

## 発情周期の異なる時期における過剰排卵処置が 超音波診断による卵胞発育と卵巣摘出による卵胞評価に与える影響

上村 俊一・浜崎 幸一・牛之浜 寛治・浜名 克己・木村 順平\*<sup>1)</sup>

(家畜臨床繁殖学研究室)

平成12年 8月25日 受理

### In vivo Ultrasonography and Ovariectomy for Evaluating Individual Follicles Superovulated on Different Stage of Estrous Cycles in Japanese Black Cows

Shunichi KAMIMURA, Kohichi HAMASAKI, Kanji USHINOHAMA,

Katsumi HAMANA and Junpei KIMURA\*<sup>1)</sup>

(Laboratory of Theriogenology)

#### 緒 言

ウシの過剰排卵処置に対する卵巣反応では、成熟卵胞数の違いや、胚回収時に未受精卵や移植不能胚が産生されるなど個体差があり、良質な胚を常に一定の割合で産生するためには多くの課題が残されている。このような個体差の一因として、過剰排卵処置開始時の卵巣の卵胞波が様々で、ウシによっては性腺刺激ホルモンを投与しても卵胞発育が必ずしも促進されないことがあげられる<sup>1, 2, 3)</sup>。そこで、発情周期の異なる時期における過剰排卵処置が、卵胞の発育に及ぼす影響を超音波診断装置により観察するとともに、過剰排卵処置後、卵巣を摘出して、個々の卵胞を組織内分泌学的に評価した。

#### 材 料 と 方 法

供試牛および過剰排卵処置：試験期間は、1998年6月～1999年7月に実施した。供試牛として、鹿児島大学農学部附属牧場で飼養されている臨床的に健康な黒毛和種経産牛7頭を用いた。まず、直腸検査で黄体期と思われる供試牛に対し、PGF<sub>2α</sub>（ジノプロストとして総量25mg，動物用プロナルゴンF，ファルマシア・アップジョン，東京）を分割投与（午前8時15mg，午後8時10mg）し、発情を誘起した。

直腸検査による排卵確認日を発情周期の1日（Day 1）として、過剰排卵処置を発情周期のDay

7に3頭（7日群）およびDay10に4頭（10日群）に行った。過剰排卵処置としては、ブタ下垂体抽出の卵胞刺激ホルモン（follicle-stimulating hormone, FSH）であるp-FSH（アントリン10，デンカ製薬，東京）28AUを12時間間隔で4日間漸減投与した。初回FSH投与後、48時間と60時間にそれぞれPGF<sub>2α</sub>を15mgと10mg頸部筋肉内に注射した。

供試牛の卵巣を、PGF<sub>2α</sub>による発情誘起からFSH処置96時間まで、7.5MHzのリニア型探触子を装着した超音波診断装置（EUB-405，日立メディコ，東京）により12時間毎に観察した。卵胞直径が4mm以上になった時点を卵胞の出現とし、特に処置前の最大直径卵胞（dominant follicle, DF；優性卵胞）と卵胞直径が2番目に大きい最大次席卵胞（largest subordinate follicle, LSF；次席卵胞）の直径の推移を調べた。また、卵胞のサイズをその直径によりS：<4mm，M：4～7mm，L：>7mmに分類し、個々の卵胞の発育状態を観察した。超音波による観察では、直径4mm以上の卵胞について、その形状の変化と卵巣内における位置を確認するため、ビデオに録画し、既報<sup>12)</sup>に従い、後で詳細に検討した。その際、卵胞には超音波画像上で番号を付け、卵胞の個体識別を行った。

初回FSH投与後、100時間目に左けん部切開により卵巣を摘出し、直ちに生理食塩液に浸した後、直径4mm以上の卵胞を実体顕微鏡下で切り出した。卵胞の同定は、摘出した卵巣を生理食塩液を満たした水槽内に浸し、超音波診断装置を用いて生体での

\*<sup>1)</sup> 日本大学生物資源科学部，藤沢市亀井野  
Nihon University, Kameino, Fujisawa-shi

観察時と同一画像が描出される方向を探し、超音波画像上で金属製の鉗子にて卵胞表面に触れることにより各卵胞を識別した。

各卵胞の同定後、直径4 mm以上の卵胞を単離し、それぞれ生理食塩液に浸し、冷蔵保存した。各卵胞は、シャーレにマウントし、実体顕微鏡下で眼科鉗を用いて1辺に小切開を入れ、浮遊または卵胞壁にある卵子を回収後、卵胞液を採取した。

