

乳牛未経産牛における受精卵（胚）回収技術の確立（第 1 報）

河端茜¹⁾・高松英里奈・澤田芳憲・横田昌己²⁾

- 1) 現 坂井農林総合事務所
- 2) 奥越高原牧場

要 約 高泌乳牛は強い泌乳ストレスにより卵巣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とすることを目的として、適切な FSH 投与量を検討した。FSH 総量を 16AU と 20AU の 2 区に分け、各区 7 頭の計 14 頭で採胚を実施し、採胚成績とその後の繁殖成績を追跡調査した。AI 時の大卵胞数は 2 区間で大きな差はなかったが、採胚時の黄体数、回収卵数、移植可能胚数は 20AU が高い傾向を示した。採胚後の繁殖成績は 16AU が 20AU より良好な成績を示したが有意差はみられず、供試牛のうち繁殖障害を示した個体はみられなかった。これらの結果から、未経産牛の FSH 総量は 20AU 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），FSH

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^{1, 18)}。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）とホルモン剤を用いて過剰排卵処理（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（SOV-AI）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-AI 法により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、胚が求められる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 での卵巣反応性が低下し凍結可能胚数が減少する傾向にある¹⁴⁾。卵巣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、加えて未経産牛でホルモン剤を用いた 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。そこで本報では、SOV で用いる卵胞発育ホルモン（Follicle Stimulate Hormone; FSH）の投与量の検討を行うとともに、採胚後の繁殖成績の追跡調査を行った。

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 14 頭 (月齢 14.0±0.3 ヶ月齢) を対象に、2021 年 4 月～2022 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。

2 試験区分

FSH の総投与量が 16AU と 20AU の 2 区を設定し、各区 7 頭を配置した。

3 SOV, AI, 採胚

SOV から採胚までは、本県の採胚プログラム⁹⁾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 8 mm 以上の卵胞はシリンジと注射針を装着した採卵針 (富士平工業株式会社, 東京) を用いて全て吸引除去した。その後、膈内留置型プロゲステロン製剤 (CIDR; イージブリード; 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 (アントリン R・10; 共立製薬株式会社, 東京) を 1 日 2 回、4 日間の計 6 回漸減投与した。4 日目の夕方にプロスタグランジン F2α 製剤 (PG; エストラメイト; MSD アニマルヘルス株式会社, 東京) を 0.750 mg 投与、5 日目朝に CIDR を抜去し、発情を誘起した。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 0.100 mg 投与し、7 日目朝に卵胞数を計測後、AI を実施した。

(2) AI

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。

(3) 採胚

14 日目朝、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) 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⁹⁾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

採胚終了直後、早期に発情を回帰させるため、PG を 0.750mg 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。

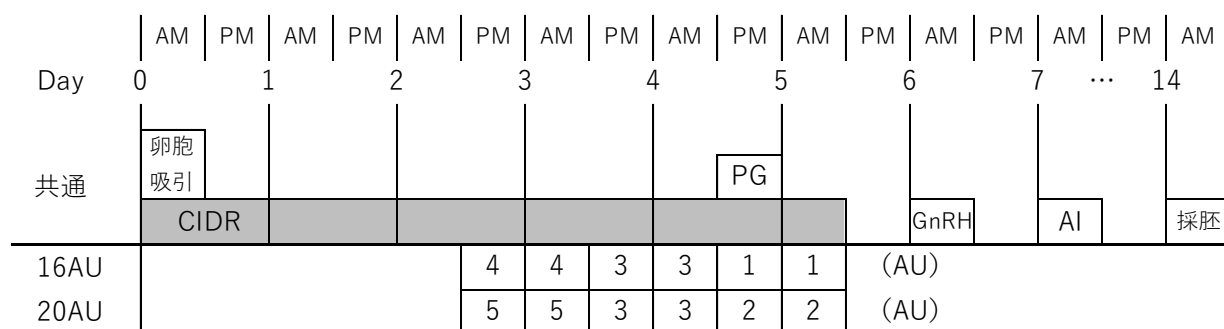


図 1 SOV-AI～採胚までのスケジュール

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, 回収卵数, 移植可能胚数 (率) および凍結可能胚数 (率)

(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

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 時での大卵胞数は 16AU で 8.0 ± 4.6 個, 20AU で 8.7 ± 3.3 個となり, 2 区間で有意な差はなかった。

2 採胚成績

採胚時の黄体数, 回収卵数, 移植可能胚数において, 20AU が 16AU より高い傾向を示し, 残存卵胞数は 16AU の方が高い傾向を示した (表 1)。一方, 凍結可能胚率は 20AU で大きく低下した。

3 採胚後の繁殖成績

発情回帰は, 16AU は 4 日以内, 20AU は 6 日以内に見られ, 両区に有意な差はなく, いずれも問題のない範囲であった (表 2)。試験期間中, 受胎が確認された個体は 16AU, 20AU とともに 5

