

黄体ホルモン製剤を用いた過剰排卵処理が 黒毛和種牛の採胚成績に及ぼす影響

藪上 剛*・富永敬一郎**・有吉哲志**

要 約

黒毛和種牛から性周期に関係なく計画的に採胚するために、黄体ホルモン製剤 (以下 CIDR と呼ぶ) を膈内に約 12 日間挿入 (試験区) し、FSH-PG 法で過剰排卵処理した後の採胚成績を、CIDR を用いない対照区と比較検討した。

- 1 CIDR を処理した場合の分娩後 3 回の採胚で得られた移植可能胚数は、それぞれ 6.4 ± 6.0 個、 6.7 ± 6.6 個および 4.9 ± 5.9 個で、処理しない対照区の 6.4 ± 6.4 個、 7.8 個 \pm 5.9 個および 7.4 ± 8.4 個と比較して有意差は認められず、性周期に関係なく採胚できるので新手法として有効である。
- 2 採胚時の直径 1cm 以上の卵胞数は、分娩後 1 および 2 回目で、試験区が 8.7 ± 4.4 個および 7.1 ± 3.0 個であり、対照区の 5.4 ± 3.5 個および 4.0 ± 3.0 個に比べて有意に多かった ($P < 0.05$)。
- 3 分娩後 1 回目の後期桑実胚の割合は、試験区が 36.7% であり、対照区の 72.4% に比べて有意に少なく ($P < 0.05$)、胚盤胞の割合は試験区が 32.4% と対照区の 4.0% に比べて有意に多かった ($P < 0.05$)。

Influence of a Progesterone Releasing Intravaginal Device on Superstimulatory Response in Japanese Black Cattle

Tsuyoshi YABUUE, Keiichiro TOMINAGA and Tetsushi ARIYOSHI

Summary

In order to obtain embryos deliberately from Japanese Black cattle, ovarian responses to super stimulatory treatments with FSH-PG following insertion of an intravaginal device releasing progesterone (CIDR) were examined. In the experiment group, intravaginally CIDR was inserted ad-libitum during estrus cycles, and removed and the animals were injected with PGF 2α 4 to 11 days later. They were administered FSH twice a day for 4 days from 2 days before the removal of CIDR. They were artificially inseminated when they showed features of standing estrus, and received further two inseminations until the end of estrus. Embryos were recovered 7 days after the first AI. Number of recovered embryos were counted, and their quality, developmental stages were examined. Number of follicles more than 1 cm in diameter and of corpus lutea were counted at embryo collection. All items were compared with the control group where animals were treated the same as the experimental group on Day 8 to 12 of estrus cycle except for CIDR treatment. Results were summarized as follows:

- (1) The number of viable embryos recovered in both experiments was not different.
- (2) The number of follicles more than 1 cm in diameter treated with CIDR was significantly greater than control in the 1st and 2nd recovery of post partum (8.7 ± 4.4 and 7.1 ± 3.0 vs 5.4 ± 3.5 and 4.0 ± 3.0).
- (3) In the 1st embryo recovery of post partum, the rate of compact molura treated with CIDR was lower (36.7% vs 72.4%), but the rate of blastocyst was higher than control (32.4% vs 4.0%).

キーワード：黄体ホルモン製剤，黒毛和種牛，過剰排卵処理，移植可能胚，後期桑実胚，胚盤胞

1998年8月26日受理

* 現和田山家畜保健衛生所 ** 中央農業技術センター

緒 言

牛の過剰排卵処理は、供胚牛の発情周期に合わせて、発情日を0日として、周期8～12日の黄体期から4日間卵胞刺激ホルモン（以下FSHと呼ぶ）を投与するのが通常とされている。従来の手法では、採胚が供胚牛の発情を発見してから計画を立てるため、凍結が困難なPCR法により雌雄判別した胚を野外で移植する場合は、新鮮胚での対応となり、受胚牛の同期化・頭数調整等が困難であるため、新手法が求められていた。

近年、牛の臍内にプロゲステロンを1.9g含有する黄体ホルモン製剤（以下CIDRと呼ぶ）を挿入して発情の同期化を行う研究^{1,3,10,11,14,15)}が報告された。

胚の効率利用には、単に受胚牛の発情を同期化するだけでなく、胚を随時に供給することによっても当然可能である。したがって、本研究では、発情の同期化に使用されるCIDRを、通常の発情周期に使用されるFSH-PG法による過剰排卵処理と組み合わせることにより、性周期に関係なく、質の良い胚を供給する可能性を明らかにする目的で行った。供給される胚の生産性についても、従来の発情周期中の過剰排卵処理法と比較検討した。

