

FSH 投与量および投与方法が乳牛の超音波誘導経膣採卵に及ぼす影響

小嶋 睦*・福尾憲久*・生田健太郎*・廣崎里麻*

要 約

Follicle Stimulating Hormon(FSH)の投与量および投与方法が乳牛の超音波誘導経膣採卵法による採取卵胞に及ぼす影響を検討した。試験Ⅰとして泌乳中期ホルスタイン種2頭にFSH 30AUまたは40AUを3日間、朝夕筋肉内に漸減投与し、4日目に第1回、6日目に第2回の経膣採卵を実施した。試験Ⅱとして、泌乳末期から乾乳期のホルスタイン種3頭に優勢卵胞(直径8mm以上)穿刺除去2日目からFSH 30AUを3日間朝夕筋肉内に漸減投与、またはpolyvinylpyrrolidone溶解後皮下に1回投与し、5日目に経膣採卵を実施し、以下の結果が得られた。

- 1 FSH処理後の大中卵胞(直径5mm以上)数は、30AU区14.1個、40AU区14.6個、吸引卵子数は第1回5.6個と4.9個、第2回1.6個と2.0個とFSHの量による有意差はなかったが、30AU区において第1回吸引卵子数が第2回に比較し有意に多く($P < 0.05$)、40AU区においてもその傾向が認められた($P < 0.1$)。
- 2 FSH処理後の超大卵胞(直径13mm以上)数、大卵胞(13~9mm)数、中卵胞(9~5mm)数および吸引卵子数に有意差はなかったが、漸減投与区の方が3層以上の卵丘細胞付着卵子数が4.8個とPVP区の2.2個より有意($P < 0.05$)に多く、その割合も75.0%と45.6%と有意($P < 0.01$)に高く、1~2層卵丘細胞付着卵子の割合は、15.8%と36.8%でPVP区の方が有意($P < 0.01$)に高かった。

Effect of Dose and Administration Methods of FSH on Ultrasound-guided Ovum Pick-up in Holstein Cows

Mutsumu KOKAMO, Norihisa FUKUO, Kentarou IKUTA and Rima HIROSAKI

Summary

Present experiments were designed to investigate effects of dosage (Exp I) and methods (Exp II) of FSH administration on the quality and number of oocytes collected by transvaginal ovum-pick up in cows.

Exp. I: Two cows were used here. Animals alternately received intramuscularly injection of total of 30 or 40AU FSH twice a day for three days by decreasing doses (decreasing method). In the first series, dominant follicles (≥ 8 mm in diameter) in the ovary were removed by a suction needle, and referred to as day 0 of the series. FSH treatments took place from day 2 to day 4. the number of follicles with more than 5 mm in diameter were counted by ultrasonography and those were aspirated on day 5 and day 7. In the second series, animals alternatively received total of 40 or 30 AU FSH in the same way, same treatment as those in series 1 with an exception of the removal of dominant follicles were successively repeated. Quality of recovered oocytes were classified to three groups by layers of surrounding cumulus oophorus, i. e. with ≥ 3 layers, 1 to 2 layers and several cells (denuded). Results of Exp. I were summarized as follows:

- 1) There was no significant difference in the mean number of follicles and oocytes collected in the first and second aspirations between treatments with 30 AU and 40 AU FSH. Quality of recovered oocytes was not significantly different between the two treatments. 2) More oocytes were recovered in the first aspiration than in the second (5.6 vs 1.6, $P < 0.05$) treatment of 30 AU FSH. There was the same kind of tendency in the treatment of 40 AU FSH (4.2 vs 2.0), but not significantly different ($0.05 < P < 0.10$).

1998年8月31日受理

* 淡路農業技術センター

Exp. II : Two methods of administration of FSH were compared. One was the decreasing method of 30 AU FSH as described in Exp. I . In the other method, 30 AU FSH was dissolved in a small aliquot of saline. Then mixed with 10 ml 30% w/v PVP (polyvinylpyrrolidone), and the whole amount was subcutaneously injected on day 2 (PVP method). Three animals were administered by the decreasing method or PVP method in one series of this experiment. Four series of treatments were repeated in each animal. Animals were alternately subjected to one of two methods. The same items in Exp. I were examined, and were compared between the two methods.

