

性腺刺激ホルモン放出ホルモン製剤利用による黒毛和種牛 過剰排卵処理後の人工授精回数低減

磯崎良寛*・古賀鉄也¹⁾・稲田 淳

黒毛和種牛における過剰排卵処理後の人工授精回数の低減技術を確認するため、性腺刺激ホルモン放出ホルモン製剤 (GnRH) の投与時期および投与量、人工授精の時期および回数が胚採取数に及ぼす影響について検討した。

過剰排卵処理時におけるプロスタグランジンF₂α類縁体 (PG) 投与48時間後にGnRHを投与して56時間後に人工授精を1回実施およびPG投与56時間後にGnRHを投与して72時間後に人工授精を1回実施した場合の胚採取数は、PG投与48時間後にGnRHを投与して56、72時間後に2回人工授精を実施した場合と同等以上であった。また、PG投与48時間後にGnRHを投与して72時間後に人工授精を実施する場合、GnRH (酢酸フェルチレリン) を200μg投与した方が100μg投与より未受精卵率が低下して正常胚採取数が増加する傾向にあった。

本研究の結果から過剰排卵処理により誘起された発情時に200μgのGnRHを投与することにより、1回の人工授精でも良好な胚採取成績が得られる可能性が示唆され、作業の軽減およびコストの低減が期待される。

[キーワード：黒毛和種、過剰排卵処理、人工授精、性腺刺激ホルモン放出ホルモン、胚採取数]

Reduction in the number of Artificial Insemination after Superovulation using Gonadotrophin Releasing Hormone in Japanese Black Cattle. ISOZAKI Yoshihiro, Tetsuya KOGA and Sunao INADA (Fukuoka Agricultural Research Center, Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan) *Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent.* 25:121-124 (2006)

This study was conducted to evaluate the effects of gonadotrophin releasing hormone (GnRH; fertirelin acetate) administration and timing of artificial insemination (AI) after superovulation on embryo recovery results in Japanese black cattle. The number of transferable embryo recovered from the superovulated cattle administered GnRH at 48 or 56 hours after prostaglandin F₂α (PG) administration and single AI at 56 or 72 hours after PG was almost the same or more, compared with those administered GnRH at 48 hours after PG and double AI at 56 and 72 hours after PG. In the cattle administered 200μg GnRH at single AI method, unfertilized egg rate was significantly lower and the number of transferable embryo was increased, compared with those administered 100μg GnRH. These results suggest that the number of AI can be reduced from 2 to 1, by 200μg GnRH administration at heat induced by superovulation.

[Key words : Japanese black cattle, superovulation, artificial insemination, gonadotrophin releasing hormone, embryo recovery]

緒言

胚移植技術により牛の改良を促進するためには、優秀な牛から過剰排卵処理・人工授精・胚採取により、できるだけ多くの体内受精胚を生産する必要がある。

過剰排卵処理をした雌牛卵巣では、複数の卵胞が同時に発育するため、排卵時期は自然発情時より幅があると考えられる。そこで、現行法では過剰排卵処理により誘起された発情後に、複数回の人工授精 (AI) を実施しており、作業が繁雑であるとともに、牛へのストレスも大きい。また、遺伝能力の高い胚を生産するため、高価な凍結精液を用いる場合が多く、複数回の人工授精は、胚生産コストを増加させる原因ともなっている。

性腺刺激ホルモン放出ホルモン製剤 (GnRH) は、下垂体前葉に作用して、黄体形成ホルモン (LH) および卵胞刺激ホルモン (FSH) を放出させる作用があり、牛卵胞嚢腫や排卵障害の治療等に用いられている。過剰排卵処理により誘起された発情時にGnRHを投与するこ

とにより、人工授精回数を1回に低減する試みについては過去にも報告^{4), 9)}があるが、未受精卵率増加や正常胚率減少のため実用化には至っていない。

そこで、過剰排卵処理後の人工授精回数の低減技術を確認するため、本研究では過剰排卵処理により誘起された発情時におけるGnRHの投与時期および投与量、人工授精の時期および回数が、胚採取数に及ぼす影響について検討した。