材料及び方法

1995年4月から1997年12月に当センターに繋養中の黒毛和種経産牛22頭を供胚牛として、試験区ならびに対照区の処理に使用し、分娩後2回または3回過剰排卵処理を行った。11頭については分娩を挟んで両区に使用した。

表1 過剰排卵処理日程

処理日	1	2	3	4	5	6	・・・	12
朝	FSH 5	4	3	2	AI	AI	・・・	採胚
(試験区)			PGA750 (CIDR 除去)			APG200		
夕	5	4	3	2	AI			

注) FSH,PGA,APGの単位はそれぞれAU, μg, RU

対照区では、供胚牛の発情後8～12日目に、試験区ではプロゲステロンを1.9g含有するCIDR（イージーフリット、家畜改良事業団）を、供胚牛の性周期に関係なく臍内に挿入し、挿入後4～11日目に過剰排卵処理を開始した。いずれの区においても、FSH（アトリン、テンカ製薬）を、朝夕2回、4日間、計28AU（7-マー単位）を漸減投与した。FSH筋肉投与開始48時間後にPGF2αナック（PGA; エストライト、住友製薬）を750 μg筋肉投与して過剰排卵処理を行った（表1）。

試験区ではPGA投与時にCIDRを除去した。両区とも供胚牛のスタンディング発情を確認後、人工授精（AI）を3回行い、3回目のAI直後に牛下垂体前葉性腺刺激ホルモン（APG; ヒポホリン、帝国臓器）200RU（家兎単位）を筋肉投与した（表1）。試験区のCIDR挿入期間の平均は、1～3回の採胚回数について、それぞれ12.6日、12.6日および12.1日であった。

胚は初回AI後7日目に非外科的灌流法で採取した。採胚時に直径1cm以上の卵胞数、黄体数、回収胚数、移植可能胚数および移植可能胚に占める発育ステージの割合の5項目について比較検討した。直径1cm以上の卵胞数と黄体数を、直腸検査と超音波断層装置を用いて計測した。回収胚の検索および胚の品質と発育ステージの判定は、実体顕微鏡および倒立顕微鏡を用いて行った。

得られた結果をt検定を用いて解析し、5%水準で有意性を検討した。発育ステージの割合については、角変換後、同様に処理した。

表2 採胚間隔（日）

区 分	1回目から2回目	2回目から3回目
試験区	46.9±15.7**	59.4±16.3*
対照区	98.8±29.2 ^b	124.7±22.6 ^b

*：平均±標準偏差

a-b：異符号間に有意差あり（P < 0.05）

表3 採胚成績

区 分	分娩後の 採胚回次	頭数	卵 胞 数* (直径 ≥ 1 cm)	黄 体 数	回 収 胚 数	移 植 可 能 胚 数
試験区	1	14	8.7± 4.4 ^a	9.9± 6.0	9.1± 6.3	6.4± 6.1
	2	14	7.1± 3.0 ^a	9.4± 6.7	8.1± 6.8	6.7± 6.6
	3	7	7.9± 4.6	7.9± 5.7	6.0± 6.4	4.9± 5.9
対照区	1	14	5.4± 3.5 ^b	13.1± 6.2	10.6± 6.9	6.4± 6.4
	2	14	4.0± 3.0 ^b	10.4± 4.7	8.9± 6.2	7.8± 5.9
	3	7	3.9± 2.7	10.6± 7.7	8.6± 9.1	7.4± 8.4

*：平均±標準偏差 a-b：同項目同採胚回次で異符号間に有意差あり（P < 0.05）

表4 移植可能胚における胚の発育ステージ別割合の推移

区分	分娩後の採胚回次	後期桑実胚 (%)	初期胚盤胞 (%)	胚盤胞 (%)	拡張胚盤胞 (%)
試験区	1	36.7 ± 36.8 ^a	24.6 ± 27.0	32.3 ± 29.4 ^a	5.8 ± 15.1
	2	52.2 ± 35.7	32.4 ± 29.6	14.6 ± 19.1	0.8 ± 2.8
	3	48.0 ± 29.5	36.2 ± 18.7	14.6 ± 23.1	1.2 ± 2.6
対照区	1	72.4 ± 31.9 ^b	23.2 ± 24.3	4.0 ± 12.8 ^b	0.3 ± 1.2
	2	51.3 ± 32.3	29.5 ± 22.9	19.1 ± 36.7	0.0 ± 0.0
	3	37.7 ± 14.7	57.3 ± 16.9	5.0 ± 7.5	0.0 ± 0.0

