

乳牛未経産牛における受精卵 (胚) 回収技術の確立 (第 2 報)

鈴木要人・高松英里奈¹⁾・澤田芳憲・横田昌己²⁾

1) 現 丹南農林総合事務所, 2) 現 自然保護センター

要 約 高泌乳牛は強い泌乳ストレスにより卵巢反応性が低下しており, 過剰排卵処理 (SOV) 後に人工授精 (AI) を実施しても受精卵 (胚) が効率的に回収できない現状にある。そこで, 泌乳開始前の未経産牛を供胚牛にすることを目的として, 本県の採胚プログラム⁴⁾に基づき適切な FSH 投与量を前報⁶⁾で検討し 20AU に決定した。しかし, 16AU と比べ凍結可能胚率の低下が課題となった。そこで, 課題の改善を目的にプロスタグランジン F2 α 製剤 (PG) の投与回数および CIDR 挿入期間について検討した。試験区を PG2 回の漸減投与とし, CIDR 挿入期間により 5 日を試験区 1, 5.5 日を試験区 2 とした。また, 前報⁶⁾で報告した FSH 総量 20AU, PG 単回投与, CIDR 挿入期間 5.5 日の区を対照区とした。試験区は各区 5 頭の計 10 頭。対照区は 7 頭とし, 3 区全体で 17 頭とした。その結果, 採胚時の黄体数, 回収胚数, 移植可能胚数, 移植可能胚率および凍結可能胚数において, 試験区 1 で高い傾向を示した。採胚後の繁殖成績は 3 区間で有意差はみられず, SOV 方法の違いによる繁殖性への影響は認められなかった。これらの結果から, 未経産牛の SOV については試験区 1 の方法が適切であると判断した。

キーワード: 乳牛, 未経産牛, 採胚, 過剰排卵処置 (SOV), PG

諸 言

高能力乳牛の効率的増産を目的として, 高能力乳牛から作出された受精卵 (胚) を受胎牛へ移植し, その後分娩により産子を得る胚移植 (ET) 技術が広く活用されている。ET のメリットとして人工授精 (AI) に比べて農家内での牛群の改良スピードが促進されること, また暑熱期やリピードブリーダー牛の受胎率向上が期待できることが挙げられる^{2, 13)}。さらに, 性選別精液を用いて作出した胚を移植すれば ET においても産子の雌雄産み分けが可能となる。

胚の作出 (採胚) 方法としては大きく分けて 2 通りあり, 雌牛の生体内から卵子を回収し成熟させたのちに体外受精 (IVF) し体外培養することで体外胚を作出する方法 (OPU-IVF) と過剰排卵処理 (SOV) を施した雌牛に人工授精 (AI) を行った後, 非外科的手法により体内胚を回収

する方法に分かれる。前者は SOV を不要とし, 短期間で繰り返し卵子を採取できる。反面, 採取した卵子を成熟培養・体外受精・体外培養する設備や技術が必要となるため, 当試験場の附置機関である奥越高原牧場では SOV を施した後に AI を実施し乳用経産牛の胚回収および凍結を業務の一環として行い, 県内酪農家の乳用牛更新を支援している。

しかし, 高泌乳牛を供胚牛にすると, 泌乳能力向上に伴う産乳ストレスにより SOV の卵巢反応性が低下し凍結可能胚数が減少する傾向にある¹¹⁾。卵巢反応性を向上させるため, ホルモン剤の投与量を増やす方法があるものの, 胚回収後の繁殖性に影響し, 以後の受胎率が低下する恐れがある。

これらのことから, 泌乳開始前の乳用未経産牛を供胚牛とした取り組みが全国で始まっているが, 未経産牛での胚回収技術が未だ確立されていないこと, 加えて未経産牛における SOV は

