

雌雄選別精液の子宮角深部注入が過剰排卵処置したホルスタイン種 経産牛の採卵成績に及ぼす影響

堀川 明彦・小林 崇之・近藤 守人

要約 ホルスタイン種経産牛から効率的に雌受精卵を生産するために、過剰排卵処置(SOV)の人工授精(AI)に雌雄選別精液を用い、採卵成績を検討した。SOV後のAIは発情確認日(初回)と翌日(2回目)に行った。初回のAIは対照区では子宮体部注入を行い、試験区では子宮角深部注入を行った。2回目のAIでは両区共に子宮体部注入を行った。その結果、採卵成績では平均回収卵数に両区で差はなかったが、平均正常胚率、平均移植可能胚率ともに試験区で低い傾向であった。また、未受精卵の回収数は対照区より試験区が多かった。これらの結果から、ホルスタイン種経産牛にSOV後に雌雄選別精液を用いた場合、発情確認後の初回AIに子宮角深部注入を行ったが、採卵成績は改善しないことが示唆された。

キーワード：雌雄選別精液、子宮角深部注入、過剰排卵処置、ホルスタイン種経産牛

I 緒言

受精卵の雌雄判別技術は、後継牛の安定確保ができ、経産牛の更新計画が立てやすくなることから、酪農および肉用牛経営の生産性の効率化と低コスト化に繋がる有益な技術である。これまでに開発されている雌雄判別技術として、胚の一部をバイオプシーにより採取し、DNAを診断するPCR法(Herr et al., 1990)やLAMP法(Hirayama et al., 2004)が実施されている。しかし、マニピュレーター等の特別な施設整備や技術が必要であること、実用的な緩慢凍結法で保存されたバイオプシー胚では高い受胎率が得られないなど、普及の妨げとなるような課題が多い(北山ら、2004)。

近年、フローサイトメーターで選別された雌雄選別精液を用いることで、農家自身がAIにより雌産子を生産することが可能である。しかし、経産牛における雌雄選別精液を用いたAIの受胎率は低い傾向にあり、受胎率およびコストの面からも未經産牛での活用が推進されている

(早川ら、2008)。また青柳ら(2009)も、雌雄選別精液をSOVに利用する手法は未經産牛を行うことを提案しており、採取した胚の受胎率が通常胚と同等であれば、改良と増殖を兼ねた雌生産技術として普及する可能性があると述べている。

当场ではこれまでに、受精卵移植技術を活用したホルスタイン種経産牛の効率的な改良増殖を目的に、雌雄選別精液を用いた雌受精卵の生産技術について検討してきた(小林、2009)。本試験では、雌雄選別精液を用いたホルスタイン種経産牛の採卵成績を向上させるため、SOV後の初回AIに子宮角深部注入を行い、その有効性を検討した。

II 材料および方法

1 供卵牛

福井県内の酪農家19戸で飼養されているホルスタイン種経産牛645頭の中から、5産以上分娩し、かつ産乳能力が高い上位3頭(平均産

表1 過剰排卵処置スケジュール

日	1	4	5	6	8	9	15
処置内容	AM E2:2mg CIDR 挿入	FSH:6AU	FSH:5AU	FSH:4AU	GnRH:200 μ g PG:625 μ g CIDR 抜去	AI(2回目)**	採卵
	PM	FSH:6AU	FSH:5AU	FSH:4AU	AI(1回目)*		

E2:安息香酸エストラジオール, CIDR:腔内留置型プロジェステロン, FSH:卵胞刺激ホルモン, PG:プロスタグランジン F2 α , GnRH:性腺刺激ホルモン放出ホルモン

* 対照区は子宮体部に1本, 試験区は左右子宮角深部に1本ずつ(計2本)の精液を注入した。

** 対照区, 試験区共に子宮体部に1本の精液を注入した。

歴7.0産)を供卵牛として用いた。また、対照区および試験区で供卵牛3頭をそれぞれ1回供試した。

2 SOV

発情確認後、7日目の黄体期に安息香酸エストラジオール(動物用オバホルモン注、あすか製薬)を2mg投与し、腔内留置型黄体ホルモン製剤(CIDR、イージーブリード、家畜改良事業団)を挿入した。CIDR挿入後4日目より総量30AU(6・6・5・5・4・4AU)の卵胞刺激ホルモン剤(FSH、アントリンR10、川崎三鷹製薬)を3日間漸減投与した。FSH投与最終日にクロプロステノール(エストラメイト、ナガセ医薬品)を625 μ g投与し、同時にCIDRを抜去した。CIDR抜去後3日目に酢酸フェルチレリン(コンセラル、ナガセ医薬品)を200 μ g投与した(表1)。

