

経膈採卵と過剰排卵処理の併用による 和牛胚の生産効率化に関する検討 (第2報)

坂本洋一 長谷川清寿 澤 香代子¹⁾ 岡崎尚之

要約 和牛胚の効率的生産とドナー牛の年1産を目標として、経膈採卵 (OPU) による体外胚生産と過剰排卵処理 (SOV) による体内胚生産を併用する手法であるD30OPU-SOVおよびD60OPU-SOVの2手法と、分娩後60日以内にSOVのみを行うD60SOVについて、ドナー牛に3産次にわたって各手法を適用した場合の胚生産成績を調査した。体外胚生産成績 (D30OPU-SOV vs D60OPU-SOV) は、移植可能胚数 (2.1 ± 0.5 vs 4.4 ± 1.4) および発生率 (29.6 ± 6.8 vs 23.8 ± 6.7) 等に有意差は認められなかった。体内胚生産成績 (D30OPU-SOV vs D60OPU-SOV vs D60SOV) は、採取卵数 (11.9 ± 2.7 vs 10.1 ± 2.5 vs 18.9 ± 5.4)、移植可能胚数 (5.5 ± 1.9 vs 8.0 ± 2.3 vs 13.1 ± 4.5)、移植可能胚率 (43.4 ± 12.9 vs 68.4 ± 11.3 vs 57.3 ± 12.7) および良質胚数 (3.8 ± 1.7 vs 7.6 ± 2.8 vs 9.1 ± 2.7) において各試験区間に明らかな差は認められなかったが、良質胚率 (24.9 ± 12.1 vs 62.9 ± 10.7 vs 36.2 ± 10.1) は、D60OPU-SOVがD30OPU-SOVと比較して有意 ($P < 0.05$) に高率であった。体外胚と体内胚の移植可能胚の総生産数 (7.6 ± 2.0 vs 12.4 ± 3.0 vs 13.1 ± 4.5) は、各試験区間に有意な差は認められなかった。移植可能胚の総生産数について、全試験区分の総平均を境界とした出現率を算出した結果、D30OPU-SOVが25.0% (2/8)、D60OPU-SOVが62.5% (5/8)、D60SOVが50.0% (4/8) であった。以上のことから、OPU後3日目からのSOVによるOPU-SOVを分娩後に適用する場合、分娩後30日より60日での適用によって、安定した胚生産成績が得られることが推察された。

キーワード：牛 黒毛和種 経膈採卵 過剰排卵処理 年1産

胚移植は、黒毛和種の優良遺伝資源を効率的に活用できる技術として普及定着化してきたが、我々はさらなる技術高度化を目指して、胚生産について経膈採卵 (OPU) と過剰排卵処理 (SOV) を組み合わせることに着目した。そして、我々は、分娩後比較的早期 (30または60日目) にこれら2つの技術を併用した場合 (OPU-SOV)、SOV単独処理による体内胚採取と変わらない胚生産成績が得られることに加え、ドナー牛の年一産も同時に実現できる可能性を示した¹⁾。今回、さらに詳細な技術評価を行うため、個々のドナー牛について、3産次にわたってそれぞれの手法を適用して胚生産を行い、加えてSOV後における繁殖成績を調査した。

材料および方法

実験のデザイン

供試牛は当センター繋養の黒毛和種経産牛8頭とし、供試牛1頭につき3つの胚生産手法を産次ごとに任意の順序ですべて適用した。これらの胚生産手法は既報¹⁾に基づき、分娩後30日目のOPUとその3日後からのSOVを併用する「D30OPU-SOV」、分

娩後60日目のOPUとその3日後からのSOVを併用する「D60OPU-SOV」、ならびに、分娩後60日以内にSOVのみを行う「D60SOV」とし、これら3手法を試験区とした。

OPUによる体外胚生産

当センターの常法²⁾に基づき、OPUで採取した卵丘細胞-卵子複合体 (COC) は成熟培養を行い、変性COCを除いて体外受精 (IVF) した後、5% CO₂、5% O₂、90% N₂の気相条件下の改変TCM199培地 (IVD101; 機能性ペプチド研究所) 内で7日間体外培養した。調査項目は、OPU時卵胞数、COC採取数およびIVFによる胚発生成績とした。

