

# ウシ胚移植における受胚牛の血中アンモニア濃度と 胚移植成績の関係

笹木教隆・田中 健・谷村英俊・朝倉利江<sup>1</sup>・福井幸昌<sup>2</sup>

## Relationship between Blood Ammonia Level and Pregnancy Rate following Embryo Transfer in Recipients

Kiyotaka SASAKI, Ken TANAKA, Hidetoshi TANIMURA, Rie ASAKURA<sup>1</sup>  
and Yukimasa FUKUI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>福井県家畜保健衛生所 <sup>2</sup>福井県嶺南牧場

### 要 約

受胚牛の血中アンモニア濃度を測定し胚移植成績との関係を調査することにより、血中アンモニア濃度の測定が受胚牛の選定方法として有効かどうか検討した。受胚牛を血中アンモニア濃度別 ( $\leq 30 \mu\text{g/dl}$ 、 $31 \sim 40 \mu\text{g/dl}$ 、 $41 \mu\text{g/dl} \leq$ )、黄体ランク別 (黄体の長径: 1cm) 可、 $1\text{cm} \leq$  良  $< 2\text{cm}$ 、優  $\geq 2\text{cm}$ ) に分類したところ、新鮮胚移植では一定の傾向はみられなかったが、凍結胚移植では各黄体ランクで血中アンモニア濃度が高くなるにしたがい受胎率が低下する傾向にあり、血中アンモニア濃度が  $30 \mu\text{g/dl}$  以下で優ランクの受胚牛は、 $31 \mu\text{g/dl}$  以上で良、可ランクの受胚牛に比べ受胎率が高かった。

移植胚数や hCG 投与の有無により受胎率に差はみられなかった。黄体ランク別受胚牛の血中アンモニア濃度に差はみられなかった。以上のことから、血中アンモニア濃度は受胚牛の選定方法として有効であることが明らかとなった。

### I 緒 言

牛の胚移植頭数は年々増加傾向にあるものの、平成 15 年度農林水産省の調査では新鮮胚移植の受胎率が 50%、凍結胚移植が 45% と人工授精に比べ 20~30% 程度低く、このことが胚移植技術を普及させるうえで大きな妨げになっている。

胚移植の受胎率に影響する要因としては、胚の凍結方法<sup>1) 13)</sup> 受胚牛の血液性状<sup>4) 8) 17)</sup>、発情徴候<sup>14)</sup> および血中ホルモン濃度<sup>6) 7)</sup> 等が報告されている。笹木ら<sup>12)</sup> は、移植成績が農家に

よりばらつきがみられ、受胚牛への給与飼料が受胎率に影響していることを報告している。受胚牛の給与飼料と血中アンモニア濃度の関係については、受胚牛へ給与する飼料の違いにより血中アンモニア濃度が変化する<sup>11)</sup> ことが報告されているが、受胚牛における血中アンモニア濃度と胚移植成績の関係についてはほとんど報告されていない。

そこで、これまで血中アンモニア濃度を測定した受胚牛の胚移植成績を調査し、血中アンモニア濃度と胚移植成績の関係について検討を行ない、血中アンモニア濃度の測定が受胚牛の選定方法として有効かどうか検討を行った。

( $\leq 30 \mu\text{g/dl}$ 、 $31\sim 40 \mu\text{g/dl}$ 、 $41 \mu\text{g/dl} \leq$ )  
に分類した。

## II 材料および方法

### 1 調査対象牛

平成12年5月から平成17年11月まで胚移植を行なったホルスタイン種、交雑種の未経産牛、経産牛の受胎牛、延べ443頭について調査を行なった。

### 2 移植胚および移植方法

移植には、前田らの方法<sup>5)</sup>に準じて黒毛和種より回収された新鮮胚および凍結胚1~2個を用いた。凍結方法は富永ら<sup>15)</sup>の方法に準じて行ない、植氷後、胚の入った10%グリセリン層に融解した0.6Mシュークロース層を重層させ、 $-30^{\circ}\text{C}$ まで冷却し、液体窒素に浸漬し保存した。移植は、凍結胚については移植時に液体窒素から取り出し、ワンステップストロー法により黄体を確認した受胎牛に対し黄体測子宮に移植した。新鮮胚は採卵後保温箱に入れ輸送後、翌日凍結胚と同様な方法により移植した。

### 3 移植前検査

移植前検査については、受胎牛は発情(発情日:0日)後3日目から移植日前日に直腸検査を行ない、黄体発育不全と診断された受胎牛に対しhCG(未経産1500IU、経産3000IU)を投与し、機能的黄体が確認できた受胎牛に対し移植を行なった。

