

ホルスタイン種経産牛における性選別精液を用いた 体内胚採取のための過剰排卵処理

秋山清・折原健太郎・坂上信忠

Superovulation in Holstein Cows using Sex-sorted Sperm

Kiyoshi AKIYAMA, Kentaro ORIHARA and Nobutada SAKAGAMI

ホルスタイン種経産牛に対して性選別精液を用いて体内胚を採取するための過剰排卵処理方法を検討した。

試験1：卵胞波調整と排卵促進処理を併用した過剰排卵処理を行った供胚牛に対して、非選別区は通常精液、選別区は性選別精液を人工授精して胚を採取した。非選別区は2頭中1頭、選別区は2頭中2頭で正常胚が得られ、正常胚数は2.5個および10.5個、正常胚率は49.5%および84.7%であった。

試験2：過剰排卵処理を行った供胚牛に対して、PG48h区はFSH投与開始から48時間、PG72h区はFSH投与開始から72時間にPGF2 α 製剤を投与し、性選別精液を人工授精して胚を採取した。PG48h区では3頭中2頭、PG72h区では3頭すべてから正常胚が得られ、正常胚数は3.3個および11.7個、正常胚率は32.8%および89.8%であった。

試験3：過剰排卵処理前の卵胞波調整方法として、DFR区は黄体ホルモン製剤留置後5日に直径8mm以上の卵胞を吸引除去し、EB区は黄体ホルモン製剤挿入時にエストラジオール製剤を投与した後に過剰排卵処理を行い、性選別精液を人工授精して胚を採取した。両区とも4頭中3頭で正常胚が採取され、正常胚数は8.0個および6.8個、正常胚率は61.7%および44.6%であり、有意差は認められなかった。

全ての試験成績の合計から、性選別精液を用いて採胚を行った14頭中11頭で正常胚が採取され、正常胚数は8.9個であり、卵胞波調整と排卵促進処理を併用した過剰排卵処理により実用性のある採胚成績が得られることが確認された。

キーワード：ホルスタイン種経産牛、性選別精液、過剰排卵処理、
卵胞波調整、排卵促進

酪農経営において畜主が希望する性別の子牛を得ることは、後継牛の計画的な生産を実現し、経営の安定化と効率化のために極めて有効な手段になると考えられる。最近、希望する性別の子牛を90%以上の確率で生産することができる性選別精液が市販され、後継牛生産に利用することが期待されている。しかし、性選別精

液はストロー1本あたりに充填された精子数が通常精液に比べて少ないことなどから、経産牛では人工授精後の受胎率が低いこと（Anderssonら2006；DeJarnettら2008；Schenkら2009；DeJarnetteら2011）や過剰排卵処理後に採取した胚の移植可能胚率や受精卵率が低いこと（Hayakawারা2009；Peippoら2009；Larsonら

2010) などが指摘されており、技術普及のために改善が望まれている。

Hayakawa ら (2009) は、過剰排卵処理後の経産牛に性選別精液を用いて1回のみ的人工授精を行った場合に通常精液と比べて正常胚率の低下と未受精卵率の増加が認められることを報告している。一方、高岡ら (2014) は人工授精を発情発見後24時間とその12時間後の2回とし、性選別精液の使用本数を増やすことで、経産牛において移植可能胚率や凍結可能胚率の低下が認められないこと、Larson ら (2010) は授精回数を3回、精液本数を4本とすることで性選別精液と通常精液で未受精卵数に差が認められないことを報告しており、適期の人工授精が有効なことが推察される。

生体内卵子吸引 (以下、OPU) により体内成熟卵子を採取するために過剰排卵処理後の排卵時間を調査した Matoba ら (2014) の報告によると、ホルスタイン種乾乳牛に対して大型卵胞の吸引除去による卵胞波調整と性腺刺激ホルモン放出ホルモン製剤 (以下、GnRH 製剤) 投与による排卵促進を併用した過剰排卵処理を行い、超音波画像診断により経時的に排卵時間を調査したところ、GnRH 投与後 29~32 時間に排卵が集中することを報告している。そこで、卵胞波調整と排卵促進を併用した過剰排卵処理方法をホルスタイン種泌乳牛の体内胚採取に応用すれば、GnRH 製剤投与時間を基準とした適期の人工授精が可能となり、性選別精液を用いた場合にも採胚成績の向上につながるものと考えられる。

