

Gn-RH 投与により卵胞をコントロールすることが過剰排卵処理及び採胚成績に及ぼす影響 (第1報)

瀬尾哲則・栗原昭広

要 約

牛において安定的に多くの正常胚を得るために、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (Gn-RH) を利用して卵胞をコントロールすることが過剰排卵処理及び採胚成績に及ぼす影響を検討した。

- 1 主席卵胞を除去し、新たな卵巣発育波を促す目的で、発情排卵後9~14日に過剰排卵処理を開始する48時間前にGn-RH200 μ gを投与した場合の採胚成績は低下した。
- 2 通常の過剰排卵処理後における排卵状況の観察では、PG投与後120時間を中心として排卵が確認され、Gn-RH投与により過剰排卵処理後の排卵を同期化することが期待できた。
- 3 過剰排卵処理を行わず、発情排卵後12日にGn-RH100 μ gを投与した場合、中型卵胞及び小型卵胞数が増加し、新たな卵巣発育波の開始が期待できた。

緒 言

牛胚の採取において、現場ではより多くの正常胚を効率的に得ることができる技術が期待されている。今回、Gn-RH投与による卵胞の制御を試み、過剰排卵処理成績および採胚成績に及ぼす影響について検討した。

方 法

1 試験期間

平成11年7月~12年3月

2 供試材料

供試牛は、当場けい養の黒毛和種成雌牛を用いた。

過剰排卵処理に使用したホルモン剤はFSH20AU (デンカ製薬、アントリン10、Lot No.612011) と合成PGF $_{2\alpha}$ 類縁体クロプロステノール0.750mg (住友製薬、エストラメイト) だった。Gn-RHはその類縁物質である酢酸フェルチレリン (武田薬品工業、コンセラル) を使用した。

3 試験の設定

1) 試験1

過剰排卵処理前に主席卵胞を抑制し、新たな卵巣発育波を促す目的で、発情排卵後7~12日目にGn-RH200 μ gを投与し、その48時間後に過剰排卵処理を開始した (試験区)。対照区はGn-RHを投与しないで発情排卵後9~14日目に過剰排卵処理を開始した。各区10頭供試の反転法とした。供試牛の年齢は4.6 \pm 3.3歳 (平均 \pm 標準偏差) だった。

2) 試験2

過剰排卵処理後の排卵状況を把握するため、通常の処理におけるPG投与後、卵巣動態を10頭について観察した。供試牛の年齢は5.1 \pm 2.0歳 (平均 \pm 標準偏差) だった。

3) 試験3

通常の性周期におけるGn-RHの作用を把握するため、過剰排卵処理を行わず、自然発情周期12日目の午前中にGn-RH100 μ gを投与した場合 (試験区) とGn-RH無投与の場合 (対照区) について、各発情周期7~17日目の卵巣動態の観察を行った。各区3頭の反復法とした。供試牛の年齢は2.9 \pm 0.8歳 (平均 \pm 標準偏差) だった。

4 調査項目

1) 卵巣動態

全ての試験で卵巣動態の観察を経時的に行った。すなわち、大型卵胞 (径8mm以上)、中型卵胞 (径6~8mm)、小型卵胞 (径6mm未満) 及び黄体を超音波診断装置 (Aloka社SSD-1200CV、7MHz経膈プローブ使用) により観察した。各試験における卵巣動態の観察過程を表1~表3に示した。

表1 卵巣動態の観察 (試験1)

日 数	処 理	超音波診断
0	Gn-RH投与	午前
1) 過剰 排卵 処理	午前・午後
2		午前
3		
4		
5		
6	人工授精	
7~12		
13	採 胚	採胚時

表2 卵巣動態の観察 (試験2)

日 数	処 理	超音波診断
発情		
1) 過剰 排卵 処理	
2		
3		
4		
5	人工授精	午前・午後
6		午前・午後
7~11		
12	採 胚	採胚時

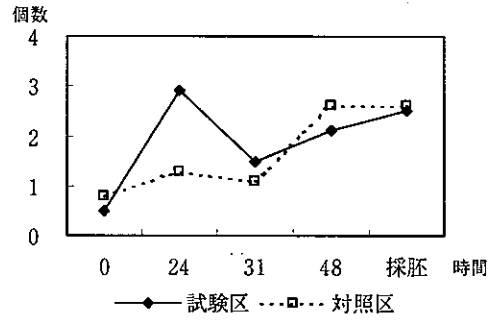


図2 中型卵胞数の推移

表3 卵巣動態の観察 (試験3)

