

胚移植技術を応用した肉用牛の効率生産に関する試験

—持続性黄体ホルモン製剤利用による過剰排卵処理に関する試験—

小島浩一、櫻井由美、神辺佳弘¹、塩生光男²、岸善明³、岩倉直行⁴、久利生正邦

¹栃木県畜産振興課

²栃木県県央家畜保健衛生所

³栃木県酪農試験場南那須育成牧場

⁴栃木県県南家畜保健衛生所

要約 供胚牛からの胚回収向上と安定化を図るために、持続性黄体ホルモン（CIDR）を利用した過剰排卵処理におけるエストラジオール製剤（E₂）の投与を行い、その効果について検討した。その結果は以下のとおりであった。

CIDRを用いた過剰排卵処理は推定黄体数9.25±5.19個、回収卵数11.25±7.68個、正常胚数7.50±5.32個及び正常胚率66.7±23.0%と、従来の方法と比べ同程度の採卵成績が期待できると考えられた。

CIDR単独区、CIDR挿入と同時にE₂を投与した区及び従来の過剰排卵処理を実施した対照区では、それぞれ推定黄体数9.25個、11.33個及び13.33個、回収卵数11.25個、12.58個及び14.42個であり、有意な差は認められなかった。CIDR挿入と同時にE₂を投与した過剰排卵処理では、CIDR単独で利用した過剰排卵処理や従来の方法と比べ、回収卵数、正常胚数及び正常胚率の改善は認められず、また未授精卵数が増加する傾向が認められた。

緒言

従来、牛の過剰排卵処理は供胚牛の発情周期の黄体期から処理を開始する必要があるため、計画的かつ確実に実施するのに困難を生じることがあり、胚移植関連技術の普及を図るためには、採卵間隔の短縮と処理の簡略化が望まれている。近年CIDR（持続性黄体ホルモン製剤）を利用した連続過剰排卵処理や処理間隔の短縮等について検討されており、従来の過剰排卵処理と同様の結果が得られたとの報告がある。^{3,4} また、最近牛の性周期中の卵胞発育波とそこから発育する優性卵胞の役割が明らかにされつつある。² 特に過剰排卵処理を開始する時に、優勢卵胞の存在が採卵成績に影響を与えていることが報告されている。⁷

そこで、供胚牛からの安定的な胚回収を図るため、優性卵胞の制御を目的に、CIDRを用いた過剰排卵処理におけるエストラジオール製剤の投与を行い、その効果について検討した。

材料及び方法

(1) 試験期間

平成10年11月～平成11年7月

(2) 供胚牛

供試牛は当場で繋養中の黒毛和種経産牛12頭を用いた。

(3) 試験方法

供試牛12頭を1群4頭ずつ3区に分け（表1）、約60日間隔で1回の胚回収を行った。つまり、1群当たり各試験区1回ずつ計3回の胚回収を実施した。

図1に各区の過剰排卵処理工程を示した。

性周期を人為的に制御するためにCIDR（1個中プロゲステロン1.9g含有、商品名：イージーブリード、interAg社）を用いた。各試験区に共通する処理として、過剰排卵処理には高度精製FSH製剤（商品名：アントリン、デンカ製薬）を用いた。過剰排卵処理はFSH18AUを3日間減量投与により朝夕2回臀部筋肉内に投与し、投与開始後3日目にPGF_{2α}（商品名：エストラメイト、（株）住友製薬、以下PG）をクロプロステノールNaとして750μgを2回に分けて臀部筋肉内投与し発情誘起を行い、発情確認後人工授精を実施した。人工授精は発情日の夕方と翌

日の朝 (計 2 回) に行った。胚の回収は人工授精後 7 日目に常法により非外科的に実施した。採卵終了後は子宮注入用抗生物質 (子宮注入用アンピシリン、三鷹製薬) を子宮内に注入し、また、PG を臀部筋肉内に投与し次回発情を誘起した。

1 区 (CIDR 区) では、CIDR を発情周期に関係なく挿入し、挿入後 10 日目から 3 日間過剰排卵処理 (FSH18AU の減量投与方法) を行った。FSH 投与 48 時間後に CIDR の除去と PG の臀部筋肉内投与を行い、発情を誘起した。

2 区 (CIDR+E 区) では、CIDR を発情周期に関係なく挿入し、挿入と同時にエストラジオール製剤 (安息香酸エストラジオール・DS、デンカ製薬、以下 E₂) 5mg を臀部筋肉内投与と同時に CIDR を 12 日間挿入し、挿入後 10 日目から 3 日間過剰排卵処理 (FSH18AU の減量投与方法) を行った。FSH 投与 48 時間後に CIDR の除去と PG の臀部筋肉内投与を行い、発情を誘起した。