*：平均±標準偏差 a-b：同項目同採胚回次で異符号間に有意差あり (P < 0.05)

結 果

分娩後の採胚間隔を表2に示した。分娩後の各採胚回次の頭数は表3に示した。対照区における2および3回目の過剰排卵処理は、胚回収後、自然発情の回帰を2回確認後の発情周期に行った。採胚回次の1回目と2回目および2回目と3回目の間隔は、試験区が対照区に比べて有意に短い採胚間隔であった。

採胚時における直径1cm以上の卵胞数は表3のように、分娩後1回目および2回目で、試験区が対照区に比べて有意に多くなった (P < 0.05)。3回目は試験区と対照区に有意差はなかったが、同様の傾向が認められた。

黄体数は、対照区が多い傾向であったが、試験区と対照区で有意差は認められなかった。

回収胚数も、黄体数と同様に、両者に有意差は認められなかった。

回収胚のうち、未受精卵、変性卵および低ランク胚を除いた移植可能胚数は、試験区で6.4 ± 6.0個、6.7 ± 6.6個および4.9 ± 5.9個、対照区で6.4 ± 6.4個、7.8 ± 5.9個および7.4 ± 8.4個であり、各回とも両者に有意差は認められなかった。

移植可能胚に占める胚の発育ステージの推移は表4のとおりである。対照区では、分娩後の採胚回数を重ねるにしたがって、後期桑実胚（以下CMと呼ぶ）の割合が減少し、初期胚盤胞（以下EBと呼ぶ）が増加する傾向が認められた。それに対して、試験区では2回目、3回目でCMとEBの割合が同程度で推移した。試験区の分娩後1回目のCMは対照区に比べて有意に少なく、胚盤胞（以下BLと呼ぶ）は対照区より有意に多かった。

考 察

過剰排卵処理の方法として、FSHまたは妊馬血清性腺刺激ホルモン（以下PMSGと呼ぶ）投与を周期8～12日

に開始する方が、他の時期に開始するより、多くの移植可能胚を回収できる^{2,4,11,12)}ため一般的に用いられる。

本研究では、過剰排卵処理に対照区として、移植可能胚が最も期待できる供胚牛の周期8～12日にFSHの漸減投与を開始した。それに対して、試験区は、1本30g中にプロゲステロン1.9gを含むCIDRを、性周期に関係なく供胚牛の臍内に約12日間挿入して、対照区と同様にFSH-PG法で処理し、AI後7日目に定法により、非外科的に採胚した。

近年、雌牛の1性周期中には、通常2つまたは3つの優勢卵胞が発育する卵胞波が存在することが、超音波断層装置により、確認されている^{12,13,15,16)}。そして、過剰排卵処理開始時に優勢卵胞が存在すると、採胚成績に影響すると言われている^{5,6,7)}。

本研究のCIDRを用いた試験区では、性周期に関係なく過剰排卵処理を行ったため、優勢卵胞の影響により、試験区の採胚時における直径1cm以上の卵胞数が対照区より多い値となった可能性が考えられる。しかし、分娩後3回の採胚時の黄体数・回収胚数・移植可能胚数に、各回とも試験区と対照区で有意差が認められなかったことから、これらの優勢卵胞は採胚成績に影響しなかったという結果になった。このことは、供胚牛の性周期に関係なく、採胚計画を立てることができるCIDRを用いても、採胚成績に悪影響は及ぼさないことを示唆している。しかし、過剰排卵処理開始時に優勢卵胞の除去を行っていない対照区との比較であり、今後、検討が必要である。採胚計画が供胚牛の発情に左右される対照区に比べて、CIDRを用いると、長期にわたって採胚計画を立てることができる。本研究結果から効率的に採胚間隔を短縮できることが示された。また、複数頭の採胚を同一日に行うことが容易になる等、新鮮胚移植を行う受胚牛の調整や新鮮胚の確保等に有益である。

