

# 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

堀川 明彦・小林 崇之・近藤 守人

**要約** 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の改善を目的に、異なる過剰排卵処置 (SOV) を実施し、その卵胞動態と採胚成績との関係を検討した。試験区 1 は卵胞刺激ホルモン (FSH) 総量30AUを3日間、試験区 2 および試験区 3 は4日間の漸減投与とした。また、試験区 2 と試験区 3 でFSH投与開始からPGF2 $\alpha$ 投与と膈内留置型ホルモン製剤を除去する時期について検討した。人工授精 (AI) は、試験区 1 と試験区 2 は2回 (発情確認日の夕刻に体部注入、翌日朝方に子宮角深部注入)、試験区 3 は1回 (発情確認日の翌日朝方に子宮角深部注入) を行った。性腺刺激ホルモン放出ホルモン剤 (GnRH) 投与時の卵胞発育を比較したところ、試験区 1 と比較して試験区 2 および試験区 3 で直径8mm以上の卵胞が多数観察された。GnRH投与後の卵胞動態を調査したところ、試験区 2 と比較して試験区 3 でGnRH投与26時間以降の排卵集中が認められた。採胚成績を比較したところ、試験区 3 で移植可能胚率が高く、未受精卵率が低かった。これらの結果から、4日間のFSH投与によってGnRH投与までの卵胞発育を促進し、GnRH投与26時間以降に子宮角深部注入によるAIを行うことで、採胚成績の改善に繋がる可能性が示唆された。

**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、優良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。フローサイトメーターで選別された雌雄選別精液 (選別精液) を用いることで、人工授精 (AI) により雌産子を生産することが可能となり、その過剰排卵処置 (SOV) への活用が期待されている。しかし、選別精液を用いた経産牛のSOVでは移植可能胚率が低い傾向にあり、雌胚生産効率およびコストの面からも未經産牛での活用が提案されている (Hayakawa et al., 2009)。

選別精液は封入精子数が少なく、選別によるダメージによって、凍結・融解後の精子活力が低下

している。この欠点を補うため、AIを子宮角深部注入で行う方法が検討されている (砂川, 2012)。当场でも、SOV後の発情確認日の夕刻に子宮角深部注入を行い、その有効性を検討したが、通常の体部注入と比較して、移植可能胚率は低い結果であった (堀川ら, 2012)。雌雄選別精液は精子活力の低下に加えて、受精能獲得と維持の時間も異なるといわれている (Moce et al., 2006; Blondin et al., 2009)。選別精液を用いた採胚成績を改善するためには、排卵後の卵子の受精率を向上させるSOV条件を検討すること、SOVにおいて排卵が集中する時期を特定し、適期に深部注入によるAIを行うことが有効と考えられる。そこで、本試験では異なるSOVを実施した供胚牛の卵胞動態を調査し、採胚成績との関係を検討した。

## II 材料および方法

### 1. 供胚牛

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の中から、4産以上分娩し、かつ産乳能力が高い上位3頭(平均産歴4.7産)を選抜した。供胚牛3頭を3反復し(延べ9回)、SOV方法が異なる3区(対照区、試験区1および試験区2)でそれぞれ1回ずつ供試した。

### 2. SOV

近年、生体内卵子吸引(OPU)と体外受精(IVF)を組み合わせた効率的な雌胚生産系の構築を目的に、効率的に成熟卵子を得るためのSOV方法が検討されてきた(的場ら, 2012)。本試験ではこれらの結果を参考に、卵胞刺激ホルモン剤(FSH)投与日数とPGF2 $\alpha$ (PG)投与および腔内留置型黄体ホルモン製剤(CIDR)除去の時期を調整した3区のSOV方法を検討した(図1)。

発情周期において直径5mm以下の小卵胞が多数観察される時期にCIDR(家畜改良事業団)を挿入し、超音波画像診断装置HS-1500(アロカ)で卵巣を観察のうえ優勢卵胞を除去した。CIDR挿入日をSOV開始0日目とし、試験区1は2日目朝方からFSH(アントリンR10、川崎三鷹製薬)総量30AUを3日間、試験区2は4日間、試験区3は夕刻から4日間漸減投与した。試験区1は4日目朝方にPG(クロプロステノール、エストラメイト、ナガセ医薬品)650 $\mu$ g投与とCIDR除去を行い、試験区2と3は4日目夕刻にPG投与、5日目朝方にCIDR除去を行った。各試験区とも6日目朝方に性腺刺激ホルモン放出ホルモン剤(GnRH、酢酸フェルチレリン、コンセラルール、ナガセ医薬品)200 $\mu$ gを投与した。

