

1. 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 1 報）

研究開発第二課 倉田佳洋* 中井里香** 松田浩典 古賀健志 億正樹**

* 現 奈良県家畜保健衛生所 ** 現 奈良県畜産課

要 約

黒毛和種の過剰排卵処理における卵胞波調整において、エストラジオール（E2）の代わりに GnRH による方法を試験 1 として検討した。採胚プログラムにおいて GnRH を 10 μ g 投与（試験 1 区）と 5 μ g 投与（試験 2 区）と従来から用いていた E2 による卵胞波調整による対照区を、採胚成績や卵胞数の推移から比較した。採胚成績では試験 2 区が採卵総数 15.3、正常胚数 10.3 と、試験 1 区（8, 3.3）、対照区（10, 6）よりも高い成績となった。卵胞数の推移では各区とも同様の推移を示したが、AI 時の 6mm 以上の卵胞数が試験 1 区で 38.7 個、試験 2 区で 39.7 個と対照区の 31.4 個よりも多い結果となった。AI 翌日では試験 2 区が 17.3 個となり、試験 1 区の 24 個よりも 6mm 以上の卵胞の数が少なく排卵数が試験 2 区で多い結果となった。この結果から GnRH による卵胞波調整は GnRH を 5 μ g 投与することによって E2 による卵胞波調整と同等の採胚成績が得られると考えられた。

また試験 2 では CIDR 挿入時の PG 投与による卵胞波調整効果を検討するため、GnRH 5 μ g 投与による卵胞波調整した採胚プログラムを試験 1 区、1 区に更に CIDR 挿入時に PG 投与したものを試験 2 区、PG 及び GnRH を投与しないものを試験 3 区として、採胚成績等を比較した。採胚成績では試験 1 区で黄体数、採卵総数、正常胚数、変性胚数及び未受精卵数の項目で他の試験区よりも多い成績となった。CIDR 挿入後 7 日目（Day7）における GnRH 投与による大卵胞への影響として、Day7 に観察された大卵胞の排卵率が試験 2 区では 100%だったのに対し、試験 1 区で 50%、試験 3 区で 0%であった。これらの結果から、当県データのみでは CIDR 挿入時の PG 投与は採胚成績への影響は認められなかったが、卵胞波調整効果の向上が示唆された。

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）の漸減投与方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黒毛和種において生理食塩水を溶媒とした FSH 皮下 1 回投与方法が漸減投与方法と同等の採胚成績を得られることを報告した^{1,2,3}。

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胚成績が低下につながることから、共同研究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、欧州では E2 の使用が禁止となり、国内においても今後は不透明となっている。そのため、黒毛和種の SOV 時において E2 に代わる卵胞波調節法として、プセリリン酢酸塩（GnRH）投与について検討を行った。

なお、本試験は 6 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：卵胞波調整のためのGnRH投与量の検討

材料及び方法

1. 方法

発情および発情直後を避けて、E2 カプセルを除去した膣内留置型プロジェステロン・エストロジェン配合剤（PRID TEIZO：あすか製薬株式会社）を膣内に挿入し、PRID 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）10 μ gを投与したものを試験1区、5 μ gを投与したものを試験2区とした。10日目午前10時に生理食塩水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、12日目午前10時にPRIDを抜去しPG（エストラメイト：株式会社インターベット）投与、13日目午後16時にGnRH10 μ gを投与し、14日目午後16時に定時AI、21日目午前10時に採卵した。対照区はE2カプセルを除去せずにPRIDを挿入し、4日目に生理食塩水50mlに溶解したFSH20AUを皮下1回投与とPGを投与、6日目にPRID抜去し、7日目午後16時にGnRH投与、8日目午後16時にAI、15日目に採卵を行った（図1）。

試験区

	Day0	Day7	Day10	Day12	Day13	Day14	Day21
AM (9:30)	PRID挿入 (E2カプセル無)		FSH20AU/50ml 1回投与	PRID除去 PG投与			採卵
PM (16:30)		GnRH投与 10 μ g（試験1区） 5 μ g（試験2区）			GnRH投与 10 μ g	TAI	