本研究はホルスタイン種経産牛に対して性選別精液を用いて体内胚を採取するための過剰排卵処理方法を構築することを目的として以下の試験を行った。

試験1では、通常精液と性選別精液による採胚成績を比較し、卵胞波調整と排卵促進処理を併用した過剰排卵処理の有効性を検討した。

試験2では、通常精液を用いた場合に正常胚数の増加が認められた卵胞刺激ホルモン製剤 (以下、FSH) 投与後のプロスタグランジン F₂α 製剤 (以下、PG) 投与時間を遅らせた過剰排卵処理 (中原ら、2012) が、性選別精液を用いた採胚に対する効果を検討した。

試験3では、性選別精液を利用するための過剰排卵処理方法を野外に普及するために、DFR による卵胞波調整の代替としてエストラジオール製剤の利用について検討した。

材料及び方法

1 供試牛

当所で飼養するホルスタイン種経産牛 (延べ11頭) を供試した。

2 過剰排卵処理

Matoba ら (2014) および秋山ら (2016) の方法に準じて、発情周期の任意の時期の供試牛に腔内留置型黄体ホルモン製剤 (以下、CIDR、シダー1900; (株)ファイザー製薬、東京) を留置 (0日目) し、5日目に直径8mm以上の卵胞を吸引除去した (以下、DFR)。6日目夕方から10日目の朝まで FSH (アントリン R10; (株)共立製薬、東京) を漸減投与 (夕朝8回、6、6、4、4、3、3、2、2AU、合計30AU) し、8日目夕方に PG (0.225mg、ダルマジン; 共立製薬、東京) を投与し、9日目朝に CIDR を抜去して発情を誘起した。10日目朝に GnRH 製剤 (0.2mg、スポルネン; (株)共立製薬、東京) を投与した。

3 人工授精および採胚

ホルスタイン種の通常精液 (家畜改良事業団、東京) は1本を左右子宮角に半量ずつ注入し、性選別精液 (精子濃度 6×10^6 個/mL、Sort90 採卵用、家畜改良事業団、東京) は左右子宮角に1本ずつ注入した。精液の融解は Sort90 人工授精マニュアル (家畜改良事業団、東京) に従って行い、GnRH 投与の24時間後に通常精液注入器 ((株)富士平工業、東京) を用いて両子宮角の浅部に注入し、採胚は人工授精後6日目の午前中に子宮灌流により行った。

4 卵胞数

卵胞数は超音波画像診断装置 (SSD3500; (株)アロカ、東京) を用いて、直径8mm以上の卵胞を吸引除去した時、FSH 投与開始時、GnRH 投与時、人工授精時および人工授精後24時間に直径8mm以上の大卵胞を計数した。

5 試験区

(1) 試験1

ホルスタイン種経産牛4頭を通常精液を授精する非選別区および性選別精液を授精する選別区に振り分けて供試した。

(2) 試験2

ホルスタイン種経産牛3頭を供試し、PG 投与を FSH 投与開始から48時間に行う PG48h 区と FSH 投与開始から72時間に行う PG72h 区の処理を60日以上の間隔を空けて反転して行った。

(3) 試験3

ホルスタイン種経産牛4頭を供試し、卵胞波調整を CIDR 挿入後3日目の DFR により行う DFR

区と CIDR 挿入時の安息エストラジオール製剤 (1mL、オバホルモン; (株)あすかアニマルヘル

ス、東京) 投与により行う EB 区の処理を 60 日以上の間隔を空けて反転して行った。

試験 1 試験 2 の PG48 h 区		試験 2 の PG72h 区 試験 3 の DFR 区		試験 3 の EB 区	
日	9:00	日	9:00	日	9:00
0	CIDR挿入	0	CIDR挿入	0	CIDR挿入, EB
5	DFR	5	DFR	4	FSH
6	FSH	6	FSH	5	FSH
7	FSH	7	FSH	6	FSH
8	FSH, PG	8	FSH	7	FSH, PG
9	FSH, CIDR除去	9	FSH, PG	8	FSH, CIDR除去
10	FSH, GnRH	10	FSH, CIDR除去	9	GnRH
11	人工授精	11	GnRH	10	人工授精
17	採胚	18	採胚	16	採胚

