

## 2. GnRH を用いた卵胞波調節による FSH 皮下 1 回投与による 過剰排卵処理法の検討 (第 2 報)

研究開発第二課 倉田佳洋\* 河野仁 古賀健志 安川幸子\* 武平有理子 浦田博文\*\*

※ 現 奈良県家畜保健衛生所 ※※ 現 公益財団法人奈良県食肉公社

### 要 約

当県の参加している共同試験グループでは黒毛和種の採卵プログラムを従来 E2 で卵胞波調整していたが、第 1 報において GnRH による卵胞波調整が E2 と同等の成績が得られ、また CIDR 挿入時に PG 投与すると卵胞波調整効果が向上することが示唆された。今回は採卵プログラムの簡易化を検討し、CIDR 挿入時に PG を投与するが、CIDR 除去時の PG と AI 前日の GnRH 投与を省略したプログラムを試験区、省略しないものを対照区として、採卵成績等を比較した。試験区が黄体数 12、採卵総数 6.5、正常胚数 5.3、正常胚率 77.2%に対し、対照区 (16.8、12.5、10.8、84.8%) と試験区が対照区よりも低い成績であった。また卵質成績ではおいては A'ランクの胚数が試験区で 3.5、対照区で 8.0 と試験区が少ない結果となった。卵胞発育では AI 時の大卵胞の卵胞数は試験区で 7.5、対照区で 5.8 と大きな差はなかった。AI 翌日の排卵率については試験区が 86.7%、対照区が 92.2%と若干試験区が低い結果となった。更に PG 省略のみの影響を検討するため、試験 2 として AI 前日の GnRH 投与は省略せず定時的に排卵させ、CIDR 除去時の PG のみを省略したプログラムを試験区、省略しないものを対照区として、採卵成績等を比較した。採卵時黄体数で試験区が 17.5 と対照区 12.8 に対して多かったが、正常胚数 5.8、正常胚率 59.2%と対照区の 8.0、70.6%に比べて低い結果となった。卵質成績においても A'ランクの胚数が試験区で 1.8 と対照区の 5.8 に比べ少なく、C ランクにおいては試験区が 2.5 と対照区の 0 に対し多い結果となった。卵胞発育では AI 日において大卵胞の数が試験区は 13.8 個で対照区の 10.3 個と試験区が多い結果となった。AI 翌日の大卵胞の排卵率は試験区 78.3%、対照区 68.0%と試験区が高い成績となった。本県実施のデータのみからでは、SOV 処理プログラムにおける PG 投与の省略によって採卵成績や卵質が低下すると考えられた。また AI 前日の GnRH 投与は排卵率を安定させるため省略はしないほうがよいと思われ、簡易化は更なる検討が必要と考えられた

### 緒 言

ウシの体内胚生産において卵胞刺激ホルモン(以下 FSH とする)の漸減投与法による過剰排卵処理(以下 SOV とする)は注射回数が多く牛へはストレスとなり人へは作業負担がかかり、これらの軽減が長年の課題になっていた。近年、当県が参加する共同研究グループは生理食塩水を溶媒とした FSH 皮下 1 回投与法が漸減投与法と同等の採卵成績を得られることを報告した<sup>1,2,3)</sup>。

牛の性周期において、一性周期に 2~3 回の卵胞波が存在しており、卵胞波においてドミナント期の主席卵胞は、インヒビンを分泌し他の卵胞の発育を阻害していると考えられている。そのため、SOV 時に主席卵胞が存在すると採卵成績が低下させるとされている。共同試験グループでは従前はエストラジオール (E2) で卵胞波調節を行ってきたが、第一報において E2 に代わる卵胞波調節法として、ブセレリン酢酸塩 (GnRH) 投与について検討を行い、E2 の代わりに GnRH を用いても有効であることがわかっ

た。またプロジェステロン徐放剤（CIDR）挿入時にPGを投与すると卵胞波調整効果の向上が見られることがわかった。今回、SOVにおいて効率化を図るため第1報の試験2の試験2区を基にしてCIDR除去時のPGを投与しない簡易化プログラムについて検討した。

