

# 低採胚成績牛における大卵胞吸引除去とestradiol 17 投与後の過剰排卵誘起とその後の採胚成績に及ぼすGn-RH製剤の投与効果

誌名	滋賀県農業総合センター畜産技術振興センター研究報告
ISSN	13489925
著者名	青木,義和 藤田,耕 宮澤,泰 関島,忠人 富家,武男
発行元	滋賀県農業総合センター畜産技術振興センター
巻/号	7号
掲載ページ	p. 5-10
発行年月	2000年12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



# 低採胚成績牛における大卵胞吸引除去とEstradiol 17 $\beta$ 投与後の過剰排卵誘起とその後の採胚成績に及ぼすGn-RH製剤の投与効果

青木義和、藤田耕、富澤泰、関島忠人、冨家武男

## 要 約

黒毛和種の低採胚成績牛を対象に、連続採胚の効率化と採胚成績の向上を目的として、次の試験を実施した。まず、膈内装着タイプの持続型黄体ホルモン製剤(CIDR-B)を用いて、発情周期の同期化を図り、その6日後には、主席卵胞の可能性が高い大卵胞(8 mm $\leq$ )を経膈的に吸引除去する(大卵胞不在個体は観察のみ)と同時に、Estradiol17 $\beta$  (E<sub>2</sub>)製剤を投与し、その後の卵巣内卵胞の動態について調査した。併せて、発情誘起後の人工授精前におけるGn-RH製剤投与の採胚成績に及ぼす影響について検討した。

大卵胞吸引除去とE<sub>2</sub>投与を実施した4日後には、小卵胞(2-4mm)数の有意な増加(13.0 $\pm$ 3.5個 $\rightarrow$ 17.1 $\pm$ 3.3個: 1.32倍)( $p < 0.01$ )が見られた。一方、大卵胞(1.1 $\pm$ 0.9 $\rightarrow$ 0.1 $\pm$ 0.2)および中卵胞(0.9 $\pm$ 0.9 $\rightarrow$ 0.1 $\pm$ 0.5)共に有意( $p < 0.01$ )な減少が見られ、卵巣中の小卵胞占有率が、87.2%から98.8%まで上昇した。

Gn-RH投与の効果については、推定黄体数に差は見られないものの、採取胚数で無投与区に対し投与区で若干の改善傾向が見られた。よって、推定黄体数に対する採取胚数の割合を示す有効排卵割合では、無投与区(27.7%)に対し投与区(54.7%)で有意( $p < 0.05$ )に高くなった。なお、採取胚の品質に対するGn-RH投与の影響は見られなかった。

(キーワード: 和牛連続採胚、大卵胞吸引除去、Estradiol17 $\beta$ 、持続型黄体ホルモン、Gn-RH製剤)

## 緒 言

牛の不完全発情周期中における卵巣では、発情・排卵を起点とし、周期的な卵胞のウェーブ的消長が観察され、この現象を一般に卵胞波と呼ぶ概念<sup>10,14,22,24</sup>が確立された。一方、過剰排卵誘起の際には、ホルモン(FSH)に反応する小卵胞の十分な確保が必要不可欠であるが、一卵胞波期間中には、下垂体からのFSH分泌を抑制する作用を持つインヒビン<sup>23</sup>を分泌し、新たな卵胞の発育を強く抑制する主席卵胞(Dominant Follicle:DF)と呼ばれる排卵に至らない大型卵胞が、1~2回出現すること<sup>1,10,14,15,24</sup>が報告されている。このDFが過剰排卵誘起の際に存在すると、その後の採胚成績に悪影響を及ぼすという報告<sup>11,13,25,26</sup>も見られる。

今回、採胚成績が劣る黒毛和種個体を対象として、計画的な連続採胚の効率化と採胚成績の向上を目的として、以下の試験を実施した。まず、膈内装着タイプの持続型黄体ホルモン製剤(CIDR-B)を用いて、発情周期の同期化を図った後、DFの可能性が高い大卵胞(8 mm $\leq$ )を吸引除去すると同時に、Estradiol17 $\beta$  (E<sub>2</sub>)製剤を投与し、その後の卵巣内卵胞の動態について調査した。併せて、近年、ホルスタイン種で授精後の受胎性を高める目的でGn-RHとPGF<sub>2 $\alpha$</sub> 製剤を組み合わせ投与するOvsynch法<sup>19</sup>の理論に基づいて、人工授精前におけるGn-RH製剤投与の採胚成績に及ぼす影響について検討した。

