

2. 体内成熟卵子の採取法

1) ドナーへの多排卵処置方法

1. ドナーへの多排卵処置方法を図 1 に示した。
2. 発情周期の任意の時期に、CIDR を腔内に挿入する(0 日目)。
3. 5 日目朝に、直径 8mm 以上の卵胞を全て超音波診断装置に接続した採卵針 (COVA ニードル:ミサワ医科工業)で吸引除去する。
4. 6 日目夕方から、FSH 計 30AU を座骨直腸窩の皮下脂肪内(または臀部や頸部の筋肉内)に、夕朝 2 回、計 4 日間漸減投与する。
5. 8 日目夕方に PGF₂α (d-クロプロステノール;225μg)を投与し、9 日目朝に CIDR を除去する。
6. 10 日目の朝に GnRH(酢酸フェルチレリン;200μg)を投与する(0 時間)。
7. GnRH 投与後 25-26 時間目に、直径 5mm 以上の卵胞を全て超音波診断装置に接続した採卵針で卵子を吸引採取する(OPU、図 2)。
8. 黄体を退行させるために、18 日目に PGF₂α (d-クロプロステノール;0.225mg)を投与する。

日	午前 (9:00)	午後 (16:50)
0		CIDR 挿入
1-4		
5	8mm 以上の卵胞吸引除去	
6		FSH 6AU
7	FSH 6AU	FSH 4AU
8	FSH 4AU	FSH 3AU, PGF ₂ α (225μg)
9	FSH 3AU, CIDR 除去	FSH 2AU
10	FSH 2AU, GnRH (200μg)	
11	OPU (11:00 : GnRH 投与後 26h)	IVF (15:00, GnRH 投与後 30h)
12	(体外成熟卵子の IVF) *	

図 1. ドナーへの多排卵処置スケジュール

(*採取された未成熟卵子は 22-23 時間体外成熟培養し、IVF を実施する。)

(解説)

- ① この多排卵処置法は卵胞波の出現、OPU および IVF の時間を考慮して決定した。
- ② 主席卵胞の吸引除去後、新たな卵胞波が出現するのに 1.5 日かかることから、多排卵処置は吸引除去後 1.5 日目から開始した。

- ③ OPU の時間は多排卵処置を実施したドナー牛の排卵時間を調査したところ、98%以上の排卵が GnRH 投与後 26 時間以降に観察されたため、GnRH 投与後 25-26 時間に実施することとした。
- ④ このとき、歩数計(牛歩:コムテック)による発情開始時間を基準とすることも考えられたが、GnRH 投与を基準とした方が排卵のバラツキが少なく排卵時間が集中する傾向があることが判明したため、GnRH 投与を基準とした。
- ⑤ さらに、排卵時間の調査から最も排卵が集中したのは GnRH 投与後 29-32 時間であり、排卵の平均時間が約 30 時間であったことから、GnRH 投与後 30 時間目に IVF を開始することとした。
- ⑥ ただし、卵子の受精能保持時間は 8 時間以上とされていることから、IVF 開始が 4 時間遅れても受精率には大きな影響はないと考えられる。
- ⑦ ドナーは発情周期の正常な牛を選抜する。
- ⑧ 極端にエネルギーバランスが負の牛(体重が極端に減少している牛)は卵胞数が減少する傾向があり、多排卵処置を避ける。
- ⑨ 主席卵胞除去時(5 日目)の超音波診断装置による卵巣観察で小中卵胞数により多排卵処置の是非を決めることができる。卵胞数が 10 個に満たない牛は FSH への良好な反応が期待できないため、処置を中止することも検討したほうが良い。



図 2. 超音波診断装置を用いた経膣採卵による生体内卵子の採取

2) 経膈採卵による体内成熟卵子採取法

1. 体内成熟卵子の OPU における器具機材は一般の未成熟卵子の OPU と同じものを用いる(図 2)。
2. 吸引液(乳酸加リンゲル液+1%子牛血清(CS)+10U/mL ヘパリン)を作製する。
3. 吸引直前に採卵針、チューブおよび卵胞液採取管に温めた吸引液(30°C)を少量入れる。
4. 吸引圧は未成熟卵子吸引の 2 割増しとする(例:吸引量=25mL/min、130-150mmHg)。
5. プローブを膈に挿入する。次いで直腸より入れた手で卵巢を保定し、プローブにあて、超音波像を得る。
6. 超音波像から膈壁より採卵針を誘導し、5mm 以上の卵胞を穿刺して卵子を卵胞液ごと吸引採取する。
7. 成熟卵子を含む卵胞液は粘性が高いため、吸引時に卵胞液が消失しても数秒はそのまま保持する(図 3)。
8. この卵胞穿刺を繰り返し、卵胞を 5-7 個ずつ吸引したら卵胞液採取管(50mL 遠心管)を新しいものに交換する。
9. 採取した卵胞液採取管は 30°C に保温し、卵子を検索する実験室へ持ち帰る。

