

## ウシ腔内留置型ホルモン製剤に着目した繁殖技術向上に関する研究

倉原 貴美・安達 聡・藤田 達男

大分県農林水産研究指導センター畜産研究部

**要 約** ウシ受精卵移植は家畜改良増殖を加速する手法、並びに生産性向上に資する手法として有効であることから、全国的に移植頭数は増加傾向にある。しかし、その受胎率については、40%前後で推移し、家畜人工授精と同等の受胎率に達していないのが現状で、その対策は重要な課題である。そこで本研究では、安息香酸エストラジオール含有ウシ腔内留置型黄体ホルモン製剤（以下：PRID）を活用した、高品質胚を安定的に多く確保するための過剰排卵（以下：SOV）処理プログラムの検討、PRIDを活用した繁殖雌牛の発情同期化処理について検討を実施した。

1. PRIDを用いた漸減投与法によるSOV処理におけるクロプロステノール（プロスタグランジンF2 $\alpha$ 類縁体（以下：PGF2 $\alpha$ ）の投与時期について検討した結果、PRID挿入後4日目の9:00投与と6日目9:00投与の間の採卵成績に有意な差は認められなかった。

2. SOV処理における豚由来卵胞刺激ホルモン（以下：pFSH、アントリンR、（株）川崎三鷹製薬）投与手法について検討した結果、pFSH投与量20AU、30AU及び溶媒液として生理食塩水10ml、20ml、50mlをそれぞれ頸部皮下投与を行ったものと、3日間の頸部筋肉内投与による漸減投与法の間での採卵成績に有意な差は認められなかった。

3. pFSH20AUを50mlの生理食塩水に融解後頸部皮下に単回投与を行い、ウマ血清由来性腺刺激ホルモン（以下：eCG、セロトロピン、（株）あすか製薬）の投与回数、投与時期について検討した結果、PRID挿入6日後のeCG400単位の1回投与（9:00）と200単位の2回投与（9:00、16:00）及びeCG400単位の同日9:00投与と16:00投与の間に有意な差は認められなかった。

4. PRIDを6日から7日留置を行い、抜去後の定時授精による人工授精及び受精卵移植による受胎率の検討を行った結果、黒毛和種雌牛への人工授精で50%以上、受精卵移植（新鮮卵）で83%の受胎率を示し、発情同期化処理に有効なプログラムであることが示唆された。

**キーワード：** PRID、pFSH単回投与法、発情同期化処理

### 緒 言

ウシ受精卵の受胎率向上には、良質な受精卵を安定的に供給することが必要条件の一つである。受精卵の生産には、ホルモン製剤によるSOV処理が広く用いられており、その手法は雌牛の性周期に基づき発情後の黄体開花期（7~8日）から、黄体の退行が始まる15日までの間にSOV処理を開始するか、性周期に関係なく人為的にSOV処

理が開始可能な腔内留置型ホルモン製剤を活用した処理法で行われている。また、SOV処理に係るpFSHの投与は、その効果の持続時間の短さ<sup>1)</sup>を補うため、3日から4日の間に12時間毎に投与を行う漸減処理法が主要な処理法として活用されているが、この手法は、作業の煩雑性並びに家畜へは負担が大きいことから、投与回数が少なく処理可能な手法についての検討も実施されて

いる。磯崎らは、ワクチンのアジュバントや薬剤の賦形剤として利用されている高分子吸着・徐放能を有する水酸化アルミニウムゲルに、30AUのpFSHを吸着させ皮下投与することで漸減投与方法と同等の正常受精卵数を得ている<sup>2)</sup>。また、西宮らは、PRIDに装着されている安息香酸エストラジオールカプセル装着の有無によるSOV処理の検討を行い、有意な差は認めないものの装着有で黄体数、採卵総数及び正常卵数で高い数値を示したと報告している<sup>3)</sup>。そこで本研究では、PRIDを活用した高品質胚を安定的に多く確保するためのSOV処理プログラムの検討、PRIDを活用した繁殖雌牛の発情同期化処理について検討を実施した。

