

黒毛和種繁殖牛における効率的な過剰排卵処置の検討

湯澤裕史、高崎久子¹⁾、宍戸容子、櫻井由美²⁾、川田智弘

1) 現 県北家畜保健衛生所、2) 現 畜産振興課

要約

黒毛和種繁殖雌牛における移植用の胚の採取（採胚）時の過剰排卵処置（SOV）の効率化を検討した。試験Ⅰとして、発情誘起法の1つであるFlex synch法を用いて卵胞波調節を行い、第一卵胞波期において卵胞刺激ホルモン（FSH）製剤の一回投与方法（ワンショット法）によるSOVを実施し、採胚成績に及ぼす影響を調査した。SOV前に卵胞波を調節した区（試験区1）、卵胞波調節後に腔内留置型プロゲステロン製剤（CIDR）を再挿入した区（試験区2）及び既報のワンショット法によるSOVを行った区（対照区）において採胚を実施した。対照区に比べ、試験区1では変性胚数が有意に多く、試験区2では正常胚率が低い傾向となった。次に、試験Ⅱとして、FSH製剤の溶媒液にヒアルロン酸（HA）を混合することで、ワンショット法におけるFSH製剤投与量の減量が可能であるかの検証を行った。FSH製剤の溶媒として、生理食塩水（生食）6 mLとHA4 mLを混合した区（試験区1）、生食のみ10 mLの区（試験区2）及び生食のみ50 mLの区（対照区；既報のワンショット法）においてSOVを実施したところ、試験区1では対照区と同等の成績が得られた。

目 的

牛の受精卵移植において、一度に多数の移植用胚を採取するためにはSOVは必須である。しかし、通常FSH製剤を数日間にわたり頻回投与する必要があり、牛に対するストレスが大きく、ホルモン処理も煩雑となることから、SOVの簡易化が求められている。

近年、省力化や牛のストレス低減を目的としたワンショット法が試みられており、平泉らは黒毛和種において生食を溶媒としたワンショット法により、従来のFSH製剤の漸減投与方法によるSOVと同等の採胚成績が得られると報告している¹⁾。しかし、既報のワンショット法では、採胚成績にバラツキがみられ、また、FSH製剤を50 mLもの生食に溶解し皮下投与するといった煩雑さの課題もある。このことから、本研究では平泉らの報告を基に、ワンショット法における採胚効率及び作業性を改善するための検討を行った。

まず、試験Ⅰにおいて、SOV開始時の主席卵胞の存在が、小卵胞の反応性と採胚総数に影響することから、発情誘起法の1つであるFlex synch法を用いて卵胞波調節を行い、第一卵胞波期においてワンショット法によるSOVを実施し、採胚成績に及ぼす影響を調査した。次に、試験Ⅱにおいて、FSHの血中濃度を一定以上に保つ必要があるSOVにおいて、体内での半減期が短く、既報のワンショット法では大量の生食に溶解し投与する必要があることから、体内への吸収時間の長いHAをFSHの溶媒に混合することで、ワンショット法におけるFSH製剤の投与量の減量が可能であるかの検証を行った。

試験Ⅰ 第一卵胞波からの過剰排卵処理法の検討

材料及び方法

1 試験期間及び供試牛

平成30（2018）年5月～平成31（2019）年2月の期間に、栃木県畜産酪農研究センターで飼養している黒毛和種繁殖雌牛4頭（産次：2～5産）を供試し、2区反転処理で暑熱期（7～8月）を避け、1頭当たり63日以上の間隔を空けて計8回採胚を実施した（表1）。

表1 試験スケジュール

供試頭数	1回目	2回目	3回目	4回目
2	試験区1	対照区	試験区2	対照区
2	対照区	試験区1	対照区	試験区2

2 SOVプログラム

試験区1では、発情後5日以降の任意の時期に超音波画像診断装置（エコー）を用いて黄体を確認後、プロスタグランジンF_{2α}（PGF_{2α}）製剤3 mL（クロプロステノール750 μg）を頸部筋肉内に投与した。また、同時に腔内留置型プロゲステロン製剤（CIDR）を挿入し、挿入後5日目にCIDRを除去することで発情を誘起（Flex synch法）した。ホルモン処置開始後7日目に性腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）製剤を1.25 mL（酢酸ブセレリン5 μ

g)を頸部筋肉内に投与し、10日目にFSH製剤20AUを生理食塩水50mLに溶解し頸部皮下に投与した。12日目にPGF_{2α}製剤3mLを頸部筋肉内に投与し発情を誘起した。13日目にGnRH製剤2.5mLを投与、14日目に人工授精を1回実施し、その7日後(21日目)に採胚を行った。試

