

乳牛未経産牛における受精卵（胚）回収技術の確立（第 4 報）

鈴木要人¹⁾・梅田彩里²⁾・堀川明彦

1) 現 福井県家畜保健衛生所, 2) 現 福井県中山間農業・畜産課

要 約 高泌乳牛は泌乳ストレスにより受精卵（胚）を効率的に生産することが困難である。本試験では、ホルスタイン種未経産牛からの効率的な胚生産を目的に、血液成分と採胚成績との関係を調査した。採胚を行った未経産牛 42 頭を調査したところ、血中尿素窒素（BUN）値が 10mg/dl 以上～13mg/dl 未満、BUN/血糖値（GLU）比（B/G 比）が 0.2 未満で正常胚率が高い傾向を示した。また、抗ミュラー管ホルモン（AMH）濃度と過剰排卵処置（SOV）前の小卵胞数との間に正の相関が認められた。調査した牛群を AMH 濃度の高い順に上位 20%, 中位 20%, 下位 60% で分類し、3 区の評価指標（H 区: 0.736ng/ml 以上, M 区: 0.466～0.736ng/ml, L 区: 0.466ng/ml 以下）を設定した。この指標をもとに新たに 10 頭の未経産牛の採胚成績を比較したところ、AMH 濃度が高い H 区で回収胚数、移植可能胚数が高かった。これらのことから、ホルスタイン種未経産牛の血中 AMH 濃度から供胚牛を選抜し、採胚前の血中 BUN, B/G 比から供胚牛のエネルギー状態を調整することで、より効率的な胚生産につながる可能性が考えられた。

キーワード: 乳牛, 未経産牛, 採胚, AMH, BUN, B/G 比

緒 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）を移植し、産子を得る胚移植（ET）技術が広く活用されている。ET を活用することで牛群の改良スピードが促進され、更には暑熱期やリピートブリーダー牛の受胎率向上も期待できる^{3, 18)}。しかしながら、高泌乳牛を供胚牛にすると、泌乳能力向上に伴う泌乳ストレスにより、過剰排卵処置（SOV）の卵巢反応性が低下して凍結可能胚数が減少する傾向がある¹⁴⁾。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悪影響を及ぼす恐れがある。

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する手法が注目されているが、未経産牛であるため泌乳能力が不明であること、未経産牛に適した胚回収技術が確立されていないこと、さらに未経産牛における SOV・採胚が

その後の繁殖性に及ぼす影響が不明であることから、普及が進んでいない。そこで当場では、既報においてホルスタイン種未経産牛に適した SOV 方法と採胚後の繁殖性を調査してきた^{9, 15, 16)}。その結果、個体ごとの採胚成績に差が認められており、安定した胚生産を実現するためには供胚牛が卵子を生産する能力を事前に評価することが重要と考えられた。

抗ミュラー管ホルモン（Anti-mullerian hormone: AMH）は、ヒトの不妊治療において卵巢予備能の目安となる指標に用いられており、黒毛和種育成牛においても供胚牛の胚生産性を予測し、早期選抜に有用である可能性について報告されている^{10, 17)}。また、効率的な胚生産には供胚牛の栄養状態も重要であり、採胚成績と血液生化学検査値との関係について報告されている^{7, 11)}。そこで本試験では、ホルスタイン種未経産牛からの効率的な胚生産を目的に、供胚牛の選抜指標として有用な血液成分を検討した。

結 果

1. 血中生化値と採胚成績との関係

SOV 開始日の血中 BUN 濃度を 4 段階 (10 mg/dl 未満, 10mg/dl 以上～13 mg/dl 未満, 13mg/dl 以上～18 mg/dl 未満, 18 mg/dl 以上) に分けしたところ, 10mg/dl 以上～13 mg/dl 未満で正常胚率 70%以上となる頭数割合が他の区より高い傾向を示した。また, BUN/GLU 比 (B/G 比) について 0.2 以上と 0.2 未満を比較したところ, 0.2 未満で正常胚率 70%以上となる頭数割合が 0.2 以上よりも高い傾向を示した (表 1)。一方, T-CHO と採胚成績との間に関係性は認められなかった (データ未掲載)。