日 数	試験区	対照区
発情 (0)		
7~11	午前	午前
12~14	午前・午後	午前
15~17	午前	午前

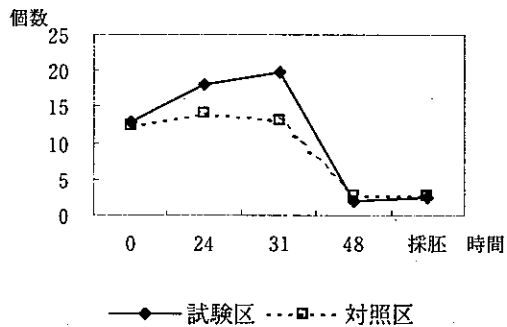


図3 小型卵胞数の推移

2) 血中プロジェステロン

試験1及び試験2で過剰排卵処理直前の値を求めた。

3) 一般血液検査

試験1及び試験2で総コレステロール、HDL-コレステロール、アルブミン、BUN、ASTを測定した。採血は過剰排卵処理直前に行った。

4) 採胚成績

試験1及び試験2で検討した。胚は子宮角灌流法により回収した。

結 果

1 卵巣動態

1) 試験1

試験区、対照区の各型卵胞と黄体の平均個数について、Gn-RH投与時を0時間とした推移を図1~図4に示した。

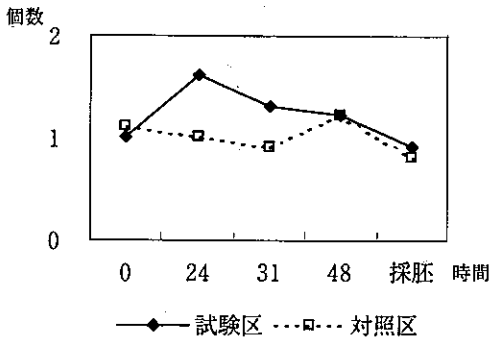


図1 大型卵胞数の推移

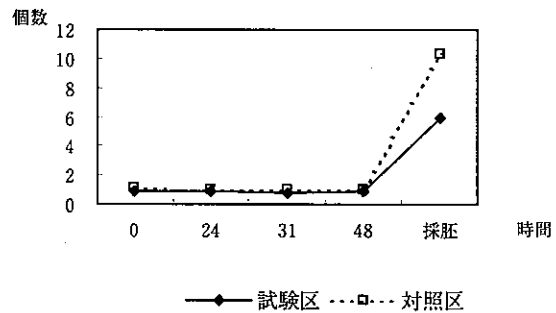


図4 黄体数の推移

試験区は、対照区と比べ、Gn-RH投与後31時間までは大型・中型・小型卵胞数が多かった。黄体数は過剰排卵処理開始まで試験区、対照区とも同等数だったが、採胚時のそれは試験区は対照区の約6割の数に留まった。

2) 試験2

過剰排卵処理におけるPG投与時を0時間とした卵巣動態及び排卵した優勢卵胞 (DF、径5mm以上) の平均個数を図5に示した。PG投与後120時間で最も多くの優勢卵胞の排卵が観察された。