### 4 黄体ランク

黄体ランクについては、移植時に直腸検査による黄体検査を行ない、黄体の長径別に1cm未満を可ランク、1cm以上2cm未満を良ランク、2cm以上を優ランクとした。

### 5 血中アンモニア濃度

血中アンモニア濃度は、移植前の検査時に受胎牛から濃厚飼料給与後3時間目以降に採血を行ない、直ちに氷温で保存後、1時間以内に微量拡散法(アミチェックメーター:京都第一化学)により測定し、アンモニア性窒素濃度で表した。受胎牛の血中アンモニア濃度は濃度別に3群

### 6 妊娠鑑定

妊娠鑑定は胚移植後30~50日に直腸検査法により実施した。

統計処理は $\chi^2$ 検定により行なった。

## III 結果

受胎牛を移植時の黄体ランク別に分類したところ、血中アンモニア濃度は優ランク: $33.8 \mu\text{g/dl}$ 、良ランク: $34.4 \mu\text{g/dl}$ 、可ランク: $34.4 \mu\text{g/dl}$ で、黄体ランク間で差はみられなかった(表1)。

表1 受胎牛における黄体ランクと血中アンモニア濃度

黄体ランク*	n	血中アンモニア濃度( $\mu\text{g/dl}$ )
優	165	$33.8 \pm 9.6$
良	194	$34.4 \pm 10.7$
可	84	$34.4 \pm 11.3$

\*: 黄体長径別(1cm>可、1cm $\leq$ 良<2cm、優 $\geq$ 2cm)

新鮮胚移植におけるにおける血中アンモニア濃度別受胎率は、 $\leq 30 \mu\text{g/dl}$ :50.0%、 $31\sim 40 \mu\text{g/dl}$ :34.3%、 $41 \mu\text{g/dl} \leq$ :51.5%で一定の傾向はみられなかった(図1)。

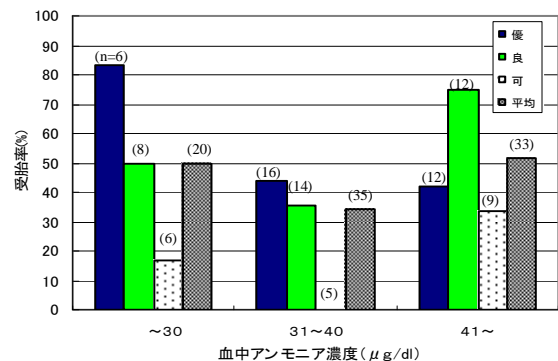


図1 新鮮胚移植における受胎牛の血中アンモニア濃度と黄体ランク別受胎率

凍結胚移植におけるにおける血中アンモニア濃度別受胎率は、 $\leq 30 \mu\text{g/dl}$ :46.0%、 $31\sim 40$

$\mu\text{g/dl}$ :41.1%、 $41\mu\text{g/dl}\leq$ :33.8%で、血中アンモニア濃度が高くなるにしたがい受胎率は低下する傾向にあった。黄体ランクごとの移植成績においても血中アンモニア濃度が高くなるにしたがい受胎率が低下する傾向にあった。血中アンモニア濃度が  $30\mu\text{g/dl}$  以下で優ランク受胎牛は、 $31\mu\text{g/dl}$  以上で良、可ランクの受胎牛に比べ受胎率が高く、血中アンモニア濃度が  $31\sim 40\mu\text{g/dl}$  で優ランクの受胎牛は、 $31\mu\text{g/dl}$  以上で良ランクの受胎牛に比べ受胎率が高かった ( $P<0.05$ )。(図2)。

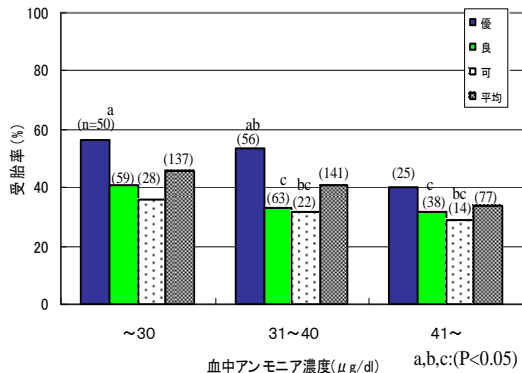


図2 凍結胚移植における受胎牛の血中アンモニア濃度と黄体ランク別受胎率

血中アンモニア濃度別受胎率で一定の傾向がみられた凍結胚移植における血中アンモニア濃度と hCG 投与別受胎率は、投与群 42.7%、未投与群 39.0%で受胎率に差はみられなかった (図3)。

