

72時間前の大型卵胞除去方法が超音波誘導経膈採卵回収成績に及ぼす影響

有安則夫・坂部吉彦・水木 剛・小田頼政

Influence large follicle removal 72 hours ago affects ultrasound-guided ovum pick-up recovery results.

Norio ARIYASU・Yoshihiko SAKABE・Takeshi MIZUKI・Yorimasa ODA

要 約

経膈採卵実施の72時間前の大卵胞除去が、小卵胞数及び回収卵子数の増減に及ぼす影響について、Gn-RH製剤を100 μ g筋肉内投与を行った区（Gn-RH区）、経膈採卵装置による吸引により除去を行った区（吸引除去区）及び前処理を行わなかった区（無処理区）の3区を設定し検討した。

- 1 Gn-RH区では小卵胞数に増減が認められなかったが、中卵胞数の減少と、大卵胞数の有意な増加が確認された。また、無処理区では小卵胞数の増加が確認される一方で、中卵胞数の有意な減少が確認される結果となった。
- 2 吸引除去区では小卵胞数の有意な増加が認められたが、大卵胞数、中卵胞数の増減はほとんど確認できなかった。

以上から、経膈採卵実施72時間前の大卵胞の除去法では、吸引除去法が前報の48時間前除去と同様に、大型卵胞数を減少させるとともに小卵胞数を有意に増加させることが示唆され、回収卵子数の向上を図る上で有効な方法と考えられる。しかし、Gn-RH投与方法では、小卵胞数及び採卵性には増減が認められなかった。

キーワード： 経膈採卵、乳用牛、大型卵胞除去

緒 言

通常ホルモン処理による採卵が困難となった牛から継続的に卵子を採取する技術として、超音波誘導経膈採卵（以下、経膈採卵）が普及している¹⁾。岡山県総合畜産センター（以下、センター）でもこの方法と体外授精技術を組み合わせ、採卵不良牛から胚及び産子の作出を行っているが²⁻³⁾、回収卵子数の不足や安定化などの課題を抱えている。経膈採卵による回収卵子数は卵巣内に存在する小型卵胞（以下、小卵胞）数と密接に関係している⁴⁾。この小卵胞数は卵胞ウェーブに伴って経時的に変化しており⁵⁾、大型卵胞（以下、大卵胞）や中型卵胞（以下、中卵胞）の存在は混在している小卵胞の発育を抑制している⁶⁾。大卵胞除去による小卵胞数の増加^{6, 7)}や、過剰排卵処理での採卵数増加が報告されている^{8, 9)}が、除去方法や除去するタイミングについての報告は少ない。前報で経膈採卵実施の48時間前の大卵胞吸引除去により、小卵胞数及び回収卵数の増加について良好な成績を得ている¹⁰⁾。しかし、これには①吸引装置が必要、②熟練した技術者が必要、③48時間前という時間的制約があり、簡易な実施は困難であることから、今回は大卵胞除去（以下、前処理）の実施

を72時間前に行うとともに、非熟練者での簡易な実施の可能性について検討するため、大卵胞除去方法が小卵胞数及び回収卵子数の増減に及ぼす影響について検討した。

材料及び方法

1 試験方法

経膈採卵は7日間隔での連続採卵とし、センター繁養のホルスタイン種経産牛（乾乳牛）3頭を試験に用いた。経膈採卵の72時間前に超音波装置により卵巣を確認し、大卵胞が確認されたものに対し、ゴナドトロピン放出ホルモン製剤（Gn-RH、酢酸フェルチレリン、コンセラル注：武田シェリングプラウ）100 μ gの筋肉内投与を行った区（Gn-RH区）、経膈採卵装置による吸引により除去を行った区（吸引除去区）及び前処理を行わなかった区（無処理区）の3区を設定した。各試験区間の相互作用を除くため、試験区の設定は表1のとおりとし、これを1クールとして2回の試験を実施した。なお、大卵胞が確認されなかった場合は、無処理とし試験から除外することとした。

表1. 試験区の設定

試験順序	1	2	3	4	5	6	7	8	9
試験区	Gn-RH区	吸引除去区	無処理区	吸引除去区	無処理区	Gn-RH区	無処理区	Gn-RH区	吸引除去区

それぞれの卵胞の区分については、前報告¹⁾と同様に卵胞の直径が3~5mmのものを小卵胞、5~10mmのものを中卵胞、10mm以上のものを大卵胞とし、小卵胞を吸引の対象とした。