## 材料および方法

### 1. 過剰排卵処理プログラムの検討

#### 1) pFSH漸減投与方法によるPG投与時期の検討(単独試験)

2009年8月から2010年12月の間に、供試牛延べ16頭(内7頭は60日以上 of 休息期間を設けて反復使用)を用いて、発情前後2日以内を避け、膈内にPRID (TEIZO: (株)あすか製薬)を挿入(挿入日を0日とする)、4~6日目にpFSH20AUを3日間(朝9:00・夕16:00:5・5AU, 3・3AU, 2・2AU, 頸部筋肉内投与)の漸減投与を行った。試験区は、PGF2 $\alpha$ 、エストラメイト、(株)ナガセ医薬品、頸部筋肉内投与) 0.75mgを4日目の9:00に、対照区では6日目の9:00に投与を行い、PRIDの抜去はいずれも6日目の9:00に実施。7日目の16:00に、ブセレリン酢酸塩(性腺刺激ホルモン放出ホルモン誘導体(以下:GnRH)、イトレリン、(株)あすか製薬)を10.5 $\mu$ g頸部筋肉内に投与し、8日目16:00に人工授精を実施した(図1)。

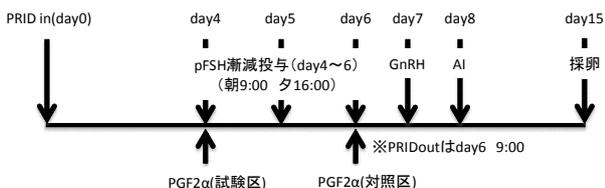


図1 PG投与時期の検討

採卵は1%子牛血清および抗生物質(ペニシリンGカリウム10万単位・硫酸ストレプトマイシン0.1g)を添加した乳酸化リンゲル液(1000ml)を還流液として、定法に従い非外科的に行い採卵成績について比較検討を実施した。

### 2) pFSH投与手法の違いが採卵成績に及ぼす影響

#### ①11府県による共同試験(平成22年度)

2010年4月から2011年1月の間に、黒毛和種若しくは褐毛和種17頭(最大22頭)の経産牛についてラテン方格法によりSOVを実施した(表1)。発情前後2日以内を避け、膈内にPRIDを挿入(挿入日を0日とする)、4日目の9:00にpFSH30AU又は20AUを生理食塩水50ml又は10mlに溶解(試験区)、それぞれ頸部皮下に投与した。対照区については、pFSH20AUを3日間(朝9:00・夕16:00:5・5AU, 3・3AU, 2・2AU, 頸部筋肉内投与)の漸減投与とした。PGF2 $\alpha$ は試験区、対照区共に、4日目9:00に0.75mg投与後、6日目9:00にPRIDの抜去を行い、7日目16:00にGnRHを10.5 $\mu$ g頸部筋肉内に投与、8日目16:00に人工授精を実施した(図2)。

表1 平成22年度試験 供試牛配置結果

pFSH 投与量	生理食塩水 溶解量	投与方法	供試牛		
30AU	50ml	頸部皮下	A	B	C
	10ml	頸部皮下	C	A	B
20AU	50ml	頸部皮下	D	E	F
	10ml	頸部皮下	E	F	D
	10ml	頸部筋肉内	B・F	C・D	A・E

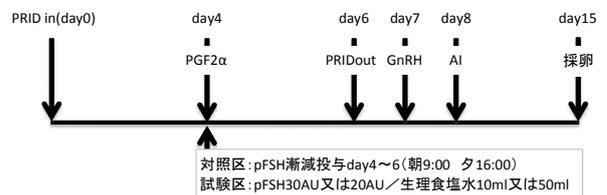


図2 pFSH量・溶媒量の検討(共同試験)

pFSHの体内動態を調査するため、4日目の投与前9:00から19:00までの2時間毎と、5日目から7日目までについては、9:00と16:00に採血を行った。また、卵胞の発育、黄体の退行状況を調査するため、4日目から9日目までの9:00に、超音

