

ホルモン処理した3か月齢子牛の卵胞内フラッシングによる 卵母細胞採取の効果

藪上 剛*・富永敬一郎*・秦谷 豊**

要 約

妊馬血清性性線刺激ホルモン (PMSG) 2,000 IU 単独あるいは PMSG 2,000 IU - ヒト絨毛性性線刺激ホルモン (hCG) 1,500 IU を投与して卵胞発育を誘起した3か月齢の黒毛和種とホルスタイン種の交雑種雌子牛を開腹手術後、卵胞からの卵丘・卵母細胞複合体 (以下COCと呼ぶ) の採取効率は、ダブルルーメンニードル卵子採取器具利用法 (以下フラッシング法と呼ぶ) と18G針を付けた注射器利用法 (以下シリンジ法と呼ぶ) について比較検討し、以下のような結果が得られた。

- 1 hCGを投与した場合、直径5mm以上の卵胞数には、大きな個体差が見られた (1~104)。採卵率 (COC数) は、フラッシング法では $87.2 \pm 15.0\%$ (20.8 ± 9.5 個) (平均±標準偏差)、シリンジ法では $57.9 \pm 28.2\%$ (18.3 ± 14.2 個) と、フラッシング法の方が有意に高かった ($P < 0.05$)。
- 2 hCG無投与の場合は、直径5mm以上に発育した卵胞数がほぼ2倍に増加したが、個体差が大きく有意差は認められなかった。フラッシング法による採卵率に影響することなく、採卵数も約2倍に増加した ($P < 0.05$)。

以上の結果から、3か月齢の子牛から未成熟卵子を採取するには、PMSG単独投与法により卵胞の発育を誘起し、フラッシング法により卵胞から卵子を採取するのが効率的であることが明らかになった。

Recovery of Cumulus-Oocyte-Complexes from Ovaries by Flushing in 3-month-old Calves Treated with Gonadotropins

Tsuyoshi YABUUE, Keiichiro TOMINAGA and Yutaka HATAYA

Summary

For obtaining cumulus-oocyte-complexes (COC) from 3-month-old calves, two collection methods and two kinds of stimulation with gonadotropins were examined. COC collected 24 h after 1,500 IU hCG following 2,000 IU PMSG was significantly higher in aspirating-flushing with a double-lumen needle (flushing system) ($87.2 \pm 15.0\%$) than by traditional aspiration using an 18 gauge needle ($57.9 \pm 28.2\%$) ($P < 0.05$). The number of follicles more than 5mm in diameter widely varied in each individual (1~104).

Those more than 5mm in diameter decreased by 1,500 IU hCG injection following 2,000 IU PMSG. Mean numbers were 27.4 ± 17.5 and 56.3 ± 35.9 72 h after PMSG treatment and 24 h after hCG following PMSG treatment, respectively, these values being essentially the same. COC collected by flushing was significantly fewer in hCG and PMSG treatment than by PMSG alone.

Only PMSG treatment thus appears suitable for obtaining many follicles more than 5 mm in diameter from 3-month-old calves, and flushing more effective than a syringe.

キーワード：子牛，卵胞発育誘起処理，卵母細胞，フラッシング法，採卵率

緒 言

著者らは、4か月齢の黒毛和種から、開腹手術後、注射器を用いて吸引採取した卵丘・卵母細胞複合体（以下COCと呼ぶ）を、体外受精して胚盤胞を作出し、2頭の産子を得たことを報告したが⁸⁾、注射器を用いたCOCの採取率はばらつきが大きく、安定しなかった。そのため、COC採取効率を向上させることが、幼齢牛からより多くの産子を得るために必要であると考えられた。

近年、ヒトに利用されていた経膈卵子採取用の2wayタイプのニードルをウシの超音波誘導経膈採卵に応用して、COCの採取効率を向上させたことが報告^{6, 9)}されている。

そこで、本試験ではホルモンを用いて卵胞発育誘起処理した3か月齢雌子牛を開腹手術して、卵胞からのCOC採取効率はダブルルーメンニードル卵子採取器具を用いた方法（以下フラッシング法と呼ぶ）と、従来の18G針を付けた注射器による吸引法（以下シリンジ法と呼ぶ）について比較した。

また、hCGの投与により、膨化した卵丘に粘濁性を帯びたCOCが出現し⁸⁾、COCの採取が困難になることから、hCG投与の有無が、子牛の卵巢反応とダブルルーメンニードル卵子採取器具を用いたフラッシング法によるCOC採取効率に及ぼす影響を検討した。

