

1. 第一卵胞波からの過剰排卵処理法の検討

研究開発第二課 中島岳人・麻植香菜子・河野仁・武平有理子・朝倉康夫

要 約

本試験では、Flex-Synch 法を用い、第一卵胞波から過剰排卵処理（FSH 皮下 1 回投与）を実施することによって採胚成績が向上するか検討した。試験 1 では、CIDR 挿入と同時に PGF2 α を投与、その後 CIDR を抜くことにより発情を誘起させ（Flex-Synch 法）、第一卵胞波をターゲットとして過剰排卵処理を行う試験区と、CIDR 挿入と同時の PGF2 α 投与及びその後の GnRH 投与により卵胞波調整を行った後、CIDR 挿入中に過剰排卵処理を行う対照区について、採胚成績から比較した。結果、試験区が黄体数 13.7、採胚総数 4.3、正常胚数 1.3、正常胚率 30.8%に対し、対照区が黄体数 15.3、採胚総数 6.0、正常胚数 2.7、正常胚率 44.4%であり、A+A' ランクの胚数が試験区で 1.0、対照区で 1.3、B ランクの胚数が試験区で 0.3、対照区で 1.3 と、試験区が対照区より劣る傾向が見られた。その原因として試験区における FSH 感作時の低プロゲステロン濃度が影響を与えている可能性が考えられたため、試験 2 として、Flex-Synch 法による卵胞波調整に加え、FSH 感作時のプロゲステロンを補うことで、採胚成績が改善するか検討を行った。試験 2 では、Flex-Synch 法により発情を誘起した後、CIDR を再度挿入し過剰排卵処理を行う試験区と、試験 1 と同様の対照区を比較した。結果、採胚成績では試験区が黄体数 9.7、採胚総数 4.3、正常胚数 2.3、正常胚率 53.8%に対し、対照区が黄体数 13.3、採胚総数 7.7、正常胚数 4.3、正常胚率 56.5%であり、黄体数、回収胚数、正常胚数において試験区が対照区よりも劣る傾向であったが、正常胚率において試験は対照区と同等であり、A+A' ランクの胚数においては試験区で 2.3、対照区で 2.3 と差はなかった。試験 1 は 1、2 回目の採胚、試験 2 は 3、4 回目の採胚であるため、結果の直接的な比較はできないものの、試験 2 の試験区において正常胚率と胚ランクが改善された可能性が考えられた。従って、Flex-Synch を用いた第一卵胞波からの過剰排卵処理法において、過剰排卵処理時に CIDR を再度挿入しプロゲステロンを補うことにより、胚の品質が高まる可能性が示唆された。しかし試験 2 でも、卵胞発育・採胚時黄体数・採胚総数等の採胚成績において、試験区が対照区に及ばなかったことから、過剰排卵処理時の低プロゲステロン濃度以外の採胚成績を低下させる要因について検討する必要があると考えられる。

緒 言

ウシの体内胚生産において卵胞刺激ホルモン（以下 FSH とする）の漸減投与法による過剰排卵処理は、注射回数が多く牛へはストレスとなり人へは作業負担がかかり、これらの軽減が長年の課題になっていた。近年、当県が参加する共同研究グループは生理食塩水を溶媒とした FSH 皮下 1 回投与法が漸減投与法と同等の採胚成績を得られることを報告した^{1,2,3)}。

黒毛和種牛の過剰排卵処理における採胚成績は、FSH 投与前に大卵胞を消失させ卵胞波の調整を行うことで向上することが知られている^{4,5)}。

当県が参加する共同研究グループでは従来、卵胞波の調整を E2 で行ってきたが、欧州では E2 の使用が禁止となっており日本においても今後使用できるか不透明であることから、E2 を使用しない卵胞波調整方法を検討してきた。検討の結果、CIDR 挿入と同時に PGF2 α を投与することで主席卵胞を形

