

1. 受精卵移植牛へのヒト及びウマ絨毛性性腺刺激ホルモン投与による黄体賦活効果と受胎率向上

研究開発第二課 倉田佳洋 藤原朋子 赤池勝 朝倉康夫

要約

自然発情または同期化処置を行ったホルスタイン育成牛に受精卵移植（ET）を行った直後に、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（hCG）1500 IU またはウマ絨毛性性腺刺激ホルモン（eCG）1000 IU を投与し、ET 直後と発情後 14 日目の血中プロゲステロン濃度（P 値）を測定し、受胎率と P 値及び ET 当日の直腸検査による卵巣の形態について、無処置区のものと比較した。受胎率は対照区 48.9%、hCG 区 47.9%、eCG 区 44.2% と対照区と hCG 区は差がみられなかったが、eCG 区は他の区と比べ低い傾向となった。P 値は hCG 区、eCG 区とも対照区より ET 直後から 14 日目への上昇幅が高い傾向であった。ET 前の黄体確認時の黄体の短径で比較すると、15mm 以上の黄体よりも 15mm 未満の黄体で全区の受胎率が高く、黄体賦活効果として P 値の上昇幅は hCG 区および eCG 区は対照区と比べ高い傾向であった。

緒言

近年、体内新鮮卵・体内凍結卵の国内の受胎率の推移はほとんど変動がなく¹⁾、受胎率向上は依然として課題となっている。その要因としては受胎牛と供胎牛の発情周期の一致や子宮疾患の有無、栄養状態、黄体の状態、移植技術、受精卵の品質等が関係しているが、特に受胎牛の黄体からの血中プロゲステロン濃度の重要性が指摘されている²⁾。

hCG・eCG はその黄体形成ホルモン（LH）様作用及び卵胞刺激ホルモン（FSH）様作用により、黄体機能が賦活され、ET 受胎率が向上することが報告されている^{2) 3) 4) 5) 6) 7)}。しかし、それぞれの効果の比較報告は数が少ない。そこで、われわれは移植直後のホルスタイン受胎牛に hCG・eCG を投与し、黄体機能賦活効果および ET 受胎率向上効果を検討した。

材料及び方法

（1）供試牛

受胎牛に自然発情または同期化処置を行った 12～18 ヶ月齢のホルスタイン未経産牛延べ 138 頭を用いた。

（2）試験区分

試験区は hCG 区、eCG 区、対照区とし受胎牛を無作為に各区に区分した。胚の移植は受胎牛の発情日を 0 日目としたときに、7 日目または 8 日目に行った。hCG 区は移植直後に hCG（ゲストロン 1500：共立製薬）1,500 IU を腰部筋肉内に投与し、eCG 区は移植直後に eCG（動物用セロトロピン：あすか製薬）1,000 IU を腰部筋肉内に投与し、対照区は無投与区とした（表 1）。また不受胎の場合、移植は 2 回まで行い 2 回目の移植は 1 回目と異なる試験区を配置した。

表 1 試験区分

試験区	延べ頭数	処理方法
hCG 区	48	胚移植直後に hCG 1,500 単位投与
eCG 区	45	胚移植直後に eCG 1,000 単位投与
対照区	45	無投与（対照区）

(3) 発情同期化処置

発情同期化は PG（ダルマジン：川崎三鷹製薬）+E2（動物用ギナンドール：日本全薬工業もしくはエストラジオール注「KS」：共立製薬）、CIDR（イージーブリード：家畜改良事業団）+PG+E2、Flex synch⁸⁾ の 3 種類の処置を行った。

(4) 移植胚

新鮮又は凍結の黒毛和種生体回収胚で、新鮮胚では A ランク（正常な発育ステージで、輪郭が明瞭、色調も正常、ほとんど変性部位無し：Excellent）、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、一部突起した細胞あるいは不均整が見られる。細胞の変性は 10% 以下有り：Good）、B ランク（正常な発育ステージで、一部突起した細胞あるいは不均整がやや目立つが、変性部位が 10~30% 以下有り：Fair）の 3 ランクの胚を選別し、凍結胚では A ランクと A' ランクの胚を選別し、このうち後期桑実胚（CM）～拡張胚盤胞（ExBL）を用いた。