回収卵子は、卵子-卵丘細胞複合体の状態で行酸緩衝液 (PBS) に移し、染色を行うまでインキュベーターで保存した (38°C, CO<sub>2</sub> 5%)。その後、卵胞液はオートピペットでシャーレ内より試験管に回収し、4°C, 5分間, 3000rpm で遠心分離を行い、細胞成分を分離後、卵胞液上清を回収して測定まで-30°C で冷凍保存した。卵子および卵胞液を採取後、卵胞壁はブアン液にて固定し、常法によりパラフィン包埋後、4 μm で組織切片を作成し、Hematoxyline-eosin 染色により、組織学的に検査した。

卵子の染色：回収された卵子について、生殖細胞を染色する Calcein-AM と死細胞を染色する Propidium Iodide の蛍光プローブを用いて、蛍光二重染色を行った。染色直前にアスピレーションにて卵丘細胞を除去した後、調整蛍光二重染色液 (Calcein: 4 μM, Propidium Iodide: 8 μM, PBS) のドロップに15分間, 38°C で浸透し、蛍光顕微鏡用スライドガラス (蛍光顕微鏡用 S-0313, NEO 白

緑磨No.1, Matsunami, 東京) にマウントし、蛍光顕微鏡にて観察した。

12時間毎の超音波診断装置による観察時、頸静脈より採血し、遠心分離した血漿により、血中エストラジオール-17β (E<sub>2</sub>) 濃度とプロジェステロン (P<sub>4</sub>) 濃度を2抗体RIA法<sup>11)</sup>により測定した。また、卵胞液についても、蒸留水で100~500倍に希釈後、同様に性ホルモン濃度を測定した。

統計処理：得られたデータは、7日群と10日群ごとに平均値±標準偏差で示し、超音波診断による卵胞数と卵胞直径の平均値については、時間の効果に関して分散分析を行った。各卵胞および各群間の有意性の検定は、Student-t検定を実施した。

## 結 果

優性卵胞 (DF) の直径は、両牛群とも Day 5 以後で次席卵胞 (LSF) より有意に大きくなった (P<0.01, Fig. 1)。7日群のDFは、Day 7に最大直径 (12.2mm) となり、10日群では Day 8に最大直径 (12.7mm) となり、その後発育を停止した。Sサイズの卵胞数は、7日群で初回FSH投与時の30.7個から、最終投与時には17.0個と減少し、Lサイズの卵胞数は1.0個から15.7個へと増加した (Fig. 2)。10日群では、Sサイズの卵胞数は、32.8個から17.5個へと減少し、Lサイズは1.3個から31.5個へと増加した。過剰排卵処置中の血中E<sub>2</sub>濃度は、10日群

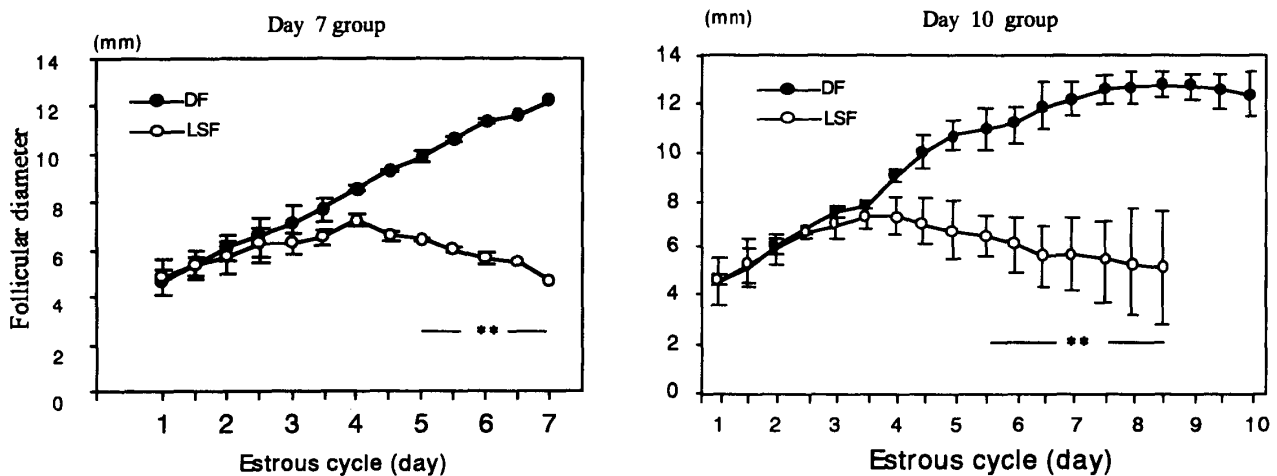


Fig.1. Profile of dominant follicles (DF) and largest subordinate follicles (LSF) before superovulation treatment in Day 7 and Day 10 group.

