

経膈採卵技術による効率的胚生産技術の開発

山口大学大学院連合獣医学研究科

詫 摩 哲 也

2009

目次

第1章	3
要旨	4
第2章	7
緒言	8
第3章	12
研究1	13
緒言	14
材料および方法	16
結果	21
考察	23
研究2	27
緒言	28
材料および方法	30
結果	35
考察	36
第4章	40
総括	41
図表	49
謝辞	58
参考文献	59

第 1 章

要旨

近年、体外受精(*In Vitro Fertilization*; IVF)技術の普及と発展による体外胚生産システムの確立は、遺伝的に優れた子牛を大量生産していく上で非常に有効な手段となりつつある。特に、超音波診断装置を利用して生体内の卵巣内卵胞を吸引する経膣採卵(Ovum Pick Up; OPU)技術と体外胚生産システムを組み合わせることにより、家畜改良における世代間隔の短縮および雌牛を中心とした遺伝的改良が可能となっている。そのような中、OPU技術に使用する装置がより実用的でかつ効率的なものに改良され、生体からの卵丘細胞卵子複合体(Cumulus Oocyte Complexes; COCs)の回収が商業レベルで普及しつつある。このOPU技術を用いることで同一雌牛から1週間あたり1~2回のCOCs回収が可能となるが、商業レベルとして成功させるためにはOPU処理時に吸引可能な胞状卵胞が卵巣内に多数出現している必要がある。しかし、OPU処理前後における雌牛の卵巣動態の変化やその後の影響、回収されたCOCsの体外発生能については未だ不明な点が多い。特に、連続的にOPU処理を行った場合の雌牛の黄体形成や退行に与える影響、発情周期に与える影響についてはよく知られておらず、さらに暑熱ストレスなど季節的要因や妊娠の有無がOPU成績に及ぼす影響はあまり検討されていない。そこで本研究では、OPU技術による効率的胚生産技術の開発を目的とし、OPU処理前後における雌牛の卵巣動態の変化やその後の影響、回収されたCOCsの体外発生能について検討を行い、加えて暑熱ストレスなど季節的要因や雌牛の妊娠の有無がOPU処理成績に及ぼす影響について検討した。

まず研究1では、週2回(3~4日間隔)の連続したOPU処理による卵胞吸引を行った場合に、吸引卵巣内における黄体の有無がその後の卵胞や黄体の動態に

及ぼす影響について調査した。試験はクロスオーバーデザイン法により試験牛（黒毛和種経産牛7頭）を3つのグループ（2頭、2頭、3頭）に分け、2ヵ月間隔ですべての試験区に供した。試験区としては、1) 黄体を有する卵巣内にあるすべての可視卵胞（長径3mm以上）を吸引する黄体側卵巣吸引区、2) 黄体を有する卵巣と反対側の卵巣内にあるすべての可視卵胞を吸引する非黄体側卵巣吸引区、および対象区として、3) 両方の卵巣内にあるすべての可視卵胞を吸引する両側卵巣吸引区を設定した。なお、すべての試験区において、OPU処理は発情周期の3日目から週2回ずつ3週連続でDay20まで実施した（発情= Day 0として、Days 3, 6, 10, 13, 17, 20）。また各試験牛の卵胞発育、黄体形成、および血漿プロジェステロン濃度の変化についてはDay 0からDay 30まで調査した。その結果、OPU処理期間中（Day 3~20）もしくは処理後（Day 21~30）において、OPU処理を施した卵巣における卵胞発育プロファイルは、OPU処理を施していない卵巣に残存卵胞があるにも関わらず、またOPU処理を施した卵巣もしくはOPU処理を施していない卵巣に黄体が存在しているか否かにも関わらず、試験区間で差が認められなかった。

一方、OPU処理後（Day21~30）において、非黄体側卵巣吸引区ではすべての試験牛がこの期間中に発情兆候を示したのに対し、黄体側卵巣吸引区および両側卵巣吸引区ではそれぞれ2頭（28.6%）の試験牛がDay30までに発情兆候を示さなかった。また両側卵巣吸引区においては、OPU処理後の黄体形成および血漿プロジェステロン濃度の増加が黄体側卵巣吸引区と比較して遅延した。

以上の結果より、OPU処理を施していない卵巣に持続的な卵胞が存在し、またOPU処理を施した卵巣もしくはOPU処理を施していない卵巣に黄体が存在しても、OPU処理期間中や処理後において連続的なOPU処理を施した卵巣内の卵胞発育は影響を受けないことが示唆された。しかし、黄体を有する卵巣内に連

継続的なOPU処理を施した場合は、処理後に発情の遅延が誘起される可能性が示唆された。

次に研究2では、季節的要因（暑熱期、冷涼期）もしくは生殖相（妊娠、非妊娠）の違いによって繁殖雌牛における卵胞発育や卵母細胞の体外発育能に与える影響を究明することを目的とし、OPU処理により黒毛和種経産牛から卵胞を吸引しCOCsの回収を行った。なお、妊娠牛では1ヶ月半の間に2～6回、非妊娠牛では2ヶ月の間に2～4回、暑熱期（7～9月）と冷涼期（10～11月）にそれぞれOPU処理を実施した。OPU処理後、回収されたCOCsの数と形態、および体外成熟培養、IVF、体外発生培養後の卵母細胞の体外発生能を評価した。

その結果、回収されたCOCsの品質は、試験牛の生殖相に関わらず、暑熱期と冷涼期の間で違いが認められなかった。また妊娠牛では、季節的要因が卵胞発育や初期胚の発育、もしくは胚の品質に及ぼす影響は認められなかった。しかし、非妊娠牛では、OPU処理における平均吸引卵胞数および平均回収卵子数が冷涼期と比較して暑熱期で減少した。一方、生殖相の違いが体外成熟培養およびIVF後のCOCsの発育に及ぼす影響を調べるために、2つの異なる時期のデータを合算した場合、総分割率、胚盤胞発生率および凍結可能胚の割合は非妊娠牛より妊娠牛で有意に高かった（ $P<0.05$ ）。

以上の結果より、黒毛和種経産牛において季節的要因（暑熱期と冷涼期）は妊娠の有無に関わらず、吸引回収されたCOCsの品質もしくは体外成熟培養およびIVF後の卵母細胞の体外発生能に明白な影響を及ぼさないことが示唆された。しかし、非妊娠牛においては季節的要因により卵胞発育に影響が認められた。さらに、妊娠の有無により卵母細胞の体外発生能は異なることが示唆された。

第 2 章

緒言

近年、家畜のバイオテクノロジー技術は大きく進歩し、家畜の改良および増殖において非常に重要な技術として活用されている。特に優れた能力の個体からは多数の産子が生産され改良の促進が図られているが、なかでも人工授精（Artificial Insemination; AI）技術の発達により、優れた遺伝的形質をもつ種雄牛から数千頭の後代産子を得ることが可能となり、家畜改良に大きく貢献している。また、AI技術と対をなす形でウシの胚移植（Embryo Transfer; ET）技術が広く普及しており、ETにより種雄牛側ばかりでなく優秀な雌牛の遺伝的能力を兼ね備えた家畜の後代産子をより効率的に生産できるようになっている。また胚の広域的な流通により国内外から優秀な家畜の遺伝資源を導入することが可能となっており、ET技術は遺伝的多様性の確保においても重要視されている。さらに、乳用種雌牛に黒毛和種牛由来の胚を移植することにより、酪農経営の生産性を向上させることも可能となっている。

現在、国内でETに供される胚の生産は大きく2つの手法で行われている。まず一つ目は、過剰排卵処理を利用して雌牛の体内から多数の胚を回収しETに供する体内胚生産技術であり、特に家畜育種においては家畜改良のスピードをあげるために「MOET（Multiple Ovulation and Embryo Transfer）育種」と称した体内胚生産による家畜改良が行われている。

二つ目の手法は、卵巣内に多数存在する卵胞からCOCsを回収し、そのCOCsを培養液中で人為的に受精させることによって初期胚を生産する体外胚生産技術である。この体外胚生産技術は、雌の屠畜体より得られる卵巣からのCOCs回収、もしくは超音波診断装置を利用した生体内の卵巣内卵胞を吸引するOPU技術を用いたCOCs回収（図1）により、数多くの体外胚を効率よく生産することが可

能であり、特にOPU技術は家畜の改良および生産拡大の手法として急速に商業化されてきている¹。その理由の一つとして、OPU技術は繁殖性を低下させることなく同一雌牛から繰り返しCOCsを回収することが出来ること、また、妊娠初期の雌牛に複数回のOPU処理を行っても、胎子発育への有害な影響を及ぼすことがない²ことも大きな要素となっていると考えられる。

一般に、OPU技術により体外胚を効率よく生産するためには、週2回（3～4日間隔）のOPU処理を実施することで、体外培養に最適な品質のCOCsをより多く回収できることが報告されている³。しかし持続的にOPU処理を実施すると、供卵牛の内分泌機能や卵胞発育のメカニズムが変化するため、発情周期への悪影響が認められており、その結果として発情周期に乱れが生じ、もしくは発情自体が消失すると考えられている^{4,6}。

このようなことから、OPU技術と超音波画像診断を組み合わせることは、学術的にも卵胞や黄体の動態を研究するためには極めて利用価値が高いものと考えられている^{5,7}。特に、OPU処理によって吸引可能な卵胞の数は発情周期のステージに関連していることがよく知られている。また、主席卵胞の存在は、吸引可能な卵胞の数および回収卵子数に負の影響を与えることも明らかにされている⁸。一般に、卵胞波の出現および主席卵胞と最大次席卵胞の逸脱（deviation）が起こる時までの卵胞発育は卵胞刺激ホルモン（FSH）によって調整されており、さらにまた、インヒビンやエストラジオール17 β の主席卵胞からの分泌が、FSH分泌に対してネガティブな調整をしていると考えられている⁹。Toheiら¹⁰は、OPU処理を行うことで血漿中のインヒビンやエストラジオール17 β の濃度が減少し、そのことで血漿中のFSHおよび黄体形成ホルモン（LH）の濃度が上昇することを報告している。その結果として新しい卵胞群の発育が起こると考えられている¹¹。一方、OPU処理後において、もし不完全な卵胞の吸引により、

いくつかの卵胞が卵巣内に残存した場合は、新しい卵胞の発育はその残存した卵胞によって何らかの影響を受けるかもしれない。しかし、OPU処理後に残存した卵胞がその後の吸引可能な卵胞数に影響を及ぼすことに関しては有用な情報がほとんどないのが現状である。

週2回（3～4日間隔）のOPU処理を実施した場合、卵巣内にある中型から大型の卵胞をすべて吸引すると、脆弱な黄体様構造の組織形成が引き起こされ¹²、また週2回のOPU処理により最初の発情周期後の血漿中プロゲステロン濃度は1ng/mL以下まで低下することが報告されている¹³。このOPU処理後に形成された黄体組織の寿命は、自然排卵した卵胞から形成された通常の黄体の寿命より短い^{12,14}。それゆえに、頻繁に卵胞を吸引することが、結果として黄体の消失や機能不全を引き起こし、プロゲステロン生産を不十分にすることが推察されている¹⁵。

一方、近年の地球規模での温暖化により農林水産業への悪影響が懸念され始めている。気温の上昇は、高温期における家畜の繁殖性の低下を引き起こす主要因のひとつと考えられており、ウシの受精能力に関する野外データでは、受胎率が冷涼期と比較して暑熱期で著しく低下することが明らかとなっている¹⁶。さらに、雌牛の胚生存能力は冷涼期と比べて暑熱期でより低いことが認められている¹⁷。このように、暑熱ストレスが卵胞発育のパターンやステロイドの産生、そして遺伝子の発現を変化させることによるCOCsの品質低下が示唆されている¹⁸。

気温の上昇がCOCsの発生能に対して及ぼす直接的な影響についてもまた体外培養系の試験で実証されてきている。Paytonら¹⁹は、卵核胞期のウシのCOCsは培養環境温度を41℃まで上昇させ12時間この環境の中に直接暴露させれば、完全な核成熟やIVF後に発育する能力が低下すると報告している。また、いくつかの報告によると、成熟培養前もしくは成熟培養中に温度が上昇し、COCsが直接その

