

# 性腺刺激ホルモン放出ホルモン及び卵胞刺激ホルモン処理が 黒毛和種雌牛の生体内卵子吸引に及ぼす影響

谷口俊仁・高田広達・樽本英幸<sup>1</sup>

和歌山県畜産試験場

## Ovum Pick-up of Japanese Black Cow Following Administration of Gonadotropin-releasing Hormone and Follicle Stimulating Hormone

Shunji Taniguchi, Hirotsu Takada and Hideyuki Tarumoto<sup>1</sup>

*livestock experiment station, Wakayama prefecture*

### 緒 言

生体内卵子吸引 (ovum pick-up : OPU) と体外受精 (in vitro fertilization : IVF) を組み合わせた子牛生産は優良な雌牛の後代を増産する技術として活用されている。またこの技術を用いることで、高齢あるいは繁殖障害などの理由で後代を生産できなくなった雌牛からの子牛生産も可能である。

しかし OPU では、回収される卵子の数にばらつきがあり、品質も安定しない。OPU で良質な卵子を得るための試みはこれまでも行われている。Goodhand et al. (1999) は、OPU 前の卵胞刺激ホルモン (FSH) の筋肉内漸減投与により良質な卵子を得ることが可能であることを示している。しかし、この手法は雌牛への複数回の注射が必要であり、作業の繁雑さ、雌牛への過度なストレス付与などの課題がある。一方、Bo et al. (1994) はウシの過剰排卵処理において、FSH の皮下単回投与で漸減投与方法と同程度の採卵成績が得られることを示しており、我々も黒毛和種の過剰排卵においても FSH の皮下単回投与の有効性を報告している (高田ら, 2013)。

そこで、黒毛和種雌牛の OPU における FSH の皮下単回投与が回収卵子の品質、体外受精後の胚発生へ及ぼす影響を調べた。

### 材料および方法

#### 1. 供試牛

県畜産試験場で飼養している黒毛和種経産牛 3 頭を供試した。

#### 2. ホルモン処理

任意の性周期の供試牛に性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH, コンセラルール, 株式会社インターベツト) を 25  $\mu$ g 筋肉内投与した 60 時間後に FSH (アントリン R10, 共立製薬株式会社) を 20AU, 肩部皮下への投与を行った。

#### 3. 未成熟卵子の採取 (OPU)

---

<sup>1</sup>現所属：紀北家畜保健衛生所

FSH 投与後 3 日目に超音波画像診断装置 (HS-1500, 本多電子株式会社) で卵巣内の卵胞を確認しながらディスプレイ採卵針 (COVA needle, ミサワ医科工業株式会社) を用いて未成熟卵子を回収した。

#### 4. 卵子の体外成熟培養

得られた卵子は卵丘細胞の付着状態により A ランク (卵丘細胞層が 4 層以上), B ランク (2~3 層), C ランク (0~1 層), D ランク (蜘蛛の巣状, 膨化など) に分類し, それぞれの数を計測した。さらに卵子を 10% ウシ胎子血清 (FBS) 加 TCM-199 (Earle' s salt, GIBCO) 内で 20~22 時間体外成熟培養 (5% CO<sub>2</sub>, 95% 空気) を行った。

#### 5. 体外受精

体外成熟培養後の卵子は IVF100 (機能性ペプチド研究所) を用いて体外受精を行った。融解した黒毛和種凍結精液を IVF100 で 2 回遠心洗浄 (×500g, 5 分間) を行い, 精子数を 5×10<sup>6</sup> 個/ml に調整した精子浮遊液の中に成熟培養後の卵子を導入して 6 時間培養した (5% CO<sub>2</sub>, 95% 空気)。

#### 6. 体外培養

体外受精後の胚は卵丘細胞を剥離後, 直径 300 μm, 深さ 200 μm の PDMS 製マイクロウェル (Saeki et al., 2008) を用いて 5% FBS 加 CR1aa (Rosenkrans et al., 1993) で 7~8 日間体外培養 (5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>) を行い, 卵割および胚盤胞期への発生数および割合を調べた。

