

種々のホルモン前処理がウシ生体卵巣からの 採取卵子数に及ぼす影響

岡崎尚之¹⁾ 長谷川清寿 山田彰司 安部茂樹

要約 黒毛和種雌牛から経膈採卵 (OPU) 時の採取卵子数の向上を図るため、OPU前のゴナドトロピン放出ホルモン (Gn-RH) および卵胞刺激ホルモン (FSH) の投与がその後の採取卵子数に及ぼす影響について調査し、採取した卵子は体外成熟、受精および発生培養を行い、卵子の正常性について調査した。

供試牛は場内繋養の黒毛和種経産牛5頭を供試し、Gn-RHを投与するGn-RH区およびFSHを投与するFSH区に分け、卵巣動態の観察を行った。また、Gn-RH区およびFSH区でOPUにより採取した卵子の正常性について、既報¹⁾に準じたIVMFCを行い、卵割率および胚盤胞期胚への発生率を観察することで確認した。

卵巣動態の観察結果では、Gn-RH区で投与48時間後の総卵胞数 36.4 ± 6.5 個 (平均値 \pm 標準誤差) が投与前 31.6 ± 7.2 個に比べ有意に増加した ($p < 0.05$)。また、FSH区では、投与24時間後の5 ~ 7 mmサイズの卵胞数 14.8 ± 5.1 個が投与前 5.2 ± 1.9 個と比べ有意に増加した ($p < 0.05$)。

各区のOPU後の採卵成績は、Gn-RH区、FSH区および対照区の1頭1回あたりの採取卵子数は、 21.0 ± 5.1 個、 19.8 ± 5.0 個および 21.4 ± 4.9 個であり、各区に差は認められなかった。採取した卵子の体外受精への供試可能な割合は、Gn-RH区が $90.1 \pm 3.1\%$ 、FSH区が $94.6 \pm 1.7\%$ 、対照区が $79.2 \pm 6.5\%$ であり、FSH区が対照区に比べ高かった ($p < 0.05$)。これらの卵子を供試して体外受精を行った結果、体外受精後の1頭1回あたりの卵割率、胚盤胞期胚発生数および発生率は、Gn-RH区が $70.0 \pm 7.2\%$ 、 3.7 ± 1.3 個および $14.0 \pm 5.0\%$ 、FSH区が $69.7 \pm 9.0\%$ 、 2.8 ± 1.0 個および $10.5 \pm 3.7\%$ 、対照区が $68.0 \pm 6.4\%$ 、 1.6 ± 0.5 個および $8.0 \pm 2.8\%$ であり、Gn-RH区の胚盤胞期胚への発生率が高い傾向であった。

以上のことから、OPU前のホルモン前処理は、ウシ卵巣中に存在する卵胞の発育を促し、直径2 ~ 4 mmあるいは5 ~ 7 mmサイズの卵胞数を増加させることにより、採取卵子周囲の卵丘細胞付着状況を向上させる、すなわち形態的品質を向上させることが示唆された。さらに体外受精に供試可能な卵子の割合を向上させ、その後の胚盤胞期胚発生率を改善できる可能性があると思われた。

キーワード：ウシ 生体内卵子採取 (OPU) ホルモン処理 体外受精 胚発生

牛の生体内から卵子を吸引採取する経膈採卵 (OPU) 技術は、体外成熟、受精および発生培養 (IVMFC) 技術と組み合わせることにより、過排卵処理が不可能な初期妊娠牛あるいは過排卵処理に対する反応性の低い雌牛および老齢牛からの効率的な胚生産に応用されている^{6, 15)}。しかし、OPUによる採卵成績は、採取卵子数およびIVMFCへ供用可能な卵子数に個体差が大きく、さらにIVMFC成績においても同様なことが報告されている^{9, 14, 15)}。よって、採取卵子数等のOPU成績の向上ならびに体外受精後の移植可能胚作出効率の改善 (発生数および発生率の向上) を図るため、OPU間隔の短縮^{7, 8)}、卵胞刺激ホルモン (FSH)^{1, 2, 5, 8, 16)} あるいは馬絨毛性性腺刺激ホルモン (eCG)^{17, 18)} の投与後のOPUについて検討されている。

