

黒毛和種におけるpFSH投与方法および卵胞ウェーブ制御が生体内卵子吸引 －体外胚生産（OPU-IVP）成績に及ぼす影響

及川 俊徳*・板橋 知子・沼邊 孝

宮城県畜産試験場

宮城県大崎市岩出山南沢字樋渡 1 〒989-6445

2016 年 12 月 22 日受付, 2017 年 1 月 27 日受理

要 約

生体からの効率的な卵子採取を目的とし、OPU 前のホルモン製剤投与方法および卵胞ウェーブ制御による OPU-IVP 成績について検討した。実験Ⅰは OPU 前の pFSH 投与量として 16 AU および 8 AU について検討した。中卵胞率は pFSH の投与量を多くするに従い有意に高くなった。A+B ランク卵子率は pFSH 8AU 区が有意に高い成績であった。pFSH 16 AU 区では裸化卵子率が有意に高い成績であった。実験Ⅱは pFSH 投与量を 8 AU とし、OPU 開始前 40 時間および 24 時間について検討した。実験Ⅰの pFSH 8 AU 区を 48 時間区として比較した。pFSH 投与開始から OPU までの時間が短い場合中卵胞は有意に少ない成績であった。採取卵子は A+B ランク卵子率は 48 時間区で有意に高い成績であった。実験Ⅲは卵胞ウェーブ制御を目的として PRID を用いた OPU 成績について検討した。中卵胞率は pFSH を投与することで有意に高い成績であった。C ランク卵子率は、PRID 区は PRID+pFSH 区よりも有意に高い成績であった。実験Ⅰ～Ⅲにおける胚発生成績には有意な差は認められなかった。ウシ OPU の前処理として、性腺刺激ホルモン製剤を投与することで中卵胞が多くなることが示唆され、pFSH 投与量は 8 AU が最適であり少なくとも OPU 実施 48 時間前にホルモン製剤を投与すべきと考えられた。

キーワード：性腺刺激ホルモン、生体内卵子吸引、体外受精

東北畜産学会報 66(3): 57～64 2017

緒 言

近年、超音波診断装置を用い経膈的にウシ生体から卵子を吸引採取する生体内卵子吸引（Ovum pick up, OPU）技術の研究が多く機関で行われている。最近では機器の小型化や性能の向上によりフィールドの農場でも実施されるようになってきた。OPU は発情周期に関係なく同一のウシから 1～2 週間の比較的短期間の間隔で繰り返し卵子の採取が可能であることから効率的な胚

生産が期待されている。ウシ OPU の進展の背景には卵子の体外培養系が確立されてきており、OPU により未成熟卵子を採取し、その後体外成熟培養・体外受精・体外培養により安定的に胚生産が可能となっていることが要因となっている。従来の外因性の性腺刺激ホルモン製剤による過剰排卵処理（superovulation, SOV）を行い人工授精後 7 日目に胚を回収・移植する方法（multiple ovulation and embryo transfer, MOET）に代わる技術として期待されている。OPU に用いるドナーとしては、生体回収胚が得られなくなったドナー、繁殖障害牛、育成牛および妊娠牛にも適応可能である（Imai ら, 2006）。

一般的な OPU では無処置で行われているが、OPU においてもホルモン製剤の投与方法について検討されてい

* 連絡者：及川俊徳（おいかわ としのり）
（宮城県畜産試験場）
〒989-6445 宮城県大崎市岩出山南沢字樋渡 1
Tel：0229-72-3101 Fax：0229-72-2326
E-mail：oikawa-to316@pref.miyagi.jp

る (De Roover, 2007 ; Vieira, 2014)。性腺刺激ホルモン製剤を投与すると卵胞が発育し OPU の作業が容易になることが知られており (Seneda ら, 2001), この場合, SOV と同様のホルモン投与量での報告が多く, この場合, OPU のメリットである短期間の間隔での実施が難しくなる。

最近の研究により卵胞の発育には卵胞ウェーブの概念が用いられ, 新たな卵胞ウェーブを誘起するためには主席卵胞を除去する必要がある。主席卵胞を除去する方法の一つとしてエストラジオールとプロジェステロンを投与する方法がある (Bo ら, 1995)。しかし, この方法を OPU に用いた場合の卵子採取成績には効果があるもの (Pfeifer ら, 2009), または認められない報告がある (Chaubal ら, 2007)。

そこで今回, OPU におけるホルモン製剤の投与方法および卵胞ウェーブ制御による OPU 成績について検討した。

材料および方法

生体内卵子吸引 (OPU)