験区1のSOVプログラムに加えて、試験区2では10日目のFSH製剤投与時に再びCIDRを挿入し、12日目に除去した。また、対照区(既報のワンショット法)ではホルモン処置開始日(0日目)に挿入したCIDRを12日目に除去した(図1)。

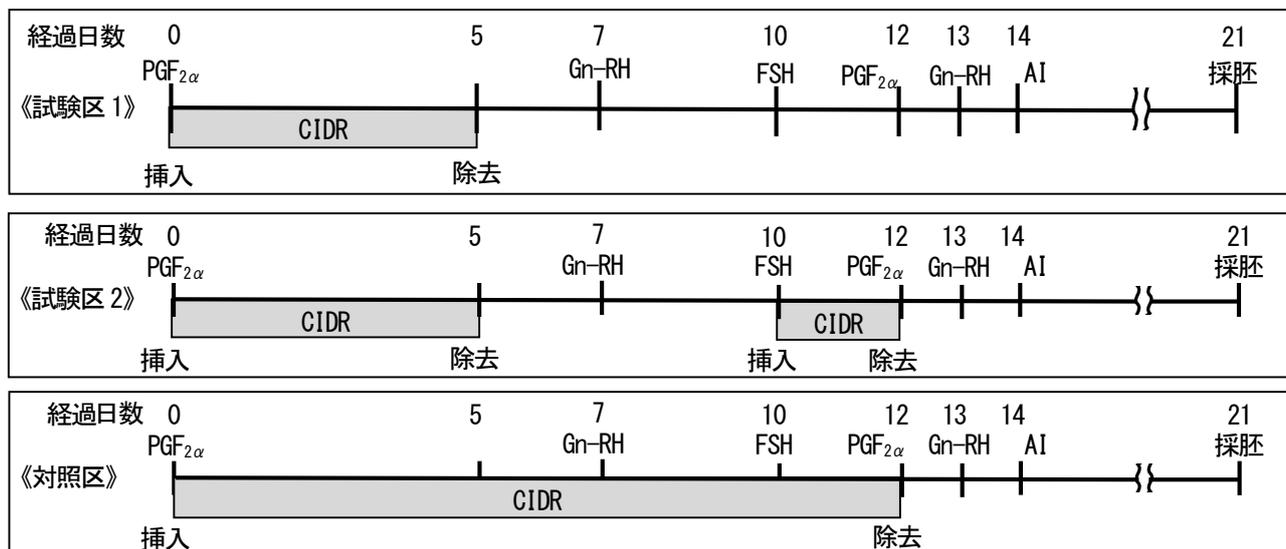


図1 試験IのSOVプログラム

3 調査項目

(1) 採胚成績

21日目の採胚時にエコーを用いて遺残卵胞数をカウントし、検卵時に採胚総数、正常胚数、変性胚数及び未受精卵数を測定した。

また、正常胚は、その発育時期(収縮桑実胚CM; compacted morula、初期胚盤胞EB; early blastocyst、胚盤胞BL; blastocyst、拡張胚盤胞EXB; expanded blastocyst)と品質(国際胚移植学会IETSマニュアル²⁾に基づきコード1~3)について分類した。

(2) 卵胞発育状況調査

ホルモン処置開始日を0として10、12日目及び21日目に卵胞ステージごとの卵胞数をエコーでカウントした。

なお、卵胞ステージについては、直径が5mm以下を小卵胞、6~10mmを中卵胞、11mm以上を大卵胞とした。

結果及び考察

採胚総数、遺残卵胞数、正常胚数及び未受精卵数では、3区間において有意な差は認められなかった。正常胚率では、対照区に比べ試験区2が低い傾向にあり、変性胚数では、対照区に比べ試験区1が有意に多い結果となった(表2)。