#### 7. 胚の細胞数計測

胚盤胞期まで発生した胚は, 二重染色法 (Thouas et al., 2001 を改変) で染色を行った。発生した胚を 1% トリトン X-100 (SIGMA), 100 μg/ml プロピディウムイオダイド (SIGMA) を含む TCM-199 (Hank' s salt, GIBCO) で 30 秒間浸漬した後, 4% パラホルムアルデヒド (ナカライテスク株式会社), 1 μg/ml ヘキスト 33342 (SIGMA) を含む 1mg ポリビニルアルコール (SIGMA) 加 PBS(-) で 30 分間静置した。その後, スライドガラス上に胚を載せ, VECTASHEILD mounting medium (Vector laboratories) で胚をカバーガラス内に封入することによりサンプルを作製した。細胞数の計測は蛍光顕微鏡 (DP70, オリパス株式会社) による観察およびデジタルカメラによる撮影により行った。

#### 8. 実験区分

ホルモン処理せずに OPU を実施したもの (無処理区) と上記のホルモン処理後 OPU を実施したもの (GnRH-FSH 処理区) を, それぞれの供試牛につき 2 回ずつ反復実施した。

#### 9. 統計処理

卵子のランク別割合, 体外受精胚の卵割率および発生率はカイ 2 乗検定, 採取卵子数および胚の細胞数は分散分析および Fisher の PLSD により解析を行った。

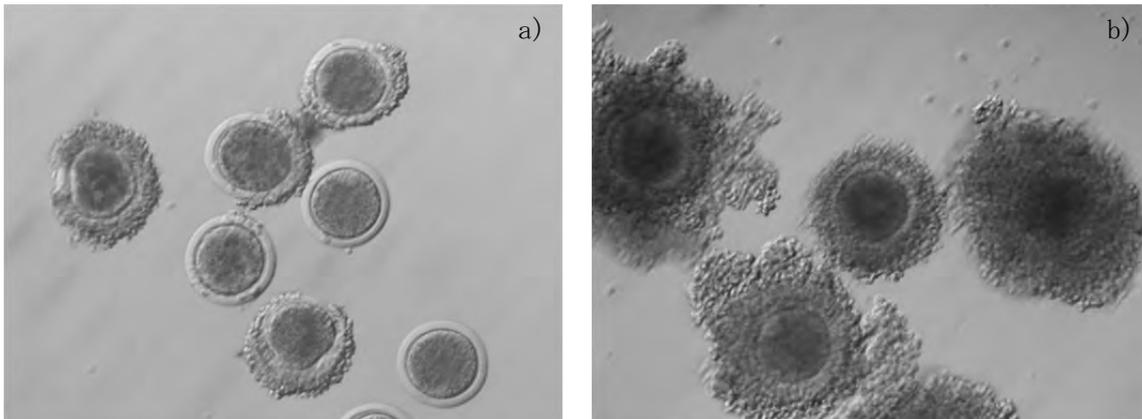
## 結 果

OPU により得られた平均回収卵子数は無処理区 6.7 個, GnRH-FSH 処理区 8.0 個で差がみられなかった ( $p>0.05$ , 第 1 表)。得られた卵子の品質については, A ランク卵子の割合が無処理区 10% (4/40), GnRH-FSH 処理区 31% (15/48) となり, GnRH-FSH 処理で品質の良い卵子が多くなった ( $p<0.05$ , 第 1 表および第 1 図)。一方, C ランク卵子の割合が無処理区 65% (26/40), GnRH-FSH 処理区 21% (10/48) となった ( $p<0.05$ , 第 1 表および第 1 図)。また, 無処理区ではみられなかった D ランク卵子が GnRH-FSH 処理区では 10% (5/48) みられた ( $p<0.05$ , 第 1 表)。