供試牛は4頭の黒毛和種経産牛 (ドナー A, B, C および D : 全て 11 歳齢) を用いた。動物を用いた本試験については全て「宮城県畜産試験場実験動物規定」に基づき実施した。OPU は宮城県畜産試験場の定法に従い実施した (Oikawa ら, 2016)。すなわち, ステンレス製の採卵針ガイドを装着した 7.5 MHz のコンベックス型プローブを接続した超音波診断装置 (Aloka, SSD1200, Overseas Monitor Corporation, Richmond, BC, Canada) を使用した。採卵針は 17 G の disposable needle (COVANEEDLE : Misawa Medical Industry, Ibaraki, Japan) を使用し, 50 ml のコニカルチューブ (Nunc, Roskilde, Denmark) に接続した。コニカルチューブは保温機 (Model FV5, FHK, Tokyo, Japan) にて 30 °C に保持した。フラッシング液は乳酸加リンゲル液に子牛血清 (calf serum, CS ; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), ゲンタマイシン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) および 10 IU/ml heparin (NOVO Heparin, Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Denmark) を添加し使用した。供試牛を柵場に保定し尾椎硬膜外麻酔を実施し 2 mm 以上の全ての卵胞を穿刺し卵胞液と共に卵子を吸引採取した。OPU は発情周期の任意の日に 1 週間以上の間隔で実施した。採取卵子は, Em-Con filter (Immuno Systems, Spring Valley, WI, USA) に移し, フラッシング液で血液を洗い流した。洗浄した卵子をシャーレに移し, 実体顕微鏡を用いて卵子を培養液中に

集めた。卵胞を吸引する前に大卵胞 : 11 mm 以上, 中卵胞 : 6 ~ 10 mm, 小卵胞 : 5 mm 以下とし, それぞれの卵胞数を計測した。採取した卵子は卵丘細胞の付着の程度で分類し, ランクごとに個数を数えた (A ランク : 卵丘細胞が 4 層以上取り囲んでいる, B ランク : 卵丘細胞が 2 ~ 3 層取り囲んでいる, C ランク : 卵丘細胞が 1 層取り囲んでいる, D ランク : 卵丘細胞が透明帯の周りに部分的に付着している, 裸化 (denuded) : 完全に裸化されている, 変性 (degenerated) : 卵細胞質が不均一で変性している, 膨化卵子 (expanded) : 卵丘細胞が膨化している)。採取卵子のうち A ~ D ランクの卵子を実験に供試した。

卵子の体外成熟

未成熟卵子の体外成熟は, 5 % 牛胎児血清 (FBS, Gibco BRL) 添加 M199 (Gibco BRL) をベースに 0.1 AU/ml 豚由来性腺刺激ホルモン (porcine follicle stimulating hormone, pFSH : Kyouritu Pharma, Tokyo Japan), 50 ng/ml 組み替え型ヒト上皮増殖因子 (epidermal growth factor, EGF ; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA) およびビルビン酸 (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を添加し, 38.5 °C, 5 % CO₂, 95 % 空気の気相下で約 22 時間成熟培養を実施した。卵子は 1 卵子あたり 10 μ l になるようにドロップを作製し培養した。

体外受精 (in vitro fertilization, IVF)

精液は宮城県畜産試験場繋用の黒毛和種雄牛 1 頭の凍結精液を用いた。体外受精は宮城県畜産試験場の定法に基づき実施した (Oikawa ら, 2016)。凍結精液を 38.5 °C の温湯中で融解し, 20 mM カフェイン (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) 添加 mTALP 液 (Parrish ら, 1988) で 500 g $\times$ 5 分間, 2 回洗浄し, 2 $\times$ 10⁷ 精子/ml となるように精子浮遊液を調整した。体外成熟卵子は 100 μ l の 10 mM カフェイン (Wako Pure Chemical Industries) および 10 IU ヘパリン (Nordisk pharma Ltd) 添加 mTALP 液 (1 $\times$ 10⁷ 精子/ml) ドロップに導入し 38.5 °C, 5 % CO₂, 95 % 空気中で 6 時間培養した。その後ピペッティングにより卵丘細胞を除去し発生培地に移した。胚の培養は, 5 % FBS 添加 mSOF (Holm ら, 1999 ; Takahashi ら, 1992) で, 38.5 °C, 5 % O₂, 5 % CO₂, 90 % N₂ の条件で培養し, 50 μ l ドロップに 10 個程度とした。胚の観察は, 体外受精後 3 日目の卵割, 8 日目における胚盤胞期胚について観察した。

実験計画

実験Ⅰ：OPU 前の pFSH 投与量の検討

図1に実験Ⅰのホルモン投与スケジュールを示した。pFSHの投与はOPU開始前48時間から実施した。pFSH総量16 AU区および8 AU区を図1のスケジュールで頸部筋肉内に投与した。対照区はホルモン投与せずOPUを実施した。ドナーAおよびBは16 AU区、無処理区、8 AU区、無処理区の順に、ドナーCおよびDは無処理区、16 AU区、無処理区、8 AU区の順に1週間間隔で実施した。

実験Ⅱ：pFSH 投与から OPU までの時間の検討

実験Ⅱの投与量は実験Ⅰから8 AUで良好な成績が得られたことから投与量は8 AUとした。図2に実験Ⅱのホルモン投与スケジュールを示した。

また、対照として実験ⅠのpFSH8 AU区を投与開始前48時間区(48 h)として比較検討した。ドナーAおよびCは、投与開始前40時間区(40 h)、24時間区(24 h)の順に、ドナーBおよびDは24 h区、40 h区の順に1週間間隔で実施した。