(5) 移植方法

胚の移植は、受胚牛を柵場に保定し直腸内の糞を除去し、尾を保定し、外陰部を清拭しアルコールで消毒した後、移植器（ノースガン式移植器：富士平工業製もしくはモー1号：ミサワ医科工業）にシース管カバーをかけて外子宮口まで挿入し、そこでシース管カバーを破って頸管経由法により非外科的に黄体側の子宮角に 1 胚移植した。

(6) 採血及び処理法

全ての試験区で、受胚牛の尾静脈から 21G の採血針を用いて真空採血管（ベノジェクト II 分離剤入り）に移植直後と発情 14 日目の計 2 回採血し、37℃ で 1h 以上静置後、3000rpm、10min で遠心分離し、分離した血清を -30℃ で P 値の測定まで凍結保存した。

(7) 調査項目

① 受胚牛の記録

受胚牛の移植前の触診による直腸検査所見において黄体の大きさを調べ、短径が 15mm 未満であれば S、15mm 以上であれば L とした。

② 血中 P 値

血清中の P 値の測定は各試験区より受胎群と不受胎群がほぼ同数になるよう 22~24 頭ずつ抽出して CLIA 法で測定した。

③ 受胎率

妊娠診断は発情後 28 日目~35 日目に直腸壁から超音波診断装置（本多電子社製；HS-101V、直腸用 50mm リニアプローブ；HLV-155(5.0MHz)）を用いて調査した。

(8) 統計処理

受胎率は χ^2 検定を用いて検定した。また血中P値の比較は、分散分析およびSteel-Dwass法による多重比較検定を用いて有意差検定を行い、危険率5%未満 ($P<0.05$) を有意差有りと判定した。

結 果

受胎率は対照区が48.9%、hCG区が47.9%、eCG区では44.2%と有意差はみられなかったが他群と比べ低い傾向となった(表2)。また流産はhCG区2頭、eCG区1頭、対照区で3頭認められた。

表2 各試験区の受胎率

試験区	受胎数/移植頭数	受胎率
hCG区	23/48	47.9%
eCG区	19/43	44.2%
対照区	22/45	48.9%

発情後14日目の血中P値はhCG区とeCG区で有意差は見られなかったが対照区と比べ高い傾向であった。また移植直後～発情後14日目の増加量もhCG区とeCG区で対照区よりも高い傾向にあった。受胎群と不受胎群でみると発情14日目の血中P値はhCG区と対照区では受胎・不受胎の差はなく、eCG区では受胎群が不受胎群よりも高い傾向にあった。胚移植直後から発情後14日目にかけての血中P値の増加量ではhCG区とeCG区の受胎群の両方とも対照区よりも高い傾向となり、不受胎群ではhCG区のみ対照区より増加傾向であった(表3)。

表3 各試験区の血中P値と増加量

試験区	頭数	移植直後	発情後14日目	移植直後～14日目の増加量
hCG区	22	8.5±0.7	18.3±1.9	9.9±1.9
eCG区	22	7.1±0.4	14.6±1.4	7.6±1.4
対照区	24	7.2±0.5	11.5±0.9	4.3±0.9
hCG区受胎群	10	8.6±1.3	19.1±1.9	10.5±1.8
hCG区不受胎群	12	8.3±0.6	17.6±3.2	9.3±3.2
eCG区受胎群	11	7.3±0.4	17.6±1.9	10.3±1.9
eCG区不受胎群	11	6.8±0.6	11.6±1.8	4.8±1.8
対照区受胎群	11	6.3±0.5	11.8±1.6	5.5±1.7
対照区不受胎群	13	7.8±0.7	11.7±0.9	3.5±0.8

