

[卵胞発育同調による性判別受精卵の効率的生産に関する研究]

## 過剰排卵処置における主席卵胞除去効果と生体内卵子吸引回収卵子の体外受精成績

片岡辰一朗・牛島 仁\*  
(畜産技術科・\*日獣大)

【要 約】 生体内卵子吸引（以下、OPU）による主席卵胞（直径 8 mm 以上）除去は、過剰排卵措置の小卵胞発育を促す。と体卵巣由来卵子と OPU 回収卵子の新鮮卵、ガラス化卵体外受精では正常受精率に大きな差はない。OPU 回収卵子受精卵は胚盤胞発生がみられない。

### 【目 的】

主席卵胞は、卵胞過剰発育処置（以下、SOV）に悪影響を与えるといわれる。そこで、OPU による主席卵胞除去（以下、OPU-DFA）が卵胞発育に与える影響について検討する。また、OPU 回収卵（以下、OPU 卵）と体卵巣由来卵（以下、と体卵）の卵核胞期卵（以下、GV 期卵）の体外受精能、体外発生能を比較するとともに低温感受性について検討する。

### 【方 法】

1. SOV 前処置としてのホルモン剤投与と OPU-DFA における卵胞発育成績  
経産牛 11 頭（延べ 16 頭）を用い、ホルモン剤（エストラジオール）（以下、E2）投与区と OPU-DFA 区を設け、SOV 終了後に超音波画像から卵巣中の発育卵胞数を比較する。
2. OPU およびと体卵巣由来の卵核胞期卵における体外受精能と低温感受性の比較  
GV 期卵のガラス化を行い 7 から 10 日間液体窒素中で保存する。解凍後 24 時間体外成熟培養を行い、体外受精（以下、IVF）を実施し、受精卵の核形態を比較する。
3. OPU およびと体卵巣由来の卵核胞期卵体外受精後の体外発生能と低温感受性の比較  
IVF48 時間後の分割率、8 から 9 日目の胚盤胞発生率を調べる。

### 【成果の概要】

1. SOV 前処置としてのホルモン剤投与と OPU-DFA における卵胞発育成績  
OPU-DFA 区では、2.4 個の主席卵胞を除去した（表 1）。SOV 後、両区ともに採卵可能卵胞数に差はない。発育卵胞総数、小卵胞数は E2 投与区で有意に多くなった（表 2）。これは、E2 による主席卵胞除去が不十分で小卵胞発育が阻害されたのと比べ、OPU-DFA 区では、確実に主席卵胞が除去され、SOV により小卵胞の発育が促されたためと考えられる。
2. OPU およびと体卵巣由来の卵核胞期卵における体外受精能と低温感受性の比較  
正常受精率は、各区で大きな差はない。OPU 卵はガラス化卵で未受精率が高い（表 3）。
3. OPU およびと体卵巣由来の卵核胞期卵体外受精後の体外発生能と低温感受性の比較  
と体卵は新鮮卵、ガラス化卵ともに約 10%胚盤胞が発生する。OPU 卵は、胚盤胞の発生はない（表 4）。OPU 卵は、卵を吸引してから IVF、ガラス化を行うまで 3 時間程度を要していること、卵子の輸送条件などにより胚盤胞まで発生しなかったと考えられる。
4. まとめ：OPU-DFA により、効率的な卵子回収が可能。OPU 卵は低温保管が可能。IVF では、卵子の輸送条件、IVF 条件などの検討が必要。

表1 OPU-DFA 実施時の超音波画像診断による卵巣中の発育卵胞数

主席卵胞数	中卵胞数	小卵胞数	発育卵胞総数	OPU-DFA 実施数
2.0±1.3	7.9±2.7	7.5±3.5	17.4±6.0	2.4±1.4
n=8 主席卵胞 (8mm 以上) 平均±標準偏差		中卵胞 (5mm 以上 8mm 未満)	小卵胞 (5mm 未満)	

表2 SOV 終了時の超音波画像診断による卵巣中の発育卵胞数

	採卵可能卵胞数*1	小卵胞数	発育卵胞総数	有効卵率(%)*2
E2 投与区(n=8)	12.0±8.3	11.1±8.3 <sup>a</sup>	21.1±5.7 <sup>a</sup>	51.9
OPU-DFA 区(n=8)	12.0±5.3	2.5±3.3 <sup>b</sup>	14.5±4.4 <sup>b</sup>	82.8
*1 主席卵胞数+中卵胞数 平均±標準偏差		*2 採卵可能卵胞数÷発育卵胞総数×100		ab P<0.01

表3 と体卵子と OPU 卵子の新鮮およびガラス化 GV 期卵の体外受精能

試験区	供試卵数	正常受精	多精子	未受精
と体卵子新鮮区	90	58(64.4%)	2(2.2%)	30(33.3%)
と体卵子ガラス化区	90	54(60.0%)	1(1.1%)	30(33.3%)
OPU 卵子新鮮区	5	3(60.0%)	1(20.0%)	1(20.0%)
OPU 卵子ガラス化区	5	3(60.0%)	0(0.0%)	2(40.0%)

※ガラス化方法

- 1 GV 期卵を基礎液(20%FCS+TCM199)に浸漬
- 2 基礎液に平衡液(7.5%エチレングリコール+7.5%DMSO)を添加し, 9 分間平衡
- 3 平衡した GV 期卵をガラス化液(15%エチレングリコール+15%DMSO+0.5%M Suc)に移動し 1 分間浸漬
- 4 新しいガラス化液に GV 期卵を移し, 30 秒以内に液体窒素中に浸漬しガラス化保存

※体外受精方法

- 1 GV 期卵を 100 μL 培地(TCM-199)ドロップ中に 5~10 個浮遊し, 39°C, 3%CO<sub>2</sub>, 24 時間成熟
- 2 体外受精用 BO 液に移し, パーコール処理精液(5×10<sup>6</sup>個/mL)を注入, 39°C, 3%CO<sub>2</sub>, 5 時間媒精

表4 と体卵子と OPU 卵子の新鮮およびガラス化 GV 期卵の発生能

試験区	未発生	2 細胞期	胚盤胞期
と体卵子新鮮区(n=195)	42(21.5%)	126(64.6%)	22(11.3%)
と体卵子ガラス化区(n=97)	28(28.9%)	59(60.8%)	10(10.3%)
OPU 卵子新鮮区(n=20)	9(45.0%)	11(55.0%)	0(0.0%)
OPU 卵子ガラス化区(n=40)	16(40.0%)	24(60.0%)	0(0.0%)