血中 AMH 濃度と SOV 開始日の小卵胞数の相関係数は, $R=0.60$ ($p<0.05$) と正の相関が認められた (図 2)。また, AMH 濃度により上位 20%, 中位 20%, 下位 60% の 3 段階 (0.736ng/ml 以上: 以下 H 区, 0.466ng/ml 以上～0.736ng/ml 未満: 以下 M 区, 0.466ng/ml 未満: 以下 L 区) で分けしたところ, 各区

間で差が認められた (図 3)。

2. AMH 測定時期の検討

月齢による AMH 濃度の変動を調査したところ, AMH 濃度は性成熟が進むにつれ前月からの変動値が小さくなる傾向が認められた (図 4)。また, 今回供試した 11 頭については, 12 か月齢時にはすべて L 区に該当した。

発情周期中の AMH 濃度の変動調査では, H 区に 1 頭, L 区に 4 頭が分類され, 発情周期中, H 区と L 区の間で AMH 濃度の交差は認められなかった (図 5)。

3. 血中 AMH 濃度と採胚成績との関係

SOV 開始日の血中 AMH 濃度をもとに 10 頭の採胚成績を分類したところ, H 区に 3 頭, M 区に 3 頭, L 区に 4 頭が分類された。各区の平均成績を比較したところ, H 区では他の 2 区と比較して卵胞吸引時の小卵胞数, 胚回収数, 移植可能胚数および凍結可能胚数が多い傾向がみられた。一方で, H 区と M 区の移植可能胚率および凍結可能胚率に差は認められなかった (表 2)。

表 1 SOV 開始日の BUN 濃度および B/G 比と採胚成績の関連性

正常胚率	BUN (mg/dl)				B/G 比	
	10 未満	10～13 未満	13～18 未満	18 以上	0.2 未満	0.2 以上
70%以上	2 (33.3%)	9 (64.3%)	8 (38.1%)	1 (25.0%)	20 (57.1%)	3 (30.0%)
50～70%未満	2 (33.3%)	2 (14.3%)	8 (38.1%)	1 (25.0%)	7 (20.0%)	4 (40.0%)
50%未満	2 (33.3%)	3 (21.4%)	5 (23.8%)	2 (50.0%)	8 (22.9%)	3 (30.0%)
頭数	6	14	21	4	35	10