その後の繁殖性に悪影響を及ぼす恐れがあることが依然として普及していない一因として挙げられる。そこで、前報⁶⁾では卵胞発育ホルモン (Follicle Stimulate Hormone; FSH) の投与量について検討したところ、20AU が乳用未経産牛 SOV に適した FSH 投与量であると判断した。一方で、16AU と比べ凍結可能胚率の低下が課題として挙げられた。本報では、黄体退行を誘発するプロスタグランジン F2 α 製剤 (PG) の単回投与から 2 回の漸減投与に変更し、排卵のタイミングの同一化および胚の品質向上を図るとともに、漸減投与に適した膈内留置型プロゲステロン製剤 (CIDR) の留置期間について検討した。また、採胚後の繁殖成績について追跡調査を行った。

材料および方法

1 供試牛

奥越高原牧場にて飼養するホルスタイン種未経産牛 17 頭 (月齢 14.1 \pm 0.5 ヶ月齢) を対象に、2021 年 3 月~2023 年 3 月に採胚を実施した。また、採胚は供試牛 1 頭につき 1 回のみ実施し、反転は行わなかった。なお、採胚には、13 ヶ月齢時の体高が 130 cm 以上の個体を供胚牛として用いた。

2 試験区分

FSH の総投与量を 20AU、PG を 2 回の漸減投与とし、膈内留置型プロゲステロン製剤 (CIDR) の留置期間の違いにより 2 区を設定し、各区 5

頭配置した。なお、前報⁶⁾で報告した FSH 総投与量 20AU、PG 単回投与の 20AU 区 7 頭を対照区に設定した。

3 SOV, AI, 採胚

SOV から採胚までは、本県の採胚プログラム⁴⁾に基づき、以下の通り実施した (図 1)。

(1) SOV

SOV は発情の前後を避けた周期で開始した。超音波画像診断装置 (HS-1500; 本多電子株式会社, 愛知) で開花期黄体と小卵胞数を確認し、直径 8mm 以上の卵胞は経膈プローブに採卵針 (富士平工業株式会社, 東京) を装着したものをを用いて全て吸引除去した。その後、CIDR (イメージブリード; サージミヤワキ株式会社, 東京) を挿入し留置した。処理開始日を 0 日目とし、2 日目夕方から 5 日目朝まで FSH 総量 20AU (アントリン R \cdot 10; 共立製薬株式会社, 東京) を 4 日間の計 6 回漸減投与した。試験区では、4 日目の夕方と 5 日目の朝に PG (エストラメイト; MSD アニマルヘルス株式会社, 東京) を 500 μ g と 250 μ g それぞれ投与し、試験区 1 では 4 日目夕に、試験区 2 では 5 日目朝に CIDR を抜去し、発情を誘起した。一方、対照区では、4 日目の夕方に PG を 750 μ g 投与、5 日目朝に CIDR を抜去し、発情を誘起した。3 区とも 6 日目朝に性腺刺激ホルモン放出ホルモン製剤 (Gonadotropin Releasing Hormone; GnRH; コンセラルール 100, ナガセ医薬品株式会社, 兵庫) を 100 μ g 投与し、7 日目朝に卵胞数を計測後、AI を実施した (図 1)。