## 材料と方法

### (1)供試牛

黒毛和種経産牛8頭 [年齢:6.4 $\pm$ 2.6才、産歴:1.8 $\pm$ 0.4産、空胎期間:617.4 $\pm$ 340.0日(最大1,086日)、BCS:5.9 $\pm$ 0.7] を35日間隔で、各2回延べ16頭(うち実採胚は14頭)を供試した。また、供試牛の即近の採胚における平均採取胚数は1.5 $\pm$ 2.3個であった。

### (2)過剰排卵誘起プログラム

供試牛の発情周期に関わらず、局方プロゲステロン1.9 gを含む持続型黄体ホルモン製剤(CIDR-B:イージーブリード;InterAg社)を各個体膈内に装着した(Day0)。その後、卵巣像観察のためDay6には、牛経膈穿刺用アームに装着したリニア型5 MHzの超音波診断プローブ(アロカ製)を膈内に挿入、子宮頸部側方へ誘導した後、直腸を介した操作で、卵巣をプローブの上に固定した。超音波卵巣画像による卵胞径から、小卵胞(2~4 mm)、中卵胞(5~7 mm)、大卵胞(8 mm $\leq$ )に分類し、各々の卵胞数を計測した。このうち、大卵胞については、経膈的に完全に吸引除去し、大卵胞不在の個体については、観察のみとした。併せて、吸引の有無に関わらず、全ての個体に対し、Estradiol17 $\beta$  (E<sub>2</sub>:安息香酸エストラジオール;デンカ製薬) 5 mgを筋肉内投与した。この4日後(Day 10)には、総量20AUFSH(FSH-R;アントリン;デンカ製薬)の1日2回(朝夕)3日間計6回に渡る漸減投与(頸部皮下)を開始するとともに、卵巣内卵胞数を計測した。Day

12の朝には、CIDR-Bを除去し、PGF<sub>2α</sub>類縁体製剤(クロプロステノールNa;エストラメイト;住友製薬)790 μgを筋肉内投与し発情を誘起した。続くDay 14の朝には、半数の個体に対しGn-RH(酢酸フェリチレリン;コンセラー:武田薬品工業)100 μgを筋肉内投与し(残半数は無投与)、同日の夕方(投与9時間後)ならびに翌日(Day 15)の朝、人工授精を実施した。初回人工授精から7日目(Day 21)に子宮灌流による採胚を実施した。以後、Day 35にCIDR-Bを再装着し、同様のプログラム(Gn-RH投与群と無投与群を1回目と入替え)により2回目採胚を実施した(図1)。

Day	0	6	10	11	12	14~15	21	35(0)
CIDR-B	装着				除去			装着
卵 巢		吸引 観察 (Φ8mm)						吸引 (残存大卵胞)
Estradiol17β		5mg						
F S H			5AU	3AU	2AU			
漸減(朝夕)					3 ml			
PGF <sub>2α</sub>						100 μg		
Gn-RH							人工授精	採胚
授精&採胚								

図1 採胚処理プログラム

(3)採胚操作

供試牛を柵場に保定した後、2%塩酸リドカイン製剤(キシロカイン:藤沢薬品)により尾椎硬膜外麻酔を施した後、臀部、外陰部および膺前庭を逆性石鹼とエタノールで洗浄消毒し、超音波診断装置を用いて、黄体数および非排卵性の残存大卵胞数を計測し、後者は全て吸引除去した。続いて、2wayバルーンカテーテル(16Fr. 30cc)