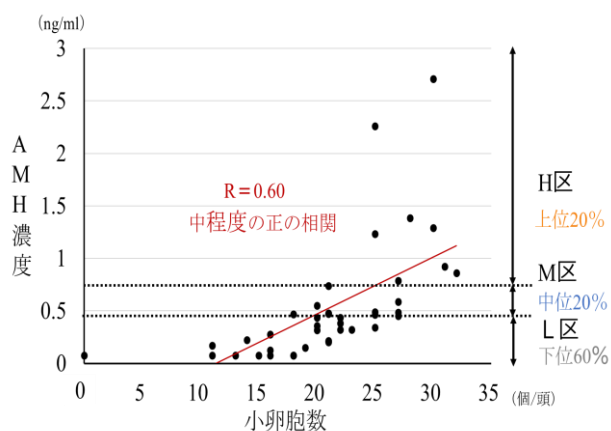


図 2 SOV 開始日の血中 AMH 濃度と小卵胞数との関係

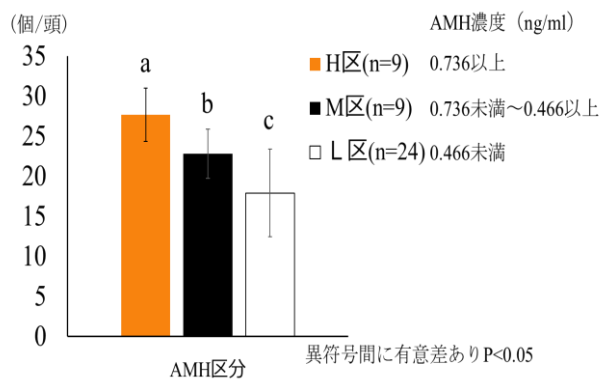


図 3 SOV 開始日の血中 AMH 濃度と小卵胞数の関係

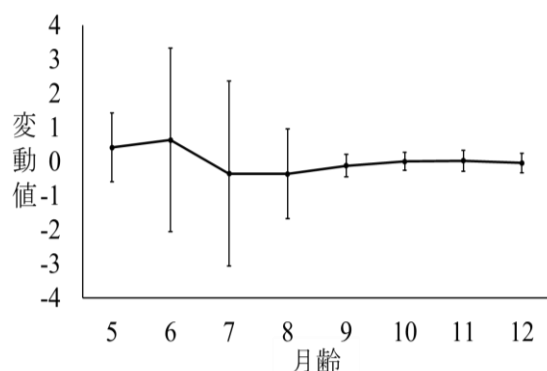


図 4 血中 AMH 濃度における前月比の変動値 (平均値±標準偏差を示す)

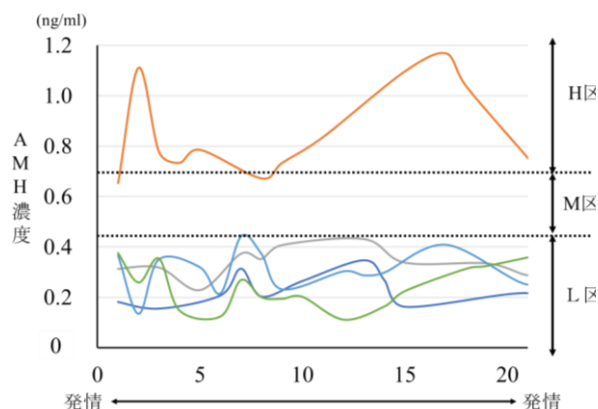


図 5 発情周期中の血中 AMH 濃度の変動

考 察

ホルスタイン種未経産牛からの効率的な胚生産を目的として、血液生化学値 (BUN, B/G 比, T-CHO) から採胚適正牛の判断指標を検討した。本試験では, SOV 開始日の血中 BUN 値が 10mg/dl 以上～13mg/dl 未満であった未経産牛の約 65%が正常胚率 70%以上であり, 13mg/dl 以上～18mg/dl 未満, 18mg/dl 以上と濃度が高くなるについて正常胚率 70%以上の頭数割合が低下した。笹木ら¹³⁾は分解性蛋白 (DIP) の給与量が過剰な場合, 子宮内 pH の低下により胚の発育が阻害される可能性について報告している。また, 細川ら⁷⁾は卵胞液中の尿素濃度が血中 BUN と同レベルで推移することから, 急速に卵胞が発育する SOV において血中 BUN が卵胞内の BUN に反映され, 卵子に何らかの悪影響を及ぼす可能性について言及している。これらのことから, 血中 BUN 値が高い個体は粗蛋白 (CP) の給与量が過剰であり, 卵胞の発育が何らかの影響を受けたことで正常胚率が低下したと考えられる。また, B/G 比 0.2 未満であったホルスタイン種未経産牛の約 6 割が正常胚率 70%以上であり, B/G 比 0.2 以上よりも頭数割合が高い結果となった。細川ら⁷⁾は正常胚率 70%を目標とした場合, BUN<13 mg/dl, B/G 比 0.2 未満が供卵牛の適正值であると報告している。一方で, BUN 値の過度な低下は定時人工授精の受胎率を低下させるため, 血中 BUN 値の

下限について検討が必要と報告されている¹⁹⁾。本試験では, 血中 BUN 値が 10mg/dl 未満のホルスタイン種未経産牛において正常胚率 70%以上の頭数割合が 13mg/dl 以上～18mg/dl 未満と同程度であり, 10mg/dl 以上～13mg/dl 未満より低い結果となった。このことから, 正常胚率 70%を目標とした場合, SOV 開始日のホルスタイン種未経産牛の適正值は, 血中 BUN 値が 10mg/dl 以上～13mg/dl 未満, B/G 比 0.2 未満であると考えられた。

