

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19580367
 研究課題名 (和文) 分娩後早期肉用牛における卵胞吸引を併用した排卵同期化処置・
 定時人工授精と再授精法
 研究課題名 (英文) Timed AI and re-AI through ovulation synchronization program in
 combination with follicular aspiration in early postpartum beef
 cows
 研究代表者
 大澤 健司 (OSAWA TAKESHI)
 岩手大学・農学部・准教授
 研究者番号：90302059

研究成果の概要：分娩後早期の黒毛和種牛における卵胞吸引と排卵同期化・定時人工授精法 (OPU-PRID-TAI 法) の有効性および授乳が及ぼす影響を明らかにする目的で、定時人工授精前後に計4回の経膈採卵を行うとともに卵巣動態、血中性ステロイドホルモン動態および受胎率を観察した。その結果、定時人工授精後に7日間隔で連続して経膈採卵を行うことで品質の高い移植可能胚を効率よく生産することが可能であること、また、子牛を母牛から一時的に隔離することで、本法による採卵成績と受胎成績の向上が期待できることが示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	900,000	270,000	1,170,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,600,000	480,000	2,080,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学

キーワード：臨床繁殖・産科

1. 研究開始当初の背景

GnRH 製剤と PGF2・製剤を用いた排卵同期化方法による定時人工授精 (Timed artificial insemination; 以下, TAI) が開発され、黒毛和種牛においても応用され、群としての平均空胎日数の短縮につながっている。しかしながら肉用牛の場合、分娩後早期の授乳中においては生理的に卵巣静止の状態にあるため、この時期に排卵同期化処置をしてTAIを実施したとしても受胎率は40%未満と低い。排卵同期化処置開始時に膈内留置型プロゲステロン製剤 (以下、膈内 P4 製剤) を併用することにより、排卵同期化処置後に形成される黄体機能の向上も期待できることが報告されていることから、膈内 P4

製剤の併用による受胎率の向上が期待できる。また、肉用牛である黒毛和種牛においては、優良な肉質形質を有する血統の繁殖雌牛からより多くの卵胞内卵子を採取できれば、体外受精とそれに続く胚移植に供することができるため、農家経営の安定化の面からもメリットが多い。体外受精に供する卵子を採取する目的で経膈卵胞内卵子回収法 (Ovum pick-up; OPU) が畜産現場において応用されている。さらに、OPUにより胞状卵胞を吸引除去することにより、新たに出現する卵胞ウェーブをリセットすることになるので、排卵同期化処置にOPUを併用することで排卵同期化率の向上が期待できる。しかしながらその有効性については検討の余地がある。

2. 研究の目的

本研究では、黒毛和種牛における分娩後早期（分娩後20日）からのOPUと排卵同期化処置・定時人工授精法の有効性を内分泌動態、排卵同期化率、授精後の黄体形成ならびに受胎率の点から証明すること、分娩後20-25日におけるOPUで採取された卵子の品質を体外培養、体外受精による発育成績の点から検討すること、初回の定時人工授精後26日の時点で不受胎と診断された個体に再度の排卵同期化処置を実施することの有効性を内分泌動態、排卵同期化率、授精後の黄体形成ならびに受胎率の点から証明すること、を目的として本研究を計画した。

3. 研究の方法

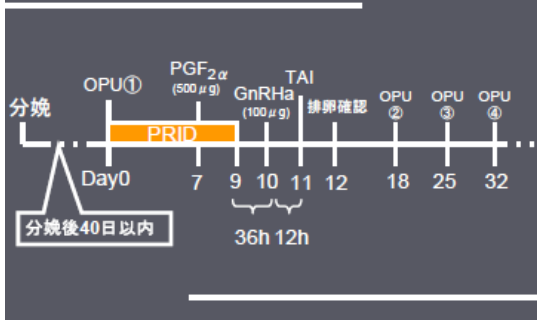
(1) 供試動物

岩手大学農学部附属寒冷フィールドサイエンス教育研究センター御明神牧場で飼養されている黒毛和種経産牛14頭で、分娩後7日目前後に子牛を離乳した離乳群（n=7）と、子牛を供試牛と同居させ自由に授乳させた授乳群（n=7）に区分した。月齢、産歴、分娩後処置開始までの日数（平均±標準偏差）は、それぞれ、36.5±14.0および57.6±28.9ヶ月齢、1.7±1.1および3.1±2.0産、28.3±4.8および27.2±6.6日であった。