実験Ⅲ：PRID を用いた OPU の検討

図3に実験Ⅲのホルモン投与スケジュールを示した。実験Ⅲは卵巣ウェーブ調節のため安息香酸エストラジオール・黄体ホルモン製剤(Progesterone releasing intravaginal device: PRID, ASKA animal health Co., Ltd, Japan)を使用した。PRID区はOPU6日前にPRIDを膣内に挿入しOPU時に除去した。PRID + pFSH区はPRIDの挿入はPRID区と同様であり、PRID挿入後4日目からpFSH製剤の投与を開始した。対照区はPRIDを使用せずOPUを実施した。ドナーAおよびCはPRID区、無処理区を1週間間隔で実施し、4週間後にPRID+pFSH区、PRID区の順に2週間間隔で実施した。ドナーBおよびDは無処理区、PRID区を1週間間隔で実施し、4週間後にPRID区、PRID+pFSH区の順に2週間間隔で実施した。PRID使用については黄体ホルモンおよび卵巣ホルモンの影響を考慮し、処理間隔を大きくした。

統計処理

卵胞数、採取卵子数および発生胚数の平均値はone-way ANOVAにより実施後、Tukey's multiple comparison testsにて多重検定を実施した。パーセンテージのデータは、chi-square test and Fisher's exact probability testにて実施した。すべての統計処理はEZR (Saitama Medical Center, Jichi Medical University), R インターフェース (version 2.13.0, The R Foundation for Statistical Computing) の修正バージョン

ンである R Commander (version 1.6.3) を用いた (Kandara, 2013)。有意水準は $P < 0.05$ とした。

結果

実験Ⅰ：OPU 前の pFSH 投与量の検討

図4には卵胞の大きさ別の分布割合について示した。中卵胞率はpFSH16 AU区で最も高く、次にpFSH8 AU区で高くそれぞれの区間では有意な差が認められ

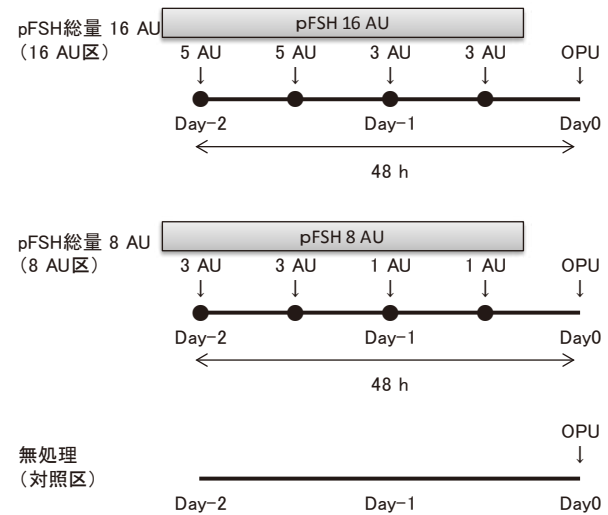


図1 実験Ⅰにおける OPU 前 pFSH 投与スケジュール

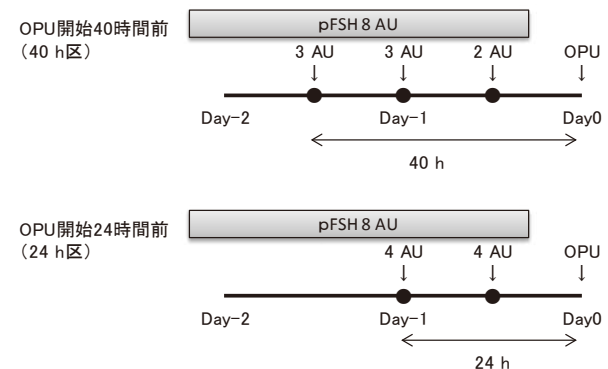


図2 実験Ⅱにおける OPU 前 pFSH 投与スケジュール

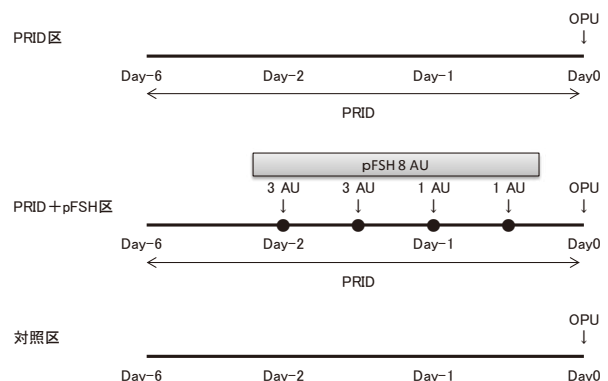
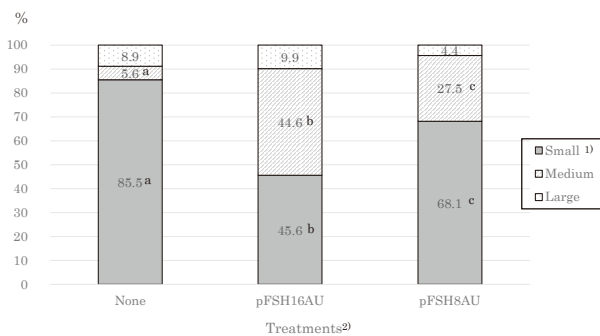