### 3. 卵胞動態の観察

卵胞動態の観察は7.5MHzのリニア式プローブを接続した超音波画像診断装置を使用し、左右の卵巣で観察された卵胞数と卵胞の最長径を測定した。SOV開始からGnRH投与までは1日毎に観察した。GnRH投与24~32時間後までは2時間毎の間隔で観察し、卵巣画像上で明瞭な卵胞像が確認できなくなったもの、消失したものを排卵と判断し、GnRH投与32時間後までに残存していた直径8mm以上の卵胞数を測定した。

### 4. AIおよび採胚

試験区1および試験区2ではスタンディング発情を確認した同日の夕刻(GnRH投与8時間後)と翌日の朝方(GnRH投与24-26時間後)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。初回のAIでは、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。2回目のAIでは、砂川(2012)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。試験区3では発情確認日の翌日朝方(24-26時間後)にのみ、左右の子宮角深部に精液を1本ずつ注入した。

AI後7日目に採胚を行い、回収された胚数および胚の品質を調査した。胚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た。回収された桑実胚から拡張胚盤胞期胚をA、A'、B、C、Dの5段階で評価し、Cランク以上のものを正常胚、Bランク以上のものを移植可能胚、Dランク以下を変性胚として分類した。

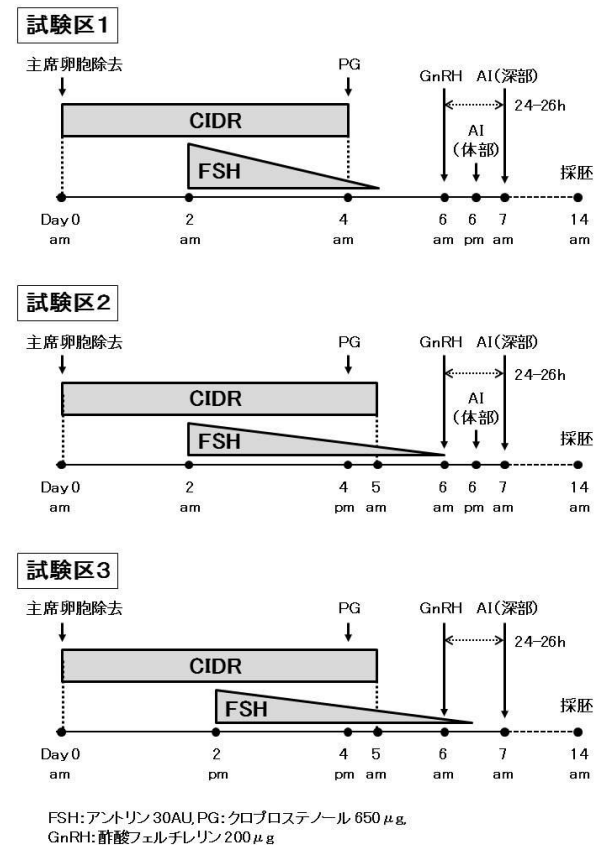


図1 SOV方法

### III 結 果

試験区1、試験区2および試験区3の方法でSOVを行い、GnRH投与時に観察された卵胞数と卵胞サイズを計測した(図2)。観察された直径5mm以上の卵胞を、直径5~8mmまたは直径8mm以上に分類して比較した(表1)。観察された直径5mm以上の卵胞のうち、直径8mm未満の卵胞数は試験区1が12.0個、試験区2が7.0個、試験区3が10.3個であり、試験区1が最も多かった。直径8mm以上の卵胞数は試験区1が9.7個、試験区2が17.7個、試験区3が15.3個であり、試験区2が最も多かった。