前処理時及び経膈採卵時に卵胞数を超音波画像上で確認するとともに、回収した卵子について、日本家畜人工授精師協会の基準に準じて¹¹⁾、卵丘細胞の付着量と細胞の質によりA(卵丘細胞1/2以上付着)、B(卵丘細胞1/2以下付着)、C(裸化卵子)、D(膨化卵子)、E(細胞質の変性、透明帯のみの卵子)に分類整理し、AからCランクを正常卵とした。

2 経膈採卵装置及び採卵方法

超音波診断装置はSSD-1200CV(Aloka)、プローブはコンベックス型UST-9109-7.5(Aloka)を用い、動物用採卵針(ミサワ医科工業)を接続した。血液凝固を防止するため、採卵針から回収瓶までは、乳酸加リンゲル液に1%子牛血清、抗生物質及びヘパリンを加えた液でリンスした。そして、吸引圧を100mmHgに設定した吸引装置KMAR-5000(COOK)により、卵胞液とともに卵子を回収瓶に吸引採取した。

なお、それぞれの統計処理はカイ二乗検定及びt検定により実施した。

結果及び考察

前処理時及び経膈採卵時の確認卵胞数を表2に示した。Gn-RH区では小卵胞数に増減が認められなかったが、中卵胞数の減少と、大卵胞数の有意な増加が確認された。吸引除去区では小卵胞数の有

意な増加が認められ、大卵胞、中卵胞では増減はほとんど確認できなかった。無処理区では小卵胞数の増加が確認される一方で、中卵胞数の有意な減少が確認される結果となった。Gn-RH区で経膈採卵時に大卵胞数の増加が確認されたのは、前処理時のGn-RH製剤投与により大卵胞の発育及び排卵が誘起され、それに伴い中卵胞が大卵胞へと発育した可能性が考えられる。無処理区でもGn-RH区ほど顕著ではないが、同様に中卵胞数の減少と大卵胞数の増加が確認されている。無処理区ではGn-RH製剤の投与がないため、大卵胞の発育及び排卵が緩やかに起こり、有意な差が現れるほどの急激な大卵胞の増加が見られなかったと考えられる。

今回の試験は小卵胞数の増加が目的であり、その点において吸引除去区は小卵胞数の有意な増加が認められており、目的に合致した結果が得られた。これは、前処理による大卵胞除去が小卵胞の発育を促したものと考えられ、他の報告同様の結果を得るに至った。既報¹⁰⁾に示した48時間前処理と合わせ、大卵胞の吸引除去は小卵胞数の増加に有効であることが示された。なお、前処理時に大卵胞が確認されなかったケースは認められなかったことから、試験からの除外のケースはない。

個体ごとの区分け別の前処理時及び経膈採卵時の確認卵胞数を表3に示している。表のとおりA号牛及びB号牛の除去区において小卵胞数の有意な増加が見られており、またC号牛も含め、それぞれ、小卵胞数は前処理時の約1.5倍程度増加している。しかし、個体ごとにそれぞれ存在する各サイズの卵胞数に差が見られ、もともとの小卵胞数が少ないC号牛では有意な増加に結びつかなかったと考える。

表2. 前処理時及び経膈採卵時の確認卵胞数

区分け		小卵胞数	中卵胞数	大卵胞数	計
Gn-RH区	前処理時	10.11±7.63	4.33±3.97	1.67±0.91 ^a	16.11±8.53
	経膈採卵時	10.61±6.03	3.28±2.08	2.61±1.09 ^b	16.50±6.55
吸引除去区	前処理時	9.17±6.96 ^a	3.06±1.73	2.28±1.27	14.50±7.86 ^a
	経膈採卵時	13.83±9.37 ^b	2.78±1.99	1.89±1.08	18.50±9.26 ^b
無処理区	採卵72時間前	10.78±7.66	3.56±1.98 ^a	1.67±1.03	16.00±8.52
	経膈採卵時	12.94±8.94	1.83±1.38 ^b	2.06±1.21	16.83±8.70