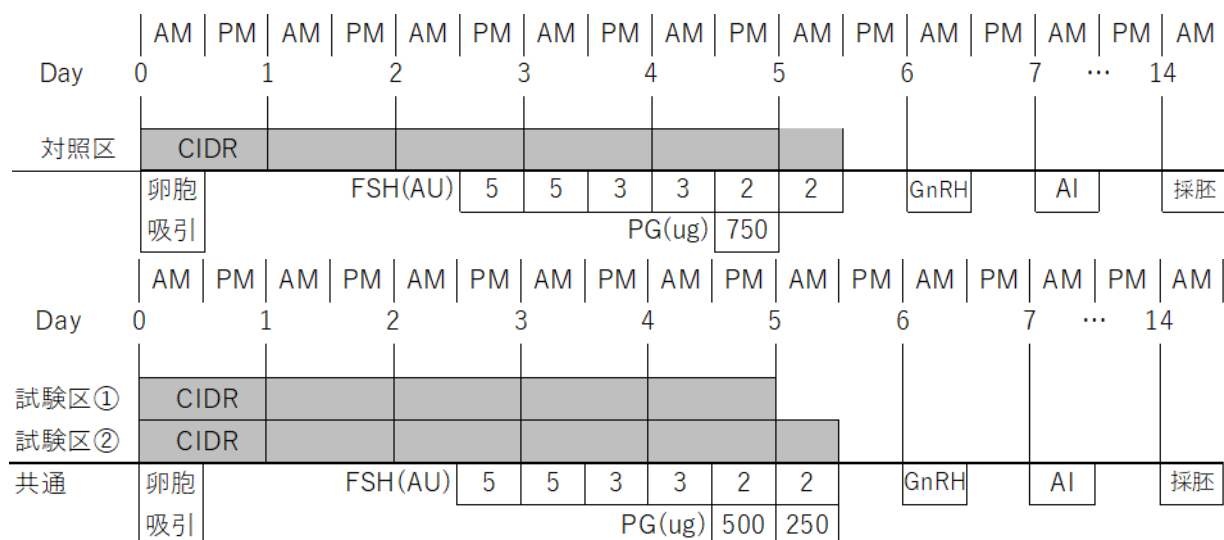


図 1 SOV~採胚までのスケジュール

(2) AI, 採胚

前報⁶⁾の方法に準じて実施し, AI には, AM カテーテル (富士平工業株式会社, 東京) を用いて性選別精液を左右子宮角深部へ各 1 本注入した。採胚は, 14 日目朝に黄体数と残存卵胞数を計測後, 多穴式 16Fr のバルーンカテーテル (富士平工業株式会社) を用いた子宮内還流法で実施した。還流液には, ハルゼン-V 注射液 (日本全薬株式会社, 福島) 1,000 ml にウシ血清 (Bovine Serum; GIBCO, 米国) と抗生物質 (ベンジルペニシリン 100 IU/ml; Meiji Seika ファルマ株式会社, 東京, ストレプトマイシン 100mg/ml; Meiji Seika ファルマ株式会社) を添加したものを使用し, メッシュ付きシャーレ (セルコレクター; 富士平工業株式会社, 東京) に回収後, 検卵を行った。回収した胚は IETS マニュアルの基準⁸⁾に従って評価し, 収縮桑実胚~胚盤胞期胚で B ランク以上を凍結可能胚, C ランク以上を移植可能胚に分類し, 回収卵数に対する凍結可能胚数および移植可能胚数の割合を算出した。

4 採胚後の追跡調査

前報⁶⁾の方法に準じて調査し, 採胚終了直後, 早期に発情を回帰させるため, PG750 μ g を単回

投与した。また, 採胚終了後に回帰した発情の次周期より AI を実施し, その後受胎までの追跡調査を行った。

5 調査項目

(1) 採胚成績

AI 時 (処理開始から 7 日目) の大卵胞数, 採胚時 (処理開始から 14 日目) の黄体数, 残存卵胞数, 回収胚数, 移植可能胚数 (率) および凍結可能胚数 (率) について調査した。

