

# 採卵間隔及び FSH 投与が乳牛の経膈採卵に及ぼす影響

福見 善之・笠井 裕明・後藤 充宏

## 要 約

超音波診断装置を用いた牛の経膈採卵法による効率的な卵胞卵子の回収を目的に、3～4日と7日間隔で連続経膈採卵の採卵成績について比較し、さらに採取率向上を図るためホルモン処置(FSH: アントリン)を行い、その採取卵数および体外受精後の発生率について検討した。供試牛は、当场繁養のホルスタイン種2頭を用い、採卵は、吸引針ガイドを装着した超音波診断装置(SSD-1200)を用い、17Gの吸引針で110mmHgの吸引圧で採取した。試験1では、3～4日と7日間隔で4週連続採卵をし、1周期休み供試牛を反転して4週連続採卵を行い、採卵成績等について比較検討した。試験2では、ホルモン処置により卵胞の発育を促し、確実に卵子を採取できるように総量20AUのFSHを漸減投与し7日間隔で4週連続採卵をし、試験1と同様に1周期休み供試牛を反転して4週連続採卵を行い、採取成績を比較検討した。対照区は無処置で7日間隔の連続採卵を行った。採取した卵子は、卵丘細胞の付着状態によりG1～6に分類し、FSH添加10%FCS-TCM199で38.5%、5%CO<sub>2</sub>、95%airの条件で22～24(h)成熟培養後、BO液(機能性ペプチド研究所: IFP963B)を用いたカフェイン-ヘパリン法で6時間媒精を行った。発生培養は、BSA-CR1aaを用い38.5%、5%CO<sub>2</sub>、90%N<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub>の条件で培養し、胚盤胞期胚への発生率について検討を行った。試験1では、採卵間隔を3～4日また7日とした場合の採卵成績について比較した結果、卵子吸引率は3～4日区で39.6%、7日区で38.2%、正常卵率は77.4%、57.9%、胚盤胞期胚への発生率は、9.2%、24.2%であり、3～4日区において回収卵子数および卵子の品質が高まるものの7日区が胚盤胞期胚への発生率が高くなる傾向であった。試験2では、FSH処置区と無処置の採卵成績について比較した結果、卵子の回収率はFSH処置区で41.5%、無処置区で33.1%、正常卵率83.7%、71.8%、胚盤胞期胚への発生率は、14.6%、53.6%であり、FSH処理により回収卵子数および卵子の品質が高まるが、無処置区のほうが胚盤胞期胚への発生率が高くなる傾向であった。

## 目 的

現在、牛受精卵移植に利用される胚は、過剰排卵処世後、人工授精を施した後、子宮灌流により回収する方法が一般的であり、フィールドで普及している。しかし、この方法では個体毎の反応性にばらつきがあり、また採取できる時期が限定されるなど受精卵の採取卵数に限界がある。近年、オランダのPieterseetal<sup>1)</sup>により超音波診断装置を用いて経膈的に牛生体の卵巢内小卵胞から未受精卵子を採取し、

体外受精技術により子牛を誕生させて以来，新たな子牛作出技術として注目されるようになった。当場においても平成7年度にこの技術を利用して子牛の生産に成功して以来，この技術の実用化に向け乳牛を用いてデータの蓄積を行っている。本試験は，超音波診断装置を用いた経膈採卵による効率的な卵胞卵子の回収を目的に，3～4日間隔(週2回)と7日間隔(週1回)で連続経膈採卵の採取成績について比較検討し，さらに採取率向上を図るためホルモン処置を行い，その採卵成績および体外受精後の発生率について比較検討を行い，若干の知見を得たので報告する。

