

乳牛の経腔採卵におけるホルモン製剤前処置時の施灸による効果

福島宜彦¹⁾・井上剛一²⁾・森下 忠¹⁾

摘要:経腔採卵(OPU)-体外受精(IVF)による胚生産効率の向上を目的として、ホルモン製剤処置時に施灸を併用する効果について調査した。乾乳牛(空胎)に対する施灸によりOPU実施日の卵胞数は、併用処置開始前と比較して有意に増加したが、ホルモン製剤投与のみを実施した区との間に有意な差は認められなかった。また、卵胞壁血流が認められる卵胞の数にも両区間で差がなかった。OPUにより採取された卵丘細胞-卵子複合体(COC)数及びその品質等級の分布は両区でほぼ同等であった。またIVF後の分割率、胚盤胞発生率には差がなかったが脱出胚盤胞率は施灸区で有意に高かった。

今回の試験において、施灸による卵胞への血流促進効果や、明らかな発生率向上は確認できなかったため、今後施灸の回数やタイミングを精査する必要がある。

キーワード:乳牛、経腔採卵、体外受精、施灸、卵胞壁血流、超音波画像検査

緒言

養牛の現場においてIVFによる胚生産技術が広く応用されており、特に近年生体から吸引採取した卵子を用いるOPU-IVFを実施する機関が増加している¹⁾。しかしOPUを実施するウシの年齢²⁾、季節³⁾、ホルモン製剤投与の有無や技術者の熟練度⁴⁾など様々な要因により胚盤胞発生率、COCの品質、正常卵子数などの成績が大きく変動することが知られており、胚の生産効率を安定的に高めるための技術改善が求められている。

ヒトの不妊治療⁵⁾や家畜の繁殖障害⁶⁾に対して鍼灸療法が応用されており、ウシでは施術により子宮動脈⁷⁾や黄体⁸⁾への血流が増加すること、また受胎率を向上させる可能性⁹⁾が報告されている。また、排卵前の時期に卵胞壁における血流が旺盛な卵胞から採取された卵子の方が、IVF成績が良好である¹⁰⁾との報告や体内胚生産において施灸により回収胚数が増加したとの報告¹¹⁾もあるが、施灸がOPU-IVFの成績に与える影響を調査した報告は確認できない。

今回、OPU-IVFにおける胚生産効率を向上させる目的で、ホルモン製剤投与による前処置と施灸を併用する技術について検討し、あわせて施灸後の卵胞壁血流の変化について調査した。

材料及び方法

1 供試牛

愛知県農業総合試場畜産研究部で飼養されていた「ホルスタイン」種乾乳牛2頭(4産次及び2産次、空胎)を用いた。

2 ホルモン製剤投与による前処置

OPU実施前に卵胞の発育を調整する目的でホルモン製剤投与が行われることがあり、今回の試験では田中ら¹²⁾の方法を参考に実施した。すなわちOPU実施日を0日(Day0)として6日前(Day-6)に腔内留置型黄体ホルモン製剤(以下CIDR、シダー1900、ゾエティス・ジャパン、東京都)を留置し、安息香酸エストラジオール2 mg(動物用オバホルモン注、あすかアニマルヘルス、東京都)筋肉内注射、2日前(Day-2)に豚前葉性卵胞刺激ホルモン(以下FSH、アントリンR・10、共立製薬、東京都)製剤10 AU/10 mLを皮下注射した。

3 試験区分

供試牛2頭について、以下の前処置後のOPUをそれぞれ回ずつ実施した。同一牛のOPUは50日以上間隔を空けた。

(1) 施灸区(n=4)

上記処置に加え、Day-6及びDay-2のホルモン製剤投与前に後述の方法で施灸した。

(2) 無施灸区(n=4)

ホルモン製剤投与による前処置のみを実施した。

4 施灸法

経穴の皮膚表面に味噌を薄く塗り、その上に丸めたもぐさ(池田屋安兵衛商店、富山県)約3 g(秤量した3 gのもぐさと目視で同等の大きさのもの)をのせ、着火し完全に燃え尽きるまで燃焼させた(約15~20分間)。経穴は繁殖障害に効果があ

¹⁾畜産研究部 ²⁾畜産研究部(現中央家畜保健衛生所)