材料および方法

試験1 GnRH投与時期および人工授精の回数・時期が胚採取成績に及ぼす影響

1 供試牛および過剰排卵処理

当場繋養の黒毛和種雌牛6頭 (年齢：2.7~6歳、初産分娩後2~9回の過剰排卵処理を実施) を供試した。

発情後9~13日目から豚由来卵胞刺激ホルモン (FSH-P) を3日間朝夕漸減法 (5, 5, 3, 3, 2, 2 AU) により皮下投与し、3日目朝にプロスタグランジンF₂α類縁体制剤 (PG) としてクロプロステノール750μgを筋肉内投与する方法により過剰排卵処理を実施した。

2 試験区設定および調査項目

PG投与後のGnRHの投与時期 (48, 56hr)、AIの実

*連絡責任者 (家畜部)

1) 現福岡県筑後家畜保健衛生所

施時期 (56, 72hr), AI回数 (2, 1回) により, 第1図に示す3つの試験区を設定した。GnRHは, 酢酸フェルチレリンとして200 μ gを筋肉内投与した。AIは, 0.5mlの黒毛和種凍結精液1本を融解後, 直腸腔法により子宮頸管深部～内子宮口に注入した。胚採取成績の個体差の影響を少なくするため, 2002年5月12日～2003年4月22日の期間中に供試牛6頭を全試験区で反転実施させた。

過剰排卵処理開始時, 発情時における卵巣状況について, 超音波診断装置 (5 Mhz経膈コンベックスプローブ) を用いて調査した。卵胞については, 直径により大: 10mm以上, 中: 5mm以上10mm未満, 小: 5mm未満に分類した。

過剰排卵処理により誘起された発情の7日後に, 頸管經由子宮灌流法により胚を採取し, 正常胚数 (実体顕微鏡観察により変性割合が50%未満), 変性胚数 (著しく発育が遅れた胚および変性割合が50%以上) および未受精卵数を調査した。各採取数については一元配置分散分析により検定を実施し, 正常胚, 変性胚, 未受精卵の割合については χ^2 検定を実施した。

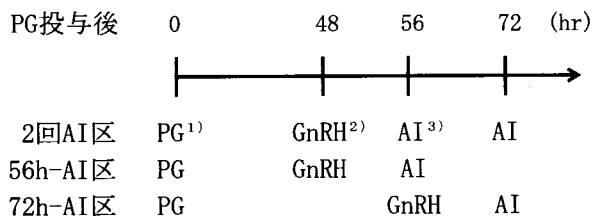
試験2 GnRHの投与量が1回AI時の胚採取成績に及ぼす影響

1 供試牛および過剰排卵処理

当時繁養の黒毛和種雌牛6頭 (年齢: 2.2～8歳, 初産分娩後1～15回の過剰排卵処理を実施) を供試した。過剰排卵処理およびAIは, 試験1と同様に実施した。

2 試験区設定および調査項目

PG投与48時間後にGnRH投与, 56時間後にAIを1回実施 (試験1における56h-AI区) という条件下で, GnRH



第1図 GnRH投与および人工授精実施時期 (試験1)

- 1) プロスタグランジン類似体製剤 (クロブロステノール) 投与
- 2) 性腺刺激ホルモン放出ホルモン製剤 (酢酸フェルチレリン) 投与
- 3) 人工授精実施

の投与量 (酢酸フェルチレリンとして100 μ gおよび200 μ g) により2つの試験区 (100 μ g区および200 μ g区) を設定した。胚採取成績の個体差の影響を少なくするため, 2003年5月8日～2003年11月17日の期間中に供試牛6頭を2つの試験区で反転実施させた。

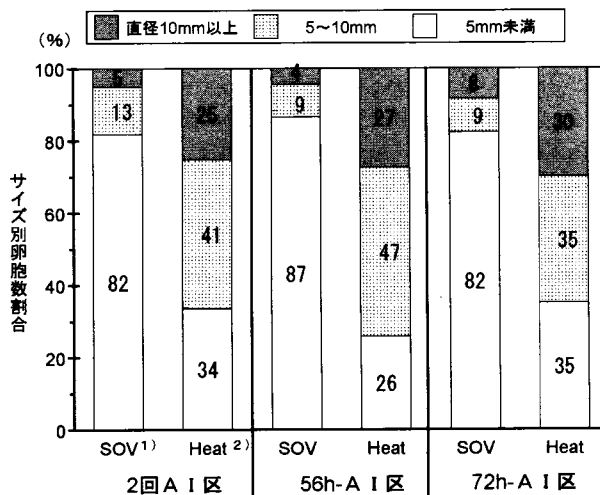
胚採取方法および調査項目については, 試験1と同様に実施した。胚採取数についてはt検定, 割合については χ^2 検定を実施した。