3 AIおよび採卵

スタンディング発情を確認した同日の夕刻と翌日の朝方にAIを計2回実施した。雌雄選別精液は採卵用Sort90(家畜改良事業団)を使用した。対照区では初回と2回目のAIでそれぞれ1本の精液を使用し、人工授精用シース管(富士平工業)を用いて子宮体部に注入した。試験区は初回AI時、砂川ら(2011)の手法に従い0.5mlストロー用に改変した動物用受精卵注入カテーテル「モ4号」(ミサワ医科工業)を使用し、左右の子宮角深部に精液を1本ずつ注入した。2回目のAIは対照区と同じ方法で子宮体部に1本の精液を注入した。

AI後7日目に採卵を行い、回収された卵子数

および胚の品質を調査した。受精卵の品質は家畜人工授精講習会テキスト(日本家畜人工授精師協会、1996)の基準に従って評価し、桑実胚および胚盤胞期胚でA、A'、B、C、Dの5段階評価でCランク以上のものを移植可能胚、未受精卵をDランクとした。

III 結 果

採卵成績を表2に示した。供卵牛3頭の平均回収卵数は対照区で2.7個、試験区で3.0個であった。平均移植可能胚数は対照区で1.7個、試験区で1.0個、平均移植可能胚率は対照区で63%、試験区で33%であり対照区が高かった。平均未受精卵数は対照区で0.3個、試験区で2.0個、平均未受精卵率は対照区で13%、試験区で67%であり試験区が高かった。

個体別にみると、供卵牛YおよびZについては、両区ともにSOVの反応が悪く、試験区は卵子を回収することができなかった。また、供卵牛Xについては、両区ともにSOVの反応が良く、対照区から3個、試験区から4個の移植可能胚を回収することができた。

表4に回収した胚を発生ステージ別に分類した。対照区からは未受精卵3個、後期桑実胚3個、初期胚盤胞期胚1個、拡張胚盤胞期胚1個を回収した。試験区からは未受精卵7個、桑実胚2個、初期胚盤胞期胚1個を回収した。

表2 採卵成績

区	供卵牛*	回収卵数 (a)	移植可能胚数 (b)	移植可能胚率 (%:b/a)	未受精卵数 (c)	未受精卵率 (%:c/a)
対照区	X	6.0	4.0	67	0	0
	Y	1.0	1.0	100	0	0
	Z	1.0	0	0	1.0	100
	平均	2.7	1.7	63	0.3	13
試験区	X	9.0	3.0	33	6.0	67
	Y	0	0	0	0	0
	Z	0	0	0	0	0
	平均	3.0	1.0	33	2.0	67

* 供卵牛3頭を対照区と試験区で1回ずつ供試した。

表3 回収した胚のステージ

	未受精卵	桑実胚	後期桑実胚	初期胚盤 胞期胚	胚盤胞期胚	拡張胚盤 胞期胚	計
対照区	3	0	3	1	0	1	8
試験区	7	2	0	1	0	0	10

IV 考 察

雌雄選別精液はフローサイトメトリーによる選別のダメージにより、通常精液と比較して精子の運動性が劣ると報告されており(Blondin et al., 2009)、このことが低い受胎率の一要因として懸念されている。そこで今回の試験では、精子の運動性低下を補うため、SOV後の初回AI時における子宮角深部注入の有効性を検討した。

SOVは供卵牛によって反応性の差が大きいいため、採卵成績に個体差が生じることが指摘されている。今回の試験でも、供卵牛X以外の2頭は超音波画像診断によりSOVの反応性低下が認められており、平均回収卵数が少ない結果(対照区2.7個、試験区3.0個)となった。

採卵成績を対照区と試験区で比較したところ、平均回収卵数に差は認められなかった。しかし、試験区では平均移植可能胚率は低く、平均未受精卵率が高い傾向が認められた。これは、今回の試験で用いた供卵牛(平均産歴7.0産)について、発情後初回AI時に子宮角深部注入を行ったが、採卵成績を改善することができなかった

ことを示している。砂川ら(2011)はホルスタイン種経産牛のSOV後のAIにおいて、発情開始後20~24時間に子宮角深部注入を行うことで、通常精液を用いた場合と同等の採卵成績が得られたと報告している。今回の試験では初回AI時(発情開始後7~8時間後)に子宮角深部注入を行っており、回収した胚のステージを対照区と比較したところ、試験区で桑実胚および未受精卵が多く回収された。このことから、試験区で行った子宮角深部注入によるAIは適切な時期に実施できていなかったことが考えられる。