(2) 採胚後の繁殖成績

採胚後, 発情回帰までに要した日数, 受胎までに要した AI 回数および日数について調査した。

6 統計処理

統計処理は一元配置分散分析を実施し, Tukey 法を用いた多重比較を行った。有意水準が 5%未満 ($p < 0.05$) を有意差ありとした。

結 果

1 卵胞発育性および黄体形成

AI 時の大卵胞数は試験区 1 で 9.0 ± 2.9 個, 試験区 2 で 8.6 ± 1.6 個, 対照区で 8.7 ± 3.3 個となり,

表 1 採胚成績

	7日目		14日目						
	大卵胞数 (個)	黄体数 (個)	残存卵胞数 (個)	回収胚数 (個)	移植可能胚数 (個)	移植可能胚率 (%)	凍結可能胚数 (個)	凍結可能胚率 (%)	未受精卵数 (個)
試験区① (n=5)	9.0 \pm 2.9	11.6 \pm 4.8	0.8 \pm 1.0	9.2 \pm 5.6	6.4 \pm 3.7	70.2 \pm 24.0	2.6 \pm 1.4	26.5 \pm 20.5	0.8 \pm 1.0
試験区② (n=5)	8.6 \pm 1.6	6.8 \pm 1.6	2.8 \pm 1.0	4.2 \pm 3.4	1.8 \pm 1.5	42.7 \pm 32.9	0.4 \pm 0.5	10.0 \pm 13.3	0.6 \pm 0.5
対照区 (n=7)	8.7 \pm 3.3	7.9 \pm 2.6	1.0 \pm 1.1	6.1 \pm 2.7	3.9 \pm 2.0	62.0 \pm 24.8	2.1 \pm 1.6	29.6 \pm 15.6	0.7 \pm 0.9

表 2 胚の品質

	凍結可能胚		Cランク	Dランク	未受精卵
	Aランク	Bランク			
試験区① (n=5)	0	2.6	3.8	1.8	0.8
試験区② (n=5)	0	0.4	2	1.6	0.6
対照区 (n=7)	0.7	1.4	1.7	1.6	0.7

表 3 繁殖成績

	回帰日数 (日)	AI回数 (回)	受胎日数 (日)
試験区①	7.6 \pm 6.0	1.7 \pm 0.5	58.3 \pm 24.3
試験区②	6.8 \pm 3.0	1.4 \pm 0.5	79.2 \pm 18.6
対照区	6.0 \pm 1.9	2.9 \pm 1.2	86.1 \pm 32.2

3 区間で有意な差はなかった (表 1)。

2 採胚成績

採胚時の黄体数、回収胚数、移植可能胚数、移植可能胚率および凍結可能胚数において、試験区 1 が他の区より高い傾向を示し、残存卵胞数については試験区 1 と対照区で試験区 2 よりも低い傾向を示した。凍結可能胚率は試験区 1 と対照区で試験区 2 よりも高い傾向を示した (表 1)。また、回収胚の品質について試験区で A ランク胚は回収できなかったが、B ランクおよび C ランク胚においては、試験区 1 が他の 2 区よりも 1 頭あたりの胚回収数が多い傾向を示した (表 2)。

3 採胚後の繁殖成績

3 区ともほぼ 1 週間前後で発情回帰しており 3 区間に有意な差はなく、いずれも問題のない範囲であった (表 3)。試験期間中、試験区 1 で 4 頭、試験区 2 で 5 頭および対照区で 7 頭の計 16 頭で受胎を確認した。

考 察

AI 時の大卵胞数について 3 区間で大きな差はみられなかったものの、試験区 1 で、黄体数、回収胚数、移植可能胚数、移植可能胚率について高い傾向を示す結果となった。卵胞は、成長するにつれて FSH 依存性から黄体形成ホルモン (LH) 依存性に移行し排卵が行われる。LH 依存性の発育は、LH のパルス状分泌が関与しており血中のプロゲステロン濃度 (P4) に支配されている^{3,7)}。試験区 1 で他の 2 区よりも黄体数および回収胚数が高い傾向を示したのは、PG 投与時に CIDR を抜去することにより低 P4 条件下になり、発育の遅い卵胞は FSH の作用により、発育の早い卵胞は LH 依存性へ移行することで、より多くの卵胞の発育が促進されたためであると考えられる。また、移植可能胚数や移植可能胚率について鈴木ら¹²⁾は、PG を 1 回投与するよりも数回に分けて投与することにより、移植可能胚数、正常卵率および A ランク胚数が高まると報告している。本試験でも PG を 2 回の漸減投与した試験区 1 が単回投与の対照区よりも有意差は無いものの移植可能胚数および移

植可能胚率が高い傾向を示した。しかし、A ランク胚数の増加については認められなかった。また、前報⁹⁾の課題であった凍結可能胚率については、試験区 1 と対照区で差は認められず改善を図ることはできなかった。

