

# 黄体ホルモン膣内挿入製剤を用いた連続過剰排卵処理法の 検討(3)

誌名	山口県畜産試験場研究報告
ISSN	02871262
著者名	田頭,明子 竹下,和久 市野,清博 藤井,陽一 藤井,満貴
発行元	山口県畜産試験場
巻/号	18号
掲載ページ	p. 17-22
発行年月	2003年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## 黄体ホルモン膈内挿入製剤を用いた連続過剰排卵処理法の検討（第3報）

### 一過剰排卵処理時のE2投与時期の違いが採胚成績に及ぼす影響一

たがしらあきこ たけしたかずひさ いらのきよひろ  
田頭明子・竹下和久・市野清博\*  
ふじいよういち ふじいみつたか  
藤井陽一・藤井満貴\*\*

#### 要 旨

膈内挿入型持続性黄体ホルモン製剤（Controlled internal drug releasing device：CIDR）を用いた過剰排卵処理において、CIDR挿入中の安息香酸エストラジオール17β製剤（E2）の投与時期の違いが採胚成績に及ぼす影響について検討した。

CIDR挿入後5日目または7日目にE2を1mg投与したところ、過剰排卵処理を開始する10日目には、E2を投与した両試験区の2回目で大型卵胞が有意に減少しており、7日目に投与した区の2回目に小型卵胞が有意に増加した。また、正常胚数、凍結可能胚数が両試験区の2回目に増加したこと、両試験区の1回目に2回目の遺残卵胞数の差が対照区の差と比較して違いは見られなかったことから、E2の効果が1mgでも十分得られ、またE2の体内残留による影響は無いと推察された。

高採胚成績牛、中採胚成績牛、低採胚成績牛別の採胚成績では、E2投与により、低採胚成績牛、中採胚成績牛における凍結可能胚数の向上が認められた。

#### 目 次

I 緒 言	17
II 材料及び方法	18
1 試験期間	18
2 供試牛	18
3 試験方法	18
III 結 果	19
IV 考 察	21
V 要 約	21
参考文献	22

#### I 緒 言

第1報<sup>1)</sup>では、膈内挿入型持続性黄体ホルモン製剤（以下CIDR）により人為的に発情周期を制御した過剰排卵処理により、35日間隔で2回の採胚を1クールとして、クール間隔を63日あげ、連続3クール、6回の連続過剰排卵処理が可能であることが確認されたが、連続過剰排卵処理回次が進むに連れて採胚成績の低下がみら

れた。

第2報<sup>2)</sup>では、35日間隔で2回の採胚を1クールとした場合と42日間隔で2回の採胚を1クールとした場合の採胚成績に差が認められないことが確認された。また、CIDR挿入後5日目に安息香酸エストラジオール17β製剤（以下E2）を10mg、14日目に性腺刺激ホルモン放出ホルモン製剤（以下GnRH）を100μg投与することにより、採胚成績の向上が認められた。さらに、優勢卵胞抑制後にE2の体内残留を防ぐため投与量を5mgとして、CIDR挿入後1日目または5日目に投与したところ、5日目投与の方が若干ではあるが凍結可能胚数が多い傾向がみられた。

そこで本試験ではCIDRを用いた過剰排卵処理における採胚成績の改善を目的とし、優勢卵胞抑制後のE2体内残留を防ぐため投与量を1mgとして投与時期の検討を行った。

なお、本試験は牛受精卵移植普及定着化事業（技術高度化型）の共同試験の本県分の成績である。

## II 材料及び方法

### 1 試験期間

2000年10月~2001年7月

### 2 供試牛

供試牛は、当場で繁養している黒毛和種経産牛9頭で、採胚成績に偏りが無いように、各個体ごとの過去の採胚成績から平均正常胚数が6個以上の牛を高採胚成績牛、平均正常胚数が3個以上6個未満の牛を中採胚成績牛、平均正常胚数が3個未満の牛を低採胚成績牛として、各試験区には高採胚成績牛1頭、中採胚成績牛1頭、低採胚成績牛1頭の3頭を1組として用いた。

### 3 試験方法

#### 1) 過剰排卵処理方法

CIDRは性周期に関係なく膈内に挿入し、挿入日を0日として10日目から過剰排卵処理を開始した。過剰排卵処理は総量20AUのFSH(アントリン:デンカ製薬)を既法に準じて3日間減量投与(5,5;3,3;2,2)した。投与部位は肩前部下とした。

過剰排卵処理開始後48時間目にプロスタグランジンF2 $\alpha$ 類縁体(エストラメイト:住友製薬、以下PGF2 $\alpha$ )をクロプロステノールとして750 $\mu$ gを筋肉内投与し、同時にCIDRを膈内より抜去した。