対照区

	Day0	Day4	Day6	Day7	Day8	Day15
AM (9:30)	PRID挿入 (E2カプセル有)	FSH20AU/50ml 1回投与 PG投与	PRID除去			採卵
PM (16:30)				GnRH投与 10 μ g	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3頭を各3回供試し、試験区を各区反転させるラテン方格法により配置し計9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）。

表 1 供試牛

牛番号	W143	B159	B129
生年月日	H19.10.4	H18.7.30	H15.7.7
産歴	3	4	5
最終分娩日	H26.1.12	H26.1.23	H26.1.28
過去の正常胚数	4.9	8.6	10.4
試験 1 回目	試験 1 区	試験 2 区	対照区
試験 2 回目	試験 2 区	対照区	試験 1 区
試験 3 回目	対照区	試験 1 区	試験 2 区

3. 調査項目

採胚成績においては採胚時に採卵総数、正常胚数、変性卵数、未受精卵数、採胚時黄体数、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⁴⁾。

また卵巣所見は PRID 挿入日と、試験区では挿入後 7 日目の GnRH 投与から 21 日目の採胚日まで、対照区では PRID 挿入後 4 日目の SOV からと 15 日目の採胚まで 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 6mm 以上と 6mm 未満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

採胚成績においては黄体数では各試験区で大きな差は見られなかったが、採卵総数、正常胚数、正常胚率の項目で試験 2 区が 15.3 個、10.3 個、64.9% となり、試験 1 区（8 個、3.3 個、27.8%）及び対照区（10 個、6 個、59.4%）より良好な成績となった（表 2）。変性胚数と未受精卵数は各試験区で顕著な差は見られなかった。

卵質成績においても A+A' ランクの受精胚が試験 2 区で 5.3 個となり、試験 1 区の 1.7 個及び対照区の 2.3 個よりも A+A' の個数と正常胚中の割合において多い結果となった（表 3）。

卵胞発育では各区とも同様の推移を示したが、AI 直前における 6mm 以上の卵胞数が試験 1 区で 38.7 個、試験 2 区で 39.7 個と対照区の 31.4 個よりも多い傾向となった（図 2）。また AI 翌日における 6mm 以上の卵胞の排卵数では、試験 1 区で 14.7 個、試験 2 区で 22.4 個排卵し、排卵数が試験 2 区で多い結果となった。

表2 試験区別採胚成績 (平均 n=3)

試験区	黄体数	遺残卵胞数	採卵総数	正常胚数	変性胚数	未授精卵数	正常胚率
試験1区	15.7	7.3	8	3.3	1	3.7	27.8%
試験2区	15	6.7	15.3	10.3	2	3	64.9%
対照区	14.3	12.3	10	6	2	2.3	59.4%

表3 試験区別卵質成績 (平均 n=3)

試験区	A	A'	A+A'	B	C
試験1区	0.7	1	1.7	1	0.7
試験2区	2	3.3	5.3	3.3	1.7
対照区	0	2.3	2.3	2.3	1.3

