

牛胚移植の受胎率向上技術の開発

森下 康・池本千恵美*・永田麻理子**

*現鳥取県西部家畜保健衛生所、**現鳥取県食肉衛生検査所

要 約

牛胚移植において受胎率を高めるために、受胎促進ホルモンの効果を検証するとともに、受胎促進効果のあるホルモン製剤を使用した野外での移植実証試験を実施し、黄体機能を促進することによる受胎率向上効果について検討を行った。

試験1では、受胎促進ホルモンの効果検証として、黒毛和種8頭を用い、ヒト胎盤性性腺刺激ホルモン(hCG)製剤投与群及び黄体ホルモン製剤投与群に分け、発情後7日目にそれぞれの製剤を投与した場合の卵巣動態及び血中プロゲステロン濃度を測定した。その結果、黄体径は両群間で有意差はないもののhCG製剤投与群において大きくなる傾向が認められ、血中プロゲステロン濃度は、投与後経時的に有意に上昇した。また、品種、年齢、産歴、飼養形態が様々な雌牛を用いて、hCG製剤または黄体ホルモン製剤の投与が移植胚の受胎に及ぼす影響について検討した結果、受胎率はそれぞれ45.0%、35.7%であった。

試験2では、未経産ホルスタイン種66頭を用い、試験1において黄体機能が促進され受胎率が向上するとすると推測されたhCG製剤投与による野外移植実証試験を実施した。その結果、受胎率はhCG製剤投与群60.6%、無処置対照群45.5%とhCG製剤投与群が高く、また、血中プロゲステロン濃度はhCG製剤投与群で有意に高かった。

これらのことから、移植時にhCG製剤を投与することにより受胎率を向上させる可能性があることが示唆された。

結 言

牛胚移植技術の普及により優良牛の生産が増加しているが、近年の受胎率は50%前後で横ばいに推移しており、受胎率の向上は重要な課題とされている。牛胚移植において高い受胎率を得るには、胚、受胚牛及び移植技術の3つの要因についてよく理解し、実施する必要がある。このうち、受胚牛については、子宮内が胚の生存や発育に適した状況であるかどうか受胎率に大きく影響し、それは、飼料、気温、ストレス、その他さまざまな潜在的な要因により左右されると考えられる。また、受胚牛の黄体から分泌されるプロゲステロンは、子宮内膜のエストロゲン受容体数とオキシトシン受容体数の増加を抑制し黄体退行の阻止と胚の発育に適した子宮環境

を整えることにより、受胎率の向上が期待されるホルモンである。胚移植の受胎率を向上させるためには、血中プロゲステロン濃度が重要だとの報告もある¹⁾。ホルモン剤のうち、hCG製剤は移植時に投与することにより黄体と共存する主席卵胞の排卵を促し、誘起黄体を形成させることが知られており²⁾、黄体ホルモン製剤はプロゲステロンの分泌促進効果があることが知られている³⁾。

そこで、本研究では、受胚牛側の要因について、受胎促進ホルモンの効果を検証し(試験1)、さらに、受胎促進効果のあるホルモン製剤を使用した野外での移植実証試験を実施し、黄体機能を促進することによる受胎率向上効果について検討を行った(試験2)。

材料及び方法

1 供試牛

1) 試験 1

当場で飼養されている黒毛和種繁殖雌牛 8 頭（試験開始時月齢 45.1 ± 11.9 （平均±標準偏差）ヶ月）を用い、同一牛を 60 日以上の間隔を空けて 2 つの試験群で反転して供試した。また、当場と県内農家で飼養されている雌牛（品種、年齢、産歴、飼養形態が様々）34 頭を用いて移植試験を実施した。

2) 試験 2

県内公共育成牧場で飼養されている未経産ホルスタイン種 66 頭（試験開始月齢は 13.9 ± 0.60 ヶ月）を用いた野外移植試験を実施した。

3 試験区分

1) 試験 1

黒毛和種繁殖雌牛 8 頭を hCG 製剤投与群及び黄体ホルモン製剤投与群とに区分し、発情後 7 日目に hCG 製剤（動物用ペロオーゲン、日本全薬工業（株）、福島）1,500 単位または黄体ホルモン製剤（動物用ルテオーゲン L、日本全薬工業（株）、福島）200mg を頸部筋肉内に投与した。供試牛は 60 日以上の間隔を空けて反転し、hCG 製剤投与群と黄体ホルモン製剤投与群とで比較を行った。さらに、34 頭の雌牛を hCG 製剤投与群及び黄体ホルモン製剤投与群に区分して胚移植を実施した。