- (1) The mean numbers of follicles stimulated and oocytes recovered were not significantly different in the 2 groups.
- (2) More oocytes with ≥ 3 layers of cumulus cells were recovered in the decreasing method than in PVP method (4.8 vs 2.2, $P < 0.05$)

キーワード： 超音波誘導, 経膣採卵, FSH, PVP, 乳牛

緒言

近年, 牛の生体内から卵胞卵子を採取し, 体外受精卵を作出する技術が研究されている。この方法では, 生体の卵巣から卵胞卵子を反復して採取できることから, 効率的な受精卵の作出が可能となり, 雌側からの遺伝改良速度の向上, 選抜の強度, 世代交代の短縮を計画的に実施できる。一般に生体内からの卵胞卵子採取については, 卵胞刺激ホルモン(以下 FSH と呼ぶ), PMSG 等のホルモン処理, あるいは無処理で超音波誘導経膣採卵法により実施されている。また, 超音波診断装置も従来の 5MHz からより解像度の優れた 7.5MHz の機種利用による, 直径 2~4mm 程度の小卵胞からの採取の報告もある。しかしながら, 高解像度の装置は高価であり, 5MHz の装置も長年の使用により解像度が劣化している場合も考えられる上, 直径 2~4mm 程度の小卵胞からの吸引は技術的にも難しい。そこで著者らも, 卵胞の直径を 10mm 程度まで成長させ吸引を容易にするために必要な FSH 投与量および投与方法を検討した。この場合一般の過剰排卵処理に用いられる FSH 漸減投与でのホルモン量を同一の試験で比較した報告例は少ない。また, 連日の注射による牛へのストレスと, 人の労力の軽減から FSH を polyvinylpyrrolidone (以下 PVP と呼ぶ) に溶解し 1 回の皮下投与方法についての検討も行った。

材料および方法

本試験場に飼養するホルスタイン種に, 日本飼養標準を充足する量を朝夕 2 回に分離給与したものをを用いた。試験 I では泌乳中期のものを 2 頭 (3,5 産) 使用し, 試験期間は 1997 年 6 月 27~8 月 22 日, 試験 II では泌乳末期から乾乳期のものを 3 頭 (2, 5, 6 産) 使用し, 試験期

間は 1997 年 11 月 19 日~1998 年 3 月 11 日であった。

1 FSH 処理および採卵時期

試験 I : FSH の投与量が経膣採卵に及ぼす影響

図 1 に示すように, 第 1 シリーズにおいては, 直径 8mm 程度の卵胞を優勢卵胞とみなし, 卵胞穿刺により除去した。この日を処理 0 日とし, 2 日目から合計 30AU の卵胞刺激ホルモン (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, 1 回目, さらにその 2 日後に 2 回目の経膣採卵を実施した。2 回目の採卵を第 2 シリーズの 0 日とし, 第 1 シリーズ同じように 2 日目から合計 40AU の FSH を, 漸減投与し, FSH の最終投与の翌日とその 2 日後の合計 2 回経膣採卵を行った。このように, 30AU と 40AU を交互に 8 シリーズ繰り返し, 8 週間連続して行った。したがって, 優勢卵胞の除去は第 1 シリーズの初日のみ行い, 第 2 シリー

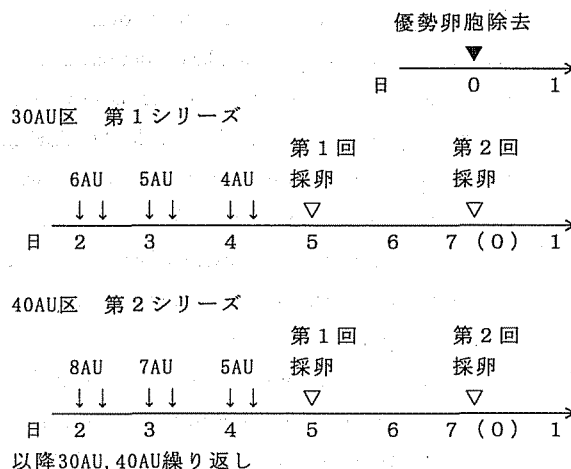
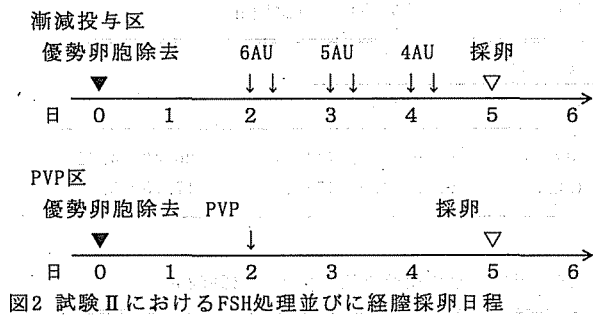