第1表 OPU前のGnRH-FSH処理が採取卵子数および品質に及ぼす影響

実験区	OPU回数	採取卵子数 (平均±標準誤差)	卵子の品質			
			Aランク (%)	Bランク (%)	Cランク (%)	Dランク (%)
無処理区	6	40 (6.7±1.4)	4 (10) <sup>a</sup>	10 (25)	26 (65) <sup>c</sup>	0 (0) <sup>e</sup>
GnRH-FSH処理区	6	48 (8.0±2.0)	15 (31) <sup>b</sup>	18 (38)	10 (21) <sup>d</sup>	5 (10) <sup>f</sup>

a-b, c-d, e-f : p<0.05



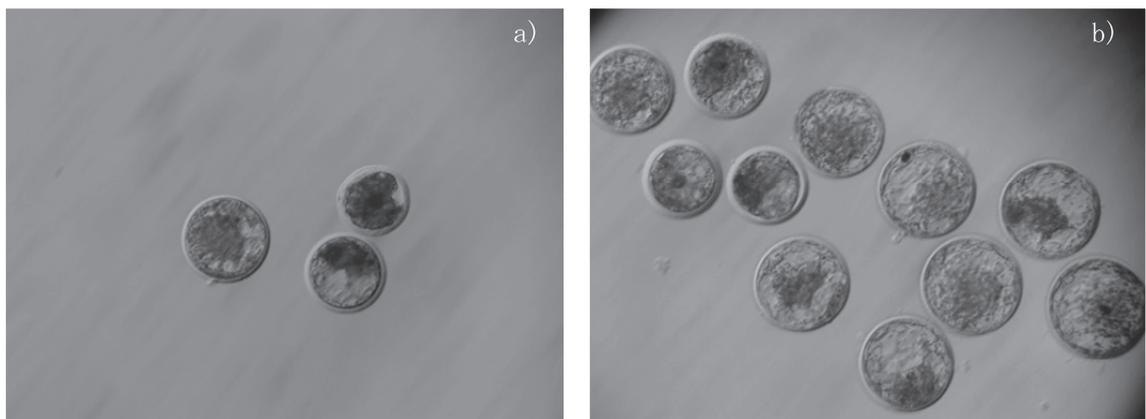
第1図 OPUで採取された卵子 a)無処理区, b)GnRH-FSH処理区

OPU で得られた卵子を体外受精した結果, 卵割率は無処理区で 62%(24/39)であったのに対し, GnRH-FSH 処理区で 82% (34/44) となり, GnRH-FSH 処理により卵割率が高くなった (p<0.05, 第 2 表). 体外受精後 7~8 日目に胚盤胞期まで発生した胚の割合は無処理区で 39%(15/39), GnRH-FSH 処理区で 59%(26/44) となり, GnRH-FSH 処理により胚の発生率が高くなる傾向であった (p<0.1, 第 2 表および第 2 図).

第2表 OPU前のGnRH-FSH処理がIVF後の胚発生に及ぼす影響

実験区	IVF回数	培養胚数	卵割数(%)	発生数(%)
無処理区	6	39	24 (62) <sup>a</sup>	15 (39)
GnRH-FSH処理区	6	44	34 (82) <sup>b</sup>	26 (59)

a-b : p<0.05



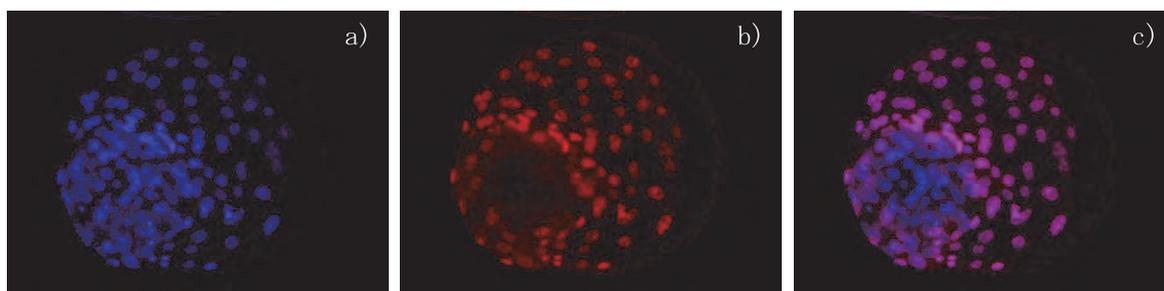
第2図 受精7日目の体外受精胚（胚盤胞期） a)無処理区, b)GnRH-FSH処理区

胚盤胞期まで発生した胚の細胞数については総細胞数, 内細胞塊 (inner cell mass : ICM) の細胞数, 栄養外胚葉 (trophectoderm : TE) の細胞数ならびに総細胞数に占める ICM の割合のいずれにおいても両区の間には差がみられなかった ( $p>0.05$ , 第3表および第3図).