2) 試験 2

未経産ホルスタイン種の発情後 7 日目に胚移植を行い、移植時に hCG 製剤を投与する群及び無処置牛を対照群とした。

4 移植胚及び移植方法

移植胚は、当場で飼養されている黒毛和種の生体から回収した胚で、品質ランクは A'ランク（正常な発育ステージで、輪郭が明瞭、ほぼ正常な形態を示すが、一部に突出した細胞あるいは不均整が見られる。変性部位は 10%以下）、発育ステージは後期桑実胚から拡張胚盤胞で、ダイレクトトランスファー法で凍結した胚を用いた。

移植方法はダイレクト法で行い、ストローを 6 秒間空气中にさらし、20 秒間 30℃の温水中に浸して融解後、黄体形成が確認された子宮角内に移植した。

移植の実施者は、試験 1 は当場職員 4 名（獣医師）、試験 2 については、公共育成牧場職員 2 名で行った。

5 採血及び処理法

頸静脈からヘパリンナトリウム加真空採血管、フッ化ナトリウム+ヘパリンナトリウム+ EDTA-2Na 加真空採血管で採取し、3,000rpm で 10 分間遠心により血漿を分離した後、測定まで-30℃で凍結保存した。

6 調査項目

1) 血液生化学的検査及び血中プロゲステロン濃度

発情後 7 日目、10 日目、14 日目の計 3 回卵巣動態及び採血を実施した（発情日を 0 日目とした）。血漿は 7 項目（Glu、TP、ALB、BUN、Tcho、GOT、TG）についてドライケミストリー法（FUJI-Dry-Chem5500V、富士メディカルシステム、東京）で行い、Ht、Glb、A/G 比についても測定した。血中プロゲステロン濃度の測定については、自動免疫蛍光測定装置スポットケムバイダス（SPOTCHEM VIDAS SV-5010、アークレイ、京都）を用いて行った。

2) 卵巣所見及び妊娠診断

卵巣動態及び妊娠診断は、超音波診断装置（トリंगा V リニア、（株）メディカル・タスクフォース、大阪）を用いて行った。

結果

1 試験 1

hCG 製剤投与群と黄体ホルモン製剤投与群とでは、黄体径は両群間で有意差はないものの、hCG 製剤投与群において大きくなる傾向が認められた（図 1）。また、血中プロゲステロン濃度は、投与後 3 日目では hCG 製剤投与群が 16.68 ± 5.23 ng/mL、黄体ホルモン製剤投与群が 9.36 ± 3.27 ng/mL、投与後 7 日目では、 19.11 ± 2.71 ng/mL、 10.05 ± 4.00 ng/mL であり hCG 製剤投与群

で有意 ($p<0.01$) に高かった (図 2)。胚移植による受胎率は、hCG 製剤投与群が 45.0%、黄体ホルモン製剤投与群が 35.7%であり、hCG 投与群が高かった (表 1)。

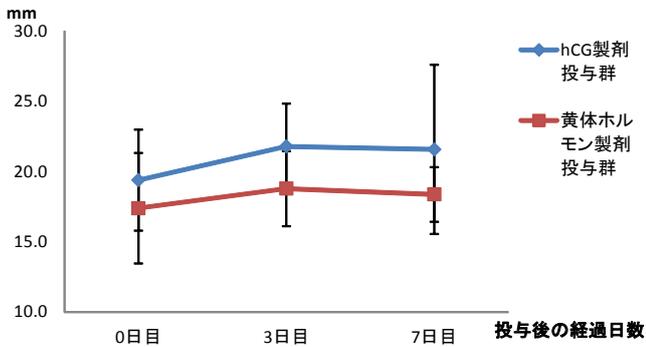


図 1 hCG 製剤投与群及び黄体ホルモン製剤投与群の黄体径の推移

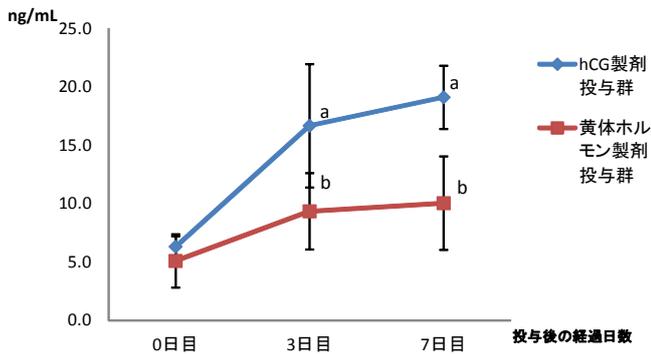


図 2 hCG 製剤投与群及び黄体ホルモン製剤投与群の血中プロゲステロン濃度の推移
* 異符号間に有意差有り ($p<0.01$)