図3 実験Ⅲにおける PRID を用いた OPU スケジュール

た。小卵胞率は無処理区が最も高く、次いで pFSH8 AU 区でそれぞれの区間において有意な差が認められた

図5には採取卵子の割合を示した。AおよびCランク卵子率に実験区間の差はみられなかったものの、Bランク卵子率は pFSH8 AU が最も高く、次に無処理区でありそれぞれの区間において有意な差が認められた。Dランク率は無処理区が他の区と比較し有意に高い成績であった。裸化卵子率は pFSH16 AU 区で他の区と比較し有意に高い成績であった。A+B ランク率は pFSH8 AU 区が他の2区よりも有意に高い成績であった。

表1には実験Ⅰにおける採取卵子の胚発生成績を示した。平均中卵胞数において pFSH16 AU 区は無処理区よりも有意に多い成績であった。平均裸化卵子数は



4 OPU 前 pFSH 投与量の違いによる OPU 時の卵巣における卵胞のサイズ別割合

- 1) 卵胞サイズ: Large: 11mm $\geq$, Medium: 6 ~ 10mm, Small: 5 mm $\leq$
- 2) 処理区: None: ホルモン処理しない対照区, pFSH16AU 区: pFSH 投与量 16AU, pFSH8AU 区: pFSH 投与量 8AU

卵胞の大きさ毎の異符号間に有意差有り (a,b,c: P<0.05)

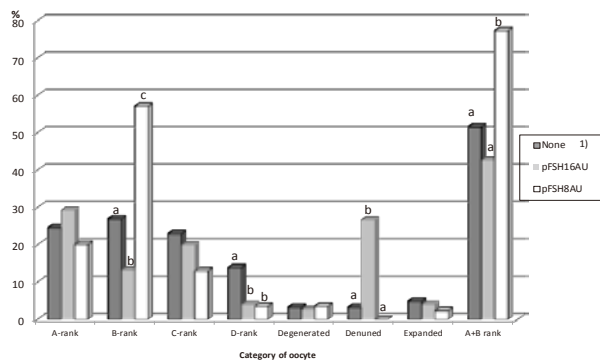


図6 pFSH 投与から OPU までの時間の違いによる OPU 時の卵巣における卵胞サイズ別割合

- 1) 卵胞サイズ: Large: 11mm $\geq$, Medium: 6 ~ 10mm, Small: 5 mm $\leq$
- 2) 処理区: 48 h 区: pFSH 投与から OPU までの時間が 48 時間, 40 h 区: pFSH 投与から OPU までの時間が 40 時間, 24 h 区: pFSH 投与から OPU までの時間が 24 時間

卵胞の大きさ毎の異符号間に有意差有り (a,b,c: P<0.05)

pFSH16 AU 区で他の2区よりも有意に多い成績であった。胚発生成績において有意な差は認められなかった。

実験Ⅱ: pFSH 投与から OPU までの時間の検討

図6には卵胞の大きさ別の分布割合について示した。中卵胞率において 24 h 区は他の区と比較し有意に低い成績であった。小卵胞率において 24 h 区は他の区と比較し有意に高い成績であった。

図7には採取卵子ランク別の割合を示した。A ランク率において 40 h 区は 24 h 区と比較し有意に低い成績であった。一方、B ランク率において 24 h 区は他の2区と比較し有意に低い成績であった。D ランク率において 24 h 区は 48 h 区と比較し優位に高い成績であった。また、A+B ランク率において 48 h 区は他の2区よりも有意に高い成績であった。

表2には実験Ⅱにおける採取卵子の胚発生成績を示した。胚発生成績において有意な差は認められなかった。

表1 OPU 前 pFSH 投与量の違いによる OPU-IVP 成績

Treatments	None	pFSH16AU	pFSH8AU
OPU session	8	4	4
Mean number of follicles	22.4 $\pm$ 1.6	25.3 $\pm$ 5.6	22.8 $\pm$ 2.8
Large	2.0 $\pm$ 0.6	2.5 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.4
Medium	1.3 $\pm$ 0.7 ^a	11.3 $\pm$ 3.6 ^b	6.3 $\pm$ 2.0 ^{ab}
Small	19.1 $\pm$ 2.2	11.5 $\pm$ 2.7	15.5 $\pm$ 2.1
Mean number of total oocyte collected	15.3 $\pm$ 2.3	18.8 $\pm$ 3.8	21.0 $\pm$ 3.2
Mean number of oocyte cultured	13.5 $\pm$ 2.0	12.5 $\pm$ 2.3	19.8 $\pm$ 3.0
Degenerate	0.5 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.5	0.8 $\pm$ 0.5
Denuded	0.5 $\pm$ 0.3 ^a	5.0 $\pm$ 2.4 ^b	0.0 $\pm$ 0.0 ^a
Expanded	0.8 $\pm$ 0.3	0.8 $\pm$ 0.5	0.5 $\pm$ 0.3
Mean number of cleaved	9.6 $\pm$ 1.8	8.0 $\pm$ 2.3	12.8 $\pm$ 2.2
Cleavage (%)	71.3	64.0	64.6
Mean number of blastocysts	7.5 $\pm$ 1.6	7.3 $\pm$ 1.7	9.5 $\pm$ 1.0
Development (%)	55.6	58.0	48.1