今回、黒毛和種雌牛からOPU時の採取卵子数の

向上を図るため、OPU前のゴナドトロピン放出ホルモン (Gn-RH) および卵胞刺激ホルモン (FSH) の投与がその後の採取卵子数に及ぼす影響について調査した。併せて、採取した卵子は体外成熟、受精および発生培養を行い、卵子の正常性について調査した。

材料および方法

実験1：

実験1では、Gn-RHおよびFSH投与が、その後の卵巣内の各サイズの卵胞数の動態に及ぼす影響について調査した。供試牛は場内繋養の黒毛和種経産牛5頭を用い、発情周期に関係なく供試した。試験区分は、Gn-RH (酢酸フェルチレリン、コンセラー；武田製薬) 100 μ gを投与するGn-RH区およびFSH (アントリンR；デンカ製薬) 5AUを8時間間

隔で2回投与するFSH区とした。卵巣動態の観察は、卵巣内に存在する直径2～4mm、5～7mmおよび8mm以上の各サイズの卵胞数を超音波画像診断装置 (Aloka、SSD-1200) を用いて投与前から経時的に計測した。

実験2：

実験2では、2種類のホルモン投与処理がその後のOPU成績に及ぼす影響について調査した。場内繋養の黒毛和種経産牛8頭を供試牛として用い、Gn-RH投与 (Gn-RH区) およびFSH投与 (FSH区) の前処理後に経膈採卵を行う区と、無処理後に行う区 (対照区) に区分し、各区について1～2回行った。2種類のホルモン投与は、発情周期に関係なく投与し、投与からOPU実施までの間隔は実験1の成績をもとに決定した。OPUの実施は1週間に1回の割合で行った。

卵巣からの卵子吸引は、吸引針ガイドセットを装着した牛経膈穿刺用7.5MHzコンベックス型プローブ (Aloka、UST-9106P-7.5) に、ダブル・ルーメンニードル (COOK-IVF、K-OPSD-1760) の穿刺針を用いて、卵胞卵子吸引システム (COOK-IVF、K-MAR-4000、K-MAR-5115) により、吸引圧100mmHgで行った。灌流液は、ヘパリン (3IU/ml) を添加した修正PBSを用いた。採取した卵子は、Haslerら⁹⁾の卵母細胞タイプ別区分に従い採取した卵子周囲の卵丘細胞の付着状況から～クラスに区分した。

次に、からクラスの卵子を、既報¹⁾に準じて、IVMFCを行い、卵割率および胚盤胞期胚への発生率を観察した。

統計解析：

統計解析は、Student's t-testおよび分散分析により行った。

結 果

実験1：

各区の卵巣動態を処理前から経時的に観察した結果 (表1)、Gn-RH区の2～4mm、5～7mmおよび8mm以上の各サイズの卵胞数および総卵胞数 (平均値±標準誤差) は、投与48時間後が29.8±5.2個、4.8±1.3個、1.8±0.7個および36.4±6.5個であり、投与前の24.2±6.2個、5.8±2.1個、1.6±0.7個および31.6±7.2個に比べ、2～4mmサイズの卵胞数が増加する傾向にあり、また、総卵胞数で有意に増加した (p<0.05)。FSH区では、投与24時間後が31.4±7.9個、14.8±5.1個、1.4±0.4個および47.6±12.7個であり、投与前の34.0±9.7個、5.2±1.9個、1.2±0.4個および40.4±10.8個に比べ、5～7mmサイズの卵胞数が有意に増加した (p<0.05)。

実験2：

各区のOPU後の採卵成績は表2に示した。

Gn-RH区、FSH区および対照区の1頭1回あたりの採取卵子数 (平均値±標準誤差) は、21.0±5.1個、19.8±5.0個および21.4±4.9個であり、各区

