

長時間保存卵巣からの卵子回収時に吸引液へ添加するジメチルチオウレアが体外受精後の発生等におよぼす影響

誌名	和歌山県農林水産総合技術センター研究報告
ISSN	13455028
著者	谷口, 俊仁 柏木, 敏孝 中本, 和弘 ほか1名,
巻/号	5号
掲載ページ	p. 83-86
発行年月	2004年3月

長時間保存卵巣からの卵子回収時に吸引液へ添加するジメチルチオウレアが体外受精後の発生等におよぼす影響

谷口俊仁・柏木敏孝・中本和弘¹・長谷川正彦

和歌山県農林水産総合技術センター 畜産試験場

Effects of Dimethylthiourea on Developmental Capacity
of Bovine Oocytes Obtained from Ovaries Preserved for a Long Time

Shunji Taniguchi, Toshitaka Kashiwagi, Kazuhiro Nakamoto and Masahiko Hasegawa

Livestock Experiment Station

Wakayama Research Center of Agriculture, Forestry and Fisheries

緒言

当試験場は、食肉処理場が長距離に位置しており、処理場で牛卵巣を採取後、当场への卵巣の到着が夜間になる。卵巣到着直後に卵子の成熟培養を行うと、翌日の体外受精や核移植が夜中の作業となるので、卵子あるいは卵巣を一定時間保存し、卵子の成熟培養開始時刻を調整する技術の確立が必要となっている。これまでに我々は、蛋白合成阻害剤の一種であるシクロヘキシミド (CHX) (Saeki et, al. 1997,1998) を用いた卵子の短期保存法により、一定時間保存された卵子が核移植のレシピエントとして利用可能であることを示した (谷口ら, 2001)。その方法により、従来の方法では夜中まで及んだ核移植を昼~夜の間に実施することが可能となった (第1図)。しかし、平成13年10月の食肉処理場におけるBSE全頭検査開始以降、検査終了前に卵巣を含めた牛由来生産物を処理場外へ持ち出すことが禁止されていることから、全頭検査開始前以上に当試験場への卵巣到着時刻が遅くなっているのが現状である。我々が確立したCHXによる卵子保存では、卵巣到着後すぐに卵子吸引・検索・培養までを行う必要があり、現状では卵巣採取に長時間 (往復約7時間) の車の運転の後、夜中に卵子の操作を行わなければならない。卵子の吸引から培養までの操作は迅速かつ無菌的であることが要求され、現状では正確な操作を行ううえで問題が生じている (第2図)。

従来法

1日目 19:00 卵巣到着 → 21:00 卵子成熟培養
2日目 17:00~24:00 体外受精

卵子保存法

1日目 19:00 卵巣到着 → 21:00 卵子保存
2日目 15:00 卵子成熟培養
3日目 11:00~18:00 体外受精

第1図 BSE全頭検査開始前の卵子保存法による体外受精のタイムスケジュール

卵子保存法

1日目 22:00 卵巣到着 → 24:00 卵子保存
2日目 15:00 卵子成熟培養
3日目 11:00~18:00 体外受精

卵巣保存法

1日目 22:00 卵巣到着・卵巣保存
2日目 15:00 卵子成熟培養
3日目 11:00~18:00 体外受精

第2図 BSE全頭検査開始後の卵子保存法および卵巣保存法による体外受精のタイムスケジュール

¹現在：紀南家畜保健衛生所

岩田ら (2002) は7時間保管した卵巣から卵子回収時に抗酸化剤であるジメチルチオウレア (DMTU) および SOD を添加した吸引液を用いることで体外受精後の発生が改善されることを報告している。そこで、20℃で overnight 保存した卵巣からの卵子吸引時に、吸引液への DMTU 添加による体外受精後の発生成績などの影響について検討した (第2図)。

材料および方法

1. 卵子の成熟培養

食肉処理場で採取された牛卵巣を生理食塩水中で 20℃に保温し、当场へ持ち帰った。卵巣到着後、以下に示した区分により保存処理・卵子吸引・成熟培養を行った。

試験区 1: 到着後直ちに DMTU を 5mM 添加した 3%子牛血清 (CS) 加 PBS を吸引液として卵巣表面にある直径 2～8mm の卵胞から吸引法により卵丘卵子複合体 (COC) を回収し、10 μ g/ml CHX (Saeki et al. 1997,1998, 谷口ら, 2001) を含む 5%CS 加 TCM199 で 12～15 時間インキュベータ内で保存 (38.5℃, 5% CO₂, 95% 空気), 5%CS 加 TCM199 (成熟培地) で洗浄後, 成熟培養 (38.5℃, 5% CO₂, 95% 空気) を行った。