プロジェステロン濃度 (ng/ml) は平均±標準誤差で表す
有意差はどの試験区・群との間もなし

黄体確認時の黄体の大きさで受胎率をみると、いずれの試験区も黄体 S で受胎率が高く、hCG 区の黄体 S と黄体 L における受胎率の差が最も大きかった (表 4)。各試験区の中で受胎したウシの発情後 14 日目の血中 P 値においては hCG 区の黄体 L が 20.4ng/ml と最も高い値で、hCG 区の黄体 S が 17.92ng/ml、eCG 区の黄体 L が 16.18ng/ml、黄体 S が 18.85ng/ml で、いずれも対照区と比べ高い値となった。また胚移植直後から発情後 14 日目にかけての血中 P 値の増加量では、hCG 区において黄体 L が 10.4ng/ml、黄体 S が 10.6ng/ml となり、eCG 区においては黄体 L が 8.7ng/ml、黄体 S が 11.6ng/ml、対照区で黄体 L が 6.0ng/ml、黄体 S が 4.5ng/ml となった (図 1)。

表 4 黄体確認時の黄体の大きさで比べたときの各試験区の受胎率

試験区	黄体の大きさ	受胎数/移植頭数	受胎率
hCG 区	L	10/23	43.5%
eCG 区	L	7/17	41.2%
対照区	L	7/16	43.8%
hCG 区	S	13/25	52.0%
eCG 区	S	12/26	46.2%
対照区	S	15/30	50.0%