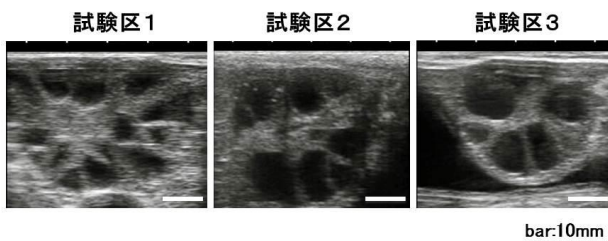


図2 GnRH投与時の卵胞サイズの比較

表1 GnRH投与時の卵胞数の比較

区	頭数	平均卵胞数		
		≥ 5mm	< 8mm	≥ 8mm
試験区1	3	21.7	12.0	9.7
試験区2	3	24.7	7.0	17.7
試験区3	3	25.7	10.3	15.3

GnRH投与26~32時間後の卵胞動態を経時的に観察し、残存卵胞数を調査した(図3、表2)。GnRH投与26時間後に観察された卵胞数は、試験区2が14.3個、試験区3が17.7個であった。GnRH投与32時間後に観察された卵胞数は試験区2が7.7個、試験区3が6.0個であった。残存卵胞率を比較したところ、試験区2が53.5%、試験区3が34.0%であり、試験区3で低かった。

採胚結果を表3に示した。供胚牛3頭の平均回収卵数は試験区1で8.0個、試験区2で4.3個、試験区3で12.0個であった。平均移植可能胚率は試験区1で25.0%、試験区2で30.8%、試験区3で36.1%であり、試験区3が最も高かった。平均未受精卵率は

試験区1で70.8%、試験区2で53.8%、試験区3で44.4%であり、試験区2が最も低かった。

回収した胚を発生ステージ別に分類した(表4)。試験区1からは初期胚盤胞期胚1個、胚盤胞期胚4個、拡張胚盤胞期胚1個を回収した。試験区2からは拡張胚盤胞期胚4個を回収した。試験区3からは後期桑実胚2個、胚盤胞期胚7個、拡張胚盤胞期胚4個を回収した。

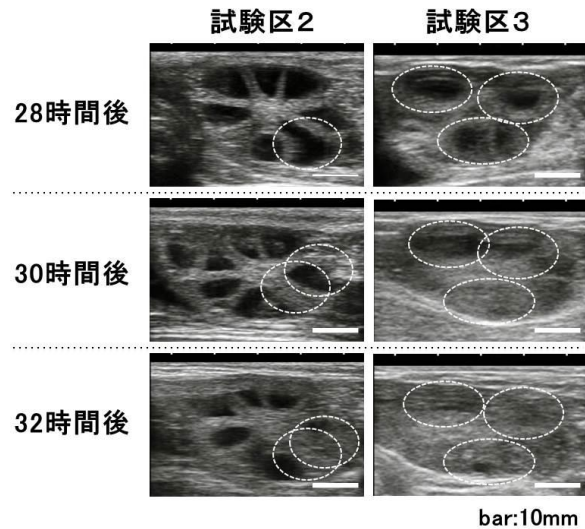


図3 GnRH投与時の卵胞動態(供胚牛X)

\*排卵が認められた卵胞を点線で示す

表2 GnRH投与後の残存卵胞数の比較

区	試験区2	試験区3	
			(頭数)
	26時間後(a)	14.3	17.7
GnRH投与後の 平均卵胞数	28時間後	11.3	12.7
	30時間後	9.3	9
	32時間後(b)	7.7	6
	残存卵胞率(%:b/a)	53.5	34

### IV 考 察

牛の定時AIプロトコールにおいて、排卵誘起で用いられるGnRHは卵胞サイズが小さい時期に投与すると、受胎率を低下させることが報告されている(Perry et al., 2005)。そのため、SOVを実施した

表3 採胚成績

区	頭数	回収卵数						平均回収卵数 (a)	平均移植可能胚数 (b)	移植可能胚率 (%:b/a)	平均未受精卵数 (c)	未受精卵率 (%:c/a)
		A	A'	B	C	D	未受精卵					
試験区1	3	3	1	2	0	1	17	8.0	2.0	25.0	5.7	70.8
試験区2	3	4	0	0	0	2	7	4.3	1.3	30.8	2.3	53.8
試験区3	3	8	0	4	1	7	16	12.0	4.3	36.1	5.3	44.4