CIDR: 膈内留置型黄体ホルモン製剤
 DFR: 直径8mm以上の卵胞の吸引
 EB: エストラジオール製剤
 FSH: 卵胞刺激ホルモン製剤
 GnRH: 性腺刺激ホルモン放出ホルモン製剤
 PG: プロスタグランジンF2 α 製剤

図 1 各試験区の処理スケジュール

6 統計処理

試験 3 の試験区間の有意差検定は t 検定で行い、危険率 5%未満は有意差ありとした。

結果

試験 1 では、非選別区は 2 頭中 1 頭、選別区は 2 頭中 2 頭で正常胚が得られ、正常胚数は 2.5 個および 10.5 個、正常胚率は 49.5% および 84.7% であった (表 1)。正常胚の発育ステージは、非選別区では初期胚盤胞、選別区では胚盤胞が多かった (表 2)。処理中の大卵胞数は、非選別区では GnRH 投与時、選別区では AI 時が多かった (表 3)。

試験 2 では、PG48h 区では 3 頭中 2 頭、PG72h 区では 3 頭すべてから正常胚が得られ、正常胚

数は 3.3 個および 11.7 個、正常胚率は 35.8% および 89.8% であった (表 4)。正常胚の発育ステージは両区ともに後期桑実胚が最も多かった (表 5)。大卵胞数は PG48h 区では AI 時、PG72h 区では GnRH 投与時が多かった (表 6)。

試験 3 では、両区とも 4 頭中 3 頭で正常胚が採取され、正常胚数は 8.0 個および 6.8 個、正常胚率は 61.7% および 44.6% であった (表 7)。正常胚の発育ステージは両区ともに後期桑実胚が最も多かった (表 8)。大卵胞数は、FSH 投与開始時に DFR 区は 0.0 個、EB 区では 2.0 個であり、両区とも GnRH 投与時が多かった (表 9)。いずれの項目も有意差は認められなかった。

表 1 試験 1 の採胚成績

試験区	供試頭数	推定黄体数	遺残卵胞数	採胚総数	正常胚数	正常胚率 (%)	変性胚数	変性胚率 (%)	未受精卵数	未受精卵率 (%)
非選別区	2	6.5	2.0	4.0	2.5	49.5	1.5	55.0	0.0	0.0
選別区	2	13.0	2.5	12.5	10.5	84.7	0.5	11.4	1.5	4.0

表 2 試験 1 の正常胚の品質ランクと発育ステージ

試験区	供試頭数	ランク				発育ステージ			
		A	A'	B	C	M	CM	EB	BL
非選別区	2	0.0	1.0	1.5	0.0	0.0	0.5	2.0	0.0
選別区	2	0.5	2.5	4.0	3.5	0.5	1.5	1.0	7.5

M: 桑実胚、CM: 後期桑実胚、EB: 初期胚盤胞、BL: 胚盤胞

表3 試験1の大卵胞数の推移

試験区	供試頭数	DFR時	FSH投与開始	GnRH投与時	AI時	AI後24時間
非選別区	2	1.5	0.5	9.5	6.5	3.0
選別区	2	1.0	0.0	19.5	23.5	5.5

表4 試験2の採胚成績

試験区	供試頭数	推定黄体数	遺残卵胞数	採胚総数	正常胚数	正常胚率(%)	変性胚数	変性胚率(%)	未受精卵数	未受精卵率(%)
PG48h区	3	11.3	5.3	8.0	3.3	35.8	2.0	45.0	2.7	22.2
PG72h区	3	15.0	5.0	14.0	11.7	89.8	1.7	7.6	0.7	2.7

表5 試験2の正常胚の品質ランクと発育ステージ

試験区	供試頭数	ランク				発育ステージ			
		A	A'	B	C	M	CM	EB	BL
PG48h区	3	0.0	1.0	1.0	1.3	0.7	2.7	0.0	0.0
PG72h区	3	0.7	1.7	3.7	5.7	2.3	6.0	1.0	2.3

M: 桑実胚、CM: 後期桑実胚、EB: 初期胚盤胞、BL: 胚盤胞

表6 試験2の大卵胞数の推移

試験区	供試頭数	DFR時	FSH投与開始	GnRH投与時	AI時	AI後24時間
PG48h区	3	4.0	0.0	18.3	21.0	10.0
PG72h区	3	1.7	1.7	25.0	16.7	8.3

