

Short Report

生体ウシ卵巢の穿刺刺激による卵胞発育誘導の試み

横尾正樹¹, 布谷未帆^{1,2}, 渥美孝雄³, 長谷川昇司³, 渡邊潤²,
佐藤勝祥¹, 伊藤謙¹, 小林仁⁴, 河村和弘⁵

¹ 秋田県立大学生物資源科学部アグリビジネス学科

² 秋田県立大学生物資源科学部フィールド教育研究センター

³ 渥美牛群管理サービス

⁴ 宮城大学食産業学群食資源開発学類

⁵ 国際医療福祉大学医学部産婦人科

生殖補助医療分野において、患者卵巢の小断片化処理によって卵巢内の初期卵胞の発育を活性化する方法が報告されている。この処理法は、卵巢内に残存する発育途上の卵胞を有効利用する画期的な方法ではあるが、外科的手術を複数回伴うことから、ウシなどの産業動物に応用するには、手間やコストが課題となる。そこで本研究では、近年、畜産現場で実用化されている生体内卵子吸引（Ovum pick up : OPU）技術を応用して、ウシ生体内卵巢に穿刺刺激を加える方法でも、卵巢内の初期卵胞の発育を促進できるかを検証した。供試牛（黒毛和種経産牛）の片側卵巢に 30 回の穿刺刺激を加えて、その後の卵胞発育の変化を、対側の無処理卵巢と比較した。穿刺後 7 週間の観察では、穿刺卵巢と無処理卵巢の卵胞発育に明確な差異は認められなかったが、穿刺後 7 週目から OPU プログラムを実施し、発育する卵胞数を比較したところ、有意差は認められなかったものの、穿刺卵巢において僅かな卵胞数の増加が認められた。以上のことから、今後、穿刺回数などの条件をより詳細に検討する必要があるが、卵巢穿刺刺激が新たな卵胞発育促進技術として活用できる可能性が示された。

キーワード : OPU, ウシ, 穿刺刺激, 卵巢, 卵胞発育

近年、子牛生産の現場では、超音波画像診断装置を用いて、経膈的に生体内の卵巢から卵子を取り出す生体内卵子吸引（Ovum pick up : OPU）技術が実用化されており、採取した卵子から体外受精—胚移植技術を利用することで産子を獲得することも報告されている（Imai *et al.*, 2006）。さらに、OPU によって卵子を効率的に採取する際に、性腺刺激ホルモン（FSH）によって卵胞発育を促進すると、採卵数を増加させることが可能であることも報告されている（Seneda *et al.*, 2001）。しかし、卵巢内に存在する卵胞のうち、FSH 依存的に卵胞発育を起こすのは二次卵胞以降のある程度発育が進んだ卵胞のみである。卵巢内卵胞の 90%以上を占める原始卵胞や一次

卵胞といった初期卵胞には FSH の効果は限定的であるため、これら初期卵胞の発育を人為的に促進させ、有効活用する技術開発が望まれている。

最近、生殖補助医療分野において早発卵巢不全（Premature Ovarian insufficiency : POI）の患者卵巢を小断片化することで、初期卵胞の発育を活性化できること、さらに、この方法で得られた成熟卵子から産子も得られたことが報告された（Kawamura *et al.*, 2013）。この方法は、卵巢内に残存する初期卵胞を有効利用する画期的な方法ではあるが、外科的手術が複数回伴うことから、ウシなどの産業動物に応用する場合には、大がかりな手術、コスト面が大きな障害となる。そのため、卵巢の小断片化処理を代

替する，産業動物にも応用可能な，より簡便な初期卵胞の活性化法の開発が期待される。

卵巣の小断片化処理による初期卵胞の活性化については，そのメカニズムも明らかになっている。つまり，小断片化による卵巣組織への物理的な刺激が卵胞内のアクチンタンパク質の重合化や Hippo シグナルの抑制を誘導し，それによって生産される細胞増殖因子により卵胞発育が活性化されるというものである（Kawamura *et al.*, 2013）。つまり，卵巣を小断片化せずとも，卵巣に物理的な刺激を加えることができれば，断片化処理と同様に卵胞発育を促進できると考えられる。そこで，本研究では OPU 技術に着目した。この技術は，前述のとおり，経膈的に卵巣内の卵子を採取する方法であり，すでにウシにおいて実用化されている。この方法を応用すれば，開腹せずに，卵巣表面に採卵針による物理的な刺激（穿刺刺激）を与えることができ，低侵襲かつ簡便に卵巣内の初期卵胞の発育を活性化できることが期待される。そこで本研究では，ウシ OPU プログラムの前処理として生体内卵巣に穿刺刺激を与えて，その後の卵胞発育にどのような影響を及ぼすかを検証することを目的とした。