なお、本試験は7府県との共同研究として行っており、今報告は当県のデータのみの報告である。

## 試験1：CIDR除去時のPG投与及びAI前日のGnRH投与の省略による簡易化の検討 材料及び方法

### 1. 方法

発情および発情直後を避けて、膣内留置型プロジェステロン徐放剤（CIDR）を挿入し、同時にPGF2 $\alpha$ （エストラメイト：株式会社インターベット）3mlを投与した。CIDR挿入日を0日目として7日目午後16時にGnRH（イトレリン：あすか製薬株式会社）5 $\mu$ gを投与し、10日目午前9時に全区に生理食塩水50mlに溶解したFSH（アントリンR10：共立製薬株式会社）20AUを頸部皮下に1回投与した。12日目午前9時に全区CIDRを抜去し、対照区のみPGF2 $\alpha$ を3ml投与し13日目午後16時にGnRH10 $\mu$ gを投与した。14日目午後16時に定時AI、21日目午前9時に採卵した（図1）。

対照区：CIDR除去時PG 3ml投与、翌日の午後16時にGnRH10 $\mu$ g投与

試験区：CIDR除去のみ（PGとGnRHの投与なし）

	Day0	Day7	Day10	Day12	Day13	Day14	Day21
AM (9:30)	CIDR挿入 PG投与 (3ml)		FSH投与 20AU/50ml生食	全区：CIDR抜去 対照区：PG投与 (3ml) 試験区：PG投与 なし			採卵
PM (16:30)		GnRH 5 $\mu$ g投与			対照区： GnRH 10 $\mu$ g投与 試験区： GnRH 投与なし	TAI	

図1 採卵プログラム

### 2. 供試牛

当センターで繋養している黒毛和種経産牛2頭を2つのグループに分け各4回供試し、計8回採卵を行い、それぞれの採卵間隔は63日以上とした（表1）。

- ・グループA：試験区－対照区－対照区－試験区
- ・グループB：対照区－試験区－試験区－対照区

表 1 供試牛

牛番号	B201	W143
生年月日	H23.11.2	H19.10.4
産歴	2	4
最終分娩日	H28.1.17	H28.1.25
過去の正常胚数	3.0	4.7
グループ	A	B

### 3. 調査項目

採卵成績においては採卵時に採卵総数、正常胚数、変性卵数、未受精卵数、採卵時黄体数、遺残卵胞数を記録し、実体顕微鏡による形態学的な卵質調査を行った。正常卵の品質および変性胚、未受精卵の判定は「胚の衛生的取扱いマニュアル」の「胚の品質コード」に準じて行った<sup>4)</sup>。

また卵巣所見は CIDR 挿入日から 21 日目の採卵日まで毎日、超音波画像診断装置(日立メディコ 本体; ECHOPAL II、プローブ; EUP-033(7.5MH))により黄体数及び卵胞発育調査を行った。卵胞は直径により 10mm 以上を大卵胞、6~9mm を中卵胞、5mm 以下を小卵胞と区分して記録した。なお、供試数が少ないため統計処理については行わなかった。

## 結 果

採卵成績では試験区が黄体数 12、採卵総数 6.5、正常胚数 5.3、正常胚率 77.2%に対し、対照区が黄体数 16.8、採卵総数 12.5、正常胚数 10.8、正常胚率 84.8%と試験区が対照区よりも低い成績であった(表 2)。また卵質成績ではおいては A'ランクの胚数が試験区で 3.5、対照区で 8.0 と試験区が少ない結果となった(表 3)。

卵胞発育では AI 時の大卵胞の卵胞数は試験区で 7.5、対照区で 5.8 と大きな差はなかった(図 2)。AI 翌日の排卵率については試験区が 86.7%、対照区が 92.2%と若干試験区が低い結果となった(表 4)。

表 2 各区採卵成績 (平均 n=4)

	黄体数	遺残卵胞数	採卵総数	正常胚数	変性胚数	未受精卵数	正常胚率
試験区	12.0	4.5	6.5	5.3	0	1.3	77.2%
対照区	16.8	5.3	12.5	10.8	0.8	0.8	84.8%

表 3 各区卵質成績 (平均 n=4)