るとされている天平、腎門、百会、帰尾(左右)、開風、氣門(左右)、尾根⁹⁾の計9か所とした(図1)。

5 OPU-IVF手順

卵胞吸引、卵子検索、成熟培養の各工程は、既存のマニュアル¹³⁾に準じた。

(1) 卵胞吸引

供試牛を柵場内保定し、尾椎硬膜外麻酔を施した。CIDRを抜去後、OPU用プローブを装着した超音波画像検査装置(My Lab One VET, Esaote Europe B.V.社、オランダ)を用いて卵胞液ごと卵子を吸引採取した。吸引液は乳酸リンゲル液(ハルゼン-V注射液、日本全薬工業、福島県)にヘパリン(ヘパリンナトリウム注、エイワイファーマ株式会社、東京都)10 U/mL及びウシ胎子血清(FBS, Sigma-Aldrich社、アメリカ)を1%添加したものを使用した。

(2) 卵子検索、成熟培養

回収した吸引液をフィルターにかけ、実体顕微鏡下でCOCを取り出し、坂口らの基準¹⁴⁾による品質等級にてG1からG4までのものを培養に供した。COCを5%FBS加199培地(Thermo Fisher Scientific社、アメリカ)内で3回洗浄した後、ミネラルオイル(light oil BioXtra, Sigma-Aldrich社、アメリカ)を入れたシャーレ中に作成した5%FBS加199培地の100 μ Lドロップ中にCOCが10個程度となるよう移動して、38.5°C、5%炭酸ガス(CO₂)、湿度飽和気相下で21時間成熟培養した。

(3) 媒精

凍結精液(サンワード SS ライオン、一般社団法人畜改良事業団、東京都)を38°Cの温湯で融解し、15 mLのコニカルチューブで媒精液(IVF-100、株式会社機能性ペプチド研究所、山形県)5 mLと混合、2000 rpm(537 \times g)、5分間遠心分離した。上清を吸引、除去し、媒精液を5 mL加え再度2000 rpm、5分間遠心分離、上清を除去後、媒精液を1 mL加えた。ここから50 μ Lを採り、3%食塩液で100倍希釈し、顕微鏡下で精子数を計測、元の精子液の精子濃度が 1×10^7 個/mLとなるよう媒精液で希釈した。あらかじめ媒精液の50 μ Lドロップを媒精の1時間以上前に38.5°C、5%CO₂のインキュベーターで保温しておき、希釈した精子液50 μ Lを各ドロップに追加することで精子濃度 5×10^6 個/mLの精子液ドロップとした。成熟培養を終えたCOCを媒精液で2回洗浄し、精子液ドロップへ移動した。インキュベーターにて、38.5°C、5%CO₂、湿度飽和気相下で6時間培養することにより受精処理した。

(4) 発生培養

発生培地はBO-IVC(IVF Bioscience社、イギリス)を使用した。媒精終了後、発生培地へ移動したCOCをパスツールピ

ペットにて繰り返し吸引、吐出することで、卵子から卵丘細胞を剥離した。発生培地の100 μ Lドロップへ移動し、38.5°C、5%CO₂、5%酸素(O₂)、湿度飽和気相下で培養し、媒精後2日に卵割の有無を、7日及び8日に胚盤胞及び脱出胚盤胞への発育を判定した。

6 超音波画像検査

Day-6の施灸及びホルモン製剤投与前とDay0のOPU実施前に超音波画像検査により左右卵巣内に存在する直径3 mm以上の卵胞の個数と直径及びそのうち卵胞壁血流が確認された卵胞の個数を計測した。超音波画像検査装置のPOWER DOPPLERモードを使用し、卵巣の長軸に沿ってプローブをゆっくり滑らせるよう移動させ卵巣内を走査した。超音波画像検査装置に保存した動画において、卵胞の直径を装置の距離計測機能を用いて計測し、直径3.0~4.9 mmを小卵胞、5.0~7.9 mmを中卵胞、8.0 mm以上のものを大卵胞と区分した。また卵胞壁血流は、画面上で血流の存在を示す橙色を呈した部分の有無により判定した(図2)。

7 統計処理

超音波画像検査により計測した卵胞数について、各区内でDay-6とDay0の差をとり、平均=0を帰無仮説とした一標本t検定を実施するとともにDay-6及びDay0それぞれ両区間の二標本t検定も行った。またIVF後の胚の分割率、胚盤胞発生率は χ^2 検定を、脱出胚盤胞率についてはFisherの正確確率検定を用いた。 χ^2 検定及びFisherの正確確率検定は青木繁伸のホームページ(<http://aoki2.si.gunma-u.ac.jp/exact/fisher/getpar.html>)上で行った。有意水準は5%とした。