表4 回収した移植可能胚のステージ

区	頭数	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
試験区1	3	0	0	1	4	1	6
試験区2	3	0	0	0	0	4	4
試験区3	3	0	2	0	7	4	13

供胚牛の卵胞サイズが小さい時期にGnRHを投与することは、強制的な排卵を促し、採胚成績を低下させる要因になると考えられる。本試験において、SOVを実施した供胚牛のGnRH投与時の卵胞数と卵胞サイズを調査したところ、試験区1と比較して試験区2および試験区3では、観察された直径5mm以上の卵胞のうち、半数以上の卵胞が直径8mm以上に発育していた(試験区1:9.7/21.7、試験区2:17.7/24.7、試験区3:15.3/25.7)。卵胞は、直径8~10mmにまで発育するとFSHから黄体形成ホルモン(LH)依存性に移行して排卵に至るが、卵胞の発育を促すLHのパルス分泌は血中黄体ホルモン(P4)により制御されている(Ginther et al., 1997; Kojima et al., 2003)。試験区2および試験区3のSOVでは、FSHを4日間の漸減投与としており、PG投与以降の低P4レベル条件において、発育の速い卵胞はLH依存性へ移行し、発育の遅い卵胞にFSHの作用が促されたことによって、より多くの卵胞発育が促進された可能性が考えられる。

Ambroseら(2008)は、CIDRを活用した定時AIプロトコルを検討したところ、PG投与およびCIDR除去の時期を調整することで受胎性を向上できる可能性があるとして報告している。本試験ではCIDR除去の時期を調整し、試験区1ではGnRH投与48時間前に、試験区2および試験区3ではGnRH投与24時間前に除去した。採胚試験の結果、試験区1と比較して試験区2および試験区3で移植可能胚率が高かった(対照区:25.0%、試験区1:30.8%、

試験区2:36.1%)。このことから、CIDR除去からGnRHまでの期間の短縮が採胚成績の改善に有効である可能性が考えられる。P4レベル低下の時期とエストラジオール(E2)及びLH濃度の推移との関係を調査し、卵胞の成熟と排卵前の卵子の品質にどのような影響を及ぼしているのか、今後検討する必要がある。

本試験では、SOVにおけるPG投与とCIDR除去の時期がGnRH投与後の供胚牛の卵胞動態に及ぼす影響を調査した。GnRH投与26~32時間後の卵胞動態を試験区2と試験区3で比較したところ、試験区3で排卵が集中していた。試験区2の卵胞動態を調査したところ、SOV開始4日目の朝方(5回目のFSH投与時)に8mm以上の卵胞が観察されており、この時点からLH依存性の卵胞が存在していたことが推察される。試験区2ではその後、6回目のFSH投与と同時にPGを投与し、翌日朝方にCIDRを除去した。一方、試験区3では直径8mmの卵胞が観察されたSOV開始4日目夕刻(5回目のFSH投与時)にPGを投与し、翌日朝方にCIDRを除去した。試験区3では直径8mm以上の卵胞の出現から早い段階で血中P4濃度を下げる処置を行ったことで、成熟卵胞への発育が促進され、GnRH投与26~32時間後の排卵の集中に繋がった可能性が考えられる。卵胞の発育に伴い分泌されるE2が試験区2と試験区3のSOVでそれぞれどのように推移し、供胚牛の排卵を誘起するLHサージに影響を及ぼしているのか、今後調査する必要がある。

GnRH投与後の卵胞動態を観察したところ、多くの卵胞の排卵はGnRH投与26時間以降に認められた。また、試験区2と3の採胚成績を比較したところ、試験区3で移植可能胚率が高かった(試験区2:30.8%、試験区3:33.3%)。試験区3では胚盤胞期胚が7個、拡張胚盤胞期胚が4個回収されていることから、深部注入によるAIは排卵が開始するGnRH投与26時間以降に行うことが適しており、それ以前のAIは採胚成績を改善しないことが推察された。

