

## 過剰排卵処理法と経膈採卵法の組み合わせによる胚生産の検討

児玉英樹・千葉伸\*・野口龍生・大和貢・吉川恵郷

### はじめに

ウシ胚の安定確保は、受精卵移植技術の普及拡大と定着を推進するために重要な技術課題となっている。胚の確保は、卵胞刺激ホルモン(Follicle Stimulating Hormone:FSH)とプロスタグランジンF<sub>2α</sub>の併用による過剰排卵処理(Superovulation:SOV)法が現在広く普及している。しかしながら、この方法による胚生産は、反復処理や供胚牛の加齢により、採胚個数、正常胚率が低下することが報告されており<sup>9</sup>新たな手法の開発が求められている。このような中で、生体から未成熟卵子を採取する経膈採卵法(Transvaginal Ovum Pick-Up:OPU)が開発され、採取した卵子は体外受精(In Vitro Fertilization:IVF)技術によって血統が明らかな胚を生産することが可能となった。そこで、我々は同一牛から短期間により多くの胚を生産することを目的にSOVとOPUの組み合わせ比較と野外応用の技術検討を行った。

表2 過剰排卵処理法と経膈採卵の組み合わせ(試験2)  
 試験区(OPU実施区)

発情 Day0	木 Day9~14	金	土	日	月	火	水	木	金
	FSH-5AU	3AU	2AU		Heat	AI	OPU	IVF	
朝	US		+PG			IVM			
夕	FSH-5AU	3AU	2AU		AI			VC	CT

翌週採胚

対照区(OPU未実施区)

発情 Day0	木 Day9~14	金	土	日	月	火	水	木	金
	FSH-5AU	3AU	2AU		Heat	AI			
朝	US		+PG						
夕	FSH-5AU	3AU	2AU		AI				

翌週採胚

FSH: アントリン 10R PG: クロプロステノール 500 μg(エストラメイト)  
 IVM: 体外成熟培養 IVC: 体外発生培養 CT: 分割検査 US: 超音波診断

\*岩手県農林水産部畜産課

### 試験方法

#### 1. SOVとOPUの組み合わせによる胚生産の検討

SOV前にFSHを前処置した後にOPUを実施した試験1とSOV時の誘起発情による人工授精(Artificial Insemination:AI)後にOPUを実施した試験2に区分し、1999年から2001年にかけて実施した。

#### (1) 試験牛

試験1, 2とも、所内繋養の黒毛和種経産牛各40頭を

表1 過剰排卵処理法と経膈採卵の組み合わせ(試験1)

発情→FSH±PVP→経膈採卵→過剰排卵処理→人工授精→採胚  
 Day0 Day1or2 Day3or4 Day9~14 Day0 Day7

試験区	頭数	FSH投与量	PVP溶媒	OPU
A	5	0AU	-	+
A'	5	0AU	+	+
B	4	5AU	-	+
B'	6	5AU	+	+
C	6	10AU	-	+
C'	4	10AU	+	+
D	10	対照区		-

用いた。

## (2)FSH 前処置と OPU の組み合わせ比較

FSH はアントリン R (デンカ製薬) を生理食塩水または 30% ポリビニルピロリドン K30(PVP) で溶解し、筋肉内に 1 回注射した。FSH 投与時期は、発情日を 0 日とし、1～2 日目に行った。OPU は、小卵胞が最も多く存在する発情後最初の卵胞波 (3～4 日目) に実施し、SOV は 9～14 日目の黄体期に開始した。

試験 1 の FSH 前処置投与量は、0.5, 10AU の 3 区 (A, B, C) と FSH の持続効果をねらいとした PVP<sup>®</sup> を溶媒とした区 (A', B', C') をそれぞれの FSH 量に応じて区分し対比した。また OPU 未実施区を対象区 (D) とし、試験 1 の区分とスケジュールを表 1 に示した。

## (3)SOV プログラム中の OPU

試験 2 では、SOV プログラム中の AI 後 1 日目に OPU を行ない IVF 胚生産を行った。対照区は OPU 未実施区とし、この試験のスケジュールを表 2 に示した。