SOVによる体内胚生産

SOVはブタ由来卵胞刺激ホルモン (pFSH) 製剤 (アントリンR・10; 共立製薬) の3日間漸減投与 (総量20AU) およびpFSH最終投与時のプロスタグランジン (PG) F₂ 類縁体 (クロプロステノール; エストラメイト、シェリング・プラウ アニマルヘルス) 0.75mgの投与により行い、PGF₂ 投与48時間後に性腺刺激ホルモン放出ホルモン類縁体 (酢酸フェルチレリン; スポルネン注、共立製薬) 100μg

現所属：¹⁾ 西部農林振興センター江津家畜衛生部

を投与後、定時に人工授精し、その7日後に子宮灌流による胚採取 (ER) を行った。ただし、D30OPU-SOV および D60OPU-SOV では OPU 直後から PG 投与までの6日間、膈内留置型プロゲステロン製剤 (CIDR; イージーブリード、(社)家畜改良事業団) を留置した。

ER後の繁殖

胚採取後、PGF₂ 製剤 (ジノプロスト; プロナルゴンF、ファイザー) 30mg を投与した。その後、すべての供試牛を対象として、次産繁殖のための人工授精 (一部は胚移植) を行った。調査項目は、胚採取時の形成黄体数、採取卵数、移植可能胚 (品質コード: 1-3) 数および良質胚 (品質コード: 1-2) 数とした³⁾。また、SOV-ER 後の繁殖成績については、人工授精および胚移植による受胎状況を調べるとともに、起点分娩から次産分娩までの推定日数 (分娩間隔) を算出した。

統計解析

解析ソフト (エクセル統計2008 for Windows、社会情報サービス) を用い、試験区分間の各数値について分散分析を行い、多重比較検定 (Scheffe 法) を適用した。さらに、胚生産成績を詳細に比較するため、移植可能胚の総生産数について、3 試験区分の全平均値を基準とした出現率 (全平均値を超過する値の出現割合) を算出した。

結 果

胚生産手法別の体外胚および体内胚生産成績は、表1に示した。OPUによる体外胚生産成績について、平均採取COC数はD30OPU-SOVが17.4個、

D60OPU-SOVが30.3個であり、このうちIVF供試COC数はそれぞれ8.9個、18.6個であった。平均移植可能胚数はD30OPU-SOVが2.1個、D60OPU-SOVが4.4個であり、移植可能胚の平均発生率はそれぞれ29.6%および23.8%であった。これらの体外胚生産に関する調査項目において、D30OPU-SOVとD60OPU-SOVとの間に有意差は認められなかった。

SOVによる体内胚生産成績について、平均形成黄体数はD30OPU-SOVが12.8個、D60OPU-SOVが14.5個、D60SOVが21.8個であり、有意差は認められなかった。また、平均採取卵数および平均移植可能胚数 (率) はD30OPU-SOVが11.9個および5.5個 (43.4%)、D60OPU-SOVが10.1個および8.0個 (68.4%)、D60SOVが18.9個および13.1個 (57.3%) であり、各項目において試験区間に有意差は認められなかった。平均良質胚数 (率) は、D30OPU-SOVが3.8個 (24.9%)、D60OPU-SOVが7.6個 (62.9%)、D60SOVが9.1個 (36.2%) であり、D60OPU-SOVの良質胚率がD30OPU-SOVのそれと比べて有意 ($P < 0.05$) に高率であった。移植可能胚の総生産数について、各試験区の平均はD30OPU-SOVが7.6個、D60OPU-SOVが12.4個、D60SOVが13.1個で有意差は認められなかった。

各試験区における移植可能胚の総生産数について、全試験区分の総平均値 (11.0個) を境界とした出現率を算出し、図1に示した。出現率は、D30OPU-SOVが25.0% (2/8)、D60OPU-SOVが62.5% (5/8)、D60SOVが50.0% (4/8) であった。