を子宮頸管を介して左右各々の子宮角に挿入し、子宮角外側分岐部から1~2指幅以上深部にバルーンをセットした。子宮内の灌流には、0.24%乳酸ナトリウム、0.1%ピルビン酸ナトリウムおよび6%(W/V)牛血清アルブミン(BSA)を含む修正リン酸緩衝液(エンブリオテック:日本全薬工業)を用いた。灌流液はガラス注射筒で子宮角内に注入し、卵管子宮移行部を持ち上げて回収した。灌流は片側子宮につき5回以上実施し、一頭あたり500mlの灌流液を使用した。後処置として、子宮内に2%局方ポピドンヨード剤(イソジン液:明治製薬)60~70mlを注入すると同時にPGF<sub>2α</sub>類縁体製剤790 μgを筋肉内投与した。なお、回収した灌流液は、φ80 μmメッシュで濾過した後、胚を検索した。採取胚は洗浄後、5%子牛血清(CS)を含むTCM199培地(GIBCO)に移し、形態観察により品質別に評価分類した。

(4)統計処理

卵胞数の平均値比較には、Student's t-test を、(採取胚数/推定黄体数)比の比較には、χ<sup>2</sup>検定を用いて統計分析を行った。

結 果

表1に示すように、大卵胞吸引除去(大卵胞不在個体では観察のみ)とE<sub>2</sub>投与(Day6)から、4日後(Day 10)のFSH処理開始時にかけて、全体として小卵胞数の有意な増加(13.0±3.5個(Day6)→17.1±3.3個(Day 10):1.32倍)(p<0.01)が見られた。なお、Day6の時点で大卵胞不在の個体については、E<sub>2</sub>投与のみを行ったが、大卵

表1 E<sub>2</sub>投与と大卵胞吸引後の卵巣内卵胞数の推移

区 分	N	観 察 時 期	小卵胞数	中卵胞数	大卵胞数	小卵胞 占有率
E <sub>2</sub> 投与& 吸引区	11	Day 6	13.1±4.0 <sup>a</sup>	0.6±0.6	1.5±0.7 <sup>c</sup>	85.7%
		Day10	17.5±3.5 <sup>b</sup>	0.2±0.6	0.1±0.3 <sup>d</sup>	98.5%
E <sub>2</sub> 投与 のみ区	5	Day 6	12.8±2.1	1.4±1.0	0.0±0.0	90.1%
		Day10	16.4±2.9	0.0±0.0	0.0±0.0	100%
計	16	Day 6	13.0±3.5 <sup>c</sup>	0.9±0.9 <sup>c</sup>	1.1±0.9 <sup>c</sup>	87.2%
		Day10	17.1±3.3 <sup>d</sup>	0.1±0.5 <sup>d</sup>	0.1±0.2 <sup>d</sup>	98.8%

a - b (p<0.05), c - d (p<0.01) 間に有意差あり。

表2 Gn-RH投与による採胚成績への影響

区分	N	採取胚数	推定 黄体数	残存 大卵胞数	有効排卵* 割合(%)
Gn-RH 投与区	7	2.9 $\pm$ 2.9	5.3 $\pm$ 2.3	4.9 $\pm$ 4.8	54.7% <sup>a</sup>
無投与区	7	1.3 $\pm$ 1.6	4.7 $\pm$ 2.4	5.4 $\pm$ 4.9	27.7% <sup>b</sup>

a - b間 ( $p < 0.05$ ) に有意差あり.

\* : (採取胚数) / (推定黄体数)  $\times$  100.

表3 35日間隔における回数別採胚成績の推移

回数	N	採取胚数	推定 黄体数	残存 大卵胞数	有効排卵* 割合(%)
1回目	7	2.0 $\pm$ 1.9	5.4 $\pm$ 2.0	4.7 $\pm$ 3.6	37.0%
2回目	7	2.1 $\pm$ 2.9	4.6 $\pm$ 2.6	5.6 $\pm$ 5.8	45.7%

\* : (採取胚数) / (推定黄体数)  $\times$  100.

