

# ウシの繁殖生理状況の違いが超音波経膈採卵成績に及ぼす 影響

誌名	滋賀県畜産技術振興センター研究報告
著者	青木, 義和 三溝, 成樹 藤田, 耕 藤谷, 泰裕 内海, 恭三
巻/号	5号
掲載ページ	p. 1-6
発行年月	1998年12月

## ウシの繁殖生理状況の違いが 超音波経膈採卵成績に及ぼす影響

青木義和 三溝成樹<sup>1)</sup> 藤田 耕 藤谷泰裕<sup>2)</sup> 内海恭三<sup>3)</sup>

滋賀県畜産技術振興センター 滋賀県家畜保健衛生所<sup>1)</sup> 大阪府立農林技術センター<sup>2)</sup> 元京都大学農学部<sup>3)</sup>

### 要 約

繁殖生理状況の異なるホルスタイン種に対して、超音波経膈採卵を実施した。採取卵母細胞の形態的特徴による品質評価などの採卵成績への影響を検討するとともに、一部は体外培養に供し胚発生状況について調査した。

ほぼ正常な発情周期を呈する経産牛4頭をI区とし、何等かの原因により発情周期が不定な経産牛3頭をII区、妊娠中期牛2頭をIII区、未経産のリピーブリーダー3頭をIV区とした。各個体1クールあたり7～14日間隔で、1～10回ずつ計67回供試した。

卵巢中の推定卵胞数は、大卵胞 (10mm $\leq$ ) および中卵胞 (5 $\leq$ ～10mm $>$ ) では、各試験区間での差を認めなかったが、小卵胞 (5mm $>$ ) 数において、I区の6.7個に対して、II区で4.1個と有意に少ない値 ( $p < 0.01$ ) を示した。また、総卵胞数でも、I区の11.0個に対してII区で7.1個、IV区で6.8個と有意に少ない値 ( $p < 0.01$ ) を示したが、III区との間には有意な差を認めなかった。また、採取された卵母細胞数 (個/回) は、試験区間で有意な差を認めなかったものの、III, IV区の1.3個, 1.0個に対して、I, II区で2.3個, 2.1個とやや多い傾向を認めた。

一方、卵母細胞の形態的特徴により品質評価を実施したところ、体外受精に供用可能なA～Dランクの割合が、III区, IV区でそれぞれ66.7%, 62.5%であったのに対して、I区, II区では74.0%, 75.7%と若干高い傾向を認めた。さらに、この中で優良品質と評価したA, Bの割合は、I区で50.9%と他の区より高い傾向を認めた。また、同一個体で1クールあたり、7～14日間隔で最大10回の反復経膈採卵を実施したが、回数を重ねても推定卵胞数および採取卵母細胞数の減少や品質の低下等の悪影響は認められなかった。

体外培養による胚発生状況については、III区, IV区では優良品質卵子の割合が低いこともあり、発生率は低いものとなった。I区, II区については、2cell $\leq$ でそれぞれ66.7%, 62.1%とほぼ同等であったが、8～16cellで47.4%, 31.0%、胚盤胞期胚への発育割合では、19.3%, 10.3%となり、発生段階が進むにしたがって、I区で優れる傾向が認められた。また、これらの中から、4個を新鮮胚移植したところ、1頭が受胎し正常雌子牛が誕生した。

以上のことから、卵巢中の推定卵胞数と採取卵母細胞の品質、体外培養による胚盤胞期胚への発生率の何れにおいても、正常発情周期個体で最も優れた結果となり、効率的な経膈採卵を行うためには、供卵牛の繁殖生理状況が重要なポイントとなることが推察された。

### 結 言

近年、優良遺伝資質を有する雌牛からの胚採取については、ホルモン処理により過剰排卵を誘起し人工受精を施した後、子宮灌流により回収する方法が一般的となっており、フィールドにおける普及率も高い。

しかし、ホルモン剤の利用は、供胚牛の反応性と回収効率にバラツキがある<sup>15,21)</sup>ほか、その後の繁殖性への悪影響も危惧される。また、妊娠中や分娩直後の個体に対しては、供用できないなどの制限がある。この様な理由から、過剰排卵処理による方法だけでは、目的とする供胚牛から多数の良質胚を安定的に確保することは難しいのが現状である。