Mes $\pm$ SEM, Different superscripts within the same column indicate statistically significant differences (a, b: p<0.05)

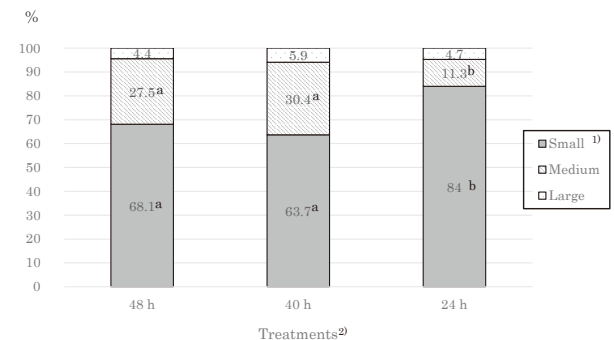


図6 pFSH 投与から OPU までの時間の違いによる OPU 時の卵巣における卵胞サイズ別割合

- 1) 卵胞サイズ: Large: 11mm $\geq$, Medium: 6 ~ 10mm, Small: 5 mm $\leq$
 - 2) 処理区: 48 h 区: pFSH 投与から OPU までの時間が 48 時間, 40 h 区: pFSH 投与から OPU までの時間が 40 時間, 24 h 区: pFSH 投与から OPU までの時間が 24 時間
- 卵胞の大きさ毎の異符号間に有意差有り (a,b,c: P<0.05)

実験Ⅲ：PRID を用いた OPU の検討

図8には卵胞の大きさ別の割合について示した。中卵胞率においてPRID+pFSH区は他の2区と比較し有意に高い成績であった。小卵胞率はPRID + pFSH区はPRID区よりも有意に低い成績であった。

図9には採取卵子ランク別の割合を示した。Cランク率は、PRID区はPRID+pFSH区よりも有意に高い成績であった。

表3には実験Ⅲにおける採取卵子の胚発生成績を示した。平均中卵胞数はPRID+pFSH区は無処理区よりも多い傾向であった ($p=0.065$)。胚発生成績においては有意な差は認められなかった。

なお、本試験では供試牛を2頭ずつの二群に分け、試験区および対照区を反転処理しているため処理の順番は結果に影響しないと考えられた。

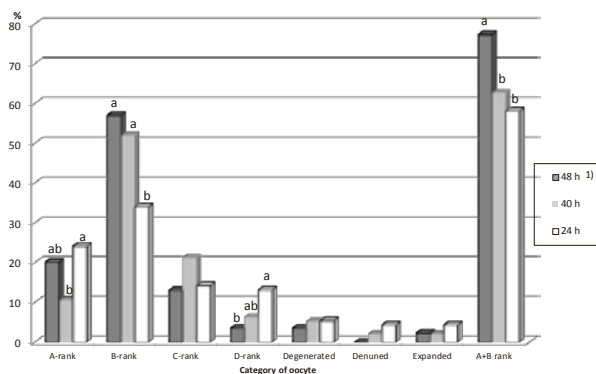


図7 pFSH投与からOPUまでの時間の違いによる採取卵子のカテゴリー別割合

1) 処理区: 48 h区: pFSH投与からOPUまでの時間が48時間, 40 h区: pFSH投与からOPUまでの時間が40時間, 24 h区: pFSH投与からOPUまでの時間が24時間

同じカテゴリー内での異符号間に有意差有り (a, b: $P<0.05$)

表2 pFSH投与からOPUまでの時間の違いによるOPU-IVP成績

Treatments	48 h	40 h	24 h
OPU session	4	4	4
Mean number of follicles	22.8 ± 2.8	33.8 ± 5.4	26.5 ± 6.4
Large	1.0 ± 0.4	2.0 ± 0.7	1.3 ± 0.3
Medium	6.3 ± 2.0	10.3 ± 2.4	3.0 ± 1.1
Small	15.5 ± 2.1	21.5 ± 5.2	22.3 ± 6.5
Mean number of total oocyte collected	21.0 ± 3.2	23.5 ± 4.4	22.8 ± 3.1
Mean number of oocyte cultured	19.8 ± 3.0	21.3 ± 4.3	19.5 ± 2.5
Degenerate	0.8 ± 0.5	1.3 ± 0.5	1.3 ± 0.3
Denuded	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.3	1.0 ± 0.7
Expanded	0.5 ± 0.3	0.5 ± 0.3	1.0 ± 0.4
Mean number of cleaved	12.8 ± 2.2	15.3 ± 3.2	13.0 ± 2.9
Cleavage (%)	64.6	71.8	66.7
Mean number of blastocysts	9.5 ± 1.0	12.3 ± 2.6	10.3 ± 2.0
Development (%)	48.1	57.7	52.6