試験区 2: DMTU を含まない吸引液を用い, 試験区 1 と同じ処理を行った。

試験区 3: 20℃生理食塩水中で卵巣の状態 で 12～15 時間保存後, DMTU 添加 3%CS 加 PBS を吸引液として COC を回収し, 成熟培養を行った。

試験区 4: DMTU を含まない吸引液を用い, 試験区 3 と同じ処理を行った。

2. 体外受精および発生培養

上記 4 試験区分による 20 時間の成熟培養後, カフェインとヘパリンで活性化処理された精子 (使用精液: 熱富士, 精子濃度: 約 6×10^6 /ml) で COC に媒精を 5 時間行った (38.5℃, 5% CO₂, 95% 空気)。媒精後, 卵子透明帯周囲に付着した卵丘細胞をピペッティングにより剥離して裸化し, IVD-101 (機能性ペプチド研究所) で発生培養を行った (38.5℃, 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂)。

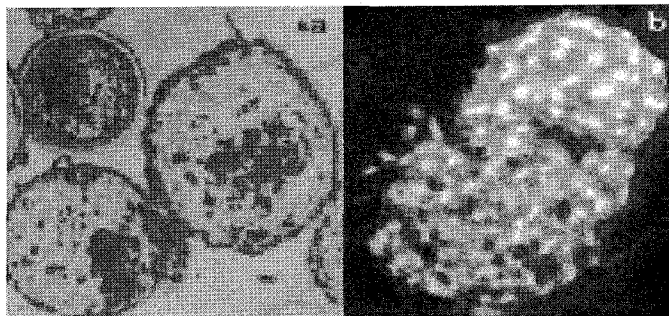
なお, 体外受精は 3 回の反復試験を行った。

3. 体外受精後の発生検査

体外受精 48 時間後に初期分割検査, 7～9 日後の胚盤胞発生検査を行った。

4. 胚の細胞数測定

胚盤胞まで発生した一部の胚については, 透明帯をプロナーゼで融解後, PBS で胚を洗浄, 0.01mg/ml ヘキストで染色し, 紫外線照射により蛍光を示す細胞数を計測した (第3図)。



第3図 (a)体外受精発生胚透過光像と(b)ヘキスト染色・落射蛍光像

5. 統計処理

体外受精後の分割率，発生率は χ^2 検定，胚盤胞の細胞数は t 検定により，5%の危険率で有意差の判定を行った。

結 果

体外受精後 48 時間目の分割率において，保存卵巣から DMTU 不添加の吸引液を用いた試験区 4 (62.4%) が試験区 1 (79.4%) および 2 (74.2%) より有意に低く ($p < 0.05$)，試験区 3 より低い傾向にあった (第 1 表)。また，変性率については卵巣を保存した試験区 3 および 4 が卵巣到着直後に卵子を吸引，CHX で保存した試験区 1 および 2 よりも有意に高い，もしくは高い傾向があった。さらに試験区 3 と 4 の変性率の比較では試験区 4 が有意に高くなった (第 1 表)。5 細胞期以上に分割が進んでいた卵の割合は，試験区 4 が他区と比較して有意に下回った (第 1 表)。

体外受精 7～9 日目の胚盤胞発生率は全ての区の間で有意な差がみられなかったものの，試験区 4 で若干低い傾向にあった (第 1 表)。

第1表 吸引液へのDMTU添加が体外受精後の分割・発生成績におよぼす影響

	卵子数	変性(%)	mono(%)	2-4cell(%)	5cell(%)	分割数(%)	胚盤胞発生数(%)
試験区1	199	16(8.0) ^{ab}	25(12.6) ^{de}	53(26.6) ^f	105(52.8) ^b	158(79.4) ^j	55(27.6)
試験区2	186	12(6.5) ^a	36(19.4) ^d	47(25.3) ^f	91(48.9) ^b	138(74.2) ^j	51(27.4)
試験区3	223	31(13.9) ^b	33(14.8) ^{de}	37(16.6) ^f	122(54.7) ^b	159(71.3) ^k	62(27.8)
試験区4	189	51(27.0) ^c	20(10.6) ^e	46(24.3) ^g	72(38.1) ^c	118(62.4) ^k	43(22.8)

a,b,c,d,e,f,g,h,i,j,k: 異符号間に有意差あり($p < 0.05$)