Kweon ら¹¹⁾は SOV 開始前 10 日以内の血中 T-CHO 値について, 90mg/dl 以上の乳用未経産牛では 4 個以上の正常胚が得られた割合が 90mg/dl 以下の牛よりも多かったと報告している。本試験では, 供胚牛の SOV 開始日の血中 T-CHO 値がほとんどの牛で 90mg/dl 以上であり, 採胚成績との関連は認められなかった。

AMH に関する先行研究では, 乳牛経産牛および未経産牛の血中 AMH 濃度が卵巣予備能の指標として有用であると報告されている^{2,5)}。本試験においては, SOV 開始日の小卵胞数と AMH 濃度の間に正の相関が認められた ($R=0.60$, $p<0.05$)。また, AMH 濃度に基づき供胚牛を 3 区 (0.736ng/ml 以上, 0.466ng/ml 以上～0.736ng/ml 未満, 0.466ng/ml 未満) に分類し, 小卵胞数を比較したところ, SOV 開始時の血中 AMH 濃度と小卵胞数の間に差が認められた。これらのことから, ホルスタイン種未経産牛においても, 血中 AMH 濃度は卵巣予備能の指標となり得ることが示唆された。

血中 AMH 濃度の評価時期を検討するために月齢ごとの血中 AMH 濃度の変動を調査した。

表 2 血中 AMH 濃度と採胚成績との関係

頭数	H区	M区	L区
	3	3	4
吸引時の小卵胞数	24.0±2.9	20.7±0.5	21.3±0.8
回収卵数	10.3±0.9	7.3±2.5	7.0±2.9
移植可能胚数	9.7±0.5	6.0±2.2	2.8±0.8
移植可能胚率	93.5±4.3	81.8±5.1	39.3±19.5
凍結可能胚数	6.0±0.8	3.7±1.2	2.5±0.5
凍結可能胚率	58.1±13.6	50.0±9.2	35.7±16.1

数値は平均値±標準偏差 (個/頭)

黒毛和種育成雌牛における血中 AMH 濃度の変動は春機発動の 6 週前から徐々に安定すると報告されている⁸⁾。黒毛和種育成雌牛における月齢ごとの血中 AMH 濃度の変動は、8 か月齢以降に収束し、最終的に供胚牛を選抜するための AMH 濃度の評価時期は 11 か月齢以降が推奨されている⁹⁾。また、供胚牛の選抜時期については谷島ら¹⁷⁾も 12～13 か月齢の血中 AMH 濃度が供胚牛の指標となる可能性を報告している。今回の調査対象牛は全頭が L 区に該当していたが、月齢ごとの血中 AMH 濃度の変動は、乳牛未経産牛でも黒毛和種育成雌牛と同様、性成熟が進むにつれて小さくなる傾向がみられた。これらのことから、11 か月齢以降の血中 AMH 濃度を測定することで、L 区に該当する個体は選抜できる可能性が考えられた。今後は、M および L 区に該当する個体の血中 AMH 濃度の変動と選抜の可否について調査が必要である。

発情周期中の血中 AMH 濃度の変動を調査したところ、今回の調査対象牛では H 区と L 区間で発情周期中の濃度交差が認められなかった。Ribeiro ら⁴⁾は、乳用経産牛において発情周期の 7 日目と 15 日目の血中 AMH 濃度に高い相関が認められたと報告している。これらのことから、血中 AMH 濃度が L 区に該当する個体については、発情周期を問わず 11 か月齢以降に評価することが可能であり、卵巢予備能の低い個体として供胚牛候補から除外できる可能性が考えられた。