表1 実験1：Gn-RHおよびFSH処理後の卵巣動態

試験区	卵胞サイズ ^a	処理前	処理後 ¹⁾
Gn-RH (n=5)	2-4mm	24.2±6.2	29.8±5.2
	5-7mm	5.8±2.1	4.8±1.3
	≥8mm	1.6±0.7	1.8±0.7
	Total	31.6±7.2 ^b	36.4±6.5 ^a
FSH (n=5)	2-4mm	34.0±9.7	31.4±7.9
	5-7mm	5.2±1.9 ^b	14.8±5.1 ^a
	≥8mm	1.2±0.4	1.4±0.4
	Total	40.4±10.8	47.6±12.7

値は平均値±標準誤差

異符号間に有意差有り a,b;p<0.05

1) Gn-RH区は48時間後、FSH区は24時間後の値

表2 実験2：各区の採取卵子個数および採取卵子の卵母細胞タイプ別採取状況

区 分	採取卵子数	卵母細胞タイプ別個数			
		I	II	III	IV
Gn-RH区 (n=9)	21.0±5.1	8.3±2.0 (38.5±6.5)	6.4±1.8 (31.2±5.1)	3.7±1.4 (20.5±7.5)	2.6±1.1 (9.9±3.1)
FSH区 (n=9)	19.8±5.0	8.1±2.5 (42.5±7.8)	8.6±2.7 (43.0±5.5)	2.0±0.9 (9.1±3.4)	1.1±0.4 (5.4±1.7)
対照区 (n=9)	21.4±4.9	5.6±1.4 (32.0±9.4)	8.3±3.0 (32.9±8.3)	3.0±0.8 (14.3±4.8)	4.6±1.8 (20.8±6.5)

値は平均値±標準誤差

()内の値は各タイプ別卵子の割合

タイプ別卵子率=各タイプ卵子数/総採取卵子数×100

に差は認められなかった。採取した卵子をHaslerら (1995) の卵子周囲の卵丘細胞付着状況によるタイプ分けに従い、区分した結果 (図1)、体外受精に供試可能と思われるタイプ、およびの卵子個数はGn-RH区が 18.4 ± 4.2 個、FSH区が 18.7 ± 4.5 個、対照区が 16.9 ± 3.9 個であり、ホルモン処理区が多い傾向であった。採取卵子に対するタイプ、およびの割合は、Gn-RH区が $90.1 \pm 3.1\%$ 、FSH区が $94.6 \pm 1.7\%$ 、対照区が $79.2 \pm 6.5\%$ であり、FSH区が対照区に比べ高かった ($p < 0.05$)。

タイプ、およびの卵子を供試して体外受精を行った結果、体外受精後の1頭1回あたりの卵割率、胚盤胞期胚発生数および発生率は、Gn-RH区が $70.0 \pm 7.2\%$ 、 3.7 ± 1.3 個および $14.0 \pm 5.0\%$ 、FSH区が $69.7 \pm 9.0\%$ 、 2.8 ± 1.0 個および $10.5 \pm 3.7\%$ 、対照区が $68.0 \pm 6.4\%$ 、 1.6 ± 0.5 個および $8.0 \pm 2.8\%$ であり、Gn-RH区の胚盤胞期胚への発生率が高い傾向であった。

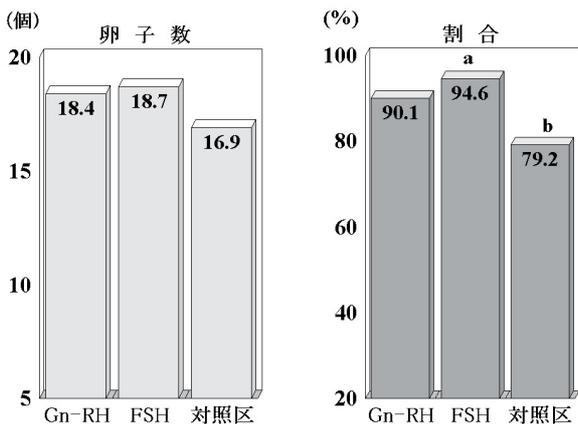


図1 経膈採卵により採取した卵子の卵母細胞タイプ別区分のタイプI、IIおよびIIIの卵子個数と総卵子数に対する割合。異符号間に有意差あり、a,b: $p < 0.05$ 。