材料及び方法

1 供試牛

黒毛和種（雄）とホルスタイン種（雌）の交雑種雌子牛を22頭用いた。供試牛の日齢と体重の平均±標準偏差は、92.4±3.9日と74.3±8.8kgであった。

2 子牛の卵胞発育誘起処理方法

子牛からCOCを採取するための卵胞発育誘起処理方法を図1に示した。

妊馬血清性腺刺激ホルモン（PMSG）2,000IU（国際単位）を皮下注射し、72時間後にヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（hCG）1,500IUを筋肉内注射し、その22～24時間後にCOCを採取する方法⁸⁾か、あるいはhCG無投与で、PMSG投与72時間後に採卵する方法を用いた。

シリンジ法は10頭すべてPMSG-hCG投与、フラッシング法は12頭のうち6頭をhCG無投与で採卵し、hCG投与の有無がフラッシング法の採卵率に及ぼす影響について検討した。

3 子牛からの採卵方法

子牛の保定、開腹及び卵巢の保持方法は既報⁸⁾に準じて行った。

シリンジ法では、あらかじめ10単位/mlのヘパリンを添加して37℃に加温した修正リン酸緩衝液（以下mPBSと呼ぶ）を約10ml入れたテルモ製20ml注射器を用いた。卵胞の手前から注射器に付けたテルモ製18G針（皮下用、長さ38mm）を卵巢表面に刺し、ピストンを一定圧で引きながら、直径5mm以上の卵胞を穿刺し、卵胞液とともにCOCを吸引した。1個の卵胞を吸引後、針先を卵巢表面から出さずに3～4個の卵胞を穿刺吸引し、mPBSを入れた新しい針付き注射器に交換するという操作を順次繰り返して採卵を行った。

フラッシング法を図2に示した。穿刺針（COOK製ダブルルーメンニードル：KOPSD-1725, 17G, 長さ25cm）に吸引器（FHK製FV4）を接続して使用した。ダブルルーメンニードルを用いて直径5mm以上の卵胞を穿刺して、110mmHgの吸引圧（流量20ml/min）で卵胞液とともにCOCを吸引し、アスピレーションライン（吸引管）から回収した。卵胞を穿刺吸引後、ヘパリン添加mPBSを3方向弁に取り付けた2.5ml注射器でフラッシングライン（注入管）より卵胞内に注入し、再び吸引するというフラッシング操作を2回行って採卵した。フラッシング液量は、卵胞の大きさにあわせて、0.2～0.3mlずつとした。吸引した卵胞液及びフラッシング液は、TAITEC製ドライサーモユニット内の50mlコニカルチューブ（ファルコン、2070）に回収し、採卵が終了するまで37

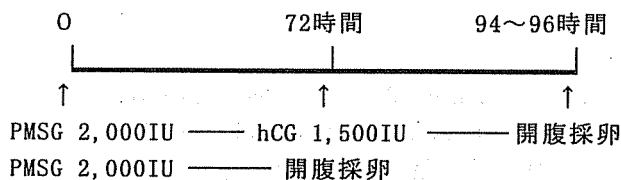


図1. 卵胞発育誘起処理方法

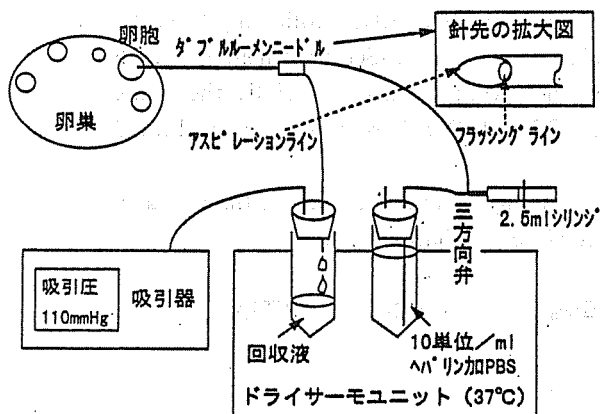


図2. ダブルルーメンニードル卵子採取器具を用いたフラッシングによる卵母細胞の吸引方法

表1. hCGの投与ならびに採卵法が採卵成績に及ぼす影響

	シリンジ法	フラッシング法	小計
hCG投与			
採卵頭数	10	6	16
吸引卵胞数 ¹⁾	28.7±20.4	25.2±12.6	27.4±17.5
採卵数	18.3±14.2	20.8±9.5 ^A	—
採卵率(%)	57.9±28.2 ^a	87.2±15.0 ^b	—
hCG無投与			
採卵頭数	—	6	6
吸引卵胞数	—	56.3±35.9	56.3±35.9
採卵数	—	46.0±23.8 ^B	—
採卵率(%)	—	87.9±14.1 ^b	—