胞吸引除去を伴う個体と同様に小卵胞数の増加傾向が見られた。一方、大卵胞数は、1.1 $\pm$ 0.9個(Day6)から0.1 $\pm$ 0.2個(Day 10)へと有意( $p < 0.01$ )に減少し、その再出現が強く抑制される現象が見られた上に、吸引操作を伴わない中卵胞数についても、0.9 $\pm$ 0.9個(Day6)から0.1 $\pm$ 0.5個(Day 10)へと有意( $p < 0.01$ )な減少が見られた。以上のことから、卵巢中における小卵胞占有率は、87.2%から98.8%まで上昇した。

人工授精前のGn-RH投与の効果については、推定黄体数に差は見られず、採取胚数において有意差は見られないものの、無投与区(1.3 $\pm$ 1.6個)に対し投与区(2.9 $\pm$ 2.9個)で、若干の改善傾向が見られた。このことから、推定黄体数に対する採取胚数の比率を示す有効排卵割合は、無投与区(27.7%)に対して、投与区(54.7%)で有意( $p <$

0.05)に高くなった。なお、残存大卵胞数では、無投与区(5.4 $\pm$ 4.9個)および投与区(4.9 $\pm$ 4.8個)間で有意な差は見られなかった(表2)。なお、採取胚の品質に対するGn-RH投与の影響は見られなかった。

また、今回、各個体35日間隔で2回の採胚を実施したが、1回目から2回目にかけて、採取胚数の減少や胚品質の低下等のマイナス効果は見られなかった(表3)。

## 考 察

近年、牛卵胞液中における主席卵胞(DF)の存在が、採胚成績に悪影響を及ぼすこと<sup>11, 13, 25, 26)</sup>が報告されるようになり、過剰排卵誘起を開始する前にDFを除去し、誘起対象の中小卵胞を増幅確保することで、良好な成績が得られるという報告<sup>7, 8, 12, 18)</sup>がなされるようになった。

一方、卵巣中に観察される大卵胞が、全てDFであるとは言えなく、Bungartz et alが示す基準<sup>9)</sup>によると、卵巣中に3~8mmの中小卵胞が10個以上存在する場合には、同時にDFは存在し得ない(ホルスタイン種)という。したがって、今回、吸引除去した大卵胞(8mm $\leq$ )が、全てDFであるとは勿論思われない。しかし、複数の供胚牛に対し計画的かつ効率的に過剰排卵誘起を施すためには、基本となる処理マニュアルが必要となり、定期的操作で100%DFを除去することが重要となる。このDF除去の具体的方法としては、現在のところPGF<sub>2</sub>とともGn-RH<sup>19)</sup>およびhCG<sup>23)</sup>の投与で、内分泌学的に排卵除去する方法、および経陰的に針を穿刺し吸引除去する方法<sup>12,15,17,18)</sup>が考えられる。我々は、完全敏速かつ弊害が少ないと思われる後者の吸引法を施した長期空胎牛において、大卵胞を吸引除去した翌日には、中小卵胞(特に小卵胞)数が有意に増加し、吸引数と増加中小卵胞数の間には、正の相関が見られ、これがある程度採取胚数にリンクすることを報告<sup>2)</sup>している。この他にも、過剰排卵誘起開始時の卵巣中に存在する3~6mmの卵胞数と採取胚数の間に正の相関を認めたというRomero et alの報告<sup>21)</sup>、さらに小径の卵胞(2~3mm)数と採胚数間との相関を示した報告<sup>15)</sup>等があり、小卵胞の存在が過剰排卵誘起後の採胚成績に大きく影響することは確実である。

今回、過剰排卵誘起処理の効率化を図るため、持続型黄体ホルモン(P<sub>4</sub>)製剤(CIDR-B)を利用し、供胚牛の発情周期を制御した上、装着6日後には、存在する大卵胞を全て吸引除去すると同時に、Estradiol17 $\beta$ (E<sub>2</sub>)製剤を投与した。その結果、4日後には小卵胞数の有意(p<0.01)な増加が見られた上に、大中卵胞の出現を抑制し、小卵胞占有率を98.8%まで高めることが可能となり、本処理操作の卵巣内小卵胞確保に対する高い効果が示唆された。しかし、過剰排卵誘起開始時に観察された小卵胞の全てが発育・排卵までには至らず、中小卵胞数を大きく採取胚数に反映した先の報告<sup>15,21)</sup>のような劇的な採胚成績の向上は見られなかった。この原因としては、供試牛が老齢である上、過去の採胚成績が劣ることに加えて、P<sub>4</sub>およびE<sub>2</sub>の投与バランス等も影響していることが考えられる。