一方、と体卵巣から得た卵母細胞を利用した体外受精技術の進歩が著しい昨今であるが、これによると、供卵牛は既に生存していないことから、同一雌個体の反復利用が望めないという欠点がある。

1991年に Pieterse et al<sup>16)</sup>が超音波診断装置を用いて生体雌牛の卵巢像を観察しながら、膈を介して卵母細胞を吸引採取できることを報告した。以後、この方法で得られた卵母細胞に体外受精を施すことにより、妊娠牛を有効活用する可能性を示唆した Meintjes et al<sup>17)</sup>の報告をはじめとした本法の適用性が、諸家により検討されている。しかし、吸引装置の仕様 (機械的条件) や供卵牛の最適生理条件およびその後の繁殖性への影響など、未だ多くの検討課題が残されている。

本試験においては、繁殖生理状況の異なる供卵牛に対して超音波経膈採卵を適用し、卵巢内卵胞数および採取卵母細胞の形態的特徴による品質評価などの採卵成績について検討するとともに、一部は体外成熟培養の後、体外受精に供し胚発生状況について調査した。

材料と方法

(1) 供試牛

当所繁養の繁殖生理状況の異なるホルスタイン種12頭を対象として、試験区分を設定した。即ち、ほぼ正常な発情周期を呈する経産牛4頭(3~4産)をI区とし、何等かの原

因により発情周期が不定な経産牛3頭(1産)をII区、妊娠中期牛2頭をIII区、未経産のリピーター3頭をIV区とした。なお、供試期間中もIV区以外の個体については、朝夕1日2回の通常搾乳を実施した。また、各個体1クールあたり7~14日間隔で、1~10回の範囲で計67回供試した(表1)。

表1 経膈採卵供用試験区分

区分	個体	年齢	産歴	供用回数	繁殖生理(発情周期)状況
I	a	7歳	3	5	正常発情周期
	b	8歳	4	10	"
	"	9歳	4	9	"
	c	10歳	3	9	"
	d	7歳	4	1	"
II	e	4歳	1	8	発情周期不定
	f	2歳	1	4	"
	"	3歳	1	5	"
	g	2歳	1	1	"
III	h	5歳	3	2	妊娠中(108日目から供用)
	i	3歳	1	5	"(152日目から供用)
IV	j	2歳	0	5	リピーター(AI:6回)
	k	2歳	0	2	"(AI:7回)
	l	2歳	0	1	"(AI:7回)

(2) 卵母細胞の経膈採取操作

供試牛を柵場に保定した後、尾椎硬膜外麻酔を施し、臀部、外陰部および膈前庭を逆性石鹼とエタノールで洗浄消毒し、本法に供した。

超音波経膈採卵操作は、以下のとおり実施した。即ち、牛経膈穿刺用アームに装着したリニア型、5MHzの超音波診断プローブ(アロカ製)を膈内に挿入し、子宮頸部側方へ誘導した。一方、直腸を介した操作で、卵巣をプローブの上に固定して、超音波診断装置のモニターで卵巣像を確認した。モニターに映し出される卵巣の超音波画像から、卵巣を直径により小卵胞(5mm<),中卵胞(5~10mm<),大卵胞(10mm≤)の3区分に分類し、卵胞数を計測し推定卵胞数としてあらわした。なお、この値については Student's t-test を用いて各試験区間の平均値の比較を行った。

本法に供する吸引針(18G,60mm)およびこれにつながる吸引チューブは、39℃の恒温槽中に保持した卵母細胞採取用の50ml滅菌試験管に接続しておいた上で、1%(v/v)ヘパリン液を加えた20.5mM乳酸ナトリウム、0.3%(W/V)牛血清アルブミン(BSA)加修正PBSを用いて、予め灌流しておいた。

モニターで標的卵胞を確認しながら、プローブ上の卵巣

中に膈壁を介して採取針を刺入し、卵胞液とともに卵母細胞を吸引採取した。吸引操作については、フットペダル付きポンプ(富士平工業製)を用いて、50~200mmHgの圧で吸引した。