結果および考察

試験1 GnRH投与時期および人工授精の回数・時期が胚採取成績に及ぼす影響

試験1における過剰排卵処理開始時および発情時のサイズ別卵胞数割合を第2図に示した。過剰排卵処理開始時には小卵胞割合: 82～87%, 中卵胞割合: 9～13%, 大卵胞割合: 4～8%であったが, 発情時には小卵胞割合: 26～35%, 中卵胞割合: 35～47%, 大卵胞割合: 25～30%となっており, 全区において過剰排卵処理により複数の卵胞が発育していたことが確認された。

試験1における胚採取成績を第1表に示した。2回AI区, 56h-AI区, 72h-AI区における胚採取総数は6.00, 8.50,



第2図 処理開始時および発情時のサイズ別卵胞割合 (試験1)

- 1) 過剰排卵処理開始時
- 2) 発情時

第1表 GnRH投与時期および人工授精回数・時期が胚採取成績に及ぼす影響 (試験1)

試験区	採取総数	正常胚数 (%) ²⁾	変性胚数 (%)	未受精卵数 (%)
2回AI	6.00 ± 2.43	4.17 ± 1.86 (69.5)	1.33 ± 1.05 (22.2 ^a)	0.50 ± 0.46 (8.3)
56h-AI	8.50 ± 1.56	5.33 ± 1.24 (62.7)	1.83 ± 0.37 (21.6 ^a)	1.33 ± 0.87 (15.7)
72h-AI	5.83 ± 1.16	4.67 ± 1.05 (80.0)	0.33 ± 0.30 (5.7 ^b)	0.83 ± 0.60 (14.3)

- 1) 表記値は, 平均±標準誤差
- 2) 割合(%)は, 採取総数に対する割合
- 3) a, b: 異符号間に有意差あり (χ^2 検定, $p < 0.05$)

5.83個、正常胚数は4.17、5.33、4.67個であり、56h-AI区が他の2区より多い傾向にあったが、胚採取総数、正常胚数および正常胚率について各試験区間に有意差は認められなかった。変性胚数は、72h-AI区が他の2区より少ない傾向にあり、変性胚率は有意に低かった ($p < 0.05$)。また、未受精卵数は、2回AI区が他の2区より少ない傾向にあったが、数および割合に有意差はなかった。

過剰排卵処理により発育した複数の卵胞の排卵時期には幅がある^{3), 7)}ため、受精率を確保するためには人工授精を複数回実施する必要がある^{2), 6)}。Schieweら⁵⁾は肉用種牛について、過剰排卵処理により誘起されたスタンディング発情開始の12時間または24時間後に1回AIすることにより、12~48時間後に4回AIした場合と同等の採胚成績が得られたと報告している。試験1の結果において、1回AI時(56h-AI区および72h-AI区)の正常胚数は2回AI時と同等以上であり、黒毛和種牛においては過剰排卵処理後の人工授精実施前にGnRHを投与することにより、人工授精回数を2回から1回に低減できる可能性が示唆された。

櫻田ら⁴⁾、網崎ら⁹⁾は、黒毛和種牛の過剰排卵処理時におけるPG投与48時間後にGnRHを100 μ g投与することにより、排卵時期がPG投与56~72時間後に集中するが、56時間後の1回AIでは56および72時間後の2回AIに比べて未受精卵率が増加し、正常胚率が減少したと報告している。試験1の2回AI区、56h-AI区、72h-AI区における未受精卵率は8.3、15.7、14.3%と1回AIに比べて1回AIが増加する傾向にあったが、正常胚率は69.5、62.7、80.0%と1回AIは2回AIに比べて減少しなかった。試験1におけるGnRHの投与量は200 μ g、既報^{4), 9)}では100 μ gであり、この投与量の違いが1回AI時における正常胚率に影響した可能性が示唆された。