Moceら(2006)は、雌雄選別精液に含まれる精子は卵管膨大部に放出された後、受精能獲得と先体反応が早く誘起されると述べている。このことから、試験区では子宮角深部注入によって精子が早くから卵管に貯留したため、排卵後の受精時期よりも早くに精子が受精能を失ってしまったことが原因で採卵成績が低下したと考えられる。

また、今回の試験では初回AI時に子宮角深部注入で2本の精液を使用した試験区の方が、子宮体部注入で1本の精液を使用した対照区よりも採卵成績が低かった。このことは、適切でない時期により多くの雌雄選別精液を使用し

て子宮角深部注入を行っても、採卵成績の向上に効果がないことを示している。Schenk(2008)らは、雌雄選別精液のAI適期は通常精液よりも遅い可能性を指摘しており、SOV後のAIを子宮角深部注入で行う適期について検討する必要があると思われた。

以上のことから、ホルスタイン種経産牛にSOV後に雌雄選別精液を用いた場合、発情確認後の初回AIに子宮角深部注入を行っても、採卵成績は改善しないことが示唆された。

文 献

- 青柳敬人. ウシ胚のダイレクト凍結融解法による実証事例について. 日本胚移植学雑誌, 31(1):47-51. 2009.
- 北山智弘・吉村義久・林登・高井尚治. 牛バイオプシー胚の保存方法と受胎性. 岐阜県畜産研究所研究報告, 4:36-39. 2004.
- 小林修一・朝倉裕樹. 雌雄産み分け用選別精液を用いたホルスタイン種経産牛の採卵成績. 東日本家畜受精卵移植技術研究会大会, 講演要旨:40-41. 2009.
- Schenk, JL. and Seidel, GE. Timed insemination of heifers with sexed sperm. *Reproduction, Fertility and development*, 20:214. 2008.
- 砂川政弘・角田毅・根岸淳江・原田守也. 過剰排卵処置したホルスタイン種牛への雌雄選別精液の子宮角深部注入. 日本胚移植学雑誌, 33:44. 2011.
- 日本家畜人工授精師協会. 家畜人工授精講習会テキスト. 日本家畜人工授精師協会, 東京, 1996.
- 早川宏之. ここまできた雌雄判別より効率的な精液の利用のために. *デーリーマン*, 58(5):48-49. 2008.
- Herr CM, Holt NA, Matthaei KI, Reed KC. Sex of progeny from bovine embryos sexed with a rapid Y-chromosome-detection assay. *Theriogenology*, 33(1):247. 1990.
- Hirayama H, Kageyama S, Moriyasu S, Sawai K, Onoe S, Takahashi Y, Katagiri S, Toen K, Watanabe K, Notomi T, Yamashina H, Matsuzaki S, Minamihashi A. Rapid sexing of bovine preimplantation embryos using

loop-mediated isothermal amplification. *Theriogenology*, 62(5):887-896. 2004.

Blondin P, Beaulieu M, Fournier V, Morin N, Crawford L, Madan P, King WA. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. *Theriogenology*, 71:30-38. 2009.

Moce E, Graham JK, Schenk JL. Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an acrosome reaction. *Theriogenology*, 66:929-936. 2006.

**Effect of artificial insemination at uterine horn with sex preselection
by separation of X- and Y-chromosome (Sort90)
on the fertilization rate and embryo quality
in superovulated Holstein cows**

Akihiko HORIKAWA, Takayuki KOBAYASHI and Morito KONDO
Fukui Prefectural Livestock Experiment Station

Abstract

To investigate the effect of bilateral uterine horn Artificial insemination(AI) on the production efficiency of female transferable embryo, superovulated embryo collection in multiparaous(5 \geq) Holstein cows was carried out using Sort90. AI was performed twice at 7~8h and 19~20h after the onset of estrus. According to the difference of AI deposition, two trials (control and Ex trial) were performed using same three cows as donors: Control trial: Donors were inseminated twice into uterine body with one Sort90 respectively; Ex trial: Donors were inseminated into uterine horn bilaterally with two Sort90 at the first AI, and one Sort90 at the second AI. No difference was observed at the number of embryo/ova between two trials. However, the rate of fertilized/transferable embryos in Ex trial was lower than that in control trial. In addition, donors had an increase in the number of unfertilized ova in Ex trial. These results suggested that the suboptimal timing of bilateral uterine horn AI appeared to be no beneficial effect result in fertilization rate and subsequent embryonic development.

Key word:X-sorted sperm, uterine horn, superovulation, Holstein cow