図1 試験 I における FSH 処理並びに経膣採卵日程
FSH 投与量の異なるシリーズを, 交互に 8 回, 合計 8 週間連続して試験を行った。したがって, 優勢卵胞の除去は第 2 シリーズ以降では行っていない。



ズ以降の試験では、前のシリーズにおける2回目の採卵により、優勢卵胞も除去されている。

試験Ⅱ：FSHの投与方法が経膈採卵に及ぼす影響

図2にFSH処理方法を示した。試験Ⅰ開始時と同様に、優勢卵胞の除去を試験の0日とした。漸減投与区では、試験Ⅰで行ったFSH漸減投与法の30AUと同様に処理した。PVP区では、30AUのFSHを約1mlの生理食塩水に溶解し、30%のポリビニルピロリドン(PVP)溶液10mlと混合し、頸部皮下に1回投与した。漸減投与区では1回目のFSH投与、PVP区ではFSH投与から3日目に経膈採卵を行った。以上の1週間のシリーズを両区を交互に4回実施し、両者のFSH投与方法の経膈採卵に及ぼす影響について比較検討した。

2 卵胞直径の計測と計数

試験Ⅰでは、確実に採卵可能である直径5mm以上の卵胞を対象として数えた。試験Ⅱでは、直径5～9mm以下のものを中卵胞、9～13mmを大卵胞、13mm以上を超大卵胞として分類し数えた。

3 経膈採卵方法

供試牛を枠場に保定し、キシロカインによる尾椎硬膜外麻酔またはパドリンの静脈内投与により腸の蠕動を押さえ、外陰部を洗浄・消毒した。前述の超音波診断装置・探触子および超音波卵胞卵採取システムL-1型(FHK)を用い、直径約5mm以上の卵胞を穿刺した。針から吸引ポンプまでは、試験Ⅰではダブルルーメン針(17G 60mm)セット(double lumen ovum pick-up set COOK AUSTRALIA)、試験Ⅱでは超音波卵胞卵採取システム

L-1型付随の採卵針、テフロンチューブ、採取管セットを用いた。吸引ポンプはエアサッカー(FHK max flow 6L/min)を用い、数個のフィルター(ミリポア マイレクス 0.22μm, 0.45μm)により、試験Ⅰでは、吸引量を約33ml/分、また同一ポンプの排気により約0.63ml/分の0.5%ヘパリンを含む注射用滅菌生理食塩水を注入した。試験Ⅱでは、吸引量を約28ml/分とした。

吸引卵子はセルコレクター(CCA-200 ニプロ医工K.K.製)で血液をろ過除去した後実体顕微鏡下で、3層以上の卵丘細胞で覆われているもの・1～2層の卵丘細胞で覆われているもの・裸化されたものに分類した。

4 統計処理

各卵胞数・卵子数はt検定、各割合はχ²検定を用いた。あわせて、試験Ⅰについては、第1回と第2回吸引卵子数について区内でt検定を行った。

結 果

試験Ⅰ：FSHの投与量が経膈採卵に及ぼす影響

表1に示すようにFSH処理後の大中卵胞数および吸引卵子数に、試験区間の有意差はなかった。しかしながら、30AU区で第1回吸引卵子数が5.6個と第2回の1.6個より有意(P<0.05)に多く、40AU区も4.9個と2.0個とその傾向(P<0.1)がみられた。第1回と第2回吸引卵子の卵丘細胞の付着状況による分類においても有意差はなかった。

試験Ⅱ：FSHの投与方法が経膈採卵に及ぼす影響

表2に示すように、FSHの投与方法による採卵時の卵胞数、超大・大・中卵胞数およびその割合に有意差はなかった。両区の吸引卵子数および卵丘細胞付着別個数、また、その割合を表3に示した。漸減投与区とPVP区の吸引卵子数に有意差はなかった。