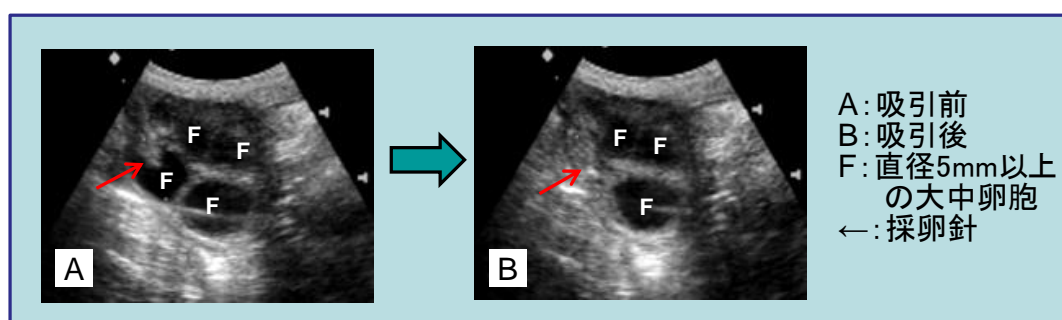


図 3. OPU による大卵胞の吸引とその消失

(解説)

- ① 未成熟卵子の OPU との違いは、成熟卵子を取り囲む卵丘細胞および顆粒膜細胞がヒアルロン酸などを産生し、膨潤化して粘張性が高く、吸引される細胞の容積も大きいため採卵針および接続チューブが詰まり易いことがあげられる。
- ② そのため、常に採卵針および接続チューブ内の採取液の動きに注意する。
- ③ 卵胞液がチューブ内で詰まったときは、吸引圧を最大として解消する。それでも解消されないときは、19G の針を付けた 5mL 注射筒を用い、COVA ニードル先端に 19G の針を挿入し、吸引液を注入する。
- ④ 卵胞を 5-7 個吸引した後採取管を交換するのは、吸引した液(卵子、卵胞内の細胞、卵胞液、血液および卵子採取液が混在)への血液の混入を最低限とするためである。

- ⑤ さらに、吸引した液に血液の混入が多い場合、血球を除去するためにフィルターにかけるが、このとき一度に多くの卵胞を吸引した液をフィルターにかけると目詰まりする、そのため1本の遠心管には5-7個の卵胞吸引液しか入れない。

3) 卵子の検索

1. 遠心管を静置し、卵子、卵丘細胞および顆粒膜細胞を沈殿させる。
2. 沈殿物を10mLピペットで吸引し(約1mL)、卵子検索用のシャーレ(直径90~100mm)に移して1%CS添加乳酸加リンゲル液を加え、卵子を検索する。
3. 卵子の検索は実体顕微鏡下で行う(図4-A)。
4. 卵子は保存液(修正TCM199 + 5%新生子牛(NCS)血清)の入った35mmシャーレに移す。
5. 顆粒膜細胞や卵丘細胞の容積が大きく、シャーレの中で卵子を見つけるのが難しい場合は、シャーレの蓋に細胞塊をパスツールピペットで移し、図4-Bのように注射針や検索棒で細胞塊を薄く伸ばし、卵子を検索する(図4-C)。
6. 卵丘細胞は膨潤化して粘張性高く、そのままではマウスピペットへの吸入が困難なため、19-22Gの注射針を用いて卵丘細胞から卵子を切離し(図4-D)、35mmのシャーレに移す。
7. 卵丘細胞をトリミングし、卵子周囲に数層残して成熟培地(TCM199 + 5%NCS)を用いて2回洗浄、媒精まで培養する(トリミング前:図4-E、トリミング後:図4-F)。
8. 最後に卵胞液採取管の残液をまとめてエムコンフィルターに入れ、卵子吸引液を数回に分けて入れながら透明になるまで濾過し、卵子検索用のシャーレに移して卵子の取り残しがないか確認する。
9. 採取した卵子はその形態により成熟卵子(図5-A)および未成熟卵子(図5-B)に分類し、それぞれ培養する。
10. 成熟卵子は成熟培地のドロップ(1卵子=5 μ L;最低20 μ L)に移し、38.5 $^{\circ}$ C、5%CO₂、95%空気、湿度飽和下で、2-3時間(GnRH投与後30時間目まで)培養する。
11. 未成熟卵子を体外受精する場合は、22-23時間体外成熟培養を行う。

(解説)