	A	A'	A+A'	B	C
試験区	1.3	3.5	4.8	0.3	0.3
対照区	1.3	8.0	9.3	1.3	0.5

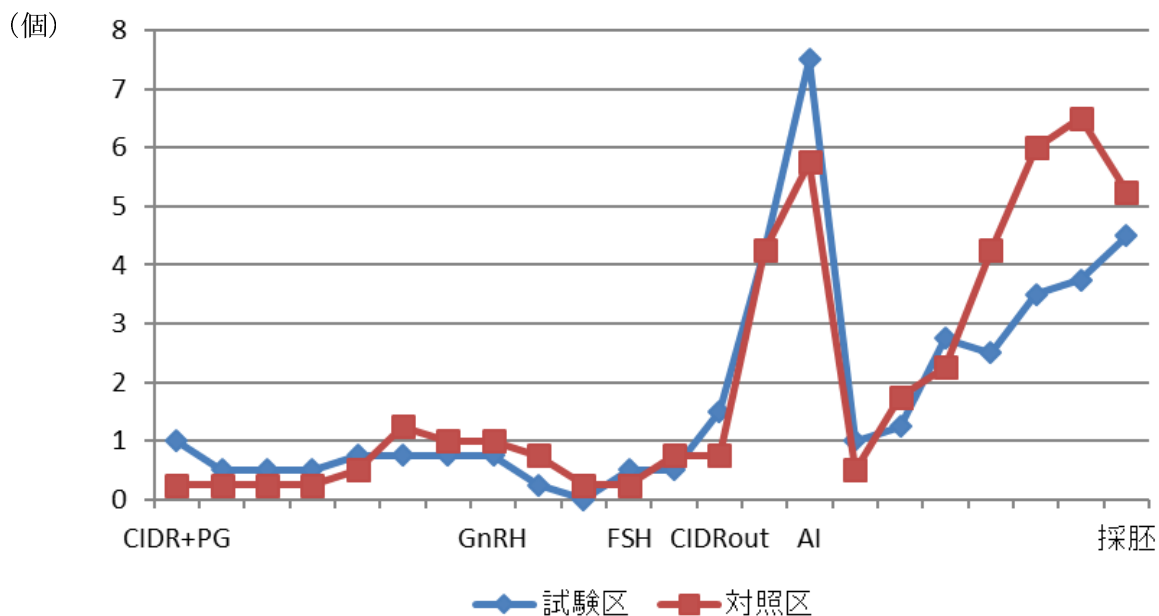


図 2 大卵胞の卵胞数の推移

表 4 AI 時と AI 翌日の大卵胞数と排卵率 (平均 n=4)

	大卵胞数		大卵胞 排卵率
	AI 時	AI 翌日	
試験区	7.5	1	86.7%
対照区	5.8	0.5	92.2%

## 試験 2 : CIDR除去時のPG投与の省略による検討

### 材料及び方法

#### 1. 方法

試験 1 では PG と GnRH 投与の両方の省略による簡易化であったが、採胚成績・卵質成績で試験区が低い成績であったことから PG の省略による影響か GnRH の省略の影響のどちらによるものか不明であった。しかし AI 翌日の排卵率が試験区で若干低いことから、排卵時期のずれが起きている可能性も考えられた。これらのことから、GnRH の投与は省略せずに排卵を定時にさせ、PG 投与の省略に絞って検討を行った。

発情周期が明らかな牛の発情および発情後 2 日以内を避けて、膈内留置型プロゲステロン徐放剤 (CIDR) を膈内に挿入し、同時に PGF2 $\alpha$  (エストラメイト : 株式会社インターベット) 3ml を投与

した。CIDR 挿入日を 0 日目として 7 日目午後 5 時に GnRH（イトレリン：あすか製薬株式会社）5 $\mu$ g を投与し、10 日目午前 9 時に全区に生理食塩水 50ml に溶解した FSH（アントリン R10：共立製薬株式会社）20AU を頸部皮下に 1 回投与した。12 日目午前 9 時に全区 CIDR を抜去し、対照区のみ PGF2 $\alpha$  を 3ml 投与し 13 日目午後 5 時に全区 GnRH10 $\mu$ g を投与した。14 日目午後 5 時に定時 AI、21 日目午前 9 時に採卵した（図 3）。

対照区：CIDR 除去時 PG 3ml 投与

試験区：CIDR 除去のみ（PG の投与なし）

	Day0	Day7	Day10	Day12	Day13	Day14	Day21
AM (9:30)	CIDR挿入 PG投与(3ml)		FSH投与 20AU/50ml生食	CIDR抜去 対照区：PG投与 (3ml) 試験区：PG投与 なし			採卵
PM (16:30)		GnRH 5 $\mu$ g投与			全区 GnRH 10 $\mu$ g投与	TAI	

図 3 採卵プログラム

## 2. 供試牛

当センターで繋養している黒毛和種経産牛 2 頭を試験区→対照区→対照区→試験区の順に各 4 回供試し、計 8 回採卵を行い、それぞれの採卵間隔は 63 日以上とした（表 5）。