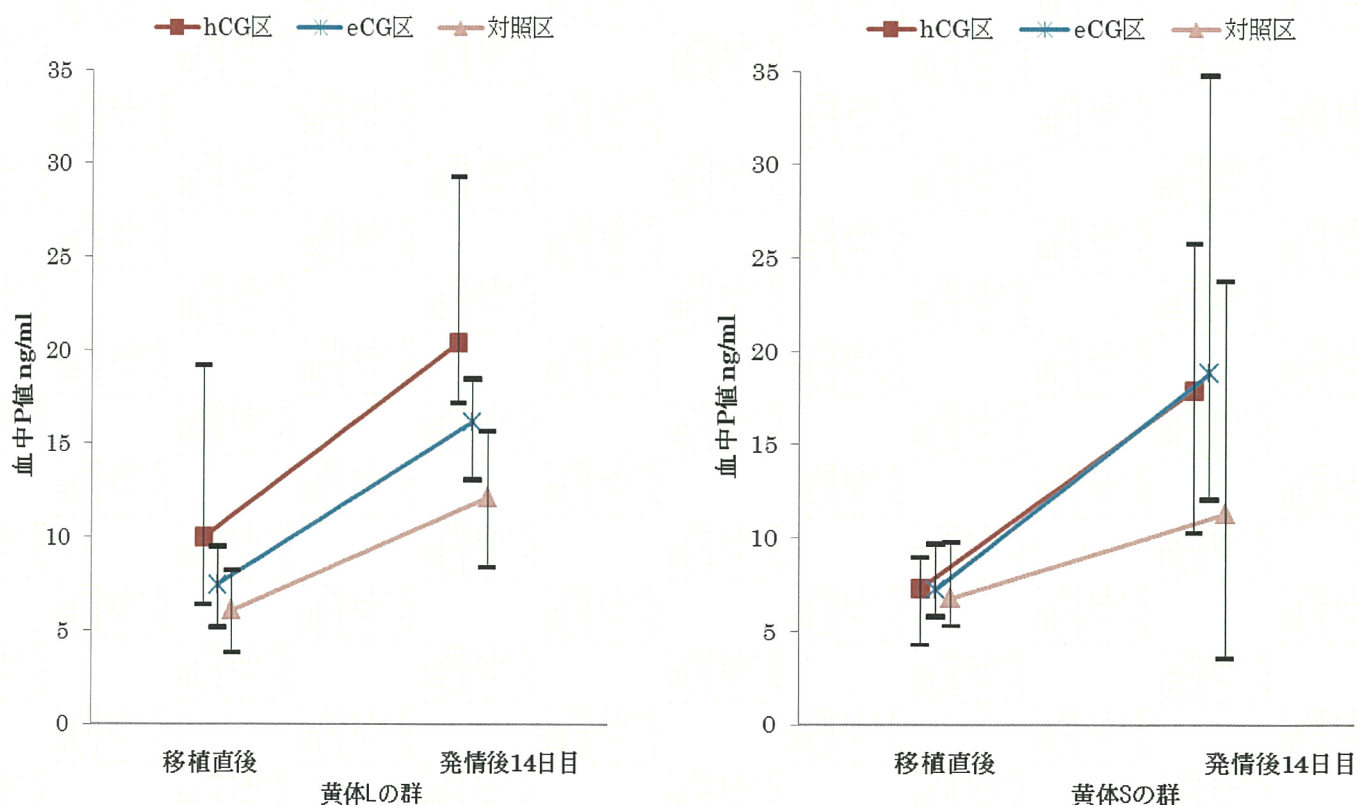


図 1 黄体の大きさで比べたときの各試験区のうちで受胎したウシの血中 P 値の推移

同期化の有無で比べたときの受胎率は、hCG区と対照区の両区とも同期化ありの群がなしの群よりも高い結果となった。eCG区においては同期化ありの群となしの群の差が他の群よりも少なかった(表5)。各試験区の中で受胎したウシの発情後14日目の血中P値はhCG区の同期化ありが21.4ng/ml、同期化なしが16.1ng/ml、対照区で同期化ありが12.4ng/ml、同期化なしが10.6ng/mlとhCG区及び対照区も同期化ありの群が高い傾向となった。移植直後から発情後14日目までの血中P値の増加量でもhCG区では同期化ありが13.8ng/mlで同期化なしの8.8ng/mlよりも多い傾向となったが、eCG区及び対照区ではhCG区ほどの増加量の差は見られなかった(図2)。

表5 同期化の有無で比べたときの各試験区の受胎率

試験区	同期化の有無	受胎数/移植頭数	受胎率
hCG区	あり	13/20	65.0%
eCG区	あり	10/22	45.5%
対照区	あり	12/17	70.6%
hCG区	なし	10/28	35.7%
eCG区	なし	9/22	40.9%
対照区	なし	10/28	35.7%

