

## 黒毛和種経産牛の過剰排卵処理反応差に影響を及ぼす要因の検討

佐々木恵美 山田彰司 長谷川清寿 安部亜津子 安部茂樹

**要約** 供胚牛における過剰排卵処理に伴う卵胞動態の観察と血中ホルモン濃度の測定を行い、外因性性腺刺激ホルモンによる過剰排卵処理反応差に影響を及ぼす要因について検討した。場内で繋養する黒毛和種経産牛12頭に過剰排卵処理としてFSH製剤20AUを3日間漸減投与、処理開始48時間後にPGF<sub>2</sub>製剤を投与し、AI後7日目に胚採取を行った。超音波画像診断装置により供胚牛の大卵胞数(8mm)、中卵胞数(5~8mm)および排卵数を計測した。また、供胚牛の末梢血を採取しP4、E2およびLH濃度を測定した。過剰排卵処理反応差により、供試牛を反応良好群(良好群; n=9)と反応不良群(不良群; n=3)に区分し比較検討した。PG投与48時間後における大卵胞数は、良好群(29.0±9.7個)が不良群(5.3±1.2個)より多く、PG投与72時間後における排卵数も良好群(16.3±10.5個)が不良群(0.3±0.5個)より多かった。血中E2濃度は、良好群ではPG投与32~60時間後に43.1~205.4pg/mLに上昇したが、不良群ではPG投与後5.8~30.5pg/mLで推移し明らかな上昇は認められなかった。LH濃度は、良好群は全頭でPG投与34~44時間後にサージが認められたのに対し、不良群ではサージが遅延または認められなかった。以上のことから、不良群において外因性性腺刺激ホルモンへの反応が低い要因として、卵胞膜内膜や顆粒層細胞における性腺刺激ホルモンレセプターの障害が示唆された。

**キーワード** : 黒毛和種 供胚牛 過剰排卵処理 時間分解蛍光免疫測定 ホルモン

牛の胚移植技術においては、供胚牛からの効率的かつ安定的な胚の採取が重要であるが、実際には胚採取における過剰排卵処理への反応は個体によって大きな差が生じている。この要因として供胚牛の品種、産歴や年齢、投与するホルモン製剤の種類や量などが指摘されている<sup>1)</sup>が、いずれも原因は解明されていない。これらの原因を究明するためには、過剰排卵処理に伴う供胚牛の血中ホルモン動態の調査が必要であるが、胚採取成績と併せて供胚牛の血中ホルモン動態について検討されている報告は少ない。

そこで今回、供胚牛における過剰排卵処理に伴う卵胞動態の観察と血中ホルモン濃度の測定を行い、過剰排卵処理反応差に影響を及ぼす要因について検討した。

### 材料および方法

調査期間および供試牛

調査期間は平成13年6月から10月まで、場内に繋養する黒毛和種経産牛12頭を供試した。

過剰排卵処理および胚採取

過剰排卵処理は発情後9~14日目に卵胞刺激ホルモン(FSH)製剤(アントリンR-10、デンカ製薬)20AUを3日間漸減投与し、処理開始48時間後にプロスタグランジンF<sub>2</sub>類縁体(PG)(エストラメイ

ト、武田シエリング・プラウアニマルヘルス)750μgを投与した。PG投与56時間または72時間後に1ないし2回人工授精(AI)を行った。胚採取はAI後7日目にを行い、超音波画像診断装置(ALOKA、SSD-900SE)を用いた胚採取時の黄体数の計測と回収胚数の調査を行った。

卵巣動態の観察

卵巣動態の観察は、超音波画像診断装置(ALOKA、SSD-900SE)を用いて処理開始時およびPG投与48~104時間後に行い、大卵胞(8mm)および中卵胞(5~8mm)数を計測した。排卵数は、計測した大卵胞数と前回の大卵胞数との差により求めた。血中ホルモン濃度の測定

末梢血の採取は、処理開始24時間前からPG投与62時間後まで行った。頸静脈よりヘパリン加試験管に採取した血液はただちに氷冷し、4℃、3,000rpm、15分間遠心分離した。得られた血漿は測定時まで-30℃で凍結保存した。血中ホルモン濃度の測定は、プロジェステロン(P4)、エストラジオール17(E2)および黄体形成ホルモン(LH)について、時間分解蛍光免疫測定によって行った。

過剰排卵処理への反応差に影響を及ぼす要因の検討  
過剰排卵処理反応差に影響を及ぼす要因を検討するため、反応差により供試牛を2群に区分した。過

剰排卵処理反応は胚採取時の推定黄体数および回収胚数により判定し、推定黄体数および回収胚数がともに10個以上の牛群を反応良好群（良好群；n=9）、9個以下の牛群を反応不良群（不良群；n=3）として、各群の卵巢動態と血中ホルモン動態を比較検討した。