\*\* : Diameters of DF showed significantly larger than those of LSF since day 5 in estrous cycle in both Day 7 and Day 10 group (P<0.01).

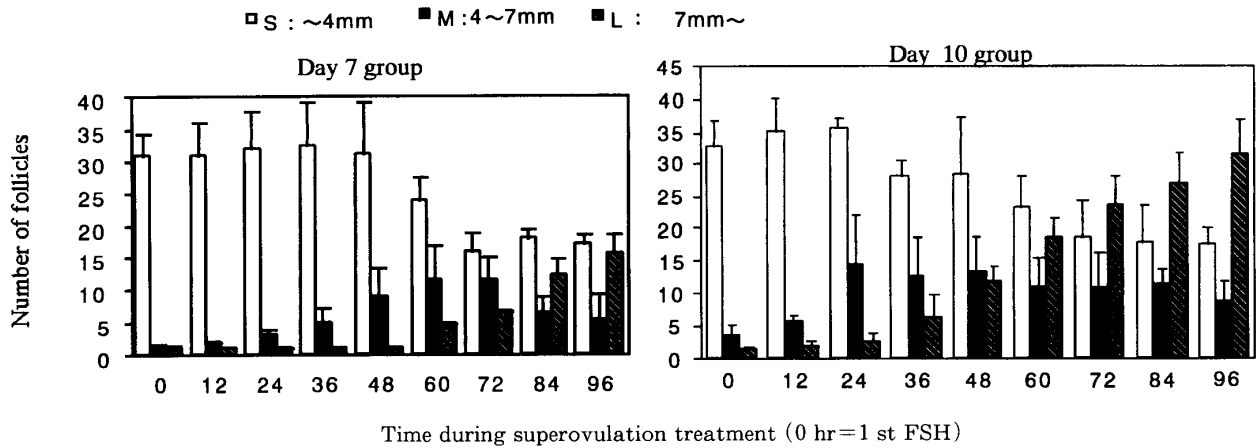


Fig.2. Number of follicles during superovulation treatment in Day 7 and Day 10 group.

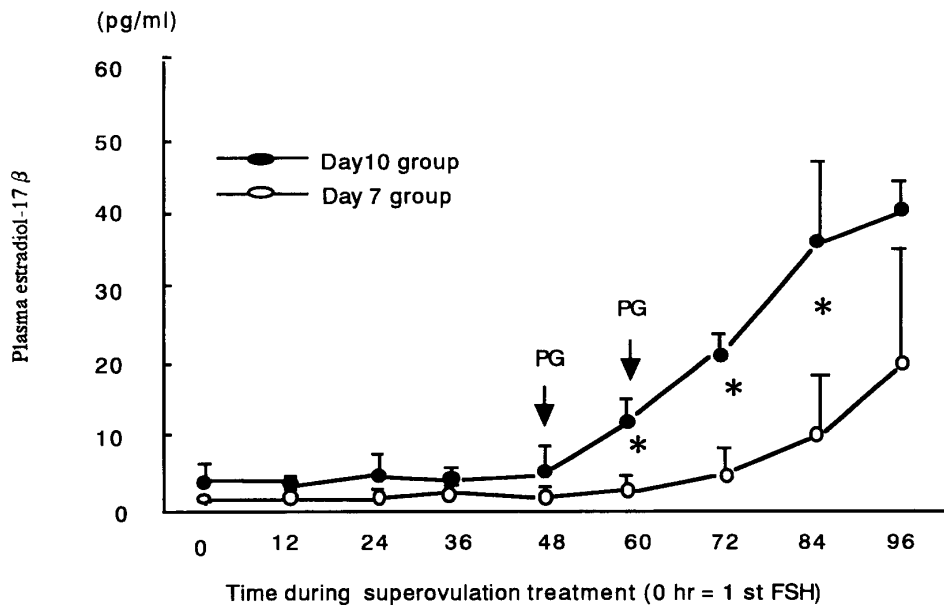


Fig.3. Plasma concentrations of estradiol-17β during superovulation treatment.