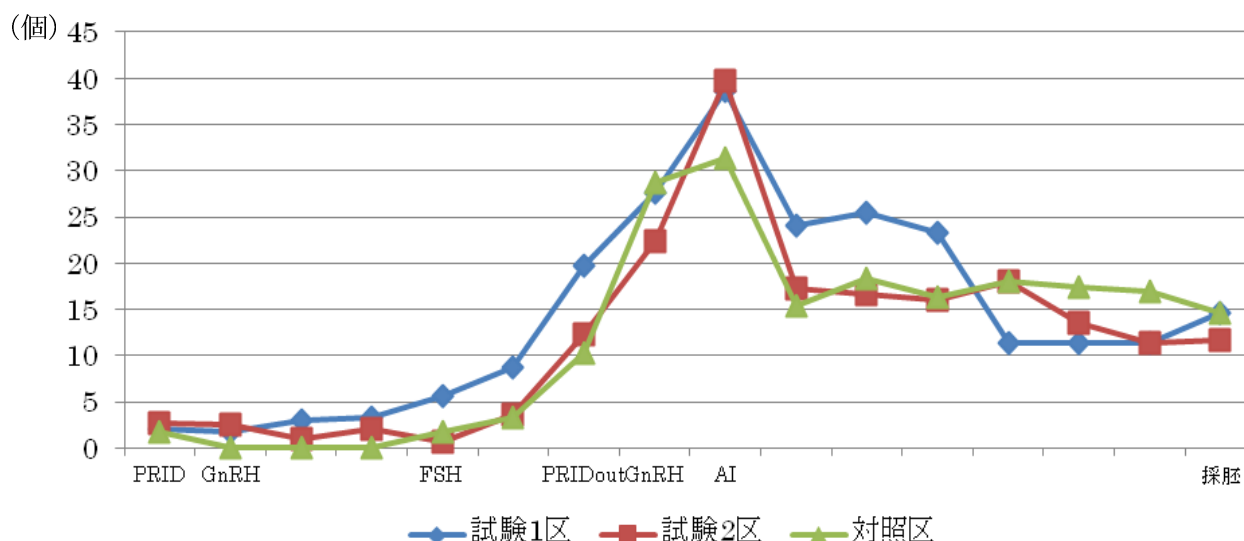


図2 6mm以上の卵胞数の推移

試験2：卵胞波調整効果向上のためのプロジェステロン徐放剤挿入時のPG投与の検討 材料及び方法

1. 方法

試験1においてGnRHの投与量を5 μ gにしたところ採卵成績が良好だったことから、GnRHはSOVにおいてE2の代わりの卵胞波調整方法として可能であることが示唆された。またGnRHの卵胞波調節にPGの投与を組み合わせることにより、GnRH投与による主席卵胞の排卵率が向上するという報告^{5,6)}があることから、卵胞波調整効果が向上されることを目的として、黒毛和種の採卵においてCIDR挿入時のPG投与の検討を行った。発情および発情直後を避けて、CIDRを膈内に挿入し、試験2区は同時にPGF2 α (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

て試験 1 区と 2 区は 7 日目午後に GnRH（イトレリン：あすか製薬株式会社）5 μ g を投与し、10 日目午前中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、12 日目午前に CIDR を抜去し PGF2 α を 3ml 投与、13 日目午後に GnRH10 μ g を投与し、14 日目午後に定時 AI、21 日目午前に採胎した（図 3）。

試験 1 区：CIDR 挿入後、7.5 日目に GnRH 5 μ g 投与

試験 2 区：CIDR 挿入時 PGF2 α 3ml 投与、7.5 日目に GnRH 5 μ g 投与

試験 3 区：CIDR 挿入のみ（挿入時の PGF2 α 、7.5 日目の GnRH 投与なし）

	Day0	Day7	Day10	Day12	Day13	Day14	Day21
AM (9:30)	全区：CIDR挿入 2区：PG投与 (3ml)		全区：FSH投与 20AU/50ml生食	全区：CIDR 抜去 PG投与(3ml)			採胎
PM (16:30)		1区, 2区： GnRH 5 μ g投与			全区 GnRH 10 μ g投与	TAI	

図 3 採胎プログラム

2. 供試牛

当センターで繁養している黒毛和種経産牛 3 頭を各 3 回供試し、試験区を各区反転させるラテン方格法により配置し計 9 回採胎を行い、それぞれの採胎間隔は 63 日以上とした（表 4）。

表 4 供試牛

牛番号	B184	B174	B192
生年月日	H19.10.4	H18.7.30	H15.7.7
産歴	3	3	2
最終分娩日	H26.12.26	H27.2.28	H27.2.15
過去の正常胚数	6.6	3.8	3.0
試験 1 回目	試験 1 区	試験 2 区	試験 3 区
試験 2 回目	試験 2 区	試験 3 区	試験 1 区
試験 3 回目	試験 3 区	試験 1 区	試験 2 区

3. 調査項目

採胚成績においては採胚時に採卵総数、正常胚数、変性胚数、未受精卵数、採胚時黄体数、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⁴⁾。

また卵巣所見は CIDR 挿入日から 21 日目の採胚日まで、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