統計処理

卵胞数および排卵数について、一元配置分散分析により統計処理を行った。

結 果

胚採取成績

良好群と不良群の胚採取時における推定黄体数はそれぞれ20.7±7.8個、1.7±1.2個、回収胚数はそれぞれ20.7±12.2個、0.3±0.5個、正常胚数はそれぞれ14.2±9.7個、0.3±0.5個であった（表1）。

卵巢動態

過剰排卵処理開始時の大卵胞数は良好群が2.2±2.2個、不良群が2.0±0.8個、中卵胞数は良好群が4.9個±2.4個、不良群が8.7個±7.6個であり、いずれも2群に差は認められなかった。しかし、良好群のPG投与48、56および72時間後における大卵胞数（29.0±9.7個、28.8±9.6個および12.4±3.8個）は、不良群の大卵胞数（5.3±1.2個、6.3±2.6個および6.0±2.9個）と比較して有意に多かった（P<0.05）。また、PG投与72時間後の排卵数も良好群（16.3±

表1. 胚採取成績

	胚採取時 推定黄体数	回収胚数	正常胚数
反応良好群 (n=9)	20.7±7.8 <sup>1)</sup>	20.7±12.2	14.2±9.7
反応不良群 (n=3)	1.7±1.2	0.3±0.5	0.3±0.5

1) mean±SD

表2. 卵胞数および排卵数の推移

	処理開始	PG投与後経過時間						
		48時間	56時間	72時間	80時間	96時間	104時間	
大卵胞数 (8mm≤)	反応良好群	2.2±2.2 <sup>1)</sup>	29.0±9.7 <sup>a</sup>	28.8±9.6 <sup>a</sup>	12.4±3.8 <sup>a</sup>	10.4±5.7	9.8±5.9	9.1±5.7
	反応不良群	2.0±0.8	5.3±1.2 <sup>b</sup>	6.3±2.6 <sup>b</sup>	6.0±2.9 <sup>c</sup>	5.3±1.9	4.7±1.7	4.7±2.5
中卵胞数 (5~8mm)	反応良好群	4.9±2.4	10.7±6.1	10.1±6.7	10.7±5.0	11.4±6.0	10.1±6.7	9.9±4.6
	反応不良群	8.7±7.6	9.3±3.3	9.3±1.7	8.3±3.7	6.0±2.2	6.7±3.3	7.3±1.2
排卵数	反応良好群		1.6±1.6	16.3±10.5 <sup>x</sup>	3.0±4.1	1.1±1.3	1.2±1.7	
	反応不良群		0.3±0.5	0.3±0.5 <sup>y</sup>	1.0±0.8	1.0±0.8	0.3±0.5	

経過時間毎の異符号間に有意差あり (a,b:P<0.01, a,c:P<0.05, x,y:P<0.05)

1) mean±SD

10.5個) が不良群 (0.3±0.5個) に比較して有意 (P<0.05) に多かった (表2)。

血中ホルモン濃度の動態

P4濃度は、2群ともPG投与後急激な低下が認められ、投与32時間後以降は1ng/mL以下で推移した (図1)。E2濃度は、良好群ではPG投与32~48時間後に43.1~205.4pg/mLに上昇したのに対して、不良群ではPG投与後5.8~30.5pg/mLで推移し、明らかな上昇が認められなかった (図2)。LH濃度は、良好群は全頭でPG投与34~44時間後に8.4~18.3ng/mLのサージが認められたのに対して、不良群では3頭中2頭が良好群と比較してサージが遅延し (PG投与56時間後、3.3ng/mL および62時間後、13.4ng/mL)、1頭はPG投与62時間後までサージが認められなかった (図3)。

考 察

牛の胚採取において問題となるのは、供胚牛における過剰排卵処理への卵巢の反応差であり、胚採取成績に大きな影響を及ぼしている。本試験では、供胚牛における超音波画像診断装置を用いた卵巢動態の観察と血中ホルモン動態の調査を行い、過剰排卵処理への良好群と不良群について比較し、反応差が生じる要因について検討した。

過剰排卵処理開始時の大卵胞数と中卵胞数は、2群間に有意差は認められなかった。しかし、良好群ではPG投与48時間後から大卵胞数の増加が認められ、56~72時間後に排卵が集中したのに対して、不良群では大卵胞数の増加が少なく、排卵もほとんど認められなかった。直径1~4mmの小卵胞はFSHに感受性を有すると報告されており<sup>3)</sup>、小林らは処理開始時の小卵胞数 (直径2~3mm) と採取胚数に正の相関が認められたとしている<sup>4)</sup>。良好群では、処