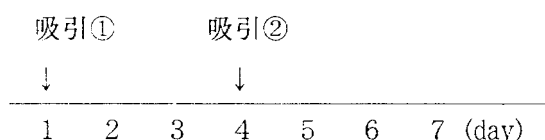
## 材料及び方法

### 【試験1】

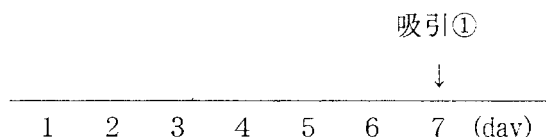
#### (1) 経膈採卵

供試牛は，当場繋養の繁殖生理状況の異なるホルスタイン種2頭を用い，性周期に関係なく3～4日間隔(週2回)採卵を試験区Ⅰ，同様に7日間隔(週1回)採卵を試験区Ⅱとして4週間連続経膈採卵を実施し，1周期休み試験区Ⅰ・Ⅱの供試牛を反転して同様に4週経膈採卵を行った(図1)。

#### 試験区Ⅰ(供試牛A)



#### 試験区Ⅱ(供試牛B)



4週間終了後，1周期休み供試牛A・Bを反転

図1 採卵方法

卵子吸引装置は超音波診断装置(SSD-1200:ALOKA)，採卵針ガイドを取り付けた7.5MHzのコンベックス型探触子(UST-994P-5:ALOKA)，吸引ポンプおよび17Gのone-Way採卵針(富士平工業)を用いた。吸引方法は，供試牛を柵場内に保定後，直腸内の糞を除去し，尾椎麻酔を行い外陰部の消毒を行った後，膈に探触子を挿入し，卵子の吸引前に卵巣の超音波断層像で卵胞の確認を行い，卵巣中の卵胞数(3～5mm：小卵胞，6～9mm：中卵胞，10mm以上：大卵胞に分類)を数え，推定卵胞数とし，吸引圧110mmHgで採取した(図2)。還流液には，ハルゼン液(乳酸加リンゲル液)に血清，ヘパリン，抗生物質を添加したものをを用いた。

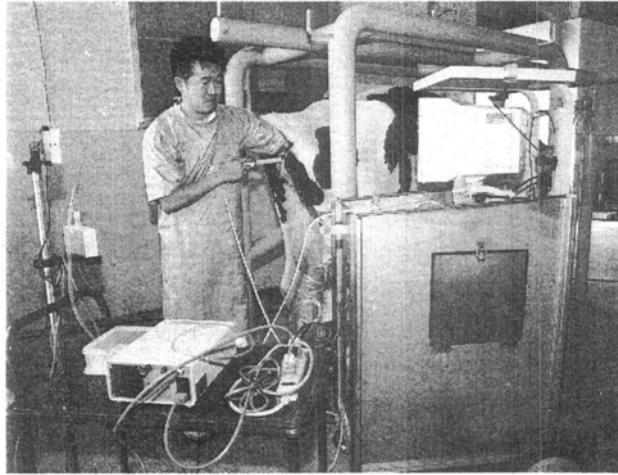


図 2 経膈採卵風景

(2) 採取卵子の処理と成熟培養

採取した卵子は，ハルゼン液で濾過洗浄した後，シャーレに個体毎に集卵し顕微鏡下で卵子の形態的特徴の観察を行い，坂口ら<sup>5)</sup>の基準に従って卵丘細胞の付着状態により G1 から G6 に分類を行い，G1 から G3 までの卵子を正常卵子として体外受精に供試した(図 2)。

ランク	形態的特徴
G 1	卵丘細胞が 4 層以上付着
G 2	卵丘細胞が 1 ～ 3 層
G 3	卵丘細胞の付着が卵子の周囲 1 / 3 以下
G 4	裸化卵子
G 5	周囲の卵丘細胞が
G 6	変性卵子

図 2 採取卵子の形態的分類

採取卵子の成熟培養は，FSH 添加 10%FCS-TCM199 で 100  $\mu$ l ドロップ中 38.5 ，5%CO<sub>2</sub>，95%air の条件下で 22 ～ 24 時間培養した。