(3) 回収卵母細胞の処理と体外受精処理

回収した灌流液をΦ80μmのメッシュで濾過した後、ヘパリンを含まない0.3%(W/V)BSA加修正PBSで、採取卵母細胞を洗浄後、5%子牛血清(CS;GIBCO)を含むTCM199培地(GIBCO)に移して形態的特徴を観察し、坂口ら<sup>19)</sup>の示した基準(表2)にしたがって、品質の高いものからA~Fの6段階に評価分類した。

表2 卵母細胞の品質評価基準

ランク	卵母細胞の形態的特徴
A	卵丘細胞が4層以上付着したもの
B	卵丘細胞が1~3層付着したもの
C	卵丘細胞の付着が1/3以下のもの
D	卵丘細胞が付着しないもの
E	卵丘細胞が膨化したもの
F	卵細胞が変性したもの

この評価によるA～Dの卵子を体外培養に供し発生能を検討した。

体外培養については、既報<sup>12)</sup>にしたがって実施した。まず、10%卵胞液を含む100IU/ml-hCG加TCM199培地で、22時間成熟培養を行った。続いて、凍結精液を融解し精子を10mMカフェインBO液で洗浄し、10μl/mlヘパリン、5mMカフェイン、1%(W/V)BSA加修BO液中で、1時間の前培養の後5時間体外受精に供した。その後の発

生培養は、5%CS加TCM199中で、 $5 \times 10^5$ /mlに調製シート化した卵丘-顆粒膜細胞との共培養法で、39℃、5%CO<sub>2</sub> in Air下で実施し、48時間毎に半量の培養液を交換し、受精後9日目まで培養を継続した。

結 果

卵巣中の径別推定卵胞数および採取卵母細胞数を表3に示した。

表3 径別推定卵胞数と採取卵母細胞数

区	採卵回数	径 別 推 定 卵 胞 数			計	採 取 卵 母 細胞 数
		5mm>	5 ≤ ~ 10mm>	10mm ≤		
I	34	6.7 ± 2.8 <sup>a</sup>	2.4 ± 2.1	2.0 ± 1.8	11.0 ± 2.6 <sup>a</sup>	2.3 ± 1.9
II	18	4.1 ± 2.7 <sup>b</sup>	1.7 ± 1.8	1.4 ± 0.9	7.1 ± 3.2 <sup>b</sup>	2.1 ± 1.4
III	7	6.9 ± 3.9 <sup>a,b</sup>	1.6 ± 1.2	0.7 ± 0.7	9.1 ± 3.8 <sup>a,b</sup>	1.3 ± 1.0
IV	8	4.9 ± 2.5 <sup>a,b</sup>	1.0 ± 1.3	0.9 ± 0.6	6.8 ± 2.2 <sup>b</sup>	1.0 ± 1.0

※. 同列異符号間に有意差あり (p<0.01)

(平均値 ± 標準偏差)

大卵胞および中卵胞数では、各試験区間での差を認めなかったが、小卵胞数において、正常発情周期個体(I区)が6.7個に対して、発情周期不定個体(II区)で4.1個と有意に低い値(p<0.01)を示した。また、総卵胞数でも、I区の11.0個に対してII区で7.1個、未経産のリピーター個体のIV区で6.8個と有意に低い値(p<0.01)を示したが、妊娠中期個体のIII区との間には有意な差を認めな

かった。

また、1採卵あたりの卵母細胞の採取個数は、試験区間で有意な差を認めないものの、III、IV区の13個、10個に対して、I、II区で2.3個、2.1個とやや多い傾向を認めた。形態的特徴による品質別の採取卵母細胞数およびその割合を表4に示した。

表4 品質別採取卵母細胞数およびその割合

区	採 取 卵 母 細胞 の ラ ン ク (%)						体外受精 供用卵母 細胞 (%) <sup>1)</sup>	優良品質 卵母細胞 (%) <sup>2)</sup>	
	A	B	C	D	E	F			
I	21 (27.3)	8 (10.4)	17 (22.1)	11 (14.3)	4 (5.2)	16 (20.8)	77	74.0	50.9
II	1 (2.7)	6 (16.2)	8 (21.6)	13 (35.1)	3 (8.1)	6 (16.2)	37	75.7	25.0
III	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (22.2)	4 (44.4)	0 (0.0)	3 (33.3)	9	66.7	0.0
IV	0 (0.0)	1 (12.5)	3 (37.5)	1 (12.5)	2 (25.0)	1 (12.5)	8	62.5	20.0