環境に曝されると、DNAの崩壊や細胞骨格の崩壊が卵母細胞内部に起こることが示されている^{20,21}。暑熱ストレスによるこれらの有害な影響により、体外成熟培養およびIVF後に胚盤胞へ発育する卵母細胞の割合は低下するとされている²⁰。また、吸引可能な卵胞の出現数は季節によって異なり^{5,22}、OPU処理による体外胚生産の割合は、暑熱ストレスに曝された雌牛から回収されたCOCsにおいて低下することが明らかになっている²³。一方で、暑熱ストレスの影響とは別に、雌牛から回収されたCOCsの品質や体外発生能は雌牛の生殖相に関連していることも示唆されている²⁴。

このように、卵胞が選抜され優位性を獲得することに関しては数多くの研究がなされているが、OPU処理後の黄体形成に関する有益な情報はほとんどなく、また卵巣内の黄体の有無が卵胞の発育に与える影響はあまり理解されていない。

さらには、正常な機能を失ったCOCsの品質は、雌牛への暑熱ストレスもしくは生殖相に関連していることが推察されるが、肉用牛雌牛から回収されたCOCsの品質、量および発育能について暑熱ストレスと生殖相との間の相互作用を考慮した情報はほとんど見当たらない。

そこで本研究では、黄体を有する卵巣もしくは黄体がない卵巣に対して週2回のOPU処理を行うことが、卵胞動態および黄体動態に及ぼす影響について調査した。さらに、暑熱ストレスと生殖相との間の相互作用を検証するために、妊娠もしくは非妊娠状態の黒毛和種経産牛から暑熱期および冷涼期に吸引回収したCOCsの数、品質、体外発生能について調査し、卵胞動態およびCOCsの発育能が季節的相違、もしくは雌牛の妊娠の有無等の生殖相の違いによって影響されるかを評価した。

第 3 章

研究 1

黄体側および非黄体側卵巣における週 2 回の卵胞吸引が
卵胞および黄体の動態に及ぼす影響

緒言

超音波診断装置を利用したOPU技術は、IVF技術との組み合わせにより、数多くの体外胚を効率よく生産することが可能であり、ウシの生産業において急速に商業化されてきている¹。

一般に、OPU技術により体外胚を効率よく生産するためには、週2回（3～4日間隔）のOPU処理を実施することで、体外培養に最適な品質のCOCsをより多く回収できる³。しかし、持続的にOPU処理を実施することで、ドナー牛の内分泌機能や卵胞発育のメカニズムが変化し、発情周期への悪影響が認められており、結果として発情間隔が乱れたり、発情自体が消失すると考えられている⁴⁻⁶。

一方、OPU技術と超音波画像診断の組み合わせは、学術的にも卵胞や黄体の動態を研究するためには極めて利用価値があり^{5,7}、OPU処理によって吸引可能な卵胞の数は発情周期の段階に関連していることがよく知られている。また主席卵胞の存在は、吸引可能な卵胞の数および回収卵子数に負の影響を与えることも明らかにされている⁸。

一般に、卵胞波の出現および主席卵胞と最大次席卵胞の逸脱（deviation）が起こる時までの卵胞発育はFSHによって調整されており、さらにまた、インヒビンやエストラジオール 17β の主席卵胞からの分泌が、FSH分泌に対してネガティブな調整をしていると考えられている⁹。

Tohei¹⁰は、OPU処理を行うことで血漿中のインヒビンやエストラジオール 17β の濃度が減少し、そのことで血漿中のFSHおよびLHの濃度が上昇すると報告している。そして、その結果として新しい卵胞群の発育が起こると考えられている¹¹。

OPU処理後において、もし不完全な卵胞の吸引によりいくつかの卵胞が卵巣内に残存した場合、新しい卵胞の発育はその残存した卵胞によって何らかの影響を受けるかもしれない。しかし、OPU処理後に残存した卵胞がその後の吸引可能な卵胞数に影響を及ぼすことに関しては有用な情報がほとんどない。ただ、週2回（3～4日間隔）のOPU処理を実施した場合、卵巣内にある中型から大型の卵胞をすべて吸引すると、脆弱な黄体様構造の組織形成が引き起こされ¹²、週2回のOPU処理により最初の発情周期後の血漿プロゲステロン濃度は1ng/mL以下まで低下することが報告されている¹³。このOPU処理後に形成された黄体組織の寿命は、自然排卵した卵胞から形成された通常の黄体の寿命より短い^{12,14}。それゆえに、頻繁に卵胞を吸引することが、結果として黄体の消失や機能不全を引き起こし、プロゲステロン生産を不十分にすることのかもしれない¹⁵。一方で、卵胞が選抜され優位性を獲得することに関しては数多くの研究がなされているが、OPU処理後の黄体形成に関する有益な情報はほとんどない。さらには、卵巣内の黄体の有無が卵胞の補充数に与える影響はあまり理解されていない。

そこでこの研究1では、黄体が存在するもしくは黄体が存在しない卵巣に対して週2回のOPU処理を行うことが、その後の卵胞動態および黄体動態に及ぼす影響について調査した。

材料および方法

1) OPU処理前の発情同期化

試験牛として正常な発情周期を繰り返す黒毛和種経産牛7頭（10-12歳）を、佐賀県畜産試験場に繋養している牛群より抽出し試験に供した。卵胞の出現は季節や動物により異なることから^{5,22}、この試験では単純なクロスオーバーデザインによって実施した。具体的には、7頭の試験牛を2頭、2頭、3頭のグループに分け、2006年2月から7月の半年間で2カ月おきに3種類の試験区（図2-A,B,C）をすべてのグループが各々実施されるようにした。なお、このクロスオーバーデザインでは、2か月の間隔をおいて、それぞれの実験期間の終わりにそれぞれの順序を変えた。

研究1では、試験牛の排卵が起こってからOPU処理期間中の発情周期を検証できるようにするために、OPU処理の前に各試験牛の発情周期のステージを排卵同期化（オブシンク）プログラム²⁵によって同調させた。具体的には、試験牛に対しゴナドトロピン放出ホルモン（GnRH）アナログ製剤（酢酸フェリチレリン；コンセラル®，シェリングプラウアニマルヘルス株式会社，東京）100μgを筋肉内に投与し、その投与日をDay0（オブシンク処理初日）として、Day7に500μgのプロスタグランジンF₂α類縁体（クロプロステノール；エストラメイト®，シェリングプラウアニマルヘルス株式会社，東京）、Day9に酢酸フェリチレリン100μgをそれぞれ投与した。発情は酢酸フェリチレリンの2回目の投与前後の3日間で一日2回の日常観察をすることによってモニターした。この同期化プログラムのもとで、各グループにおけるすべての試験牛で発情が発現し、その後の超音波画像診断においてOPU処理開始前に排卵が確認された。

2) OPU処理と試験設定

OPU処理による卵胞吸引は、Imaiら²⁶、Tagawaら²⁷の方法に準じて行い、6.5MHzのマイクロコンベックス型トランスデューサーを備えたリアルタイムBモード超音波診断装置(ECHOPAL II 超音波スキャナー装置; 株式会社日立メディコ, 東京) と採卵針(COVA Needle、54cm、17ゲージ; ミサワ医科工業株式会社, 東京, 日本)を使って、3週間連続で週2回、計6回(発情= Day 0として、Days 3, 6, 10, 13, 17, 20) 実施した。

OPU処理時は、まず試験牛を柵場に保定し、鎮静のために塩酸キシラジン(スキルペン[®], 10 mg/cow; 株式会社インターベット, 東京)を筋肉内投与して十分な鎮静状態が得られた後に、臭化プリフィニウム(パドリン[®], 75 mg/cow; 大洋薬品工業株式会社, 東京)を蠕動運動抑制のための鎮痙薬として静脈内に投与した。次いで、試験牛の直腸内の除糞を行った後、陰部および肛門周囲を洗浄し、トランスデューサーを外陰部から膣の深部に挿入した(図1)。

試験牛の卵巣は直腸を介して用手的に操作し、採卵針が通るトランスデューサーの一直線上に吸引しようとする卵胞が位置するように超音波診断装置を見ながら移動させた。その後、ガイドに沿って膣壁を貫通させた採卵針を卵巣へ挿入し、卵巣内の卵胞液を吸引した。なお、可視卵胞(長径3mm以上)の吸引は、吸引ポンプの吸引圧を95~105mmHgの陰圧にして、1分間あたりの流量を20~25mLとして行った。

各試験牛は前述のように7頭を2頭、2頭、3頭の3つのグループにわけ、クロスオーバーデザインにより2カ月間隔で各試験区に供した。なお、各試験区の処理および試験設定は次に示すとおりである。

Group1（黄体側卵巣吸引区）：（図2-A）

黄体を有する卵巣内にあるすべての可視卵胞（長径3mm以上）を3週間連続で週2回吸引し、かつ非黄体側卵巣にある卵胞は卵胞吸引を行わなかった。

Group2（非黄体側卵巣吸引区）：（図2-B）

黄体を有する卵巣の逆側の卵巣内にあるすべての可視卵胞（長径3mm以上）をGroup1と同様に吸引回収した。この場合、黄体を有する卵巣内の卵胞は吸引しなかった。

Group3（両側卵巣吸引区）：（図2-C）

両側卵巣にあるすべての可視卵胞を3週間連続で週2回吸引回収した。

3) 超音波診断装置を利用した卵巣動態の観察

各試験牛における卵胞発育および黄体の形成もしくは退行等の卵巣動態を、7.5MHzのリニアトランスデューサーを装着した超音波診断装置（ECHOPAL II）を用いて、同一術者が1日1回、Day0（発情日=Day0）からDay30まで観察した。まず、超音波検査画面上に卵巣を投影し、長径3mm以上のすべての卵胞の図形および黄体を各卵巣で記録した。この時、卵巣内にある可視卵胞（長径3mm以上）の数はモニター上で認識した。また、黄体の長径を計測するために黄体の最小径および最大径を計測し、平均黄体径は両者（最小径および最大径）の平均値から算出した。

4) 血漿中プロジェステロン濃度の測定

血漿中プロジェステロン濃度を測定するための血液サンプルは、Day0 から Day30 の期間において 2 日おきに頸静脈から回収した。そのサンプルはヘパリンの入った採血管で行い、採血後直ちに実験室に持ち帰り、4 °C、30 分間、800g で遠心分離した。分離した血漿はプロジェステロン濃度測定まで-30 °C で保管した。

血漿中プロジェステロン濃度の測定は自動測定機(SPOTCHEM™ VIDAS SV-5010; アークレイ, 京都)を用いて酵素免疫蛍光測定法(enzyme-linked fluorescent assay; ELFA 法)にて行った。なお、抗プロジェステロンマウスモノクローナル抗体 (VIDAS Progesterone Assay Kit; アークレイ, 京都)をこの分析で使用した。また、このアッセイにおけるアッセイ内変動係数およびアッセイ間変動係数はそれぞれ 8.44%および 5.71%であり、分析感度は 0.25ng/mL であった。

5) 統計解析

卵巣動態およびプロジェステロン濃度などすべての実験データは平均±標準誤差 (Mean±SEM) で表示した。総可視卵胞数 (長径 3mm 以上)、平均黄体長径、最終吸引から排卵までの間隔、プロジェステロンの平均値は SAS (SAS for Windows, version 9.1, SAS Institute Japan 株式会社, 東京)の general linear models (GLM)プロシジャを用いた分散分析によって解析した。統計モデルとして、吸引方法、反復性、黄体の有無、吸引方法×反復性、吸引方法×黄体の有無を含

めた。吸引方法×黄体の有無においては、総可視卵胞数が Day4～Day26 において有意な相互作用を示したので、その平均値は卵巢のタイプ（黄体の有無）により解析した。また平均黄体径、最終吸引から排卵までの間隔および血漿プロゲステロン濃度においては、統計学的なモデルは吸引方法、反復性およびその相互作用を含めて解析した。反復性と黄体の有無間の相互作用は認められなかったもので、これらはモデルから除外した。

結果

Day0（発情日=Day0）からDay30において、卵巣内にある総可視卵胞（長径3mm以上）の平均数の推移を図3に示した。OPU処理を施していない卵巣内には卵胞が無傷のまま存在しているにも関わらず、または黄体が吸引もしくは非吸引卵巣内のいずれかに存在しているにも関わらず、新しい卵胞の発育が各々の吸引後2日以内にOPU処理を施した卵巣内に認められた。またこの時、OPU処理を施した卵巣内の卵胞発育プロファイルはそれぞれの試験区間で同様であった。