(3) 体外受精，発生培養

体外受精には同一種雄牛の凍結精液を用いた。精子の授精能獲得はカフェイン及びフェパリンを添加した BO 液(機能性ペプチド研：IFP963B)を用い，精子濃度を 500 万 / ml に調製を行い，精子浮遊液 100  $\mu$ l ドロップを作製し，卵子導入後 38.5 ，5%CO<sub>2</sub>，95%air，の条件下で 6 時間媒精処理を行った。発生培養は 媒精終了した卵子を添加した CR1aa の培養液から 100  $\mu$ l ドロップを作製し 38.5 ，5%CO<sub>2</sub>，90%N<sub>2</sub>，5%O<sub>2</sub>の条件下で培養し，媒精後 48 時間目に分割率を調査し，7 ～ 8 日目に胚盤胞

期胚への発生率について比較検討した。

【試験 2】

試験 1 と同一の供試牛 2 頭を用い、採取率向上を目的にホルモン処置を行い、7 日間隔(週 1 回)で 4 週間連経膈続採卵を行ったものを試験区 I、対照区として同時期に性周期に関係なく無処置により 7 日間隔で採卵を行ったものを試験区 II として試験 1 と同様に供試牛を反転して比較検討した。

ホルモン処置法は、図 3 に示すように、性周期の 5 日目に直径 8mm 以上の卵胞を優性卵胞(dominant follicle 以下 DF)とみなし、卵胞穿刺により吸引除去した。さらに、PGF2 類縁体制剤(エストラメイト：住友化学)により黄体を退行させ人為的に黄体のコントロールを行い、発情を抑制することを目的として膈内挿入型プロゲステロン(CIDR)を膈内に挿入留置した。この日を処理日 0 日とし、2 日目から合計 20 単位の FSH(アントリン：デンカ製薬)を 3 日間朝夕 2 回漸減投与した。FSH 最終投与の翌日に第 1 回目の経膈採卵を実施。さらにその 3 日目に優性卵胞を吸引除去し、同様に 3 日間ホルモン処置を行い最終投与日の翌日に 2 回目の採卵を行った。3 回目以降は、2 回目採卵の繰り返しで計 4 回行った。

また、その時の卵子吸引装置、回収液、分類、体外受精、培養方法等については試験 1 と同様に行い、分割率および胚盤胞期胚への発生率について比較検討した。

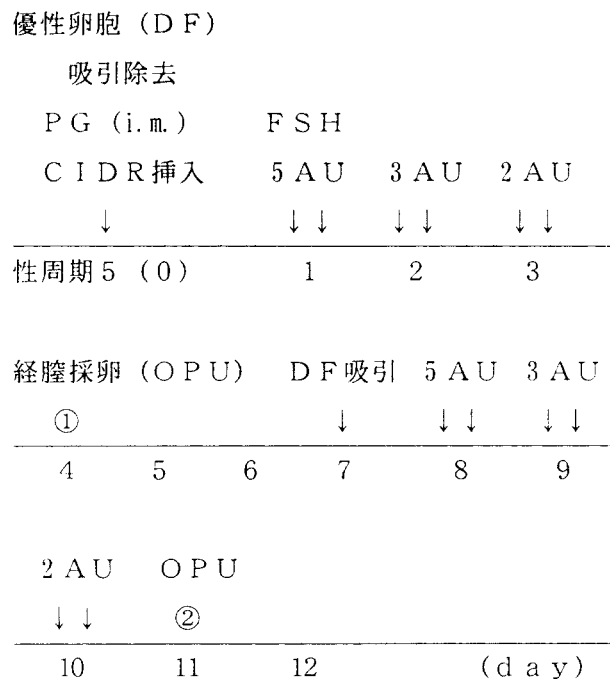


図 3 FSH 処置方法

結 果

【試験 1】採卵間隔が経膈採卵に及ぼす影響

2頭の供試牛から3～4日間隔(週2回)と7日間隔(週1回)連続経膈採卵を行った採卵成績を表1に示した。

採取卵子の総計は、試験区Iにおいて84個、試験区IIにおいて57個であり、採取率はそれぞれ38.2%(84/220)、39.6%(57/144)とあまりかわらなかった。しかし、1回当たりの採取卵数は、試験区I、IIにおいて7.1個、5.2個であり、3～4日間隔(週2回)採卵を行うことで、採取卵数が7日間隔(週1回)採卵より1週間あたりに採取される卵子が増加する傾向にあった。