(2) 処置

処置スケジュール（図1.）は、処置開始日（Day0）にOPUを行い、その直後からPRID（プロゲステロン1.55g, 安息香酸エストラジオール10mg含有）を腔内に挿入し、9日間装着後に抜去した。抜去の2日前にプロスタグランジンF_{2α}類縁体（PGF_{2α}：クロプロステノールとして500μg）を投与した。抜去から36時間後にGnRH類縁体（酢酸フェリチレンとして100μg）を筋注し、その12時間後にTAIを行い、翌日直腸検査で排卵を確認した。TAI後は7日前後の間隔で3回のOPUを連続実施した。各処置時に直腸検査を行い、頸静脈からヘパリン加真空採血管で採血し、速やかに常温、15分、700Gで遠心分離して血漿を得、ステロイドホルモン測定まで-20℃で凍結保存した。

図1. 処置スケジュール



(3) Ovum pick-up (OPU)の方法

供試牛を梓場に保定し、セラクタール2%注射液約0.8mlを頸部筋肉内に投与して沈静し、臭化プリフィニウム（パドリン注として10ml）を頸静脈内に投与して直腸の蠕動を抑制した。腔内にコンベックス型の超音波プローブ（UST-M15-21079：Aloka）を挿入し、超音波診断装置（SSD-900：Aloka）のモニタ映像を確認しながら、17Gのシングルルーメンニードル（COVA Needle：ミサワ医科工業）、吸引圧70～80mmHgの条件下で実施した。回収液にはエンブリオテック（全薬工業）にノボヘパリン（10μl/ml）を加えたものを用いて直径約3mm以上の卵胞を吸引した。回収した未成熟卵子は、3～4層以上の緻密な卵丘細胞に囲まれた直径120μm前後の色調が明瞭なものを培養適合卵子と判定した。

(4) IVPの方法

IVPは機能性ペプチド研究所の方法に準拠して行った。すなわち、成熟培養は培養シャーレ（リプロC-1）のウエルに200μlの成熟培地（IVMD 101, 機能性ペプチド研）を入れ、100μlのミネラルオイルを重層し、38.5℃、5%CO₂、95%空気条件下で約20時間実施した。凍結精液は、1回目をリン酸緩衝液（PBS）で、2回目を媒精液（IVF 100, 機能性ペプチド研）で遠心分離（700G, 5min）により洗浄後、100μlドロップ中で最終濃度約1,000万 sperm/mlの精子により約8時間媒精した。凍結黒毛和種精液は社団法人家畜改良事業団の黒毛和種精液を利用した。媒精終了後卵子は、200μlの発生培地（IVD 101, 機能性ペプチド研）、38.5℃、5%O₂、5%CO₂、90%空気条件下で10日間培養を継続し、媒精後2日目に2細胞期および5細胞期以上へ分割した胚の割合、媒精後7-9日目に胚盤胞期に発育した胚の割合を観察した。

(5) ステロイドホルモン濃度の測定

エストラジオール-17β（Estradiol-17β：E₂）およびプロゲステロン（progesterone：P）濃度の測定は、田谷らの二抗体ラジオイムノアッセイ（RIA）に準じて行った。各ホルモンに対する特異的抗体はコロラド州立大学のDr. Niswenderより提供を受けた。E₂およびPアッセイの感度は0.2pg/mlおよび0.04ng/ml、アッセイ内変動およびアッセイ間変動はE₂が7.0%および12.7%、Pが9.3%および7.6%であった。

(6) 統計処理

二群間の排卵同期化率および受胎率はFisher's exact probability testで比較した。二群間のホルモン濃度およびOPU成績の時系列差異の分析にはTwo-way repeated measures ANOVAを用いた。また、適切と考えられる場合にはunpaired t-testにより比較した。OPU成績における二群間の割合の比較に

は χ^2 検定を用いた。値は平均値±標準誤差で表した。P<0.05を有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) 卵巣動態および受胎率

本研究では、分娩後46日以内にOPUを実施し、その直後からPRIDを9日間挿入し、抜去前2日にPGF_{2α}を投与した。そして抜去後36時間にGnRHを投与し排卵同期化を、その後12時間に定時授精を行った。その結果、授乳群の1頭(B5.6)を除く全ての個体でPGF_{2α}投与後に新たな卵胞が発育し、排卵後に黄体形成がみられた。供試14頭中13頭(92.9%)において排卵が同期化し、その後に黄体形成が認められた。離乳群(7/7, 100%)および授乳群(6/7, 85.7%)間で排卵同期化率に有意差は認められなかった。