供胚牛選抜における AMH 測定の有用性を検討するため、血中 AMH 濃度と採胚成績との関連を調査した。黒毛和種育成雌牛では、12～13

か月齢時の血中 AMH 濃度と初回採胚における回収胚数および正常胚数との関連が報告されている¹⁷⁾。Souza ら¹⁾はホルスタイン種経産牛の採胚成績を血中 AMH 濃度から分類して比較したところ、AMH 濃度が高い区ほど回収胚数、移植可能胚数、凍結可能胚数が多くなったが、移植可能胚率および凍結可能胚率に差はみられなかったと報告している。黒毛和種やホルスタイン種以外のシンメンタール種においても血中 AMH 濃度と黄体数および回収胚数との関連が報告されており¹²⁾、いずれの報告においても血中 AMH 濃度の体内胚生産能力評価への利用について言及されている。本試験でも、血中 AMH 濃度が高い H 区が他の 2 区よりも SOV 開始時の小卵胞数、回収胚数、移植可能胚数および凍結可能胚数が多くなる傾向が認められた。同時に、H 区と M 区の移植可能胚率および凍結可能率に大きな差は認められなかった。このことから、ホルスタイン種未経産牛においても血中 AMH 濃度が体内胚生産能力の評価に利用できる可能性が考えられた。また、血中 AMH 濃度が高い牛で移植可能胚数および凍結可能胚数が多く回収されたのは、回収胚数が多くなったことによる二次的な結果と考えられた。本試験の結果は SOV に対する個体ごとの反応性について考慮していないことから、引き続き採胚を行い、データの蓄積が必要である。

以上のことから、ホルスタイン種未経産牛の採胚においては、11 か月齢以降に採血を行い、AMH 濃度から供胚牛を選抜することで採胚時の回収胚数を増加させられること、また BUN、B/G 比から供胚牛のエネルギー状態を適正値に保つことで胚の品質が向上し、より効率的な胚生産につながることを示唆された。血中 AMH 濃度、BUN 値および B/G 比は乳牛未経産牛の採胚適正牛の判断指標として有用であると考えられた。

文 献

- 1) A.H.Souza・P.D.Carvalho・A.E.Rozar・L.M.Vieira・K.S.Hackbart・R.W.Bender・A.D.Dresch・J.P.Verstegen・R.D.Shaver・M.C.Wiltbank, Relationship between circulating anti-

- Mullerian hormone (AMH) and superovulatory response of high-producing dairy cows, *Journal of dairy science*, 98(1):169-178, 2015
- 2) Charlene Rico・Stephane Fabre・Claire Medigue・Nathalie di Clemente・Frederrique Clement・Martine Bontoux・Jean-Luc Touze・Mickael Dupont・Eric Briant・Benoit Remy・Jean-Francios Beckers・Danielle Monniaux, Anti-mullerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow, *Biology of Reproduction*, 80(1):50-59, 2009
- 3) 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
- 4) E.S.Ribeiro・R.S.Bisinotto・F.S.Lima・L.F.Greco・A.Morrison・A.Kumar・W.W.Thatcher・J.E.P.Santos, Plasma anti-Mullerian hormone in adult dairy cows and associations with fertility, *J.Dairy Sci*, 97:6888-6900, 2014
- 5) J.L.H.Ireland・D.Scheetz・F.jimenez-krassel・A.P.N.Themmen・F.Ward・P.Lonergan・G.W.Smith・G.I.Perez・A.C.O.Evans・J.J.Ireland, Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle, *Biology of Reproduction*, 79(6):1219-1225, 2008
- 6) Hiroki Hirayama・Akira Naito・Shiego Fukuda・Takahashi Fujii・Masatugu Asada・Yasushi Inaba・Toshiro Takedomi・Masakazu Kawamata・Satoru Moriyasu・Soichi Kageyama, Long-term changes in plasma anti-Mullerian hormone concentration and the relationship with superovulatory response in Japanese Black cattle, *Journal of Reproduction and Development*, 63(1):95-100, 2017
- 7) 細川泰子・福成和博・吉川恵郷・佐藤洋一・菊池雄, 過剰排卵処理を施した黒毛和種牛における採胚成績と給与試料および BUN/血糖値比の関係, *日獣会誌*, 61:699-704, 2008
- 8) Hossam El-Sheikh Ali・Go kitahara・Toru Takahashi・Shogo Mido・Mohammed Sadawy・Ikuo Kobayashi・Koichiro Hemmi・Takeshi Osawa, Plasma anti-Mullerian hormone profile in heifers from birth through puberty and relationship with puberty onset, *Biology of Reproduction*, 97(1):153-161, 2017
- 9) 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, 2022
- 10) 北野典子・北原豪・坂口浩平・亀樋成美・鍋西久・小仲瑠偉・杉野文章・黒木幹也・須崎哲也, 抗ミューラー管ホルモン(AMH)を利用した胚生産予測技術の実証, *宮崎県畜産試験場試験研究報告*, 29:4-7, 2019
- 11) Oh-Kyeong Kweon・Hiroshi Kanagawa・Yoshiyuki Takahashi・Hideo Yamashina・Noboru Seike・Yasuaki Iwazumi・Yoshito Aoyagi・Hitoshi Ono, Factors Affecting Superovulation Response in Cattle, *The Jpnan Journal Veterinary Science*, 48(3):495-503, 1986
- 12) Ramazan Sevgi・Huseyin Erdem・Tahir Karasahin・Mehmet Ali Yilmaz・Muharrem Satilmis・Alaeddin OkuroGLU・Ilker Unal・Sukru Dursum・Hasan Alkan・Fatma Satilmis・Mehmet Guler, Determination of the relationship between serum anti-Mullerian hormone level and superovulatory response in Simmental cows, *Reproduction in Domestic Animals*, 54(10):1322-1329, 2019
- 13) 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*, 51:583-587, 1998
- 14) 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
- 15) 鈴木要人・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2報), *福井県畜産試験場研究報告*, 36:13-17, 2023
- 16) 鈴木要人・梅田彩里・澤田芳憲, 乳牛経産