成させ、その7日後のGnRH投与により排卵させる卵胞波調整法により、E2を用いた卵胞波調整法と同等の採胚成績を得た⁶⁾。

そこで本試験では、さらなる卵胞波調整効果を期待し、第一卵胞波からFSH皮下1回投与方法による過剰排卵処理を実施することによって採胚成績が向上するか検討した。今回、第一卵胞波から過剰排卵処理を実施する方法として、CIDR挿入と同時にPGF2 α を投与、その後CIDRを抜くことにより2日後に高率に発情を誘起させるFlex-Synch法を用いた。

なお、本試験は8府県との共同研究として行っており、当報告は当県のデータのみの報告である。

試験1：Flex-Synch法を利用した第一卵胞波からの過剰排卵処理方法の検討（1）

材料及び方法

1. 方法

・試験区：発情後5日目以降に超音波検査により黄体を確認（黄体が確認できない場合は処理中止）した後、膈内留置型プロゲステロン徐放剤（CIDR）を挿入し、同時にPGF2 α （エストラメイト：株式会社インターベット）3mlを投与した。CIDR挿入日を0日目として5日目午前中にCIDRを抜去することで発情を誘起し、7日目午前中にGnRH（イトレリン：あすか製薬株式会社）1.25mlを投与した。10日目午前中に生理食塩水50mlに溶解したFSH（アントリンR10：共立製薬株式会社）20AUを頸部皮下に1回投与した。12日目午前中にPGF2 α を3ml投与し、13日目午後16:00にGnRH2.5mlを投与した。14日目午後16:00に定時AI、21日目午前中に採胚した。

・対照区：発情後5日目以降に、CIDRを挿入し、同時にPGF2 α 3mlを投与した。CIDR挿入日を0日目として7日目午後16:00にGnRH1.25mlを投与し、10日目午前中に生理食塩水50mlに溶解したFSH20AUを頸部皮下に1回投与した。12日目午前中にCIDRを抜去しPGF2 α を3ml投与、13日目午後16:00にGnRH2.5mlを投与した。14日目午後16:00に定時AI、21日目午前中に採胚した（図1）。

● 試験区

Day	0	5	7	10	12	13	14	21
午前 (9:00)	CIDR 挿入 PG(3ml)	CIDR 除去	GnRH (1.25ml)	FSH (20AU/50ml)	PG (3ml)			採胚
午後 (16:00)						GnRH (2.5ml)	AI	

● 対照区

Day	0	5	7	10	12	13	14	21
午前 (9:00)	CIDR 挿入 PG(3ml)			FSH (20AU/50ml)	CIDR 除去 PG(3ml)			採胚
午後 (16:00)			GnRH (1.25ml)			GnRH (2.5ml)	AI	

図1 採胚プログラム

2. 供試牛

当センターで繋養している黒毛和種経産牛3頭を2つのグループに分け各区1回ずつ供試し、計6回採胚を行い、それぞれの採胚間隔は63日以上とした(表1)。

- ・グループA： 対照区-試験区
- ・グループB： 試験区-対照区

表1 供試牛

牛番号	B201	B225	W145
生年月日	H23.11.2	H28.3.5	H19.11.6
産歴	2	1	5
最終分娩日	H28.1.17	H30.2.4	H30.3.5
過去の平均正常胚数	4.4	今回初採卵	6.1
グループ	A	A	B

3. 調査項目

採胚成績においては採胚時に採胚総数、正常胚数、変性胚数、未受精卵数、採胚時黄体数、遺残卵胞数を記録し、実体顕微鏡による形態学的な卵質調査を行った。正常胚の品質および変性胚、未受精卵の判定は「胚の衛生的取扱いマニュアル」の「胚の品質コード」に準じて行った⁷⁾。

また卵巣所見はCIDR挿入時、及びFSH投与時から21日目の採胚日まで毎日、超音波画像診断装置(日立メディコ 本体; ECHOPAL II、プローブ; EUP-033(7.5MH))により黄体数及び卵胞発育調査を行った。卵胞は直径により10mm以上を大卵胞、6~9mmを中卵胞、5mm以下を小卵胞と区分して記録した。なお、供試数が少ないため統計処理については行わなかった。