表3 実験2：各区の体外受精後の卵割および胚盤胞期胚への発生状況

区分	供試回数	供試卵子数	卵割卵子数	胚盤胞期胚数
Gn-RH区	9	18.4 ± 4.4	12.0 ± 3.0 (70.0 ± 7.2)	3.7 ± 1.3 (14.0 ± 5.0)
FSH区	9	18.0 ± 4.6	12.2 ± 3.4 (69.7 ± 9.0)	2.8 ± 1.0 (10.5 ± 3.7)
対照区	9	16.4 ± 3.9	12.2 ± 3.1 (68.0 ± 6.4)	1.6 ± 0.5 (8.0 ± 2.8)

値は平均値±標準誤差

()内は卵割率(%)および発生率(%)

卵割率 = 卵割卵子数 / 供試卵子数 × 100

胚盤胞期胚発生率 = 胚盤胞期胚数 / 供試卵子数 × 100

考 察

OPU技術は生体内卵巢から超音波画像診断装置と経膈用プローブを用いて卵胞内卵子を採取する技術であり、このOPUとIVMFC技術を組み合わせることにより、胚の大量生産および子牛の生産が可能である⁵⁾。我々は、OPUとIVMFC技術の組合せによる連続的な胚生産の有効性、さらに子牛生産が可能であることをすでに示している¹²⁾。しかし、経膈採卵による採取卵子数および体外受精後の胚盤胞期胚への発生成績は個体差が大きいこと^{9, 14, 15)}が報告されている。

本試験では、黒毛和種雌牛からOPU時の採取卵子数の向上を図るため、OPU前のGn-RHおよびFSHの投与がその後の採取卵子数に及ぼす影響について調査した。

まず、Gn-RH100 μgあるいはFSH5AUの2回総量(10AU)投与後、卵巢内に存在する直径2 mm以上の卵胞数の動態について観察した。2種類のホルモン投与後、いずれの場合も2 ~ 7 mmサイズの卵胞数は増加する傾向にあり、特に最初のFSH投与後24時間目では5 ~ 7 mmサイズの卵胞数増加が、また、Gn-RH投与の場合、48時間後に総卵胞数の増加が認められた。

FSHは、発育初期卵胞の顆粒膜細胞に存在するFSHレセプターに作用し、細胞の分裂・増殖および卵胞液の分泌を促進することにより、卵胞を発育させる¹³⁾。投与後の卵巢動態の観察から、FSH2回投与後に5 ~ 7 mmサイズの卵胞数の増加が認められたことは、外因性のFSHの作用による卵胞発育を促したものと考えられる。その結果として、OPUによる採取卵子数において、卵丘細胞が1層以上付着した卵子の割合はFSH処理することにより増加する傾向

にあり、さらに裸化卵子を含めた体外受精供試可能卵子割合もFSH処理することにより増加したものと考えられる。

Gn-RHは、脳下垂体前葉からのFSHおよび黄体形成ホルモン(LH)の放出を促すばかりでなく、その合成をも促進する¹³⁾といわれている。今回、Gn-RH投与48時間後に、総卵胞数が増加したことは、Gn-RH投与

により放出されたLHが発情周期中に観察できる主席卵胞を排卵・閉鎖させ、新しいウェーブの出現を促した可能性が考えられる。投与後の卵巢動態の観察において、8 mm以上の大型卵胞の排卵を認めた個体の割合は60% (3頭/5頭)であった。Xuら¹⁹⁾およびBodensteinerら⁴⁾は、大型卵胞内の顆粒膜細胞におけるLHレセプターあるいはLHレセプターの遺伝子発現は発情から最初のウェーブ出現後2～4日の間に獲得、増加したのち、10日目には減少あるいは消失する。また、Martinezら¹¹⁾は最初のウェーブの主席卵胞の各ステージにおけるGn-RH処理に対する排卵反応は、Day3 (排卵日=Day0) 処理で89%、Day6で56%、Day9で22%、全体では56%であること、排卵を示した牛は投与から1.3日後に次のウェーブが出現することを報告している。今回、供試牛には発情周期に関係なくGn-RHを投与していることから、排卵した供試牛は次のウェーブの開始時にみられる内因性のFSHサージが、そうでないものは外因性Gn-RHによる脳下垂体からのFSH分泌が、卵胞内顆粒膜細胞に存在するFSHレセプターに働き、卵胞発育を促したものと推察される。

