

## 効率的過剰排卵処理法の開発（第3報）

億 正樹 上村 佳代 小財 千明\* 青山 譲

\* 家畜保健衛生所 業務第一課

### 要 約

主席卵胞（以下：DF）の抑制による良質胚の安定的効率的確保を目的とし、連続過剰排卵処理に用いる安息香酸エストラジオール製剤（以下：EB）の比較及び投与法の検討を行った。

製剤 A については、一過性のピークは認められず、製剤 B については、投与後 6 時間で一過性の血中濃度の上昇が認められ、体内動態の早い製剤であることが推測されたので、以後の採胚試験に供した。

連続採胚は 35 日間隔 2 回の連続採胚を 3 クール行ない、クール間の採卵間隔は 63 日とした。EB は膈内挿入プロジェステロン製剤（以下：CIDR）挿入後 7 日目に 1mg 投与した。試験区は 3 区設定し、A 区は EB 無投与、B 区は毎回投与、C 区は全クール 2 回目のみ投与した。

全試験区の平均回収卵個数は 5.5 個、正常胚数は 3.5 個であった。試験区別の採胚成績は、A 区の平均回収卵個数 4.6 個、正常胚数 3.2 個に対し、B 区の平均回収卵個数 5.4 個、正常胚数 3.2 個と、正常胚数については A 区と同等の成績であったが、C 区の平均回収卵個数 6.5 個、正常胚数は 4.2 個、と A 区を上回る成績であった。回次別の採胚成績は A、B 区で 1 回目よりも 2 回目で低下していたが、C 区で 2 回目の成績が向上していた。

### 緒 言

平成 11 年度の試験により、過剰排卵処理における卵巣内小卵胞確保を目的とした EB の 2mg 投与で、DF を抑制し小卵胞数の増加させることが可能であることが判明したが、採卵成績の向上には至らなかった<sup>1)</sup>。Anderson J は自然状況下での血中エストラジオール（以下：E2）濃度の動きを見ると、スパイク状のピークが認められるだけであり、投与する EB は急峻でショートアクティブでなければならないと述べている<sup>2)</sup>。前年度の成績では、過剰排卵処理時の小卵胞数が EB 投与区で増加し、5mg 投与区よりも 2mg 投与区の成績が良好であったことから、EB の投与により小卵胞数が増加したにもかかわらず、投与量または溶剤の影響により EB が長期にわたり体内に残留し、その後の小卵胞の発育に悪影響を及ぼしていることが考えられた<sup>1)</sup>。また、S Fuentes らは CIDR 挿入後 5 日目に EB を投与すると、6・7 日目に投与した場合に比べ採卵数が少なく正常卵率も低いと述べており<sup>3)</sup>、EB の投与時期の問題が考えられた。

そこで今回、試験で用いる急峻でショートアクティブな体内動態を示す EB 製剤を選定するため、経時的に E2 測定を実施し、その推移を比較した。EB の投与方法については前年度実施した 2mg から 1mg に減量し、従来から問題になっていた 2 回目の採胚成績の低下を改善する目的で、2 回目のみ EB を投与する区を設定した。また、E2 の投与時期を 5 日目から 7 日目に変更し年間合計 6 回の連続採胚を行った。

なお、本試験は、平成 12 年度受精卵移植普及定着化事業の共同試験 11 県（奈良、青森、秋田、宮城、神奈川、長野、静岡、山口、高知、大分、宮崎）によるもので、奈良県で実施した成績を取りまとめたものである。

## 材料及び方法

### 1. ホルモン動態測定

#### 1) 供試 EB 製剤及び投与量

市販安息香酸エストラジオール製剤 A、B、の 2 種を用い、安息香酸エストラジオールとして 5mg を頸部筋肉内投与した。

#### 2) 供試牛及び試験区

黒毛和種 4 頭を製剤 A 投与区と製剤 B 投与区の 2 群に分け、約 60 日間隔で反転した。

#### 3) 採材間隔

測定は、投与直後、投与後 6 時間、12 時間、24 時間、48 時間、72 時間、96 時間の計 7 回頸静脈から採血し、血清分離後凍結保存し測定に供した。

#### 4) ホルモン測定法

E2 は、DCP・エストラジオールキット（ニッポン・ディーピーシー・コーポレーション）を用い測定した。

### 2. 連続採胚試験

#### 1) 過剰排卵処理法

過剰排卵処理は既報に基づき行なった。性周期に関係なく CIDR を挿入し、10 日目（CIDR 挿入日を 0 日）に PVP 溶解 FSH（25AU）と生理食塩水溶解 FSH（5AU）（図-1）を肩前皮下に同時投与し、48 時間後に PGF<sub>2α</sub>（750 μg）投与と同時に CIDR を除去した。発情発現後人工授精し、21 日目に採胚した。