胚生産手法別の胚生産後の繁殖成績については、

表1 胚生産手法別の体外胚および体内胚生産成績

試験区分	OPUによる体外胚生産				SOVによる体内胚生産				移植可能胚の総生産数 ⁷⁾
	採取COC数	IVF供試COC数	卵割数	移植可能胚数 ¹⁾	形成黄体数	採取卵数	移植可能胚数 ²⁾	良質胚数 ²⁾	
D30OPU-SOV (n = 8)	17.4±2.5	8.9±1.9	4.0±1.1 (46.0±6.7) ³⁾	2.1±0.5 (29.6±6.8) ⁴⁾	12.8±2.7	11.9±2.7	5.5±1.9 (43.4±12.9) ⁵⁾	3.8±1.7 (24.9±12.1) ^{a)6)}	7.6±2.0
D60OPU-SOV (n = 8)	30.3±6.2	18.6±4.2	10.9±2.9 (59.9±10.2) ³⁾	4.4±1.4 (23.8±6.7) ⁴⁾	14.5±3.5	10.1±2.5	8.0±2.3 (68.4±11.3) ⁵⁾	7.6±2.8 (62.9±10.7) ^{b)6)}	12.4±3.0
D60SOV ⁸⁾ (n = 8)	-	-	-	-	21.8±5.2	18.9±5.4	13.1±4.5 (57.3±12.7) ⁵⁾	9.1±2.7 (36.2±10.1) ⁶⁾	13.1±4.5

数値は平均値±標準誤差、異符号間に有意差あり (a, b: $P < 0.05$) .

¹⁾ IVF後7日目時点の発生胚盤胞数.

²⁾ 移植可能胚は国際胚移植学会 (IETS) による「品質コード1-3」と判定した胚で、良質胚は移植可能胚のうち低ランク胚を除く「品質コード1-2」と判定した胚.

³⁾ 卵割率: IVF供試COC数に対する割合 (%).

⁴⁾ 移植可能胚発生率: IVF供試COC数に対する割合 (%).

⁵⁾ 移植可能胚率: 採取卵数に対する割合 (%).

⁶⁾ 良質胚率: 採取卵数に対する割合 (%).

⁷⁾ 体外胚生産における移植可能胚数に体内胚生産における移植可能胚数を加えた総数.

⁸⁾ 分娩後60日以内でSOVを開始した区で、起点分娩からSOV処理開始までの日数は平均52日.