*MEAN±SE

**同列異符号間で有意差あり(P<0.01)

表3. 個体別 前処理時及び経膈採卵時の確認卵胞数

個体	区分け		小卵胞数	中卵胞数	大卵胞数	計
A号牛	Gn-RH区	前処理時	8.83±2.41	5.33±3.90	1.17±0.90	15.33±3.14
		経膈採卵時	11.67±2.92	3.50±0.96	2.17±0.69	17.33±2.87
	吸引除去区	前処理時	8.00±2.24 ^a	4.17±1.57	1.67±1.37	13.83±2.73
		経膈採卵時	13.17±6.18 ^b	3.33±2.13	1.50±0.76	18.00±4.04
	無処理区	前処理時	11.50±3.77	3.83±1.34	1.17±0.69	16.50±2.99
		経膈採卵時	12.33±5.88	2.17±1.34	1.33±0.47	15.83±4.78
B号牛	Gn-RH区	前処理時	17.83±7.31	5.67±4.11	1.83±0.69	25.60±6.12
		経膈採卵時	15.50±5.25	4.17±2.48	3.00±0.58	21.80±5.34
	吸引除去区	前処理時	15.83±7.24	2.83±1.21	3.00±1.29	21.67±8.38
		経膈採卵時	23.00±7.14	2.83±2.03	1.83±1.21	27.67±7.93
	無処理区	前処理時	18.17±5.46	5.17±1.67	1.83±0.90	25.17±4.18
		経膈採卵時	22.50±4.07	1.83±1.07	2.17±0.90	26.50±4.27
C号牛	Gn-RH区	前処理時	3.67±1.70	2.00±2.08	2.00±0.82	7.67±2.81
		経膈採卵時	4.67±2.56	2.17±1.77	2.83±1.57	9.67±1.80
	吸引除去区	前処理時	3.67±1.89	2.17±1.57	1.83±0.90	7.67±1.97
		経膈採卵時	5.33±1.70	2.17±1.34	2.33±0.94	9.83±2.63
	無処理区	前処理時	2.67±1.11	1.67±0.47	2.00±1.15	6.33±1.25
		経膈採卵時	4.00±1.91	1.33±1.60	2.83±1.34	8.17±1.95

*MEAN±SE

*同列異符号間で有意差あり (P<0.05)

また、表4に回収卵子数及びランクについて示した。それぞれ各試験区間に総採卵数及び正常卵数の有意な差は認められなかったが、経膈採卵時に小卵胞数が一番多く確認された吸引除去区が、総採卵数及び正常卵数ともに一番少ない回収結果となった。

この理由については、前処理時の卵巣への穿刺により血管の新生あるいは血液の貯留が起こり、これを超音波画像上で小卵胞と見誤ったとも考えられるが、ある程度経膈採卵技術に熟練したものが見誤る可能性は考えにくく、今後検討を重ね、原因を究明する必要がある。

表4. 回収卵子数及びランク

区分け	総採卵数 正常卵数	Aランク	Bランク	Cランク	Dランク	Eランク
Gn-RH区	11.83±6.94	2.56±1.71	2.89±2.11	4.33±4.31	0.89±1.45	1.17±1.07
	9.78±5.95					
吸引除去区	11.17±6.96	2.39±2.11	2.56±1.67	4.39±3.74	0.72±1.41	1.11±1.05
	9.33±5.83					
無処理区	13.17±8.47	2.61±1.67	3.17±2.29	5.39±4.51	0.94±1.61	1.06±0.97
	11.17±6.84					

*MEAN±SE

あわせて、個体別回収卵子数及びランクについて表5に示しているが、各個体間で総採卵数及び正常卵数ともに有意な差が見られている。これは

表3にも示したとおり、存在する小卵胞数に影響を受けた結果と考える。

表5. 個体別 回収卵子数及びランク

区分け	総採卵数 正常卵数	Aランク	Bランク	Cランク	Dランク	Eランク
A号牛	11.61±3.23 ^a 9.94±2.86 ^a	2.44±1.21 ^c	3.61±1.53 ^a	3.89±2.16 ^a	0.28±0.56 ^a	1.39±1.01
B号牛	19.28±7.38 ^b 16.00±6.06 ^b	3.61±2.24 ^c	3.17±2.39	9.22±3.68 ^b	2.11±1.97 ^b	1.17±1.17
C号牛	5.28±2.68 ^c 4.33±2.24 ^c	1.50±1.21 ^f	1.83±1.71 ^b	1.00±0.82 ^c	0.17±0.37 ^a	0.78±0.79
平均	12.06±7.54 10.09±6.27	2.52±1.84	2.87±2.06	4.70±4.23	0.85±1.50	1.11±1.03