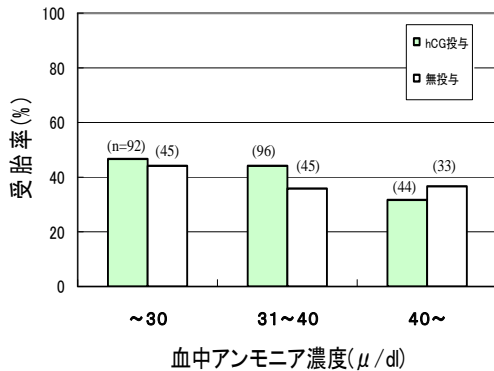


図3 凍結胚移植における血中アンモニア濃度と hCG 投与別受胎率

#### IV 考 察

笹木ら<sup>1,2)</sup>は、移植農家の受胎牛への給与飼

料を改善することにより血中アンモニア濃度は低下傾向にあり、ばらつきも小さくなったことを報告している。また、浦川ら<sup>16)</sup>は、アンモニアを添加した培地で胚を培養したところ、胚の発育に悪影響を及ぼすことを報告している。このことから、受胎牛の血中アンモニア濃度が高くなると、子宮内のアンモニア濃度も高くなると考えられ、これが移植された胚にダメージを与えているものと思われる。

牛におけるの血中のアンモニアは給与飼料中の分解性摂取蛋白 (DIP) がルーメン内で分解し、アンモニアとなってルーメン内壁より吸収され生体内に入るため、給与された DIP 量により変化する<sup>12)</sup>ことから、給与量を減らす事でも低下すると推察されるが、給与量を減少させることにより給与飼料中の可消化養分総量 (TDN) 不足を招き繁殖機能に悪影響を与える<sup>2)</sup>ことが懸念される。しかし、給与バランスのとれた適正な飼料を受胎牛に給与する<sup>10)</sup>と、受胎牛の血中アンモニア濃度は高くなり、繁殖機能も良好になることから、血中アンモニア濃度が低く黄体ランクが良好な群の受胎率が高くなったのではないかとと思われる。

hCG 投与の有効性については、今回移植成績に差は認められなかった。斉藤ら<sup>9)</sup>は移植前に hCG を投与し、黄体の長径が 1.5 cm 以上になると受胎率が向上することを報告している。今回の調査では、移植の検査で黄体機能不全と診断された受胎牛に対してのみ投与しており、hCG の投与により状態が悪かった受胎牛の状態が向上し底上げされたため、状態の良い未投与群との間で移植成績に差が無かったのではないかとと思われる。

Fischer-Brown ら<sup>3)</sup>は受胎牛へ高蛋白質飼料を給与した群と低蛋白飼料を給与した群に人工授精、生体内由来凍結胚移植、体外受精由来新鮮胚移植を実施したところ、人工授精、生体内由来凍結胚移植では受胎率に差はみられなかったものの、体外受精由来新鮮胚移植では高蛋白質飼料給与群の受胎率が低かったことを報告している。今回の成績においては、新鮮胚移植では血中アンモニア濃度により受胎率に一定の傾向はみられず、凍結胚では血中アンモニア濃度が高くなるにしたがい受胎率が低下傾向にあったことから、新鮮胚に比べ胚の生存性がやや低

下すると思われる凍結胚の方が子宮内のアンモニア濃度に影響されやすいのではないかと推察される。

受胎牛の黄体ランクについては胚移植を行う受胎牛の選定方法の指標として用いられているが、受胎牛における黄体ランク別血中アンモニア濃度については差がみられなかった。このことから、受胎牛の血中アンモニア濃度は受胎に影響を及ぼすプロジェステロン濃度<sup>7)</sup>とは異なった側面の受胎要因と思われる。

以上のことから、受胎牛において血中アンモニア濃度を測定することは、受胎牛の選定方法として有効と思われ、黄体検査との併用によりより効率的な受胎牛の選定が可能になることが明らかとなった。