人工授精は発情に合わせて2回行った。

胚の回収は人工授精から7日目に定法により実施した。採胚終了時には子宮内膜炎予防のためポピオン

ヨード剤(動物用イソジン液:明治製菓)50mlを子宮内注入するとともに、黄体を退行させるためにPGF2 $\alpha$ をクロプロステノールとして750 $\mu$ gを筋肉内投与した。〔図1〕

#### 2) 超音波画像診断装置による卵胞数調査

CIDR挿入後0日目、5日目、10日目、21日目に超音波画像診断装置(SSD-500:ALOKA株式会社)を用いて卵胞数を調査した。最大径により大型卵胞(10mm以上)、中型卵胞(5mm以上、10mm未満)、小型卵胞(5mm未満)に分類し集計した。

#### 3) 卵回収及び処理法

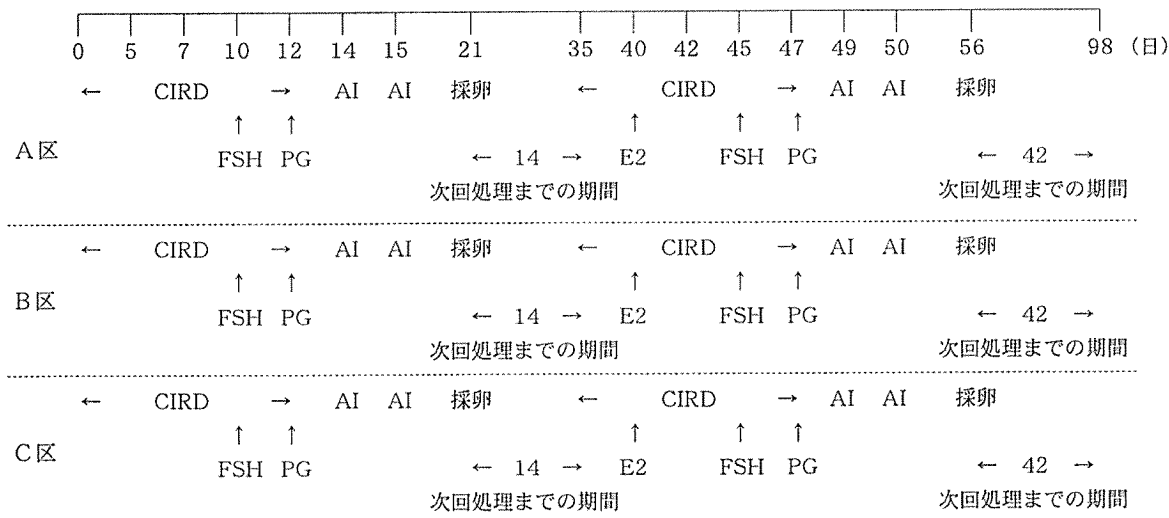
胚回収は灌流液全体をいったん胚回収シャーレに移した後、実体顕微鏡下で検索した。胚洗浄は保存液(20%子牛血清加PBS)に10回移し換えることよって行った。形態観察は倒立顕微鏡下で行い、形態により正常胚、変性胚、未受精卵に分類し、正常胚はExcellent、Good、Fair、Poor3)に分類した。また、発育遅延胚は変性胚とした。

#### 4) 試験区分

1回目の採胚から2回目の採胚までの間隔を63日(1回目の採胚から42日後に2回目のCIDR挿入)として、2回の採胚を1クールとした。これらの処理及び採胚を繰り返して1頭あたり3クール、延べ6回の採胚を行った。〔図1〕

区の設定は以下のとおりとした。

A区:基本パターンによる処理を行い、各クール2回目のCIDR挿入日から5日目にE2を1mg



A区 基本パターンによる処理を行い、各クール2回目のCIDR挿入日から5日目にE2を1mg筋肉内投与した。  
B区 基本パターンによる処理を行い、各クール2回目のCIDR挿入日から7日目にE2を1mg筋肉内投与した。  
C区 対照区