採胚成績においては 黄体数、採卵総数、正常胚数、変性胚数、未受精卵数の項目で試験 1 区が 15.0 個、12.7 個、7.7 個、2.7 個、2.3 個と試験 2 区（9.7 個、6.0 個、5.3 個、0.7 個、0 個）及び試験 3 区（9.3 個、1.7 個、4.3 個、3.7 個、0.3 個、0.3 個）よりも多い成績となった（表 5）。正常胚率では試験 2 区 92.6%、試験 3 区 93.9% となり試験 1 区の 83.3% よりも高い結果であった。

卵質成績においても各ランクの胚数とも試験 1 区が多く、ついで試験 2 区、対照区の順となった。（表 6）。

卵胞発育では AI 日において 6mm 以上の中・大卵胞の数が試験 1 区は 26 個で試験 2 区の 15.7 個、試験 3 区の 12.7 個に比べ、多い結果となった（図 4）。

また Day7 における GnRH 投与による大卵胞への影響として、Day7 と Day10 の FSH 投与時の大卵胞の観察頭数を調べたところ、試験 2 区では Day7 で 3 頭に大卵胞が観察されたが、Day10 では全頭とも大卵胞が消失していた。一方、試験 1 区と試験 3 区では Day7 で各区 2 頭に大卵胞が観察されたが、Day10 では試験 1 区で 1 頭消失し、試験 3 区では 2 頭とも消失しなかった（表 7）。

表 5 試験区別採胚成績（平均 n=3）

試験区	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 1 区	15.0	3.3	12.7	7.7	2.7	2.3	83.3%
試験 2 区	9.7	2.7	6.0	5.3	0.7	0	92.6%
試験 3 区	9.3	1.7	4.3	3.7	0.3	0.3	93.9%

表 6 試験区別卵質成績（平均 n=3）

試験区	A	A'	A+A'	B	C
試験 1 区	1.3	4	5.3	1.7	0.7
試験 2 区	0.7	3.7	4.3	1	0
試験 3 区	0.3	3	3.3	0.3	0

表7 Day7 GnRH 投与による大卵胞への影響 (平均 n=3)

試験区	大卵胞観察頭数		大卵胞排卵率
	Day7 GnRH 投与時	Day10 FSH 投与時	
試験1区	2	1	50%
試験2区	3	0	100%
試験3区	2	2	0%