3 区 (対照区) では、発情後 10~14 日の期間から 3 日間過剰排卵処理 (FSH18AU の減量投与方法)

を開始し、発情後人工授精を実施した。胚の回収は人工授精後 7 日目に常法により非外科的に実施した。

(4) 調査項目

胚の回収時に黄体数を直腸検査により推定した。

回収した卵及び胚は顕微鏡下で形態的な鑑別を行い、正常胚、変性胚、未受精卵に分類した。また、回収卵数 (総回収卵) に対する正常胚数の比率を正常胚率とした。胚の品質評価は、形態学的に A, B, C の 3 段階に分類した。^{1,2)}

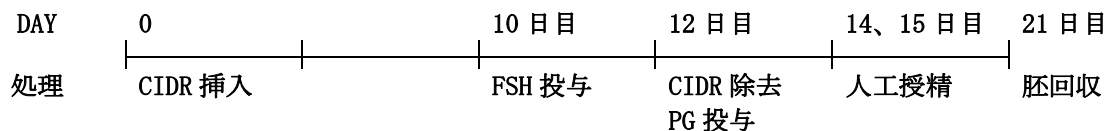
得られた数値は、個体、処理方法及び処理回数を要因として取り上げ、分散分析を行った。

そして、CIDR 挿入時、過剰排卵処理開始時、人工授精時及び胚回収時に採血を行い、血漿中プロゲステロン濃度を関沢らの報告⁸⁾ に準じて酵素免疫測定法 (Enzyme Immunoassay、EIA: プレグテスト、帝国臓器製薬株式会社) により測定した。

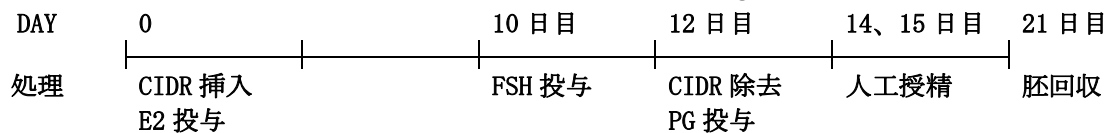
表 1 供試牛の群分け

群	頭数	処理 1 回目	処理 2 回目	処理 3 回目
1	4	3 区 (対照区)	1 区 (CIDR 区)	2 区 (CIDR+E 区)
2	4	2 区 (CIDR+E 区)	3 区 (対照区)	1 区 (CIDR 区)
3	4	1 区 (CIDR 区)	2 区 (CIDR+E 区)	3 区 (対照区)

1 区 (CIDR 区) : CIDR 挿入後 10 日目から過剰排卵処理を開始 (CIDR 挿入日を 0 とする)



2 区 (CIDR+E 区) : CIDR 挿入と同時にエストラジオール製剤 5mg 筋肉内投与



3 区 (対照区) : 発情後 10~14 日目に過剰排卵処理を開始

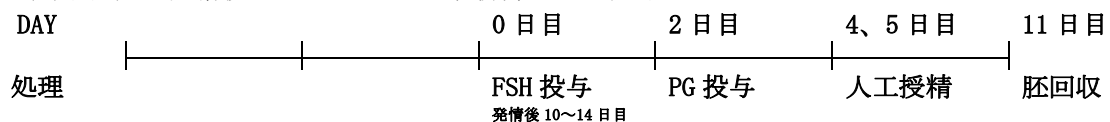


図 1 試験区の過剰排卵処理工程

結果

表 2 に全体及び試験区別の過剰排卵処理成績を示した。供試牛全体でみた場合、推定黄体数、回収卵数及び正常胚数はそれぞれ 11.31 個、12.75 個、6.86 個、正常胚率は 53.8%、未受精卵数、変性胚数はそれぞれ 2.75 個、3.14 個であった。各試験区別でみた場合、1 区、2 区及び 3 区は推定黄体数 9.25 個、11.33 個及び 13.33 個、回収卵数 11.25 個、12.58 個及び 14.42 個であった。1 区、2 区に比べ対照区である 3 区が推定黄体数や回収卵数が多い傾向にあったが、有意差は認められなかった。しかし、正常胚率についてみると、1 区 66.7%、2 区 51.0%及び 3 区 46.2%と CIDR を用いた 1、2 区が 3 区に比べ高い傾向にあった。未受精卵数については、2 区が多く、変性胚数については 3 区で多い傾向が認められた。それぞれの試験区別の回収した卵及び胚の品