- ① 採取した顆粒膜細胞-卵丘細胞-卵子の複合体は膨潤化しており、区別が付きにくい、卵丘細胞の方が顆粒膜細胞よりも透明度が高く、その中に卵子が存在する。
- ② 膨潤化した卵丘細胞はピペットや攪拌棒では切れない。そのため、針を使って切る。
- ③ 血液が混入して見づらい時は、静置して赤血球がしずむのを待つ、あるいはフィルターを再度かける必要がある。
- ④ 1%子牛血清添加ハルゼン液に卵子を長時間(2時間以上)入れておくと発生率

が低下する恐れがあるので、なるべく早く保存液に卵子を移す。

- ⑤ 最後に卵子が残っていないか確かめるため、以下の手順で再度卵子の検索を実施することも可能である。まず、回収液(細胞塊を含む)を遠心管に集め、1000rpm、5 分間の遠心後、上清を除去し、0.1%ヒアルロニダーゼを 1mL 入れ、2~3 分間攪拌する。細胞塊がバラバラになったら、1%CS 添加乳酸加リンゲル液を加えて攪拌し、2-3 分間静置、上清を除去して 1%CS 添加乳酸加リンゲル液を加え、シャーレに移し卵子を検索する。
- ⑥ 注意点として、OPU で採取した体内成熟卵子の検索は未成熟卵子のそれと比べて、煩雑で時間を要する。そのため、検索する技術者が少ない事業所においては、一度に OPU を実施する頭数を制限した方が良いと考える。

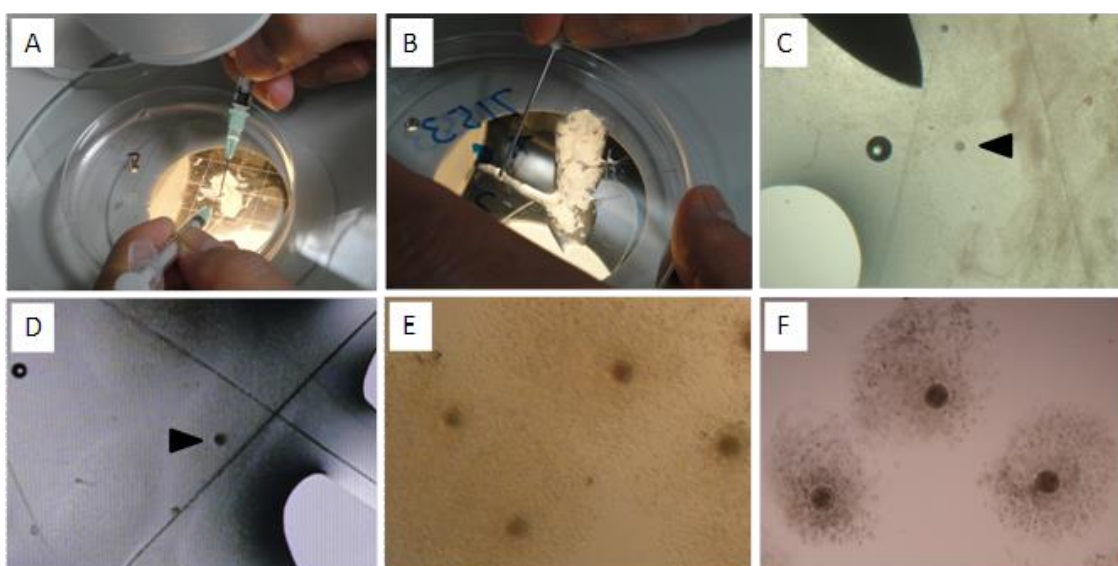


図 4. 卵子の検索と卵丘細胞のトリミング

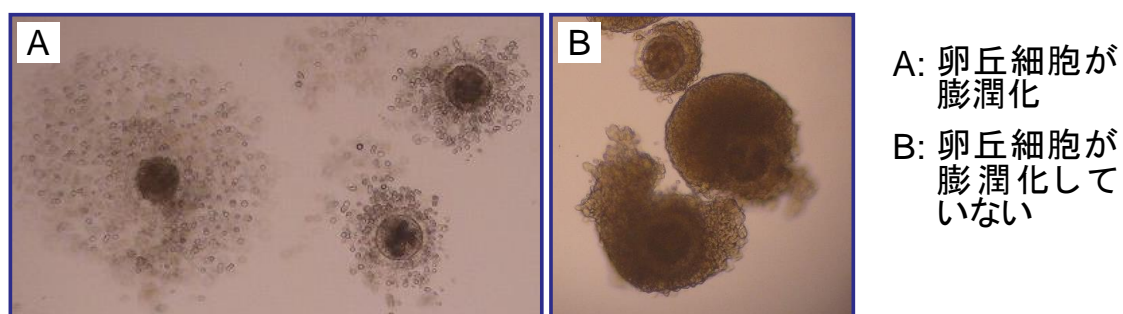


図 5. 体内成熟卵子(A)および未成熟卵子(B)の形態