3層以上卵丘細胞が付着した卵子数は漸減投与区が4.75個で、PVP区の2.17個より有意(P<0.05)に多かった。1～2層付着卵子数は1.00個と1.75個、裸化卵子は0.58個と0.83個と両区に有意差はなかった。卵丘細胞付着状況により分類された卵子の割合は、3層以上

表1 FSH投与量の違いが卵胞数、吸引卵子数および卵丘細胞付着状況に及ぼす影響(平均個数±標準偏差)(試験Ⅰ)

試験区	吸引採卵 実施回数	FSH処理後 大・中卵胞数	吸引卵子数		卵丘細胞付着状況により分類された卵子数(%)**		
			第1回	第2回	3層以上	1～2層	裸化
30AU区	8*	14.1±7.8	5.6±3.2*	1.6±1.7 ^b	3.5±2.7 (51.2)	1.7±1.2(24.4)	1.7±0.8(24.4)
40AU区	8	14.6±7.4	4.9±4.0	2.0±1.6	3.4±3.7 (49.1)	2.3±1.9(32.7)	1.3±1.4(18.2)

* 吸引卵子数は7回、卵丘細胞付着率は6回分の結果を示す
 ** 2回分の吸引卵子についての結果
 a, b間で有意差有り(P<0.05)

表2 FSHの投与方法の違いが採卵時の卵胞数並びに直径に及ぼす影響(平均個数±標準偏差) (試験Ⅱ)

試験区	実施回数	卵 胞 の 区 分			計
		超大卵胞数	大卵胞数	中卵胞数	
漸減投与区	12	2.75±2.90 (13.5)	8.67±3.89 (42.4)	9.00±3.52 (44.1)	20.42±4.62
PVP区	12	1.50±2.39 (8.5)	6.83±5.61 (38.5)	9.42±4.91 (53.1)	17.75±5.96

()内は出現割合で%

表3 FSHの投与方法の違いが吸引卵子数および卵丘細胞付着状況に及ぼす影響(平均個数±標準偏差) (試験Ⅱ)

試験区	実施回数	吸引卵子数	吸引卵子の卵丘細胞付着状況		
			3層以上	1～2層	裸化
漸減投与区	12	6.33±3.87	4.75±3.57 ^a (75.0%)	1.00±0.95 (15.8%)	0.58±0.79 (9.2)
PVP区	12	4.75±3.89	2.17±1.64 ^b (45.6%)	1.75±1.76 (36.8%)	0.83±1.40 (17.5)

()内は出現割合で%

同列a, b間(P<0.05), c, d間(P<0.01)で有意差有り

では漸減投与区が75.0%とPVP区の45.6%より有意(P<0.01)に高く、1～2層では、15.8%、36.8%と逆にPVP区の方が有意(P<0.01)に高かった。裸化卵子の割合に有意差はなかった。

考 察

試験Ⅰ：FSHの投与量が経膈採卵に及ぼす影響

FSH 30AUと40AUの3日間朝夕漸減投与では、FSH処理後の大中卵胞数、吸引卵子数および吸引卵子の卵丘細胞付着状況には有意差はなかった。FSH処理の効果については処理後の週1回の吸引で3、4日間隔の週2回吸引と同等の数の卵子が吸引できるとの報告^{8,9,11,13,19)}があるものの、投与量を同一の試験で比較したものは少ない。今回の結果から、非妊娠牛のFSH処理量は40AUと30AUでは差がなく30AUで十分と考えられた。Meintjes¹⁴⁾らは、妊娠牛にFSH40mg、20mgまたは未処置と非妊娠牛に40mgのFSHを投与し、卵胞数はFSH投与妊娠牛が非投与妊娠牛より有意に多く、回収率は妊娠・非妊娠に関わらず40mg投与区が20mg・未投与より有意に多いと報告している。また、卵子の形態的正常率は妊娠牛20mg投与区より40mg投与区が有意に高く、総合的に妊娠牛では、40mg区が良いとしている。

FSH未処理の吸引間隔について、Boni⁵⁾らは、吸引間隔2日では、3あるいは4日間隔に比較し、吸引卵子数が少ないと報告している。一方、Simon¹⁰⁾らは、48と96時間間隔では48時間間隔での吸引の方が多くの卵胞数・高い回収率、並びに形態的な正常性を示す卵子の割合が高いと報告している。本試験では、FSH処理後の週2回採卵を検討したものの、第1回目の吸引卵子数がその2日後の第2回目と比較し、30AU区では有意(P<0.05)