表1 採卵間隔における採取卵数及び採取率

	試 験 区	
	I	II
供 試 牛	2	2
採 卵 間 隔	3～4日間隔	7日間隔
採 卵 回 数	16	8
推 定 卵 胞 数	220	144
採 取 卵 数	84	57
採 取 率 (%)	38.2	39.6

卵子の品質を卵丘細胞の付着状態等で6段階に分類した結果を表2に示した。試験区I、IIにおける正常卵子数は、84個、57個、正常卵率は、77.4%(65/84)、57.9%(33/57)であり、3～4日間隔(週2回)採卵において、採取卵子数が多いほど正常卵子数も多く、また正常卵率も高くなる傾向にあった。

表2 採取卵子の品質

( ラ ン ク )	試 験 区	
	I	II
	3～4日間隔	7日間隔
G 1	28	18
G 2	28	13
G 3	9	2
G 4	5	7
G 5	7	11
G 6	7	6
採 取 卵 数	84	57
正 常 卵 数	65	33
正 常 卵 数 (%)	77.4	57.9

体外受精の成績を表3に示した。採取率および正常卵率の高かった試験区Iにおいて供試胚65個について体外受精を行ったところ、分割率18.5%(12/65)、胚盤胞期胚発生率9.2%(6/65)であり、試験区IIの分割率39.4%(13/33)および胚盤胞期胚発生率24.2%(8/33)に比べ、低い発生率であった。

表3 採取卵子の胚盤胞期胚発生率

	試験区		対照区
	I	II	
供試卵数	65	33	200
分割卵数	12	13	102
分割率(%)	18.5	39.4	51.0
Blast数	6	8	68
Blast発生率(%)	9.2	24.2	34.0

【試験2】FSH投与方法が経膈採卵に及ぼす影響

FSH処置と無処置における2頭の供試牛から週1回連続経膈採卵を4週間行った採卵成績を表4に示した。採取卵子の総計は、FSH処置区49個、無処置区39個であった。採取率については、それぞれ41.5%(49/118)、33.1%(39/118)であった。また、1回あたりの採取卵子数は6.1個、4.9個であり、FSH処置により卵胞を発育させることによって回収卵子数が増加する傾向にあった。

表4 FSH処置による採取卵数及び採取率

	試験区	
	I	II
供試牛	2	2
処置	FSH処置	無処置
採卵回数	8	8
推定卵胞数	118	118
採取卵数	49	39
採取率(%)	41.5	33.1

採取卵子の品質を試験1と同様に分類し、表5に示した。試験区I、IIにおける正常卵子数は、41個、28個、正常卵率は、83.7%(41/49)、71.8%(28/39)であり、FSH投与区において採取率および正常卵率が向上する傾向であった。

表6に採取卵子の体外受精の成績を示した。FSH処置区における供試胚41個について体外受精を行ったところ、分割率36.6%(15/41)胚盤胞期胚発生率14.6%(6/41)であり、無処置区における分割率92.8%(26/28)、胚盤胞期胚発生率53.6%(15/28)に比べ低い発生率を示し、FSH投与により採取

率および正常卵率が向上するものの体外受精後の発生率においては低くなる傾向であった。

表5 採取卵子の品質

	試 験 区	
	I	II
( ラ ン ク )	3～4日間隔	7日間隔
G 1	28	18
G 2	28	13
G 3	9	2
G 4	5	7
G 5	7	11
G 6	7	6
採 取 卵 数	84	57
正 常 卵 数	65	33
正 常 卵 数 (%)	77.4	57.9

表6 採取卵子のBlast発生率

	試 験 区	
	I	II
供 試 卵 数	41	28
分 割 卵 数	15	26
分 割 率 (%)	36.6	92.8
B l a s t 数	6	15
B l a s t 発 生 率 (%)	14.6	53.6