質割合について表 3 に示した。A ランク胚率は 1 区、2 区及び 3 区それぞれ 48.9%、32.5%、30.6%と 1 区が最も多く、1 区、2 区、3 区の順で多い結果となった。変性胚率をみた場合、対照区が 39.9%と最も多く、CIDR を用いた 1、2 区で少ない傾向が認められ、CIDR と E を併用した 2 区で 9.9%と最も少なかった。しかし、未受精卵率については、2 区 39.1%と最も多い結果となった。

CIDR を用いた過剰排卵処理した場合の血漿中 P 濃度における E₂ の効果を表 4 に示した。

血漿中 P 濃度については、CIDR 挿入時は E を投与した 2 区が高かったが、逆に過剰排卵処理開始時には CIDR を単独で用いた 1 区が高い結果となった。人工授精時では、1 区、2 区それぞれ 0.4、0.3ng/dl であり、胚回収時は 1 区 11.9ng/dl、2 区 13.7ng/dl とほとんど差が認められなかった。

表 2 全体及び試験区別の過剰排卵処理成績

	頭数	推定黄体数	回収卵数	正常胚数	正常胚率 (%)	未受精卵数	変性卵数
1 区 (CIDR)	12	9.25±5.19	11.25± 7.68	7.50±5.32	66.7±23.0	1.33±2.31	2.42±3.80
2 区 (CIDR+E)	12	11.33±7.44	12.58± 9.62	6.42±6.05	51.0±34.4	4.92±8.59	1.25±2.09
3 区 (対照区)	12	13.33±9.74	14.42±12.88	6.67±6.88	46.2±30.6	2.00±2.66	5.75±7.15
全体		11.31±7.65	12.75±10.08	6.86±5.96	53.8±30.3	2.75±5.44	3.14±5.07

注) 数値は平均値±標準偏差を表す。

表 3 回収卵の品質割合

単位 : %

	頭数	A ランク胚	B ランク胚	C ランク胚	変性胚	未受精卵
1 区 (CIDR)	12	48.9	10.4	7.4	21.5	11.9
2 区 (CIDR+E)	12	32.5	12.6	7.9	9.9	39.1
3 区 (対照区)	12	30.6	11.6	2.9	39.9	13.9

注) 数値は平均値を表す。

表4 CIDRを用いた過剰排卵処理におけるE併用による血漿中P濃度の推移 単位: ng/dl

	CIDR 挿入時	過剰排卵処理 開始時	人工授精時	胚回収時
1区 (CIDR)	2.7±2.0	6.0±4.9	0.4±0.1	11.9±5.1
2区 (CIDR+E)	3.2±1.3	2.0±2.1	0.3±0.0	13.7±7.8

注) 数値は平均値±標準偏差を表す。

考 察

牛の過剰排卵処理は、一般的に発情後9~14日後に黄体を確認し処理を開始している。そのため、牛の発情周期と過剰排卵処理のスケジュールに合わせて処理を実施しなければならず、計画的に採胚を実施するのに困難を生じているのが現状である。現在、過剰排卵処理において、発情周期のどの時期でも人為的に周期を制御できる持続性黄体ホルモン製剤(CIDR)の効果が報告されている。^{3,4)} 其中では、CIDRを用いた過剰排卵処理において、従来の発情後9~14日後に黄体を確認し開始している過剰排卵処理と同等の成績が得られている。本試験では、対照区と比べCIDRを用いた区とCIDRとE₂の併用区は、推定黄体数や回収卵数が少ない傾向が認められたが、有意差はなくほぼ同等の成績が得られた。このことは、発情の確認、黄体の確認等の労力削減ができ、発情周期に関係なく過剰排卵処理が可能であることを示唆している。

一方、近年超音波診断技術の進歩により、牛では発情周期中における卵巣中の卵胞動態の観察が進んでいる。¹¹⁾ この観察から、1発情期中には、2~3個の優勢卵胞(dominant follicle、以下DF)が順次発育退行する卵胞波が存在し、DFの存在により他の卵胞発育が抑制されることが知られている。²⁾ そのため、過剰排卵処理開始時のDFの存在がその成績に与える影響については、いくつか検討されており、DFの存在が過剰排卵処理成績に悪い影響を及ぼすとの報告が多い。⁷⁾

DFを機械的に消失させ、卵胞波を同期化してから過剰排卵処理を開始すると、良好な成績を得ている報告¹⁾が多いが、機械的な処理には、超音波断層装置を用い卵巣の経時的観察が必要であり、その労力は大きく、ホルモン剤によるDF制御が実用的である。