一方、週2回3週連続で実施したOPU処理期間中は、OPU処理を施した卵巣内にある可視卵胞の平均数（1.6～14.4個）が、OPU処理を施していない卵巣内にある可視卵胞の平均数（22.5～32.3個）より有意に減少した($P < 0.05$)。

しかし、最終（6回目）のOPU処理後10日目（Day30）においては、OPU処理を施した卵巣内の総可視卵胞の平均数（22.9～24.7個）は、黄体を有する卵巣もしくはその反対側の卵巣に対してのOPU処理に関わらず、吸引をしていない卵巣（25.0～27.6個）と同程度まで回復した($P > 0.05$)。

次に、各試験区間におけるDay0からDay30までの黄体形成（黄体の平均長径）および血漿プロゲステロン濃度プロファイルを、それぞれ図4、5に示した。この中で、週2回3週連続で実施したOPU処理後、黄体側卵巣吸引区および両側卵巣吸引区において、それぞれ2頭（28.6%）の試験牛がDay30まで発情行動を示さなかった。さらに、黄体側卵巣吸引区においては、週2回3週連続で実施したOPU処理期間中である発情周期の8日目（Day8）に卵胞を吸引していない卵巣において新しい黄体を形成する試験牛が1頭観察された。また、黄体側卵巣吸引区および両側卵巣吸引区においては、最終（6回目）のOPU処理後に発情兆候

を発現した試験牛の排卵までの間隔がそれぞれ -0.5 ± 2.5 日目 (-1から6日目) および 7.6 ± 0.5 日目 (6から9日目)であったのに対し、非黄体側卵巢吸引区ではすべての試験牛が最終(6回目)のOPU処理後に発情兆候を示し、それに伴う排卵までの期間は 4.6 ± 0.9 日目 (1-9日目)であった。

片方の卵巢のみにOPU処理を施した黄体側卵巢吸引区および非黄体側卵巢吸引区の両方において、最終(6回目)のOPU処理後の排卵により形成された黄体はすべてOPU処理を施していない方の卵巢内に形成された。さらに、この時の黄体形成のプロファイルは2つのグループ間で同様の傾向であった。一方、両側卵巢吸引区においては、新しい卵胞の出現がOPU処理を施した卵巢に派生し、排卵後に黄体が形成された。なお、Day28からDay30に形成された黄体の平均長径は両側卵巢吸引区に比べて、片方の卵巢のみにOPU処理を施した黄体側卵巢吸引区および非黄体側卵巢吸引区で有意に増加した ($P < 0.05$)。

また、両側卵巢吸引区においては、最終(6回目)のOPU処理後の黄体形成は黄体側卵巢吸引区と比較して遅れ、さらに黄体側卵巢吸引区における血漿プロジェステロン濃度は両側卵巢吸引区より早い割合で増加した。その結果としてDay30における血漿プロジェステロン濃度は両側卵巢吸引区より黄体側卵巢吸引区で有意に高い値を示した ($P < 0.05$)。

考察

週1回（7日間隔）のOPU処理に比べ、週2回（3～4日間隔）のOPU処理はCOCsの回収数により効果的であることが実証されている^{3,6}。また、OPU処理後に正常な卵胞発育をするうえで、再度OPU処理が可能になるために2、3日以内に卵胞が長径2mm以上に達することが重要な要素だと考えられている²⁶。

Toheiら¹⁰は卵胞を吸引することにより血漿中のインヒビンおよびエストラジオール17 β の濃度が減少し、結果としてFSHやLHの血漿中濃度が増加すると報告している。この報告の中で彼らは、血漿中のFSHやLH濃度がOPU処理後に上昇することが新しい卵胞群の成長と成熟を刺激することを示唆している。

一方で、OPU処理後の卵巣内に持続性の卵胞が存在すると、エストラジオール17 β やインヒビンの卵胞からの分泌のために新しい卵胞波の出現が抑制されるものと考えられる。しかし面白いことに、今回の研究において、毎日実施した卵巣の超音波画像診断において、OPU処理を施していない方の卵巣内に卵胞があるにも関わらず、OPU処理後2日以内に新しい卵胞が出現することが確認された。さらに、OPU処理を施した卵巣におけるOPU処理後の卵胞形成（長径3mm以上）のプロファイルは、OPU処理を施した卵巣もしくはOPU処理を施していない卵巣に黄体が存在しているにも関わらず、それぞれの処理区間で差が認められなかった。

一般に、黄体期は発情周期の長さや卵胞波の数の両方に影響すると報告されている²⁸。また、血漿中のプロゲステロン濃度の上昇とそれに関連した負のフィードバックにより、吸引できる卵胞数の減少傾向に関与していることが報告されている⁴。しかし、今回の研究においては、OPU処理を施した卵巣もしくはOPU処理を施していない卵巣における黄体の存在は、OPU処理を施した卵巣

内の卵胞形成プロファイルに影響をしていなかった。

週2回のOPUスケジュールにおいて、黄体を有する卵巢と黄体を有さない卵巢での卵胞の形成の違いは、個々の特異的な現象であると報告されている⁵。それゆえに、週2回3週連続で実施したOPU処理期間中または最終（6回目）のOPU処理後において、OPU処理を施していない卵巢内の卵胞の存在と、OPU処理を施した卵巢もしくはOPU処理を施していない卵巢にある黄体の存在は、OPU処理を施した卵巢内で形成される卵胞にほとんど影響していないことが示唆された。

OPU処理を繰り返し行うことは、OPU処理期間中の生殖器官とそれらの機能が変わるため、その後の動物の生殖行動に対して負の影響を及ぼすことが示唆されている¹²。今回の研究では、黄体側卵巢吸引区および両側卵巢吸引区の両方において、OPU処理を繰り返し行うことに起因したと考えられる発情発現の乱れおよび遅延が認められた。さらに、黄体側卵巢吸引区では1頭の雌牛においてOPU処理期間中に新しい黄体の形成が認められ、その一方で、非黄体側卵巢吸引区では最終（6回目）のOPU処理後にすべての雌牛において発情発現と卵胞の排卵が認められた。OPU処理を繰り返し行うことで卵巢内に線維組織の蓄積のような卵巢白膜の硬化や、卵胞内血腫形成のような病的な変化が引き起こされることが報告されており¹²、さらには、OPU処理が発情周期の異常を引き起こしたり、もしくは内分泌機能や卵胞形成のメカニズムを改善するために発情が消失したりすることが認められている⁴⁻⁶。

今回の研究結果のように、黄体側卵巢吸引区と両側卵巢吸引区の両方で最終（6回目）のOPU処理後に発情回帰日の相違が認められた理由は明白ではないが、これら2つの試験区においては、OPU処理自体が黄体形成を妨げ、内分泌機能へ負の影響を与え、その結果としてOPU処理期間中もしくはOPU処理後

の発情発現が遅延しているのかもしれないと考えられた。

次に、今回の研究において、最終（6回目）の OPU 処理後に認められた黄体の形成と血漿プロゲステロン濃度の増加は、黄体側卵巣吸引区に比べ非黄体側卵巣吸引区で遅い傾向が見られたが、黄体形成プロファイルとプロゲステロン濃度プロファイルではこれら2つの試験区は同様の推移を示した。同様に、両側卵巣吸引区における黄体長径の平均値は最終吸引処理後最終（6回目）の OPU 処理後徐々に増加した。しかし、Day30 における血漿プロゲステロン濃度は黄体側卵巣吸引区より両側卵巣吸引区で低かった。また片方の卵巣のみに OPU 処理を施した黄体側卵巣吸引区および非黄体側卵巣吸引区の両方において、OPU 処理後に OPU 処理を施していない卵巣で卵胞が排卵し、黄体形成が起こっていた。反対に、両側卵巣吸引区では、黄体の形成は吸引卵巣に起こった。Carlin ら¹⁵ はすべての卵胞を頻繁に吸引することで黄体が消失したり、機能不全を起こす可能性があり、その結果としてプロゲステロンの不十分な生産がおけると報告している。さらに、OPU 処理後に形成された黄体様構造体の寿命とプロゲステロン生産能力は自然排卵した卵胞から派生した黄体より劣っている^{12,14}。それゆえに、Day30 において両側卵巣吸引区で血漿プロゲステロン濃度が低いのは、OPU 処理後に出現した卵胞から派生した脆弱な黄体形成に関連しているのかもしれない。

結論として、OPU 処理を施していない卵巣内にある卵胞および OPU 処理を施した卵巣もしくは OPU 処理を施していない卵巣にある黄体の存在は、OPU 処理期間中もしくは OPU 処理後の卵巣内における卵胞形成に影響を及ぼさないことが示唆された。また黄体側卵巣吸引区および両側卵巣吸引区における OPU 処理は、その後の発情発現の乱れや遅れを引き起こす可能性が示唆された。さらに、頻繁に卵巣内のすべての卵胞を吸引することにより、機能の低下

した脆弱な黄体様構造体が形成される可能性が示唆された。

研究 2

季節および生殖相の違いが黒毛和種経産牛から吸引回収された COCs の
品質およびその後の体外発生能に及ぼす影響について

緒言

気温の上昇は、暑熱期における家畜の繁殖性の低下を引き起こす主要因のひとつと考えられている。ウシの受精能力に関する野外データでは、受胎率が冷涼期と比較して暑熱期で著しく低下することが明らかとなっている¹⁶。さらに、雌牛体内における初期胚の生存能力は冷涼期と比べて暑熱期でより低いことが認められている¹⁷。これは、暑熱ストレスによって卵胞発育のパターンやステロイドの産生、関連する遺伝子の発現が変化を受けることによってCOCsの品質が損なわれてしまうことに関連していると推察されている¹⁸。

気温の上昇が、COCsの発生能に対して及ぼす直接的な影響についてもまた体外培養系の試験で実証されてきている。例えば、Paytonら¹⁹は、卵核胞期のウシの卵母細胞は培養環境温度を41℃まで上昇させ、その環境の中に12時間直接暴露させれば、完全な核成熟やIVF後の発育がおこる能力が低下すると報告している。またいくつかの報告によると、成熟培養前もしくは成熟培養中に温度が上昇し、COCsが直接その環境に曝されると、DNAの崩壊や細胞骨格の崩壊が卵母細胞内部に起こることも明らかにされている^{20,21}。このように、暑熱ストレスによる有害な影響により、体外成熟培養およびIVF後に胚盤胞へ発育する卵母細胞の割合が低下するのである²⁰。

近年、体外胚生産との組み合わせによるOPU技術は牛の生産分野において次第に商業ベースで実施されるようになってきている¹。この技術は繁殖性を低下させることなく同一雌牛からCOCsを繰り返し回収することが出来る。さらに、妊娠初期における雌牛においてもOPU処理を施すことが可能であり、複数回OPU処理を行っても胎子発育に対して有害な影響を及ぼすことはない²。

しかし一方で、OPU処理により吸引可能な卵胞の出現数は季節によって異なる

ことが報告されており^{5,22}、特にOPU処理による体外胚生産の割合は、暑熱ストレスに曝された雌牛から回収されたCOCsにおいて低下することが明らかになっている²³。また暑熱ストレスの影響に加えて、雌牛から回収されたCOCsの品質や体外発生能は生殖相に関連していることが報告されている²⁴。

このように、正常な機能が失われたCOCsの品質は雌牛への暑熱ストレスもしくは生殖相に関連しているかもしれないが、肉用牛雌牛から回収されたCOCsの品質、量もしくは発育能についての報告はほとんどない。

そこで、研究2では、妊娠もしくは非妊娠の黒毛和種経産牛から暑熱期および冷涼期に吸引回収したCOCs数、品質、体外発生能について調査し、さらに卵胞動態および卵母細胞の発育能が季節および雌牛の生殖相によって影響されるか評価した。