※. 1) (A~D個数)/(A~F個数) × 100, 2) (A~B個数)/(A~D個数) × 100

体外受精に供用可能としたA~Dランクの割合は、III区、IV区でそれぞれ66.7%、62.5%であるのに対して、I区、II区では74.0%、75.7%と若干高い傾向を認めた。さらに、この中で優良品質と評価したA、B卵子の割合は、I区で50.9%と他の区より高い傾向を認めた。

今回、同一個体で1クールあたり、7~14日間隔で1~10回の範囲で反復経膈採卵を実施したが、各個体とも回数を重ねることによる推定卵胞数および採取卵母細胞数の減少や品質の低下傾向などは認められなかった。なお、I区、II区、IV区の個体では、クール終了後に発情回帰が認められ

供用前に比べて繁殖生理状況が悪化した個体はなかった。一方、妊娠中期個体に(Ⅲ区)において、108日目から7日間隔で2回供用したもので、予定どおり正常産子を娩出した。しかし、152日目から7日間隔で5回供用した個体では、因果関係は明らかでないものの、最終採卵の20日後(妊娠200日目)に流産した。しかし、その後の発情は回帰し供用後廃用に至るまでの間に2回の妊娠および分娩が可能であった。

採取卵母細胞に対する体外成熟および体外受精処理後の発生率を表5に示した。

表5 試験区別培養胚の発生率

区	供試卵母細胞数	胚 2 cell <sup>1)</sup>	発 生 率 (%) 8~16 cell <sup>2)</sup>	(%) 胚盤胞期胚 Blastocyst <sup>3)</sup>
I	57	38 (66.7)	27 (47.4)	11 (19.3)
II	29	18 (62.1)	9 (31.0)	3 (10.3)
III	6	4 (66.7)	2 (33.3)	0 (0.0)
IV	5	1 (20.0)	1 (20.0)	0 (0.0)

※: 媒精日を0日として、1) 2日目、2) 3日目、3) 7~9日目の成績を示す。

Ⅲ区、Ⅳ区については、供試卵母細胞数が少なく品質も優れなかったこともあり、発生率は低いものとなった。Ⅰ区、Ⅱ区については、2cell<sup>1)</sup>でそれぞれ66.7%、62.1%とほぼ同等であったが、8~16cell<sup>2)</sup>で47.4%、31.0%、胚盤胞期胚への発育割合で19.3%、10.3%となり、発生段階が進むにしたがって、Ⅰ区で優れる傾向が認められた。また、これらの中から、4個を新鮮胚移植したところ、1頭が受胎し正常雌子牛が誕生した。

### 考 察

Pieterse et al<sup>16)</sup>は、直径10mm以上の卵胞については、吸引操作しても卵母細胞が回収される頻度が低い傾向にあることを報告していることから、確実に卵母細胞を採取するためには、卵巣における10mm未満の中小卵胞の存在が重要となることが推察される。今回の結果からも、他の区に対して中小卵胞数の多い傾向を認めた正常発情周期個体(Ⅰ区)の供用適性の高さが示唆された。また、Bungartz et al<sup>11)</sup>は、搾乳牛、乾乳牛、妊娠牛、未経産牛に本法を適用したところ卵巣内卵胞数は後2者に対して前2者で多く、採取正常卵母細胞率は、搾乳牛で特に高かったことを報告している。今回の結果においても、妊娠牛、未経産牛(リピートブリーダー)に対して正常発情周期の搾乳牛で、優良品質卵母細胞の割合が高い傾向を認めた。これらのことから、本法の高品質卵母細胞の採取効率には、供卵牛の繁殖生理状況が少なからず影響していることが確認された。

また、妊娠個体に対する本法の供用について、Meintjes et al<sup>14)</sup>、藤谷ら<sup>2)</sup>は、妊娠60~90日のいわゆる妊娠前期の段階で本法を2回反復実施しても、妊娠を継続したことを報告している。さらに、Reinders et al<sup>17)</sup>は妊娠30~90日の間で、本法を定期的に反復供用しても流産した個体はなかったことを報告している。