材料・方法

供試動物

秋田県立大学フィールド教育研究センターで飼養管理されている黒毛和種の経産牛 2 頭（71 ヶ月齢，112 ヶ月齢），および宮城県内の畜産農家で飼養管理されている黒毛和種の経産牛 1 頭（121 ヶ月齢）の計 3 頭を使用した。

生体ウシ卵巣の穿刺処理

穿刺処理に先立ち，供試牛を保定用柵場に入れ，直腸の緊張緩和剤として臭化プリフィニウム（パドリン注；インターベット）10mL とセラクタール（バイエル薬品）0.5mL の混合液を頸静脈に投与した。穿刺試験には，コンベックス型超音波プローブ（HCV-4710MV, 7.5MHz；本多電子）を接続した超音波画像診断機（HS-2000；本多電子）を使用した。外陰部を洗浄・消毒後，膈内に採卵針（17G，ミサ

ワ医科工業）を装着した超音波プローブを挿入し，超音波映像を確認しながら，膈壁より採卵針を卵巣表面に穿刺した（**図 1**）。穿刺処理は，いずれの個体においても，片側の卵巣のみに実施し（穿刺処理区），対側の卵巣は無穿刺とした（無処理区）。なお，本研究における卵巣あたりの穿刺回数は 30 回とした。

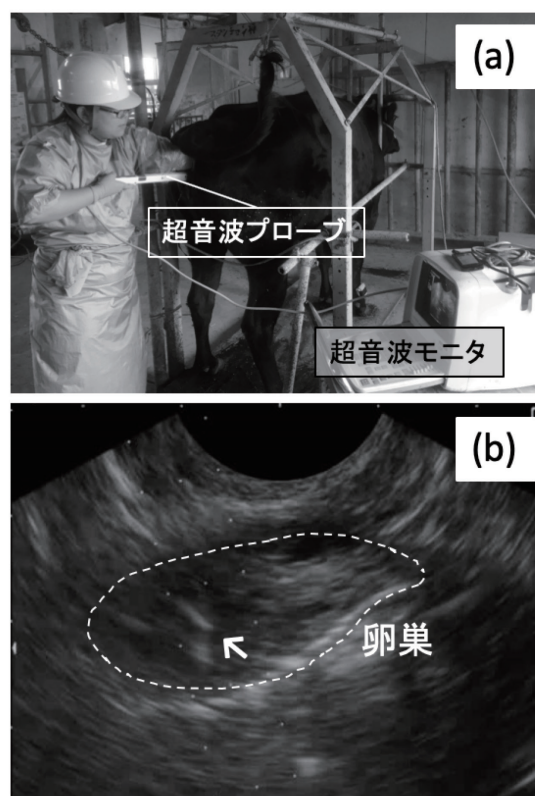


図 1. 卵巣穿刺処理

(a) 卵巣穿刺の様子，(b) 超音波映像（矢印は穿刺針の先端を示す）

OPU プログラム

本研究で実施した OPU プログラムの概要を **図 2** に示した。すなわち，穿刺処理から 50 日目を Day0 とし，膈内に CIDR（膈内留置型プロゲステロン製剤；サージミヤワキ）を挿入し，EB 製剤（エストラジオール；共立製薬）1 mL を筋注投与した。Day 4 および ay 5 のそれぞれ朝夕に，FSH 製剤（アントリン 10；共立製薬）を 2.5AU ずつ筋注投与し，Day 7 に卵巣内の卵胞発育を比較調査した。なお，本試験では採卵は行わず，卵胞観察のみ実施した。