材料および方法

1) 試験牛

試験牛として、佐賀県畜産試験場に繋養している黒毛和種経産牛を供した。OPU処理は、生殖相を区分するために妊娠牛および非妊娠牛に分け、それぞれ妊娠牛6頭(年齢 6.8 ± 1.4 歳; 産次数 5.3 ± 1.5 産; 体重 441.7 ± 16.7 kg; 最終分娩後 156.3 ± 30.0 日; 初回OPU処理時の妊娠日数 75.7 ± 3.7 日、平均±標準誤差) および非妊娠牛12頭(年齢 8.6 ± 0.5 歳; 産次数 6.6 ± 0.4 産; 体重 439.6 ± 10.4 kg; 最終分娩後 250.5 ± 32.7 日、平均±標準誤差) で行った。妊娠牛、非妊娠牛のボディコンディションスコア(BCS: 和牛登録協会のガイドによる1から5段階のスケール)は実験開始時において、それぞれ 3.3 ± 0.1 および 3.2 ± 0.1 であった。なお、妊娠牛には乾草スーダン(5.0kg/頭)およびふすま(0.5~1.5kg/頭、平均乾物摂取量 5.9 ± 0.2 kg、TDN50%、CP12%)を給餌し、一方非妊娠牛には試験期間中を通して同じ粗飼料(平均乾物摂取量 5.9 ± 0.1 kg)を給餌した。

また試験期間として、2008年の7月から9月を暑熱期とみなし、同年10月から11月を冷涼期と見なし季節的な比較を行った。なお、各OPU処理時における実験地域の外気温および相対湿度のデータは佐賀地方気象台から取得し、温度湿度指数(THI)を次の式に当てはめて算出した。

$$THI = 0.81T + 0.01H(0.99T - 14.3) + 46.3 \quad (T: \text{外気温}, H: \text{相対湿度})$$

この場合、暑熱期における実験地域の平均最低気温および平均最高気温はそれぞれ 23.9 °C and 33.9 °C (平均気温 28.3 ± 0.3 °C)、平均最低湿度および平均最高

湿度は 55.0%および 71.0% (平均湿度 $66.5 \pm 0.3\%$)であり、THIは最低および最高値がそれぞれ 71.9 および 86.6 (平均THI 78.3 ± 0.4) であった。一方、非暑熱期における実験地域の平均最低気温および平均最高気温はそれぞれ 12.9 °C and 23.3 °C (平均気温 17.5 ± 0.4 °C)、平均最低湿度および平均最高湿度は 52.0%および 67.0% (平均湿度 $62.9 \pm 1.3\%$)であり、THIは最低および最高値がそれぞれ 55.9 および 70.5 (平均THI 62.2 ± 0.6) であった。

2) 卵胞吸引およびCOCs回収

OPU処理による卵胞吸引およびCOCs回収は、妊娠牛では1ヶ月半の期間に6～14日間隔で2～6回（各シーズンで3頭ずつ）、非妊娠牛では2カ月の期間に6～14日間隔で2～4回（各シーズンで12頭ずつ）のペースで実施した。OPU処理による卵胞吸引は、研究1と同様にImaiら²⁶およびTagawaら²⁷の方法に準じて行い、6.5MHzのマイクロコンベックス型トランスデューサーを備えたリアルタイムBモード超音波診断装置(ECHOPAL II 超音波スキャナー装置; 株式会社日立メデイコ, 東京) と採卵針(COVA Needle、54cm、17ゲージ; ミサワ医科工業株式会社, 東京)を使って実施した。

簡単には、OPU処理時はまず試験牛を柵場内に保定し鎮静のために塩酸キシラジン(スキルペン[®], 10 mg/cow; 株式会社インターベツト, 東京)を筋肉内投与し、十分な鎮静状態が得られた後に臭化プリフィニウム(パドリン[®], 75 mg/cow; 大洋薬品工業株式会社, 東京)を蠕動運動抑制のための鎮痙薬として静脈内に投与した。次いで、試験牛の直腸内の除糞を行った後、陰部および肛門周囲を洗浄し、トランスデューサーを膣の前方部位に挿入した(図1)。試験牛の卵巣

は直腸を介して操作し、採卵針が通るルートの一直線上に吸引しようとする卵胞が位置するように超音波診断装置を見ながら移動させた。その後、ガイドに沿って採卵針を挿入し膣壁を貫通させ、卵巣内の卵胞に達して吸引した。なお、可視卵胞（長径3mm以上）の吸引は、吸引ポンプ(FV4; 富士平工業株式会社, 東京, 日本)を用いて吸引圧を95~105mmHgの陰圧にし、1分間あたりの流量を20~25mLとして行った。

なお、卵胞内内容物はヘパリン(10 IU/ml; 味の素株式会社, 東京, 日本)および0.5%ウシ胎児血清(FBS; インビトロジェン, Carlsbad, CA, USA)を添加した乳酸リンゲル液(日本全薬工業株式会社, 福島)とともにチューブに回収し、卵胞数およびCOCsは個体ごとに分別回収し記録した。

3) 卵丘細胞卵子複合体 (COCs) の品質評価

それぞれの卵巣から回収されたCOCsは、吸引回収後ただちに既報の方法によって評価した²⁹。グレード1は数層の卵丘細胞を有し均質な卵細胞質をしているものとし、次いで卵丘細胞が1~3層のもの、卵丘細胞がなく完全に裸化したもの、卵丘細胞が膨化したもの、変性したものをそれぞれグレード2、3、4、5とした(図6)。品質の評価後グレード3から5のCOCsは廃棄し、残ったCOCsは体外成熟培養、体外受精および体外発生培養に供した。

4) 体外成熟培養、体外受精および体外発生培養

グレード1および2のCOCsは、0.02 AU/ml 卵胞刺激ホルモン (FSH; 川崎三鷹株式会社, 川崎)、5% ウシ胎児血清および 50 $\mu\text{g/ml}$ ゲンタマイシン (シグマ, St. Louis, MO, USA)を添加したTCM199培地(インビトロジェン)内に入れ成熟培養を行った。なお、COCsは38.5°C、5% CO₂、湿度飽和の気相条件下で成熟培養を22時間実施した。

成熟培養後、1頭の黒毛和種雄牛の凍結精液を37°Cで融解し、IVF用溶液(IVF 100; 機能性ペプチド研究所, 山形)で遠心洗浄 (630g、5分間) を2回行った。精子の沈殿物は最終濃度が 7.5×10^6 になるように希釈してIVF用溶液に再度浮遊させた。その後、COCsを38.5°C、5% CO₂、湿度飽和の気相条件下で6時間、精子を滴下したマイクロドロップ内に入れてIVFを行った。

IVF後、COCsは5%ウシ胎児血清および50 $\mu\text{g/ml}$ ゲンタマイシンを添加した修正合成卵管液 (mSOFaa)³⁰に移し、38.5°C、5% CO₂、湿度飽和の気相条件下で24時間培養した。

24時間の培養後、COCsはガラスピペットで軽くピペッティングすることで裸化し、0.3%ウシ血清アルブミン (シグマ)、10 ng/ml 上皮細胞増殖因子 (シグマ)、2% (v/v) Eagle's basal medium (BME) アミノ酸溶液 (インビトロジェン)、1% (v/v) minimal essential medium (MEM) non-essential アミノ酸溶液(インビトロジェン)を添加したmSOFaa溶液に移し、38.5°C、5% CO₂、5% O₂、90% N₂、湿度飽和の気相条件下で培養した。

なお、胚の分割および胚盤胞の形成については、それぞれ培養後72時間目および8日目に評価した。8日目に胚盤胞まで発育した胚は倒立顕微鏡下での形態学的な観察を行い、A、B、CおよびDランク (それぞれexcellent、good、fair もしく

は poor) に分類した³¹。Aランクの胚盤胞では栄養膜細胞、内部細胞塊と胞胚腔が鮮明に観察されるものとし、Aランク胚だけを凍結保存可能胚と判断した。

5) 統計処理

各データは解析前にアークサインにより変換してから計算した。卵胞および回収 COCs、そしてグレード 1 および 2 の COCs の割合、分割率、胚盤胞に発育した胚の割合、凍結可能胚の割合は SAS (SAS for Windows, version 9.1, SAS Institute Japan 株式会社, 東京)の General linear models (GLM)プロシジャを用いた分散分析によって解析した。なお、この統計モデルはウシの生殖相(妊娠×非妊娠)の影響、季節的(暑熱期×冷涼期)な影響、そして2 要因からの各データに及ぼす相互作用を解析した。また、実験データは平均±標準偏差 (Mean±SEM) で表現し、確率値(P)は 0.05 以下を有意差ありと判定した。

結果

表 1 に示すように、卵胞数と試験牛から吸引回収されたCOCs数において、試験牛の生殖相(妊娠×非妊娠)と季節的(暑熱期×冷涼期)な要因との間で相互作用が認められた ($P<0.05$)。しかし、試験牛の生殖相は平均卵胞数およびCOCs数に影響しなかった ($P>0.05$)。また、平均卵胞数および非妊娠牛から回収されたCOCsは暑熱期と比較して冷涼期で有意に増加した ($P<0.05$) が、この卵胞の出現に対する季節的な影響は妊娠牛では観察されなかった。

一方、回収されたCOCsの品質として、グレード1~2のCOCsが占める割合は、試験牛の生殖相に関わらず暑熱期と冷涼期の間で差が認められなかった。

次にIVF後の培養において、分割卵の割合や、胚盤胞もしくは凍結可能胚へと発育する割合においては、試験牛×季節の相互作用が認められなかった(表 2)。

非妊娠牛においては冷涼期と暑熱期で分割率に有意差 ($P<0.05$) が認められたが、両シーズン間において胚盤胞もしくは凍結可能胚へと発育する割合は有意な差が認められなかった。一方、妊娠牛においては、胚発育における季節的な違いは認められなかった。

生殖相が体外成熟培養およびIVF後の卵母細胞の発育に及ぼす影響を調べるために、2つの異なるシーズンのデータを合算した場合、総分割率、胚盤胞発生率および凍結可能胚の割合は非妊娠牛より妊娠牛で有意に高かった(各分割率, 63.3 ± 2.3 vs. 74.3 ± 3.1 ; 胚盤胞発生率, 33.4 ± 2.1 vs. 46.9 ± 3.0 ; 凍結可能胚発生率, 21.8 ± 1.8 vs. 30.1 ± 4.0 、 $P<0.05$)。

考察

高い環境温度や湿度により、発情行動の発現が減少し、卵巣内の卵胞発育が変化し、卵母細胞は発育能力に対する悪影響を受け、結果として胚発育が阻害されるため、家畜の繁殖異常が危ぶまれている^{32,33}。これまで、OPU技術を使って回収されたCOCsの品質や体外発生能が暑熱ストレスにより著しく低下することが報告されており³⁴、また夏期に屠殺されたホルスタイン雌牛の卵胞から採取されたCOCsでは体外成熟培養およびIVF後の胚盤胞への発育能力が低下していることが明らかにされている³⁵。さらに、生体では搾乳牛においては、THIの値が71以上になると受精率が低下することから、暑熱ストレスへの対策を講じる場合、このTHI71が重要なターニングポイントになることが示唆されている³⁶。

今回の研究では暑熱期における平均THIの値が78.3であり、上記から繁殖行動に影響があったものと推測された³⁷。しかし、暑熱期に試験牛から吸引回収したCOCsに占めるグレード1~2の割合は冷涼期に回収されたものと有意な差が認められなかった。また、供試牛の各生殖相において、体外成熟培養およびIVF後のCOCsの体外発生能については、明白な季節的影響が認められなかった。さらに、胚の品質においても夏（暑熱期：7月から9月）と秋（冷涼期：10月から11月）で同様であった。

暑熱ストレスへの暴露は、温暖な気候で飼養されている品種より、熱帯気候に適応した品種の繁殖機能に対してあまり不利な影響を及ぼさないことが実証されている³⁴。さらに、卵母細胞や胚のレベルで気温上昇に高い感受性を示すような遺伝的な差異が認められている^{34,38}。それゆえに、今回の結果のように、季節的な要因がCOCsの品質や胚発育に影響を与える環境にあるにも関わらず暑熱期