一方、今回の成績では、108日目から7日間隔で2回供用したもので、予定通り正常産子を娩出したが、卵巣把握が困難な中期以降である152日目から7日間隔で本法を5回実施した個体では、最終採卵の20日後(妊娠200日目)に流産した。因果関係は明らかではないものの、これは黄体等に少なからず刺激が加わり、妊娠維持に悪影響を及ぼしたものと推察された。また、Looney et al<sup>13)</sup>は妊娠70~90日で、最も卵子の採取効率が高く、90日以降ではやや低下する傾向を認めている。

このことから、妊娠個体に対して、本法を適用する場合、採卵行為が困難で採取効率も低く、妊娠の継続が危ぶまれる中期以降ではなく、リスクの少ない前期での適度な回数の実施が望ましいと思われる。

また、本法の同一個体に対する反復供用については、同一個体で1クールあたり、7~14日間隔で1~10回の範囲で反復経膈採卵を実施したが、各個体とも回数を重ねることによる推定卵胞数および採取卵母細胞数の減少や品質の低下傾向は認められず、クール終了後には発情回帰も認められ、藤谷ら<sup>2)</sup>(7日間隔: 2~9回)、坂口ら<sup>19)</sup>(7日間隔: 2~3回、4日間隔: 4回)の報告と同様に供用前に比べて繁殖生理状況が、本法により悪化した個体も認めなかった。また、Hananberg et al<sup>17)</sup>は、3,4日間隔で本法を反復供用したところ、3日間隔でも他の区に劣ることなく卵母細胞が採取できる上に、移植可能な胚盤胞期胚への発育率では、むしろ勝る傾向が認められたことを報告しており、今回の最短7日という供用間隔については、さらに短縮することも可能である様に思われた。

今後は、本法の利用意義を一層広げるために、発情微弱個体、周期不定個体、発情周期は正常にも関わらず何らかの原因で受胎に至らないリピートブリーダー等、その優良遺伝資源が繁殖利用できない個体に対して、本法による胚生産の効率化を図ることが肝要となる。これに対して、経膈採卵に先立ってFSH製剤の3日間漸減投与が無処理のものより卵巣内卵胞数および採取卵子数、正常卵子数が多かったというGoodhand et al<sup>5)</sup>の報告のほか、同様にFSH投与の有効性が妊娠牛<sup>6,13)</sup>、老齢牛<sup>18)</sup>においても報告されている。この様なことから、薬剤利用も考慮にいれるべきなのかも知れないが、反面、FSH処理は回数を重ねると卵胞数は減少するが、無処置区ではその数が増加する傾向を認めたという報告<sup>20)</sup>もあり、薬剤不使用のメリットを鑑みながら、さらなる検討が必要である。

Ginther et al<sup>4)</sup>はホルスタイン種の未経産個体で、一発情周期において2~3回の卵胞波が観察できることを報告しているほか、Gibbons et al<sup>3)</sup>は、週2回の割合で本法を供用することにより、主席卵胞の発育を抑えることができる上に、小卵胞の発育が促され採取卵母細胞の数が多くなることを報告している。これらのことから、今後は、個体毎の卵胞発育動態を把握し、卵胞吸引の適正タイミングを考慮した採卵プログラムを作成することが肝要であると考え。

一般に卵母細胞への卵丘細胞の付着状況が、体外成熟および体外受精後の胚の正常な発生能に大きく影響し、付着状態が良好な卵母細胞を用いることが移植可能な胚盤胞期胚への発生率を向上させること<sup>2,10,11)</sup>が知られている。今回の培養結果による胚盤胞期胚も、A,Bランクの高品質な卵母細胞から得られたものであり、体外培養に供用する卵母細胞品質の重要性が確認された。一般に、と畜卵巣由来の卵母細胞とは異なり経膈採卵の場合、吸

引針から採取試験管までの吸引距離が長いために、吸引圧をある程度強くする必要のあることから、この圧による卵丘細胞の物理的剥離による卵母細胞の品質低下が危惧されている。Hasler<sup>9)</sup>は吸引圧を50mmHgから100mmHgに上げることで、卵母細胞周囲の卵丘細胞に有意なダメージを与えることを報告しており、今後は、卵母細胞の品質低下を招かない効率的な採取が可能な吸引圧の設定および装置の改良などが必要となる。