一方、ホルスタイン種で授精後の受胎性を高める目的で、近年、Gn-RHとPGF<sub>2</sub>を組み合わせるOvsynch法<sup>19)</sup>の有効性が報告されている。今回、これの理論に基づいて、PGF<sub>2</sub>投与による発情誘起の際、非排卵性の残存大卵胞数を減少させ採取胚数を増加させる目的で、Gn-RHの投与効果を検討した。その結果、採取胚数は、低レベルで推移したものの、投与区では胚品質の低下も

なく、採取胚数の若干の改善傾向が見られ、有効排卵割合では、無投与区に対し投与区で有意(p<0.05)に高くなった。このことから、Gn-RH投与が採取胚数の向上に有効であることが明らかとなった。今回の結果以外にも、卵胞の発育および排卵を促すために、E<sub>2</sub>製剤<sup>3,4,5,17,20)</sup>およびGn-RH製剤<sup>6,16)</sup>を併用することで、より高い効果が得られたという報告がある反面、卵胞吸引後の過剰排卵誘起で排卵数は増加したものの、凍結不能胚数および未受精卵数も増加した<sup>16)</sup>という負の報告もある。今後は、全体のホルモンバランスを考慮した上で、より有効な投与方法および投与量などについて、検討を加える必要があると考える。

また、今回の供胚牛におけるBCS平均は、繁殖適性に応じた範囲内にあったが、ホルスタイン種では栄養度が高い場合に対し低い場合に、卵胞第1波中のDFは長く存在し径も大きくなること<sup>9)</sup>が報告されており、局所的な卵巣の状態のみならず、より広域な観点から、個体毎の生理栄養状態も把握しておく必要がある。我々は、以前同一個体に対し短期に最大5回にも及ぶ連続過剰排卵誘起により、その採胚率が著しく低下した経験<sup>2)</sup>をもつことから、供胚牛の適度な休養ならびに、定期的な妊娠分娩が必要であると思われる。

最後に、今回供試した個体は、平均空胎期間が長く、過去の採胚成績も劣ることから、本来、過剰排卵誘起の対象としては不適であるのかも知れない。一方で、このような個体でも、優れた遺伝資源を有することが想定されることから、今後、通常の採胚成績が劣る個体にも適用可能な新たな胚生産システムの構築に向けた展開の必要性が強く感じられる。

## 謝 辞

本論文を御校閲頂きました京都大学農学部動物生殖生理学講座山田雅保助教授に深甚なる謝意を表します。

## 引用文献

- 1) Adams,G.P. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle:Implication for synchronization super-stimulation.(1994),Theriogenology,41: 19-24.
- 2) 青木義和・藤田耕・富澤泰・中山貴久・富家武男・森岡征夫、長期空胎牛における大卵胞吸引除去後の過剰排卵誘起、(1999)、日本胚移植学誌、21(2): 75-84.
- 3) Bo,G.A., G.P.Adams, R.A.Pierson, H.E.Tribulo,M. Caccia & R.J.Mapletoft. Follicular wave dynamics after estradiol17- $\beta$  treatment of heifers with or