と冷涼期において差が認められないという一見矛盾したようなこれら結果は、ある程度気温上昇に対する感受性が低い遺伝的背景があるかもしれないと考えられた。

搾乳牛においては、COCsの品質や初期胚発育への障害は、負のエネルギーバランスや低下したボディーコンディションに関連していることが示されている³⁹。暑熱ストレスを受けた搾乳牛では、乾物摂取量の低下が起こり、負のエネルギーバランスの期間が延長する⁴⁰。そしてさらに、負のエネルギーバランスの有害な影響は、暑熱ストレスを宣告する環境温度の増加に伴って、増大するのかもしれない³³。それゆえに、暑熱ストレスは直接的にも間接的にも繁殖行動に影響を及ぼす可能性があり、直接的な作用はエネルギーバランスの修正を通して調整される。搾乳牛においては、高泌乳に関連した雌牛のエネルギーの要求量が、低泌乳のエネルギー要求量より高い傾向にあることが実証されている⁴¹。また、栄養要求量は肉用牛雌牛でさえ年間を通してさまざまであるが⁴²、雌牛のエネルギー要求量は妊娠期間中で増加することが示されている⁴³。それゆえに、妊娠していない肉用牛雌牛における栄養要求量の変化は妊娠している肉用牛の雌牛より少ないものと考えられる。

我々は今回の研究の中で、季節的な要因が卵胞発育に及ぼす影響は試験牛の2つの生殖相の違いにより異なることを明らかにした。特に妊娠牛では、期待に反して季節的な要因が卵胞発育に与える影響は認められなかった。しかし反対に、非妊娠牛においては、平均卵胞数と回収卵子数で、冷涼期と暑熱期の間で相違が観察され、結果として暑熱期の回収COCs数の減少が認められた。これらの季節的要因により引き起こされる卵胞発育に及ぼす影響が妊娠牛と非妊娠牛で一致しない理由は明らかではない。

今回の研究では、非妊娠牛においてOPU処理の頻度が暑熱期と冷涼期の間で異

なっていた。これまでに、OPU処理の間隔と頻度により繁殖雌牛における可視卵胞数と吸引回収卵子数に影響があることが立証されている^{5,8}。また週1回のOPU処理（7日間隔）と比較して、週2回のOPU処理（3～4日間隔）によって吸引回収卵子数が増加し、より効果的であることが証明されている^{3,6}。このことに関連して、Boniら⁵は、吸引卵胞数はOPU処理の頻度が増加することで増えると報告している。しかし、今回の研究の中で、我々は非妊娠牛で冷涼期よりも多く暑熱期にOPU処理を頻繁に実施したにも関わらず、暑熱期におけるOPU処理一回あたりの平均卵胞数と吸引回収卵子数は減少した。吸引回収卵子数は血漿中のインシュリン濃度が相互に関連しており、それが卵巣によって分泌されるステロイドホルモンの生産と性腺刺激ホルモンへの感受性に影響を及ぼしていることが示唆されている⁴⁴。また低い乾物摂取量によって負のエネルギーバランスが引き起こされ、血漿中のインスリン、グルコースおよびインシュリン様成長因子I (IGF-I)の濃度減少が誘発され、それが卵胞発育とCOCsの品質に影響する^{28,33}。それゆえに、暑熱期における暑熱ストレスと負のエネルギーバランスが卵胞発育を害し、その結果として非妊娠牛から得られるCOCs数の減少が誘発されたのかもしれない。

今後の研究の中で、生殖相が卵胞発育に及ぼす影響を明らかにしていくためには、肉用牛雌牛の妊娠個体もしくは非妊娠個体におけるインシュリンの血漿中濃度やエネルギーバランスを比較しなければならないと考えられた。

また今回の研究の中で我々は、吸引回収したCOCsの形態学的な品質が妊娠牛と非妊娠牛との間で違わなかったにも関わらず、非妊娠牛から得られたCOCsの体外発生能が妊娠牛から得られたCOCsよりも低いことを明らかにした。この結果により、非妊娠牛から得られるCOCsの卵細胞質の品質は、妊娠牛から得られたCOCsのものと比較して劣っている可能性が示唆された。さらに、体外成熟培

養およびIVF後の卵母細胞の発生能は生殖相の違いに関連している可能性も示唆された。

結論として黒毛和種経産牛において季節的要因（暑熱期と冷涼期）はウシの生殖相に関わらず、吸引回収されたCOCsの品質もしくは体外成熟培養およびIVF後の卵母細胞の体外発生能にあまり明白な影響を及ぼさないことが示唆された。しかし、非妊娠牛においては季節的要因により卵胞発育に少なからず影響が認められ、また生殖相の違いにより卵母細胞の体外発生能は異なることが示唆された。

第 4 章

総括

超音波診断装置を利用した生体内の卵巣内卵胞を吸引する OPU 技術を用いた COCs 回収と体外胚生産技術を組み合わせることにより、数多くの体外胚を効率よく生産することが可能であり、特に OPU 技術は産業動物分野における高度獣医療の中でも家畜の改良および生産拡大の手法として急速に商業化されてきている¹。その理由のひとつとして、OPU 技術は繁殖性を低下させることなく同一雌牛から COCs を繰り返し回収することができ、また妊娠初期の雌牛に複数回の OPU 処理を行っても、胎子発育への有害な影響を及ぼすことはない²ことも大きな魅力となっていると考えられる。

一般に、OPU 技術により体外胚生産を効率よく実施するためには、週 2 回 (3~4 日間隔) の OPU 処理を実施することで、体外培養に最適な品質の COCs をより多く回収できることが示唆されている^{3,6}。しかし持続的に OPU 処理を実施すると、供卵牛の内分泌機能や卵胞発育のメカニズムが変化するため、発情周期への悪影響が認められており、その結果として発情周期に乱れが生じ、もしくは発情自体が消失すると考えられている^{4,6}。哺乳動物の卵母細胞は、未だ完全には理解されていない複雑な環境である卵胞および卵巣の中で成長し、受精後に初期胚として発育するための能力を獲得している⁴⁵。事実、OPU 処理後に正常な卵胞発育をするうえで、再度 OPU 処理が可能になるために 2、3 日以内に長径 2mm 以上に達することが重要な要素だと考えられている⁴⁶。これは、卵胞内には卵母細胞の他に 3 つの異なる細胞種 (莢膜細胞、顆粒膜細胞、卵丘細胞) が存在し、それらがお互いに協力して卵母細胞の減数分裂の休止を維持する役目を担い⁴⁷、そして卵母細胞が発育するための能力を獲得するための環境を整える必要があるからと考えられる⁴⁸。また、卵胞内では卵丘細胞と卵母

細胞の間のギャップジャンクションを介した直接的なコミュニケーションを行っているのと同様に、卵胞内に存在する3つの異なる細胞種すべてが、持続的にホルモンや成長因子のパラクリンやオートクリンを介して細胞間や卵母細胞との間接的なコミュニケーションを行っているものと考えられる⁴⁹。さらに、Toheiら¹⁰は卵胞を吸引することにより血漿中のインヒビンおよびエストラジオール17 β の濃度が減少し、結果としてFSHやLHの血漿中濃度が増加すると報告している。この報告の中で彼らは、血漿中のFSHやLH濃度がOPU処理後に上昇することが新しい卵胞群の成長と成熟を刺激することを示唆している。これらの因子がどのように卵母細胞の能力を確立するかは不明であるが、FSH⁵⁰、GH⁵¹、EGF^{52,53}、IGF-I⁵³などのような高分子が体外における卵母細胞の発育能に有益な影響を与えていることが明らかにされている。

一方で、OPU処理後の卵巣内に持続性の卵胞が存在すると、エストラジオール17 β やインヒビンの卵胞からの分泌のために新しい卵胞波の出現が抑制されるものと考えられた。しかし興味深いことに、本研究においては毎日実施した卵巣の超音波画像診断において、OPU処理を施していない方の卵巣内に卵胞があるにも関わらず、OPU処理後2日以内に新しい卵胞が出現することが確認された。さらに、OPU処理を施した卵巣におけるOPU処理後の卵胞形成（長径3mm以上）のプロファイルは、OPU処理を施した卵巣もしくはOPU処理を施していない卵巣に黄体が存在しているにも関わらず、それぞれの処理区間で差が認められなかった。

一般に、黄体期は発情周期の長さや卵胞波の数の両方に影響すると報告されている²⁸。また、血漿中のプロゲステロン濃度の上昇とそれに関連した負のフィードバックにより、吸引できる卵胞数の減少傾向に関与していることが報告されている⁴。しかし、本研究においては、OPU処理を施した卵巣もしくはOPU

処理を施していない卵巣における黄体の存在は、OPU処理を施した卵巣内の卵胞形成プロファイルに影響をしていなかった。なお、週2回のOPUスケジュールにおいて、黄体を有する卵巣と黄体を有さない卵巣での卵胞の形成の違いは、卵巣特異的なものかはさておき、動物特異的な現象であると報告されている⁵。それゆえに、週2回3週連続で実施したOPU処理期間中または処理後において、OPU処理を施していない卵巣内の卵胞の存在と、OPU処理を施した卵巣もしくはOPU処理を施していない卵巣にある黄体の存在は、OPU処理を施した卵巣内における卵胞形成にほとんど影響していないものと考えられた。

頻繁に OPU 処理を繰り返すことは、OPU 処理期間中の生殖器官とそれらの機能が変化するため、その後の動物の生殖行動に対して負の影響を及ぼすことが示唆されている¹²。本研究では、黄体側卵巣吸引区および両側卵巣吸引区の両方において、OPU 処理を繰り返し行うことに起因したと思われる発情発現の遅延が認められた。さらに、黄体側卵巣吸引区では1頭の雌牛において OPU 処理期間中に新しい黄体の形成が認められ、その一方で、非黄体側卵巣吸引区では最終の OPU 処理後にすべての雌牛において発情発現と卵胞の排卵が認められた。OPU 処理を繰り返し行うことで卵巣内に線維組織が蓄積し、卵巣白膜の硬化や卵胞内血腫形成などの病的な変化が引き起こされることが報告されており¹²、さらには、OPU 処理が不正な間隔の発情周期を引き起こしたり、もしくは内分泌機能や卵胞形成のメカニズムを改善するために発情が消失したりすることが認められている⁴⁻⁶。

本研究結果のように、黄体側卵巣吸引区と両側卵巣吸引区の両方で最終の OPU 処理後に発情回帰日の違いが認められた理由は明白でないが、これら2つの試験区においては、OPU 処理自体が黄体形成を妨げ、内分泌機能へ負の影響を与え、その結果として OPU 処理期間中もしくは OPU 処理後の発情発現が乱

れたり遅れているのかもしれないと考えられた。

次に、最終の OPU 処理後の黄体形成と血漿プロゲステロン濃度の増加においては、黄体側卵巣吸引区に比べ非黄体側卵巣吸引区で遅い傾向が見られたが、黄体形成プロファイルとプロゲステロン濃度プロファイルではこれら 2 つの試験区は同様の推移を示した。また、両側卵巣吸引区における黄体の長径の平均値は最終吸引処理後最終の OPU 処理後徐々に増加した。しかし、Day30 における血漿プロゲステロン濃度は黄体側卵巣吸引区より両側卵巣吸引区で低かった。また片方の卵巣のみに OPU 処理を施した黄体側卵巣吸引区および非黄体側卵巣吸引区の両方において、OPU 処理後に OPU 処理を施していない卵巣で卵胞が排卵し、黄体形成が起こっていた。反対に両側卵巣吸引区では、黄体の形成は吸引卵巣に起こった。

このことに関連して、Carlin ら¹⁵はすべての卵胞を頻繁に吸引することで黄体が消失したり機能不全を起こす可能性があり、その結果としてプロゲステロンの不十分な生産がおけると報告している。さらに、OPU 処理後に形成された黄体様構造体の寿命とプロゲステロン生産能力は自然排卵した卵胞から派生した黄体より低下している^{12,14}。それゆえに、Day30 において両側卵巣吸引区で血漿中のプロゲステロン濃度が低いのは、OPU 後に出現した卵胞から派生した黄体の形成不全に関連していることが示唆された。

一方、高い環境温度や湿度により、発情行動の発現が減少し、卵巣内の卵胞発育が変化し、卵母細胞は発育能力に悪影響を受け、そして胚発育が阻害されるため、家畜の繁殖異常が危ぶまれている^{32,33}。これまで、OPU 技術を使って回収されたCOCsの体外発生能や品質が暑熱ストレスにより著しく低下することが報告されており³⁴、また夏期に屠殺されたホルスタイン雌牛の卵胞から採取されたCOCsにおいても体外成熟培養およびIVF後の胚盤胞への発育能力が低下

していることが明らかにされている³⁵。さらに、生体では搾乳牛においては、THIの値が71以上になると受精率が低下することが示唆されており、このTHI71が暑熱ストレスへの指標として重要とされている³⁶。