1) 直径5mm以上の卵胞数

A B, a b : 異符号間に有意差あり (P<0.05)

℃に保温した。

回収液は、45μm200メッシュのステンレス製試験ふるい(飯田製作所、直径8cm)で濾過した後、ダルベッコ変法MEM(日水)を用いて90×20mmのシャーレに洗い流し、実体顕微鏡下でCOCを検索した。

採卵成績として、吸引した卵胞(直径5mm以上に発育した卵胞)数と採取したCOC数(以下採卵数と呼ぶ)を計測し、両者の比率を採卵率として算出した。

4 統計処理

吸引卵胞数と採卵数はt検定により有意性の判定を5%水準で行った。採卵率については、角変換後、同様の検定をした。

結 果

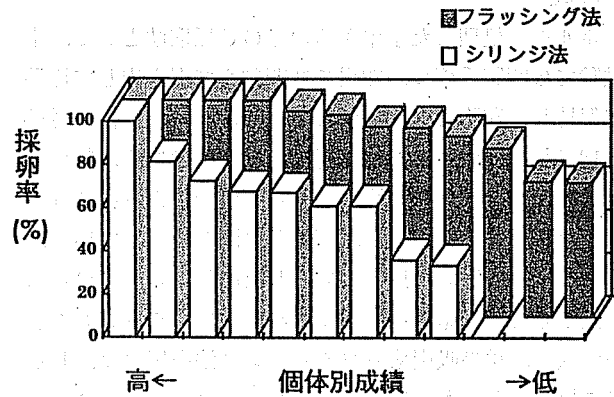
1 子牛の採卵成績

hCGを投与した3か月齢子牛からのシリンジ法とフラッシング法の採卵成績を表1に示した。

5mm以上に発育した吸引卵胞数および採卵数の1頭あたりの平均値は、シリンジ法で28.7±20.4個および18.3±14.2個、フラッシング法で25.2±12.6個および20.8±9.5個と差はなかった。しかし、5mm以上に発育した吸引卵胞数は1~104個と、卵胞発育誘起処理による卵巢反応の個体によるばらつきが大きかった。

1頭あたりの採卵率の平均値は、シリンジ法で57.9±28.2%、フラッシング法で87.2±15.0%となり、フラッシング法がシリンジ法に比べて有意に高かった(P<0.05)。

hCG投与の有無がフラッシング法の採卵成績に及ぼ



注) グラフは縦軸を採卵率とし、シリンジ法10頭、フラッシング法12頭の個別成績を採卵率が高い順に左から並べた。

図3. シリンジ法とフラッシング法の個別採卵率

す影響を表1に示した。吸引卵胞数は、hCG投与区で1頭あたり25.2±12.6個、hCG無投与区で56.3±35.9個となり、無投与区が投与区に比べてほぼ2倍に増加したが、個体差が大きく、有意差は認められなかった。一方、1頭あたりの採卵数は投与区で20.8±9.5個、無投与区で46.0±23.8個となり、無投与区が投与区に比べて有意に多かった(P<0.05)。また、採卵率の1頭あたりの平均値は、投与区と無投与区でそれぞれ87.2±15.0%と87.9±14.1%となり、ともに高い採卵率であった。また、hCG投与による排卵のため、黄体化したものが1個(1頭)みられた。

採卵率のばらつきをみるために、シリンジ法とフラッシング法の個別採卵率を図3に示した。シリンジ法の個別採卵率が0%~100%であるのに対し、フラッシング法はhCG投与区が61.8%~100%、hCG無投与区が62.5%~100%となり、採卵率100%の子牛がシリンジ法で1頭に対し、フラッシング法では4頭みられた。また、卵丘の剥がれた裸化卵は、シリンジ法で4個(3頭)みられたのに対し、フラッシング法では全くみられなかった。

考 察

近年、子牛由来の卵子から胚盤胞を作出し、子牛を生産する試みがなされている^{1, 4, 5, 7)}。子牛からのCOC採取法には開腹手術⁵⁾、腹腔鏡¹⁾、超音波経膈法²⁾が報告されている。子牛の負担を最小限にし、より正確な遺伝的情報を得るためには、安定した胚生産が必要であり、そのためには効率的なCOC採取法の確立が重要と考え