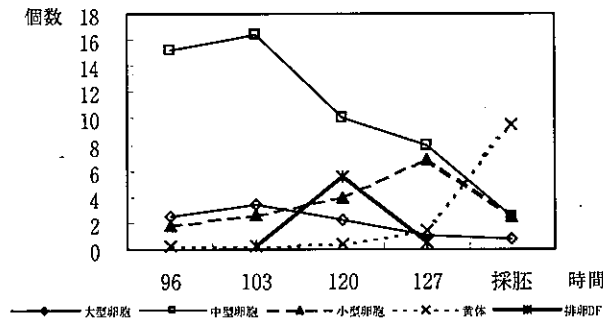


図5 PG投与後の卵巢動態及び排卵DFの推移

3) 試験3

発情排卵日を0日とした、試験区、対照区における大型・中型卵胞数の推移を図6、図7に示した。

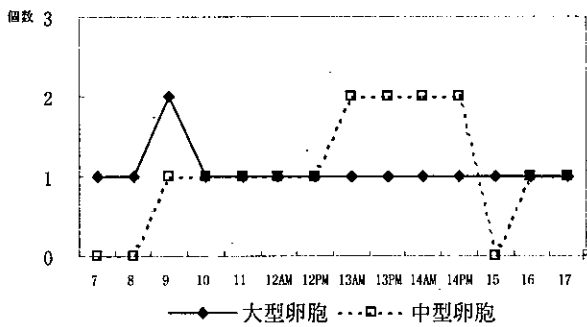


図6 試験区の大型・中型卵胞数の推移

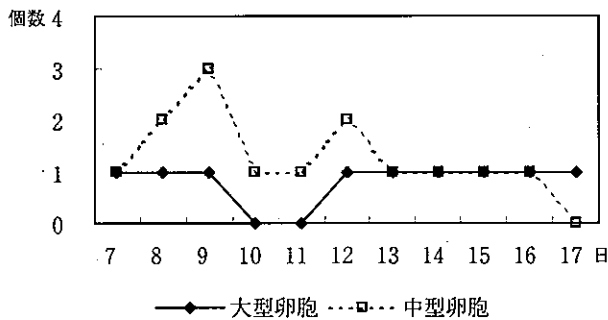


図7 対照区の大型・中型卵胞数の推移

試験区ではGn-RH投与後中型卵胞数が増加したが、大型卵胞数は変化せず、対照区でみられたような大型・中型卵胞の閉鎖は認めなかった。

小型卵胞数について、対照区では大型・中型卵胞の場合と同様に発情後10日で最も低い値を示し、その後緩やかな上昇がみられたが、試験区ではGn-RH投与後3日以降その増加が認められた(図8)。

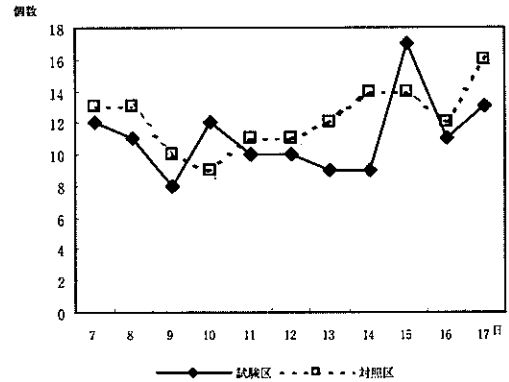


図8 小型卵胞数の推移

2 血中プロゲステロン

1) 試験1

過剰排卵処理開始時の血中プロゲステロン(P)値と総胚数との関係を図9に示したが、相関はみられなかった。

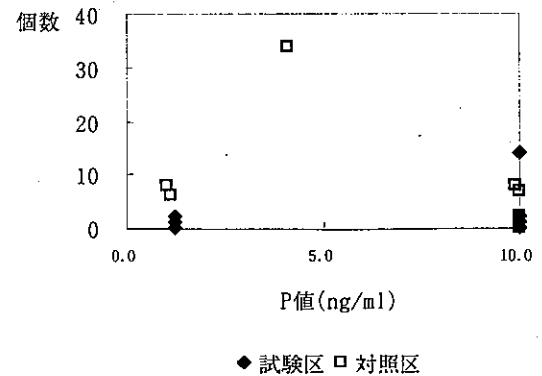


図9 P値と総胚数との関係

2) 試験2

過剰排卵処理開始時の血中プロゲステロン(P)値と総胚数との関係を図10に示したが、試験1の場合と同様相関はみられなかった。

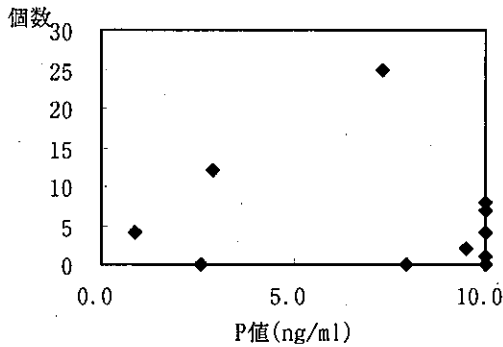


図10 P値と総胚数との関係

3 一般血液検査

表4のように、試験区、対照区とも栄養性は正常範囲内だった。

表4 一般血液検査

項目	試験区	対照区
T-Cho mg/dl	109±12	102±14
HDL-Cho mg/dl	70±10	67±6
Alb g/dl	3.6±0.2	3.4±0.2
BUN mg/dl	8±3	9±3
AST IU/dl	71±15	66±14
I-P mg/dl	6.8±0.5	6.6±0.6

平均±標準偏差

4 採胚成績

1) 試験1

表5のとおり、試験区において総胚数、正常胚数、Aランク胚数は、対照区と比較して有意ではないが低下する傾向がみられた。

表5 採胚成績 (試験1)

項目	試験区	対照区
総胚数	2.0±4.3	6.5±10.3
正常胚数	1.0±2.8	2.6±4.3
Aランク胚数	0.8±2.5	2.5±4.0
変性胚数	0.6±1.3	2.0±4.4
未受精胚数	0.4±0.5	1.6±2.1

平均±標準偏差

2) 試験2

採胚成績を表6に示した。通常の過剰排卵処理による採胚では、その成績に個体差がみられた。

表6 採胚成績 (試験2)

項目	試験区
総胚数	5.2±7.0
正常胚数	1.8±2.2
Aランク胚数	1.7±1.8
変性胚数	0.5±1.4
未受精胚数	2.8±4.4

平均±標準偏差

考 察

牛の過剰排卵処理による採胚は、個体要因（年齢、採胚回数、栄養状態等）や環境要因（気候、牛舎構造等）によりその成績は不安定である。

牛の過剰排卵に負の影響を与える要因の一つとして、卵巢動態における主席卵胞の存在が考えられている。すなわち、過剰排卵処理開始時に主席卵胞が存在しているとFSHに対する卵巢の反応が抑制されて、採胚数の減少、胚の回収率の低減が生じるとされている。特に主席卵胞の発育が処置開始の3日以内に起こった場合において成績が低いといわれている。