結 果

採胚成績では試験区が黄体数13.7、採胚総数4.3、正常胚数1.3、正常胚率30.8%に対し、対照区が黄体数15.3、採胚総数6.0、正常胚数2.7、正常胚率44.4%であり、試験区では対照区よりも正常胚率が劣る傾向であり、採胚総数等その他の項目も試験区で若干低い結果となった(表2)。また胚質成績においてもA+A'ランクの胚数が試験区で1.0、対照区で1.3、Bランクの胚数が試験区で0.3、対照区で1.3と、試験区が劣る傾向となった(表3)。

卵胞発育ではAI時の大卵胞数は試験区で8.7、対照区で15.0と、試験区で発育が劣る傾向となった(図2)。

表2 採胚成績(平均 n=3)

	黄体数	遺残卵胞数	採胚総数	正常胚数	変性胚数	未受精卵数	正常胚率
試験区	13.7	1.3	4.3	1.3	2.3	0.7	30.8%
対照区	15.3	6.0	6.0	2.7	2.3	1.0	44.4%

表3 胚質成績 (平均 n=3)

	A	A'	A+A'	B	C
試験区	0.0	1.0	1.0	0.3	0.0
対照区	0.7	0.7	1.3	1.3	0.0

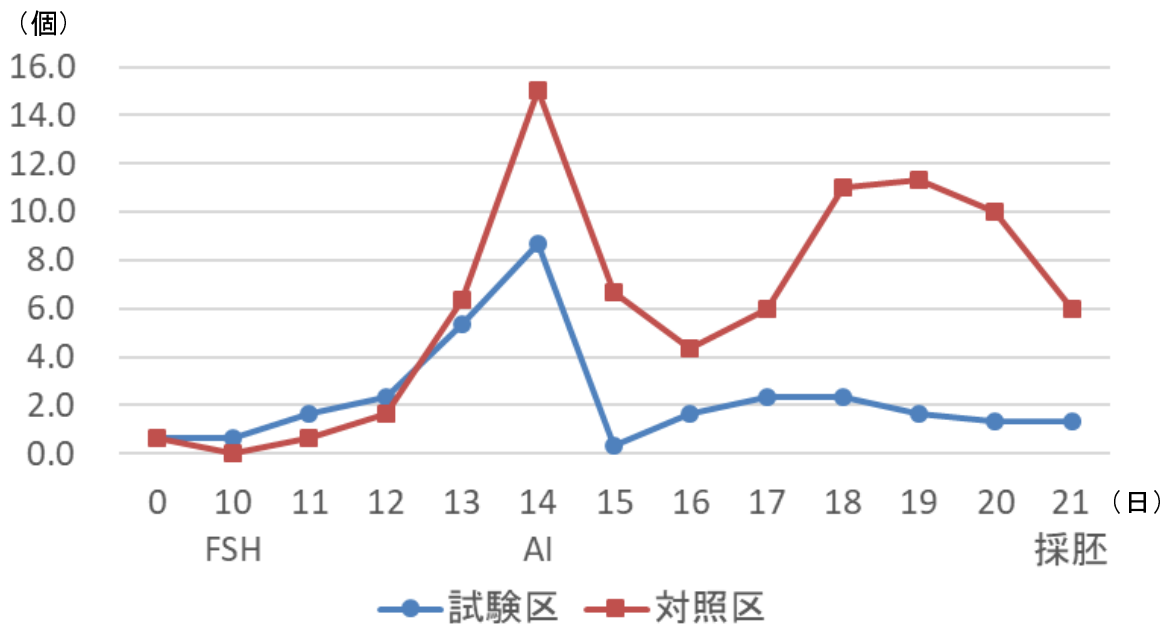


図2 大卵胞数の推移

考 察

試験1では Flex-Synch 法により卵胞波を調整し、第一卵胞波から過剰排卵処理を実施したが、採胚成績・胚質成績・卵胞発育成績のほぼ全てにおいて試験区が対照区より劣る傾向が見られた。