結果及び考察

1 施灸が卵胞発育に与える影響

(1) 超音波画像検査で確認された卵胞数の変化

図3にDay-6及びDay0において超音波画像検査により確認された卵胞の数を示した。施灸区と無施灸区の間で、Day0における卵胞直径区分ごとの卵胞数及び総卵胞数に有意な差は認められなかったが、施灸区においては、Day-6と比較してDay0の総卵胞数が有意に増加した。遠藤ら¹⁵⁾は、黒毛和種に対し発情後6日より3日間連続して施灸したところ、卵胞数の増減率(施灸実施期間後/施灸実施期間前)が、無処置牛では89%と減少したのに対し、109%まで増加したことを報告している。また、広井ら¹¹⁾は黒毛和種の体内胚

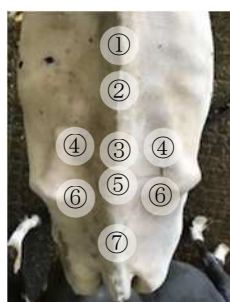


図1 経穴の位置

- ① 天平
- ② 腎門
- ③ 百会
- ④ 帰尾(左右)
- ⑤ 開風
- ⑥ 氣門(左右)
- ⑦ 尾根



黒く抜けている部分が卵胞その辺縁でPOWER DOPPLERの血流反応がみられるのが卵胞壁血流(△印)

図2 卵胞壁における血流

生産において、発情日、FSH投与開始日及び人工授精日に施灸したところ、FSH投与のみの群に比べ、回収卵数が増加する傾向がみられたとしている。これらのことより、施灸により卵胞発育が促進され、前処置開始時に超音波画像検査装置で視認可能な卵胞数が少ない状態にあってもそれを増加させる効果が期待できることが示唆された。OPU実施時に視認可能な卵胞数が増加することにより、特に経験の浅い技術者の場合に採取卵子数が増加する⁴⁾との報告もあり、OPUの吸引作業が容易になるものと考えられる。

(2) 卵胞壁血流が認められた卵胞数

図4にDay-6及びDay0において卵胞壁血流が認められた卵胞数を、表1にDay0において卵胞壁血流が認められた卵胞数を卵胞直径の区分ごとに示した。図4で両区とも卵胞壁血流を認めた卵胞数はDay0がDay-6を上回ったが、有意な差は認められなかった。またDay-6及びDay0における両区間の比較においても差はなかった。また表1で両区とも小卵胞で卵胞壁血流が認められた割合が低い一方、ほとんどの大卵胞に血流が認められたが、卵胞の大きさによる卵胞壁血流の違いは施灸区と対照区との間で有意な差は認められなかった。

鍼灸療法実施後、交感神経を介した血管への作用により卵巣へも血液を供給する子宮動脈の血流が増加すること^{7,16)}、また施灸により黄体への血流が増加した⁸⁾との報告はあるが、卵胞壁血流への影響を調査したものは見当たらない。今回の試験でDay-6及びDay-2のホルモン製剤投与時に施灸を併用したが、OPU実施日に卵胞壁血流が認められた卵

胞は増加しなかった。機能性の黄体では周囲を取り囲むように血管が発達する¹⁷⁾が、特に小卵胞における微細な血流の測定には限界があり¹⁸⁾、今回の施灸プログラムでは超音波画像で検知できるほどの変化は惹起されなかったものと推察する。

2 OPUにより採取されたCOC数とIVF後の培養成績

(1) OPUにより採取されたCOC数と品質等級

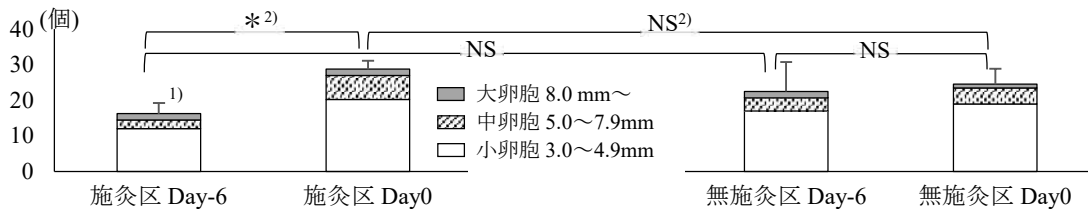
OPU1回あたりに採取されたCOCの数ならびに品質等級の分布を表2に示した。採取されたCOC数及び各品質等級の分布は両区でほぼ同等であった。