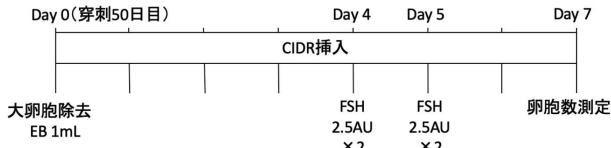


図2. OPU プログラムの概要

卵胞観察と卵胞数の計測

卵胞観察は、経膈超音波プローブ（HCV-4710M）を接続した超音波画像診断機（HS-2000）を用いて、穿刺処理後から週1回実施した。卵胞所見は、大卵胞（最大直径 10mm 以上）、中卵胞（最大直径 5mm 以上 10mm 未満）、小卵胞（最大直径 5mm 未満）に区分し、各卵胞個数を計測した。

統計処理

計測した卵胞数は Student's t test を用いて解析した。全ての解析は、GraphPad Prism 8 (GraphPad Software) を用いて行い、危険率 5%未満を有意と判定した。

結果

穿刺後から OPU プログラムを開始するまでの 7 週間、卵巣内で観察された各卵胞数（平均）の推移を図 3 に示した。卵巣周期に伴う卵胞数の増減が認められるものの、無処理卵巣と穿刺卵巣における各卵胞数に大きな差異は認められず、卵胞発育に対する穿刺刺激の影響は確認することはできなかった。次に、卵巣穿刺処理が OPU プログラム後の卵胞数に及ぼす影響を調査した。OPU プログラム後の卵胞数（平均）では、両試験区間に有意差は認められなかったものの、無処理区と比較して、穿刺処理区で卵胞数が増加傾向を示した（表 1）。

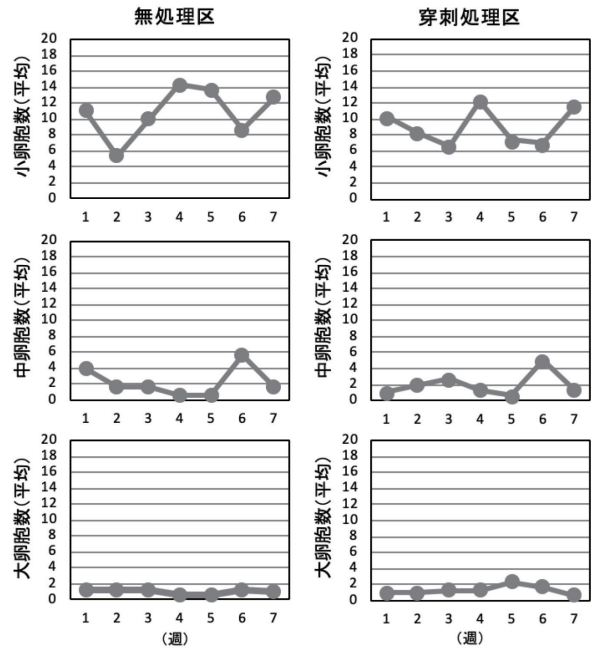


図3. 卵胞数（平均）の推移

考察

本研究では、OPU 技術を応用した卵巣穿刺刺激が、初期卵胞の発育を活性化することが可能であるかを検証することを目的に取り組んだ。穿刺後 7 週間の卵胞発育においては、穿刺卵巣と無処理卵巣の卵胞発育において明確な差異は観察されず、本研究の穿刺条件では当初期待したような卵胞発育促進効果を確認することはできなかった。しかし、穿刺処理から 7 週後に実施した OPU プログラム後には、僅かではあるが穿刺処理した卵巣で卵胞数に増加傾向が観察された。本研究では、生殖補助医療分野における多嚢胞性卵巣症候群（Polycystic Ovary Syndrome : PCOS）の治療法で実施される腹腔鏡下卵巣穿孔（Laparoscopic Ovarian Drilling : LOD）を参考にして、穿刺回数を 30 回と設定したが、ウシ卵巣への穿刺刺激としては刺激が少なかった可能性が考えられる。

表1. OPUプログラム後の卵胞数(平均)

試験区	例数	大卵胞	中卵胞	小卵胞	計
無処理	3	0.7	5.0	8.0	13.7
穿刺処理	3	1.0	5.3	10.7	17.0

今後は、卵巣の大きさを考慮して、穿刺深度や穿刺回数を増やすなど、穿刺条件を検討する必要がある。また、本研究では、穿刺刺激から OPU プログラムまでの期間を7週間としたが、ウシなどの大型家畜では、生体内での前胞状卵胞から排卵直前の成熟卵胞への発育には少なくとも2～3ヶ月の期間を要する(星, 2002)。このことから、穿刺刺激後の効果を検証するためには、今後、より長期間での卵巣観察試験を実施する必要性が考えられる。なお、本研究に供試した各個体では、穿刺処理後も正常な発情周期が観察されたことから、穿刺処理がその後の卵巣周期に悪影響を及ぼすことは少ないと考えられる。