対照区は CIDR 挿入中に過剰排卵処理を開始しているのに対して、試験区は CIDR 除去により発情を誘起してから第一卵胞波に過剰排卵処理を開始するというプログラムになっており、試験区ではその CIDR 抜去により FSH 感作時のプロジェステロン濃度が対照区と比べて低値になっていると考えられる。排卵数が多い群は FSH 開始時の血漿中 E2/P4 比が低い傾向があるという報告⁸⁾や、低い P4 濃度下で卵胞発育が起きた場合、胚の品質が低下するという報告⁹⁾があることから、今回の試験区における FSH 感作時の低プロジェステロン濃度が採胚成績や胚質成績に影響を与えている可能性が考えられた。

試験2：Flex-Synch法を利用した第一卵胞波からの過剰排卵処理方法の検討（2）

材料及び方法

1. 方法

試験1では Flex-Synch 法により卵胞波を調整し、第一卵胞波から過剰排卵処理を実施したが、採胚成績・胚質成績・卵胞発育成績のほぼ全てにおいて試験区が対照区より劣る傾向が見られた。その原因

として、試験区では過剰排卵処理開始前の CIDR 抜去による FSH 感作時の低プロジェステロン濃度が影響している可能性が考えられた。このことから、Flex-Synch 法による卵胞波調整に加え、過剰排卵処理時に CIDR を再度挿入し FSH 感作時のプロジェステロンを補うことにより、採胚成績が改善するか検討を行った。

・試験区：発情後 5 日目以降に超音波検査により黄体を確認（黄体が確認できない場合は処理中止）した後、CIDR を挿入し、同時に PGF2 α 3ml を投与した。CIDR 挿入日を 0 日目として 5 日目午前 CIDR を抜去することで発情を誘起し、7 日目午前 GnRH 1.25ml を投与した。10 日目午前 CIDR を挿入し、生理食塩水 50ml に溶解した FSH 20AU を頸部皮下に 1 回投与した。12 日目午前 CIDR を抜去し PGF2 α を 3ml 投与、13 日目午後 GnRH 2.5ml を投与した。14 日目午後定時 AI、21 日目午前採胚した。

・対照区：発情後 5 日目以降に、CIDR を挿入し、同時に PGF2 α 3ml を投与した。CIDR 挿入日を 0 日目として 7 日目午後 GnRH 1.25ml を投与し、10 日目午前生理食塩水 50ml に溶解した FSH 20AU を頸部皮下に 1 回投与した。12 日目午前 CIDR を抜去し PGF2 α を 3ml 投与、13 日目午後 GnRH 2.5ml を投与した。14 日目午後定時 AI、21 日目午前採胚した（図 3）。

● 試験区

Day	0	5	7	10	12	13	14	21
午前 (9:00)	CIDR 挿入 PG(3ml)	CIDR 除去	GnRH (1.25ml)	CIDR 挿入 FSH (20AU/50ml)	CIDR 除去 PG (3ml)			採胚
午後 (16:00)						GnRH (2.5ml)	AI	

● 対照区

Day	0	5	7	10	12	13	14	21
午前 (9:00)	CIDR 挿入 PG(3ml)			FSH (20AU/50ml)	CIDR 除去 PG(3ml)			採胚
午後 (16:00)			GnRH (1.25ml)			GnRH (2.5ml)	AI	

図 3 採胚プログラム

2. 供試牛

試験 1 で供試した黒毛和種経産牛 3 頭を引き続き同じグループ分けで使用した。試験 2 では下記のように試験 1 における試験区および対照区の処理順を逆転して各区それぞれ 1 回ずつ供試し計 6 回採卵を行い、それぞれの採卵間隔は 63 日以上とした (表 4)。