## (4)SOV 方法

試験 1, 2 の SOV は、発情 9～14 日目の間に開始し、FSH 量は 20AU/head の 3 日間減量投与方法とした。処理開始 48 時間後に PGF<sub>2α</sub> 類縁体 (住友製薬: エストラメイト以下 PG) を 2ml 筋肉内注射して発情を誘起させ、AI 後 7 日目に子宮灌流法により胚を回収した。

## (5)OPU 方法

OPU は、超音波診断装置 (ALOKA 社製: SSD-500) に採卵針ガイドを取り付けた 5Mhz のコンベックス型プローブ (ALOKA 社製) を用いた。吸引器 (FHK 社製: MODEL-FV4) 及び One-Way 採卵針 (FHK 社製: 17G × 530mm または ミサワ医科工業: 17G × 500mm) を用い、吸引圧 100mmHg で卵胞液を採取した。回収液は 1% 子牛血清加 PBS+Hepalin-10u/ml (H+PBS) を使用した。また、この診断装置で卵巣中の卵胞を観察した。

## (6)体外受精方法

検卵後の未成熟卵子は卵丘細胞の付着状況などにより G1 から G6 に分類し (表 3)、G1 から G3 までを正常卵子として成熟培養に供した。成熟培養は、卵子成熟、共培養用培養液 (機能性ペプチド研究所製: IVMD101)

を用い、38.5℃、5%CO<sub>2</sub>+95%air 条件で 22～24 時間実施した。媒精は媒精液 (同所製: IVF100) を用い、同培養条件下で 6 時間行った。胚の前培養は IVMD101 で 24 時間実施し、その後は裸化卵子培養液 (同所製: IVD101) により、38.5℃、5%O<sub>2</sub>+5%CO<sub>2</sub>+90%N<sub>2</sub> の条件下で培養し、3～4 日目に培養液を半量交換、7～9 日目の胚盤胞発生状況を調査した。

## (7)統計処理

試験 1 は D.B.Duncan の多重範囲検定法、試験 2 では t 検定を用いて有意差の検定を行った。

## 2. OPU により採取した未成熟卵子輸送方法の野外応用試験

OPU で採取した未成熟卵子をその後の成熟及び発生率を損なわないよう野外から体外受精施設まで輸送する方法について検討した。

### (1)供試牛

所内繁用の黒毛和種経産牛延べ 48 頭を用いた。

### (2)試験方法

OPU および体外受精方法は前述の手法により実施し、媒精後 7 日目の胚盤胞発生率によって評価した。

#### ①成熟培養までの時間比較

OPU による未成熟卵子回収から成熟培養までの所要時間については、1 時間未満を A 区、1 時間以上 2 時間半以内を B 区とし、分割率と発生率を比較した。

#### ②成熟培養条件の比較

A 区は、IVMD101 を用いて卵子を 0.25ml のストローに充填し、37℃ で 3 時間保存した。その後卵子をストローから取り出し、プラスチックディッシュ内の IVMD101 に移し変えて 38.5℃、5%CO<sub>2</sub>+95%air の条件で 19～20 時間、成熟培養した。B 区は、IVMD101 を用いて卵子を 0.25ml のストローに充填し、ストロー内で 37℃、21～23 時間、成熟培養した。C 区は PBS 中で 3 時間保存後、IVMD101 で 19～21 時間成熟培養を実施した。D 区は前述の IVMD101 による成熟培養を実施し、対照区とした。なお、IVMD101 は 5%CO<sub>2</sub> の気相に平衡してから使用した。

#### ③成熟培養液の検討

IVMD101 による成熟培養液は炭酸ガス培養装置を必要とする。野外応用の利便性から 10%FCS 加 HanksTCM199 を用いて 37℃、孵卵器内で成熟培養を行い試験区とした。対照区は IVMD101 による成熟培養とした。この試験における卵子は、食肉処理場由来卵巣から採取した。

### (3)統計処理

カイ二乗検定法により有意差の検定を行った。

表 3 未成熟卵子の分類

G1: 細胞質に異常が見られず 3 層以上の卵丘細胞が付着
G2: 細胞質に異常が見られず 1～2 層の卵丘細胞が付着
G3: 細胞質に異常が見られず卵丘細胞が一部付着
G4: 裸化
G5: 膨化
G6: 変性

表4 FSH前処置によるOPU時の卵胞サイズ別個数 (mean ± S.D.)

