

経膈採卵法における連結チューブの長さ, 吸引圧及びフラッシング量がウシ卵胞卵子の採取効率に及ぼす影響

木伏雅彦*・福島護之*・野田昌伸*

要 約

超音波診断装置を用いたウシの経膈採卵法における効率的な卵胞卵子の回収を目的とし, 90cmと180cmの2種類の長さの連結チューブの採卵成績を比較した. 食肉センター由来の卵巣を用いて, 吸引圧, フラッシング量を検討し, 次いで, 180cmの連結チューブを用いて黒毛和種の経膈採卵を実施した.

1 フラッシング量 0.2ml/2sec の条件において, 90cm の連結チューブを用いた場合の卵子回収率は吸引圧 150mmHg で 91.5% と有意に高く, 正常卵丘・卵母細胞複合体 (以下 COC と呼ぶ) 回収率は 58.8% であった. 180cm の連結チューブを用いた場合の卵子回収率は, 吸引圧 100mmHg で 70.4% と有意に高く, 正常 COC 回収率は 51.6% であった.

2 180cm の連結チューブを用い, 吸引圧 100mmHg の条件において, フラッシング量を 0.3ml/2sec とした時に卵子回収率は 78.7%, 正常 COC 回収率は 54.3% と最も高かった.

3 180cm の連結チューブを用い, 吸引圧 100mmHg, フラッシング量 0.3ml/2sec の条件で, 黒毛和種7頭に対し経膈採卵を実施したところ, 卵子回収率は 57.3%, 正常 COC 回収率は 42.7% であった.

以上のことから, 180cm の連結チューブを用いても最適な条件設定を行えば, 既存の 90cm の連結チューブと変わらない回収率を得ることができると示された.

Effects of Length of Aspiration and Needle Lines, Aspiration Pressures and Flushing Volume on Recovery Rate of Bovine Oocytes by Ultrasound-guided Transvaginal Collection

Masahiko KIBUSHI, Moriyuki FUKUSHIMA and Masanobu NODA

Summary

Various lengths of aspiration and needle lines (90 and 180cm), aspiration pressures (75, 100, 125, 150 and 175mmHg) and flushing volumes (0.1, 0.2, 0.3 and 0.4ml) were used to aspirate ovarian follicles from bovine ovaries from a slaughterhouse to assess the impact on the quantity and quality of recovered immature oocytes.

(1) Recovery rate of oocytes using a 90cm aspiration line was significantly higher at an aspiration pressure of 150mmHg (91.5%) than the other pressures ($P < 0.05$).

Recovery rate of viable COCs (cumulus-oocyte complexes) was 58.8%. Using a 180cm aspiration line, recovery rate of oocytes was higher at 100mmHg (70.4%) compared with the other pressures ($P < 0.01$).

The rate of viable COCs at the pressure was 51.6%.

(2) For a 180cm aspiration line at 100mmHg, recovery rate of oocytes was higher using flushing volume of 0.3ml/2sec (78.7%) than the others ($P < 0.01$). Recovery rate of viable COCs was 54.3%.

(3) Transvaginal aspiration was conducted on Japanese Black cows ($n=7$) using a 180cm aspiration line. Recovery rates of oocytes and viable COCs were 57.3% and 42.7%, respectively. These results indicate that 180cm aspiration lines are useful for transvaginal aspiration of bovine oocytes under proper conditions.

キーワード: 超音波診断装置, 経膈採卵, 吸引圧, フラッシング, 卵丘卵母細胞

緒 言

ウシの超音波誘導経膈採卵法は、1988年のPieterseらの報告⁷⁾以来、新たな子牛生産方法として注目され、生体から繰り返し卵胞卵子を採取する方法として研究が進められてきている^{2,5,8)}。

採取法については、ダブルルーメンニードルを用いたフラッシング法の導入により、卵胞卵子回収効率が向上したが¹⁾、吸引圧、フラッシング量などの設定条件が回収率に大きな影響を与えることが報告されている¹¹⁾。また、採卵針と吸引装置を結ぶ連結チューブ(アスピレーション及びニードルライン)は、一般に用いられるチューブ長90cmではチューブが短いため作業性が悪いばかりでなく、作業中に針が折れやすいなどの欠点があり、最近、2倍の長さの180cmのチューブが試作された。本研究では、このチューブを用いて効率的な卵子の回収を行うために、まず食肉センター由来の卵巣を用いて、吸引圧及びフラッシング量の基礎的な条件設定を行い、その後、実験的に生体からの経膈採卵を実施して、その条件の適性を検討した。