注) これらの処理及び採卵を3回繰り返し、1頭あたり計6回の採卵を行った。

図1 処理スケジュール

筋肉内投与した。

B区：基本パターンによる処理を行い、各クール2回目のCIDR挿入日から7日目にE2を1mg筋肉内投与した。

C区：基本パターンのみで処理を行い、これを対照区とした。

5) 調査項目

採胎成績：推定黄体数、遺残卵胞数、回収卵数、正常胚数、正常胚率、変性胚数、未受精卵数

卵胞数：CIDR挿入後0日目、5日目、10日目、21日目

### III 結 果

1) 卵胞数の推移

CIDR挿入後0日目、5日目、10日目、21日目の大型卵胞数の推移を〔表1〕に示した。

E2投与前のCIDR挿入後5日目とE2投与後のCIDR挿入後10日目では、E2を投与しなかった各区の1回目はA区が1.2個と1.3個、B区が1.4個と1.1個、C区が0.7個と0.8個、A区、B区でE2を投与した2回目ではA区が1.8個と0.8個（ $P < 0.05$ ）、B区で1.6個と0.7個（ $P < 0.05$ ）、C区で0.6個と0.6個となり、A区、B区の2回目で大型卵胞数が有意に減少した。

表1 大卵胞の推移

単位：個

区 分	処理頭数	0日目	5日目	10日目	21日目	
A区	1回目	9	1.0 ± 0.7	1.2 ± 1.0	1.3 ± 1.5	3.8 ± 3.0
	2回目	9	2.0 ± 1.2	1.8 ± 1.0 <sup>a</sup>	0.8 ± 0.8 <sup>b</sup>	3.8 ± 2.9
B区	1回目	9	1.0 ± 0.5	1.4 ± 1.1	1.1 ± 1.1	3.2 ± 3.0
	2回目	9	2.0 ± 1.2	1.6 ± 1.2 <sup>c</sup>	0.7 ± 0.5 <sup>d</sup>	2.6 ± 2.6
C区	1回目	9	0.8 ± 0.7	0.7 ± 0.5	0.8 ± 0.8	0.8 ± 1.6
	2回目	9	0.8 ± 0.7	0.6 ± 0.5	0.6 ± 0.5	1.8 ± 2.5

注) 平均値 ± 標準偏差

[a - b, c - d] 異文字間に5%の有意差あり

CIDR挿入後0日目、5日目、10日目、21日目の中型卵胞数の推移を〔表2〕に示した。E2投与前のCIDR挿入後5日目とE2投与後のCIDR挿入後10日目では、E2を投与しなかった各区の1回目ではA区が1.7個と

1.9個、B区が1.2個と2.0個、C区が1.6個と2.0個、A区、B区でE2を投与した2回目ではA区が3.0個と3.4個、B区で1.4個と1.4個、C区で0.7個と1.8個となり、有意差はなかった。

表2 中卵胞の推移

単位：個

区 分	処理頭数	0日目	5日目	10日目	21日目	
A区	1回目	9	2.2 ± 1.9	1.7 ± 1.1	1.9 ± 1.6	2.0 ± 1.7
	2回目	9	1.2 ± 1.5	3.0 ± 2.2	3.4 ± 2.4	2.3 ± 2.0
B区	1回目	9	2.1 ± 1.6	1.2 ± 1.8	2.0 ± 1.8	1.4 ± 1.6
	2回目	9	0.6 ± 1.1	1.4 ± 1.6	1.4 ± 1.9	1.1 ± 2.0
C区	1回目	9	1.8 ± 1.6	1.6 ± 1.3	2.0 ± 2.6	1.1 ± 1.2
	2回目	9	0.3 ± 0.7	0.7 ± 0.5	1.8 ± 1.9	1.6 ± 3.2

注) 平均値 ± 標準偏差

CIDR挿入後0日目、5日目、10日目、21日目の小型卵胞数の推移を〔表3〕に示した。E2投与前のCIDR挿入後5日目とE2投与後のCIDR挿入後10日目では、E2を投与しなかった各区の1回目ではA区が12.2個と11.4個、B区が13.1個と14.9個、C区が12.9個と13.2個、A区、B区でE2を投与した2回目ではA

区が14.7個と12.9個、B区で12.8個と17.3個（ $P < 0.05$ ）、C区で12.9個と14.7個となり、B区の2回目で有意に増加した。

表3 小卵胞の推移

単位:個

区 分	処理頭数	0日目	5日目	10日目	21日目	
A 区	1回目	9	12.6 ± 3.8	12.2 ± 4.6	11.4 ± 4.5	8.9 ± 3.3
	2回目	9	12.7 ± 5.2	14.7 ± 3.2	12.9 ± 5.6	11.7 ± 4.8
B 区	1回目	9	13.4 ± 6.4	13.1 ± 4.4	14.9 ± 4.9	11.3 ± 3.5
	2回目	9	12.8 ± 3.8	12.8 ± 3.4 <sup>a</sup>	17.3 ± 6.7 <sup>b</sup>	14.8 ± 4.7
C 区	1回目	9	11.7 ± 3.9	12.9 ± 5.1	13.2 ± 4.5	10.7 ± 5.4
	2回目	9	12.7 ± 5.7	12.9 ± 5.6	14.7 ± 7.6	11.1 ± 6.6