また、と畜卵巣では、品質の高い卵母細胞をある程度揃えた集合培養が可能であるのに対して、経膈採卵の場合、一度に採取できる卵母細胞数が少なく品質の低いものも供用せざるを得ない上、厳密な個体別培養が要求される。当所の培養系では、胚盤胞期胚への発育率では、と畜卵巣で約30%であったのに対して、経膈採卵全体では15%前後と劣る傾向が認められた(表6)。

表6 経膈採卵、と畜卵巣由来卵母細胞の培養胚発生率

区	基礎培地	培養法	供用 卵子数	胚 発 生 率 (%)		
				2 cell <sup>2)</sup>	8~16 cell <sup>3)</sup>	胚盤胞期胚 <sup>4)</sup>
<b>経膈採卵</b>						
I 区	M199	共培養 <sup>1)</sup>	57	38(66.7)	27(47.4)	11(19.3)
II 区	"	"	29	18(62.1)	9(31.0)	3(10.3)
I~II区	"	"	86	56(65.1)	36(41.9)	14(16.3)
I~IV区	"	"	97	61(62.9)	39(40.2)	14(14.4)
<b>と畜卵巣</b>						
	"	"	74	61(82.4)	49(66.2)	22(29.7)

※:1)卵丘-顆粒膜細胞との共培養(48hr毎半量の培地交換),その他の培養条件は39℃,5%CO<sub>2</sub> in Airとした。媒精日を0日として、2)2日目、3)3日目、4)7~9日目の成績を示す。

今回、卵母細胞の培養密度などを考慮せず、と畜卵巣由来の卵母細胞の集合培養と同様に、本法で得た卵母細胞を体外培養に供した。橋本ら<sup>9)</sup>により、卵丘細胞付着の乏しい卵母細胞に対して、体外成熟過程で培養液量に対する卵子密度を調整することにより、胚盤胞期胚への発育率が改善されることが報告されており、今後は、この様な本法由来卵母細胞の発生効率向上を目的とした体外培養系の改良も重要な課題となる。

引用文献

1) Bungartz L, A. Lucas-Hahn, D. Rath, H. Niemann. (1995), Theriogenology, 43 : 667-675  
 2) 藤谷(泰)・西村(和)・笠井(浩)・三溝(成)・藤田(耕)・内海(恭), 日畜会報(1995), 66(12): 1023-1030  
 3) Gibbons J. R, W. E. Beal, R. L. Krisher,

E. G. Faber, R. E. Pearson, F. C. Gwazdauskas. (1994.), Theriogenology, 42 : 405-419  
 4) Ginther O. J, L. Knoph, JP.Kastelic.(1989), J.Reprod. Fert, 87 : 223-230  
 5) Goodhand K. L, J. S. Broadbent, R. G. Hutchinson, M. E. Watt, M. E. Staines, L. C. Higgins.(1996), Theriogenology, 45 : 355  
 6) Guyader Joly. C, S. Ponchon, J. M. Thuard, M. Durand, M. Nibart, B. Marquant-LeGuienne, P. Humblot.(1997), Theriogenology, 47 : 157  
 7) Hanenberg. E. H. T. A, A. M. Van Wagtenonk-de Leeuw. (1997), Theriogenology, 47 : 158  
 8) 橋本(周)・長尾(慶)・佐伯(和)・清家(昇)・永井(政) (1996), 日本胚移植研究会誌, 18(3) : 206-210