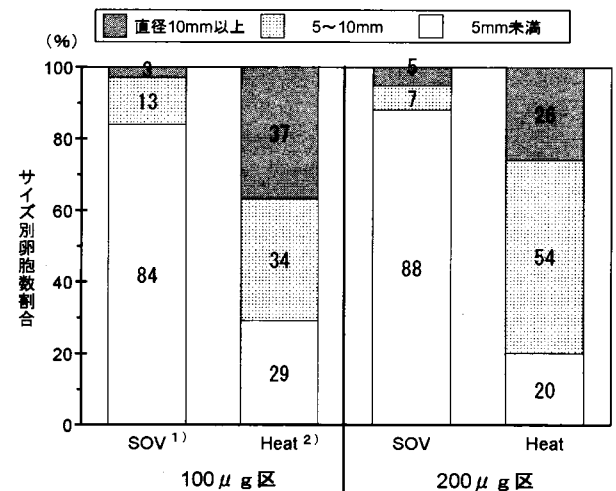
牛の排卵は、発情期における黄体形成ホルモンの一過性放出のピーク(LHサージ)により誘起される。過剰排卵処理時には、PG投与後47.7時間でLHサージが起こる¹⁾。また、GnRHを投与すると、血中LH濃度は急速に上昇して1~2時間後にピークに達する⁸⁾。試験1において、PG投与48時間後にGnRHを投与した2回AI区および56h-AI区では過剰排卵処理後の内因性LHサージとGnRH投与による外因性LHサージはほぼ同調し、72h-AI区では内因性LHサージの8時間後に外因性LH

サージが起こったと考えられる。本研究の結果においては、GnRHの投与時期の違いは胚採取成績に大きな影響を及ぼさなかったと推察された。

試験2 GnRHの投与量が1回AI時の胚採取成績に及ぼす影響

試験2における過剰排卵処理開始時および発情時のサイズ別卵胞数割合を第3図に示した。過剰排卵処理開始時には100 μ g区および200 μ g区の小卵胞割合:84および88%、中卵胞割合:13および7%、大卵胞割合:3および5%であったが、発情時には小卵胞割合:29および20%、中卵胞割合:34および54%、大卵胞割合:37および26%となっており、両区において過剰排卵処理により、複数の卵胞が同様に発育したことが確認された。

試験2における胚採取成績を第2表に示した。100 μ g区および200 μ g区における胚採取総数は7.83および8.17個と同様であったが、正常胚数は4.00、5.00個と200 μ g区が100 μ g区よりやや多い傾向を示した。胚採取総数、正常胚数および正常胚率について各試験区間に有意差は認められなかった。200 μ g区の変性胚数は



第3図 処理開始時および発情時のサイズ別卵胞割合 (試験2)

- 1) 過剰排卵処理開始時
- 2) 発情時

第2表 GnRHの投与量が1回AI時の胚採取成績に及ぼす影響 (試験2)

試験区	採取総数	正常胚数 (%) ²⁾	変性胚数 (%)	未受精卵数 (%)
100 μ g	7.83 \pm 1.48	4.00 \pm 1.72 (51.1)	0.50 \pm 0.31 (6.4 ^a)	3.33 \pm 1.41 (42.5 ^A)
200 μ g	8.17 \pm 1.52	5.00 \pm 2.11 (61.2)	1.83 \pm 0.80 (22.4 ^b)	1.33 \pm 0.90 (16.3 ^B)

1) 表記値は、平均 \pm 標準誤差
 2) 割合(%)は、採取総数に対する割合
 3) a, b: 同列異符号間に有意差あり (χ^2 検定, $p < 0.05$), A, B: 同 ($p < 0.01$)

第3表 人工授精回数がコストに及ぼす影響

項目	2回人工授精	1回人工授精
FSH-P ¹⁾	3,780円	3,780円
PG ²⁾	2,100円	2,100円
GnRH ³⁾	—	2,415円
注射用品	135円	154円
投薬技術料	4,690円	5,360円
凍結精液代金	10,500円	5,250円
人工授精技術料	7,000円	3,500円
コスト合計	28,205円	22,559円

1) 豚由来卵胞刺激ホルモン

2) プロスタグランジンF₂α類似体製剤(クロプロステノール)