分娩後1回目の採胎において、試験区の移植可能胚に占める胚の発育ステージは、対照区に比べて、CMが少なく、BLが多かった。これは分娩後1回目でCIDRを用いると、対照区に比べて早く排卵し、発育ステージの進んだ胚が得られたことを示している。2回目、3回目では有意差は認められなかったことから、分娩後の哺乳等によるホルモンバランスの変化と、CIDRから補給されるプロジェステロン、過剰排卵処理に用いる性腺刺激ホルモン、PGA等との相互作用による結果であると推察される。本研究の試験区ではPGA投与と同時にCIDRを除去したが、必要とする胚の発育ステージに合わせて、CIDRを除去する時期を考慮すべきである。

CIDRは、供胚牛の発情に左右されることなく、効率的に採胎計画を立てることができ、しかも移植可能胚数を減らすことなく、安定した採胎成績が得られることが明らかとなった。また、新鮮胚移植を行うための受胎牛の同期化にも、CIDRを応用できる可能性がある。今後は、CIDR挿入時のE₂-17β投与^{1,11,14,15)}による優勢卵胞の発育を抑制するための検討や、過剰排卵処理のさらなる簡易化を図るためのPMSG1回投与の検討¹⁴⁾等が必要である。

引用文献

- (1) Bo, G. A., G. P. Adams, R. A. Pierson and R.J. Mapletoft (1995) : Exogenous control of follicular wave emergence in cattle : *Theriogenology* 43, 31-40
- (2) Boland, M.P., D.Goulding and J.F.Roche (1991) : Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle : *Theriogenology* 35, 5-17
- (3) D'Occhio, M. J., A. Niasari-Naslaji and J. E. Kinder (1997) : Influence of varied progestogen treatments of ovarian follicle status and subsequent ovarian superstimulatory responses in cows : *Anim. Reprod. Sci.* 45, 241-253
- (4) Goulding, D., D.H.Williams, O.Duffy, M.P.Boland and J.F.Roche (1990) : Superovulation in heifers given FSH initiated either at Day 2 or Day 10 of the oestrous cycle : *Theriogenology* 34, 767-778
- (5) Gray, B.W., R.E.Cartee, D.A.Stringfellow, M.G.Riddell, K.P.Riddell and J.C.Wright (1992) : The effects of FSH priming and dominant follicular regression on the superovulatory response of cattle : *Theriogenology* 37, 631-639
- (6) Guilbault, L. A., F. Grasso, J. G. Lussier, P. Rouillier and P.Matton (1991) : Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle : *J.Reprod.Fertil.* 91, 81-89
- (7) Huhtinen, M., V.Rainio, J.Aalto, P.Bredbacka and A.Maki-Tanila (1992) : Increased ovarian responses in the absence of a dominant follicle in superovulated cows : *Theriogenology* 37, 457-463
- (8) Lerner, S. P., W.V.Thayne, R. D.Baker, T.Henschen, S.Meredith, E.K.Inskeep, R.A.Dailey, P.E.Lewis and R.L.Butcher (1986) : Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows : *J. Anim. Sci.* 63, 176-183
- (9) Lindsell, C.E., V.Pawlyshyn, A.Bielanski and R. J.Mapletoft (1985) : Superovulation of heifers with FSH-P beginning on four different days of the cycle : *Theriogenology* 23, 203
- (10) Macmillan, K.L., V.K.Taufa, D.R.Barnes and A. M.Day (1991) : Plasma progesterone concentrations in heifers and cows treated with a new intravaginal devices : *Anim. Reprod. Sci.* 26, 25-40
- (11) Macmillan, K.L. and A.J.Peterson (1993) : A new intravaginal progesterone releasing device for cattle (CIDR-B) for oestrous synchronization, increasing pregnancy rates and the treatment of post-partum anoestrus : *Anim. Reprod. Sci.* 33, 1-25
- (12) Pierson, R.A. and O.J.Ginther (1988) : Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle : *Theriogenology* 29, 21-37
- (13) Savio, J. D., L. Keenan, M. P. Boland and J.F. Roche (1988) : Pattern, of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers : *J. Reprod. Fertil.* 83, 663-671
- (14) Sawyer, G.J., P.J.Broadbent and D.F.Dolman (1995) : Ultra-soundmonitored ovarian responses in normal and superovulated cattle given exogenous progesterone at different stages of the oestrous cycle : *Anim. Reprod. Sci.* 38, 187-201
- (15) Singh, S.P., P.J.Broadbent, J.S.M.Hutchinson, R.G.Watt and D.F.Dolman (1996) : Follicular dynamics and superovulatory response in heifers : *Anim.Reprod. Sci.* 43, 183-190
- (16) Sirois, J. and J.E.Fortune (1988) : Ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography : *Biol. Reprod.* 39, 308-317