表7 試験3の採胚成績

試験区	供試頭数	推定黄体数	遺残卵胞数	採胚総数	正常胚数	正常胚率(%)	変性胚数	変性胚率(%)	未受精卵数	未受精卵率(%)
DFR区	4	14.8	1.8	12.0	8.0	61.7	2.5	21.7	1.5	16.7
EB区	4	19.3	3.0	17.5	6.8	44.6	6.8	34.7	4.0	20.7

表8 試験3の正常胚の品質ランクと発育ステージ

試験区	供試頭数	ランク				発育ステージ			
		A	A'	B	C	M	CM	EB	BL
DFR区	4	3.5	1.3	2.3	1.0	0.3	7.5	0.3	0.0
EB区	4	0.5	2.5	2.3	1.5	0.0	5.5	0.5	0.8

M: 桑実胚、CM: 後期桑実胚、EB: 初期胚盤胞、BL: 胚盤胞

表9 試験3の大卵胞数の推移

試験区	供試頭数	CIDR挿入時	FSH投与開始	GnRH投与時	AI時	AI後24時間
DFR区	4	2.5	0.0	17.8	13.0	2.3
EB区	4	2.0	2.0	23.0	14.0	2.3

考察

本研究は、卵胞波調整と排卵促進を併用した過剰排卵処理を行ったホルスタイン種経産牛に対して性選別精液を利用するための処理方法に

ついて検討したものである。

試験1では、ホルスタイン種経産牛において6 × 10⁶個/mLの性選別精液2本をGnRH投与後24時

間に人工授精したところ、通常精液に比べて正常胚率が高く、これまでの報告(Hayakawaら2009; Kaimioら2013; 高岡ら2014)にあるように人工授精回数や精液本数を増やさなくても未受精卵率の増加は認められなかった。このことから、卵泡波調整と排卵促進を併用した過剰排卵処理を行いGnRH投与後24時間に人工授精を行うことで、性選別精液を利用して効率的な体内胚の採取が可能であると推察された。

試験2では、中原ら(2012)の報告に準じてFSH投与後のPG投与時間を72時間とし性選別精液を用いて採胚を行った。その結果、PG48h区に比べて正常胚数が増加し、さらに正常胚率も高い結果が得られた。Mapletoftら(2015)はFSH投与日数を7日間とした場合にFSH投与日数を4日間とした場合と比べて黄体数や正常胚数が増加し、FSH投与期間を延長することが採胚成績の向上に有効なことを報告している。本研究ではFSH投与期間は延長せずPG投与をFSH投与後48時間から72時間に遅らせた。このことにより、PG投与前のFSH投与回数が増加し卵泡発育が促されたことで、採胚成績の向上につながった可能性があると考えられた。

試験1および試験2では、CIDR留置後に直径8mm以上の卵泡を吸引除去することにより卵泡波調整を行った。しかし、性選別精液を利用するための過剰排卵処理方法を野外に普及するためには、ホルモン剤を利用して卵泡波調整を行う方法が実用的である。そこで、試験3ではCIDR留置と同時にエストラジオール製剤を投与し卵泡波調整を行う方法で採胚成績を調査した。その結果、エストラジオール製剤を投与したEB区の採胚成績は大型卵泡を吸引除去したDFR区と比べて有意差は認められなかった。卵泡波調整には主席卵泡の吸引除去のほかエストラジオール製剤を用いる方法とGnRH製剤を用いる方法がある。日高ら(2015)は黒毛和種牛に対するOPUの前処置としてGnRH製剤投与とエストラジオール製剤投与を比較したところ、卵泡数や採取卵子数はいずれの方法も無処置区より増加し、どちらの方法も卵泡波の調整に効果があることを報告している。しかし、GnRH製剤投与による卵泡波調整は、その後のPG投与までの日数によってはPGに反応することができる黄体が形成されないことが考えられる。このことから、体内胚採取

のための卵泡波調整にはエストラジオール製剤を投与する方法が有効であり、本研究の結果からも主席卵泡の吸引除去の代用として利用可能と考えられた。

本研究は少頭数の試験成績ではあるが、性選別精液を用いた場合にも多数の正常胚が得られることが確認された。平井(2014)はホルスタイン種の体内胚の採取において正常胚数が0個の個体の割合は、経産牛で21%であり未経産牛や黒毛和種に比べて多く、正常胚数は5.3個であったと報告している。本研究の各試験の成績を合計してみると、性選別精液を用いて採胚を行った14頭のうち正常胚が0個の個体は3頭(21%)、正常胚数は8.9個であり、平井(2014)の報告と比べても実用性のある採胚成績が得られることが確認された。