## 考 察

### 【試験1】

近年、超音波診断装置を用いた経膈採卵により牛生体内から卵胞卵子採取および体外受精により、胚生産の困難な牛からも胚の作出することが可能になり、現在、効率的な卵子採取方法および採取卵子の体外受精技術の向上について検討されている。試験1では、効率的な卵子の採取間隔について、3～4日間隔(週2回)、7日間隔(週1回)で連続経膈採卵を行い採卵成績について検討した。Gibbon et al<sup>11)</sup>は、週2回の割合で採卵を行うことにより、優性卵胞の発育を抑えることができ、小卵胞の発育が促され採取卵母細胞数が増えることを報告しており、最近の報告でも週1回採卵よりも2回採卵の方

が多く卵子を回収できることが明らかになっている。今回の試験結果からも週2回採卵を行うことにより週1回採卵よりも、多く卵子を回収することができ、また採取卵子の正常卵率も週1回採卵で採取した卵子よりも正常卵率が高かった。Walton et al<sup>18)</sup>は、3~4日の短期間の吸引間隔での高頻度の吸引により、卵胞由来のインヒビンの分泌が抑制され、FSHの分泌が増加し、卵胞数が増加することを報告しており、経膈採卵の反復による卵胞液の吸引により、卵胞が刺激され卵巣が活性化され卵胞数が増加されたと考えられた。

さらに、採取卵子の体外受精後の発生率について検討した。Hanenberg et al<sup>14)</sup>は、採卵間隔7日から3・4日に短縮しても7日間隔と同等の移植可能な胚盤胞期胚を作出できることを報告しており、これらのことから週2回採卵を行うことにより週1回採卵より多くの胚盤胞期胚への発生率を期待したが、週1回採卵の方が胚盤胞への発生率が高い傾向であった。

以上のことから、今回の経膈採卵成績では、採卵間隔を週2回行うことにより、採取卵数および正常卵率が高まるものの、胚盤胞への発生率は低くなる傾向であった。

## 【試験2】

経膈採卵の反復により多数の卵子を回収することが可能になり、過剰排卵処置を必要とせずに長期間連続して卵子を採取できるようになった。最近、過剰排卵処置の前に卵巣内の優性卵胞(DF)を取り除くことにより回収胚数が増加する報告<sup>15,16)</sup>があり、今回、性周期の5日目に超音波モニター上で直径8mm以上の卵胞をDFと見なし、吸引除去をして小卵胞数を増やし、採取卵子数を増加させることを目的に、超音波モニター上で識別しづらい小卵胞をFSH投与により発育させ、採取率向上を図り、採取卵子の品質および体外受精後の発生率について検討した。

Goodhand et al<sup>12)</sup>は、経膈採卵に先立ちFSH製剤の3日間の漸減投与が無処置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報告のほか、同様にFSH投与の有効性が妊娠牛<sup>7,13)</sup>、老齢牛<sup>17)</sup>においても報告されている。試験2では、FSH処置を行い週1回間隔で採卵を行うことにより、採取卵数および正常卵率の向上が見られた。Ooe et al<sup>10)</sup>は、優性卵胞のない場合の方が、推定卵胞数・採取卵子数が多いことを報告しており、今回の採取率向上の要因として優性卵胞の吸引除去後のFSH投与による効果が考えられた。しかし、FSH処理により週1回の吸引で、3,4日間隔(週2回)吸引ほどの卵子の吸引数は認められなかった。

また、FSH処置により卵胞の大きさが増加し吸引卵子数が増えるが、5mm以上の中卵胞が反応し大きくなるのみで、5mm以下の小卵胞においては、反応は認められなかった。さらに、反応を示した中卵胞から吸引された大半の卵子における体外受精後の胚盤胞期胚への発生率は、無処置区に比べ有意に低く、FSH前処置をする場合の体外受精系、特に成熟培養方法について検討する必要があると考えられた。また、FSH処理は回数を重ねることにより卵胞数が減少し、無処置区のほうが多く採取できる報告<sup>6)</sup>もあり、今回の原因としてFSH投与方法についてさらに検討を行う必要があることも考えられた。現在ホルモン処理により、卵子の成熟および卵胞発育との間に不一致が生じ、体外受精成績が悪くなるという報告があり、FSH処置後の卵胞の大きさ<sup>8)</sup>、最終FSH処置から卵子採取までの期間<sup>9)</sup>