以上のことから、4日間のFSH投与によってGnRH投与までの卵胞発育を促進し、GnRH投与26時間以降に深部注入によるAIを行うことで、選別精液を用いたホルスタイン種経産牛の採胚成績を改善する可能性が示唆された。SOVは供卵牛によって反応性の差が大きいため、採卵成績に個体差が生じることが指摘されている。本試験でも試験区間で平均回収卵数にバラつきが認められたことから、さらに例数を増やし、今回検討したSOV方法の有効性を継続して調査する必要がある。

## 文 献

- Ambrose, D. J., D. G. Emmanuel, M. G. Colazo and J. P. Kastelic. Pregnancy rates to timed artificial insemination in Holstein heifers given prostaglandin F2alpha twenty-four hours before or concurrent with removal of an intravaginal progesterone-releasing insert. *J Dairy Sci*, 91(7):2678-2683. 2008.
- Ginther, O. J., K. Kot, L. J. Kulick and M. C. Wiltbank. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology*, 48(1):75-87. 1997.
- 砂川政弘. 牛性選別精液を用いた人工授精:子宮角深部注入の取り組み. *日本胚移植学雑誌*, 34(2):91-95.2012.
- Kojima, F. N., E. G. Bergfeld, M. E. Wehrman, A. S. Cupp, K. E. Fike, D. V. Mariscal-Aguayo, T. Sanchez-Torres, M. Garcia-Winder, D. T. Clopton, A. J. Roberts and J. E. Kinder. 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.
- 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.
- 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.
- Hayakawa, H., T. Hirai, A. Takimoto, A. Ideta and Y. Aoyagi. Superovulation and embryo transfer in Holstein cattle using sexed sperm. *Theriogenology*, 71(1):68-73. 2009.
- 堀川明彦・小林崇之・近藤守人. 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. *福井県畜産試験場研究報告*, 25:1-5.2012.
- Perry, G. A., M. F. Smith, M. C. Lucy, J. A. Green, T. E. Parks, M. D. MacNeil, A. J. Roberts and T. W. Geary. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(14):5268-5273. 2005.
- 的場理子・吉岡一・相川芳雄・大竹正樹・小林修司・松田秀雄・堀口英司・橋谷田豊・長井誠・今井敬. 多排卵処置後に採取した体内成熟卵子または無処置で採取した卵子と性選別雌精液を用いた体外受精によるウシ胚生産. *日本胚移植学雑誌*, 34(1):40.2012.
- 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.

**The effect of growth state and different timing of PG treatment and  
CIDR removal on embryo production in superovulated  
Holstein cows using X-sorted sperm (Sort90)**

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

**Abstract**

To investigate the effect of growth state of follicle and different timing of PGF2 alpha (PG) treatment and controlled internal drug release device (CIDR) removal on the production efficiency of female transferable embryo in multiparaous ( $4 \geq$ ) Holstein cows, three protocols of superovulation were carried out with X-sorted sperm. 30 A.U of FSH was injected over three days in protocol 1, whereas that was injected over four days in protocol 2 and protocol 3. PG treatment concurrent with CIDR removal was done in protocol 1, whereas PG treatment followed by CIDR removal (16h later) was done in protocol 2 and protocol 3. AI was performed twice in protocol 1 and protocol 2: Donors were inseminated into uterine body with one Sort90 at 7-8h after GnRH treatment and uterine horn with two Sort90 at 24-26h after GnRH treatment. AI was performed once into uterine horn at 24-26h after GnRH treatment in protocol 3. Ovarian follicle growth and ovulation was observed by transrectal ultrasonography. In protocol 2 and protocol 3, the number of follicle  $\geq 8$ mm in diameter was higher than in protocol 1 at the time of GnRH treatment. Compared with protocol 2, the rate of ovulation at 26-32 hour after GnRH treatment was higher in protocol 3 in which PG was injected immediately after growing follicle  $\geq 8$ mm in diameter. The rate of fertilized transferable embryo was higher in protocol 3 than other two protocols. These results indicate the beneficial effect of four days treatment of FSH and short interval from CIDR removal to GnRH treatment for follicle maturation. Furthermore, PG treatment followed by CIDR removal in combination with uterine horn AI with two Sort90 at 26h after GnRH treatment may be suitable for efficient production of female transferable embryo in superovulated Holstein cows.

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