表2 各試験区の採胚成績

区分	供試頭数 (延べ)	採胚総数 (個)	遺残卵胞数 (個)	正常胚数 (個)	正常胚率 (%)	変性胚数 (個)	変性胚率 (%)	未受精卵数 (個)	未受精卵率 (%)
試験区1	3	10.7±2.3	2.7±0.9	5.0±2.5	51.1±0.2	5.0±2.5 ^b	42.2±0.2	0.7±0.7	6.7±0.1
試験区2	4	8.0±0.8	3.8±2.4	4.0±1.2	48.3±0.1 ^a	3.3±1.1	44.2±0.1	0.8±0.8	7.5±0.1
対照区	7	8.4±1.7	4.4±1.0	7.4±1.6	88.0±0.0 ^a	0.7±0.2 ^b	8.3±0.0	0.3±0.2	2.5±0.0

a 同符号間 $p < 0.09$ 、b 同符号間 $p < 0.05$

胚の発育時期は、3区間で有意な差は認められなかったが、試験区1及び2では、EXBに分類される胚は検出されなかった(表3)。

表3 正常胚の発育時期別個数(割合)

区分	発育時期			
	CM	EB	BL	EXB
試験区1	2.7±1.2 (35%)	2.0±0.8 (27%)	0.3±0.3 (5%)	0 (0%)
試験区2	1.0±0.6 (25%)	2.8±1.1 (63%)	0.3±0.2 (13%) ^c	0 (0%)
対照区	3.1±1.2 (46%)	3.4±1.0 (42%)	0.6±0.3 (6%) ^c	0.3±0.3 (6%)

CM; 収縮桑実胚 compacted morula、EB; 初期胚盤胞 early blastocyst、BL; 胚盤胞 blastocyst、EXB; 拡張胚盤胞 expanded blastocyst

また、胚の品質においても、3区間で有意な差は認められなかった(表4)。

表4 正常胚の品質別個数(割合)

区分	胚の品質		
	コード1	コード2	コード3
試験区1	2.7±1.2 (36%)	1.7±0.7 (22%)	0.7±0.5 (8%)
試験区2	2.8±0.7 (71%)	0.5±0.4 (8%)	0.8±0.2 (21%)
対照区	4.4±0.7 (68%)	2.0±0.6 (23%)	1.0±0.4 (9%)

コード1: Excellent (優) または Good (良)

コード2: Fair (可) コード3: Poor (不良)

さらに、卵胞発育状況調査でも、経過日数ごとの小卵胞、中卵胞及び大卵胞の割合は、3試験区で有意な差は認められなかった(図2)。

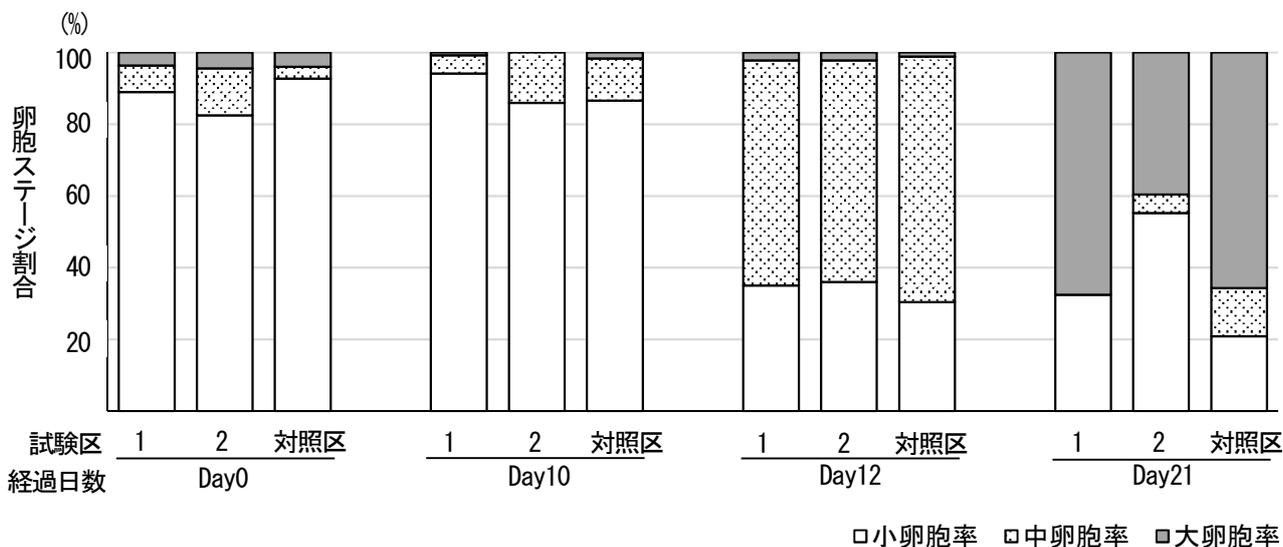


図2 SOVの経過日数毎の卵胞ステージの割合

以上のことから、第一卵胞波期からSOVを実施した試験区1及び2は、既報のワンショット法である対照区と比較して、経過日数ごとの卵胞ステージの割合に有意差が見られなかったことから、ホルモン処置に対する反応性に差はないことが示唆された。しかしながら、採胚成績において、試験区1では変性胚数が多く、試験区2でも正常胚率が低い傾向にあり、さらに、試験区1及び2