※本来、供試牛 3 頭とする予定の 1 頭で、対照区→試験区→試験区→対照区の順に供試した牛 1 頭については試験途中で採卵不適となったため、今回のデータはこの 2 頭のみとなった。

表 5 供試牛

牛番号	B156	B158
生年月日	H18.6.14	H18.7.19
産歴	5	4
最終分娩日	H28.10.26	H26.2.12
過去の正常胚数	7.9	14.7

## 3. 調査項目

採卵成績においては採卵時に採卵総数、正常胚数、変性卵数、未受精卵数、採卵時黄体数、遺残卵胞数を記録し、実体顕微鏡による形態学的な卵質調査を行った。正常卵の品質および変性胚、未受精卵の判定は「胚の衛生的取扱いマニュアル」の「胚の品質コード」に準じて行った<sup>4)</sup>。

また卵巣所見は CIDR 挿入日と 7 日目の GnRH 投与日および 10 日目の FSH 投与日から 21 日目の採卵日までは 24 時間毎に超音波画像診断装置（日立メディコ 本体；ECHOPAL II、プローブ；EUP-033(7.5MH)）により黄体数及び卵胞発育調査を行った。卵胞は直径により 10mm 以上を大卵胞、

6～9mm を中卵胞、5mm 以下を小卵胞と区分して記録した。なお、供試数が少ないため統計処理については行わなかった。

## 結 果

採胚成績では黄体数で試験区が 17.5 と対照区 12.8 に対して多かったが、正常胚数 5.8、正常胚率 59.2%と対照区の 8.0、70.6%に比べて低い結果となった（表 6）。また変性胚数と未受精卵数は試験区で 3.5、2.8 と対照区の 1.5、1.5 と大きな差はなかったが、各個体での採卵結果を見ると試験区で多い傾向が見られた。

卵質成績においても A'ランクの胚数が試験区で 1.8 と対照区の 5.8 に比べ少なく、C ランクにおいては試験区が 2.5 と対照区の 0 に対し多い結果となった。（表 7）。

卵胞発育では AI 日において大卵胞の数が試験区は 13.8 個で対照区の 10.3 個と試験区が多い結果となった（図 4）。AI 翌日の大卵胞の排卵率は試験区 78.3%、対照区 68.0%と試験区が高い成績となった（表 8）。

表 6 各区採胚成績（平均 n=4）

	黄体数	遺残卵胞数	採胚総数	正常胚数	変性胚数	未受精卵数	正常胚率
試験区	17.5	9.5	12.0	5.8	3.5	2.8	59.2%
対照区	12.8	10.8	11.5	8.0	1.5	1.5	70.6%

表 7 試験区別卵質成績（平均 n=4）

試験区	A	A'	A+A'	B	C
試験区	0.5	1.8	2.3	1.0	2.5
対照区	1.5	5.8	7.3	1.3	0

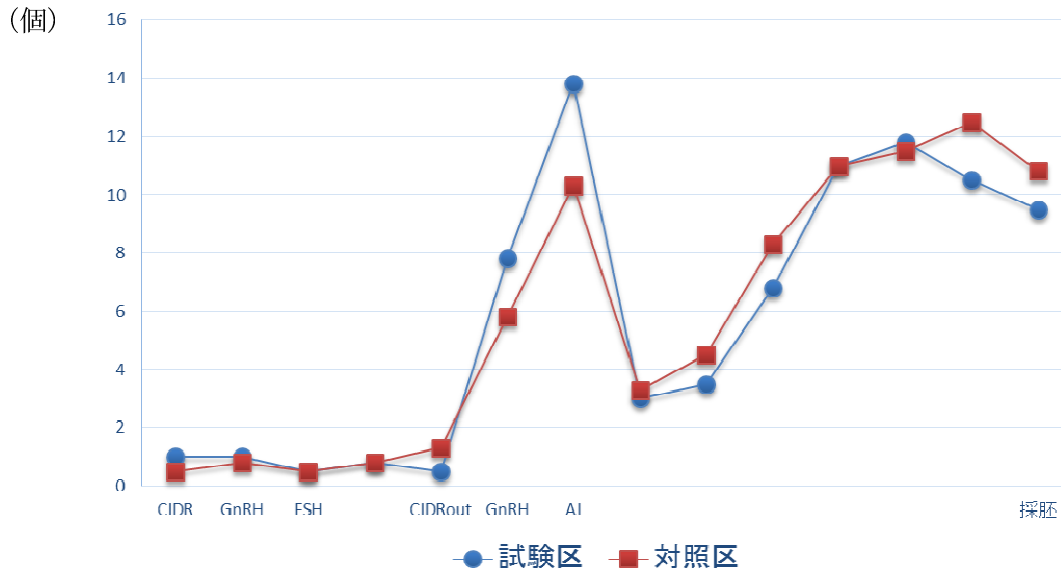


図4 大卵胞数の推移

表8 AI時とAI翌日の大卵胞数と排卵率 (平均 n=4)