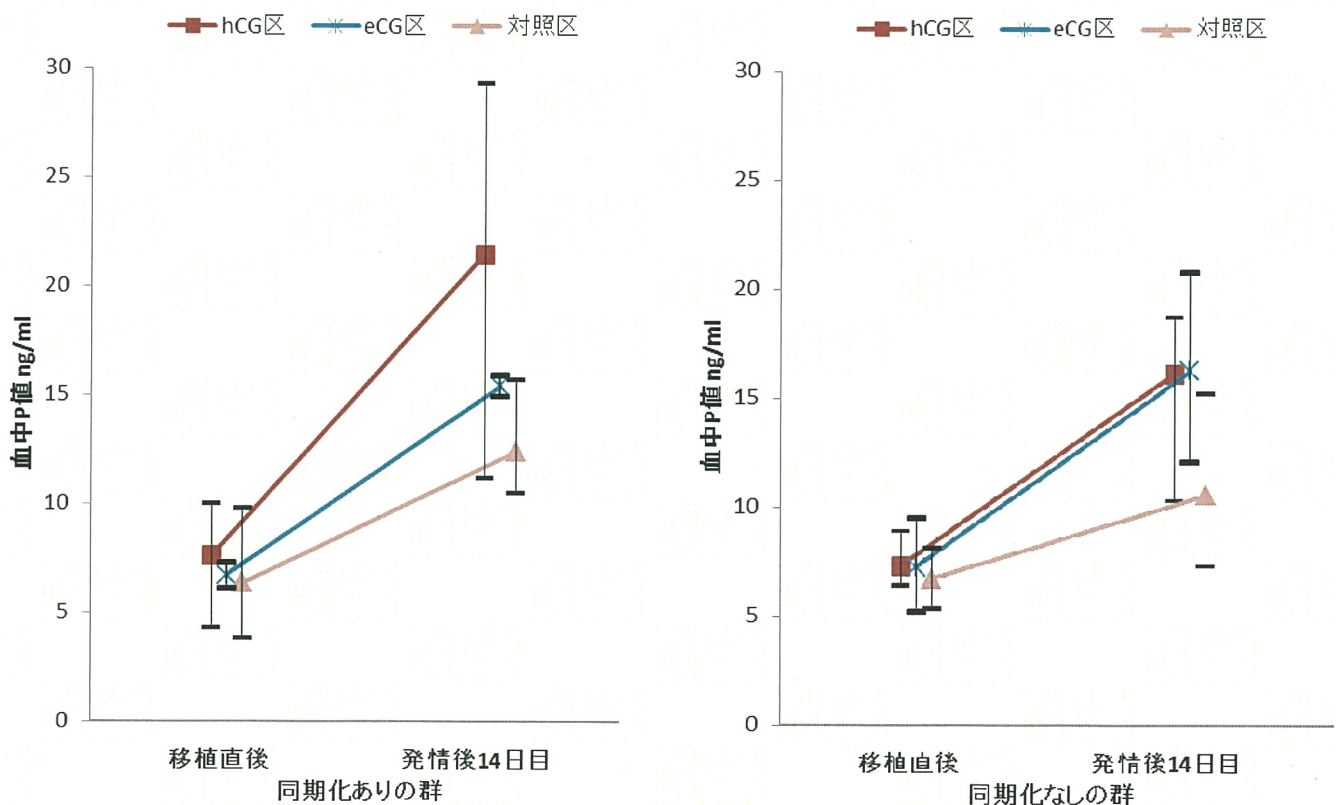


図2 同期化の有無で比べたときの各試験区のうちで受胎したウシの血中P値の推移

移植前に共存卵胞の有無も確認したが、eCG 区は共存卵胞なしの群で受胎率と P 値の上昇幅が高い結果（表 6・図 3）となっていた。

表 6 触診できる共存卵胞の有無で比べたときの eCG 区の受胎率

共存卵胞の有無	受胎数／移植頭数	受胎率
あり	9／23	39.1%
なし	10／20	50.0%

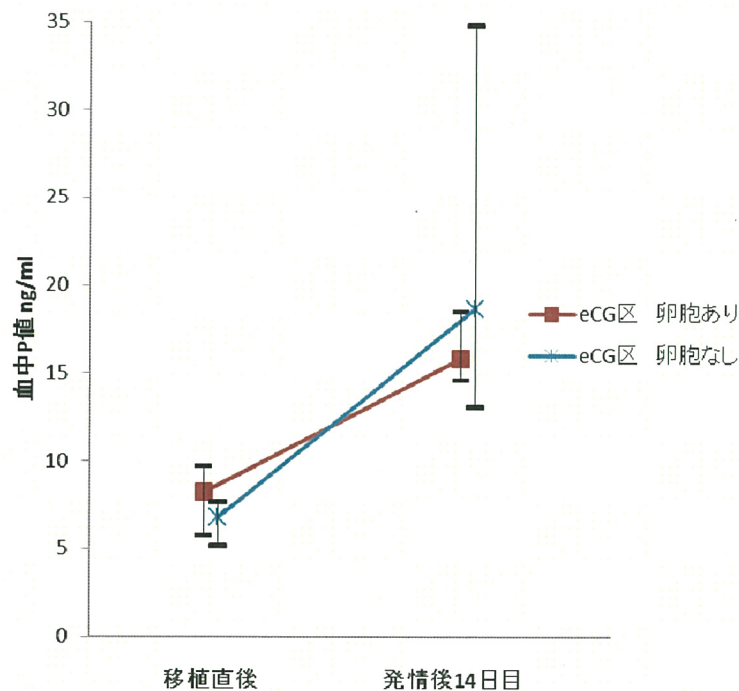


図 3 触診できる共存卵胞の有無で比べたときの eCG 区のうち受胎したウシの血中 P 値の推移

考 察

本試験において受胎率は対照区と hCG 区で差はなかったが、有意差はなかったものの eCG 区は他の試験区と比べ低い傾向であった。血中 P 値は移植直後から発情後 14 日目までの増加量において有意差はなかったが、hCG 区が全体的に高い上昇幅を示し、また eCG 区も対照区よりは上昇幅が大きい結果となった。また黄体確認時の黄体が小さい群の受胎率が高かったことについては、触診による確認のため、黄体の内腔が大きなものやのう腫様黄体も大きいと判断しており今後の課題となった。