3) 性腺刺激ホルモン放出ホルモン製剤(酢酸フェルチレリン)

100μg区より少ない傾向にあり、変性胚率は有意に低かった(p<0.05)。また、未受精卵数は、200μg区が100μg区より少ない傾向にあり、未受精卵率は有意に低かった(p<0.01)。

試験2の胚採取成績から、PG投与48時間後にGnRHを投与して56時間後に1回人工授精を実施する場合、200μgのGnRHを投与した方が、100μg投与した場合に比べて未受精卵率が低下して正常胚採取成績が向上する傾向にあった。このことから、過剰排卵処理により誘起された発情時に200μgのGnRHを投与した方が、100μg投与するより排卵時期を集中させる効果が高いと思われた。

本研究における試験1および試験2は違う年度に違う供試牛(一部重複)により実施したが、全く同じ処理で実施した試験1の56h-AI区と試験2の200μg区の胚採取成績はほぼ同じ結果となっており、両試験には一貫性があったと考えられる。本研究の結果から、黒毛和種牛の過剰排卵処理におけるPG投与48時間後に、GnRHを酢酸フェルチレリンとして200μg投与して、56時間後に人工授精を1回実施することにより、48および56時間後に2回人工授精した場合と同様の胚採取成績が得られる可能性が示唆された。

本研究では経時的排卵状況や血中LH濃度の推移について調査していないため、排卵誘起効果の確認およびメカニズムについての解明はできておらず、今後さらに検討する必要がある。

人工授精回数低減によるコスト節減効果

本研究で検討した人工授精回数低減が、過剰排卵処理・人工授精コストに及ぼす影響を試算した結果について、第3表に示した。2回人工授精実施時にはGnRH非投与、凍結精液代金を5,250円/本という条件で試算した結果、2回人工授精実施時のコスト28,205円に比べて1回人工授精実施時では22,559円となり、5,646円(20%)のコ

ストが低減された。また、凍結精液代金を10,500円/本とした場合には、コスト低減額が10,896円(28%)となり、さらにコスト低減効果が高まる。

本研究では過剰排卵処理後のGnRH投与により人工授精回数を低減する技術について検討したが、この技術が確立されることにより、過剰排卵処理の作業が軽減できるとともに、処理コストが低減できると考えられる。

引用文献

- Dieleman, S. J., Bevers, M. M., Wurth, Y. A., Gielen J.Th., and A. H. Willemse (1989) Improved Embryo yield and condition of donor ovaries in cows after PMSG superovulation with monoclonal anti-PMSG administered shortly after the preovulatory LH peak. *Theriogenology*31: 473-487.
- Elsden, R. P., Nelson, L. D., and G. E. Seidel JR (1978) Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gona-dotrophin. *Theriogenology*9: 17-26.
- Maxwell, D. P., Massey, J. M., and D. C. Kraemer (1978) Timing of ovulations in the superovulated bovine. *Theriogenology*9: 97.
- 櫻田孝之・森一憲・安達善則(2002)牛の人工妊娠技術に関する基礎的研究 I 過剰排卵処理後のGnRH投与が採胚成績に及ぼす影響. *京都碓高牧試研報*23: 16-23.
- Schiewe, M. C., Looney, C. R., Johnson, C. A., Hill, K. G., and R. A. Godke (1987) Transferable embryo recovery rates following different insemination schedules in superovulated cattle. *Theriogenology*28: 395-495.
- Schneider JR, H. F., Castleberry, R. S., and J. L. Griffin (1980) Commercial aspects of bovine embryo transfer. *Theriogenology*13: 73-85.
- Shea, B. F. (1978) Recovery of bovine follicular oocytes and their fertilization in a recipient animal. *Theriogenology*9:101.
- Tanabe, T. Y., Deaver, D. R., and H. W. Hawk (1994) Effect of gonadotrophin-releasing hormone on estrus, ovulation and ovum cleavage rates of dairy cows. *J. Anim. Sci*72: 719-724.
- 網先誠・木下政建・渡部正哉(2002)黒毛和種牛における過剰排卵処理後のGnRH投与および人工授精(AI)回数が採胚成績に及ぼす影響. *愛媛畜試研報*19: 1-6.