波診断装置（日立製ECHOPAL II：型式EUB-405B）を用いて卵胞径の計測と黄体の画像診断を実施した。採卵は、定法により非外科的に行い採卵成績について比較検討を実施した。

②県単独試験

2009年8月から2010年12月の間に年齢4.3～14.5歳（平均9.4歳）の黒毛和種雌牛延べ22頭（内、5頭は60日以上以上の休息期間を設けて反復実施）にPRIDを発情前後を避けて挿入し（挿入日を0日とする）、4日目にpFSH20AUを20mlの生理食塩水に溶解後、頸部皮下に投与した。対照区には、1）試験のpFSH20AUの3日間漸減投与による投与方法とした。両区とも、PGF2αの投与は4日目9:00、PRIDの抜去は6日目9:00とし、7日目の16:00にGnRH 10.5μgを頸部筋肉内に投与後、8日目の16:00に人工授精を実施した（図3）。採卵は、定法により非外科的に行い採卵成績について比較検討を実施した。

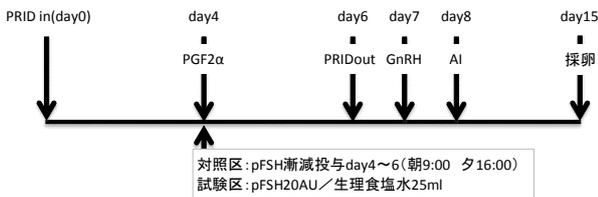


図3 pFSH溶解量の検討(県単独)

3) pFSH単回投与方法におけるeCG投与による良質胚生産についての検討(11府県による共同試験:平成23年度)

2011年4月から2012年1月の間に、黒毛和種若しくは褐毛和種34（最大35頭）頭の経産牛についてラテン方格法（表2）により、2）（1）で実施したpFSH20AUを50mlの生理食塩水に融解後、頸部皮下に単回投与した手法を基にSOVを実施した。6日目の9:00にeCGを400単位投与区と、同日の9:00に200単位、16:00に200単位の2回投与区、及びeCG無投与区を設定し、7日目の16:00にGnRH 10.5μgを頸部筋肉内に投与後、8日目の16:00に人工授精を実施した（図4）。採卵は、定法により非外科的に行い採卵成績について比較検討を実施した。

表2 平成23年度試験 供試牛配置結果

eCG投与方法	供試牛		
単回区	A	B	C
2回区	B	C	A
対照区	C	A	B

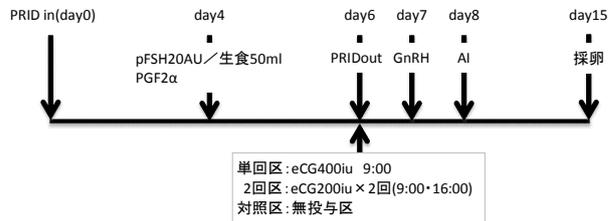


図4 eCG投与量の検討(共同試験)

卵胞の発育、黄体の退行状況を調査するため、4日目から9日目までの間、9:00に、超音波診断装置を用いて卵胞径の計測と黄体の画像診断を実施した。採卵は定法により非外科的に行った。

4) pFSH単回投与方法におけるeCG投与時期の検討(11府県による共同試験)

2012年4月から2013年1月の間に、黒毛和種123頭の経産牛についてラテン方格法により比較検討した。eCG投与時期の検討については、2）（1）で実施したpFSH20AUを50mlの生理食塩水に融解後、頸部皮下に単回投与した手法を基に、eCG400単位を6日目9:00に投与する区、同単位を同日16:00に投与する区、並びにeCG無投与区に設定、いずれもPRIDの抜去を6日目16:00に実施した後、7日目の16:00にGnRH10.5μgを頸部筋肉内に投与後、8日目の16:00に人工授精を実施した（図5）。また、卵胞の発育、黄体の退行状況を調査するため、4日目から9日目までの間、9:00に、超音波診断装置を用いて卵胞径の計測と黄体の画像診断を実施した。採卵は、定法により非外科的に行い採卵成績について比較検討を実施した。