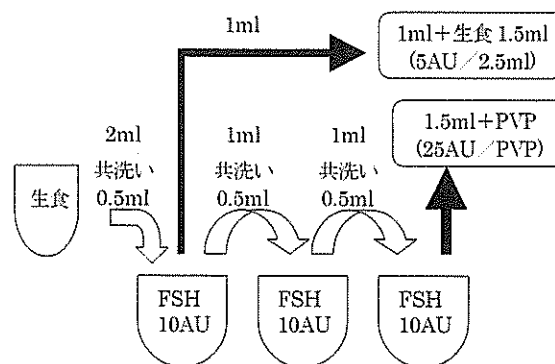


図-1 FSH の調整方法

#### 2) 間隔及び回数

採胚間隔は 35 日間隔での 2 回連続採胚を 1 クールとし、63 日間隔（クール 2 回目と次のクール 1 回目）で 3 クール行なって、年間合計 6 回の採胚を実施した。

#### 3) 供試牛

供試牛は黒毛和種 9 頭を用い、過去の採胚成績から高・中・低の採胚群に分け、各群から 1 頭ずつの 3 頭を 1 つの過剰排卵処理試験区とし、3 区設定した。

#### 4) 試験区

前述の過剰排卵処理を基本に EB を組み合わせた処理区を設定した（図-2）。

A 区 : 対照区（無処置）

B 区 : CIDR 挿入後 7 日目に EB を 1mg 投与した。

C 区 : 各クール 2 回次のみ CIDR 挿入後 7 日目に EB を 1mg 投与した。

なお、EB 製剤は E2 測定により、急峻な動態を呈した製剤を供試した。

#### 5) 調査項目

CIDR 挿入後 0、5、10、21 日目に、超音波断層診断装置を用いて卵胞数を調査するため卵巣診断を

行った。なお、卵胞数は5mm未満を小卵胞、5mmから10mmを中卵胞、10mm以上を大卵胞に分類し調査した。また、採胚当日は採胚成績として、推定黄体数、遺残卵胞数、回収卵数、正常胚数、変性卵数、未受精卵数を調査した。

| 試験区        | 0日目    | 5日目      | 7日目               | 10日目              | 12日目                         | 発情日 | 21日目 |
|------------|--------|----------|-------------------|-------------------|------------------------------|-----|------|
| A区<br>(基本) | CIDR挿入 | → CIDR除去 |                   |                   |                              |     |      |
|            |        |          |                   | PVP+FSH<br>(30AU) | PGF <sub>2α</sub><br>(750μg) | AI  | 採胚   |
| B区         |        |          | E2<br>(1mg)       |                   |                              |     |      |
| C区         |        |          | 2回次のみ<br>E2 (1mg) |                   |                              |     |      |
| 卵巢診断       | ○      | ○        |                   | ○                 |                              |     | ○    |

図-2 過剰排卵処理スケジュール

## 結 果

### 1. ホルモン動態測定

製剤Aについては、一過性のピークは認められず、検出限界以下の濃度で長時間推移していることが考えられた。製剤Bについては、投与後6時間で一過性の血中濃度の上昇が認められ、48時間後には基底値に戻った。以上の結果から、製剤Bは体内動態の消長が早い製剤であることが推測され、以後の採胚試験に供する薬剤に決定した。

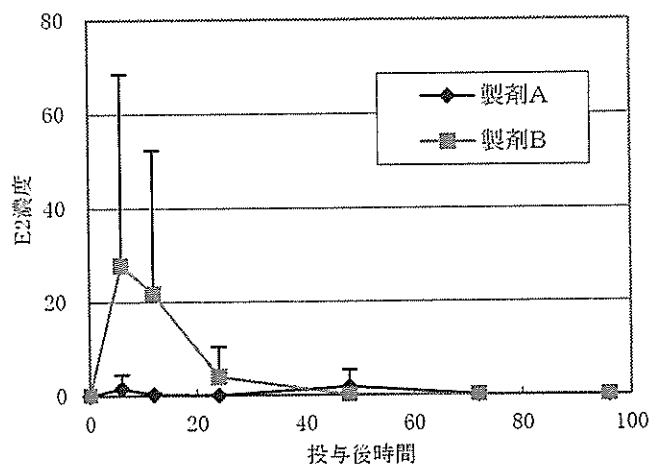


図-3 血中E2濃度の推移

### 2. 採卵試験

全体の平均回収卵個数は5.5個、正常胚数は3.5個、正常胚率は64.3%であった。採卵区分別での採胚成績は、高採胚牛の平均採卵個数は10.4個、正常胚数は6.6個、正常胚率は63.1%、中採胚牛の平均採卵個数は3.3個、正常胚数は2.3個、正常胚率は69.5%、低採胚牛の平均採卵個数は2.8個、正常胚数は1.8個、正常胚率は62.7%であり、特に中～低採胚牛で著しく採胚成績が低下していた。(表-1)