採胚後の発情回帰は、試験区 1 で他の 2 区よりも 1 日～2 日ほど回帰が遅れたが、概ね 3 区とも 1 週間前後で発情回帰がみられた。また、3 区間で有意差は認められなかった。大津ら¹⁰⁾は、採胚時の推定黄体数と発情回帰日数に正の相関があることを報告しており、試験区 1 で他の 2 区よりも発情回帰が遅れた理由については、採胚時の黄体数が 11.6 ± 4.8 (個) と他の 2 区よりも黄体数が多かったためであると考えられる。

受胎成績について 3 区間で比較したところ対照区で他の 2 区よりも AI 回数が 1 回ほど多い結果となったが、有意差は認められなかった。以上のことから、SOV 方法の違いによる繁殖成績への影響はないと考える。また、場内の供試牛を除いた未経産牛の平均 AI 回数は令和 2 年度、令和 3 年度でそれぞれ 2.06 回、1.96 回 (データなし) と本試験の 3 区の AI 回数と大きな差は認められなかったことから、未経産牛への本 SOV 方法および採卵が繁殖性へ与える影響は少ないと考える。今回採胚を実施した供胚牛 17 頭のうち試験区 2 において、採胚後に卵胞嚢腫がみられたが、治療後に正常な発情周期に戻り、その後受胎を確認した。Humblot⁹⁾は、妊娠認識 (受精後 16 日) 以前に胚死滅がみられた場合を早期胚死滅、それ以後から 42 日目までに胚が死滅した場合を後期胚死滅と定義している。本試験では対照区の 1 頭で後期胚死滅が、卵胞嚢腫がみられた試験区 2 の 1 頭において早期流産がみられ、授精回数が増加する事例が確認された。

採胚成績において、試験区 1 で A ランク胚の回収はできていないが、回収胚数、移植可能胚数、凍結可能胚数が他の 2 区よりも多い傾向があり、特に胚回収数 (1 頭当たり平均胚数) が試験区 1 で試験区 2 および対照区と比べそれぞれ 5.0 個、3.1 個多く回収できているため、今後改善していく際の期待値が高いと考える。また、繁殖成績においては 3 区間で有意な差がなかった。以上のことから、3 区間の中では試験区 1 の

SOV 方法が最も適切な方法であると考え。一方、試験区 1 では A ランクのような高ランク胚の回収ができていない。また、移植可能胚率が 70%以上あるにもかかわらず、凍結可能胚率が 30%に満たないため採胚成績の向上が課題として挙げられる。Mapletoft ら⁹⁾は FSH の投与期間を延ばすことにより、小さい卵胞も発育が促され排卵する卵胞が増える他、排卵タイミングがそろいやすくなるため、採胚成績の向上に有効であることを報告している。また、秋山ら¹⁾は FSH 投与期間を延長せず PG 投与を FSH 投与後 48 時間から 72 時間に遅らせたところ、PG 投与前の FSH 投与回数が増加し卵胞発育が促されることで採胚成績の向上につながる可能性について報告している。今後は FSH 処理期間を延ばすと同時に FSH 投与開始から PG 投与時間を遅らせることで、卵胞発育を促し採胚成績の向上を図る。