材料及び方法

1 期間

1997年11月～1998年7月

2 使用機器

吸引システムとして、灌流装置であるインフュージョンポンプ(COOK社製K-MAR-4000)、吸引装置であるアスピレーションシステム(COOK社製K-MAR-5000)を使用した(図1)。

吸引針は17G、60cmで2way方式のダブルルーメンニードル(COOK社製)で、採卵針と回収容器を結ぶ連結チューブは90cm及び180cmの2種類を用いた(図2)。

超音波診断装置(日立EUB-405)に6.5MHzコンベックス探触子(EUP-F331)を接続し、採卵アダプター(EZU-PA6)と吸引針を装着した(図3)。

3 方法

実験1：連結チューブ長及び吸引圧の検討

食肉センター由来の卵巣を用いて、90cm及び180cmのそれぞれのチューブごとに、吸引圧を75mmHg、100mmHg、125mmHg、150mmHg及び175mmHgの5区に設定し、卵子の吸引を行った。フラッシングはD-MEMにヘパリンNa90単位/100mlを加えた灌流液を用い、量は0.2ml/2secとした。

次に180cmチューブを用いて先の実験において最も成績の良かった吸引圧100mmHgの条件下でフラッシング量を2秒間に0.1ml、0.2ml、0.3ml及び0.4mlの4区に設定して吸引を行った。

実験2：経膈採卵

実験1の結果から得た最適条件により、黒毛和種7頭を用いて経膈採卵を実施した。

4 調査項目

吸引卵胞数、卵子回収数及び正常COC数を記録した。回収したCOCを、Aは5層以上の卵丘細胞が緊密に付着、Bは卵丘細胞が5層以下あるいは卵子周囲に1/3以上付着、Cは完全な裸化卵子、Dは卵丘細胞及び細胞質の変形、Eは透明帯が破損の5ランクに分類⁶⁾し、Bランク以上を正常COCとした(図4)。



図1 吸引システム

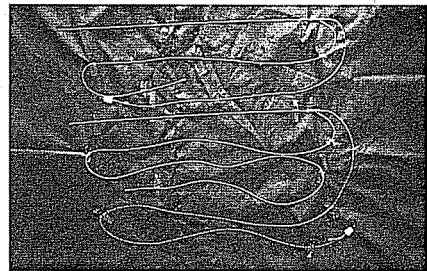


図2 吸引針：上90cm連結チューブ、下180cm連結チューブ

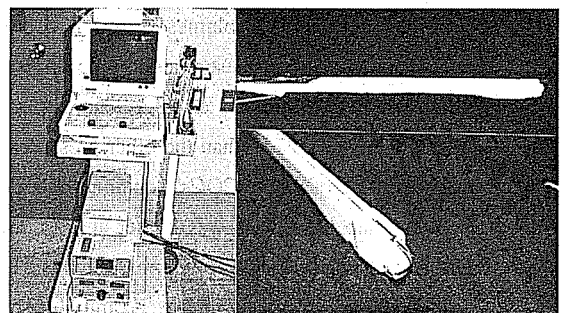


図3 超音波診断装置及び採卵アダプター

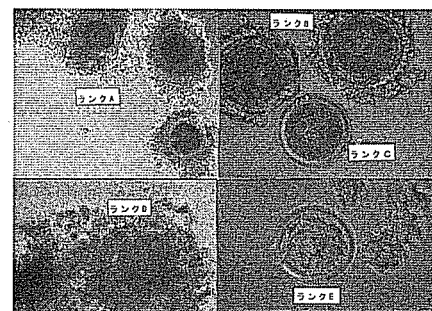


図4 卵丘・卵母細胞複合体

結 果

実験1：連結チューブ長及び吸引圧の検討

連結チューブ90cmを用い、吸引圧を75mmHgから175mmHgとした場合の卵子回収結果を表1に示す。卵子回収率は150mmHg区が91.5%で他区と比較して有意に高かった(p<0.05)。正常COC率は75mmHg, 100mmHg, 150mmHgの順で高く、正常COC回収率は150mmHgが58.8%で最も高かった。また、75mmHg, 100mmHg及び150mmHgにおける正常COC率及び正常COC回収率は125mmHg及び175mmHgに比較して有意に高かった(p<0.05)。

連結チューブ180cmの卵子回収結果を表2に示す。卵子回収率は100mmHgが70.4%と最も高く、125mmHgとともに150mmHgに対して有意に高かった(p<0.01)。正常COC率は175mmHgが他に対して有意に低く(p<0.01)、正常COC回収率は100mmHgが51.6%と150mmHg及び175mmHgに対して有意に高かった(p<0.01)。図5に示すように180cmのチューブを用いて吸引圧を100mmHgとした場合、卵子回収率は90cmのチューブを用いて吸引圧を150mmHgとした場合より劣るものの、正常COC率が高いため、正常COC回収率はほぼ同等となった。

