

卵巣の長時間保存が体外受精成績へ及ぼす影響について

有安則夫・水木 剛

About the influence which prolonged preservation of the ovary does to
in vitro fertilization results

Norio ARIYASU・Takeshi MIZUKI

要 約

BSE全頭検査の導入により新鮮な卵巣の入手が困難となったことから、長時間の卵巣の保存状態が体外受精後の胚の発生に与える影響について明らかにする必要がある。そこで卵巣採材時からBSE検査結果が判明するまでの保存が体外受精後の胚の発生に与える影響について検討した。

- 1 採材された卵巣は20℃に設定した生理食塩水(含：抗生物質)で満たされた真空ポット中で保管し、検査終了までの間、食肉衛生検査所の管理下におかれた。採材から吸引処理まで約11時間を要した当日処理区と約25時間を要した翌日処理区を設定し、経膈採卵区を対照区とした。
- 2 分割率及び胚盤胞発生率は、当日処理区で51.5%、14.6%、翌日処理区で45.4%、16.2%であった。一方、対照区では70.9%、43.8%であった。
- 3 採材季節での体外受精成績を翌日処理区を対象に比較したところ、温暖期(4~6月・10・11月)は暑熱期(7月)及び寒冷期(12月)と比較して低率であった。

以上のことから卵巣採材後約10時間までの温度管理が重要であることが示唆された。さらに温度管理の徹底を図るとともに保存液の改良を図る必要があると考えられた。

キーワード：牛、体外受精、BSE、経膈採卵

緒 言

平成13年10月からのBSE全頭検査の導入により新鮮な卵巣の入手が困難となった。しかし、長時間の卵巣の保存状態が体外受精後の胚の発生に与える影響についての報告¹⁻⁵⁾は少なく、試験への利用の可能性は未知数である。そこで卵巣採材時からBSE検査結果が判明するまでの長時間の保存が、体外受精後の胚の発生に与える影響について検討した。

材料及び方法

1 供試サンプル

採材した卵巣は安部ら³⁾の報告に基づき真空ポット(容積1.5ℓ)中で20℃に調整した生理食塩水(含：抗生物質)に浸漬保存した。さらに、外気温の影響を受けにくくするため、真空ポットをクーラーボックスで保管した。なお、卵巣採材からBSE検査終了までの間、岡山県食肉衛生検査所の管理下におかれた。BSE検査終了後、当センターに持ち帰った卵巣から卵子を吸引採取し、ランクAの卵子のみを選別後、成熟培養に供した。

2 試験区の設定

BSE検査終了後、直ちに当センターに持ち帰り卵子の吸引採取を行った区(以下、当日処理区)と、採材日の翌朝まで卵巣を真空ポット中に保存し、吸引採取を行った区(以下、翌日処理区)の2つの試験区を設定した。また食肉処理場由来の新鮮な卵子の確保が不可能なため、超音波誘導経膈採卵による生体卵巣からの吸引採取を対照区とした。

なお、真空ポット内部の温度及び外部の温度について、経時的温度計測器(おんどとりJr. : 株式会社ティアンドディ)を用いて10分ごとに測定した。

3 タイムスケジュール

採材日は、朝9時から11時までの間、食肉処理場で卵巣の採材を行った。

当日処理区では20時前後に卵子を吸引採取しており、採材から卵子の吸引採取まで約11時間を要した。一方、翌日処理区では卵子の採取を翌日10時前後に行っており、採材から卵子の吸引採取まで約25時間を要した。経膈採卵区では採卵後直ちに卵子を選別し、体外成熟に供した。

4 成熟培養

成熟培地には(IVMD101:機能性ペプチド研)を用い、培養は38.5℃、5%CO₂、95%空気の炭酸ガス培養器内で湿度飽和状態で22時間行った。

5 体外受精

体外受精は未受精卵子をKobayashiら⁶⁾の方法に準じて行った。凍結融解精液を受精培地(IVF100:機能性ペプチド研)で1200回転、5分間の2回遠心洗浄後、精子濃度を 1×10^8 sperm/mlに調整した。この精子浮遊液50ulを成熟卵子10個入りの50ulの受精培地に注入し、媒精を行った。媒精6時間後に0.025%ヒアルロニダーゼ溶液中で卵丘細胞を除去した後、5%FCS加CR1aa培地に移して38.5℃、5%CO₂、5%O₂、90%空気の炭酸ガス培養器内で湿度飽和状態で培養を行った。培養48時間後に、無血清培地(IVD101:機能性ペプチド研)への培地交換を行い、同様の条件下で培養を継続し、胚の発生を観察した。