表 1 ホルモン製剤投与後の受胎成績の比較

試験群	品種	産歴	移植頭数	受胎頭数 (%)
hCG 製剤投与群	黒毛和種	未経産	1	1 (100.0)
		経産	7	2 (28.6)
	交雑種	未経産	0	0 (—)
		経産	4	2 (50.0)
	ホルスタイン	未経産	6	3 (50.0)
		経産	2	1 (50.0)
小計			20	9 (45.0)
黄体ホルモン製剤投与群	黒毛和種	未経産	1	0 (0.0)
		経産	3	1 (33.3)
	交雑種	未経産	1	0 (0.0)
		経産	3	3 (100.0)
	ホルスタイン	未経産	3	1 (33.3)
		経産	3	0 (0.0)
小計			14	5 (35.7)

2 試験 2

受胎率は、hCG 製剤投与群が 60.6%、対照群が 45.5%であり、hCG 投与群で高かった (表 2)。

血中プロゲステロン濃度については、ホルモン製剤投与後 7 日目では、hCG 製剤投与群が $19.50 \pm 6.24\text{ng/mL}$ 、対照群が $9.14 \pm 4.68\text{ng/mL}$ であり、hCG 製剤投与群で有意 ($p<0.01$) に高かった (図 3)。本試験において受胎した牛の血中プロゲステロン濃度は、hCG 製剤投与群で $20.55 \pm 6.22\text{ng/mL}$ 、対照群で $10.16 \pm 3.84\text{ng/mL}$ であった。また、不受胎の牛の数値は、hCG 製剤投与群で $17.90 \pm 6.17\text{ng/mL}$ 、対照群で $8.29 \pm 5.23\text{ng/mL}$ であった (図 4)。なお、血液生化学検査では著変を認めなかった (表 3)。

表 2 野外移植実証試験における受胎成績

試験群	移植頭数	受胎頭数	受胎率 (%)
hCG 製剤投与群	33	20	60.6
対照群	33	15	45.5

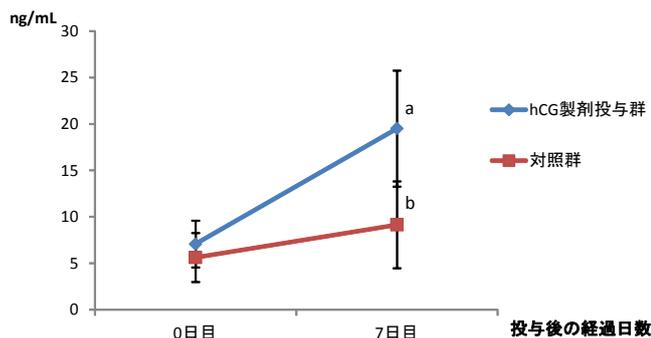


図3 野外移植実証試験における hCG 製剤投与群及び対照群での血中プロゲステロン濃度の推移
* 異符号間に有意差有り (p<0.01)

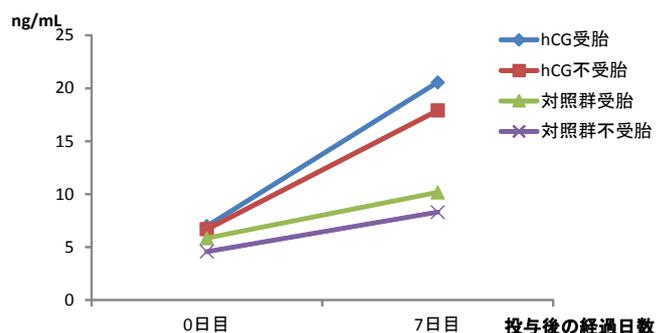


図4 野外移植実証試験における血中プロゲステロン濃度の推移

考 察

表3 血液生化学検査結果

試験群	採血	Ht	Glu	TP	ALB	GLB	A/G 比
		%	mg/dL	g/dL	g/dL	mg/dL	
hCG 製剤 投与群	移植時	29.2	63.6	7.7	3.2	4.6	0.7
	7日後	3.1	9.5	0.9	0.5	0.6	0.2
		2.5	6.8	1.1	0.7	0.9	0.2
対照群	移植時	28.5	63.3	7.6	3.1	4.5	0.8
	7日後	2.6	8.1	0.6	0.6	0.7	0.4
		2.4	5.4	0.8	0.5	0.9	0.2