また、Gn-RHおよびFSH処理により、1層以上の卵丘細胞の付着した卵子の割合が高い傾向にあったのは、Gn-RHによる脳下垂体からのFSH分泌あるいは外因性のFSH処理が卵胞内顆粒膜細胞に存在するFSHレセプターに働き、顆粒膜細胞の増殖、卵胞液の分泌促進した結果、OPUによる卵子吸引時に起こり易い卵丘細胞剥離を軽減させたのではないかと思われる。

通常、体外受精に供試する卵子は、卵子細胞質の色彩や細胞質内顆粒分布の均一性等の形態および卵子を取り囲む卵丘細胞の付着状況および形態を指標に選別され、密で十分な卵丘細胞が付着し、細胞質内顆粒の分布が均一な卵子が、成熟率が高い¹⁰⁾といわれている。体外受精後の卵割率および胚盤胞期胚への発生率は、Gn-RH、FSH処理の有無に関わらず有意な差は認められないが、Gn-RHおよびFSH処理の場合の胚盤胞期胚発生率が高い傾向であったことは、卵丘細胞の付着状況と関係していると考えられる。

以上のことから、OPU前のホルモン前処理は、ウシ卵巢中に存在する卵胞の発育を促し、直径2～4 mmあるいは5～7 mmサイズの卵胞数を増加させることにより、採取卵子周囲の卵丘細胞付着状況を向

上させる、すなわち形態的品質を向上させることが示唆された。さらに体外受精に供試可能な卵子の割合を向上させ、その後の胚盤胞期胚発生率を改善できる可能性があると思われる。

引用文献

- 1) 安部茂樹ら, 日畜会報, 64 (1): 32-37, 1993.
- 2) Blondin P. et al., Theriogenology, 47: 1061-1075, 1997.
- 3) Blondin P. et al., Theriogenology, 48: 803-813, 1997.
- 4) Bodensteiner K.J. et al., Theriogenology, 45: 499-512, 1996.
- 5) Bungartz L. et al., Theriogenology, 43: 667-675, 1995.
- 6) 藤谷泰裕ら, 日畜会報, 66 (12): 1023-1030, 1995.
- 7) Garcia A. et al., Theriogenology, 50: 575-585, 1998.
- 8) Gibbons J.R. et al., Theriogenology, 42: 405-419, 1994.
- 9) Hasler J.F. et al., Theriogenology, 43: 141-152, 1995.
- 10) 家畜人工授精講習会テキスト (家畜体外受精卵移植編), 日本家畜人工授精師協会, 1993.
- 11) Martinez M.F., Anim. Reprod. Sci., 57: 23-33, 1999.
- 12) 岡崎尚之ら, 平成11年度島根県獣医学会講演要旨, 7, 1999.
- 13) 新繁殖学辞典, 家畜繁殖学会編, 文永堂出版, 1992.
- 14) 高橋博人, ETニュースレター, No.18: 25-29, 1996.
- 15) Taneja M. and X. Yang, ET newsletter, 16 (4): 10-12, 1998.
- 16) Sirard M.-A. et al., Theriogenology, 51: 699-708, 1999.
- 17) Vos P.L.A.M et al., Theriogenology, 41: 829-840, 1994.
- 18) Walton S.J. et al., Theriogenology, 39: 336, abstr. 1993.
- 19) Xu Z. et al., Biol. Reprod., 53: 951-957, 1995.