等多くの検討がされている。今回、FSH 処置により採取した卵子は卵丘細胞の付着状態による形態的特徴により分類を行ったのみで、卵子の発育ステージ等についての核相検査を実施していないため、今後、FSH 処置により採取された卵子の核相検査を実施することにより、卵子の発育ステージの確認を行い、FSH 処置により効率的な体外受精卵作出方法について検討を行いたい。

## 参考文献

- 1) 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. *Theriogenology* 1991;35:19 ~ 24.
- 2) 小鴨 陸, 福尾憲久, 生田健太郎, 廣崎里麻 FSH 投与量および投与方法が乳牛の超音波誘導経膈採卵に及ぼす影響 兵庫農技研報(畜産)1999;35:35 ~ 40.
- 3) 藤谷泰裕, 大谷新太郎, 小南成広, 武内美穂 繁殖障害牛における卵母細胞の経膈採卵大阪 農技セ研報 1997;33:48 ~ 53.
- 4) 青木義和, 三溝成樹, 藤田 耕, 藤谷泰裕, 内海恭三 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 滋賀 畜技セ研報 1998;5:1 ~ 6.
- 5) 坂口(真), 井口(光), 小林(直), 藤谷(泰), 三滝(成), 内海(恭)1995;17:2.
- 6) Stubbing R. B, J.S. Walton *Theriogenology* 1995;45:354.
- 7) Looney. C. R, B. R. Lindsey, D. J. Funk, G. S. Gue, D. C. Fahar. *Proc. 12th Ann. Conv. A. E. T. A.* 1993:53 ~ 61.
- 8) Blondin, P. K. Coenen, L. A. Guilbault and M. A. Sirard Superovulation can reduce the developmental competence of bovine embryos *Theriogenology* 1996;46:1191 ~ 1203.
- 9) Blondin, P., L.A. Guilbault and M.-A. Sirard The time interval between FSH -Padmini st ration and slaughter can influence the developmental competence of beef heifer oocytes *Theriogenology* 1997;48:803 ~ 813.
- 10) Ooe, M., R. Rajamahendran, A. Boediono and T. Suzuki Ultrasound - guided follicle aspiration and IVF in dairy cows treated with FSH after removal of estrus cycle *J Vet Med Sci.* 1997 ; 59 : 371 ~ 376.
- 11) Gibbons J. R, W. E. Beal, R. L. Krisher, E. G. Faber, R. E. Pearson, F. C. Gwazdauskas. *Theriogenology.* 1994 ; 42 : 405 ~ 419.
- 12) Goodhand K. L J. S. Broadbent, R. G. Hutchinson, M. E. Watt, M. E. Staines, L.C. Higgins, *Theriogenology* 1996 ; 45 : 355.
- 13) Guyader Joly. C, S. Ponchon, J. M. Thuard, M. Durand, M. Nibart, B. Marquant LeGuienne, P. Hemblot *Theriogenology* 1997 ; 47 : 157.
- 14) Herenberg. E.H.T.A, A.M. Van Wagtenonk de Leeuw. *Theriogenology* 1997;47:158.
- 15) 吉羽宣明, 高田新一郎 牛の過剰排卵処理開始時の大型卵胞吸引除去が採卵成績に及ぼす影響 埼玉畜セ研報 1997;1:7 ~ 10.
- 16) 吉羽宣明, 高田新一郎 性周期後期の大型卵胞吸引除去が牛過剰排卵処理ならびに採卵成績に及ぼ

す影響 埼玉研報 1999;3:1 ~ 6.

- 17) Riddell MG, Jr. , R. L. Carson, K. P. Riddell , P. K. Galik, DA. Stringfellow. Theriogenology1997 ; 47 : 162.
- 18) Walton, JSS., Christie, NA. , and S tubbings, RB. Evaluation of frequency of ul trasonically guided follicle aspiration on ovarian dynamics. Theriogenology1993 ; 39 : 336. Abst.