次に、連結チューブ180cmを用いた際に最も成績が良好であった吸引圧100mmHgでフラッシング量を検討した。フラッシング量0.1mlから0.4mlの各区の卵子回収結果を表3に示す。卵子回収率は0.3mlが0.1ml及び0.2mlよりも有意に高く(p<0.01)、正常COC率及び正常COC回収率は、

表1 連結チューブ90cmにおける吸引圧と卵子回収結果

吸引圧 (mmHg)	吸引 卵胞数	回収 卵子数	正常 COC数	卵子 回収率 (%)	正常 COC率 (%)	正常COC 回収率 (%)
75	120	86	61	71.7 ^{b,c}	70.9 ^a	50.8 ^a
100	205	150	101	73.2 ^b	67.3 ^a	49.3 ^a
125	123	74	32	60.2 ^c	43.2 ^b	26.0 ^b
150	177	162	104	91.5 ^a	64.2 ^a	58.8 ^a
175	125	90	40	72.0 ^b	44.4 ^b	32.0 ^b

a, b, c: 異符号間で有意差あり (P < 0.05)

表2 連結チューブ180cmにおける吸引圧と卵子回収結果

吸引圧 (mmHg)	吸引 卵胞数	回収 卵子数	正常 COC数	卵子 回収率 (%)	正常 COC率 (%)	正常COC 回収率 (%)
75	105	69	53	65.7 ^{a,b}	76.8 ^a	50.5 ^{a,b}
100	186	131	96	70.4 ^a	73.3 ^a	51.6 ^a
125	147	101	72	68.7 ^a	71.3 ^a	49.0 ^{a,b}
150	180	98	65	54.4 ^b	66.3 ^a	36.1 ^{b,c}
175	133	84	39	63.2 ^{a,b}	46.4 ^b	29.3 ^c

a, b, c: 異符号間で有意差あり (P < 0.01)

いずれも0.3mlと0.4mlが他の2区と比較して有意に高かった(p<0.01)。

実験2：経膈採卵

180cmの連結チューブを用い、吸引圧100mmHg, フラッシング量0.3ml/2secで経膈採卵を行った。確認卵胞数が82個、回収卵胞数が47個、正常COC数が35個で卵子回収率は57.3%、正常COC率は74.5%、正常COC回収率は42.7%であった(表4)。

考 察

超音波診断装置を用いた経膈採卵法は、1) 過剰排卵処理法により受精卵が採取できないウシからの採卵が可能になる、2) 過剰排卵処理法との組み合わせにより、より効率的な採卵が可能になる、3) 短期間に多くの種雄牛との交配が可能である等の有用性から、優良牛生産技術の主力の一つとなりうる技術である¹⁰⁾。しかし、使

表3 連結チューブ180cmを用いたフラッシング量と卵子回収結果

フラッ シ ン グ 量 (ml)	吸 引 回 収 卵 胞 数	回 収 卵 子 数	正 常 COC 数	卵 子 回 収 率 (%)	正 常 COC 率 (%)	正 常 COC 回 収 率 (%)
0.1	145	92	35	63.4 ^a	38.0 ^a	24.1 ^a
0.2	147	95	51	64.6 ^a	53.7 ^a	34.7 ^a
0.3	188	148	102	78.7 ^b	68.9 ^b	54.3 ^b
0.4	45	30	22	66.7 ^{a,b}	73.3 ^b	48.9 ^b

a, b: 異符号間で有意差あり (P < 0.01)

表4 黒毛和種を用いた経膈採卵成績

採卵 頭 数	確 認 卵 胞 数	回 収 卵 子 数	正 常 COC 数	卵 子 回 収 率 (%)	正 常 COC 率 (%)	正 常 COC 回 収 率 (%)
7	82	47	35	57.3	74.5	42.7
(平均)	11.7	6.7	5.0			
(S D)	4.1	4.2	2.9			