ともに発育時期がEXBの胚が見られなかったことから、第一卵胞波期からSOVを実施することで、得られる胚の質が低下したり、発育が遅れたりする可能性が考えられた。搾乳牛(乳用牛)では、第一卵胞波期からのSOVはプロゲステロン濃度が低く、胚の質に影響を及ぼすという報告があるが³⁾、今回は泌乳をしていない黒毛和種繁殖雌牛でも同様の結果が得られた。また、プロゲステロン

濃度を維持するため CIDR を再挿入した試験区 2 でも、対照区に比べ正常胚率が低い傾向となったことから、CIDR を再挿入しても血中のプロゲステロン濃度が十分に上昇しないのか、第一卵胞期からの SOV により、先行する発育した卵胞がないことが影響しているのかなどの要因は考えられたが、特定には至らなかった。

試験Ⅱ ヒアルロン酸添加 FSH 製剤 1 回投与法の検討

材料及び方法

1 試験期間及び供試牛

令和元 (2019) 年 5 月～11 月の期間に、当センターで飼養している黒毛和種繁殖雌牛 3 頭 (産次: 2 産) を供試し、ラテン方格法による反転方式で、暑熱期 (7～8 月) を避けて、また 1 頭当たり 63 日以上の間隔を空けて、各試験区 3 回、合計 9 回採胚を実施した (表 5)

表 5 試験スケジュール

牛 No.	1 回目	2 回目	3 回目
a	試験区 1	対照区	試験区 2
b	試験区 2	試験区 1	対照区
c	対照区	試験区 2	試験区 1

2 SOV プログラム

3 区とも、発情後 5 日以降の任意の時期に超音波検査により黄体を確認後、CIDR を挿入すると同時に、PGF_{2α} 製剤 3 mL (クロプロステノール 750 μg) を頸部筋肉内に投与した。CIDR 挿入後 7 日目に GnRH 製剤を 1.25 mL (酢酸ブセレリン 5 μg) を筋肉内に投与し、10 日目に FSH 製剤 20 AU を頸部皮下に投与した。12 日目に CIDR を除去すると同時に PGF_{2α} 製剤 3 mL を筋肉内に投与し発情を誘起した。13 日目に GnRH 製剤 2.5 mL を投与。14 日目に人工授精を実施し、その 7 日後 (21 日目) に採胚を行った。ただし、10 日目の FSH 製剤について、溶媒を試験区 1 は生食 6 mL と HA 4 mL の混合液 10 mL、試験区 2 は生食 10 mL、対照区は生食 50 mL として、頸部皮下に投与した (図 3)。

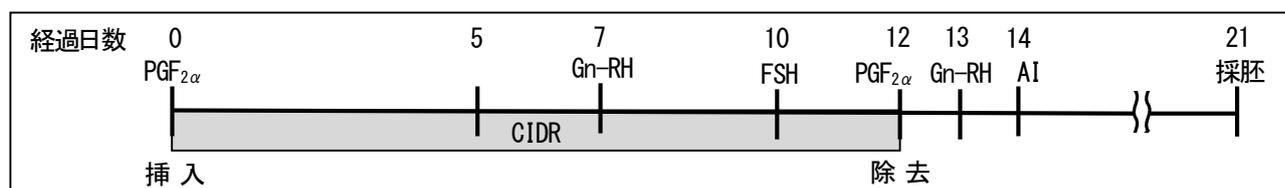


図 3 試験Ⅱの SOV プログラム

3 調査項目

(1) 採胚成績

21 日目の採胚時に、エコーを用いて遺残卵胞数を測定し、検卵時に採胚総数、正常胚数、変性胚数及び未受精卵数を測定した。

また、正常胚は試験Ⅰと同様に、その発育時期と品質を国際胚移植学会 IETS マニュアル²⁾に基づき分類した。

(2) 卵胞発育状況調査

CIDR 挿入日を 0 として 10、12、14 日目及び 21 日目に各卵胞ステージの個数をエコーにてカウントした。

結果及び考察

採胚成績は、変性胚率において、試験区 2 は対照区と比較し低い傾向にあった。

採胚総数、遺残卵胞数及び未受精卵数は、試験区 2 が試験区 1 及び対照区と比較して、測定値の平均では大きな差があったが、3 区間で有意な差は認められなかった (表 6)。