頭ずつ計 10 頭で, 16AU が 20AU より AI 回数は少なく, かつ受胎日数も短い結果となったが,

表 2 繁殖成績

	発情回帰日数 (日)	AI回数 (回)	受胎日数 (日)
16AU	4.4 ± 2.1	2.4 ± 2.0	64.6 ± 65.3
n=	7	5	5
20AU	6.0 ± 1.9	3.4 ± 1.0	103.6 ± 44.2
n=	7	5	5

2 区間で有意な差は認められなかった。

考 察

一般に, ホルスタイン種雌牛の性成熟は 8~12 カ月齢と言われているが, 体の発育状況等を考慮し, AI 開始月齢は性成熟から遅らせて 14~15 カ月齢頃に開始するとされている⁸⁾。本研究では, 14 カ月齢時に採胚を実施できるよう, 13 カ月齢から SOV を開始するため, 推奨発育値⁹⁾をもとに 13 カ月齢時に体高が 130 cm 以上の個体を供胚牛と判断した。

現在, 乳用未經産牛における適切な FSH の投与量は確立されておらず, 不明な点が多い。FSH 製剤の添付文書には, 雌牛 1 頭当たりの総投与量は 20~48AU とされている。一方, 本試験での供卵牛とほぼ同月齢の牛に対する FSH 投与量は 20AU が国内での報告ではよく見かけるものの^{10, 11, 17)}, 最も高いもので 28AU²⁾, 最も低いもので 15AU¹⁵⁾と大きく差がある。細かい条件は異なるが, 国内の報告では FSH の投与量が増えるにつれて回収卵数や正常胚数は増加傾向にあるが, 変性胚率も増加する傾向がみられた。また, 一部^{7, 13)}では報告があるものの, FSH 投与量の違いによる採胚後の受胎率や繁殖障害等

表 1 採胚成績

	黄体数 (個)	残存卵胞数 (個)	回収卵数 (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)
16AU n=7	6.0 ± 3.3	1.7 ± 0.5	3.3 ± 2.8	3.0 ± 3.0	64.3 ± 44.0	2.0 ± 1.6	51.0 ± 37.9	0.3 ± 0.5
20AU n=7	7.9 ± 2.6	1.0 ± 1.1	6.1 ± 2.7	3.9 ± 2.0	62.0 ± 24.8	2.1 ± 1.6	29.6 ± 15.6	0.7 ± 0.9

については記載のない報告も多くみられたことから、本試験では採胚成績と繁殖性の両面から 14 カ月齢前後の未経産牛に対する適切な FSH 投与量を検討するため、報告の中で最低単位に近い 16AU と最も報告数の多い 20AU の 2 区で SOV を行い比較検討した。

AI 時の卵胞数は 2 区間で大きな差はなかったが、黄体数では 1.9 個の差が生まれた。加えて、有意差は認められなかったが、回収卵数において 20AU が 16AU の 2 倍近い結果となった。一方、移植可能胚率は 2 区間で同程度であるにもかかわらず、凍結可能胚率が 20AU で大きく低下した。凍結可能胚率の低下の要因として変性細胞数が増加し、胚の品質が低下したことが考えられる。SOV では約 8 割の卵胞は排卵開始から 8 時間以内に排卵完了するが、一過的に多数の卵胞に卵胞発育を誘導するため、一部の卵胞は排卵までに 8~12 時間を要することが知られている¹⁶⁾。20AU では効果的な卵胞発育を誘引した一方、卵胞ごとに排卵のタイミングにズレが生じたことから、卵子の品質低下を招き、発生時の胚で変性細胞が増加したと思われた。

また、採胚後の発情回帰は 16AU が 20AU よりも約 2 日早かったが、有意差は認められなかった。大津ら¹²⁾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いることから、FSH 投与量の増加に伴い黄体数が増加した個体では、発情回帰が遅くなるのが本試験においても示された。

受胎成績も同様に、16AU が 20AU よりも授精回数が 1 回分少ない結果となり、同時期の場内の供試牛を除いた育成牛の平均 AI 回数 1.9 回 (データなし) に近い結果となった。今回採胚を実施した供胚牛 14 頭には、採胚後に卵巣静止や卵胞嚢腫等の繁殖障害はみられず、20AU 以下の FSH は採胚後の繁殖性に大きく影響しないと考えられた。一方、FSH 投与量にかかわらず夏季に AI した一部の個体では後期胚死滅が認められ、授精回数が増加するケースがみられた。

以上の結果をもとに、採胚後の繁殖成績は 16AU が 20AU より良好な結果となったが、供胚牛 1 頭からより効率的に胚の回収が可能である点を考慮し、20AU が乳用未経産牛 SOV の最

適 FSH 投与量であると判断した。一方、20AU は効率的な胚の回収が期待できるものの、凍結可能胚率の低下が課題として挙げられたことから、今後は黄体退行を誘発する PG の単回投与から 2 回の漸減投与による排卵のタイミングの同一化および胚の品質向上を図る。