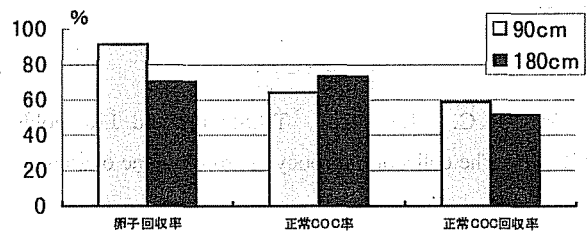


図5 連結チューブ90cmと180cmの回収成績

用する機器及びその設定条件により、採卵効率及びその再現性はかなり影響を受けることが報告されている¹¹⁾。現在のところ、吸引針には60 cm前後の長針と10 cm前後の短針があり、それぞれのフラッシング方式により、one-way及び2wayのシングル及びダブルルーメンに分けられる。吸引圧は100 mmHgまでが一般的であり^{3,4,9)}、フラッシング量は0.2ml/2secが良好であったとの報告¹¹⁾がある。吸引針と回収容器を結ぶ連結チューブは90 cmが一般的であるが、これでは吸引装置、超音波診断装置とウシとの間隔が短いために操作がしにくく、ウシの動きにより針が折れる事があった。

今回の実験では連結チューブ90 cmの場合、吸引圧150 mmHg、フラッシング量0.2ml/2secの条件が最も回収効率が高かったが、180 cmの場合にも吸引圧100 mmHg、フラッシング量0.3ml/2secで、90 cmでの成績とほとんど差がない結果を得た。また、90 cmの場合は卵子回収率、正常COC回収率ともに75 mmHgから150 mmHgまで高い値で推移しており、適正範囲が広いことが示唆された。一方、180 cmの場合は回収率、正常COC回収率ともに75 mmHgから125 mmHgと良好な範囲が狭まる傾向があった。このことは、連結チューブの長さが伸びたために、回収液の動きが断続的になり、回収液の間に空気層ができるデッドスペースが増えた結果、連続吸引においては吸引圧に差が生じ、回収卵子数が減少したものと考えられる。しかしながら、180 cmでは正常COC率が90 cmより高い値で推移しておりCOCに対する物理的影響が軽減され、卵丘細胞のはく離が減少したと考えられる。

黒毛和種を用いて経膈採卵を実施したところ、180 cmのチューブで57.3%の卵子回収率を得ることができた。このことは同様のシステムを用い、90 cmのチューブを用いた報告における回収率が60%であることから¹¹⁾、ほぼ同じ結果であった。

以上のことより、180 cmの連結チューブを用いる場合には吸引圧100 mmHg、フラッシング量0.3ml/2secが適していることが明らかとなった。また、吸引システムの使用機器を変更する場合には、食肉センター由来の卵巢等を用いて、基礎的な条件の設定を行うことが重要と考えられた。

引用文献

- (1) Fry, R.C., E.M.Niall, T.J.Squires and J.Reynolds (1997): The collection of oocytes from bovine ovaries: *Theriogenology*. 47, 977-987
- (2) Gibbons, J.R., W.E.Béal, R.L.Krisher, E.G.Faber, R.E.Pearson and F.C.Gwazdauskas(1994): Effects of once versus twice weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development: *Theriogenology*. 42, 405
- (3) Hasimoto, S., R.Takakura, M.Kishi, T.Sudo, N.Minami and M.Yamada(1998): Effect of aspiration and needle diameter on the recovery rate of bovine cumulus-oocyte-complexes by transvaginal aspiration: *Theriogenology*. 49, 40
- (4) 笠井宏明・後藤充宏・川島迪夫(1995): 超音波診断装置を用いた牛生体内未成熟卵子の回収と体外受精: 徳島県畜産試験場研究報告 36, 5-7
- (5) Kruip, Th.A., M.C.Pieterse, Th.H.van Beneden, P.L.A.M. Vos, Y.A.Wurth and M.A.M.Taverne(1991): A new method for bovine embryo production: a potential alternative to superovulation: *Veterinary Record*. 128, 208-210
- (6) Looney, C.R., B.R.Lindsey, C.L.Gonseth and D.L. Johnson(1994): Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization for embryo production in problem cows: *Theriogenology*. 41, 67-72
- (7) Pieterse, M.C., K.A.Kappen, Th.A.M.Kruip and M.A.M. Taverne(1988): Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries: *Theriogenology*. 30, 751-762
- (8) Pieterse, M.C., P.L.A.M.Vos, Th.A.M.Kluip, Y.A.Wurth, Th.H. van Beneden, A.H.Willemsse and M.A.M. Taverne(1991): Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes: *Theriogenology*. 35, 857-862
- (9) Reichenbach, H.D., N.H.Wiebke, U.H.Besenfelder, J. Modl and G.Brem(1993): Transvaginal laparoscopic guided aspiration of bovine follicular oocytes: preliminary results: *Theriogenology*. 39, 295
- (10) 高橋博人: 生体からの卵胞卵子の吸引と体外受精卵の生産: ET ニュースレター 20, 29-32
- (11) 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