クール別の成績は、1クール目の平均採卵個数は6.2個、正常胚数は4.3個、正常胚率は68.8%であったが、クールが進むにつれ採胚成績は低下した(表-2)。

表-1 採胚区分別採胚成績

| 区分   | 延頭数 | 黄体数  | 遺残卵胞 | 回収卵数 | 正常胚数 | 正常胚率  | 変性胚数 | 未受精卵数 |
|------|-----|------|------|------|------|-------|------|-------|
| 高採胚牛 | 18  | 11.9 | 5.5  | 10.4 | 6.6  | 63.1% | 1.1  | 2.7   |
| 中採胚牛 | 18  | 6.0  | 4.2  | 3.3  | 2.3  | 69.5% | 0.6  | 0.4   |
| 低採胚牛 | 18  | 5.0  | 4.1  | 2.8  | 1.8  | 62.7% | 0.3  | 0.8   |
| 全体   | 54  | 7.6  | 4.6  | 5.5  | 3.5  | 64.3% | 0.6  | 1.3   |

表-2 クール別採胚成績

| 区分   | 延頭数 | 黄体数 | 遺残卵胞 | 回収卵数 | 正常胚数 | 正常胚率  | 変性胚数 | 未受精卵数 |
|------|-----|-----|------|------|------|-------|------|-------|
| 1クール | 18  | 7.9 | 4.5  | 6.2  | 4.3  | 68.8% | 0.9  | 1.1   |
| 2クール | 18  | 7.9 | 4.4  | 5.6  | 4.1  | 72.3% | 0.7  | 0.8   |
| 3クール | 18  | 7.1 | 4.9  | 4.7  | 2.3  | 48.8% | 0.3  | 2.1   |

試験区別の採胚成績は、対照区であるA区の平均採卵個数4.6個、正常胚数は3.2個、正常胚率70.7%に対し、B区は平均回収卵個数5.4個とA区を上回ったが、正常胚率が低下し結果的にA区と同等の成績であった。C区は、平均回収卵個数は6.4個とA区を上回る成績であった(表-3)。

表-3 試験区別採胚成績

| 試験区 | 延頭数 | 黄体数 | 遺残卵胞 | 回収卵数 | 正常胚数 | 正常胚率  | 変性胚数 | 未受精卵数 |
|-----|-----|-----|------|------|------|-------|------|-------|
| A区  | 18  | 6.3 | 4.2  | 4.6  | 3.2  | 70.7% | 0.9  | 0.4   |
| B区  | 18  | 7.3 | 5.1  | 5.4  | 3.2  | 59.2% | 0.3  | 1.9   |
| C区  | 18  | 9.3 | 4.4  | 6.5  | 4.2  | 64.1% | 0.7  | 1.7   |

回次別の採胚成績では1回次の平均採卵個数は6.4個、正常胚数は3.8個、正常胚率は59.9%、2回次の平均採卵個数は4.6個、正常胚数は3.3個、正常胚率は70.4%であり、1回目よりも2回目で低下していた。試験区別成績では、C区の2回目の成績が向上していた(表-4)。

卵胞数の推移は、全試験区において7日目から過剰排卵処理時まで大卵胞数の顕著な変化は認められなかったが、B、C区では小卵胞数の増加が認められた(表-5)。回次別の成績では1回次の小卵胞数は全区で、増加していた。2回次ではA区は減少していたのに対し、E2を投与したB、C区では小卵胞数の増加が認められた(図-4)。