PG: Administrations of prostaglandin F<sub>2α</sub> at 48 and 60 hr during superovulation treatment.  
\*: p < 0.05.

が7日群より60時間以後有意に高くなった (P < 0.05, Fig. 3).

直径4 mm以上の223個の卵胞が過剰排卵処置中、超音波診断装置で観察され、うち170個が単離された(卵胞回収率73%)。さらに、それらの卵胞から、実体顕微鏡下で123個の卵子が回収された(卵子回収率72%)。卵胞液中の性ホルモン濃度では、7日群と10日群に有意差はみられなかったが、過剰排卵

処置中、後半に出現した卵胞ほどE<sub>2</sub>とP<sub>4</sub>の比(E/P)が増加する傾向にあった(Fig. 4)。

合計で、92個の卵子をCalcein-AMで染色したが、いずれも特有な緑黄蛍光を発し、生存していることが確認された。

卵胞の組織学的所見には、牛群間による違いはみられなかった(Fig. 5)。しかし、過剰排卵処置開始時にすでに存在したDFは、顆粒層細胞が遊離

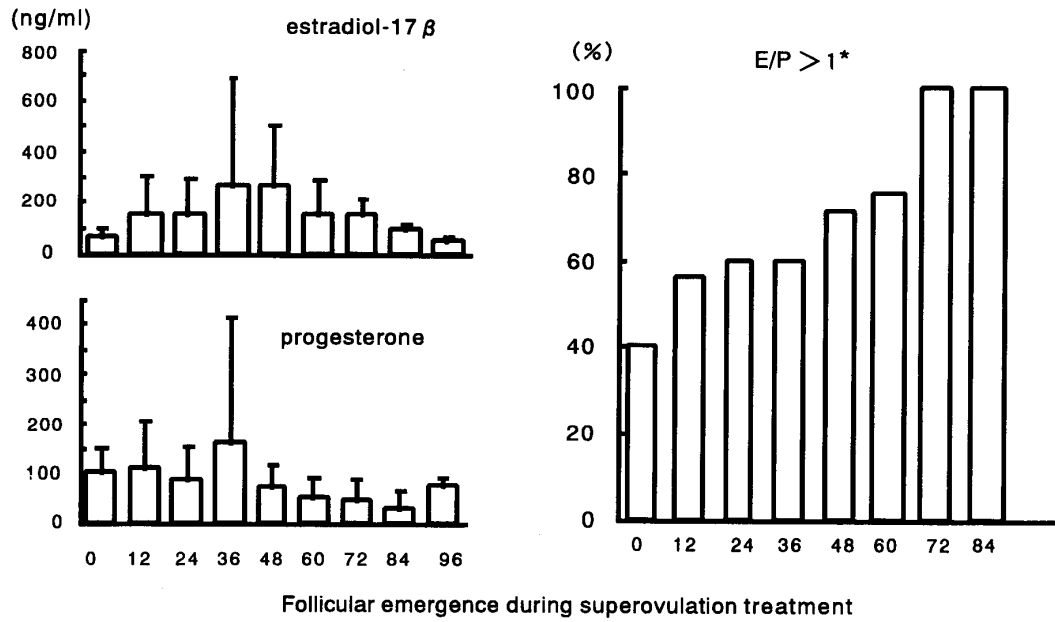


Fig.4. Intrafollicular steroid hormones depending on the emergence of follicles during superovulation treatment.

\*E/P: Ratio of concentrations in estradiol-17β and progesterone.