区	大卵胞	中卵胞	小卵胞
A	1.2 ± 1.1	1.8 ± 1.8 <sup>b</sup>	19.0 ± 5.1
A'	0.8 ± 0.4	4.0 ± 1.6	16.0 ± 6.9
B	2.5 ± 3.0	5.0 ± 1.4	12.5 ± 3.3
B'	3.5 ± 2.2	6.7 ± 3.3 <sup>a</sup>	16.5 ± 7.5
C	1.5 ± 1.5	4.8 ± 2.6	13.0 ± 6.2
C'	2.8 ± 2.5	2.8 ± 1.0	11.3 ± 8.3

大卵胞：直径8mm以上、中卵胞：8～5mm、  
小卵胞：5mm未満  
a,b：異符号間で有意差有り (p<0.05)

表5 採取した卵子の性状 (mean ± S.D.)

区	総卵胞数	採取卵胞数	正常卵胞数*	正常卵胞率
A	22.0 ± 4.2	15.0 ± 7.1	11.8 ± 6.7	78.7
A'	20.8 ± 6.6	12.4 ± 5.1	10.2 ± 4.7	82.3
B	20.0 ± 2.9	11.0 ± 2.2	8.3 ± 2.9	75.5
B'	26.7 ± 7.8	15.5 ± 6.5	14.0 ± 6.4	90.3
C	19.3 ± 4.8	13.7 ± 5.1	11.2 ± 6.0	81.8
C'	16.8 ± 7.2	10.0 ± 7.4	7.0 ± 9.1	70.0

\*正常卵胞：G1～G3

## 試験結果

### 1. 試験1

#### (1)OPU時の卵胞所見

FSH前処置を実施した結果、FSH投与区で卵胞のサイズが増加する傾向が認められ、直径5～8mmの中卵胞数はB'区がA区と比較し有意に多かった。5mm未満の小卵胞数はA、A'、B区が多い傾向が認められ、成績を表4に示した。

#### (2)採取した卵子の性状

採取卵胞数ではA、B'区で高い傾向が認められ、正常卵胞率ではB'区が最も高かった。また、採取卵胞数、正常卵胞数ともにC'区が最も低く、成績を表5に示した。

#### (3)体外受精成績

各試験区とも分割率と発生率に差は認められなかった。また、全ての試験区で1頭あたり1～2個の胚盤胞が得られた(表6)。

#### (4)過剰排卵処理成績

SOV成績を表7に示した。OPUを実施した全ての試

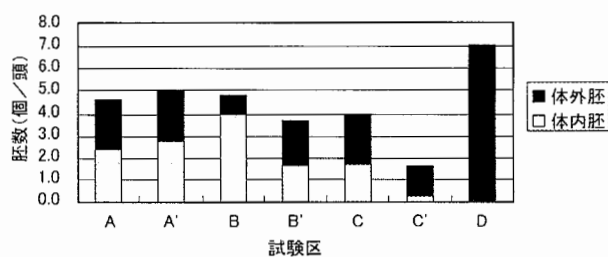


図1 OPUとSOVによる総胚生産

表6 体外受精成績その1 (mean ± S.D.)

区	培養卵胞数	分割胚数	分割率	胚盤胞発生数	発生率
A	10.2 ± 6.0	6.6 ± 6.1	64.7	2.2 ± 2.0	21.6
A'	10.0 ± 3.9	8.2 ± 3.9	82.0	2.2 ± 1.3	22.0
B	8.0 ± 2.7	5.3 ± 2.4	65.6	0.8 ± 1.0	10.0
B'	14.0 ± 6.4	9.7 ± 5.9	69.0	2.0 ± 1.7	14.3
C	10.8 ± 6.2	6.7 ± 5.5	61.5	1.7 ± 1.4	15.7
C'	5.5 ± 6.4	3.5 ± 4.4	63.6	1.3 ± 1.9	23.6

表7 過剰排卵処理成績その1 (mean ± S.D.)