第3表 OPU前のGnRH-FSH処理がIVF胚の細胞数に及ぼす影響

実験区	胚数	総細胞数	ICM細胞数	TE細胞数	ICM/総細胞 (%)
無処理区	15	143.4 ± 11.3	62.9 ± 4.1	80.5 ± 8.3	45.1 ± 1.7
GnRH-FSH処理区	26	135.8 ± 7.4	58.8 ± 3.8	77.0 ± 4.4	43.1 ± 1.4

平均±標準誤差



第3図 二重染色した胚盤胞期胚の蛍光顕微鏡観察像

- a) 青色 (ヘキスト 33342 染色像) : 総細胞, b) 赤色 (プロピディウムイオダイド染色像) : TE,
- c) a および b の合成像, 紫色 : TE, 青色 : ICM

### 考 察

OPU-IVF は卵巣の卵胞内に存在する未成熟卵子を吸引採取し, 体外受精により胚を作製する技術であるが, より良質な卵子を得るための手法が多く検討されている. Goodhand et al. (1999) は FSH を 1日に2回ずつ, 筋肉内に3日間掛けて減量しながら投与した場合の体外受精胚生産の効率は, OPU前に

処置をしなかった場合の2倍程度の効率となったことを示した。今回、Bo et al (1994) および高田ら (2013) の方法をOPUに適用し、FSHの皮下への1回投与を行ったところ、OPU前に処置をしなかった場合(39%)よりも体外受精胚の発生率が向上した(59%, 第2表)。したがって、FSHの皮下1回投与は筋肉内減量投与と同様にOPU-IVFによる胚の生産効率を向上させることが示された。

Sato et al. (2005)は牛の過剰排卵処理における卵胞の動態を経時的に調べており、一般的な過剰排卵処理法であるFSH減量投与を行うと開始翌日から中卵胞(直径7~10mm)および大卵胞(直径10mm以上)が増加し、3日目に中卵胞および大卵胞数が最大となり、その後一定数を保つことを示している。そのため、我々は卵胞の発育が最大となるFSH投与後3日目にOPUを行った。しかし、FSHを投与され直径が大きくなった卵胞は小卵胞と比較して採卵針での穿刺が容易であるものの、回収効率が向上しなかった。Edwards et al. (1980)は、ホルモン投与により吸引液に含まれる顆粒膜細胞層が多くなり、さらに卵胞液の粘性も増すと述べており、FSH等で卵胞を発育させてから行うOPUにおいては吸引圧をさらに高く設定して実施する必要もあると考えられる。

FSHで卵胞刺激を行ってからOPUを実施する術式に加え、さらに優性卵胞除去(dominant follicle removal:DFR)をFSH投与前に行うことで、OPU-IVFによる胚生産の効率が向上することをChaubal et al. (2006)が示している。彼らはDFRを超音波画像診断装置で卵巣を確認しながら採卵針を用いて行っている。Sato et al. (2005)はGnRHの投与により優性卵胞の除去が可能であるが、GnRHの投与量が多いとその後の胚回収成績が安定せず、少量(25 $\mu$ g)の投与では成績が良好であることを示している。そこで我々は、OPUの際の卵胞刺激前に行うDFRにおいて少量のGnRH投与を試みた結果、良好な成績が得られた。GnRH注射により、OPU前のDFRを採卵針で行うよりも低コストで行うことができ、さらに今回の良好な胚発生成績の一因となった可能性が考えられる。