- 9) Hasler, J. F. (1993), Proc. 12th Ann. Conv. A. E. T. A., 43-52
- 10) Jiang H. S, W. L. Wang, K. H. Lu, I. Gordon, C. Polge. (1991), Theriogenology, 35 : 216
- 11) 加藤(博)・細井(美)・内海(恭)・入谷(明) (1992), 繁殖技術会誌, 14(1): 20-28
- 12) 金(光)・三溝(成)・藤田(耕)・山田(雅)・内海(恭) (1995), 日本胚移植研究会誌, 17(1) : 1-5
- 13) Looney, C. R, B. R. Lindsey, D. J. Funk, G. S. Gue, D. C. Faher. (1993), Proc. 12th Ann. Conv. A. E. T. A., 53-61
- 14) Meintjes, M, M. S. Bellow, J. R. Broussard, J. B. Paul, R. A. Godke. (1993), Theriogenology, 39 : 266
- 15) 太田(均)・田崎(道)・猪八重(悟)・立山(昌)・川畑(孟)・山田(一)・内海(恭) (1991), 繁殖技術会誌, 13(2), 81-85
- 16) Pieterse, M. C, P. L. A. M. Vos, Th. A. M. Kruip, Y. A. Wurth, Th. H. Van Beneden, A. H. Willemse, M. A. M. Taverne. (1991), Theriogenology, 35 : 19-24
- 17) Reinders J. M. C, A. M. van Wagtendonk-de Leeuw. (1996), Theriogenology, 45 : 354
- 18) Riddell MG, Jr., R. L. Carson, K. P. Riddell, P. K. Galik, DA. Stringfellow. (1997), Theriogenology, 47 : 162
- 19) 坂口(真)・井口(光)・小林(直)・藤谷(泰)・三溝(成)・内海(恭) (1995), 日本胚移植誌, 17(2): 94
- 20) Stubbing R. B, J. S. Walton. (1995) Theriogenology, 45 : 354
- 21) 吉川(修)・松岡(清)・友田(誠)・田所(啓) (1993), 繁殖技術会誌, 15(3) : 171-175

Influence of Repeated Transvaginal Ultrasound-Guided Follicular Aspiration on Collection of Oocytes and Production of Embryos in Holstein-cows with Different Breeding Conditions.

SUMMARY

The Present study was designed to examine the influence of repeated transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration on collection of oocytes and production of embryos in cows with different breeding conditions. A 5MHz linear-transducer with needle (60cm length, 18G) connected to an ultrasound-guided scanner was used for the observation of follicles and follicular aspiration. Oocytes were collected from 12 cows with different breeding conditions (4 cows with normal estrous cycle : group I, 3 cows with disturbances of estrous cycle : group II, 2 pregnant cows : group III, 3 repeat breeder : group IV) by repeated aspiration using a transvaginal ultrasound-guided technique. Aspiration was performed within 7~ 14 days interval. The mean number of guessed follicles with 5mm > in diameter in two ovaries was significantly different between group I (6.7±2.8) and group II (4.1±2.7) (p<0.01). And the mean of total number of follicles was significantly different between group I (11.0±2.6) and group II (7.1±3.2) and between group I and group II (6.8±2.2) (p<0.01), but was not significantly different between group I and group III (9.1±3.8). The mean number of collected oocytes was not significantly different among every groups (group I : 2.3±1.9, II : 2.1±1.4, III : 1.3±1.0, IV : 1.0±1.0). Collected oocytes were generally surrounded by cumulus cells whose constituents were far more meager compared to those surrounding control oocytes obtained from slaughtered bovine ovaries, according to morphological examination. In the proportion of normal oocytes (oocytes completely surrounded with cumulus cells [rank A~B], oocytes partly denuded [rank C] and oocytes denuded [rank D] in collected all oocytes [rank A~F], group I (74.0%) and group II (75.7%) were higher than group III (66.7%) and group IV (62.5%). The proportion of oocytes of good quality [rank A~B/A~D] in group I (50.9%) was higher than that in other groups. In all experimental groups, detrimental effect of repeated aspiration that was performed within 7~ 14days interval (range 1~10/one cow), was not recognized. The proportion of development to the cleavage and blastocyst stages of transvaginally aspirated oocytes in group I (66.7%, 19.3%) and group II (62.1%, 10.3%) after in vitro maturation and fertilization was higher than that in group III (66.7%, 0%) and group IV (20.0%, 0%). When four embryos produced from oocytes in group I were transferred to four recipient heifers, one recipient was pregnant (25%), and delivered one calf (25%).

There results suggested that ultrasound-guided aspiration of follicles of bovine ovaries may be a useful procedure to collect oocytes repeatedly from the same individual and that individual with normal estrous cycle may be suitable for donors of this method.