近年、超音波誘導で経膈的に吸引針を用いて主席卵胞の卵胞液を吸引除去することにより、過剰排卵処理成績が向上することが報告されているが、特殊な装置、熟練した技術が求められ、現場における普及が進んでいない。そこで、下垂体前葉からのLHやFSHの合成や分泌をコントロールし、繁殖機能を制御するGn-RHを利用して卵胞をコントロールすることを試みた。

試験1では、過剰排卵処理開始前に存在した主席卵胞をGn-RHにより除去し、新たな卵胞発育波の促進を試みたが、主席卵胞と思われた大型卵胞の除去はできなかった。一方、中型卵胞、小型卵胞数はGn-RH投与後増加傾向にあり、卵胞発育波の新生が期待できた。しかし、採胚時における黄体数は試験区が対照区と比べ少なく、その結果、採胚成績も低下した。これは、大型卵胞が残存したことにより卵巢の顆粒層細胞でインヒビンが生成され、それが卵胞波の新生を抑制した可能性があったためと思われた。通常、牛の発情周期では、2~3回の周期性のFSHの増加がみられ、それに伴い連続した卵胞発育波の出現がみられる。卵胞発育波の出現後、血中インヒビン濃度は主席卵胞の発育過程で上昇し、主席卵胞の排卵あるいは発育停止に伴い低下する。そして血中FSH濃度はサージを除いて、主席卵胞の発育過程では低値で推移するといわれている。インヒビンはFSHやhCGによって促進され、また大量のLHによっても促進されるため、今回のGn-RH投与方法ではインヒビンを増加させた可能性が

考えられた。インヒビンについては、抗インヒビン血清を用いた受動免疫法によりインヒビンを中和し、血中FSH濃度を上昇させ、採胚成績の向上を図ることが試みられているが、Gn-RH投与により間接的にインヒビンをコントロールすることができれば、現場において簡易に利用可能な技術になりうると思われた。

Gn-RHの投与について、十分量(250 μ g)の投与により急激なLHの分泌をもたらす、存在する優勢卵胞を排卵させたという報告があるが、Gn-RHは優勢卵胞が選択される以前の投与では卵胞波の発育に影響しないとされている。また、主席卵胞を吸引除去する場合、主席卵胞が機能的に正常である時期に行わないと効果は期待できないといわれ、Gn-RHの投与時期を卵胞発育波に同期させて検討する必要があると思われた。

試験2において、過剰排卵処理でのPG投与後120時間を中心としてDFの排卵が観察されたことから、Gn-RHを利用して排卵を同期化し、未受精卵を低減することが期待できると考えられた。

試験3では、試験区において主席卵胞と思われた大型卵胞の消失はみられなかったが、Gn-RH投与後は中型卵胞、小型卵胞数の増加が観察され、卵胞発育波の新生が期待できると思われ、過剰排卵処理とどのような組み合わせで利用すれば効果が認められるかが、今後の課題となった。

過剰排卵処理開始時の血中P値と総胚数との関係は不明瞭であったため、超音波診断と併せた詳細なホルモン動態の追跡が必要だと思われた。

謝 辞

今回、共同研究としてご協力、ご助言をいただいた京都府淀高原総合牧場、埼玉県農林総合研究センター畜産支所、山梨県酪農試験場、島根県立畜産試験場、愛媛県畜産試験場及び農林水産省家畜改良センター技術部の関係諸氏に深謝します。

引用文献

- 1) 下平乙夫：家畜繁殖領域における超音波診断技術の応用、畜産技術、第472号、18-22 (1994)
- 2) 金子浩之：雌ウシのFSH分泌とインヒビン、畜産の研究、第49巻、第8号、913-916 (1995)
- 3) 武富敏郎：インヒビンの免疫中和法を応用したウシの新しい過剰排卵誘起法の開発、臨床獣医、第16巻、第5号、62-69 (1998)
- 4) 金田義宏：牛の発情周期における卵胞発育波、家畜診療、第46号、第2号、67-75 (1999)

5) 星野邦夫ら：生殖内分泌学的知見、家畜共済の診療指針(II)、107-147 (1993)

6) J.F. Roche et al.：分娩後の牛の繁殖効率、日獣会誌、第52巻、第10号、627-634 (1999)

7) 岩尾健ら：大型卵胞除去が過剰排卵処理に及ぼす影響、鳥取畜試研報、第29号、1-4 (1999)