に多く、40AU区では多い傾向(P<0.1)がみられた。2回目の吸引は次回FSH処理の2日前であり、今後は、連続した数週にわたるFSH処理後の週1回の採卵への、各週処理前の優勢卵胞除去の効果を、検討する必要もあろう。

試験Ⅱ：FSHの投与方法が経膈採卵に及ぼす影響

とくに野外の牛を用いる場合は、3日間連続した朝夕の過剰排卵処理は、牛へのストレスとともに人の労力面からも問題があると考えられる。今回この問題を軽減させるために和牛の過剰採卵処理で用いられているPVPを利用した1回皮下注射について検討した。今回の試験で1回の皮下投与において3日間の朝夕漸減投与方法と変わらぬ卵胞発育・吸引卵子数を得た。Ooe¹⁷⁾らは、過剰排卵への優勢卵胞除去の影響の検討が目的であるが、20mgのFSHをPVPに溶解し1回筋肉内投与を行い経膈採卵により吸引卵子を得ている。今回の試験は全てFSH処理2日前に優勢卵胞を除去した結果であるが、Ooe¹⁷⁾らも、優勢卵胞のない場合の方が吸引可能卵胞数、吸引卵子数並びに体外受精後の分割卵の割合も有意に多い(P<0.05)と報告しており、優勢卵胞の除去は必要と考えられる。Sato¹⁸⁾らは、和牛の体内受精卵の過剰排卵にFSHのPVP溶解法について検討している。1回のFSH20AUまたは30AUを、筋肉内投与と、30AUまたは40AUを皮下投与し、20AU3日間朝夕漸減投与の対象と比較したところ、40AU皮下投与区は黄体数、残存卵胞数、回収胚および移植可能胚の全てにおいて、20AU筋肉内投与区は回収胚数で有意(P<0.05)に劣るものの、30AUの筋肉内および皮下投与では差がないと報告している。

しかしながら、今回の試験では漸減投与区の方が3層以上の卵丘細胞付着卵子数が有意(P<0.05)に多く、その割合も有意(P<0.01)に高く、1～2層の卵子の

割合は、PVP 区の方が有意 ($P < 0.01$) に高かった。Fukui⁸⁾らによると、ホルモン非処理のと場採取卵巣では卵胞の直径の大きいものほど卵丘細胞の付着していない卵子が増える傾向を示していたが、今回の結果では差はないものの、逆に PVP 区の方が平均超大あるいは大卵胞数は少なかった。また、吸引条件は同じであるため、PVP 区の方が吸引中に卵丘細胞がはがれやすい状況にあったとも考えられるが、両区の卵子の成熟状況については調査していないため、その理由は不明である。卵子の体外成熟には、卵丘細胞の成熟培養液中の濃度のみではなく、卵子との結合性も重要^{7,8,12,16)}であるため、3層以上の卵丘細胞が付着した卵子が多かった漸減投与方法が PVP より適していると考えられる。今後例数を重ね卵子の成熟度や体外受精成績等も取り入れてさらに検討する必要がある。

経膈採卵における採取卵子の付着卵丘細胞数には、ハード面の影響も指摘されている^{3,4)}。本試験では、一般的に妥当と考えられる市販の針と卵胞卵子吸引システムを用い、1分間当たりの回収液量も多くの報告の範囲内とした。

また、吸引卵子の形態学的区分ではクラス1を Moreno¹⁵⁾らは経膈吸引卵子で3層以上のコンパクトな卵丘細胞付着卵子、Blondin²⁾らとは場採卵からの吸引卵子で4または5層以上としている。本試験は経膈採卵であるため3層以上を正常と考え、1～2層、および裸化に区分した。

また、過剰排卵により、卵子成熟および卵胞発育との間に不一致が生じ、体外受精成績が悪いとの報告が一部に有り、FSH 処理後の卵胞の大きさ¹⁾、GnRH 投与の有無⁶⁾、最終 FSH 処理から卵採取までの期間²⁾等多くの検討がなされており、FSH 投与により吸引卵子数が増えるものの体外受精卵の効率的な作出については今後の研究に待つものが大きい。