表 6 各試験区の採胚成績

区分	供試頭数 (延べ)	採胚総数 (個)	遺残卵胞数 (個)	正常胚数 (個)	正常胚率 (%)	変性胚数 (個)	変性胚率 (%)	未受精卵数 (個)	未受精卵率 (%)
試験区 1	3頭	12.0±1.7	2.3±1.0	10.3±1.5	86.1±1.8	1.0±0.5	7.9±3.2	0.6±0.5	6.1±4.9
試験区 2	3頭	6.7±2.4	4.0±2.2	5.0±2.1	77.8±12.0	0.7±0.5	5.6±4.5 ^c	1.0±0.8	16.7±13.6
対照区	3頭	12.0±4.9	2.3±0.7	8.7±3.8	72.5±5.7	2.3±0.5	25.1±7.5 ^c	0.3±0.3	1.4±1.1

c 同符号間 p = 0.169

胚の発育時期は、3 区の正常胚において、すべて CM、EB 及び BL の何れかに区分され、EXB に分類される胚は確認されなかった。特に、試験区 2 では、BL に分類される胚も検出されなかった。(表 7)。

表 7 正常胚の発育時期別個数 (割合)

区分	発育時期		
	CM	EB	BL
試験区 1	2.7±1.4 (30.6 %)	7.0±2.2 (64.7 %)	0.7±0.5 (4.8 %)
試験区 2	1.7±0.7 (33.2 %)	3.3±1.5 (67.8 %)	0 (0 %)
対照区	3.3±2.0 (31.5 %)	4.3±2.0 (50.0 %)	1.7±0.5 (22.2 %)

CM; 収縮桑実胚 compacted morula、EB; 初期胚盤胞 early blastocyst、BL; 胚盤胞 blastocyst

胚の品質は、3 区間ですべてのコードで有意な差は認められなかった (表 8)。

表 8 正常胚の品質別個数 (割合)

区分	胚の品質		
	コード 1	コード 2	コード 3
試験区 1	5.7±2.6 (48 %)	3.0±0.9 (34 %)	1.7±0.5 (18 %)
試験区 2	3.0±1.2 (64 %)	1.7±0.7 (32 %)	0.3±0.3 (3 %)
対照区	5.3±2.4 (60 %)	2.7±1.8 (20 %)	1.3±0.5 (20 %)

コード 1 : Excellent (優) または Good (良)

コード 2 : Fair (可) コード 3 : Poor (不良)

また、卵胞発育状況は、Day14 (人工授精時) において、試験区 2 が試験区 1 及び対照区に比べ大卵胞の割合が低い傾向にあった。また、Day0、10、12 及び 21 日では、3 区間で有意な差は認められなかったが、Day12 において、大卵胞が試験区 1 では検出されず、対照区では 0.7% だったのに対し、試験区 2 では 10.3% であった (図 4)。