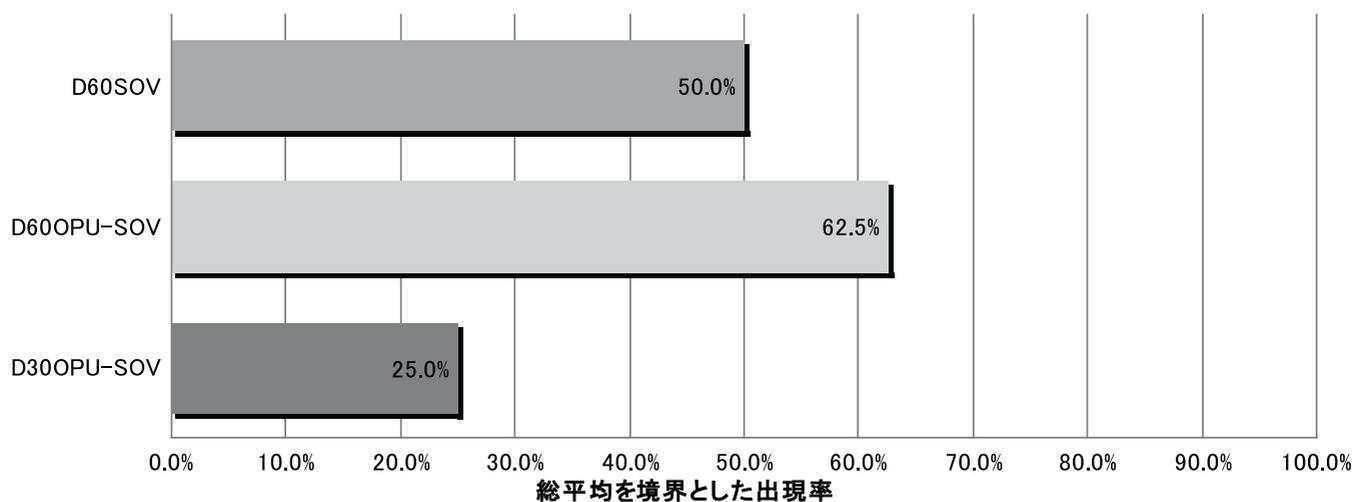


図1 移植可能胚総生産数における総平均を境界とした出現率

¹⁾ それぞれの試験区分において、3試験区分全体の総平均値（11.0個）を超過した個体の割合。

表2 胚生産手法別の胚生産後の繁殖成績

試験区分	受胎所要日数 ¹⁾	受胎所要繁殖回数 ²⁾	分娩間隔 ³⁾
D30OPU-SOV (n = 7)	58.4 ± 18.2	2.1 ± 0.4	387.9 ± 15.0
D60OPU-SOV (n = 6)	33.2 ± 4.2	1.3 ± 0.2	393.5 ± 3.8
D60SOV ⁴⁾ (n = 7)	51.6 ± 13.1	2.1 ± 0.3	399.6 ± 18.5

数値は平均値 ± 標準誤差

¹⁾ 胚生産終了後から受胎起点発情までの経過日数。

²⁾ 受胎に要したAIおよびETの実施回数。

³⁾ 胚生産の起点分娩から受胎起点発情までの経過日数に、黒毛和種牛の平均妊娠期間（285日）を加算した日数。

⁴⁾ 分娩後60日以内でSOVを開始した区で、起点分娩からSOV処理開始までの日数は平均52日。

表2に示した。胚生産後の受胎所要日数の平均値は、D30OPU-SOV (n = 7) が58.4日、D60OPU-SOV (n = 6) が33.2日、D60SOV (n = 7) が51.6日であった。受胎所要繁殖回数の平均値はD30OPU-SOVが2.1回、D60OPU-SOVが1.3回、D60SOVが2.1回であった。分娩間隔の平均値は、D30OPU-SOVが387.9日、D60OPU-SOVが393.5日、D60SOVが399.6日であった。

考 察

ドナー牛の年一産と胚生産との両立を企図する場合、分娩後の胚生産がいつから開始できるかが重要な要素となる。たとえ分娩後早期に胚生産を強行しても、移植可能胚が十分に確保されなければフィールド技術としての意味をなさない。我々はまず、胚生産を開始する分娩後の日数を、年一産を可能とする30日および60日に設定した¹⁾。そして、移植可能胚の安定的確保をねらい、従来のSOVによる体内胚生産に加え、OPUによる体外胚生産を併用するプログラムを考案し、移植可能胚の生産成績と胚生

産後の繁殖成績の両面から、技術評価を試みてきた。

今回の実験では、個体要因の影響⁴⁻⁶⁾を可能な限り取り除くため、同一ドナー牛に3つの手法を適用した成績を用いて検討した。胚生産の観点からは、ドナー牛1頭あたりの期待できる移植可能胚の総生産数が最も重要である。この総生産数については、それぞれの手法に統計的な差は認められなかったため、技術的安定性を“出現率”によって評価した。その結果、D30OPU-SOV区はD60OPU-SOV区と比べて安定度が低かった。この要因としては、供試牛の分娩後の発情回帰や初回排卵等は必ずしも確認していないため、生殖器の回復が十分ではない個体も含まれている可能性が推察された。有安ら¹²⁾は、分娩後52日目のERにおいて、自然哺乳中のドナー牛の方が分娩直後に親子分離したドナー牛よりも正常胚率が高い傾向にあり、分娩後早期の離乳は自然哺乳よりも子宮修復が遅れる傾向がある^{8, 14)}ことから、子宮の回復度がER成績に影響することを示唆している。したがって、逆に、技術的な安定性が推察されたD60OPU-SOV区では、分娩後の子宮の修復が