Mes±SEM, Different superscripts within the same column indicate statistically significant differences (a, b: $P<0.05$)

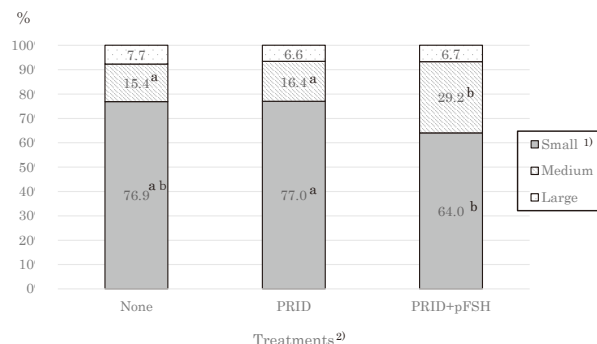


図6 pFSH投与からOPUまでの時間の違いによるOPU時の卵巣における卵胞サイズ別割合

1) 卵胞サイズ: Large; 11mm ≥, Medium; 6 ~ 10mm, Small; 5 mm ≤
2) 処理区: 48 h区: pFSH投与からOPUまでの時間が48時間, 40 h区: pFSH投与からOPUまでの時間が40時間, 24 h区: pFSH投与からOPUまでの時間が24時間

卵胞の大きさ毎の異符号間に有意差有り (a, b, c: $P<0.05$)

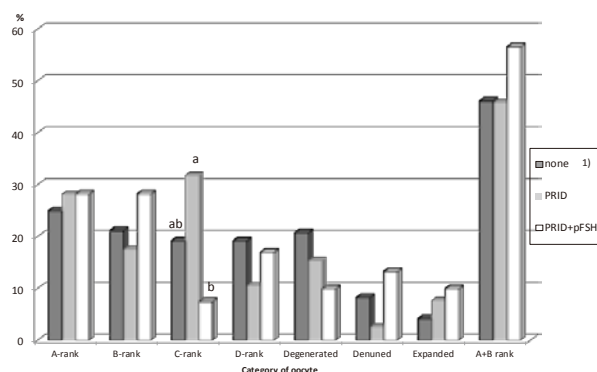


図9 PRIDを用いた卵胞液制御およびpFSH投与による採取卵子のカテゴリー別割合

1) 処理区: None; PRIDおよびホルモン処理しない対照区, PRID区: PRIDによる卵胞液制御, PRID+pFSH区: PRIDによる卵胞液制御およびpFSH投与

同じカテゴリー内での異符号間に有意差有り (a, b: $P<0.05$)

表3 PRIDを用いた卵胞液制御およびpFSH投与によるOPU-IVP成績

Treatments	None	PRID	PRID+pFSH
OPU session	4	8	4
Mean number of follicles	16.3 ± 2.3	19.0 ± 1.8	22.3 ± 2.7
Large	1.3 ± 0.6	1.3 ± 0.5	1.5 ± 0.5
Medium	2.5 ± 1.3	3.1 ± 0.6	6.5 ± 1.4
Small	12.5 ± 2.3	14.6 ± 1.8	14.3 ± 1.1
Mean number of total oocyte collected	13.0 ± 1.6	10.6 ± 1.3	13.3 ± 2.5
Mean number of oocyte cultured	11.0 ± 0.7	9.4 ± 1.1	10.8 ± 2.3
Degenerate	1.3 ± 0.9	0.8 ± 0.3	0.8 ± 0.5
Denuded	0.5 ± 0.5	0.1 ± 0.1	1.0 ± 1.0
Expanded	0.3 ± 0.3	0.4 ± 0.4	0.8 ± 0.3
Mean number of cleaved	8.0 ± 0.7	7.3 ± 0.7	9.0 ± 2.3
Cleavage (%)	72.7	77.3	83.7
Mean number of blastocysts	6.0 ± 1.1	5.3 ± 0.9	6.3 ± 2.3
Development (%)	54.5	56.0	58.1

Mes±SEM, Different superscripts within the same column indicate statistically significant differences (a, b: $P<0.05$)