結果及び考察

真空ポット内部の温度に影響を与える最大の要因は外気温と考えられることから、温暖期(4~6月、10・11月)、暑熱期(7月)、寒冷期(12月)の温度変化について、翌日処理区を対象に比較した。温暖期における真空ポット内温度及び真空ポット外温度の変化は図1のとおりであった。と畜直後の温かい卵巣が真空ポット内に入るため、採材開始とともに真空ポット内温度が上昇した。そのため、採材終了時に新たな20℃の生理食塩水と入れ替えた。またクーラーボックスの保管を行っている食肉衛生検査所内の空調の影響により温度の上昇がみられるが、同検査所の閉所とともに真空ポット内外温度の緩やかな低下がみられた。しかし、採材から24時間以上経過しても温度の変化はほとんどみられず、温度変化も0.5℃程度であった。暑熱期における温度変化は、図2に示すとおりであった。真空ポット外温度が高いため、採材の24時間後には約3℃の温度上昇が認められた。一方、寒冷期における温度変化は図3のとおりで、採材後、24時間で約1℃の温度低下が認められた。

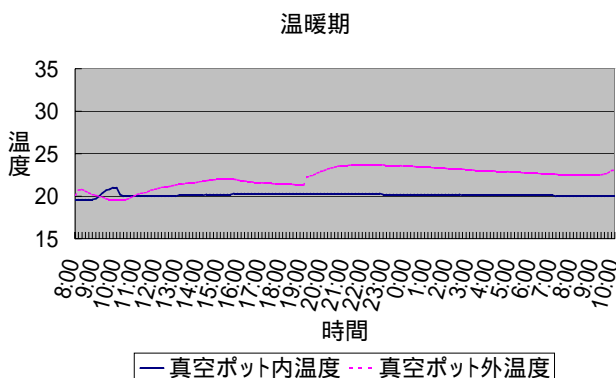


図1．真空ポット内外温度の経時変化(温暖期)

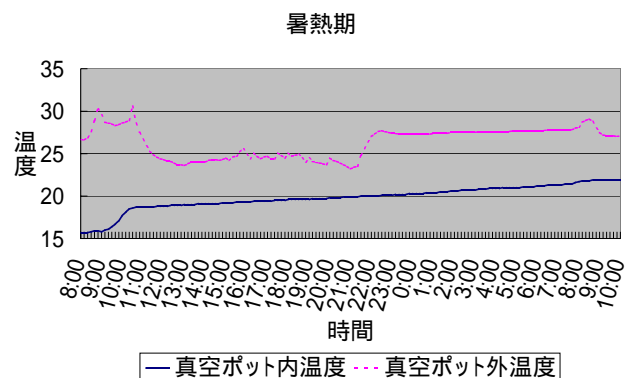


図2．真空ポット内外温度の経時変化(暑熱期)

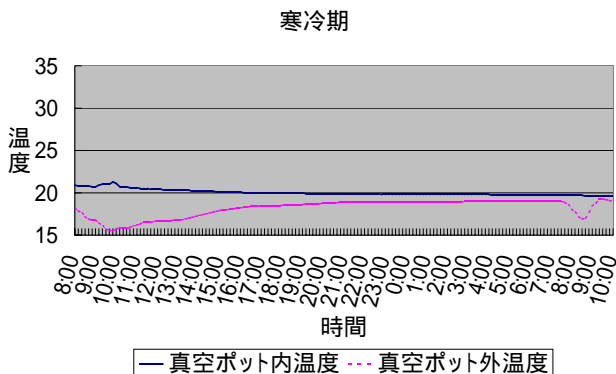


図3．真空ポット内外温度の経時変化(寒冷期)

各シーズンの体外受精成績は表1のとおりで、真空ポット内温度の変化がほとんどなかった温暖期において、分割率、胚盤胞率及び脱出胚盤胞率すべてが他の区より低い値となった。その一方で、寒冷期では真空ポット内の温度変化が温暖期と近似しているにもかかわらず高い胚の発生を得ていることから、温度以外の要因が体外受精成績に影響している可能性が伺える。例えば一般的に夏季における暑熱ストレスは繁殖障害を起こしやすく⁷⁻⁹⁾、その影響は秋まで継続されることが多いと言われている。この場合、卵子の質の低下も秋以降に継続し、このことが受胎率の低下の一因と考えられる。同様に体外受精における低下もこれらに起因している可能性が考えられる。しかし、暑熱ストレス以外にも多数の要因が発生に影響を与えていると考えられ、原因を特定するには至らなかった。