引用文献

- (1) Blondin, P., K. Coenen, L. A. Guilbault and M. -A. Sirard (1996) : Superovulation can reduce the developmental competence of bovine embryos : *Theriogenology* 46, 1191-1203
- (2) Blondin, P., L. A. Guilbault and M. -A. Sirard (1997) : The time interval between FSH-P administration and slaughter can influence the developmental competence of beef heifer oocytes : *Theriogenology* 48, 803-813
- (3) Bols, P. E. J., A. Van Soom, M. T. Ysebaert, J. M. M. Vandenheede and A. de Kruif (1996) : Effect of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes : *Theriogenology* 45, 1001-1014
- (4) Bols, P. E. J., J. M. M. Vandenheede, A. Van Soom and A. de Kruif (1995) : Trans vaginal ovum pick-up in the cow : a new disposable needle guidance system : *Theriogenology* 43, 677-687
- (5) Boni, R., M. W. Roelofs, M. C. Pieterse, J. Kogut and Th. A. M. Kruif (1997) : Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture : *Theriogenology* 48, 277-289
- (6) Bordignon, V., N. Morin, J. Durocher, D. Bousquet and L. C. Smith (1997) : GnRH improves the recovery rate and the in vitro developmental competence of oocytes obtained by transvaginal follicular aspiration from superstimulated heifers : *Theriogenology* 48, 291-298
- (7) E. Behalva and T. Greve (1993) : Penetration rate if cumulus enclosed versus denuded bovine eggs fertilized in vitro : *Theriogenology* 39, 186
- (8) Fukui, Y. and Y. Sakum (1980) : Maturation of bovine oocytes cultured in vitro : relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells : *Biol. of Rep.* 22, 669-673
- (9) Gibbons, J. R., W. E. Beal, R. L. Krisher, E. G. Faber, R. E. Pearson and F. C. Gwazdauskas (1994) : Effects of once- versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development : *Theriogenology* 42, 405-419
- (10) L. Simon, L. Bungartz, (1993) : Repeated bovine oocyte collection by means of a permanently rinsed ultrasound guided aspiration unit : *Theriogenology* 39, 312
- (11) Lacaze, S., B. Marquant-Le guienne, N. Delalleau, L. Richet, S. Maunas, M. Nibart and P. Humblot (1997) : Centralized in vitro embryo production after ultrasound guided bovine oocyte collection: effect of parity and superovulation treatment : *Theriogenology* 47, 161
- (12) Leibfried-Rutledge, M. L., E. S. Critser, J. J. Parrish and N. L. First (1989) : In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes : *Theriogenology* 31, 61-74
- (13) Looney, C. R., B. R. Lindsey, C. L. Gonseth and D. L. Johnson (1994) : Commercial aspect of oocyte retrieval and IVF for embryo production in problem cows : *Theriogenology* 41, 67-72
- (14) Meintjes, M., M. Bellow, J. R. Broussard, J. B. Paul and R. A. Godke (1995) : Transvaginal aspiration of oocyte

- from hormone-treated pregnant beef cattle for IVF : J Animal Sci. 73, 967-974
- (15) Moreno, J.F., G. Flores-Foxworth, M. Westhusin and D. C. Kraemer (1993) : Influence of pregnancy and presence of CL on quantity and quality of bovine oocyte obtained from ovarian follicles aspirated post-mortem : Theriogenology 39, 271
- (16) N.L. Hazeleger and R.B. Stubbings (1992) : Development potential of selected bovine oocyte cumulus complexes : Theriogenology 37, 219
- (17) Ooe, M., R. Rajamahendran, A. Boediono and T. Suzuki (1997) : Ultrasound-guided follicle aspiration and IVF in dairy cows treated with FSH after removal of estrus cycle : J Vet Med Sci. 59, 371-376
- (18) Sato, H., T. Numabe, T. Takata, T. Oikawa, A. Kifune, G. Watanabe and K. Taya (1996) : Superovulation in Japanese cows using polyvinylpyrrolidone (PVP) as the vehicle for porcine FSH : Theriogenology 45, 332
- (19) Walton, J. S., K. A. Christie and R. B. Stubbings (1993) : evaluation of frequency of ultrasonically guided follicular aspiration on bovine ovarian dynamics : Theriogenology 39, 336