以上のことから、本研究で用いた卵泡波調整と排卵促進を併用した過剰排卵処理は、性選別精液を用いてホルスタイン種経産牛から体内胚を採取するために有効な方法であると考えられた。

謝辞

本試験の実施に当たりご指導いただいた家畜改良センター十勝牧場稲葉泰志氏および家畜改良事業団家畜バイテクセンター濱野晴三氏に感謝の意を表します。

引用文献

- 秋山清、坂上信忠、中川浩、瀬田剛史、河合愛美、長井誠、林みち子、的場理子、稲葉泰志、松田秀雄、今井敬、下司雅也. 2016. 多排卵処理後に採取した卵泡内卵子と性選別精液の体外受精によるウシ性判別胚の生産. 日本畜産学会報 87, 107-113.
- Andersson M, Taponen J, Kommeri M, Dahlbom M. 2006. Pregnancy rates in lactating Holstein-Friesian cows after artificial insemination with sexed sperm. *Reproduction Domestic Animal* 41, 95-97.
- DeJarnett JM, Nebel RL, Marshall CE, Moreno JF, McCleary CR, Lenz RW. 2008. Effect of sex-sorted sperm dosage on conception rates in Holstein heifers and lactating cows. *Journal of Dairy Science* 91, 778-1785.
- DeJarnett JM, Nebel RL, Marshall CE. 2011.

- Evaluating the success of sex-sorted semen in US dairy herds from on farm records. *Theriogenology* 71, 49-58.
- Hayakawa H, Hirai T, Takimoto A, Ideta A, Aoyagi Y. 2009. Superovulation and embryo transfer in Holstein cattle using sexed sperm. *Theriogenology* 71, 68-73.
- 日高健雅、森本和秀、今井昭、栗原幸一、福本豊、山崎瑞穂、横田文彦、山本祐輔、尾形康弘、山田博道、堀内俊孝. 2015. エストラジオール製剤投与が経膈採卵一体外受精精液に及ぼす影響. 広島県獣医学会雑誌 30, 43-48.
- 平井俊哉. 2014. 道東における牛の過剰排卵処理・胚回収の取り組み. 日本胚移植学雑誌 35, 43-46.
- Kaimio I, Mikkalo M, Lindeberg H, Heikkinen J, Hasler JF, Taponen J. 2013. Embryo production with sex-sorted semen in superovulated dairy heifers and cows. *Theriogenology* 80, 950-954 から 2013
- Larson JE, Lamb GC, Funnell BJ, Bird S, Martins A, Rodgers JC. 2010. Embryo production in superovulated Angus cows inseminated four times with sexed-sorted or conventional, frozen-thawed semen. *Theriogenology* 73, 698-703.
- Matoba S, Yoshioka H, Matsuda H, Sugimura S, Aikawa Y, Ohtake M, Hashiyada Y, Seta T, Nakagawa K, Lonergan P, Imai K. 2014. Optimizing production of in vivo-matured oocytes from superstimulated Holstein cows for in vitro production of embryos using X-sorted sperm. *Journal of Dairy Science* 97, 743-53.
- Mapletoft RJ, Garcia Guerra A, Dias FC, Singh J, Adams GP. 2015. In vitro and in vivo embryo production in cattle superstimulated with FSH for 7 days. *Animal Reproduction* 12, 383-388.
- 中原仁、小田亘、立川優子. 2012. ホルスタイン種における過剰排卵処理方法の検討. 第 19 回日本胚移植研究会大会講演要旨. 13.
- Peippo J, Vartia K, Kananen-Anttila K, Rätty M, Korhonen K, Hurme T, Myllymäki H, Sairanen A, Mäki-Tanila A. 2009. Embryo production from superovulated Holstein-Friesian dairy heifers and cows after insemination with frozen-thawed sex-sorted X spermatozoa or unsorted semen. *Animal Reproduction Science* 111, 80-92.
- Schenk JL, Cran DG, Everett RW, Seidel Jr GE. 2009. Pregnancy rates in heifers and cows with cryopreserved sexed sperm: Effects of sperm numbers per inseminate, sorting pressure and sperm storage before sorting. *Theriogenology* 71, 717-728.
- 高岡亜沙子、谷口雅康、音井威重. 2014. 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, 59-63.