区	推定黄体数	回収胚数	正常胚数	正常胚率
A	3.6 ± 3.8	3.2 ± 4.6	2.4 ± 3.6	75.0
A'	4.4 ± 4.5	4.2 ± 4.5	2.8 ± 2.9	66.7
B	7.0 ± 5.9	5.8 ± 6.4	4.0 ± 5.6	69.0
B'	3.8 ± 2.9	2.7 ± 2.9	1.7 ± 2.7	63.0
C	4.2 ± 5.5	3.8 ± 5.3	2.2 ± 3.7	57.9
C'	2.3 ± 3.3	0.5 ± 1.0	0.3 ± 0.5	60.0
D	7.5 ± 4.5	7.9 ± 4.7	7.2 ± 5.0	91.1

験区で対照区より回収胚数、正常胚数が低い傾向を示した。いずれの区においても成績間に有意差は認められなかった。CとC'区ではSOV後に発情が認められなかった例がそれぞれ2/4頭、1/6頭、B区を除く全ての試験区で採卵時に黄体形成が認められなかった例が6/26頭あり、OPU実施区において30頭中9頭の採卵が実施できなかった。

#### (5)OPU + IVFとSOVによる総胚生産

両法を組み合わせた総胚生産数を図1に示した。SOV成績の低下により全ての試験区において対照区よりも少なかった。個体別に見るとOPU + IVFにより体外胚が生産された個体は25/30頭(83.3%)であった。SOVで正常胚が回収された個体は13/30頭(43.3%)であり、かつ体外胚も生産された個体は11/30頭(36.7%)であった。

表8 過剰排卵処理成績その2 (mean ± S.D.)

区	頭数	推定黄体数	回収胚数	正常胚数	正常胚率	A～Bランク率
試験区	20	8.6 ± 5.9	6.3 ± 6.1	2.9 ± 3.7	45.2	77.2(44/57)
対照区	20	8.7 ± 6.6	5.3 ± 6.7	1.7 ± 2.3	31.1	78.9(26/33)

\*A～Bランク率：(A～Bランク胚数/正常胚数)

表9 卵子回収から成熟培養までの所要時間と発生率の比較

試験区	所要時間	実施頭数	供試卵数	分割胚数 (%)	発生胚数 (%)
A	1時間未満	5	58	45 (77.6)	12 (20.7) <sup>a</sup>
B	1時間以上 2時間半以内	5	62	42 (67.7)	4 (6.5) <sup>b</sup>

a,b: 異符号間で有意差有り (p&lt;0.05)

表10 成熟培養条件の違いによる発生率の比較

試験区	ストロ-内 保存液	ストロ-内 保存時間	頭数	供試卵数	分割胚数 (%)	発生胚数 (%)
A	IVMD101	3	16	177	152 (85.9)	35 (19.8)
B	IVMD101	21-23	3	31	18 (58.1)	3 (9.7)
C	PBS	3	3	34	14 (41.2)	3 (8.8)
D (対照区)			16	190	160 (84.2)	40 (21.1)

表11 HanksTCM199による体外受精成績

区	成熟培地	気相	回数	供試卵数	分割胚数 (%)	発生胚数 (%)
試験区	10%FCS+ HanksTCM199	air	3	58	46 (73.9)	13 (22.4)
対照区	IVMD101	5%CO <sub>2</sub> , 95%air	3	62	52 (83.9)	14 (22.6)

## 2. 試験2

### (1)OPU時の卵胞所見

OPU時の卵胞数は1頭あたり14.1±5.3個であり、採取卵子数と正常卵子数は、それぞれ4.8±3.4個(33.1%)、3.2±2.9個(22.8%)であった。

### (2)体外受精成績

1頭当りの培養卵子数は3.2±2.9個で、分割率は59.4%であったが胚盤胞まで発生するには至らなかった。

### (3)SOV成績

SOV成績(表8)は、黄体数、総胚数、正常胚数、正常胚率、A～Bランク率、全ての項目において有意差が認められなかったが、試験区の正常胚率に高い傾向が見られた。

## 3. OPUにより採取した未成熟卵子輸送方法の野外応用試験

### (1)OPUによる未成熟卵子回収から成熟培養までの所要

### 時間の検討

A区は分割率77.6%、発生率20.7%であったのに対し、B区は分割率67.7%、発生率6.5%と低く、2区間の発生率に有意差が認められた(表9)。

### (2)成熟培養条件の検討

対照区の発生率21.1%に対し、A,B,C区はそれぞれ19.8%、9.7%、8.8%であり、IVMD101を保存液としたA区は対照区と同等の成績であった(表10)。