小西ら⁵⁾はCIDRを利用した過剰排卵処理においてEV(Estradiol-17β Valerate)投与により、回収卵数が増加したと報告している。また、低採胚成績の牛において、大卵胞吸引除去や

Estradiol-17β投与により採胚成績が有意に改善されたとの報告もある。^{1,5)} 本試験では、CIDR単独区と比べ明確な採胚成績の改善効果は認められなかった。しかし、傾向的变化としてCIDRとE₂の併用区で未受精卵数が多かったのは、橋村らの報告¹⁰⁾を裏付ける結果となった。

ただ、本試験ではE₂投与から過剰排卵処理開始までの間隔は10日、多くの報告^{1,5,10)}は5から6日間隔で実施されているため、比較できないが今後E₂投与時期、投与量について、更に検討する必要があると思われた。

CIDRを用い、過剰排卵処理した場合の血漿中P濃度におけるE₂の効果については、過剰排卵処理開始時にCIDR単独区の方がE₂を併用した区と比べ高かったが、人工授精時、胚回収時では差は認められなかった。さらに、血漿中のP濃度推移については、菅野ら⁶⁾、中野ら⁹⁾の報告と同様処置開始日より採胚日が高い傾向にあった。本試験では、血漿中P濃度と推定黄体数との間にも一定の傾向は見られず、CIDRを用いた過剰排卵処理においてE₂投与の有無による血漿中のP濃度変化は認められなかった。

今後は、胚回収の向上と安定化のため、CIDRを利用した過剰排卵処理におけるE₂の適切な投与方法の検討とともに、過剰排卵処理成績にはDF制御以外にも多くの要因が関与していると考えられるため、その要因解明が必要と思われた。

文 献

- 1) 青木義和・藤田耕・富澤泰・関島忠人・富家武男. 低採胚成績牛における大卵胞吸引除去とEstradiol-17β投与後の過剰排卵誘起とその後の採胚成績に及ぼすGn-RH製剤の投与効果. 日本胚移植学雑誌, 21(3): 126-132. 1999.
- 2) Adams, GP. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: Implication for synchronization super-stimulation. Theriogenology, 41: 19-24. 1994.
- 3) 市野清博・松岡一仁・石井俊昭・嶋屋佳子・

- 樫原孝正. 黄体ホルモン膣内挿入製剤を用いた連続過剰排卵処理法の検討. 山口県畜産試験場研究報告, 15 : 17-24. 1999.
- 4) 川島敬二・須藤慶子・高橋正博・砂川政広. 膣内留置型黄体ホルモン製剤を用いた黒毛和種未経産牛への連続過剰排卵誘起処置. 群馬県畜産試験場研究報告, 6 : 26-30. 1999.
- 5) 小西一之・堂地修・岡田真人・宮沢彰. 黒毛和種未経産牛におけるCIDRとFSHを用いた過剰排卵処理成績に及ぼすEstradiol-17 β の効果. 日畜会報, 68(11) : 1075-1084. 1997.
- 6) 菅野美樹夫・篠木忠・本間強・根本光輔・小林雄治. 黒毛和種供胚牛の血液成分を指標とした供胚牛選定の検討. 日本胚移植学雑誌 19(3) : 169-174. 1997.
- 7) Stock AE, Ellingston JE, Fortune JE. A Dominant follicle does not affect follicular recruitment by superovulatory doses of FSH in cattle but can inhibit ovulation. Theriogenology, 45:1091-1102. 1996.
- 8) 関沢文夫・斉藤光男・荒井徹. 受胎牛の血中プロゲステロン濃度と凍結保存に関する検討. 栃木県酪農試験場研究報告, 121 : 1-5. 1997.
- 9) 中野千代・明見好信・松崎重範・岩野信也・岩住安晃. 供胚牛の血液成分と卵巢反応の関係について. 繁殖技術会誌, 14(3) : 177-180. 1992
- 10) 橋村慎二・秋山清・岸井誠男. 受精卵移植技術高度化に関する試験 効率的過剰排卵処理方法の検討. 神奈川県畜産研究所試験研究成績書, 11-2 : 1-4. 1998.
- 11) 山城存・西銘清二・知念司・野中克治. 牛の受精卵移植技術簡易化試験 (3) CIDR装着時の卵胞動態およびエストロゲン投与が卵胞発育波に与える影響. 沖縄県畜産試験場研究報告, 35 : 1-8. 1997.
- 12) 家畜人工授精講習会テキスト (家畜受精卵移植編). 日本家畜人工授精師協会, 197-211, 鈴木達行.