	大卵胞数		大卵胞 排卵率
	AI時	AI翌日	
試験区	13.8	3	78.3%
対照区	10.3	3.3	68.0%

## 考 察

黒毛和種の SOV 処理時に大卵胞が存在していると採胚成績が低下することから、当県が参加する共同研究グループでは卵胞波の調節を E2 で行ってきた。第 1 報では、卵胞波調整において GnRH が E2 との代替えとして用いられることが判明し、また CIDR 挿入時に PG を投与することにより卵胞波調整効果が向上することが示唆された。このことから第 1 報の試験 2 の試験 2 区をベースにして、今回の試験 1 では CIDR 除去時の PG と AI 前日の GnRH を投与しない簡易化法について検討した。卵胞波調整において GnRH を用いた場合、投与時に GnRH に反応できる卵胞が存在すると排卵が起き、黄体が形成される。しかしこの過剰排卵処理法では GnRH 投与時 CIDR によるプロジェステロン濃度が高いため、黄体形成不全が生じるか、または形成された黄体の機能は弱いと推測される<sup>5)</sup>。試験 1 では CIDR 除去時の PG と AI 前日の GnRH を投与しない試験区で採胚成績が対照区よりも低く、卵質成績も低い結果となった。また大卵胞数の推移は試験区と対照区では大きな差が見られなかったが、排卵率は若干試験区が低かった。排卵率に差があったことから、GnRH の省略による排卵のずれによる採胚成績や卵質成績の影響が考えられた。しかし、試験区では CIDR 挿入後 7 日目の GnRH 投与により黄体が形成され AI 翌日まで確認された個体 (B201) がいたことから、黄体が存在したことによる採胚成績の低下も考えられた。

これらのことから、試験 2 では GnRH を省略せず排卵を定時化させ、PG の省略のみによる簡易化を検討した。AI 翌日の排卵率では試験区が対照区よりも高い結果となったことから、排卵のずれは少ないと考えられた。卵胞発育では各区とも同様の推移が見られたが、採胚成績の正常胚数で試験区が少なく、また変性胚数及び未受精卵数で試験区が多い傾向で大きな差は見られなかった。試験 1 同様、試験 2 の試験区でも CIDR 挿入後 7 日目の GnRH 投与により黄体が形成された個体 (B158) がおり、対照区の時よりも採卵成績が低下していた。卵胞の発育は FSH 等のホルモンによってされるが、黄体が存在した場合はプロゲステロンの負のフィードバックによって GnRH の分泌が抑制され、下垂体の LH と FSH の分泌が減少する。今回、黄体の存在した個体では投与による外因性の FSH での卵胞発育が主で、内因性の FSH による作用は少なかった可能性が考えられた。このため採胚成績や卵質成績に影響を与えたとも考えられた。

試験 1 及び試験 2 とも本県実施のデータのみでは採胚成績や卵質成績で試験区が低い成績だったことから、SOV 処理プログラムにおける PG 投与の省略による簡易化は、今後さらに例数を増やして検討する必要があると考えられた。

## 参考文献

- 1) 西野 治ら：卵胞刺激ホルモン製剤1回投与による黒毛和種の過剰排卵処理の簡易化の検討 奈良県畜産技術センター研究報告 第40号 1-5 (2015)
- 2) 平泉真吾ら：生理食塩水を溶媒とした卵胞刺激ホルモン (FSH) 皮下 1 回投与法により牛の過剰排卵処理が可能である 第24回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会講演要旨 52-53
- 3) 平泉真吾ら：Superovulatory response in Japanese Black cows receiving a single subcutaneous porcine FSH treatment or six intramuscular treatments over three days Theriogenology Vol.83 No.4 466-473(2015)
- 4) 社団法人畜産技術協会：胚の衛生的取り扱いマニュアル第 3 版(2001)
- 5) 水木若菜ら：黒毛和種における過剰排卵処理の効率化および簡易化に向けた取り組み 日本胚移植学雑誌 Vol.40 No.2 33-39(2018)