試験群	採血	BUN	Tcho	GOT	TG
		mg/dL	mg/dL	U/L	mg/dL
hCG 製剤 投与群	移植時	11.4	112.1	73.0	32.0
	7日後	3.5	28.8	10.7	8.3
		11.6	112.2	73.7	31.5
対照群	移植時	10.8	118.2	75.2	29.5
	7日後	2.9	39.5	11.6	6.5
		12.1	104.2	77.8	28.9
		3.6	29.1	14.1	5.6

数値 (上段: 平均、下段: 標準偏差)

牛胚移植における受胎率を向上させるため、黄体機能を強化し、血中プロゲステロン濃度を高める受胎促進ホルモンについて検討した。

試験1では、受胎促進ホルモンについて、hCG 製剤及び黄体ホルモン製剤を用いたところ、hCG 製剤投与により黄体ホルモン製剤投与と比較し黄体径は大きくなる傾向が認められ、血中プロゲステロン濃度は投与後経時的に有意に高くなり、胚移植による受胎率も高く、受胎促進効果があることが示唆された。

未経産牛では、牛胚移植における受胎率は経産牛より高いことが知られている⁴⁾。また、ホルスタイン種育成牛は、経産牛に比べ子宮の清浄性が高く、子宮頸管や子宮体、子宮角が小さく、移植器の挿入が容易であること、さらに、過大子による分娩時の事故を防げることなどから受胎牛として多く利用されている。本県では、酪農家のホルスタイン種に黒毛和種受精胚を移植し、和子牛の増頭対策に取り組んでおり、牛胚移植による受胎率を向上させることは喫緊の課題となっている。試験2では、hCG 製剤による未経産ホルスタイン種を用いた野外移植実証試験を実施した。移植時に hCG 製剤を投与することにより、血中プロゲステロン濃度は対照群より有意に高く、受胎率も高い結果であった。これらのことから、hCG 製剤を投与することにより黄体機能が促進されたと考えられ、本剤の投与により受胎率向上効果を示すこ

とが示唆された。ただし、血中プロゲステロン濃度については、対照群で受胎した牛の数値は、hCG 投与群の不受胎の数値より低かったことから、受胎する要因は、受胎牛の血中プロゲステロンが高いことだけではなく、その他の様々な要因が関与していることが推察された。

牛胚移植の受胎率向上を目的とした試験研究は様々行われており、胚に関する要因としては、移植胚の機能補助として栄養膜細胞から産生されるインターフェロントウによる妊娠認識物質を利用した受胎率向上が図られている⁵⁾。移植技術に関する要因としては、胚の品質を維持するための適切な操作、基本に忠実な胚の取扱い、直腸検査技術を再確認し、移植技術を向上させることが重要である。受胎牛側の要因として、臍内留置型黄体ホルモン剤を利用した受胎率向上効果について検討されている⁶⁾。このように検討すべき課題は多く、受胎率を向上させるためには、胚に関する要因、移植技術に関する要因、受胎牛側の要因の3要因の相乗効果により発揮されると思われる。

今回の得られた成績から、移植時に hCG 製剤を投与することにより受胎率は向上し、牛胚移植において受胎率を向上させる方法の一助になると思われる。留意点としては、hCG 製剤の反復投与により抗体が産生されるため使用に際し注意する必要がある。

謝 辞

本研究の実施にあたり、胚移植にご協力いただいた公益財団法人鳥取県畜産振興協会鳥取放牧場の皆様、血中プロゲステロン濃度の測定に際しご協力いただいた鳥取大学農学部附属動物医療センターの皆様に深謝する。

参 考 文 献

- 1) 億正樹ら、受胎率向上のための前後処置法の検討、奈良県畜産研報、30.1-7 (2004)
- 2) 梅木英伸ら、牛受精卵移植技術の実用化に関する研究、大分県平成 15 年度試験成績報告書、33.5-11 (2004)
- 3) 山城存ら、牛胚の受胎率向上試験、沖縄県畜産研報、47. (2009)
- 4) 前原智ら、ウシ胚移植における受胎率に及ぼす要因の検討、島根県畜産研報、331-4 (2000)
- 5) 山口大輔ら、妊娠妊娠物質を利用した受胎率向上技術の確立、茨城畜産研報、41.1-6 (2008)
- 6) 藤井陽一ら、臍内留置型黄体ホルモン剤 (CIDR) を利用したウシ胚移植における受胎率向上効果の検討 (第 2 報)、山口県畜産試験場研究報告、22.1-7 (2007)