本研究では暑熱期における平均THIの値が78.3であり、繁殖行動に影響があったものと推測された³⁷。しかし、暑熱期に試験牛から吸引回収したCOCsに占めるグレード1~2の割合は冷涼期に回収されたものと有意な差が認められなかった。また、供試牛の各生殖相において、体外成熟培養およびIVF後の卵母細胞の体外発生能については、明白な季節的影響が認められなかった。さらに、胚の品質においても暑熱期と冷涼期で同様であった。

一方、卵母細胞や胚のレベルで気温上昇に高い感受性を示すような遺伝的な差異が認められている^{34,38}。暑熱ストレスへの暴露は、温暖な気候で飼養されている品種より、熱帯気候に適応した品種のウシの繁殖機能に対してあまり不利な影響を及ぼさないことが報告されている³⁴。それゆえに、今回の結果のように、季節的な要因がCOCsの品質や胚発育に影響を与える環境にあるにも関わらず、暑熱期と冷涼期において差が認められないという一見矛盾したような結果が得られたのは、ある程度気温上昇に対する感受性が低い遺伝的背景が関与していることが考えられた。

また、搾乳牛においては、COCsの品質や初期胚発育への障害は負のエネルギーバランスや低下したボディーコンディションに関連していることが示されている³⁹。暑熱ストレスを受けた搾乳牛では乾物摂取量の低下が起こり、負のエネルギーバランスの期間が延長する⁴⁰。そしてさらに、負のエネルギーバランスの有害な影響は、暑熱ストレスと関連する環境温度の増加に伴って、増大するのかもしれない³³。それゆえに、暑熱ストレスは直接的にも間接的にも繁殖行動に影響を及ぼす可能性があり、直接的な作用はエネルギーバランスの修正を通して調

整される。搾乳牛においては、高泌乳に関連した雌牛のエネルギーの要求量が、低泌乳のエネルギー要求量より高い傾向にあることが実証されている⁴¹。また、栄養要求量は肉用牛雌牛でさえ年間を通してさまざまであるが⁴²、雌牛のエネルギー要求量は妊娠期間中で増加することが示されている⁴³。それゆえに、妊娠していない肉用牛雌牛における栄養要求量の変化は妊娠している肉用牛の雌牛より少ないものと考えられる。

ウシの卵巢動態の季節的な変化について、Zeronら⁵⁴は一卵巢内に存在する3～8mmの卵胞数は夏（12.0個）と比較して冬（19.6個）で多く、また一卵巢あたり10個未満の卵胞しか存在しない卵巢は冬では全体の16%だったのに対し、夏では50%まで増加することを報告している。今回の研究においても、非妊娠牛においては、平均卵胞数と回収卵子数で冷涼期と暑熱期の間で著しい違いが観察され、結果として暑熱期の回収卵子数の減少が認められた。しかし、一方で季節的な要因が卵胞発育に及ぼす影響は試験牛の2つの生殖相の違いにより異なることが明らかとなった。特に妊娠牛では、期待に反して季節的な要因が卵胞発育に与える影響は認められなかった。これらの季節的要因により引き起こされる卵胞発育に及ぼす影響が、妊娠牛と非妊娠牛で一致しない理由は明らかにはできなかったが、卵胞液や顆粒膜細胞、卵母細胞におけるリン脂質の脂肪酸組成は夏期では飽和脂肪酸が非常に高く、冬期では一価不飽和脂肪酸と多価不飽和脂肪酸の割合が高くなることが示唆されている⁵⁴ことから、今後は栄養面と併せて検討していく必要があると考えられた。

また本研究では、OPU処理の頻度が繁殖雌牛における可視卵胞数と吸引回収卵子数に与える影響についても若干の知見が得られた。非妊娠牛においては、OPU処理の頻度が暑熱期と冷涼期の間で異なり、冷涼期よりも多く暑熱期にOPU処理を頻繁に実施したけれども、暑熱期におけるOPU処理一回あたりの平均卵胞数と

吸引回収卵子数は減少した。吸引卵胞数は、OPU処理の頻度が増加することで増えると報告されており⁵、またOPU処理の間隔と頻度により繁殖雌牛における可視卵胞数と吸引回収卵子の数に影響があることも報告されている^{5,8}。週2回のOPU処理(3~4日間隔)によって吸引回収されるCOCsの数は、週1回のOPU処理(7日間隔)によって吸引回収されるCOCsの数と比較して増加し、より効果的であることも証明されている^{3,6}。一方で、非妊娠牛では吸引回収卵子数が血漿中のインシュリン濃度に相互に関連しており、卵巣によって分泌されるステロイドホルモンの生産と性腺刺激ホルモンへの感受性に影響を及ぼしていることが示唆された⁴⁴。暑熱期においては低い乾物摂取量によって負のエネルギーバランスが引き起こされ、血漿中のインスリン、グルコースおよびインシュリン様成長因子I(IGF-I)の濃度減少が誘発され、結果として卵胞発育とCOCsの品質に影響しているものと考えられた^{28,33}。

今後の研究の中で、生殖相の違いが卵胞発育に及ぼす影響を同定していくために、妊娠個体もしくは非妊娠個体におけるインシュリンの血漿中濃度やエネルギーバランスも併せて比較しなければならないと考えられた。また本研究では、吸引回収されたCOCsの形態学的な品質が生殖相の違いで差がなかったにも関わらず、妊娠牛から得られた卵母細胞の体外発生能が非妊娠牛から得られた卵母細胞よりも高いことを実証した。このことから、妊娠牛から得られた卵母細胞の卵細胞質の品質は、非妊娠牛から得られる卵母細胞のものと比較して優れている可能性が示唆された。さらに、体外成熟培養およびIVF後の卵母細胞の発生能が生殖相の違いに関連している可能性も示唆された。

総括として、本研究により、OPU処理を施していない卵巣内にある卵胞およびOPU処理を施した卵巣もしくはOPU処理を施していない卵巣にある黄体の存在は、OPU処理期間中もしくはOPU処理後の卵巣内における卵胞形成に影響を及ぼ

さないことが示唆された。また黄体側卵巣吸引区および両側卵巣吸引区における卵胞吸引は、OPU処理後の発情発現の乱れや遅れを引き起こす可能性が示唆された。さらに、頻繁に卵巣内のすべての卵胞を吸引することにより、機能の低下した黄体様構造体が形成される可能性が示唆された。一方、黒毛和種経産牛において季節的要因（暑熱期と冷涼期）は試験牛の生殖相に関わらず、吸引回収した卵母細胞の品質もしくは体外成熟培養およびIVF後の卵母細胞の体外発生能にあまり明白な影響を及ぼさないことが示唆された。しかし、非妊娠牛においては季節的要因により卵胞発育に少なからず影響が認められ、また生殖相の違いにより卵母細胞の体外発生能は異なることが示唆された。以上の結果は、OPU技術による効率的胚生産技術の開発を行ううえで卵巣動態や卵母細胞の体外発生能を理解するための一助になると考えられた。

图 表

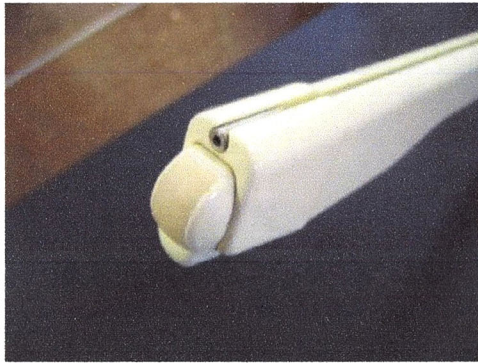
A)



B)



C)



D)



E)



F)

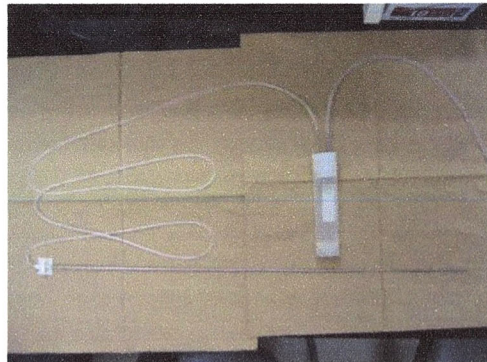
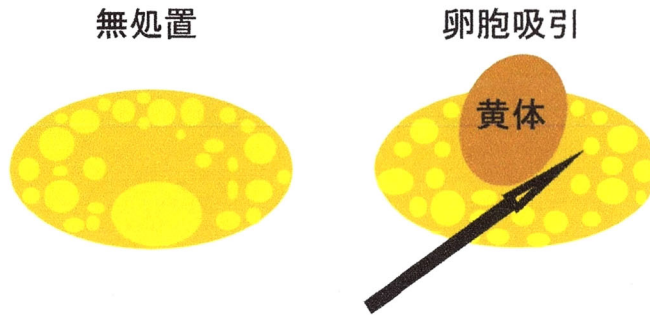
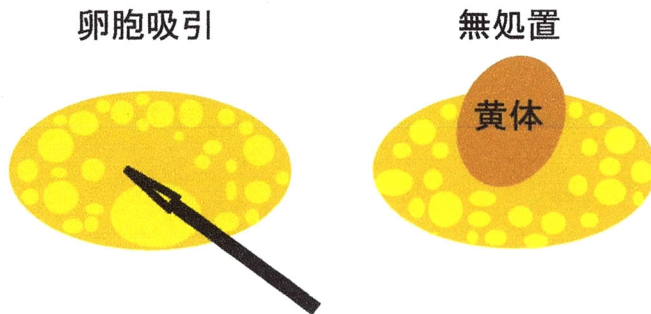


図1. 経腔採卵風景および使用する器具機材
A) 経腔採卵風景、B) 超音波診断装置一式、
C) 背面に採卵針を通すガイドを備えた経腔採卵用プローブ
D) 採卵針(54cm、17ゲージ)の先端
E) 吸引装置一式(フットスイッチにてON/OFFを切り替える)
F) 採卵針と卵胞液回収用チューブの接続

A) Group1:黄体側卵巢吸引区



B) Group2:非黄体側卵巢吸引区



C) Group3:両側卵巢吸引区

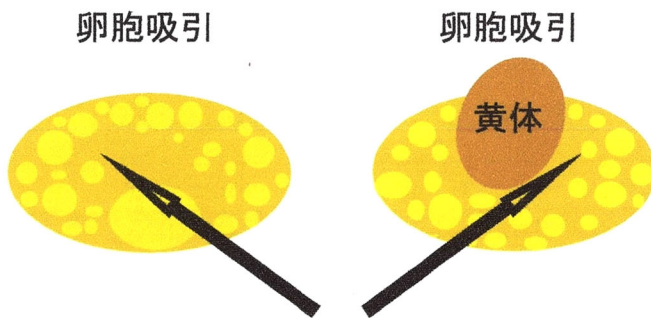


図2. 研究1における試験区設定

- A) 黄体が存在する片側卵巢のみ連続的に経膣採卵を実施
- B) 黄体が存在しない片側卵巢のみに連続的に経膣採卵を実施
- C) 両側の卵巢に連続的に経膣採卵を実施