一方、本研究で実施した卵巣穿刺技術は、通常の OPU 技術による採卵作業とほぼ同じ手技で実施できたことから、普段、OPU を実施している技術者にとっては、無理なくウシ生体内卵巣を刺激できることが確認できた。今後、卵胞発育を促進させる穿刺条件を決定することができれば、より簡便に採卵数を増加させる方法として、生産現場での活用が期待される。

まとめ

本研究では、卵巣内の卵胞発育を促進する方法として、卵巣穿刺刺激という新しい手法を試みた。本法は、大がかりな開腹手術を行うことなく、低侵襲に生体内卵巣を刺激できることが可能であった。当初期待したような効果は認められなかったものの、今後、穿刺刺激の強度や処理期間など条件を見直し、卵巣内の初期卵胞を発育する最適条件を見いだすことができれば、ウシ生体卵巣内の初期卵胞を有効活用する新しい技術開発に繋がると考えられる。

謝辞

本研究の一部は、秋田県立大学平成29年度産学連携・共同研究推進事業によって行われました。また、供試牛の飼養管理については、秋田県立大学フィールド教育研究センター畜産班の技能スタッフの皆様にご多大なるご協力をいただきました。ここに深謝いたします。

文献

- Imai K, Tagawa M, Yoshioka H, Matoba S, Narita M, Inaba Y, Aikawa Y, Ohtake M, Kobayashi S. (2006). The efficiency of embryo production by ovum pick-up and in vitro fertilization in cattle, *J Reprod Dev*, 52, S19-S29.
- Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N, Deguchi M, Sato Y, Takae S, Ho CH, Kawamura N, Tamura M, Hashimoto S, Sugishita Y, Morimoto Y, Hosoi Y, Yoshioka N, Ishizuka B, Hsueh AJ. (2013). Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 17474-17479.
- Seneda MM, Esper CR, Garcia JM, Oliveira JA, Vantini R. (2001). Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. *Anim Reprod Sci*, 67, 37-43.
- 星 宏良 (2002) . 哺乳動物卵胞・卵子の体外発育培養. *Tiss Cult Res Commun*, 21, 73-81.

〔 令和2年2月29日受付
令和2年3月9日受理 〕

Study on the Promotion of Follicle Development by Needle Stimulation in Bovine Internal Ovaries

Masaki Yokoo¹, Miho Nunoya^{1,2}, Takao Atsumi³, Shoji Hasegawa³, Jun Watanabe²,
Katsuyoshi Sato¹, Ken Ito¹, Jin Kobayashi⁴, Kazuhiro Kawamura⁵

¹ Department of Agribusiness, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University

² Field Education and Research Center, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University

³ Atsumi Herd Management Service

⁴ Department of Food Resource Development, School of Food Industrial Sciences, Miyagi University

⁵ Department of Obstetrics and Gynecology, International University of Health and Welfare School of Medicine

In assisted reproductive research, it has been shown that ovarian fragmentation treatment promotes follicle development, the retrieval of mature oocytes, and in vitro fertilization. Following embryo transfer, a healthy baby was delivered. However, this treatment involves a surgical operation. Therefore, this process is not ideal, as it is costly and troublesome for application in industrial animals. On the other hand, transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up (OPU) is a reliable technique for harvesting oocytes from bovine ovaries. This method allows the internal ovaries to be approached via puncture needle without a surgical operation. Therefore, the purpose of this study is to examine whether needle stimulation for internal ovaries promotes follicle development. Three Japanese black heifers underwent transvaginal ovarian stimulation using an aspiration needle (30 punctures per ovary); subsequently, the numbers of follicles were recorded. Seven weeks after the needle stimulation, there were no significant differences in follicle development between the punctured ovaries and the untreated ovaries. However, an increase in the numbers of follicles was observed in the punctured ovaries after the OPU session. The results of the present study suggest the possibility that needle stimulation for internal bovine ovaries promotes follicle development, however, the optimum condition of needle stimulation has not yet been clarified and should be further elucidated.

Keywords: bovine, follicular development, needle stimulation, OPU, ovary, puncture