表3 平成24年度 供試牛配置結果

投与・抜去時期		供試牛		
eCG投与	6日目9:00	A	B	C
	6日目16:00	B	C	A
無投与区		C	A	B
PRID抜去	6日目9:00	D	E	
	6日目16:00	E	D	

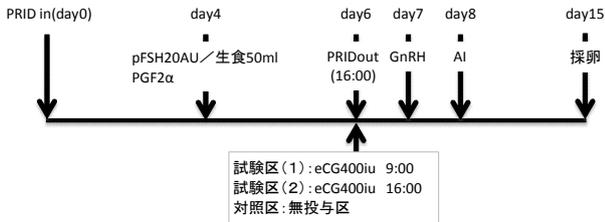


図5 eCG投与時期の検討

## 2. PRIDによる発情同期化処理の検討

2010年6月から2012年10月の間に、分娩後50日を経過し発情兆候を示さないものを含む乳用種（ホルスタイン種）5頭、黒毛和種23頭に対し、PRIDを挿入（挿入日を0日とする）、挿入と同時にPGF2α 0.75mgを投与（4頭）、又は6日から7日間の留置後、抜去と同時にPGF2α 0.75mgの投与（24頭）を行い、PGF2α投与後31時間から48時間後にGnRH10.5μgを頸部筋肉内に投与した。GnRH投与から16時間後に人工授精を実施（15頭）、又はGnRH投与日から起算して8日目に受精卵移植を実施（9頭）した。また、1. 1). (2) のpFSH20AUを25mlの生理食塩水に溶解して実施する過剰排卵処理と同スケジュールでPRIDの挿入又は抜去を行い、抜去と同時にPGF2α 0.75mgを投与、31時間後にGnRH10.5μgした後、GnRH投与から起算して8日目に新鮮卵移植を実施（6頭）した。

## 結果

### 1. 過剰排卵処理プログラムの検討

#### 1) pFSH漸減投与法によるPG投与時期の検討（単独試験）

超音波診断装置による採卵後の推定黄体数は、試験区10.2±1.8、対照区8.4±1.3、回収した採卵数は試験区10.0±1.8、対照区6.6±1.5で、その内の正常卵数は、試験区6.9±2.1、対照区4.4

±1.1であった（表4）。また、回収した受精卵の品質については、試験区のAランク5.7±4.8、Bランク0.9±0.3、Cランク0.3±0.3であり、対照区では、Aランク3.8±2.7、Bランク0.2±0.1、Cランク0.6±0.3であった。統計処理において、未受精卵数で試験区が有意に多い結果（p<0.05）であったが、正常卵のBランクで試験区が対照区に対し有意に多い結果（p<0.05）となり、両者間における回収した受精卵数には有意な差は認められなかった。

表4 採取成績に及ぼす影響

試験区分	頭数	推定黄体数	採卵数	正常卵数
試験区	7	10.2±1.8	10.0±2.8	6.9±2.1
対照区	9	8.4±1.3	6.6±1.5	4.4±1.1

表5 回収卵の品質に及ぼす影響

試験区分	正常卵数	正常卵の内訳(%)			変性卵	未受精卵
		Aランク	Bランク	Cランク		
試験区	6.9±2.1 (68.8%)	5.7±4.8 (57.1%)	0.9±0.3* (8.6%)	0.3±0.3 (2.9%)	2.2±0.6 (21.5%)	1.0±0.5* (10%)
対照区	4.4±1.1 (67.8%)	3.8±2.7 (57.6%)	0.2±0.1* (1.7%)	0.6±0.3 (8.5%)	1.9±1.1 (28.9%)	0.3±0.2* (3.4%)