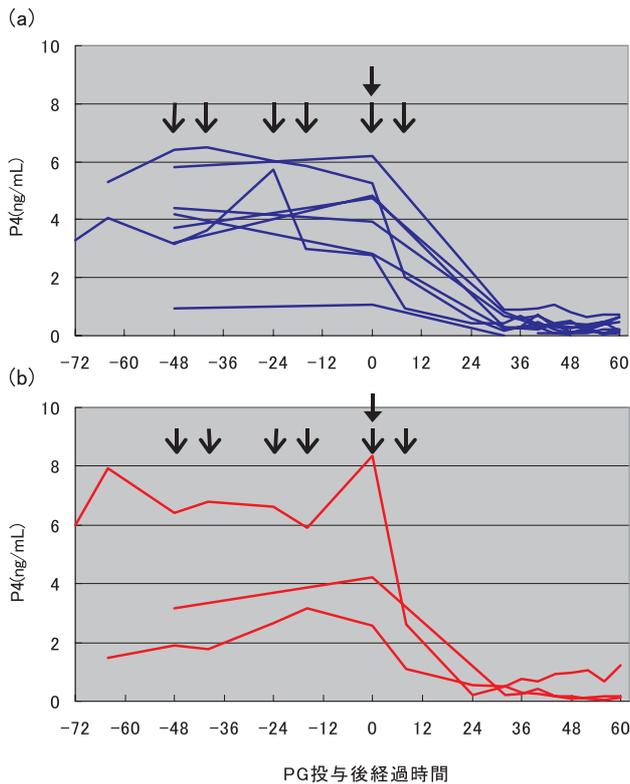


図1. 供胚牛における血中P4濃度

(a)反応良好群、(b)反応不良群を示す。PG投与を0時間とする。  
↓:FSH投与、▼:PG投与

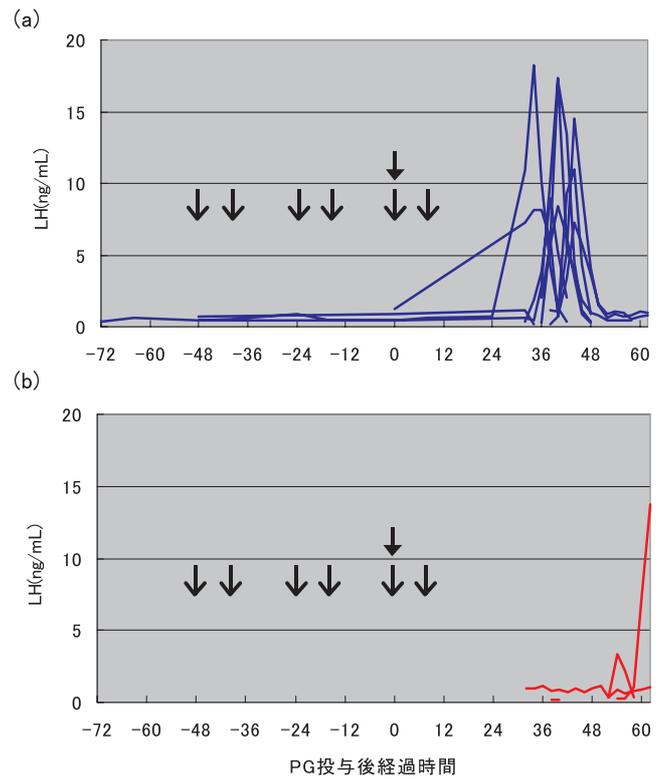


図3. 供胚牛における血中LH濃度

(a)反応良好群、(b)反応不良群を示す。PG投与を0時間とする。  
↓:FSH投与、▼:PG投与

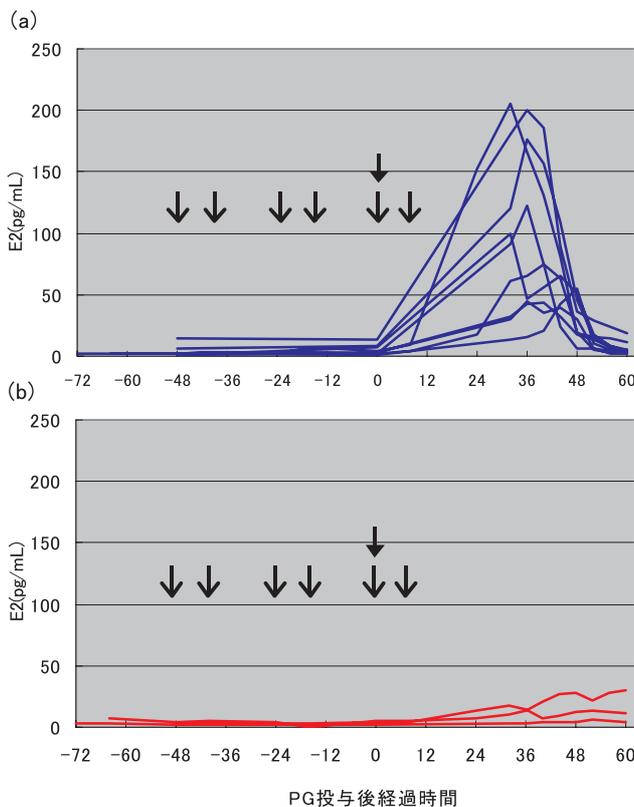


図2. 供胚牛における血中E2濃度

(a)反応良好群、(b)反応不良群を示す。PG投与を0時間とする。  
↓:FSH投与、▼:PG投与

理開始時の卵胞数と比較してPG投与48時間後の卵胞数が著しく増加していることから、4 mm以下の小卵胞がFSH作用によって中卵胞や大卵胞へ移行したと考えられた。一方、不良群では良好群と比較してPG投与48時間後の卵胞数が少ないことから、小卵胞の中卵胞や大卵胞への移行が少なかったと考えられた。

血中ホルモン動態は、P4濃度は2群でほぼ同様に推移したが、E2濃度は良好群ではPG投与32時間後から上昇が認められたのに対して、不良群では明らかな濃度の上昇が認められなかった。また、良好群ではE2レベルが正常の性周期の約10~20倍を示す個体が約半数認められたが、これは大卵胞数の増加によるものと思われた。LH濃度は良好群の全頭でPG投与34~44時間後にサージが認められたのに対して、不良群ではサージが遅延または認められなかった。

卵胞では、卵胞膜内膜にLHレセプターが存在する。FSH製剤による過剰排卵処理期間中は黄体が存在するため、P4によって視床下部におけるGnRHパルスが抑制され、LH分泌が抑制される。PG投与によりP4レベルが低下し、GnRHパルスが抑制を解除されることによって、LHが大量に分泌される

ようになる。LHが卵胞膜内膜に作用するとアンドロジェンが合成され顆粒層細胞へ移行する。FSHの作用により活性化されたアロマターゼによって、アンドロジェンはエストロジェンに変換される。このエストロジェンはさらに顆粒層細胞に作用してFSHレセプター数を増加させFSH作用を増強する。このようにして卵胞が発育し、成熟した卵胞から大量のエストロジェンが分泌され、ポジティブ・フィードバックで視床下部からLHRH、次いで下垂体からLHの大量放出（サージ）が誘起され排卵が起こる<sup>5)</sup>。