表-4 回次別採胚成績

| 区分  | 黄体数  | 遺残卵胞 | 回収卵数 | 正常胚数 | 正常胚率  | 変性胚数 | 未受精卵数 |
|-----|------|------|------|------|-------|------|-------|
| 1回次 | 9.5  | 4.2  | 6.4  | 3.8  | 59.9% | 0.9  | 1.7   |
| 2回次 | 5.7  | 5.0  | 4.6  | 3.3  | 70.4% | 0.4  | 1.0   |
| A区  |      |      |      |      |       |      |       |
| 1回次 | 7.7  | 3.7  | 6.1  | 4.1  | 67.3% | 1.3  | 0.7   |
| 2回次 | 4.9  | 4.8  | 3.0  | 2.3  | 77.8% | 0.6  | 0.1   |
| B区  |      |      |      |      |       |      |       |
| 1回次 | 10.0 | 4.2  | 7.2  | 3.4  | 47.7% | 0.7  | 3.1   |
| 2回次 | 4.6  | 6.0  | 3.7  | 3.0  | 81.8% | 0.0  | 0.7   |
| C区  |      |      |      |      |       |      |       |
| 1回次 | 10.9 | 4.8  | 5.8  | 3.9  | 67.3% | 0.7  | 1.2   |
| 2回次 | 7.8  | 4.1  | 7.2  | 4.4  | 61.5% | 0.7  | 2.1   |

表-5 卵胞数の推移

| 試験区 | 頭数 | Day 0 |     |      | Day 7 |     |      | Day 10 |     |      | Day 21 |     |     |
|-----|----|-------|-----|------|-------|-----|------|--------|-----|------|--------|-----|-----|
|     |    | 大     | 中   | 小    | 大     | 中   | 小    | 大      | 中   | 小    | 大      | 中   | 小   |
| A区  | 18 | 0.7   | 1.1 | 20.8 | 0.6   | 0.7 | 26.3 | 0.6    | 0.9 | 26.9 | 3.8    | 0.2 | 3.0 |
| B区  | 18 | 0.7   | 0.7 | 25.4 | 0.3   | 1.2 | 25.1 | 0.1    | 1.3 | 28.3 | 3.7    | 0.1 | 2.2 |
| C区  | 18 | 0.8   | 0.7 | 30.3 | 0.6   | 0.6 | 32.8 | 0.7    | 0.4 | 34.6 | 4.0    | 0.3 | 2.8 |
| 全体  | 54 | 0.8   | 0.8 | 25.5 | 0.5   | 0.8 | 28.1 | 0.4    | 0.9 | 29.9 | 3.9    | 0.2 | 2.7 |

考 察

今回、我々はDFの抑制による良質胚の安定的効率的確保を目的とし、連続過剰排卵処理に併用するEB製剤の比較及び投与法の検討を行った。

EB製剤の比較では製剤によりE2の消長に違いがあり、目的に合った製剤を選定する必要があることが判った。本試験では前年度の成績を踏まえ<sup>1)</sup>、EB投与量を1mgとし、製剤はより体内動態の早い薬剤を供し、尚且つ投与時期を5日目から7日目に変更した。その結果、小卵胞の増加が認められたが、DFであると推測される大卵胞の減少は認められなかった。この理由として、形態的にはDFは存在しているが、機能的には退行していたと推察された。したが

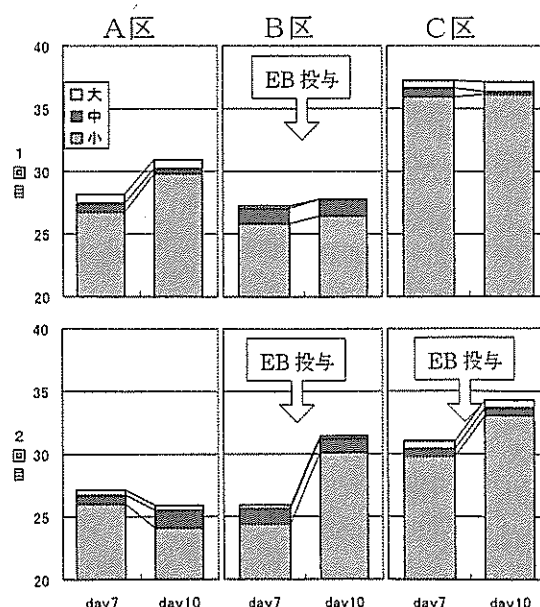


図-4 回次別卵胞数の推移

って、卵胞ウエーブの制御は1 mg 投与でも可能であることが判った。

採胚成績では、通常2回目の成績が低下傾向にあったものが、EBの投与により向上する結果となった。本試験での過剰排卵処理開始日は、EBの投与時期を7日目にするにより、新しいウエーブが起きるとされている日の1日前に相当する。この時期は発育する小卵胞が多く、退行する小卵胞が少ない時期であることが考えられ、このことが好成績を収めた原因であると考えられた。

#### 参考文献

- 1) 億 正樹、上村佳代、小財千明、青山 譲 (2001)、奈良県畜産試験場報告、27
- 2) James C. Anderson (1999)、日本胚移植学雑誌、21(1) : 23-27
- 3) S Fuentes and J. De la Fuente (2000), Theriogenology, 53(1) : 497