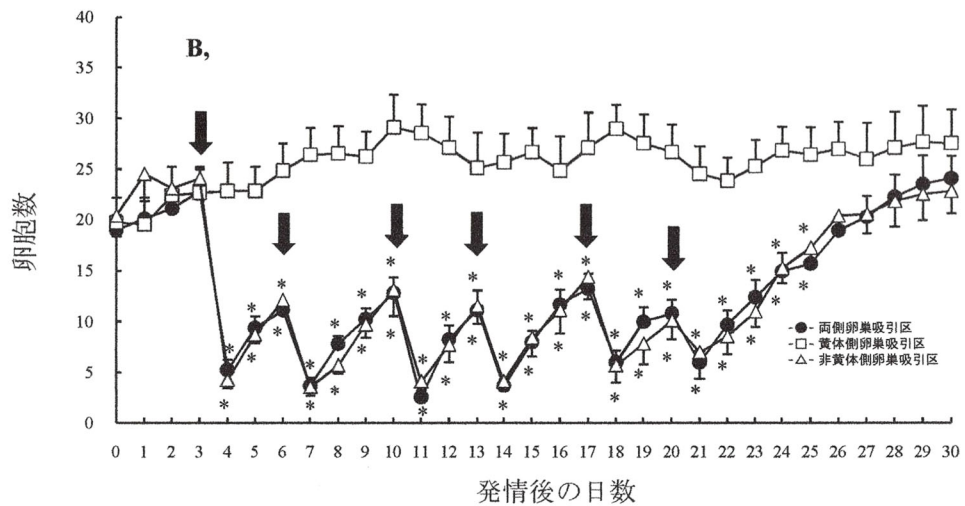
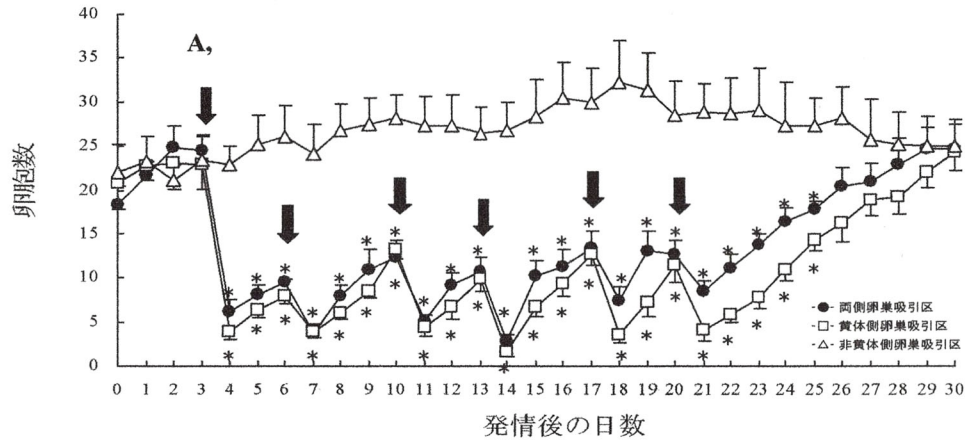


図3. 総可視卵胞数(長径 3mm 以上)の変動

A) 黄体が存在する卵巣における可視卵胞数。黄体側卵巣吸引区(-□-, n=7)では卵胞吸引を実施しており、非黄体側卵巣吸引区(-△-, n=7)には卵胞吸引を実施していない。

B) 黄体が存在しない卵巣における可視卵胞数。黄体側卵巣吸引区(-□-, n=7)には卵胞吸引を実施しておらず、非黄体側卵巣吸引区(-△-, n=7)では卵胞吸引を実施している。

対象区として、両側卵巣吸引区(-●-, n=7)は両方の卵巣で卵胞吸引を実施している。データは Mean±SEM で表記しており、アスタリスクは(A)では非黄体側卵巣吸引区と比較して、(B)では黄体側卵巣吸引区と比較して有意差(P<0.05)があることを示す。

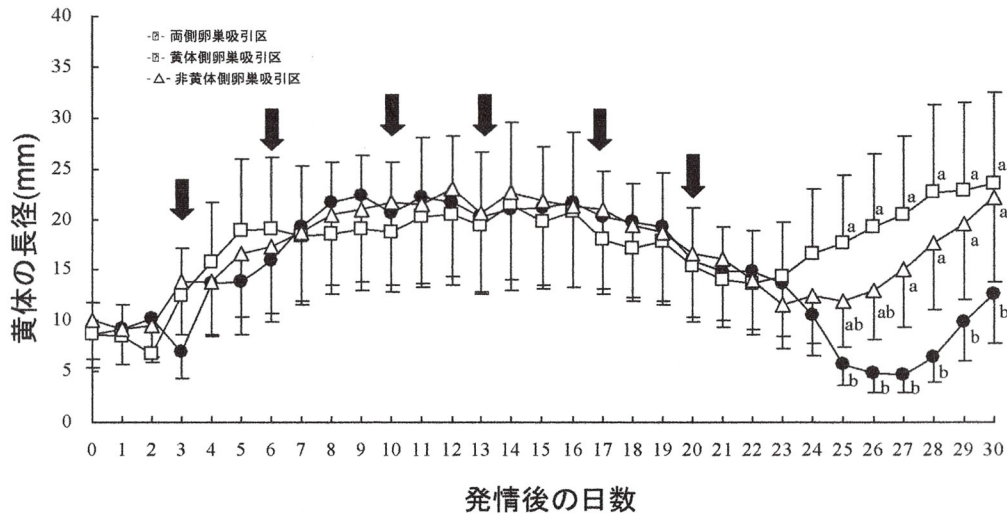


図4. 黄体長径の変動

黄体が存在する卵巣にある(黄体側卵巣吸引区-□-, n=7)もしくは黄体が存在しない卵巣にある(非黄体側卵巣吸引区-△-, n=7)すべての可視卵胞を週2回、3週連続で吸引した。対象区として、両側卵巣吸引区(-●-, n=7)では両方の卵巣で卵胞吸引を実施している。なお、矢印は卵胞吸引した時期を示している。またデータは Mean±SEM で表記しており、同日での異符号(a/b)間で有意差(P<0.05)があることを示している。

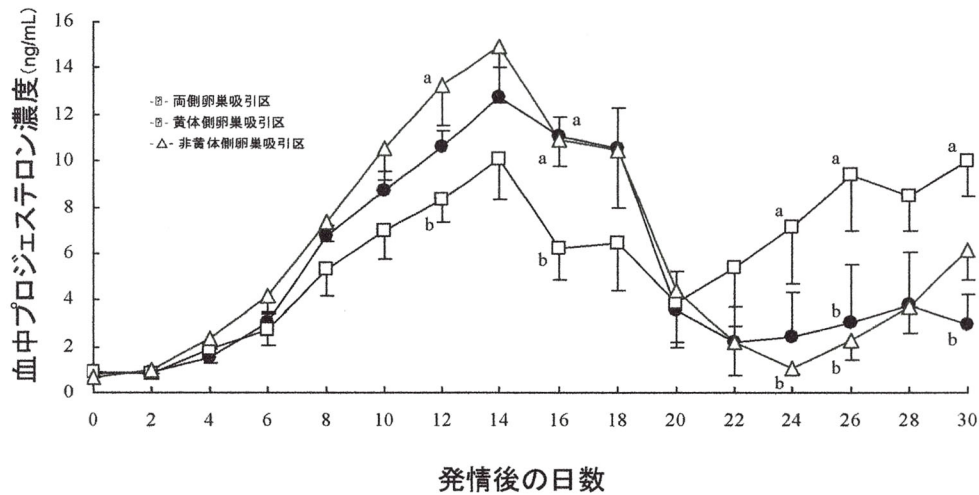


図5. 血漿中プロゲステロン濃度の推移

血液サンプルは Day0 から Day30 まで 2 日おきに採取した。

黄体が存在する卵巣にある(黄体側卵巢吸引区-□-, n=7)もしくは黄体が存在しない卵巣にある(非黄体側卵巢吸引区-Δ-, n=7)すべての可視卵胞を週2回、3週連続で吸引した。対象区として、両側卵巢吸引区(-●-, n=7)では両方の卵巣で卵胞吸引を実施している。なお、データは Mean±SEM で表記しており、同日での異符号(a/b)間で有意差(P<0.05)があることを示している。

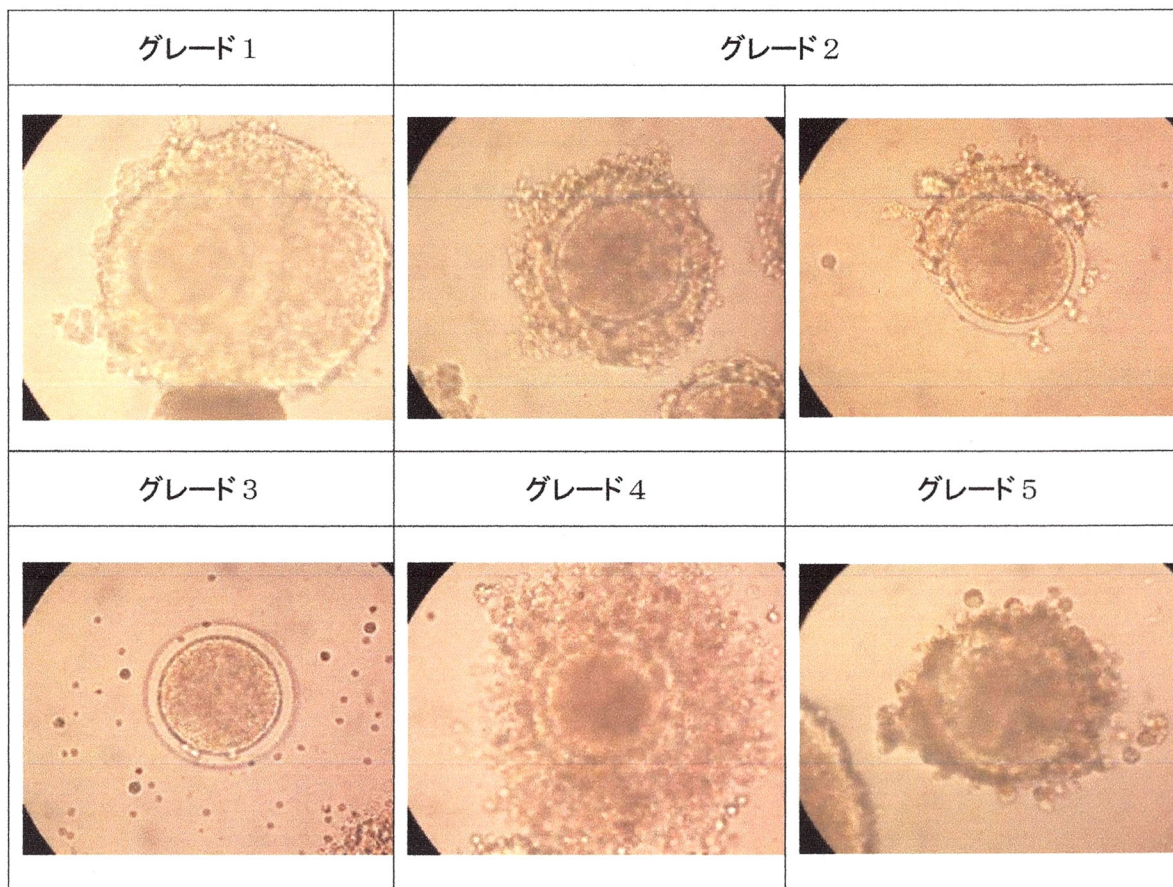


図6. 回収された卵丘細胞卵子複合体(COCS)の品質評価

それぞれの卵巣から回収されたCOCSは、吸引回収後ただちに既報の方法によって評価した²⁹。このとき各COCSは次のように分類した。グレード1は数層の卵丘細胞を有し均質な卵細胞質をしているものとし、次いで卵丘細胞が1~3層のもの、卵丘細胞がなく完全に裸化したもの、卵丘細胞が膨化したもの、変性したものをそれぞれグレード2、3、4、5とした。品質の評価後グレード3から5(下段)のCOCSは廃棄し、残ったCOCS(上段)は体外成熟培養、体外受精および体外発生培養に供した。

表1. 季節的要因および生殖相が黒毛和種経産牛の卵胞数および回収卵子数に及ぼす影響

試験牛	季節	供試 のべ頭数	吸引卵胞数 (Mean±SEM) ¹	回収卵子数 (Mean±SEM) ¹	グレード1-2の COCS数(%) ²
妊娠牛	冷涼期	8	211 (26.4 ± 5.4)	148 (18.5 ± 3.7)	133 (87.2 ± 5.0)
	暑熱期	14	319 (22.8 ± 2.9)	239 (17.1 ± 2.6)	207 (88.5 ± 3.0)
非妊娠牛	冷涼期	24	770 (32.1 ± 2.3)a	556 (23.2 ± 1.9)a	494 (88.3 ± 1.5)
	暑熱期	43	670 (15.2 ± 1.0)b	481 (11.2 ± 0.8)b	413 (86.1 ± 2.2)

¹ 試験牛 × 季節の相互作用が検出された(P<0.05)

非妊娠牛では、吸引卵胞数と回収卵子数が冷涼期と比較して暑熱期で低下した(P<0.05)。

妊娠牛では、個々の試験牛から暑熱期および冷涼期に回収された卵母細胞数の最大変動はそれぞれ 22 および 11 であったのに対し、非妊娠牛ではそれぞれ 14 および 18 であった。