- ・グループ A： 試験区－対照区
- ・グループ B： 対照区－試験区

表 4 供試牛

牛番号	B201	B225	W145
生年月日	H23.11.2	H28.3.5	H19.11.6
産歴	2	1	5
最終分娩日	H28.1.17	H30.2.4	H30.3.5
過去の平均正常胚数	4.4	今回初採卵	6.1
グループ	A	A	B

3. 調査項目

採卵成績においては採卵時に採卵総数、正常胚数、変性胚数、未受精卵数、採卵時黄体数、遺残卵胞数を記録し、実体顕微鏡による形態学的な卵質調査を行った。正常胚の品質および変性胚、未受精卵の判定は「胚の衛生的取扱いマニュアル」の「胚の品質コード」に準じて行った⁷⁾。

また卵巣所見は CIDR 挿入時、及び FSH 投与時から 21 日目の採卵日まで毎日、超音波画像診断装置 (日立メディコ 本体; ECHOPAL II、プローブ; EUP-033(7.5MH)) により黄体数及び卵胞発育調査を行った。卵胞は直径により 10mm 以上を大卵胞、6~9mm を中卵胞、5mm 以下を小卵胞と区分して記録した。なお、供試数が少ないため統計処理については行わなかった。

結 果

採卵成績では試験区が黄体数 9.7、採卵総数 4.3、正常胚数 2.3、正常胚率 53.8% に対し、対照区が黄体数 13.3、採卵総数 7.7、正常胚数 4.3、正常胚率 56.5% であり、黄体数、回収胚数、正常胚数において試験区が対照区よりも劣る傾向であったが、正常胚率において差はほとんど見られなかった (表 5)。

また胚質成績では、B ランクの胚数が試験区で 0.0、対照区で 2.0 と試験区が少ない結果となったものの、A+A' ランクの胚数は試験区で 2.3、対照区で 2.3 と差はなかった (表 6)。

卵胞発育では AI 時の大卵胞数は試験区で 5.3、対照区で 12.3 と、試験区で発育が劣る結果となった (図 4)。

表 5 採卵成績 (平均 n=3)

	黄体数	遺残卵胞数	採卵総数	正常胚数	変性胚数	未受精卵数	正常胚率
試験区	9.7	4.3	4.3	2.3	0.0	2.0	53.8%
対照区	13.3	5.7	7.7	4.3	0.0	3.3	56.5%

表 6 胚質成績 (平均 n=3)