### 参考文献

- 1) Dochi. O.・Imai. K. and Takakura. H. Birth of calves after direct transfer of the wed bovine embryos stored frozen in ethy leneglycol. Anim. Reprod. Sci, 38:179-185. 1995.
- 2) Dunn, T. G. J. E.・Ingalls, D. R.・Jimmerman and J. N.・Wiltbank. Reproductive performance of 2 - year-old Hereford and Angus heifers as influenced by pre and post- calving energy intake, J. Aim. Sci, 29: 719-726, 1969.
- 3) Fischer-Brown. A. E. , Reduced dietary protein improves pregnancy rates following transfer of in vitro produced bovine embryos. Theriogenology, 59 (1) :364. 2003.
- 4) 伊藤博康・小林正人・今田匡彦・青柳和重・叶内恒雄・武田文雄・早坂恭二. 胚移植における未経産受胎牛の血清脂質と受胎率. 東日本 E T 研報, 12:58. 1996.
- 5) 前田淳一・小林修一・笹木教隆・野上高靖・松山 茂. 牛の人工妊娠技術の実用化に関する研究. 福井県畜産試験場研究報告, 11:20-29. 1989.
- 6) 中西喜彦・加治佐 修・江副 幹太・後藤和文・田崎道弘・大田 均・猪八重 悟・立山昌一・川端 孟・小川清彦. 黒毛和種供卵牛の種々の血液成分と卵質の関係. 日畜会報, 62(6) : 546-551, 1991.
- 7) 西貝正彦・下平乙夫・加茂前秀夫. 簡易血中黄体ホルモン測定キットを用いた移植前日の P 濃度測定による受胎牛の選定. 東日本 E T 研報, 11:30-31. 1995.
- 8) Park. S. B.・Im. S. K.・Woo. J. S.・Kim. I. H.・Choi. S. H. Suh. G. H. Ryu. I. S. and Son. D. S. The usefulness of plasma urea nitrogen test as an indicator for recipient selection for bovine embryo Transfer. Theriogenology, 53:315, 2000.
- 9) 齊藤康倫. 受胎牛選別のための臨床並びに内分泌所見. 家畜繁殖誌, 37. 5:71-77. 1991.
- 10) 笹木教隆・河合隆一郎・小林修一・生水誠一・近藤守人・松井 司・前田淳一. 乳牛における胚移植の受胎成績と飼料給与の関係. 日獣会誌, 51, 10:583-587, 1998.
- 11) 笹木教隆・河合隆一郎・前田淳一. 供胎牛に置ける血中アンモニア濃度と給与飼料が胚回収成績に及ぼす影響. 日畜会報, 72(9) : J337 -J342. 2001.
- 12) 笹木教隆・前田淳一・河合隆一郎. 牛胚移植成績別農家における給与飼料が受胎牛の血液生化学検査成績におよぼす影響. 東日本 E T 研報, 18:60-61. 2002.
- 13) 鈴木達行・羽根茂雄. 牛の血中  $\beta$ -カロチン濃度と繁殖性—とくに供卵牛と受卵牛の卵巣反応と受胎性—. 畜産の研究, 40. 10: 67-69. 1986.
- 14) 田中芳実・移植候補牛の移植成功率向上に関する要因. 日本胚移植学雑誌, 1, 2:113-119, 1994.
- 15) 富永敬一郎・道後泰治・猪八重悟・中井貞夫・小山秀一・内海恭三・藤井好孝・松山謙二. 牛の受精卵移植技術の実用化に関する研究. 兵庫畜試研報, 22:37-46・1985.
- 16) 浦川真実・出田篤司・岩佐昇司・酒井伸一・武富敏郎・小西正人・青柳敬人. 家畜人工授精, 234(5月):45-47・2006.
- 17) 柳田宏一・片平清美・紙屋 茂・谷本保幸・元石睦郎・後藤和文・大久津昌治・中西喜彦. 受胎牛の栄養管理と受胎性. 繁殖技術会誌, 15, 2: 49-53, 1993.

## Relationship between Blood Ammonia Level and Pregnancy Rate following Embryo Transfer in Recipients

Kiyotaka SASAKI, Ken, TANAKA Hidetoshi TANIMURA, Rie ASAKURA<sup>1</sup>  
and Yukimasa FUKUI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fukui Prefectural Health and Sanitation Center <sup>2</sup>Fukui Prefectural  
Reinan Livestock Farm

The aim of this study was to examine the relationship blood ammonia level and pregnancy rate following embryo transfer on recipients. As recipients were divided into the groups according to the difference in blood ammonia level ( $\leq 30 \mu\text{g/dl}$ ,  $31 \sim 40 \mu\text{g/dl}$ ,  $41 \mu\text{g/dl} \leq$ ) and to the difference in the rank of luteum (size of luteum :  $1\text{cm} > \text{Fair}$ ,  $1\text{cm} \leq \text{Good} < 2\text{cm}$ ,  $\text{Excellent} \geq 2\text{cm}$ ). There was no relation between blood ammonia level and pregnancy rate following embryo transfer on recipients when fresh embryo was transferred. But As for the recipients when frozen embryo was transferred, the pregnancy rate of recipients with blood ammonia level under  $30 \mu\text{g/dl}$ , the luteum of Excellent were significantly higher than that of blood ammonia level over  $31 \mu\text{g/dl}$  with the luteum of Fair and Good ( $p < 0.05$ ). There was no relation between the pregnancy rate and the injection of hCG. There was no relation between the rank of luteum in recipients and the blood ammonia level. These results show the examination of the blood ammonia level in recipients is effective in improving the pregnancy rate after frozen embryo transfer.