牛における授精卵 (胚) 回収技術の確立 (第 3 報), 福井県畜産試験場研究報告, 37:9-15, 2024

- 17) 谷島優平・千ヶ崎健太・飯盛和也・加藤由紀及, 黒毛和種における抗ミューラー管ホルモンを用いた効率的な体内胚生産方法の検討, 茨城県畜産センター研究報告, 56:2024
- 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
- 19) 山田恭嗣・中尾敏彦, 乳牛の乾乳期および泌乳期における代謝プロファイルテストの成績と排卵同期化・定時人工授精の受胎率との関係, 日獣会誌, 59:40-44, 2006

The Establishment of Technique for Collecting Embryo in Holstein Heifers (The 4th Report)

Kaname SUZUKI¹⁾, Ayari UMEDA²⁾ and Akihiko HORIKAWA

Fukui Prefectural Livestock Experiment Station

1) Livestock Hygiene Service Center

2) Hilly and Mountainous Region Agriculture and Livestock Division

Abstract

High-yielding dairy cows often face challenges in efficiently producing fertilized embryos due to lactation stress. This study aimed to improve embryo production efficiency in Holstein heifers by investigating the relationship between blood components and embryo collection outcomes. Among the 42 heifers examined, those with blood urea nitrogen (BUN) levels between 10 mg/dl and less than 13 mg/dl, and a BUN/glucose (B/G) ratio below 0.2, tended to show a higher rate of normal embryos. Additionally, a positive correlation was also observed between anti-Müllerian hormone (AMH) concentration and the number of small follicles prior to superovulation (SOV) treatment. Based on AMH concentration, the heifers were classified into three groups: top 20% (H group: ≥ 0.736 ng/ml), middle 20% (M group: 0.466–0.736 ng/ml), and bottom 60% (L group: ≤ 0.466 ng/ml). When embryo collection performance was compared among 10 newly selected heifers using this classification, the H group showed higher numbers of total and transferable embryos. These findings suggest that selecting donor heifers based on blood AMH concentration and adjusting their energy status prior to embryo collection using BUN and B/G ratio may lead to more efficient embryo production in Holstein heifers.

Keywords: dairy cattle, heifers, embryo collection, AMH, BUN, B/G ratio