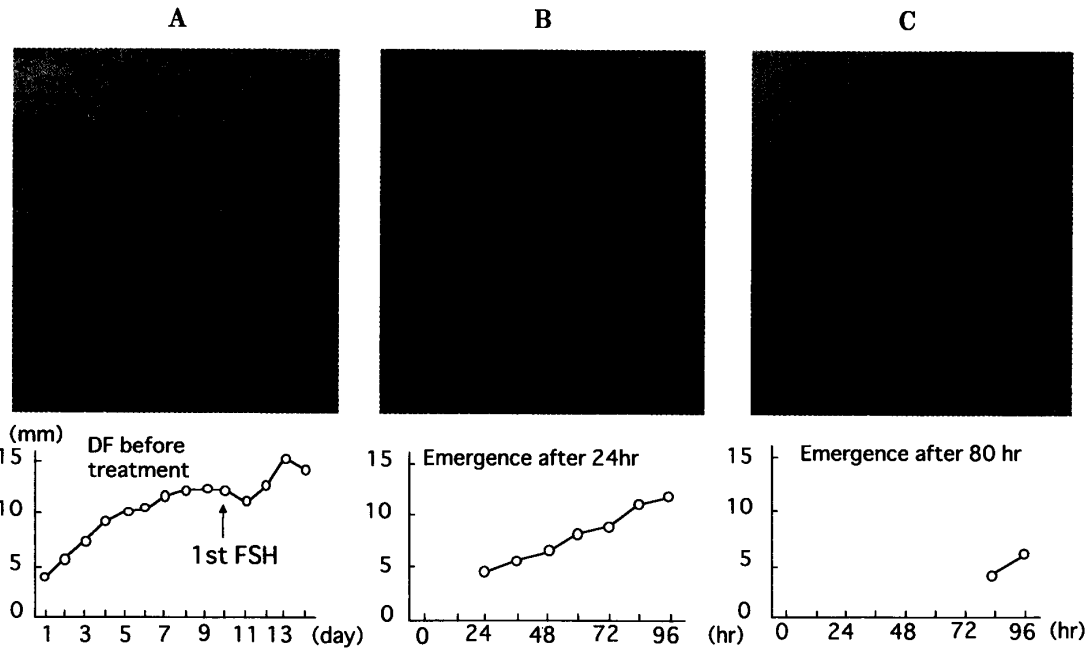


Fig.5. Follicular morphologies characterized depending on the emergence of follicles during superovulation treatment.

- A: Morphologies of follicular walls and in vivo development monitored with ultrasonography of DF existed before the superovulation treatment.
- B: Morphologies and follicular development of a follicle emerged at 24 hr after first FSH injection.
- C: Morphologies and follicular development of a follicle emerged at 80 hr after first FSH injection.

した閉鎖退行像を示し、過剰排卵処置中に新たに出現したDFは顆粒層細胞が厚く、充実していた。

### 考 察

Ginther et al.<sup>4)</sup>は、優性卵胞と最大次席卵胞の出現時から8時間間隔で超音波診断法により卵巣を観察し、両卵胞の直径の差は、卵胞出現後 $2.8 \pm 0.2$ 日よりみられ、また最大次席卵胞は $3.7 \pm 0.2$ 日に直径が最大になったと報告している。今回、優性卵胞と最大次席卵胞の卵胞直径の差は、7日群および10日群において過剰排卵処置前のDay1からDay4の午前(最大次席卵胞の直径が最大となる)まで有意な差はなく、その後最大次席卵胞が退行し、優性卵胞との直径に有意差が認められた。また、優性卵胞はその後も成長を続け、7日群では、過剰排卵処置開始時まで発育途中であり、10日群では発情周期の8日目に最大直径となってから、過剰排卵処置開始時には発育を停止した状態であった。Desaulniers et al.<sup>2)</sup>は、2歳以下の未経産ホルスタイン牛と9~13歳の高齢ホルスタイン牛を用いて、FSH 30mgの漸減投与とPGF<sub>2α</sub>の2回投与による過剰排卵処置を実施し、直径サイズ別(2~3mm, 4~5mm, 6~10mm, 10mm以上)の卵胞数を計測した。その結果、直径2~3mmの卵胞は常に供給されており、FSHの漸減投与により、卵胞は漸次直径4~5mmの卵胞となり、また、直径6~10mmの卵胞数は、直径4~5mmの卵胞数の増加と連動しており、これらが漸次直径6~10mmの卵胞に移行することを報告している。