14頭中8頭(57.1%)がOPU-PRID-TAI処置により受胎した。受胎率についても両群間に有意差は認められなかった(離乳群71.4%, 授乳群42.9%)。

(2) OPU成績

回収卵子数および胚盤胞数は離乳群および授乳群において、4つのOPUセッション間における差はなかった(Table 1)。

4つのセッション合計の回収卵子数、培養適合卵子数、卵割胚率、胚盤胞数、胚盤胞発育率は全て離乳群が授乳群と比較して有意に高い値を示した。

(3) ホルモン動態

離乳群と授乳群との間で血漿中プロゲステロン濃度推移に有意差が認められた(図2)。

離乳群において初回のOPU処置から7日および25日におけるプロゲステロン濃度が授乳群よりも高い傾向を示した。血漿中エストラジオール-17β濃度は両群間において有意差は認められなかった。

以上の結果から、今回ここに述べたOPU-PRID-TAI処置は、分娩後早期の黒毛和種経産牛の繁殖成績を、離乳、授乳に関係なく向上させることができることが示された。また、OPU-PRID-TAI処置は分娩後早期の黒毛和種経産牛において受胎成績に悪影響を与えることなく妊娠早期に連続してOPUを繰り返し実施できるということが示された。我々はこれまでも既に、分娩後早期の授乳牛に対して高い受胎率を得ることができる方法としてOPU-PRID-TAI処置を提唱してきたが、今回のOPU-PRID-TAI処置においてはPRIDを9日間留置し、PGF_{2α}・製剤をPRID抜去の2日前に投与、PRID抜去後36時間にGnRH製剤を投与するというプロトコルを用いており、本プロトコルはGnRH製剤投与前に排卵するリスクを最小限にする意味でも有効だと考えられる。

Table 1. 黒毛和種牛におけるOPU-PRID-TAI処置前後4回のOPU成績の離乳群および授乳群間での比較

	離乳群 (n = 7)	授乳群 (n = 7)
OPUの延べ回数	28	28
1頭当たり(4回)のOPUにより採取された卵子数	494 (17.6 ± 11.1) ^{a,b,c}	301 (10.8 ± 6.7) ^a
セッション1 (Day 0 ^b)	142 (20.3 ± 12.8)	81 (11.6 ± 5.5)
セッション2 (TAI後7日)	88 (12.6 ± 9.0)	83 (11.9 ± 4.2)
セッション3 (TAI後14日)	139 (19.9 ± 13.7)	69 (9.9 ± 10.1)
セッション4 (TAI後21日)	125 (17.9 ± 8.6)	68 (9.7 ± 7.0)
培養適合卵子数 ^c	441 (15.8 ± 9.6) ^a	288 (10.3 ± 5.6) ^a
卵割胚数	241 (8.6 ± 7.2) ^a	132 (4.7 ± 4.0) ^a
培養卵子数に対する卵割胚数の割合 (%)	54.6 ^a	45.8 ^a
胚盤胞数 (体外培養から7日)	70 (2.5 ± 3.4) ^a	25 (0.9 ± 1.9) ^a
培養卵子数に対する胚盤胞数 (体外受精から7日)の割合 (%)	15.9 ^a	8.7 ^a
胚盤胞数 (体外受精から7-9日)	99 (3.5 ± 4.0) ^a	36 (1.3 ± 1.8) ^a
培養卵子数に対する胚盤胞数 (体外受精から7-9日)の割合 (%)	22.4 ^a	13.5 ^a
セッション1 ^d (Day 0)	19 (2.7 ± 3.5)	11 (1.6 ± 2.1)
セッション2 (TAI後7日)	15 (2.1 ± 2.4)	4 (0.6 ± 0.8)
セッション3 (TAI後14日)	38 (5.4 ± 5.8)	10 (1.4 ± 1.8)
セッション4 (TAI後21日)	27 (3.9 ± 3.5)	11 (1.6 ± 2.6)

^{a, b}: 同列の2群間での有意差 (*P < 0.05, **P < 0.01).