不良群ではPG投与によるP4濃度の低下が認められるため、GnRHパルスの抑制は解除されたと考えられる。しかし、LHの卵胞膜内膜への作用に続いて起こるE2濃度の上昇とLHサージが認められないため、卵胞膜内膜でのLHレセプターの障害が示唆された。さらに、過剰排卵処理により血中FSH濃度が高く維持されるにも関わらず、卵胞の発育とこれに続くE2濃度の上昇が認められないことから、顆粒層細胞でのFSHレセプターの障害についても示唆された。

しかし、レセプターの障害を証明するためには、レセプターの存在やmRNAの発現を確認する必要があり、これらは今後の課題である。また、卵胞発育の過程では、主席卵胞からのインヒビンおよびエストロジェンの分泌が増加し、下垂体からのFSH分泌が抑制されることによって卵胞の選抜がおこる。特にインヒビンは、過剰排卵処理牛において排卵前のFSH分泌を抑制するとの報告があり<sup>2)</sup>、胚採取成績

に影響を及ぼすと考えられる。さらに、インヒビンのサブユニットの鎖ダイマーであるアクチビンは、インヒビンの作用とは逆にFSHの分泌を促進すると報告されている<sup>6)</sup>。したがって、さらに詳細な解析のためには、本試験で行っていないFSH濃度の測定の他にインヒビンやアクチビンなどの濃度の測定が必要と考えられた。

#### 謝 辞

本試験を行うにあたり、血中ホルモン濃度の測定について多大なるご指導ご協力をいただきました独立行政法人農業生物資源研究所発生分化研究グループ生殖再生研究チームの皆様には深謝します。

#### 参 考 文 献

- 1) 前原智ら．島根県立畜産試験場研究報告，32：1-5．1999．
- 2) Kaneko H. et al. The Japanese Journal of Animal Reproduction, 36 (2) : 77-82. 1990.
- 3) 金子浩之ら．新しい家畜繁殖学 臨床獣医臨時増刊号，73-84．2002．
- 4) 小林修一ら．日本畜産学会報，68 (1) : 45-53．1997．
- 5) 田谷一善．新しい家畜繁殖学 臨床獣医臨時増刊号：11-19．2002．
- 6) 日本比較内分泌学会編．ホルモンハンドブック：279-285．1988．