- without a progesterone implant.(1994),*Theriogenology*, 41:1555-1569.
- 4) Bo,G.A., G.P.Adams, M.Caccia, M.Martinez, R.A. Pierson & R.J Mapletoft. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progesterone and estradiol in cattle.(1995), *Anim.Reprod. Sci.*,39: 193-204.
  - 5) Bo,G.A.,G.P.Adams,R.A.Pierson & R.J.Mapletoft. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle.(1995),*Theriogenology*,43:31-40.
  - 6) Bodensteiner.K.J., K.Kot, M.C.Wiltbank & O.J.Ginther. Synchronization of emergence of follicular waves in cattle.(1996),*Theriogenology*, 45:1115-1128.
  - 7) Bungartz.L & H.Niemann. Effect of a dominant follicle on ovarian response of dairy cows following various superovulatory treatment schedules. ( 1993 ) , *Theriogenology*,39:198.8) Bungartz.L & H.Niemann. Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination.(1994), *J.Reprd. Fert.*,101:583-591.
  - 9) Burke,J.M., J.H.Hampton, C.R.Staples & W.W. Thatcher. Body condition influences maintenance of a presistent first wave dominant follicle in dairy cattle.(1998),*Theriogenology*,49:751-760.
  - 10) Ginther,O.J, L.Knopf & J.P.Kastelic.Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus cycle with two and three follicular waves. (1989), *J.Reprd.Fert.*,87:223-230.
  - 11) Guibault,L.A, F.Grasso, J.G.Lussier, P.Rouillier, P. Rouillier & P.Maton, Decreased super ovulatory responses in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle.(1991), *J.Reprd.Fert.*,91:81-89.
  - 12) Hill,K.G, & L.F Kuehner,Follicle aspiration prior to superovulation in cattle : a field study .(1996), *Theriogenology*,45:324.
  - 13) Huhtinen, M., V.Rainio, J.Aalto, P.Bredbakca&A. Maki-Tanila.Increased ovarian responses in the absence of a dominant follicle in super-ovulated cows.(1992), *Theriogenology*,37:457-463.
  - 14) 木之下明弘・前田真理・上村俊一・大久津昌治・後藤和文・中西善彦、正常な発情周期中の未経産牛における卵胞の発育動態の解析、(1998)、日畜会報、69(7) :690-696.
  - 15) 小林修一・生水誠一・河部恭一・高岸実・加藤武市・福井幸昌・内海恭三、ウシ発情周期における卵胞動態の超音波画像診断装置による解析と過剰排卵反応、(1997)、日畜会報、68(1):45-53.
  - 16) Kohram,H., H.Twagiramungu, D.Bousquet, J.Durocher & L.A.Guilbault.Ovarian superstimulation after follicular wave synchronization with GnRH at two different stages of the estrous cycle in cattle.(1998), *Theriogenology*,49:1175-1186.
  - 17) 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、黒毛和種経産牛における 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、(1997)、日畜会報、68(11): 1075-1084.
  - 18) Lindney,B.R.,C.R.Looney, D.J.Funk & D.C Faber. The effect of apparent dominant follicle removal prior to FSH treatment on superstimulated response in problem donors.(1994),*Theriogenology*, 41:238.
  - 19) Pursley,J.R., M.O.Mee & M.C.Wiltbank. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  and Gn-RH.(1995),*Theriogenology*,44:915-923.
  - 20) Rivera,G.M.,C.G.Goni, M.A.Chaves, S.B.Ferrero & G.A.Bo. Ovarian follicular wave synchronization and induction of ovulaion in postpartum beef cows . (1998),*Theriogenology*,49:1365-1375.
  - 21) Romero,A., J.Albert, Z.Brink & G.E.Seidel. Number of small follicles in ovaries affect super ovulation response in cattle.(1991), *Theriogenology*, 35:265.
  - 22) Savio,J.D.,L.Keenan, M.P.Boland & J.F.Roche. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrus cycle of heifers.(1988),*J.Reprd.Fert.* ,83:663-671.
  - 23) Sianangama,P.C & R.Rajamahendran. Effect of hCG administration on day7 of the estrous cycle on follicular dynamics and cycle length in cows.(1996), *Theriogenology*,45:583-592.
  - 24) Sirois,J & J.E.Fortune. Ovarian follicular dyna mics during the estrus cycle in heifers minitored by real-time ultrasonography. (1988) ,*Biol.Reprod.*, 39:308-317.
  - 25) Stock,A.E, J.E.Ellington & J.E.Fortune. A dominant follicle does not affect follicular recruitment by superovulatory dose of FSH in cattle but can inhibit ovulation.(1996), *Theriogenology*,45:1091-1102.
  - 26) Taneja,M., G.Singh, S.M.Totey & A.Ali.

Follicular dynamics in water buffalo superovulated in presence or absence of dominant follicle.(1995), *Theriogenology*,44:581-597.

- 27) Woodruff,T.K & J.P.Mather. Inhibin activin and the female reproductive axis.(1995),*Annu.Rev. Physiol.*, 57:219-244.