COCの品質等級について、G1～G4は主に卵丘細胞の附着状態によって判定されるが、これはOPU時の吸引手技などにも影響されるもので、施灸による直接的な影響は少ないと考えられる。卵子の成熟が進みIVFには不適と判定されるG5も両区でほぼ同等の数値であったことから、OPUの前処置としてホルモン製剤投与に施灸を併用しても過度に卵子を成熟させることはないものと考えられる。

(2) 培養成績

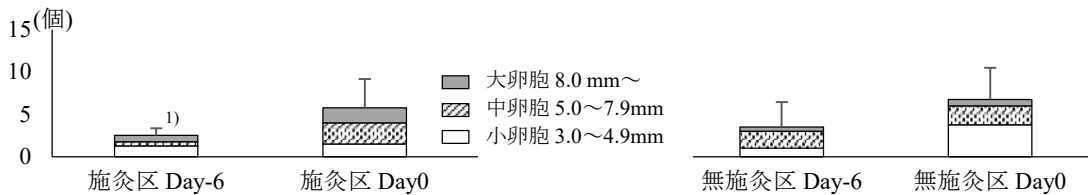
IVF後の発生培養成績を表3に示した。卵割率、胚盤胞発生率に有意な差は認められなかったが、8日目までの脱出胚盤胞率は施灸区で有意に高かった。

前述したとおり施灸により生殖器への血流が増加することや、排卵前の時期に卵胞壁血流が旺盛な卵胞には酸素や栄養が多く供給され、そこから採取された卵子の方が、IVF成績が良好である¹⁰⁾ことが報告されている。今回の試験では



1) エラーバーは総卵胞数の標準偏差で、有意差は総卵胞数に対するもの 2) *:P<0.05, NS:有意差なし

図3 Day-6及びDay0において超音波画像検査により確認された卵胞数



1) エラーバーは血流が確認された卵胞総数の標準偏差

図4 Day-6及びDay0において卵胞壁血流が確認された卵胞数

表1 Day0における卵胞直径ごとの卵胞壁血流が認められた卵胞数

試験区分	小卵胞 3.0~4.9mm	中卵胞 5.0~7.9mm	大卵胞 8.0mm~	総卵胞数
施灸区 (n=4)	20.3 ± 4.3 ¹⁾	6.8 ± 1.9	1.8 ± 0.8	28.8 ± 2.4
うち卵胞壁血流あり	1.5 ± 1.7 (7.4) ²⁾	2.5 ± 2.3 (36.8)	1.8 ± 0.8 (100)	5.8 ± 3.4 (20.1)
無施灸区 (n=4)	19.0 ± 5.4	4.5 ± 3.2	1.0 ± 0.0	24.5 ± 4.4
うち卵胞壁血流あり	3.8 ± 3.3 (20.0)	2.3 ± 1.8 (51.1)	0.8 ± 0.4 (80.0)	6.8 ± 3.8 (27.8)

1) 平均±標準偏差 2) 当該直径の卵胞に占める割合

表2 採取COC数及び品質等級の分布

試験区分	採取卵子数	品質等級 ³⁾					
		G1	G2	G3	G4	G5	G6
施灸区(n=4)	19.3±8.8 ¹⁾	2.0±1.9(10.4) ²⁾	10.8±4.0(56.0)	2.5±1.8(13.0)	0.3±0.4(1.6)	2.8±1.9(14.5)	1.0±1.0(5.2)
無施灸区(n=4)	19.3±8.6	2.3±1.1(11.9)	10.8±5.9(56.0)	2.3±0.8(11.9)	0.5±0.5(2.6)	2.8±1.9(14.5)	0.8±0.4(4.1)

1) 平均±標準偏差 2) 採取卵子数に占める割合(%) 3) G1:卵丘細胞層が4層以上 G2:卵丘細胞層が1~3層
G3:卵丘細胞の付着が卵子の周囲 1/3 以下 G4:裸化卵子 G5:卵丘細胞が膨化 G6:変性卵子

表3 発生培養成績

試験区分	培養卵数	卵割率(%)	胚盤胞発生率(%)	脱出胚盤胞率(%)
施灸区 ¹⁾	59	71.2 (42/59)	45.8 (27/59)	55.6 ^{a3)} (15/27)
無施灸区 ¹⁾	46	71.7 (33/46)	39.1 (18/46)	22.2 ^b (4/18)

1) 両区とも4回の培養結果を集計。発生培養の前段階で一部受精卵の紛失あり 2) 括弧内は胚の実数 3) 同列異符号間 有意差あり(P<0.05)