また、採胚成績には個体差があったが、黒毛和種ではイオンチャンネル型グルタミン酸受容体 (GRIA1) 遺伝子の遺伝子型³⁾や血中抗ミュラー管ホルモン (AMH) 等の増減⁴⁾に伴って遺伝的な採胚成績の推定が期待できるとされており、これらをもとに供胚牛を選定することで効率的な胚の作出が可能であると報告されている。一方、これらの因子と乳用牛における採胚成績との相関は確認されておらず、乳用種では採胚前に供胚牛の選別を行うことが難しい。今後、採胚した牛および今後採胚予定の牛の血中成分と採胚成績との相関分析を実施し、採胚成績が期待できる供胚牛選定を目指す。

文 献

- 1) 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
- 2) 平井俊哉, 道東における牛の過剰排卵処置・胚回収の取り組み, *日本胚移植学雑誌*, 36(1):43-46, 2014
- 3) Hirayama H・Kageyama S・Naito A・Fukuda S・Fujii T・Minamihashi A, Prediction of superovulation response in Japanese black cattle using ultrasound test, plasma Anti-Mullerian hormone concentration and polymorphism in ionotropic glutamate receptor AMPA1/GRIA1, *J Reprod Dev*, 58(3):380-383, 2012
- 4) Hirayama H・Naito A・Fukuda S・Fujii T・Asada M・Inaba Y・Takedomi T・Kawamata M・Moriyasu S・Kageyama S, Long-term changes in plasma anti-Müllerian hormone concentration and the relationship with

- superovulatory response in Japanese Black cattle, *J Reprod Dev*, 63(1): 95-100, 2017
- 5) 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
 - 6) 一般社団法人日本ホルスタイン登録協会, ホルスタイン種雌牛の推奨発育値, 2018
 - 7) 伊藤博康・齋藤真希・青柳和重・叶内恒雄・岡崎光幸, 未經産牛からの採卵成績とその後の繁殖性及び分娩後の採卵成績の関係, 東北農業研究, 52:119-120, 1999
 - 8) 柏村文郎・鈴木三義, デーリイマン 2010 年秋季臨時増刊号「徹底・後継牛づくり」, 75-82, デーリイマン社, 北海道, 2010
 - 9) 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
 - 10) 中川浩・安野僚太郎・福留信司・佐藤義政・大矢俊行, ホルスタイン種未經産牛における性選別精液を用いた採胚技術の検討, 新潟畜産研報, 18:22-25, 2015
 - 11) 中川邦昭・瀬田剛史・篠川温・中川浩・田村祐一, ホルスタイン種未經産牛における反復採胚技術の検討, 新潟畜産研報, 17:54-57, 2011
 - 12) 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, 乳用種未經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
 - 13) R L Ax・S Armbrust・R Tappan・G Gilbert・J N Oyarzo・M E Bellin・D Selner・T C McCauley, Superovulation and embryo recovery from peripubertal Holstein heifers, *Anim Reprod Sci*, 85(1-2):71-80, 2005
 - 14) Snijders, S.E.M et al., Effect of genetic merit, milk yield, body condition and lactation number on in vitro oocyte development in dairy cows, *Theriogenology*, 53, 981-989, 2000
 - 15) 砂川政広, 「使いたい胚の確保」にかかわる話題, *LIAJ News*, 172:26-27, 家畜改良事業団, 東京, 2018
 - 16) 高橋芳幸, はんしょく学ノート「牛の過剰排卵処置」, *SIRE*, 428: 8-10, 一般社団法人ジェネティクス北海道, 北海道, 2018
 - 17) 高岡亜沙子・谷口雅康・音井威重, ホルスタイン種牛の過剰排卵処置における雌雄選別精液の有用性の検討, *日本胚移植学雑誌*, 36(2):59-64, 2006
 - 18) 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 1st Report)

Akane KAWABATA¹⁾, Erina TAKAMATSU, Yoshinori SAWADA and Masami YOKOTA²⁾

Fukui Prefectural Livestock Experiment Station

1) Sakai Agriculture and Forestry General Office

2) Okuetsu Highlands Ranch

Abstract

In high yielding dairy cows, fertilized eggs (embryos) have not been effectively collected by artificial insemination (AI) after superovulatory (SOV) treatment, due to deteriorating ovarian responsiveness caused by stress of excessive lactation. We investigated optimum follicle stimulating hormone (FSH) doses using Holstein heifers as embryo donors. 14 cows were divided into two groups of 7 cows each, administered FSH in total 16AU and 20AU to each group, and examined their embryo yield and following reproductive ability. As a result there were no significant difference in the number of large follicles at the time of AI between 2 groups, but the number of luteal, collected ova and transferable embryos of 20AU group showed a higher tendency at the time of embryo collection than 16AU group. Reproductive performance after embryo collection was better in 16AU group than in 20AU group, although showed no significant difference. None of the tested cows showed reproductive problems. From these results, it was suggested that administrating 20 AU of total FSH is recommendable for heifers to obtain embryos.

Keyword: dairy cow, heifer, embryo collection, superovulation (SOV), FSH