同期化の有無で受胎率を比べるといずれの試験区も同期化ありの群が高い傾向となったが、eCG 区は受胎率の差が少なかった。血中 P 値の増加量においても eCG 区は同期化ありの群と同期化なしの群の差がなく、今回の試験では投与量が多く黄体賦活効果よりも FSH 作用が強くなったと考えられた。一方、同期化時の hCG 投与は同期化しない場合よりも黄体賦活効果が高いと推察された。

hCG は強力な LH 作用を有し黄体を賦活化し、共存卵胞を副黄体化させ、eCG は FSH 作用が強く LH 作用が弱い低容量であれば hCG と同様の黄体機能の賦活効果があると考えられている⁶⁾。本試験の eCG 区の受胎群の血中 P 値が hCG 群とほぼ同様の上昇幅を示し、不受胎群の血中 P 値が対照群と同様の上昇幅しか示さなかったことから、超音波診断装置で発情後 14 日目の卵巣を確認していないため検証できていないが、受胎群においては副黄体が形成され、不受胎群においては副黄体が形成されずに主黄体のみからプロゲステロンが分泌された可能性が考えられた。本試験に使用した eCG の投与量は 1000 IU と過剰排卵で用いる 2000~4000 IU ほどではないが種々の報告^{3) 7)}に比べると多量であり、eCG 自体の血中半減期も長いことが報告されている⁹⁾。また移植前の直腸検査において触診できる共存卵胞を確認したが、eCG 区は共存卵胞なしの群で受胎率と P 値の上昇幅が高い結果(表 6・図 3)となっており、移植日となる発情から 7~8 日目が卵胞発育ウェーブの中で第 1 ウェーブにあたり主席卵胞が存在すること¹⁰⁾から、触診できるほどの卵胞が存在した場合に本試験の eCG の用量では黄体機能を賦活化させる以上に主席卵胞に長期間作用しエストロジオールの分泌が促進されたことにより、母体が受精卵を認識する 14 日目前後に低値の E/P 比が維持しにくい状況になり受胎率に影響があったと考えられた。

参考文献

- 1) 農林水産省家畜生産新技術関連情報牛受精卵移植実施状況(H21 年度) 農林水産省 Homepage <http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l_katiku/pdf/21_gaiyou.pdf> (2013 年 6 月現在)
- 2) 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 30 1-7 (2004)
- 3) 永野理樹ら：ウマまたはヒト絨毛性性腺刺激ホルモン投与牛の黄体機能賦活 日獣会誌 52 635-638 (1999)
- 4) 佐々木恵美ら：受胎牛の発情排卵同期化処理への eCG 投与追加は、胚移植成績を向上させる 近畿中国四国農業研究成果情報 2005 383-384 (2006)
- 5) 田頭明子ら：ウシ胚移植における受胎牛へのホルモン製剤投与が受胎率および移植率に及ぼす影響 山口県畜産試験場研究報告 19 21-26 (2006)
- 6) 梅木英伸ら：Examination of Hormone Administration Method for Pregnancy Rate Improvement in Bovine Embryo Transfer 大分畜試報告 33 5-11 (2004)
- 7) 平子誠ら：Luteotropic Effect of Pregnant Mare Serum Gonadotropin in Cattle J.Vet.Med.Sci 57 2 317-321 (1995)
- 8) 竹之内直樹：黒毛和種の新しい発情同期化法 (Flex-Synch) 養牛の友 11 41-45 (2010)
- 9) 山内亮ら：牛に投与した PMS の血中 level について 日本獣医学雑誌 23 440 (1961)
- 10) 森純一ら(編)：獣医繁殖学 文永堂出版 64-66(1995)