施灸による卵胞壁血流の変化は検知されず、IVF後の胚盤胞発生率の向上には至らなかったが、脱出胚盤胞率が向上したことより、胚の正常な発育が促進された可能性が考えられる。

今回 OPU 実施の 6 日前と 2 日前のホルモン製剤投与時に施灸を併用したところ、超音波画像検査により視認可能な卵胞数が増加し、IVF8 日目までの脱出胚盤胞率が向上するなどの効果がみられたものの、胚生産効率向上に直結する採取卵子数や胚盤胞発生率の有意な上昇は認められなかった。ウシの繁殖障害治療や体内胚生産に関する過去の報告では、3 日間連続施灸を行うプログラムなどが試みられており^{6-8,14)}、今後さらに施灸の効果を確実なものにするため、施灸回数の増加や施灸間隔の短縮を試みるなど施灸方法について精査する必要がある。

引用文献

- 今井敬. 経腔採卵による胚生産技術の概要. 臨床獣医. 34(9), 12-17(2016)
- 秋山清, 坂上信忠, 仲澤慶紀. 経腔採卵と体外受精による牛胚の生産. 神奈川県畜産技術センター研究報告. 2, 1-5(2009)
- 江頭潤将, 建本秀樹, 和田康彦, 山中賢一. 暑熱ストレスが経腔採卵により採取されたウシ卵丘-卵母細胞複合体の品質に及ぼす影響. 日本暖地畜産学会報. 61(2), 111-119(2018)
- 山本伸治, 白田聡美. 過剰排卵処理を組み入れた経腔採卵技術の検討. 日本胚移植学雑誌. 33(1), 44(2011)
- 池田朋子, 山口玲奈, 北小路博司. 不妊クリニックにおける鍼灸治療導入の実態に関するアンケート調査. 全日本鍼灸学会雑誌. 70(3), 230-241(2020)
- 函城悦司. 疾病別によるお灸の応用例. 養牛の友. 7月号, 58-61(2014)
- 石川初, 上村俊一, 牛之浜寛治, 浜名克己, 坂本紘. 牛における灸処置が血中性ステロイドホルモン濃度と子宮動脈血流量に及ぼす影響. 日獣会誌. 54, 527-532(2001)

- 塚田朱香, 堀江このみ. 乳牛への施灸が卵巣機能に及ぼす影響. 帯畜大別科研報. 26, 25-28(2012)
- 三山紗依子, 小山朋子, 片岡辰一郎. 乳用牛の繁殖機能改善を目的とした施灸の有用性. 東京農総研研報. 13, 113-122(2018)
- Siddiqui, M. A. R., Gastal, E. L., Gastal, M.o., Almamun, M., Beg, M. A. and Ginther, O. J. Relationship of vascular perfusion of the wall of the preovulatory follicle to in vitro fertilisation and embryo development in heifers. Reproduction. 137, 689-697(2009)
- 広井信人, 近藤新二, 丸山幹夫. 灸療法を応用した黒毛和種供卵牛の採卵成績. 東日本家畜受精卵移植技術研究会報. 10, 45-46(1995)
- 田中昌子, 竹下和久. 経腔採卵・体外受精(OPU-IVF)による黒毛和種胚生産の効率化に関する研究 ~卵胞発育調節プログラムの省力化に係る検討. 山口県農林総合技術センター研究報告. 8, 46-52(2017)
- 小林修司. ウシ生体吸引・体外受精マニュアル. 独立行政法人家畜改良センター. 8-11, 42-47 (2014)
- 坂口慎一, 井口光国, 小林直彦, 藤谷泰裕, 三溝成樹, 内海恭三. 超音波診断装置を利用した繁殖不適和牛からの連続経腔採卵. 日本胚移植学雑誌. 17(2), 94-101(1995)
- 遠藤正憲, 嵯峨裕紀, 野口龍生, 高橋政義. 牛の過剰排卵処理における施灸効果. 東日本家畜受精卵移植技術研究会報. 24, 38-39(2008)
- Sterner, E., Waldenstrom, U., Andersson, SA., and Wikland, M. Reduction of blood flow impedance in the utrine arteries of infertile women with electro-acupuncture. Hum Reprod. 11(6), 1314-1317(1996)
- 金澤朋美. 乳牛におけるカラードブラ法による受胎牛選定と超早期妊娠診断. 産業動物臨床医誌. 8(2), 51-66(2017)
- Acosta, T. J., Hayashi, K., Matsui, M., and Miyamoto, A. Changes in follicular vascularity during the first follicular wave in lactating cows. J Reprod Dev. 51(2), 273-280(2005)