考 察

黒毛和種牛の MOET では投与する pFSH の投与量は 20 AU 程度と比較的大量のホルモン製剤を投与する。そのため MOET による胚生産では次の処理までに約 2 ヶ月程度の間隔を開ける必要がある。OPU においてもホルモン投与法について様々検討されているが (Bousquet ら, 1999 ; Dr roover ら, 2005), 大量のホルモン製剤を投与した場合その影響が認められるため, 本試験ではまず pFSH の投与量として 16 AU およびその半量の 8 AU について試験を実施した。その結果, FSH 製剤を投与することで中卵胞が多くなることが明らかとなった。一方 pFSH の投与量について比較した場合, 中卵胞率は 8 AU で有意に低く小卵胞率は有意に高い成績であった。採取卵子のカテゴリについては, A+B ランク率は 8 AU で有意に高い採取率であった。このことは pFSH を低容量にすることで中卵胞が減少し良質卵子の採取につながったと推察された。また, pFSH 無処理と 8 AU を比較した場合, 無処理では小卵胞が 85% を占め有意に高い成績であったが, 一方, 採取卵子のカテゴリについては 8 AU で良質卵子が多く採取された。このことは pFSH 投与が中卵胞だけでなく小卵胞にも影響を与えているものと推察されたが, 本試験では採取された卵子の評価は形態的な評価のみで実施しており小卵胞のクオリティの違いはわからなかった。本試験では小卵胞のサイズを 5mm 以下としているがより詳細に検討を行うことで卵胞サイズと良質卵子の関連性が明らかになると考えられ今後の課題であると考えられた。本試験では実施していないが, あわせて採取卵子の核相の検査を実施するなど卵子の成熟についても検討が必要であると考えられた。その他の項目については, 裸化卵子は 16 AU で有意に多く, pFSH の投与量を半分に減量したところ裸化卵子は採取されなかった。このことは pFSH の投与量 16 AU ではオーバードースである可能性が示唆された。卵丘細胞の付着が見られない裸化卵子は, 成熟後の受性能および発生能が著しく低く (Yamauchi と Nagai, 1999) 体外受精には卵丘細胞が付着した卵子が必要である。また, 未成熟卵子が成熟卵子になるためには形態的な変化が起こる。すなわち, ゴナドトロピンの作用により卵丘細胞が膨化し卵丘細胞と卵細胞質をつないでいるギャップ結合が閉鎖され卵腔の形成と第一極体の放出が観察される (佐藤, 2013)。このような卵成熟の一連の変化が起こるためには卵丘細胞の役割が重要である。Seneda ら (2001) は, 卵胞の大きさと採取される卵子の質について調べた結果それらの間には影響がなく, むしろドナーの卵胞発育時期が影響していること

を報告している。OPU 卵子の体外受精後の胚発生成績については有意な差が認められなかったが, pFSH8 AU 区における胚盤胞数は最も多い成績であった。このことは, 裸化卵子が少なくなったことが影響していると考えられた。従って本試験の結果から OPU 前のホルモン製剤の投与量は 8 AU が最適であることが示唆された。

投与開始時期については, OPU からホルモン投与までの開始時間が短い場合, 中卵胞は少ないことから, pFSH の効果を得るためには OPU まで 40 時間程度必要であることが明らかとなった一方, 採取された卵子のカテゴリについて見てみると, A+B ランク率において 48 h 区が有意に高い成績であったことから良質卵子を得るためにはある程度 pFSH への感作時間が必要であることが示唆された。しかし, 胚発生成績には区間に有意な差が認められなかった。以上の結果から OPU 実施 48 時間前の pFSH 投与が有効であることが示唆された。一方, 40 h 区においては, 有意な差はなかったものの胚盤胞数は最も多い成績が得られ, 48 h 区よりも注射回数が少ないことから現場での作業を考慮した場合有効な方法であると考えられた。

最後に, PRID を用いた卵胞ウェーブ調節を目的とした OPU について検討した。今回の結果から PRID を用いても卵子採取成績および IVF 後の胚発生成績に影響は認められなかった。また, PRID と pFSH の併用についても検討したが, pFSH 投与により中卵胞の増加が認められたが胚発生成績を向上させる結果は得られなかった。卵胞内卵子の個数と品質は OPU 時のウシの卵胞発育ステージが大きく影響しているとの報告 (Seneda ら, 2001) があるが, エストラジオールとプロジェステロン投与による OPU-IVP 成績に影響はなかった。今後さらなる検討が必要と考えられた。

Vieira LM ら (2014) はホルスタインに対し OPU 前 4 回 FSH 製剤投与を実施し, 投与終了後 40 時間後に OPU を実施したところ胚発生成績が良好であったことを報告している。卵胞の大きさ別の割合は本試験と同様に FSH 製剤を投与することで中卵胞率が増加するが, 胚発生成績は FSH 製剤に対する感作時間が必要であることを示唆している。De Roover ら (2005) も最後の FSH 製剤投与から 48 時間で OPU を実施し良好な胚発生成績を得ている。本試験において胚発生成績に影響がなかったのは, 最後の pFSH 投与から OPU までの時間は 18 時間程度であり上記の報告と比較し FSH の感作時間が短かったためと考えられ, 今後検討する必要があると思われる。