体外受精後 7-8 日目に発生した胚盤胞の細胞数は試験区 2 が高い傾向にあったが，それぞれの区間に有意な差はみられなかった (第 2 表)。

第2表 吸引液へのDMTU添加が体外受精発生胚の細胞数におよぼす影響

	胚盤胞数	細胞数±標準偏差
試験区1	12	109.2 ± 37.3
試験区2	12	126.9 ± 30.2
試験区3	12	103.0 ± 38.9
試験区4	12	106.3 ± 31.3

考 察

今回の研究では，卵巣を長時間保存し，卵子回収液への DMTU (抗酸化剤の一種) 添加の有無による体外受精後の発生成能について検討を行った。その結果，DMTU 添加によって体外受精 48 時間後の変性率，5 細胞期率が有意に改善され，7～9 日目の胚盤胞発生率も改善の傾向がみられた。岩田ら (2002)

は、長時間保存された卵巣内の卵子は活力が低下しており、さらに回収時に発生する活性酸素によって発生能が損なわれることを示している。今回検討した結果も、DMTUの抗酸化作用により卵子回収時の活性酸素を中和することで回収された卵子の体外受精後の発生能に改善がみられたと考えられる。

また、卵巣を保存せずに卵子吸引し、当场で常法となっているCHXによる卵子保存(Saeki et, al. 1997,1998, 谷口ら, 2001)の後に成熟培養をおこなった場合、吸引液へのDMTU添加の有無により体外受精後の発生には影響を与えなかった。これは、卵巣の保存時間が短かったため、卵子回収時に活性酸素が発生しなかった、または微量であったため、卵子にダメージが蓄積されていなかったことが原因と推察される。

さらに、岩田らは卵巣保存時間を7時間としたが、我々は12～15時間とより長時間の卵巣保存をおこなった。これは、体外受精や核移植など、卵子の成熟培養開始時刻により決定される作業スケジュールを改善するためにより有効であると考えられ、上述したとおり、DMTU添加により体外受精後の発生に改善がみられたことから、良い時間的条件で核移植のスケジュールを組むことが可能であると考えられる。現在、この方法により得られた卵子をレシピエントとして用いた核移植について検討中である。

摘 要

従来夜間に行っていた卵子回収・成熟培養・体外受精作業を昼間の時間帯に実施するため、長時間保存したウシ卵巣からの卵子回収時に、吸引液へのジメチルチオウレア(DMTU)添加による体外受精後の発生などにおよぼす影響を検討した。その結果、DMTU添加により体外受精48時間後の分割率および7日後の胚盤胞発生率が改善される傾向があったが、発生した胚盤胞の細胞数には影響はみられなかった。

引用文献

- 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
- Saeki, K., Y. Nagao, M. Kishi and M. Nagai. 1997. Developmental capacity of bovine oocytes following inhibition of meiotic resumption by cycloheximide or 6-dimethylaminopurine, *Theriogenology* 48: 1161-1172
- Saeki, K., Y. Nagao, M. Kishi, M. Nagai and A. Iritani. 1998. Timing of completion of the first meiotic division in bovine oocytes after maintenance of meiotic arrest with cycloheximide and their subsequent development, *J. Vet. Med. Sci.* 60: 523-526
- 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第2号: 155-158

Summary

In order to do oocyte collection/maturation and in vitro fertilization (IVF) in daytime, which was carried out conventionally at night, we investigate the effects of addition dimethylthiourea (DMTU) to oocyte collection medium on developmental capacity of bovine oocytes obtained from ovaries preserved for a long time. Consequently, there were tendencies to improvement in cleaved rate at 48 hours after IVF and developed rate at 7 to 9 days in case of DMTU was added to oocyte collection medium. However, DMTU didn't influence on the cell number of developed blastocysts.