今回、卵巣変化の観察期間が過剰排卵処置開始時(0時間)から96時間まであり、過剰排卵処置の後半に出現した卵胞はさらに成長することを考慮し、Kohram et al.<sup>7)</sup>の卵胞直径を参考にして、卵胞サイズを3つに区分した。この区分では、Sサイズ(<4mm)の卵胞数は、過剰排卵処置開始時より処置48時間まではほぼ一定であり、Mサイズ(4~7mm)では、7日群で処置24時間から72時間にかけて増加し、10日群では過剰排卵処置開始時より増加し、処置後60時間以後ではほぼ一定となった。これはDesaulniers et al.<sup>2)</sup>の報告と同様、直径4mm未満の卵胞は常に供給されており、FSHの漸減投与により、漸次直径4~7mmの卵胞に移行しているためと思われる。また、Lサイズ(>7mm)の卵胞数は、7日群で処置60時間、10日群では処置36時間より増加を開始しており、7日群より早期に大型の卵胞数が増加する。

これは10日群では、過剰排卵開始時より増加を始めるMサイズの卵胞が漸次大型の卵胞に移行しているためと考えられる。

新たな卵胞の出現や小型卵胞から大型卵胞への移行が7日群に比べ、10日群で早期に起こっていること、および10日群で最終的(処置96時間)な大型卵胞数が多いことは、血中E<sub>2</sub>濃度が7日群に比べ、10日群で早期に増加していることと一致する。また、過剰排卵処置開始時の優性卵胞は、10日群ではすでに発育を停止しており、小型卵胞への抑制効果が減少し、その結果、過剰排卵処置に反応する小型卵胞数が増加したものと推察される。逆に、7日群では、過剰排卵処置開始時では機能的な優性卵胞が存在し、このため過剰排卵処置に反応して新たに誘起(recruit)される卵胞の発育パターンが抑制され、排卵数が低下する傾向にあり、過去の報告と類似した<sup>5, 10)</sup>。

Schotanus et al.<sup>9)</sup>は、マウス顆粒層細胞のセルラインを利用した調整培養液を用いてウシの胞状卵胞以前の細胞の培養を行っており、最終的な生殖細胞の生存性の評価に、今回の試験で用いたCalcein-AMで染色している。今回、生細胞を染色するCalcein-AMと死細胞を染色するPropidium Iodideという2種類の蛍光プローブを用いて卵子の二重染色を行った結果、回収卵子全てにおいてCalceinの緑色蛍光が観察された。これは過剰排卵処置に反応した多数の卵胞の卵子はエステラーゼ活性を示す卵子であることを示唆している。また、Hyttel et al.<sup>6)</sup>は一連のウシ卵子の形態観察から、卵子の成熟に伴い、卵細胞内では脂肪滴の数とその大きさが増加し、LHサーージ後15時間では、卵子と顆粒層細胞の細胞結合(gap junction)の消失が認められ、排卵後の卵子の栄養分の供給源としてこの脂肪滴が利用されていると考えられている。このことは、回収卵子はエステル結合を分解する酵素であるエステラーゼの活性を示すとともに、死細胞を染色するPropidium Iodide不透過性の強固な透明帯および細胞膜を持つ生存卵子であり、生存性の観点からは体外受精(IVF)生産に全て利用可能であると言える。

Yoshimura et al.<sup>13)</sup>は、黄体期にある非妊娠ホルスタイン牛44頭から88個の卵巣を回収し、細胞壁を組織学的に検討し、卵胞を7段階(成長過程の卵胞~閉鎖・退行過程にある卵胞)に分類すると同時に、卵胞液中のインヒビリンやステロイドホルモン濃

度を測定している。その結果、卵胞液中の $E_2$ 濃度は、卵胞が成長過程にあると増加し、退行や閉鎖過程にある卵胞では低下するとしている。また、卵胞液中の $P_4$ 濃度は、退行や閉鎖過程の進んだ卵胞では増加すると報告している。

Martin et al.<sup>8)</sup>はLHサージ前後の優性卵胞の卵胞液中 $E_2$ 濃度は、LHサージを境に低下し、 $P_4$ 濃度は増加すると述べている。今回、過剰排卵処置に反応した卵胞の卵胞液中中性ステロイドホルモン濃度と超音波診断装置により観察した卵胞発育との間に、Yoshimura et al.<sup>13)</sup>の報告したような結果はみられなかった。そこで、各卵胞の卵胞液中 $E_2$ および $P_4$ 濃度の比率( $E/P$ )を算出したところ、過剰排卵処置後84時間以前に出現した卵胞では、時間とともにその割合は増加した。つまり、過剰排卵処置の早期に出現した卵胞群では、 $P_4$ 優性の卵胞の割合が高く、このような卵胞がMartin et al.<sup>8)</sup>の報告したLHサージを受けた卵胞であると推察された。