² 百分率は MEAN±SEM で表現し、グレード 1-2 の COCS が総回収卵子数に占める割合を算出した。

表2. 季節的要因および生殖相が黒毛和種経産牛から回収した卵子の発生能に及ぼす影響¹

試験牛	季節	培養卵子数 ²	分割数 (%)	胚盤胞発生率 (%)	凍結可能胚数 (%) ³
妊娠牛	冷涼期	130	98 (75.6 ± 5.6) _a	57 (47.2 ± 5.8) _{a, c}	46 (36.7 ± 7.2) _a
	暑熱期	207	147 (73.5 ± 3.9) _a	92 (46.7 ± 3.5) _a	57 (26.4 ± 4.7) _{a, b}
非妊娠牛	冷涼期	494	273 (56.5 ± 3.8) _b	138 (31.2 ± 3.7) _b	101 (22.4 ± 3.1) _{a, b}
	暑熱期	413	262 (67.1 ± 2.7) _a	139 (34.7 ± 2.6) _{b, c}	90 (21.5 ± 2.3) _b

¹百分率は MEAN ± SEM で表現した。

²グレード 3-5 の COCS は破棄し、それ以外を体外成熟培養に供した。

体外成熟後、体外受精を行い、引き続き 8 日間の発生培養を行った。

発生培養 72 時間目および 8 日目にそれぞれ分割検査、胚盤胞発生検査を行った。

³ランク A(Excellent)の胚盤胞を凍結可能胚とした。

^{a-c} 同列異符号間で有意差あり (P<0.05)

謝 辞

本稿を終了するにあたり、各研究について終始暖かい激励とご指導、ご鞭撻を賜りました山口大学大学院連合獣医学研究科 音井威重教授、鹿児島大学農学部獣医学科 窪田力准教授に心より感謝申し上げます。

学位論文審査においては、貴重なご指導とご助言を頂いた山口大学農学部獣医学科 井上誠教授、田浦保穂教授、山本芳実教授に心から感謝申し上げます。

また、論文の作成にあたり数多くの貴重なご指導とご助言を頂いた独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構畜産草地研究所 永井卓研究管理監に深謝いたします。

最後に、各研究において試験牛の維持管理、実験室内外の諸作業および研究成果の実用化に向けてご尽力いただいた佐賀県畜産試験場 長友邦夫場長、市丸浩昭副場長をはじめ、大家畜部 黒川洋介部長、家畜育種研究担当 一丸仁係長、大坪利豪副主査、江副大輔技師、樋渡貞夫副主任農業技術員、岩永敬久副主任農業技術員、山口敏弘副主任農業技術員、山崎真一農業技術員、中島香織氏、坂井佐代子氏、肉用牛研究担当 宮島恒晴係長、岸川嘉洋特別研究員、松尾重己副主任農業技術員、宮口秀光副主任農業技術員、竹下賢治副主任農業技術員、吉牟田彰彦農業技術員、乳牛・飼料研究担当 高島文明副主任農業技術員、養鶏研究担当 奥俊博副主任農業技術員、佐賀県中部家畜保健衛生所 陣内孝臣係長に感謝の意を表します。

参考文献

- 1 van Wagendonk-de Leeuw, A. M., Ovum pick up and in vitro production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. *Theriogenology* 65 (5), 914 (2006).
- 2 Meintjes, M. et al., Transvaginal aspiration of bovine oocytes from hormone-treated pregnant beef cattle for IVF. *Theriogenology* 39, 266 abstr. (1993).
- 3 Galli, C. et al., Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology* 55 (6), 1341 (2001).
- 4 Stubbings, R. B. and Walton, J. S., Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in Holstein cows. *Theriogenology* 43 (4), 705 (1995).
- 5 Boni, R. et al., Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. *Theriogenology* 48 (2), 277 (1997).
- 6 Gibbons, J. R. et al., Effects of once- versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. *Theriogenology* 42 (3), 405 (1994).
- 7 Ginther, O. J., Knopf, L., and Kastelic, J. P., Ovarian follicular dynamics in heifers during early pregnancy. *Biol Reprod* 41 (2), 247 (1989).
- 8 Petyim, S. et al., Two different schemes of twice-weekly ovum pick-up in dairy heifers: effect on oocyte recovery and ovarian function.

- Theriogenology* 60 (1), 175 (2003).
- 9 Amiridis, G. S. et al., Plasma estradiol FSH and LH concentration after dominant follicle aspiration in the cow. *Theriogenology* 52 (6), 995 (1999).
- 10 Tohei, A. et al., Dynamic changes in plasma concentrations of gonadotropins, inhibin, estradiol-17beta and progesterone in cows with ultrasound-guided follicular aspiration. *J Vet Med Sci* 63 (1), 45 (2001).
- 11 Adams, G. P. et al., Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fertil* 94 (1), 177 (1992).
- 12 Petyim, S. et al., The effect of repeated follicular puncture on ovarian function in dairy heifers. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 47 (10), 627 (2000).
- 13 Gibbons, J. R. et al., In vitro embryo production after microinjection and ovarian dynamics following transvaginal follicular oocyte aspiration. *Theriogenology* 43 (6), 1129 (1995).
- 14 Petyim, S. et al., Effects of repeated follicular punctures on ovarian morphology and endocrine parameters in dairy heifers. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 48 (8), 449 (2001).
- 15 Carlin, S. K. et al., Effects of ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on oocyte recovery and hormonal profiles before and after GnRH treatment. *Theriogenology* 51 (8), 1489 (1999).
- 16 Badinga, L., Collier, R. J., Thatcher, W. W., and Wilcox, C. J., Effects

- of climatic and management factors on conception rate of dairy cattle in subtropical environment. *J Dairy Sci* 68 (1), 78 (1985).
- 17 Monty, D. E., Jr. and Racowsky, C., In vitro evaluation of early embryo viability and development in summer heat-stressed, superovulated dairy cows. *Theriogenology* 28 (4), 451 (1987).
- 18 Hansen, P. J., Exploitation of genetic and physiological determinants of embryonic resistance to elevated temperature to improve embryonic survival in dairy cattle during heat stress. *Theriogenology* 68 Suppl 1, S242 (2007).
- 19 Payton, R. R. et al., Susceptibility of bovine germinal vesicle-stage oocytes from antral follicles to direct effects of heat stress in vitro. *Biol Reprod* 71 (4), 1303 (2004).
- 20 Roth, Z. and Hansen, P. J., Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. *Biol Reprod* 71 (6), 1898 (2004).
- 21 Ju, J. C. and Tseng, J. K., Nuclear and cytoskeletal alterations of in vitro matured porcine oocytes under hyperthermia. *Mol Reprod Dev* 68 (1), 125 (2004).
- 22 McNatty, K. P. et al., Seasonal differences in ovarian activity in cows. *J Endocrinol* 102 (2), 189 (1984).
- 23 de S. Torres-Junior, J. R. et al., Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology* 69 (2), 155 (2008).
- 24 Bungartz, L., Lucas-Hahn, A., Rath, D., and Niemann, H., Collection

- of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin pretreatment and in different reproductive stages. *Theriogenology* 43 (3), 667 (1995).
- 25 Pursley, J. R. et al., Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. *J Dairy Sci* 80 (2), 295 (1997).
- 26 Imai, K. et al., The efficiency of embryo production by ovum pick-up and in vitro fertilization in cattle. *J. Anim. Sci.* 52 (Suppl), S19 (2006).
- 27 Tagawa, M. et al., Production of monozygotic twin calves using the blastomere separation technique and Well of the Well culture system. *Theriogenology* 69 (5), 574 (2008).
- 28 Lucy, M. C. et al., Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J Anim Sci* 70 (11), 3615 (1992).
- 29 de Loos, F., van Vliet, C., van Maurik, P., and Kruip, T. A., Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Res* 24 (2), 197 (1989).
- 30 Kwun, J. et al., Effects of exogenous hexoses on bovine in vitro fertilized and cloned embryo development: Improved blastocyst formation after glucose replacement with fructose in a serum-free culture medium. *Mol Reprod Dev* 65 (2), 167 (2003).
- 31 Van Soom, A. et al., Sucrose-induced shrinkage of in vitro produced bovine morulae: effect on viability, morphology and ease of evaluation. *Theriogenology* 46 (7), 1131 (1996).
- 32 Roth, Z., Heat stress, the follicle, and its enclosed oocyte: mechanisms

- and potential strategies to improve fertility in dairy cows. *Reprod Domest Anim* 43 Suppl 2, 238 (2008).
- 33 Rensis, F. D. and Scaramuzzi, R. J., Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow—a review. *Theriogenology* 60 (6), 1139 (2003).
- 34 Rocha, A. et al., High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. *Theriogenology* 49 (3), 657 (1998).
- 35 Al-Katanani, Y. M., Paula-Lopes, F. F., and Hansen, P. J., Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *J Dairy Sci* 85 (2), 390 (2002).
- 36 Bruno, R. G. et al., Effect of feeding yeast culture on reproduction and lameness in dairy cows under heat stress. *Anim Reprod Sci* 113 (1-4), 11 (2009).
- 37 Armstrong, D. V., Heat stress interaction with shade and cooling. *J Dairy Sci* 77 (7), 2044 (1994).
- 38 Hernandez-Ceron, J., Chase, C. C., Jr., and Hansen, P. J., Differences in heat tolerance between preimplantation embryos from Brahman, Romosinuano, and Angus breeds. *J Dairy Sci* 87 (1), 53 (2004).
- 39 Kendrick, K. W. et al., Effects of energy balance of hormones, ovarian activity, and recovered oocytes in lactating Holstein cows using transvaginal follicular aspiration. *J Dairy Sci* 82 (8), 1731 (1999).
- 40 Fuquay, J. W., Heat stress as it affects animal production. *J Anim Sci* 52 (1), 164 (1981).

- 41 Solis, J. C. et al., Maintenance requirements and energetic efficiency of cows of different breed types. *J Anim Sci* 66 (3), 764 (1988).
- 42 Laurenz, J. C., Byers, F. M., Schelling, G. T., and Greene, L. W., Effects of season on the maintenance requirements of mature beef cows. *J Anim Sci* 69 (5), 2168 (1991).
- 43 Freetly, H. C., Nienaber, J. A., and Brown-Brandl, T., Partitioning of energy in pregnant beef cows during nutritionally induced body weight fluctuation. *J Anim Sci* 86 (2), 370 (2008).
- 44 Argov, N., Arav, A., and Sklan, D., Number of oocytes obtained from cows by OPU in early, but not late lactation increased with plasma insulin and estradiol concentrations and expression of mRNA of the FSH receptor in granulosa cells. *Theriogenology* 61 (5), 947 (2004).
- 45 Hagemann, L. J., Influence of the dominant follicle on oocytes from subordinate follicles. *Theriogenology* 51 (2), 449 (1999).
- 46 Imai, K. et al., The efficiency of embryo production by ovum pick-up and in vitro fertilization in cattle. *J. Reprod. Dev* 52, 20 (2006).
- 47 Downs, S. M., Humpherson, P. G., Martin, K. L., and Leese, H. J., Glucose utilization during gonadotropin-induced meiotic maturation in cumulus cell-enclosed mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 44 (1), 121 (1996).
- 48 Eppig, J. J., Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev* 8 (4), 485 (1996).
- 49 Monniaux, D. et al., Follicular growth and ovarian dynamics in

- mammals. *J Reprod Fertil Suppl* 51, 3 (1997).
- 50 Lonergan, P., Carolan, C., and Mermillod, P., Development of bovine embryos in vitro following oocyte maturation under defined conditions. *Reprod Nutr Dev* 34 (4), 329 (1994).
- 51 Izadyar, F., Colenbrander, B., and Bevers, M. M., In vitro maturation of bovine oocytes in the presence of growth hormone accelerates nuclear maturation and promotes subsequent embryonic development. *Mol Reprod Dev* 45 (3), 372 (1996).
- 52 Lonergan, P. et al., Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro. *Biol Reprod* 54 (6), 1420 (1996).
- 53 Rieger, D. et al., The effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on the metabolic activity, nuclear maturation and subsequent development of cattle oocytes in vitro. *J Reprod Fertil* 112 (1), 123 (1998).
- 54 Zeron, Y. et al., Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction* 121 (3), 447 (2001).