### (3)成熟培養液の検討

試験区は、分割率73.9%、発生率22.4%であり、対照区のそれぞれ83.9%、22.6%との間に有意差が認められなかった(表11)。

## 考 察

今回、我々は一発情期中により多くの胚生産を行うことを目的にSOVとOPU-IVFを組み合わせた胚生産の検討を行った。

試験1では、FSHを前処置することで大卵胞数と中卵胞数が増加する傾向が見られ、特に5AU-FSH+PVPを投与したA区でFSHを投与しないC区より中卵胞数が有意に増加した。轟木らは<sup>8)</sup>、OPU前にFSHを投与することで中卵胞数が有意に増加し、1頭当りの吸引時間が短縮したと報告しており、我々も同様の成績であった。また、Goodhandらは<sup>9)</sup>、OPU前にFSH9mgを3日間減量投与した場合、無処置のものより総卵胞数、吸引卵胞数、正常卵子数の増加を認めている。さらにBolsらは<sup>7)</sup>、OPU時卵胞数が少なかったドナーにFSHとLHを投与することで総卵胞数が増加したと報告している。しかし、我々の成績ではFSH投与区で卵胞のサイズは増加する傾向にあるものの総卵胞数の増加は認められなかった。

過剰排卵成績は、OPUを実施しない対照区と比較して、OPUを実施した全ての試験区では低い傾向を示した。轟木らは、同様の試験でPVP投与区がFSHの有無に関係なく採胚総数、移植可能胚数、正常胚率ともに高い傾向を認めているが、我々の成績と異なるものであった。この理由として、試験区ではSOV後に発情や採胚時に黄体形成が認められなかった例があり、採胚を実施した個体が全体の70%に減少したことが要因として考えられた。

試験2では、SOVのAI後にOPUを行う胚生産を検討した。OPU時の超音波診断像による卵巣所見から、1頭当り14.1±5.3個の卵胞が確認されたが、採取卵子数及び正常卵子数はそれぞれ4.8±3.4個、3.2±2.9個と少なかった。渡邊らは<sup>9)</sup>、過剰排卵処理の発情から48時

間後に OPU を行ない、総卵胞数  $15.7 \pm 6.1$  個、採取卵子数  $8.5 \pm 4.6$  個、AB ランク卵子数  $3.2 \pm 3.3$  個であったとし、林ら<sup>2)</sup>も SOV の初回 AI 後 24 時間目に OPU を行ない、超音波診断像からは中型および小型卵胞が 10 個以上認められるものの、吸引した良質卵子数は少なかったとそれぞれ報告している。これらのことから、SOV-AI 後 1 日目の卵巣内には、IVF に供試できる卵子数が少ないと推察された。今井<sup>3)</sup>は OPU-IVF による胚生産の効率は、採取する卵子の個数に影響すると報告している。今回我々は、 $3.2 \pm 2.9$  個/頭の卵子を用いて IVF を行ったが、8 細胞期あたりで発生を停止する胚が多く、胚盤胞まで発生するには至らなかった。しかし、林ら、渡邊らは、同様の試験で  $1.1 \pm 0.7$  個、 $0.9 \pm 1.1$  個の体外胚生産が可能であったと報告しており、今後発生しなかった要因について検討する必要がある。

SOV 後に OPU を実施した採卵成績は、正常卵率が対照区よりも高い傾向が見られた。林らも同様の成績を報告している。このことは、過剰排卵処理で排卵せずに残った大卵胞からの過剰なエストロゲン作用が、卵管や子宮の内部環境に影響し、胚の発育異常が起これと考えられており、OPU の実施によりこの要因を排除したことによる効果と推察した。

OPU 由来卵子は、発生率の低下を防ぐために回収後 1 時間以内に成熟培養に供することが重要であった。また、IVMD101 を用いストロー内で卵子を 3 時間保存後、ストローから取り出し成熟培養を実施した場合の発生率は、対照区と差が認められなかった。林ら<sup>3)</sup>は食肉処理場由来卵巣から回収した卵子を用い、IVMD101 によるストロー内での保存時間を 0,2,5,10 時間で検討し、10 時間までは成熟率に差が認められないものの IVF 後の発生率が低下することから、5 時間までの保存が適当であると報告しており、卵子のストロー内輸送方法を支持するものであった。さらに、10%FCS+HanksTCM199 培地を使用することで 37°C の孵卵器内でも成熟培養が可能であったことから、炭酸ガス培養装置がない野外での卵子輸送に応用可能と考えられた。