今回、発情周期の異なる時期に過剰排卵処置を行ったところ、優性卵胞が発育を停止した後(発情周期の10日)の処置が良好な卵巣反応となった。今後、臨床現場において過剰排卵処置を開始する際、機能的な優性卵胞の有無を調べるのが重要である。

## 要 約

発情周期の異なる時期における過剰排卵処置が、卵胞の発育に及ぼす影響を超音波診断装置により観察するとともに、卵巣を摘出して、卵胞を組織内分泌学的に評価した。発情周期の7日と、10日にFSHの4日間漸減投与による過剰排卵処置を行い、発情日(Day 0)から、過剰排卵処置終了まで超音波診断法による12時間間隔の卵巣観察を行った。初回FSH投与後、100時間に卵巣を摘出し、直径4 mm以上の卵胞について、卵胞壁を組織学的に検査した。その結果、優性卵胞(DF)は、両群とも発情周期の5日以後で次席卵胞(LSF)より有意に大きくなった。Lサイズ(>7 mm)の卵胞数は、7日群で15.7個、10日群では31.5個と増加した。過剰排卵処置中の血中エストラジオール濃度は、10日群が7日群より有意に増加した。卵胞の組織学的所見では、最初から存在したDFは、顆粒層細胞が遊離する閉鎖退行像を示し、処置中に出現したDFは顆粒層細胞が厚く充実していた。発情周期の10日ではDFはすでに優性を失い、そのため10日に過剰排卵処置を開始した牛群では、いまだ機能的なDFが

存在する7日開始群より、Lサイズの卵胞数が増加した。

謝辞：本論文をまとめるに当たり、ご校閲を賜った鹿児島大学農学部阿久沢正夫教授に深謝する。本研究の一部は、文部省科学研究費補助金(課題番号11836008)によった。

## 文 献

- 1) Bo, G. A., Adams, G. P., Pierson, R. A. and Mapletoft, R. J.: Effect of progestogen plus estradiol-17 $\beta$  treatment on superovulatory response in beef cattle. *Theriogenology*, **45**, 897-910 (1996)
- 2) Desaulniers, D. M., Lussier, J. G., Goff, A. K., Bousquet, D. and Guilbult, L. A.: Follicular development and reproductive endocrinology during and after superovulation in heifers and mature cows displaying contrasting superovulatory responses. *Theriogenology*, **44**, 479-497 (1995)
- 3) D'occhio, J. M., Jillella, D. and Lindsey, R. B.: Factors that influence follicle recruitment, growth and ovulation in heifers: Opportunities to increase ovulation rate and embryo recovery by delaying the exposure of follicles to LH. *Theriogenology*, **51**, 9-35 (1999)
- 4) Ginther, O. J., Kot, K., Kulick, L. J. and Wiltbank, M. C.: Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology*, **48**, 75-87 (1997)
- 5) Huhtinen, M., Rainio, V., Aalto, J., Bredbacka, P. and Make Tanila, A.: Increased ovarian responses in the absence of a dominant follicle in superovulated cows. *Theriogenology*, **37**, 457-462 (1992)
- 6) Hyttel, P., Fair, T., Avery, B., Callesen, H. and Greve, T.: Transcriptional activity and ultrastructure in bovine oocytes. *Reprod. Domest. Anim.*, **34**, 447-454 (1999)
- 7) Kohram, H., Twagiramungu, H., Bousquet, D., Durocher, J. and Guilbult, A.L.: Ovarian superstimulation after follicular waves synchronization with GnRH at two different stages of the estrous cycle in cattle. *Theriogenology*, **49**, 1175-1186 (1998)
- 8) Martin, T.L., Fowell, R.L. and Ireland, J.J.: Concentrations of inhibins and steroids in follicular fluid during development of dominant follicles in heifers. *Biol. Reprod.*, **44**, 493-700 (1991)
- 9) Schotanus, K., Hage, W. J., Vanderstichele, H. and Van den Hurk, R.: Effects of conditioned media from murine granulosa cell lines on the growth of isolated bovine preantral follicles. *Theriogenology*, **48**, 471-483 (1997)
- 10) Stock, A. E., Ellington, J. E. and Fortune, J. E.: A dominant follicle does not affect follicular recruitment by superovulatory doses of FSH in cattle but inhibit ovulation. *Theriogenology*, **45**, 1091-1120 (1996)
- 11) 田谷一善, 渡辺 元, 笹本修司:  $^{125}I$ 標識ホルモンを用いたプロジェステロン, テストステロンおよびエストラジオール-17 $\beta$ のラジオイムノアッセイについて. *家畜繁殖誌*, **31**, 186-197 (1985)
- 12) Ushinohama, K., Kamimura, S. and Hamana, K. :