	A	A'	A+A'	B	C
試験区	2.0	0.3	2.3	0.0	0.0
対照区	0.7	1.7	2.3	2.0	0.0

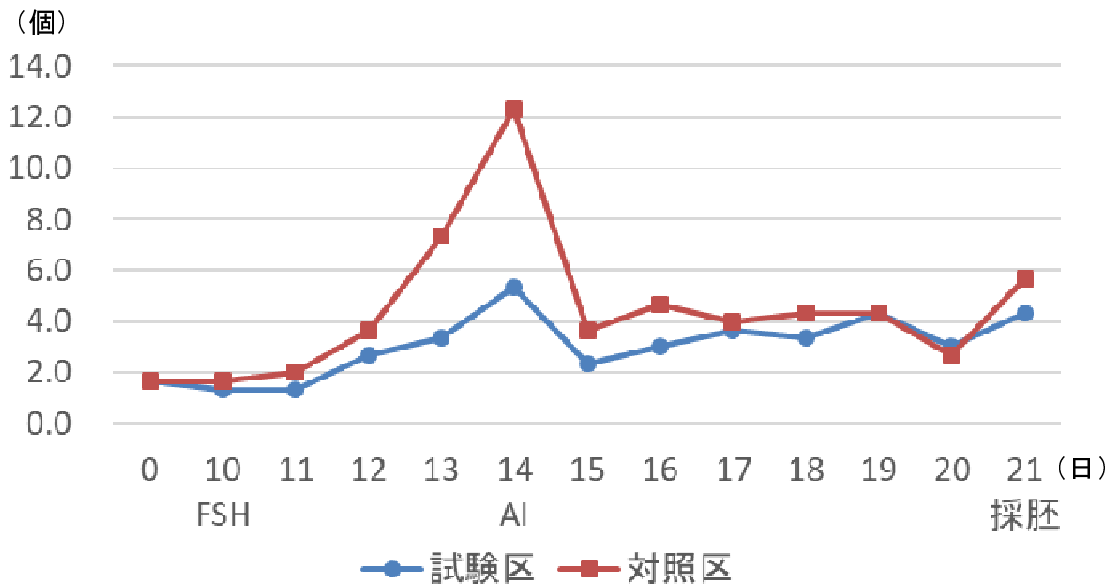


図 4 大卵胞数の推移

考 察

Flex-Synch 法により卵胞波を調整し、第一卵胞波から過剰排卵処理を実施する方法について検討した。試験 1 では、採胚成績・胚質成績・卵胞発育成績の全てにおいて試験区が対照区より劣る成績であり、その原因として、FSH 感作時の低プロゲステロン濃度が影響している可能性が考えられた。このことから、試験 2 では、Flex-Synch 法による卵胞波調整に加え、過剰排卵処理時に CIDR を再度挿入し FSH 感作時のプロゲステロンを補うことにより、採胚成績が改善するか検討を行った。

その結果、試験区は対照区と比較して、卵胞発育・採胚時黄体数・採胚総数は低かったものの、正常胚率においては対照区と同等であった。また胚質成績では、試験区は A+A'ランクの胚数において対照区と同等であった。今回の試験において供試牛は 4 回の採胚を実施しており、試験 1 は 1、2 回目の採胚、試験 2 は 3、4 回目の採胚である。一般的に回数を重ねた方が採胚成績は低下するため、試験 1 と試験 2 の結果の直接的な比較はできないものの、試験 2 の試験区において正常胚率と胚ランクが改善された可能性が考えられた。従って、今回検討した Flex-Synch を用いた第一卵胞波からの過剰排卵処理法において、過剰排卵処理時に CIDR を再度挿入しプロゲステロンを補うことにより、胚の品質が高まる可能性が示唆された。

しかしながら試験 2 でも、卵胞発育・採胚時黄体数・採胚総数等の採胚成績において、試験区が対照区に及ばなかったことから、過剰排卵処理時の低プロゲステロン濃度以外の採胚成績を低下させる要因について検討する必要があると考えられる。

参考文献

- 1) 西野 治ら：卵胞刺激ホルモン製剤1回投与による黒毛和種の過剰排卵処理の簡易化の検討 奈良県畜産技術センター研究報告 第40号 1-5 (2015)
- 2) 平泉真吾ら：生理食塩水を溶媒とした卵胞刺激ホルモン (FSH) 皮下1回投与法により牛の過剰排卵処理が可能である 第24回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会講演要旨 52-53
- 3) 平泉真吾ら：Superovulatory response in Japanese Black cows receiving a single subcutaneous porcine FSH treatment or six intramuscular treatments over three days Theriogenology Vol.83 No.4 466-473(2015)
- 4) Guilbault, L.A. et al：Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle, Reprod. Fertil.,91:81-89 (1991)
- 5) Huhtinen, M. et al：Increased ovarian responses in the absence of a dominant follicle in superovulated cows, Theriogenology, 37:457-463 (1992)
- 6) 水木若菜ら：黒毛和種における過剰排卵処理の効率化および簡易化に向けた取り組み 日本胚移植学雑誌 Vol.40 No.2 33-39(2018)
- 7) 社団法人畜産技術協会：胚の衛生的取り扱いマニュアル第3版(2001)
- 8) 江副幹太ら：黒毛和種供卵牛における血漿中の性腺刺激ホルモン,卵巣ステロイドホルモンおよびインヒビン濃度と採卵成績との関係 日本畜産学会報 61 卷 8 号 683-689(1990)
- 9) Inskeep EK：Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow, J Anim Sci, 82 E-Suppl:E24-39(2004)