今回検討したGnRH-FSH処理後のOPUにより得られた卵子の品質については、第1表に示したとおり良質なAランク卵子の割合が増加し、比較的品質の低いCランク卵子の割合が減少した。しかし、卵丘細胞が膨化したDランク卵子が無処理ではみられなかったのに対し、GnRH-FSH処理では10%の割合でみられた。FSHなどによる卵胞刺激をされていない卵巣内の卵胞のほとんどは小卵胞であり、それらの卵胞内の卵子は成熟前の卵核期で減数分裂を停止している。一方、卵胞刺激を与えられた卵巣内の卵胞は発育を開始し、中卵胞、さらに大卵胞へと発育していく。それらの中には、排卵に向けて減数分裂を再開し、卵核崩壊、さらに成熟が完了した第2減数分裂中期まで達している卵子もある可能性が考えられる。今回観察されたDランク卵子は、卵子成熟の進行に伴い卵丘細胞の膨化したものであった可能性がある。また、このことを踏まえ、今回実施したタイミングよりOPUを遅らせることで成熟卵子が効率的に採取できる可能性も考えられる。

胚盤胞期まで発生した体外受精胚の細胞数について、総細胞数、ICMの細胞数、TEの細胞数ならびに総細胞数に占めるICMの割合のいずれにおいてもGnRH-FSH処理区によるものと無処理区との間で差がみられなかった。このことから、GnRH-FSH処理により作製された体外受精胚は、従来の方法で作製された体外受精胚と細胞数ならびに細胞構成においては差がみられないことがわかった。しかしながら、最終的な体外受精胚の品質の評価は受胎性、さらに子牛への発生能について評価する必要がある。したがって、今後この手法で作製された体外受精胚の受卵牛への移植による個体発生能について検討を進めていく必要がある。

## 摘 要

黒毛和種雌牛の生体内卵子吸引および体外受精において、卵子吸引前に性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) および卵胞刺激ホルモン (FSH) の投与を行うことにより、得られた卵子の品質が向上した。さらにその後の体外受精胚の発生率が向上した。以上の結果より、GnRH-FSH 処理を OPU 前に行うことで体外受精胚生産が効率化できることが示された。

## 引用文献

- Bo, G. A., D. K. Hockley, L. F. Nasser and R. J. Mapletoft. 1994. Superovulatory response to a single subcutaneous injection of follitropin-V in beef cattle. *Theriogenology*. 42: 963-975.
- Chaubal, S. A., J. A. Molina, C. L. Ohlrichs, L. B. Ferre, D. C. Faber, P. E. Bols, J. W. Riesen, X. Tian and X. Yang. 2006. Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimise oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. *Theriogenology*. 65: 1631-1648.
- Edwards, R.G., P. C. Steptoe, R. E. Fowler and J. Baillie. 1980. Observations on preovulatory human ovarian follicles and their aspirates. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 87: 769-779.
- Goodhand, K. L., R. G. Watt, M. E. Staines, J. S. Hutchinson and P. J. Broadbent. 1999. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. *Theriogenology*. 51: 951-61.
- Saeki, K., N. Kato, D. Iwamoto and S. Taniguchi. 2008. Successful culture of single bovine embryos using Polydimethylsiloxane (PDMS) micro-well plates cured under low pressure. Book of abstract for the 10th World Conference on Animal Production: 186. (Abstr.).
- Sato, T., K. Nakada, Y. Uchiyama, Y. Kimura, N. Fujiwara, Y. Sato, M. Umeda and T. Furukawa. 2005. The effect of pretreatment with different doses of GnRH to synchronize follicular wave on superstimulation of follicular growth in dairy cattle. *J. Reprod. Dev.* 51: 573-578.
- Rosenkrans, C.F., G. Q. Zeng, G. T. McNamara, P. K. Schoff and N. L. First. 1993. Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. *Biol. Reprod.* 49: 459-62.
- 高田広達・樽本英幸・谷口俊仁・中本和弘. 2013. 黒毛和種雌牛の採卵における過剰排卵処理の簡略化. *和歌山農林水研報*. 1: 113-117.
- Thouas G.A., N. A. Korfiatis, A. J. French, G. M. Jones and A. O. Trounson. 2001. Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. *Reprod. Biomed. Online*. 3: 25-29.