注) 平均値±標準偏差

[a - b] 異文字間に5%の有意差あり

## 2) 採胚成績

試験区別の採胚成績を〔表4〕に示した。

遺残卵胞数は、E2を投与しなかった各区の1回目とA区、B区でE2を投与した2回目を比較するとA区では3.0個と3.8個、B区では1.9個と2.4個、C区では1.1個と1.7個と増加する傾向が見られたが、有意差は無かった。

回収卵数について、E2を投与しなかった各区の1回目とA区、B区でE2を投与した2回目を比較するとA区では2.9個と5.0個、B区では3.6個と5.0個、C区では2.1個と2.6個であった。

正常胚数についてはA区では1.6個と4.1個、B区では3.4個と4.3個、C区では1.7個と2.2個であった。

胚の品質別に各区の1回目と2回目を比較するとGood以上胚はA区で1.0個と3.3個(P<0.05)、およびFair胚は0.6個と0.2個、合計1.6個と3.5個、B区で1.4個と3.1個、および1.1個と0.6個、合計2.5個と3.7個、C区で1.7個と1.4個、および0.0個と0.8個、合計1.7個と2.2個でありE2を投与したA区、B区の2回目で卵質が向上し、凍結可能胚数が増加する傾向が見られた。

表4 試験区別採胚成績

単位:個

区 分	処理頭数	遺残卵胞数	回収卵数	正常胚数	凍結可能胚数	Good以上	Fair	
A 区	1回目	9	3.0 ± 2.7	2.9 ± 1.8	1.6 ± 1.3	1.6 ± 1.3	1.0 ± 0.9 <sup>a</sup>	0.6 ± 1.0
	2回目	9	3.8 ± 2.9	5.0 ± 3.9	4.1 ± 3.9	3.5 ± 3.7	3.3 ± 3.2 <sup>b</sup>	0.2 ± 0.7
B 区	1回目	9	1.9 ± 2.3	3.6 ± 6.7	3.4 ± 6.8	2.5 ± 5.4	1.4 ± 3.1	1.1 ± 2.3
	2回目	9	2.4 ± 2.7	5.0 ± 5.1	4.3 ± 4.2	3.7 ± 4.0	3.1 ± 3.6	0.6 ± 0.7
C 区	1回目	9	1.1 ± 1.4	2.1 ± 2.3	1.7 ± 2.0	1.7 ± 2.0	1.7 ± 2.0	0.0 ± 0.0
	2回目	9	1.7 ± 2.5	2.6 ± 4.4	2.2 ± 4.1	2.2 ± 4.1	1.4 ± 2.6	0.8 ± 1.6

注) 平均値±標準偏差

[a - b] 異文字間に5%の有意差あり

過去の採胚成績別の採胚成績を〔表5〕に示した。

E2を投与しなかった各区の1回目とA区、B区でE2を投与した2回目の凍結可能胚数は高採胚成績牛ではC区で2回目の採胚時にやや増加したが、顕著な差は認め

られなかった。中採胚成績牛ではA区、B区(P<0.05)で2回目に増加する傾向が認められた。低採胚成績牛ではA区で増加する傾向が認められた。

表5 過去の採胚成績別凍結可能胚数

単位：個

区 分	処理頭数	高採胚成績牛	中採胚成績牛	低採胚成績牛	平均	
A 区	1回目	9	1.7 ± 2.1	1.7 ± 0.6	1.3 ± 1.5	1.6 ± 1.3
	2回目	9	2.0 ± 2.6	4.3 ± 5.8	4.3 ± 3.1	3.5 ± 3.7
B 区	1回目	9	7.3 ± 8.1	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.6	2.5 ± 5.4
	2回目	9	6.3 ± 5.1	4.7 ± 2.5 <sup>b</sup>	0.0 ± 0.0	3.7 ± 4.0
C 区	1回目	9	3.3 ± 3.1	1.0 ± 0.0	0.7 ± 0.6	1.7 ± 2.0
	2回目	9	5.7 ± 6.4	0.3 ± 0.6	0.7 ± 0.6	2.2 ± 4.1