a): 1回のOPU当たりの平均値(±標準偏差)をカッコ内に示す。

b): Day 0 = OPU-PRID-TAI protocol開始日。

c): 直径100 μm以上で正常な卵丘細胞を有する卵子

d): セッション1において産出された胚盤胞 (体外受精から7-9日)数。

回収卵子数およびその後に発育した胚盤胞数は4つのOPUセッション間において差を認めなかったが、その結果は妊娠早期における7日間間隔の連続OPUによって回収された卵子も数量的に問題ないことを示唆するものである。妊娠期におけるOPU実施の間隔については2週間に1回が良いとする報告もあることから、今後の詳細な検討が望まれる。

4つのセッション合計のOPU成績は離乳群が授乳群と比較して良好であった。このことは、離乳牛からのOPUが数量ともに高いレベルの卵子を採取することができることを示唆する結果であるといえる。その理由として、離乳牛の多くが分娩後の卵巣機能を回復しているために小卵胞群の正常な発育がOPU実施時まで開始していたからだと考えられる。さらに、授乳牛においては正常な性腺刺激ホルモンの分泌が抑制されていたという

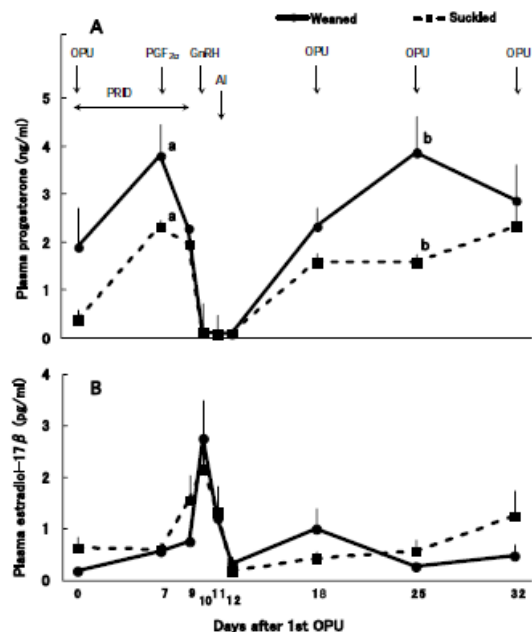


図 2. 分娩後早期の黒毛和種経産牛に OPU-PRID-TAI 処置を行った際の、離乳群 (Weaned, n=7) および授乳群 (Suckled, n=7) における血漿中プロゲステロン (A) およびエストロジオール-17β 濃度 (平均±標準誤差) 推移の比較. OPU: 卵子採取 (Ovum pick-up), PRID: 腔内留置型プロゲステロン製剤 (9 日間留置), AI: 人工授精.

ことも考えられる. このことは, プロゲステロン濃度が授乳牛においてより低値を示したという今回の結果からも推察することができる. 今後の展望として, 授乳が OPU 実施時における FSH 分泌および LH 分泌に及ぼす影響について明らかにする必要がある.

従来のオブシンク法において, PGF_{2α} 製剤投与から 2 回目の GnRH 製剤投与までの 48 時間, 一時的に子牛を授乳牛から離すことで TAI 後の受胎率が向上したという報告もあることから, 今回我々が実施した OPU-PRID-TAI 処置においても一時的な子牛の隔離は受胎率および OPU 成績の向上に有効かもしれない.

結論として, 分娩後早期の黒毛和種牛において OPU-PRID-TAI 処置を実施するとともに TAI 後に連続 OPU を行うことで, 品質の高い移植可能胚を効率よく産生することが可能であることが示された. これに子牛の一時的な隔離を加えることでさらなる成績の向上が期待できる.

5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Hirata T, Sato M, Sasaki S, Sasaki O, Osawa T. Effect of suckling on embryo production by repeated ovum pick-up before and after timed artificial insemination in early postpartum Japanese Black cows. J. Reprod. Dev., 54: 346-351, 2008. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

① 佐々木修一, 三浦優子, 佐々木 修, 昆直樹, 杉山あかね, 平田統一, 大澤健司, 黒毛和種母子牛の分娩後 1 週あるいは 3 ヶ月における分離が子牛の発育性と母牛の繁殖性に及ぼす影響 (2), 第 58 回東北畜産学会大会, 2008. 8. 21-22, 福島・杉妻会館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大澤 健司 (OSAWA TAKESHI)
岩手大学・農学部・准教授
研究者番号: 90302059

(2) 研究分担者

平田 統一 (HIRATA TOH-ICHI)
岩手大学・農学部・助教
研究者番号: 20241490

(3) 連携研究者

なし