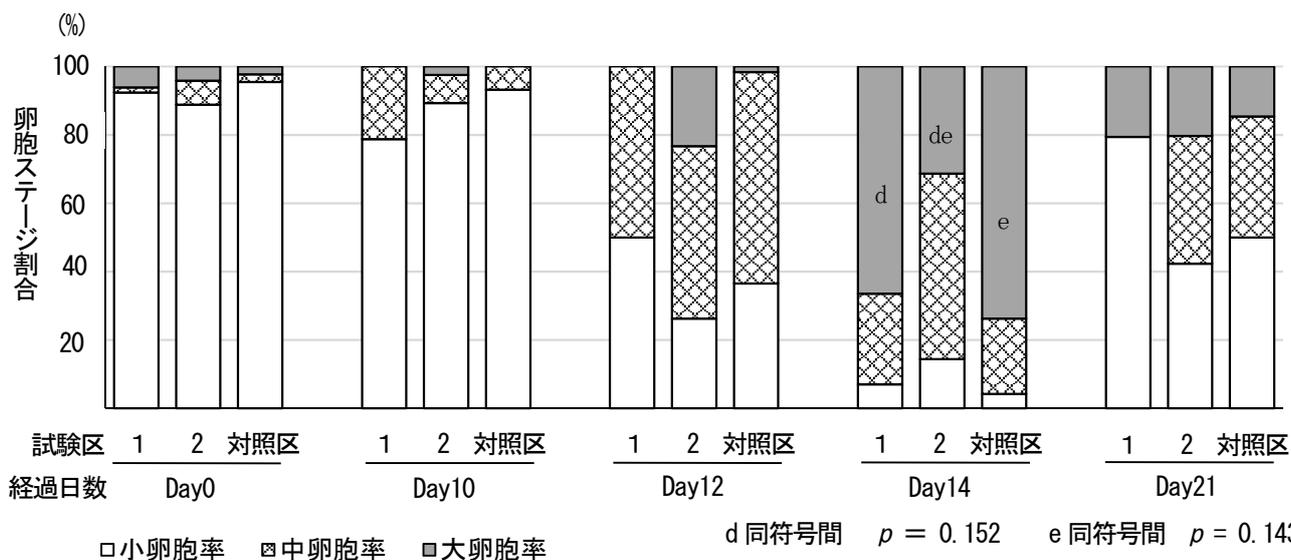


図 4 SOV の経過日数毎の卵胞ステージの割合

以上のことから、SOV のワンショット法における FSH 製剤の溶媒量を 10 mL に減量しても、HA を混和することによって、採胚成績及び卵胞発育状況のいずれも既報のワンショット法と同等の成績を得ることができた。溶媒が生食 10 mL のみでは、大卵胞の割合が AI 日以前から増加し、AI 日には他の試験区及び対照区に比べ大卵胞の割合が低い傾向にあった。HA 溶液を溶媒に用いた皮下注射では血中濃度の維持やより良好な薬物動態により注射の回数が減少するとの報告があることから⁴⁾⁵⁾、SOV のワンショット法においても、HA を混和することで、溶媒量 10 mL でも既報のワンショット法と同等投与した場合と同様の血中濃度の維持ができることが示唆された。一方、単純に溶媒量を減らした生食だけでは、FSH の血中濃度が一

過性に上昇し一定の血中濃度を維持できず、早い段階で卵胞が発育してしまい、その後卵胞の発育が促進されなかったと推測された。また、AI 時に大卵胞の割合が低い傾向があったが、採胚成績では有意差は認められなかった。

今回は、溶媒に HA を混合することで、既報のワンショット法と同等の成績を収めることができたが、Biancucciらは、溶媒に 5%HA 溶液を溶媒に用いることで SOV におけるゴナドトロピン投与量及び頻度が少なくすみ、受精卵数や移植及び凍結可能胚数が増加するとの報告をしている⁶⁾。そのため、今後はさらに採胚成績を改善するため、適正な HA の混和量等について検討する必要がある。

参考文献

- 1) S Hiraizumi, H Nishinomiya, T Oikawa, N Sakagami, F Sano, O Nishino, T Kurahara, N Nishimoto, O Ishiyama, Y Hasegawa, Y Hashiyada. 2015. Superovulatory response in Japanese Black cows receiving a single subcutaneous porcine follicle-stimulating hormone treatment or six intramuscular treatments over three days. *Theriogenology* 83, 466-473
- 2) 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) 第 3 版. 2001. (社) 畜産技術協会
- 3) Fernando A Rivera, Luis G D Mendonca, Gl AUCio Lopes Jr, Jose E P Santos, Rolando V Perez1, Marcel Amstalden, Abelardo Correa-Calderon, Ricardo C Chebel. 2011. Reduced progesterone concentration during growth of the first follicular wave affects embryo quality but has no effect on embryo survival post transfer in lactating dairy cows. *Reproduction and Fertility* 141(3).333-342
- 4) Esposito E, Menegatti E, Cortesi R. 2005. Hyaluronan-based microspheres as tools for drug delivery: a comparative study. *International Journal of Pharmaceutics* 288(1), 35-49
- 5) Kim SJ, Hahn SK, Kim mmJ, Kim DH, Lee YP. 2005. Development of a novel sustained release formulation of recombinant human growth hormone using sodium hyaluronate microparticles. *Journal of Controlled Release* 104(2), 323-335
- 6) Biancucci A, Sbaragli T, Comin A, Sylla L, Monaci M, Peric T, Stradaioli G. 2016. Corrigendum to "Reducing treatments in cattle superovulation protocols by combining a pituitary extract with a 5% hyaluronan solution: Is it able to diminish activation of the hypothalamic pituitary adrenal axis compared to the traditional protocol?" *Theriogenology* 85(5), 914-921