注) 平均値±標準偏差

[a - b] 異文字間に5%の有意差あり

## IV 考 察

小西ら<sup>4)</sup>は過剰排卵処理時にE2を投与することにより大型卵胞が抑制され、採胚成績が改善されることが示唆されたと報告している。一方辻野ら<sup>5)</sup>はE2の投与により大型卵胞が抑制され、小型卵胞が増加するものの採胚成績は改善されなかったと報告している。本研究ではE2を投与したA区とB区の2回目で大型卵胞が有意に減少しており、B区の2回目に小型卵胞が有意に増加した。また、正常胚数、凍結可能胚数もA区、B区の2回目に増加し、卵質も向上する傾向が見られた。なお、E2投与時期による差は認められなかった。このことからCIDRとE2を併用することにより卵巣中の大型卵胞が抑制され、採胚成績の向上に効果があるものと考えられた。

竹下ら<sup>2)</sup>はCIDR挿入後1日目または5日目にE2を5mg投与したところ、5日目投与の方が若干ではあるが凍結可能胚数が多い傾向がみられたが、対照区と比して採胚成績の向上は認められなかったと報告している。本研究では、優勢卵胞抑制後にE2の体内残留を防ぐため投与量を1mgとして投与したところ、A区、B区の採胚時の遺残卵胞数が対照区と比較して若干多いものの、各区、1回目と2回目の遺残卵胞数の差に違いは見られなかった。また、正常胚数、凍結可能胚数もA区、B区の2回目に増加したことから、E2の効果が1mgでも十分得られ、またE2の体内残留による影響は無いものと考えられた。

小西ら<sup>4)</sup>は回収卵数が8個以上の牛にE2投与による成績の改善はみられなかったが、8個以下の牛ではE2の投与により成績が改善されたと報告しており、本研究においても過去の採胚成績別に高採胚成績牛、中採胚成績牛、低採胚成績牛を試験区毎に比較すると中採胚成績牛ではA区、B区（ $P < 0.05$ ）で2回目に向上

する傾向が認められ、低採胚成績牛ではA区で向上する傾向が認められたことから、E2の投与は採胚成績が劣るものにおいて有効である可能性が示唆された。

以上のことから過剰排卵処理開始前に超音波画像診断装置を用いて卵巣動態を調べ、大型卵胞が存在する場合はE2を用いて抑制することが採胚成績の向上につながると考えられる。また、CIDRとE2の組み合わせは中採胚成績牛、低採胚成績牛に対してより効果的であり、E2投与が効率的な胚生産につながると考えられる。

## V 要 約

- ① CIDR挿入中のE2の投与時期の違いが採胚成績に及ぼす影響について検討した。
- ② CIDR挿入後5日目または7日目にE2を1mg投与したところ、過剰排卵処理を開始する10日目には、E2を投与した両試験区の2回目で大型卵胞が有意に減少し、7日目に投与した区の2回目に小型卵胞が有意に増加した。また、正常胚数、凍結可能胚数も両試験区の2回目に増加し、卵質も向上する傾向が見られた。
- ③ 正常胚数、凍結可能胚数が両試験区の2回目に増加したこと、E2投与により遺残卵胞数が増加する傾向は見られなかったことから、E2の効果が1mgでも十分得られ、またE2の体内残留による影響は無いものと考えられた。
- ④ 過去の採胚成績別に高採胚成績牛、中採胚成績牛、低採胚成績牛を試験区毎に比較すると両試験区間に差は認められなかったものの、対照区と比較すると低採胚成績牛、中採胚成績牛において凍結可能胚数の向上が認められた。

## 参 考 文 献

- 1) 市野清博・松岡一仁・石井俊昭・嶋屋佳子・櫻原孝正：黄体ホルモン膈内挿入製剤を用いた連続過剰排卵処理法の検討(第1報)。山口県畜産試験場研究報告, 17~24 (1999)
- 2) 竹下和久・市野清博・藤井満貴・石井俊昭・井上愛子・松崎伸生：黄体ホルモン膈内挿入製剤を用いた連続過剰排卵処理法の検討(第2報)。山口県畜産試験場研究報告, 157~166 (2000)
- 3) 財団法人日本家畜人工授精師協会：家畜人工授精講習会テキスト(家畜受精卵移植編), 158~176 (1996)
- 4) 小西一之・堂地 修・岡田真人・宮沢彰・橋谷田豊・後藤裕司・小林修司・今井 敬：黒毛和種未經産牛におけるCIDRとFSHを用いた過剰排卵処理成績に及ぼすEstradiol-17 $\beta$ の効果。日本畜産学会報 68, 1075~1084 (1997)
- 5) 新納正之・辻野堂史・岡田真人・橋谷田豊・宮澤彰・今井 敬・後藤裕司・小林修司・小島敏之：CIDRを用いた黒毛和種未經産牛の過剰排卵処理成績に及ぼす安息香酸エストラジオールの影響。第13回東日本家畜受精卵移植技術研究会講演要旨, (1998)