^aMEAN±SE

^{**}a, b, c: 同列異符号間で有意差あり (P<0.01)

^{***}e, f: 同列異符号間で有意差あり (P<0.05)

以上から、前報同様に大卵胞の吸引除去法は、経膈採卵実施48~72時間前に行うことにより経膈採卵時に確認される大卵胞数を減少させるとともに小卵胞数を有意に増加させることが示唆され、回収卵子数の向上を図る上で有効であり、また時間的な制約も受けにくい方法と考えられる。しかしながら、今回の72時間前での処理は回収卵子数の増加が見られていないことから、今後、さらに検討していく必要がある。また、Gn-RH製剤法では、小卵胞数及び採卵性には増減が認められなかった。前処理は経膈採卵だけでなく、通常の過剰排卵処理での回収卵数の増加へも利用が可能¹²⁻¹⁴⁾である。時間的あるいは経膈採卵装置の機材や技術的な面での制約を受けやすいフィールドでの採卵も視野に入れ、Gn-RH製剤での卵胞のコントロールを今後も検討していきたい。

また、現状では超音波画像上で確認される小卵胞のほとんどが回収されていることから、回収数の増加を目指すため、卵巣内の小卵胞数自体の増加を図る必要がある。しかしながら、C号牛のようにもともと小卵胞数の少ない個体も見受けられることから、今後は脂肪酸カルシウムなどの飼料添加剤の投与による飼養管理・栄養管理面の改善による小卵胞数の増加についても併せて検討を行っていく必要がある。

引用文献

- 1) 永井卓(1995): 牛卵胞卵の経膈反復採取と体外受精. 日本胚移植学雑誌17, 34-37.
- 2) 坂部吉彦・有安則夫・小田頼政・中原仁(2001): 経膈採卵を利用した体外受精卵生産システムの確立. 岡山総畜セ研報, 12, 21-24.
- 3) 有安則夫・坂部吉彦・中原仁・水木剛・小田頼政(2004): 岡山県における経膈採卵への取り組み. 日本胚移植学雑誌, 26, 124-130.
- 4) 小林直彦・林尚徳・松野弘・平尾一平・山田雅保(2000): 超音波診断装置による経膈採卵成績と採取した未成熟卵子の体外発生成績. 日本胚移植学雑誌, 7-11.
- 5) 斉藤則夫(2001): ET技術の現状(先進的技術例の報告)について. 家畜診療, 48巻8号, 491-506.
- 6) Bungartz, L. & h. niemann(1994): Assessment of the presence of a dominant follicle and secretion of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. J. Reprod. Fert., 101, 583-591.
- 7) 川俣昌和(1996): 低生産牛における最大卵胞除去後の過剰排卵処理に及ぼす影響. 日本胚移植学雑誌, 18, 1-3.
- 8) 小林修一(2000): 牛発情周期における卵胞波の解析と過剰排卵反応. 日本胚移植学雑誌, 12-16.
- 9) 本間穂積ら(2000): 牛の発情周期後期における大型卵胞除去がその後の過剰排卵処置に与える影響. 東日本家畜受精卵移植技術研究会大会講演要旨, 30-31.
- 10) 坂部吉彦・有安則夫・小田頼政(2003): 大型卵胞の除去が超音波誘導経膈採卵回収成績に及ぼす影響. 岡山総畜セ研報, 14, 27-30.
- 11) 日本家畜人工授精師協会(1993): 家畜人工授精講習会テキスト(家畜体外受精卵移植編), 93-94.
- 12) 高仁敏光・岡崎尚之・前原智・白石忠昭(2000): 大型卵胞除去がウシの過剰排卵処理に与える影響(第1報). 島根畜試研報, 33, 10-12.
- 13) 高仁敏光・岡崎尚之・前原智・白石忠昭(2000):

大型卵胞除去がウシの過剰排卵処理に与える影響（第2報）．島根畜試研報, 33, 13-16.

14) 岡崎尚之・高仁敏光・長谷川清寿・白石忠昭

(2001)：大型卵胞除去がウシの過剰排卵処理に与える影響（第3報）．島根畜試研報, 34, 1-5.