\*: P<0.05

### 2) pFSH投与手法の違いが採卵成績に及ぼす影響

#### ①11府県による共同試験（平成22年度）

pFSHの血中動態調査では、pFSH20AUを生理食塩水10mlと50mlにそれぞれ融解した区、及び30AUを50mlに溶解した区間の血中動態に変化は認められなかった。30AUを50mlに溶解した区では、投与後6時間後に著しい上昇を示し、3日間の漸減投与を行った対照区では、10時間後に最高値に達した後、2～3日目の朝夕の2回投与により2峰性の上昇が認められた（図6）。超音波診断装置を用いた卵胞の発育状況を、pFSH投与開始時の小卵胞数を基数とした、卵胞発育割合＝（中・大卵胞数－pFSH投与時中大卵胞数）／pFSH投与開始時小卵胞数×100の数式にて求めた結果、pFSH30AUを投与した区では、投与開始後96時間後、溶媒量10mlが135%、50mlが170%、対照区が153%の発育割合であった。また、20AUを投与した区では、投与開始後96時間後、溶媒量10mlが217%、50mlが248%、対照区が218%であり、pFSH20AUの溶媒量50mlが最も高い卵胞発育割合であった（図7・8）。

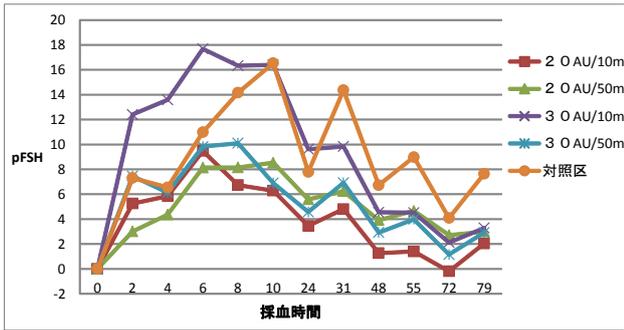


図6 血中pFSH動態結果

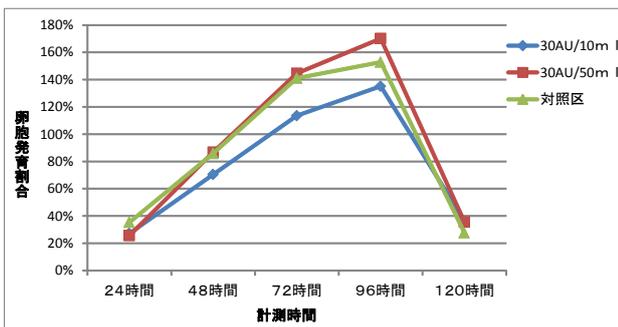


図7 pFSH30AUによる卵胞発育割合

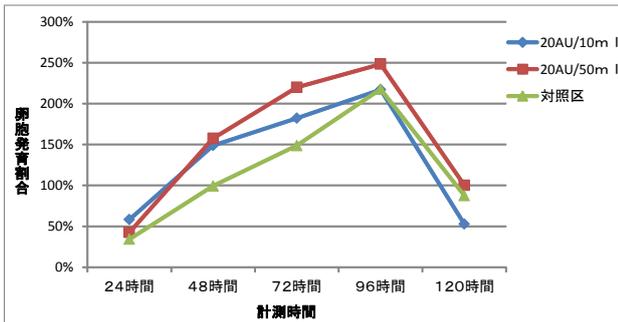


図8 pFSH20AUによる卵胞発育割合

採卵時における黄体数，採卵総数，正常卵数及び正常卵率の平均値は，pFSH20AU投与区の溶媒量10ml区で，15.0個，13.1個，7.5個，60.1%，50ml区で16.3個，15.0個，9.2個，63.8%，一方，対照区では17.0個，16.2個，8.7個，56.8%であり，いずれの項目間に有意な差は認められなかった．また，pFSH30AU投与区の溶媒量10ml区では，それぞれ18.6個，20.1個，7.7個，48.6%，50ml区で19.1個，16.2個，8.5個，58.3%，一方，対照区では18.6個，15.2個，8.9個，64.3%であり，このpFSH30AU区においても項目間に有意な差は認められなかった（表6）．