- 
- Ultrasonographic observation of individual follicular development in Japanese Black cows superovulated with FSH. *J. Reprod. Dev.*, **44**, 237-242 (1998)
- 13) Yoshimura, S., Hondo, E., Murabayashi, H., Kitamura N., Miyamoto, A., Manabe, M., Hasegawa, Y. and Yamada, J.: Stage-specific distributions of inhibin,  $\alpha$ -subunit in bovine ovarian follicles, and various hormones levels in follicular fluid. *J. Reprod. Dev.*, **45**, 213-222 (1999)

### Summary

In order to clarify the ovarian response to the superovulation treatment carried out with FSH on different stage of estrous cycles, a consecutive ultrasonography for tracing the individual follicular development and an ovariectomy for follicular morphology were performed.

**MATERIALS AND METHODS:** The superovulation treatment accompanied with multiple intramuscular injections of p-FSH (28 AU) executed in decreasing doses at 12 hr intervals for 4 days, was initiated on Day 7 (3 cows) and on Day 10 (4 cows). Ovaries were monitored with ultrasonography at 12 hr intervals after an estrus previously synchronized by PGF<sub>2α</sub> injection until the end of superovulation treatment. All the follicles more than 4mm in diameter were monitored in freezing ultrasonography images with built-in calipers. The respective follicles were characterized by the size of diameter, S: < 4 mm, M: 4 - 7 mm and L: > 7 mm. And then, the ovariectomy was carried out at 100 hr after the 1st FSH injection. The individual antral follicles > 4 mm in diameter were dissected from the extraneous tissue under a stereomicroscope. After a slit was opened, follicular fluid and oocyte were collected separately. Oocyte was subjected for fluorochroming with Calcein-AM, and the viability was verified. The blood samples collected at 12 hr after the respective ultrasonography and the individual follicular fluid obtained after ovariectomy, were subjected for determination of concentrations of progesterone (P<sub>4</sub>) and estradiol-17β (E<sub>2</sub>) with RIA.

**RESULTS AND DISCUSSION:** In both groups, the diameter of dominant follicle (DF) became significantly larger than the largest subordinate follicle (LSF) since Day 5. In Day 7 group, DF reached the maximum diameter (12.2mm) on Day 7, while in Day 10 group it reached that (12.7mm) on Day 8, ceasing to grow on Day 10 (12.4mm). In Day 7 group, the number of S-sized follicles decreased from 30.7 at the first FSH to 17.0 at the last FSH, while L-sized ones increased from 1.0 to 15.7. In Day 10 group, S-sized ones decreased from 32.8 at first FSH to 17.5 at the last FSH, and L-sized ones increased from 1.3 to 31.5. In Day 7 group, the number of follicles (> 4 mm in diameter) recruited in response to FSH injections showed maximum at 48 hr (5.0 follicles) after the first FSH injection, while it showed that earlier at 24 hr (8.0 follicles) in Day 10 group. The plasma E<sub>2</sub> profile showed significantly higher levels at and after 36 hr, during superovulation treatment in Day 10 group, compared those in Day 7 group.

Out of 223 follicles (>4mm in diameter) observed with ultrasonography during the superovulation treatment, 170 follicles were individually dissected (73% recovery), 123 oocytes were collected under stereomicroscope (72% recovery). Between the Day 7 and Day 10 groups, there was no statistic difference in the follicular fluid steroid concentration, however the follicles that emerged later tended to increase the E/P ratio of follicular fluid steroids. A total of 92 oocytes subjected for fluorochroming showed a positive viable color against Calcein-AM. There was no significant difference in the follicular morphological characteristics depending on the treatment.

These results indicate that the ovarian responses were apt to be made more increased by the superovulation treatment initiated on Day 10 after DF loss its dominance effect than by the treatment executed on Day 7 when DF was still in dominant phase.