概ね40日前後で完了すること^{7, 8)}、卵巣回復と子宮回復が平行で惹起されること⁹⁾を反映した結果と考えられた。

SOV-ERにOPU-IVFを加えた効果については、D60OPU-SOV区とD60SOV区のSOV-ER成績の比較で検討を試みた。Mertonら¹⁰⁾は、OPU後のSOVでは発育過程にある卵胞のみが反応するため、結果的に変性卵や未受精卵が少なくなる可能性があるが、SOVに反応する卵胞数を減少させることも示唆している。今回の体内胚生産成績は、両区間に明らかな差が認められず、SOV前のOPUの効果は明瞭ではなかったが、平均形成黄体数、平均採取卵数はD60SOV区が多く、しかし平均良質胚率はD60OPU-SOV区が高かったことは、Mertonらの指摘と同じ傾向であった。また、D60OPU-SOV区で平均4.4個の体外胚を生産したものの、移植可能胚の総生産数は両区間で差がなかった。このことは、体外胚生産数のばらつきが大きかったことに加え、SOVへの反応に対するOPUの負の効果によるものと推察された。しかし、Hirataら¹¹⁾も、OPU後に新たに導出された卵胞波を利用した定時授精において55.6%の受胎率が得られ、発情排卵同期化率は100%と、OPUの卵巣リフレッシュ効果を示しており、SOV前のOPUの効果については、今後もさらに例数を加えて検証が必要である。

一方、もう一つの観点である年一産については、各試験区の分娩間隔はいずれも400日程度となった。ER後の発情回帰日数は、菅野ら¹⁵⁾の報告によると6~12日、また藤井ら¹⁶⁾は、推定黄体数とは関係なく、2~50日であったと述べており、個体差や飼養管理の影響が大きいと考えられる。したがって、極山ら¹³⁾はER後の受胎成績について、受胎所要日数は平均41.5日であり、早期受胎を図るためにはオブシンク法等を取り入れることが重要であると述べている。また、有安ら¹²⁾も黒毛和種を用いて分娩後62日目にERを行い、ER後9日目からオブシンク法を適用することで60%程度の年一産率を報告している。よって、ドナー牛の年一産を目標とする場合では、分娩後比較的早期の胚生産に加え、現場での

普及技術とするためには、胚生産後の積極的な繁殖管理を追加する必要性もあると考えられた。

以上のことから、分娩後30日もしくは60日にOPU-SOVを適用する場合、60日での適用によって、安定した胚生産成績が得られる可能性が示唆された。

参 考 文 献

- 1) 長谷川清寿ら. 島根県畜産技術センター研究報告, 42: 7-12. 2011.
- 2) 長谷川清寿ら. 島根県畜産技術センター研究報告, 40: 1-5. 2008.
- 3) 社団法人畜産技術協会. 胚の衛生的取り扱いマニュアル (IETS マニュアル第3版), 164-167. 東京. 2001.
- 4) 大谷ら. 日本畜産学会報, 78(2): 147-153. 2007.
- 5) J.S.Merton, et al. *Theriogenology*, 72: 885-893. 2009.
- 6) 中村 勝. 平成18年度石川県畜産総合センター年報, 35-36. 2006.
- 7) 小山 毅. 北海道獣医師会雑誌, 56: 10-15. 2011.
- 8) 居在家義昭ら. 中国農業試験場報告, B29: 17-23. 1986.
- 9) Hommeida A., et al. *Journal of Veterinary Medical Science*, 67: 1031-1035. 2005.
- 10) Merton J.S., et al. *Theriogenology*, 59: 651-674. 2003.
- 11) Toh-Ichi Hirata, et al. *Journal of Reproduction and Development*, 57: 613-619. 2011.
- 12) 有安亮代ら. 岡山県総合畜産センター研究報告, 14: 35-40. 2003.
- 13) 極山 太ら. 京都府畜産技術センター試験研究成績, 2: 42-46. 2005.
- 14) 居在家義昭ら. 中国農業試験場報告, B29: 9-16. 1986.
- 15) 菅野美樹夫ら. 福島県畜産試験場研究報告, 9: 1-4. 1999.
- 16) 藤井陽一ら. 山口県農林総合技術センター研究報告, 24: 1-5. 2009.