卵子を吸引採取するまでの保存時間の違いによる体外受精の胚の発生及び、参考データとしてBSE

表1. 季節による体外受精成績

	発生培養数	分割数	分割率(%)	胚盤胞数	胚盤胞率(%)	脱出胚盤胞数	脱出胚盤胞率(%)
温暖期	366	153	41.8	43	11.7	26	7.1
暑熱期	237	105	44.3	48	20.3	35	14.8
寒冷期	128	67	52.3	29	22.7	24	18.8

*温暖期(4~6月、10・11月)、暑熱期(7月)、寒冷期(12月)

検査導入前までの食肉処理場由来卵子の体外受精成績を表2に示した。BSE検査導入前までは、朝9時から11時までの間食肉処理場で卵巣の採材を行い、12時前後に卵子を吸引採取しており、採材から卵子の吸引採取まで約3時間を要した。分割率及び胚盤胞発生率は、当日処理区でそれぞれ51.5%、14.6%、翌日処理区で45.4%、16.2%であり、対照区では70.9%、43.8%であった。またBSE検査導入前までは59.6%、37.3%であった。なお、対照区ではすべての胚を性判別に供したため、脱出胚盤胞数及び脱出胚盤胞率については不明である。両試験区ともに対照区と比較して分割率及び胚盤胞発生率が低くなっていることから、少なくとも10時間以上の卵巣の保存が発生に悪影響を及ぼしていることが推測される。

しかし、温度管理を徹底してもその発生率は未だに低率であり、さらに改善を図る必要がある。例えば保存液への抗酸化剤の添加が発生率を向上させるとの報告¹⁰⁾があるように、浸漬する保存液の改良も有効な手段と考えられることから、今後あわせて検討する必要がある。

表2. 保存時間の違いによる体外受精成績

	発生培養数	分割数	分割率(%)	胚盤胞数	胚盤胞率(%)	脱出胚盤胞数	脱出胚盤胞率(%)
当日処理区	171	88	51.5	25	14.6	15	8.8
翌日処理区	511	232	45.4	83	16.2	57	11.2
対照区*	258	183	70.9	113	43.8	-	-
参考データ	166	99	59.6	62	37.3	43	25.9

*対照区はすべて性判別に供したため、脱出胚盤胞数及び脱出率については不明。

引用文献

- 1) 塩谷康生・桑山正成・上田修二・斉藤秀一・太田均・花田章(1988):家畜繁殖誌,34,39~43.
- 2) 安部茂樹・長谷川清寿・川平実(1991):哺乳卵学誌,8,(2),155~163.
- 3) 安部茂樹・長谷川清寿・川平実(1993):牛の体外受精に関する研究 第3報 牛卵巣の輸送温度が体外成熟・体外受精卵子の胚盤胞発生へ及ぼす影響. 鳥根県立畜産試験場研究報告,28,1~5.
- 4) 青柳和重・伊藤博康・齋藤真希・叶内恒雄(1998):24時間保存した卵巣からの卵子をレシピエントとした牛核移植及び核移植胚の発生培養の検討. 山形県農業研究研修センター畜産研究部研究報告,45,3-4.
- 5) 谷口俊仁・柏木敏孝・野口浩和・温井功夫(2001):保存卵子および卵巣を用いたウシ受精卵核移植. 和歌山県農林水産総合技術センター研究報告,2,155~158.
- 6) Kobayashi K, Takagi Y, Satoh T, Hoshi H and Oikawa T (1992): Development of early bovine embryos to the blastocyst stage in serum-free conditioned medium from bovine granulosa cells. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 28A, 255-259.
- 7) 可世木蔵人(1985): 初歩が第一、まずは家畜の衛生管理、乳牛編(3). 畜産コンサルタント, 248, 56~62.
- 8) 山本展司(2001): 特集 暑熱期の乳牛の飼養管理 牛舎環境の換気対策. 酪農ジャーナル, 639, 20~23.
- 9) 大山求(1991): 平成2年の家畜暑熱被害と防暑対策 - 香川県の実態. 家畜診療, 334, 62~64.
- 10) 岩田尚孝・太田麻由子・伊佐治麻実子・長井義晴(2002): 卵巣卵母細胞の回収時に使用する抗酸化剤が体外受精後の発生能に及ぼす影響. 第9回日本胚移植研究会大会 講演要旨集, 28.