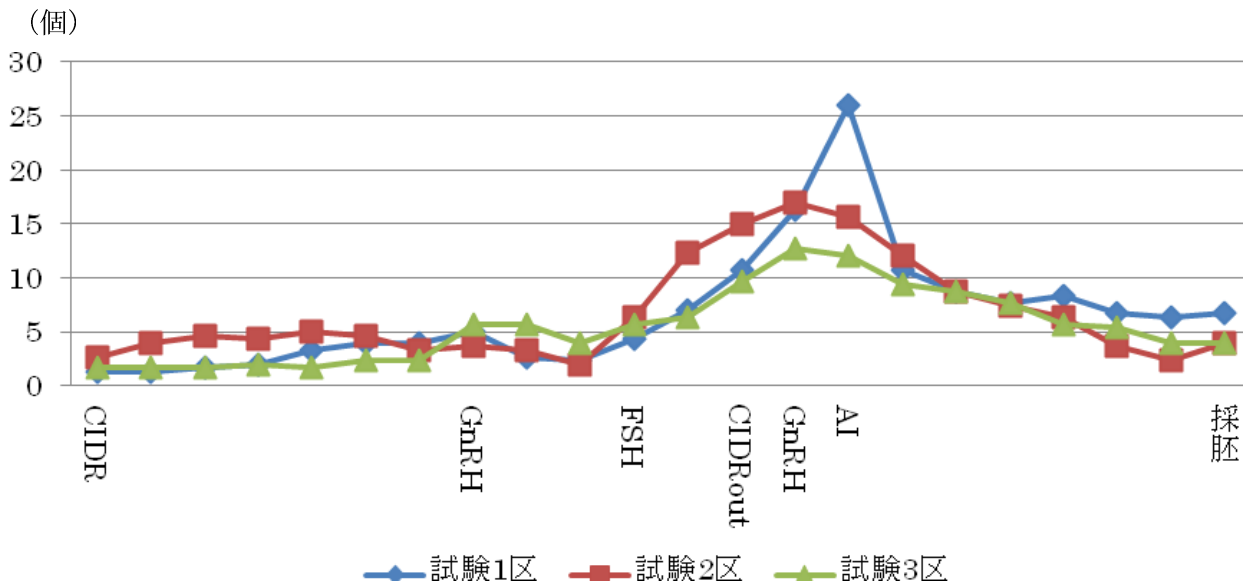


図4 6mm以上の卵胞数の推移

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。本試験では、卵胞波調整が GnRH でも可能かを調べ、試験 1 では卵胞波調整のための GnRH 投与量について検討を行った。GnRH を Day7 で 5 μ g 投与した試験 2 区で採卵総数と正常胚数及び卵質成績で他の区よりも良好な成績であることから、GnRH による卵胞波調整は 5 μ g 投与した試験 2 区で E2 による卵胞波調整と同等以上の効果を示す傾向が示唆された。また 6mm 以上の卵胞発育推移でも試験 2 区が他の区よりも AI 時における卵胞数で、他の区よりも多く観察され、また AI 翌日の卵胞数も試験 2 区で大きく減少していることから、卵胞の発育及び排卵がされており、GnRH の投与量は 5 μ g が適量と考えられた。

卵胞発育推移で試験 1 区は試験 2 区よりも AI 翌日の 6mm 以上の卵胞の観察数が減っていなかったことから、試験 2 区よりも排卵数が少ない傾向であった。GnRH の投与による下垂体からの LH の一過性の過剰な放出は下垂体内の LH が一時的に枯渇状態になる可能性があると言われて⁷⁾。試験 1 区は GnRH の投与量が 10 μ g と試験 2 区の倍量であり、今回用いた GnRH である酢酸ブセレリンはアク

チング時間が長い。また卵胞波調整のための GnRH 投与から AI 前日の排卵同期化のための再度の GnRH 投与まで 6 日間と短いことから、その間に下垂体での LH の十分な蓄積ができず、LH の放出量不足のために排卵が減少し、採卵総数や正常胚数で他の区よりも低い成績となった可能性が考えられた。

試験 2 では試験 1 で SOV 処理のための卵胞波調整に GnRH は有効と考えられたので、更なる卵胞波調整効果向上のために CIDR 挿入時の PG 投与の検討を行った。これは卵巢に黄体が存在した際に、事前に退行させることによる物理的な卵巢内の卵胞発育スペースを確保するとともに、卵胞波調整のための GnRH による排卵率の向上を目的として行った。採胚成績及び卵質成績では正常胚率以外、全体的に試験 1 区が他の区よりも高い成績となった。これは試験 1 区において試験牛の 1 頭における成績が突出していたために試験 1 区の成績が底上げされたと考えられた。試験 1 区では変性卵数と未受精卵数が他の区よりも多かった結果、正常胚率で試験 2 区と試験 3 区が高い結果となっている。卵胞発育推移においても試験 1 区で AI 時の 6mm 以上の卵胞数が 26.0 と多く、AI 翌日も卵胞数が 10.7 と他の区よりも減少しており、他の試験区よりも良好な卵胞推移と考えられた。しかし、Day7 の GnRH 投与の大卵胞の影響では、CIDR 挿入時に PG 投与しない試験 1 区が 2 頭のうち 1 頭のみ排卵したことに対し、PG 投与した試験 2 区で 3 頭とも排卵したことから、CIDR 挿入時の PG 投与による効果が考えられた。

今回の試験から SOV 処理における卵胞波調整は E2 の代わりに GnRH を用いても有効であり、その投与量は 5 μ g が適当と考えられた。CIDR 挿入時の PG 投与による採胚成績や卵質成績の向上は本県実施のデータでは見られなかったが、GnRH の卵胞波調整効果の向上については PG 投与の効果が示唆された。採胚成績や卵質成績について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る。

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) J.A.Smallら：Effects of progesterone presynchronization and eCG on pregnancy rates to GnRH-based, timed-AI in beef cattle Theriogenology Vol.71 No.4 698-706(2009)
- 6) 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)
- 7) 億正樹ら：受胎率向上のための前後処置法の検討 奈良県畜産技術センター研究報告 第30号 1-7 (2004)