表6 採卵成績

pFSH	溶媒量	区分	黄体数	採卵総数	正常卵数	変性卵数	未受精卵数	正常卵率	個体数	
20AU	10ml区	平均	15.0	5.0	13.1	7.5	2.0	3.8	60.1%	
		SE	1.9	1.2	2.4	1.7	0.6	1.4	7.6%	
	50ml区	平均	16.3	5.8	15.0	9.2	3.2	4.9	63.8%	
		SE	2.3	1.1	2.4	2.0	0.6	1.0	6.7%	
	対照区		平均	17.0	4.5	16.2	8.7	2.8	4.9	56.8%
	対照区		SE	1.8	1.2	1.9	1.5	0.6	1.8	7.2%
30AU	10ml区	平均	18.6	6.4	20.1	7.7	4.6	8.3	48.6%	
		SE	4.0	1.4	3.9	1.5	1.2	3.4	7.9%	
	50ml区	平均	19.1	6.4	16.2	8.5	3.4	4.1	58.3%	
		SE	2.9	1.4	3.2	2.0	1.2	1.4	8.1%	
	対照区		平均	18.6	4.7	15.2	8.9	2.8	3.5	64.3%
	対照区		SE	3.2	0.8	3.0	1.7	0.6	1.8	7.2%

回収した受精卵の品質におけるAランク（A+A'），Bランク，Cランクの平均値は，pFSH20AU区の溶媒量10ml区で，4.5個，1.8個，1.2個，50ml区で4.6個，3.2個，1.4個であり，対照区では5.2個，2.5個，1.0個と，それぞれの項目間における有意な差は認められなかった．また，pFSH30AU区の溶媒量10ml区では，4.5個，2.1個，1.1個，50ml区では5.4個，1.6個，1.5個、一方，対照区では4.1個，3.6個，1.2であり，このpFSH30AU区においても有意な差は認められなかった（表7）．

表7 受精卵の品質結果

pFSH	溶媒量	区分	A	A'	B	C	A+A'	個体数	
20AU	10ml区	平均	1.3	3.3	1.8	1.2	4.5	n=22	
		SE	0.6	1.3	0.5	0.3	1.3		
	50ml区	平均	3.1	1.5	3.2	1.4	4.6	n=22	
		SE	1.0	0.4	0.9	0.3	1.2		
	対照区		平均	2.3	2.9	2.5	1.0	5.2	n=22
	対照区		SE	0.8	0.9	0.8	0.3	1.2	
30AU	10ml区	平均	1.8	2.6	2.1	1.1	4.5	n=17	
		SE	0.6	1.0	0.6	0.3	1.1		
	50ml区	平均	2.5	2.9	1.6	1.5	5.4	n=17	
		SE	1.1	0.6	0.6	0.7	1.4		
	対照区		平均	1.8	2.3	3.6	1.2	4.1	n=17
	対照区		SE	0.5	0.6	1.6	0.4	0.9	

② 単独試験

採卵成績について比較検討を行った結果，推定黄体数，採卵総数，正常卵数，変性卵数及び未受精卵数で試験区と対照区間の有意な差は認められず，正常卵率で対照区が56%，試験区が66%であった（表8）．また，受精卵の品質についても，各ランク間に差は認められず，対照区のAランク数は5.6±4.5で，対照区のそれは5.1±4.6であった（表9）．

表8 採卵成績

区分	個体数	推定黄体数	採卵総数	正常卵数	変性卵数	未受精卵数	正常卵率
試験区	平均	9.4	8.3	5.5	2.0	0.8	66%
	SE	5.1	7.1	4.6	2.9	0.7	
対照区	平均	12.0	11.1	6.3	2.4	2.7	56%
	SE	4.6	7.7	4.7	2.6	2.4	