られる。

ホルモン処理した子牛からのCOC採取法として、本試験では開腹手術後、卵巣を切開創まで引き出して片手で保持し、卵胞を穿刺吸引した。しかし、注射器に付けた18G針で吸引するシリンジ法の採卵率は低く、特に直径5mm以上の大きな卵胞や、hCG処理により粘濁性を増したCOCの吸引では、回収率の問題を残している。

そこで、直径5mm以上に発育した卵胞からのCOC採取法として、卵胞液を吸引後、卵胞内にフラッシング液を注入し、再び吸引するフラッシング法を用いた。hCGを投与した3か月齢子牛において、フラッシング法の採卵率はシリンジ法より有意に高く、しかもばらつきが少ない安定した成績が得られることが本試験で明らかとなった。

卵胞発育誘起処理でPMSGに加えhCGを投与すると、3か月齢子牛の卵巣に5mm以上に発育する卵胞数がPMSG単独投与に比べ減少し、採卵数が有意に減少した。これは、hCGを投与すると成熟卵子が出現し、他の5mm以上に発育する卵胞数に影響したと推測される。著者らは、PMSG-hCG処理した4か月齢の子牛から得られた卵丘の膨化したCOCを、採取後直ちに体外受精して産子を得ており、採取したCOCの発生能及び受胎性を確認している⁹⁾。

さらに、フラッシング法では、hCG投与による卵丘の膨化したCOCの出現にもかかわらず、5mm以上の卵胞からの採卵率は高率であった。このことから、フラッシング法は、hCG投与の有無にかかわらず、ホルモン処理した子牛からのCOC採取効率に有効であることが示された。

また、フラッシング法で採取したCOCのうち、裸化卵は全くみられなかったことから、直径5mm以上の卵胞を吸引する場合、110mmHgの吸引圧は適切であったと考えられる。

多数の子牛を早期に生産して世代間隔を短縮することができれば、遺伝的改良量⁹⁾が促進される。本試験でのCOC採取は、1頭の子牛につき1回のみとしたが、今後、反復してCOCを採取できる採卵方法の開発が必要であると考えられる。

引用文献

- 1) Armstrong, D.T., P.Holm, B.A.Petersen, R.B. Stubbings, D.McLean, G.Stevens and R.F.Seamark (1992): Pregnancies and live birth from in vitro fertilization of calf oocytes collected by laparoscopic follicular aspiration: *Theriogenology* 38, 667-678
- 2) Brogliatti, G.M., and G.P.Adams (1996): Ultrasound-guided transvaginal oocyte collection in prepubertal calves: *Theriogenology* 45, 1163-1176
- 3) DUBY, D.T., P.Damiani, C.R.Looney, R.A.Fissore and J.M.Robl (1996): Prepuberal calves as oocyte donors: Promises and problems: *Theriogenology* 45, 121-130
- 4) Kajihara, Y., E.G.Blakewood, M.W.Myers, N. Kometani, K.Goto and R.A.Godke (1991): In vitro maturation and fertilization of follicular oocytes obtained from calves: *Theriogenology* 35, 220
- 5) Lazzari, G., R.Duchi, R.Landriscina, N.Colombo and C.Galli (1996): Developmental capacity of IVM-IVF calf oocytes from eCG stimulated donors of 2-3 months of age: *J.Reprod.Fertil.* 17 (abstr), 17
- 6) 宮田幸路・加藤泰之・山本広憲・安藤学・犬塚満 (1996): ウシの経膈採卵により得られた卵子の体外受精および移植成績: 第11回東日本受精卵移植技術研究会大会講演要旨, 38
- 7) Revel, F., P.Mermillod, N.Peynot, J.P.Renard and Y.Heyman (1995): Low developmental capacity of in vitro matured and fertilized oocytes from calves compared with that of cows: *J.Reprod.Fertil.* 103, 115-120
- 8) 藪上剛・福島護之・富永敬一郎・秦谷豊: PMSG-hCG処理した3及び4か月齢子牛の卵母細胞の体外受精による胚の発生能及び受胎性 (1997): 兵庫農技研報 (畜産) 33, 1-6
- 9) 山本広憲・宮田幸路・加藤泰之・安藤学・犬塚満 (1995): ダブル・ルーメンニードルを使用した経膈採卵効率化の検討: 第88回家畜繁殖学会講演要旨, 70