今回の試験から、過剰排卵処理法と経膣採卵を組み合わせた胚生産は、過剰排卵処理中に体外胚の生産が可能であり(試験 1)、SOV-AI 後に OPU を実施することで、正常胚率が向上する成績を得た(試験 2)。しかし、野外で応用するためには、体外胚の発生率を高めることが今後の課題である。

なお、本試験は平成 11 ~ 13 年度受精卵移植普及定着化事業の共同試験 10 県(岩手、山形、栃木、新潟、岐阜、愛知、福岡、佐賀、長崎、鹿児島)によるもので、

本県で実施した成績を取りまとめたものである。

## 摘 要

我々は同一牛から短期間に多くの胚を生産することを目的に SOV と OPU の組み合わせ比較と野外応用の技術検討を行った。

その結果、発情後最初の卵胞波での OPU-IVF は、FSH 前処置の有無にかかわらず 1 ~ 2 個/頭の体外胚生産が可能であった。しかし、その後の過剰排卵処理成績が低下する傾向にあった。また、SOV-AI 後 1 日目の OPU-IVF は、採取した正常卵子数が  $3.2 \pm 2.9$  個と少なく胚盤胞発生には至らなかったが、過剰排卵処理成績における正常胚率が向上する傾向を認めた。OPU を野外で応用するための技術検討結果から、生体から回収した卵子は 1 時間以内に検卵を終了し、IVMD101 を用いて卵子をストロー内に充填、37°C に保温し 3 時間以内に体外受精施設まで輸送することが、その後の発生率を損なわない手法として有効であった。

さらに 10%FCS+HanksTCM199 培地は、炭酸ガス培養装置がない野外での卵子輸送に応用可能と考えられた。

## 引用文献

- 1) 江邑明, 式村茂(1994), PVP 溶解 FSH1 回投与による過剰排卵処理の簡易化(予報), 平成 6 年度家畜改良センター年報, 104-106
- 2) 林史弘, 轟木淳一, 溝下和則, 山口浩, 窪田力(2002), 過剰排卵処置法と経膣採卵の組み合わせによる胚生産の検討(第 3 報), 鹿児島県肉用牛改良研究所研究報告第 7 号, 13-15
- 3) 林史弘, 窪田力, 轟木淳一, 溝下和則, 山口浩(2002), 吸引卵子の保存時間の検討, 鹿児島県肉用牛改良研究所研究報告第 7 号, 16-18
- 4) 今井敬(2002), OPU-IVF による胚生産の効率と問題点, 第 17 回東日本受精卵移植技術研究会大会講演要旨: 20-21
- 5) K.L.Goodhand, P.J.Broadbent, J.S.M.Hutchinson, R.G.Watt, M.E.Staines and L.C.Higgins(1996), In-Vivo Oocyte Recovery and In-Vitro Embryo Production in Cattle Pre-Treated with FSH, Progesterone and Estradiol. Theriogenology.45:355(abst)
- 6) 小西一之, 鈴木一男(1994), 黒毛和種供胚牛の分娩をはさんだ反復過剰排卵処理, Journal of Reproduction

- and Development, Vol.40, No5
- 7) P.E.J.Bols, A.Van Soom, G.Vanroose, A.de Kruif (1996), Transvaginal Oocyte Pick-Up in Infertile Belgian Blue Donor Cows: Preliminary Results. *Theriogenology*.45:359(abst)
- 8) 轟木淳一, 窪田力, 溝下和則, 山口浩, 田原則雄 (2001), 過剰排卵処置法と経膈採卵の組み合わせによる胚生産の検討 (第2報), 鹿児島県肉用牛改良研究所研究報告第6号, 17-22
- 9) 渡邊貴之, 大谷直人, 山形重喜, 三谷和則, 伊藤義文, 小野寺健一 (2002), 過剰排卵処理と生体卵子吸引を組み合わせた短期間胚生産, 第17回東日本受精卵移植技術研究会大会講演要旨: 54-55
- 10) 柳澤文子, 山内武司, 船内克俊, 壺岐直史, 内山京子, 湊芳明, 花田章 (2002), ウシ体外受精における多精子受精の粘性培地による防御, 第17回東日本受精卵移植技術研究会大会講演要旨: 36-37