文 献

- 1) 秋山清・折原健太郎・坂上信忠, ホルスタイン種経産牛における性選抜精液を用いた体内胚採取のための過剰排卵処理, 神奈川県畜産技術センター研究報告, 1:7C12, 2017
- 2) Dochi O・Takahashi K・Hirai T・Hayakawa H・Tanisawa M・Yamamoto Y・Koyama H, The use of embryo transfer to produce pregnancies in repeat-breeding dairy cattle, *Theriogenology*, 69:124-128, 2008
- 3) Ginther O.J・Kot K・Kulick L.J・Wiltbank M.C, Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle, *Theriogenology*, 48(1):75-87, 1997
- 4) 堀川明彦・小林崇之・近藤守人, 過剰排卵処置における卵胞発育および排卵時間と雌雄選別精液を用いたホルスタイン種経産牛の採胚成績, 福井県畜産試験場研究報告, 27:1-11, 2014
- 5) Humblot P, Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants, *Theriogenology*, 56: 1417-1433, 2001
- 6) 河端茜・高松英里奈・澤田芳憲・横田昌己, 乳牛経産牛における授精卵(胚)回収技術の確立(第1報), 福井県畜産試験場研究報告, 35:19-24, 2023
- 7) Kojima F.N・Bergfeld E.G・Wehrman M.E・Cupp A.S・Fike K.E・Mariscal-Aguayo D.V・Sanchez-Torres T・Garcia-Winder M・Clopton D.T・Roberts A.J・Kinder J.E, Frequency of luteinizing hormone pulses in cattle influences duration of persistence of dominant ovarian follicles, follicular fluid concentrations of steroids, and activity of insulin-like growth factor binding proteins, *Anim Reprod Sci* 77(3-4):187 - 211, 2003
- 8) 国際胚移植学会, 胚の衛生的取り扱いマニュアル(国際胚移植学会 IETS マニュアル), 106-107, 1998
- 9) Mapletoft R.J・Garcia Guerra A・Dias F.C.F・Singh J・Adams G.P, In vitro and in vivo embryo production in cattle superstimulated with FSH for 7 days, *Anim Reprod*, 12(n3):383-388, 2015
- 10) 大津昇三・角田龍司・笠原民夫・大野光男・佐々木捷彦・谷中匡・湊芳明, 乳用種未経産牛の過剰排卵処置後の発情発現と受胎成績について, 家畜繁殖学雑誌, 29(4):194-197, 1983
- 11) Snijders S.E.M・Dillion P・O'Callaghan D・Boland, Effect of genetic merit, milk yield, body condition and lactation number on in vitro oocyte development in dairy cows, *Theriogenology*, 53, 981-989, 2000
- 12) 鈴木達行・下平乙夫・松田修一・三浦秀夫・伊藤一伸, PGF_{2α}の分割投与がウシの過剰排卵に与える影響, 家畜繁殖誌, 31(4):216-217, 1985
- 13) 上野修ら, 夏季における胚移植の受胎成績, 東日本家畜受精卵移植技術研究会大会研究会報, 9, 61-62, 1995

The Establishment of Technique for Collecting Embryo in Holstein Heifers (The 2nd Report)

Kaname SUZUKI, Erina TAKAMATSU¹⁾, Yoshinori SAWADA and Masami YOKOTA²⁾

Fukui Prefectural Livestock Experiment Station

1)Tannan Agriculture and Forestry General Office, 2) Fukui Nature Conservation Center

Abstract

High-yielding dairy cows experience decreased ovarian responsiveness due to intense milk production stress, leading to inefficient collection of fertilized embryos after superovulation (SOV) treatment and artificial insemination (AI) procedures. Therefore, with the aim of utilizing heifers as embryo donors, we investigated the appropriate dosage of follicle-stimulating hormone (FSH) based on our prefecture's embryo collection program and determined it to be 20 Armour Units (AU) in a previous report. However, a decrease in the rate of freezable embryos compared to those of administrated 16 AU posed a challenge. To address this issue, we conducted a study on the administration frequency of prostaglandin F2 α (PG) and the duration of controlled internal drug release (CIDR) insertion. The test group received gradual reduced doses of PG twice and was divided into two subgroups based on a CIDR insertion period of 5 days (test group 1) and 5.5 days (test group 2). As for the control group data, we utilized those of previously reported group; received a total FSH dosage of 20 AU, a single dose of PG, and a CIDR insertion period of 5.5 days. The test group consisted of 10 cows (5 cows per subgroup), while the control group included 7 cows, resulting in a total of 17 cows across the three groups. The test group 1 demonstrated a higher number of corpora lutea, collected embryos, transferable embryos, transferable embryo rate, and freezable embryos. There were no significant differences in reproductive performance after embryo collection among the three groups, suggesting that the different SOV methods did not affect fertility outcomes. Based on these results, we concluded that the approach of test group 1 is appropriate for SOV in heifers.

Keywords: dairy cows, heifers, embryo collection, superovulation treatment (SOV), prostaglandin F2 α (PG)