FSH 製剤投与による OPU では短期間での連続実施が困難であったが, 本研究で検討した低容量の pFSH

投与方法を応用することでホルモン製剤を利用した短期間での連続した OPU が可能になると考えられた。

引用文献

- Bo GA, Adams GP, Caccia M, Martinez M, Pierson RA, Mapletoft RJ. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progesterone and estradiol in cattle. *Anim Reprod sci.*, 39: 193-204. 1995
- Bousquet D, Twagiramungu H, Morin N, Brisson C, Carboneau G, Durocher J. In vitro embryo production in the cow: An effective alternative to the conventional embryo production approach. *Theriogenology.*, 51: 59-70. 1999.
- Chaubal SA, Ferre LB, Molina JA, Faber DC, Bols PEJ, Rezamand P, Tian X, Yang X. Hormonal treatments for increasing the oocyte and embryo production in an OPU-IVP system. *Theriogenology.*, 67: 719-728. 2007.
- De Roover R, Bols PE, Genicott G, Hanzen Ch. Characterisation of low, medium and high responds following FSH stimulation prior to ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval in cows. *Theriogenology.*, 51: 1489-1503. 2005.
- De Roover R, Feugang JMN, Bols PEJ, Genicot G, Hanzen Ch. Effects of ovum pick-up frequency and FSH stimulation: A retrospective study on seven years of beef cattle *in vitro* embryo production. *Reprod Dom anim*, doi: 10.1111/j.1439-0531.2007.00873.x.
- Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, Callesen H. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology.*, 52: 683-700. 1999.
- Imai K, Tagawa M, Yoshioka H, Matoba S, Narita M, Inaba Y, Aikawa Y, Ohtake, Kobayashi S. The efficiency of embryo production by ovum pick-up and in vitro fertilization in cattle. *J Reprod Dev.*, 52: S19-S29. 2006.
- Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplantation.*, 48: 452-458. 2013.
- Oikawa T, Itahashi T, Numabe T. Improved embryo development in Japanese black cattle by in vitro fertilization using ovum pick up plus intracytoplasmic sperm injection with dithiothreitol. *J Reprod dev.*, 62: 11-16. 2016.
- Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod.*, 38: 1171-1180. 1988.
- 佐藤英明, 卵形成の制御機構の解明と卵巣卵の体外成熟法の開発. *東畜会報*, 62: 57-62. 2013.
- Pfeifer LFM, Sartori R, Pivato I, Rumpf R, Nogueira GP, Xavier EG, Dionello NJL, Correa MN. Effect of circulating progesterone on in vitro developmental competence of bovine oocytes. *Anim Reprod.*, 6: 473-480. 2009.
- Seneda MM, Esper CR, Garcia JM, Oliveira JAD, Vantini R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. *Anim Reprod Sci.*, 67: 37-43. 2001.
- Takahashi Y, First NL. In vitro development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 1992; 27: 963-978.
- Vieira LM, Rodrigues CA, Castro Netto A, Guerreiro BM, Silveira CRA, Moreira RJC, Sa Filho MF, Bo GA, Mapletoft RJ, Bariselli PS. *Theriogenology.*, 82: 318-324. 2014.
- Yamauchi N, Nagai T. Male pronuclear in denuded porcine oocytes after in vitro maturation in the presence of cysteamine. *Biol Reprod.*, 61: 828-833. 1999.

Effect of gonadotropin treatments and follicle wave synchronization on oocyte recovery and embryo development by ultrasound-guided ovum pick-up followed by in vitro embryo production in Japanese Black cattle

Toshinori OIKAWA, Tomoko ITAHASHI, Takashi NUMABE

Miyagi Prefectural Livestock Experiment Station, Miyagi, 989-6445, Japan

Corresponding: Toshinori OIKAWA

(Tel : +81-0229-72-3101, E-mail : oikawa-to316@pref.miyagi.jp)

This study evaluated the efficacy of different hormonal treatments and follicle wave control before ovum pick-up (OPU) on in vitro embryo production in Japanese Black cattle. In experiment 1, we compared treatment with different pFSH dosages for superstimulation of follicle growth. The donors treated with pFSH had higher proportion of medium-sized follicles. When compared with other treatments, cows treated with 8 AU of FSH showed higher recovery of A+B-rank oocytes, while those treated with 16 AU of pFSH presented higher number of denuded oocytes. In experiment 2, we compared treatment with pFSH at the start of administration and at 24, 40, and 48 h before OPU. Donors treated with pFSH for 24 h had a lower proportion of medium-sized follicles, while those treated with pFSH for 48 h exhibited higher recovery of A+B-rank oocytes, when compared with the values noted at the start of pFSH administration. In experiment 3, we compared the effect of dominant follicle removal by estradiol benzoate plus progesterone (PRID) to control follicular wave emergence, and treatment with FSH to superstimulate follicle growth. Donors treated with pFSH presented higher proportion of medium-sized follicles, while treatment with PRID resulted in higher recovery of C-rank oocytes, when compared with PRID plus FSH treatments. However, no differences in cleavage and embryo development were noted among the treatments in all the experiments. Thus, before OPU, superstimulation with FSH was useful for the growth of medium-sized follicles. Moreover, a pFSH dosage of 8 AU was noted to be optimum for administration at least 48 h before OPU in Japanese Black cattle.

Key words : gonadotropin, in vitro fertilization, ovum pick-up