表9 受精卵の品質結果

区分	平均	A	A'	B	C	A+A'
試験区	平均	2.3	2.8	0.2	0.2	5.1
	SE	2.5	2.8	0.4	0.4	4.6
対照区	平均	2.9	2.7	0.5	0.2	5.6
	SE	2.4	2.6	0.8	0.6	4.5

3) pFSH単回投与法におけるeCG投与による良質胚生産についての検討 (11府県による共同試験：平成23年度)

採卵成績について、黄体数、遺残卵胞数、採卵総数、正常卵数、変性卵数、未受精卵数及び正常卵率でeCG400区、eCG200の2回区及び対照区間に有意な差は認められなかった(表10)。また、受精卵の品質についても同様に差は認められず、Aランク数で、eCG400区が $6.1 \pm 0.9$ 、eCG200の2回区が $5.2 \pm 0.8$ 、対照区が $5.3 \pm 0.8$ であった(表11)。超音波診断装置を用いた卵胞の発育状況は、各区の間に有意な差は認められなかった。

表10 採卵成績

区分	黄体数	遺残卵胞数	採卵総数	正常卵数	変性卵数	未受精卵数	正常卵率	黄体数	
eCG400区	平均	18.5	4.2	17.5	10.2	3.9	3.6	58.6%	33
	SE	1.5	0.7	1.8	1.3	0.9	0.7	5.1%	
eCG200×2回区	平均	16.8	6.2	16.5	9.1	3.6	4.1	55.2%	35
	SE	1.8	0.8	2.4	1.1	1.0	1.5	5.0%	
対照区	平均	16.2	5.0	13.4	8.0	3.0	2.7	59.6%	35
	SE	1.7	0.9	1.7	0.9	1.0	0.8	5.0%	

表11 受精卵の品質結果

区分	A	A'	B	C	A+A'	
eCG400区	平均	2.6	3.6	2.8	1.1	6.1
	SE	0.5	0.8	0.6	0.2	0.9
eCG200×2回区	平均	2.5	2.7	2.6	1.0	5.2
	SE	0.5	0.6	0.5	0.2	0.8
対照区	平均	2.9	2.5	1.8	0.8	5.3
	SE	0.5	0.5	0.4	0.2	0.8

4) pFSH単回投与法におけるeCG投与時期の検討 (11府県による共同試験：平成24年度)

採卵成績について比較検討を行った結果、黄体数、遺残卵胞数、採卵総数、正常卵数、未受精卵数及び正常卵率で試験区1・2及び対照区間に有意な差は認められなかったが、変性卵数において、試験区1と対照区間に有意 ( $P>0.05$ ) な差が認められた(表12)。受精卵の品質についても、各ランク間に差は認められず、試験区1のAランク数は $5.0 \pm 1.3$ 、試験区2は $4.9 \pm 1.2$ で、対照区については、 $2.9 \pm 0.8$ であった。また、超音波診断装置を用いた卵胞の発育状況については、特に有意な差は認められなかった。

表12 採卵成績

区分	黄体数	遺残卵胞数	採卵総数	正常卵数	変性卵数	未受精卵数	正常卵率	
試験区1	平均	16.3	9.3	14.4	8.1	4.2*	2.1	63.2%
	SE	0.3	0.9	2.6	1.7	1.0	0.6	4.5%
試験区2	平均	16.3	4.8	12.4	7.7	2.2	2.4	63.9%
	SE	1.9	1.0	1.9	1.5	0.6	0.6	5.7%
対照区	平均	13.7	5.0	8.9	6.5	1.1*	1.3	71.4%
	SE	1.7	0.9	1.7	1.3	0.3	0.5	5.5%

\*  $P>0.05$

表13 受精卵の品質結果

区分	A	A'	A+A'	B	C	
試験区1	平均	2.7	2.3	5.0	2.1	1.0
	SE	0.9	0.7	1.3	0.5	0.4
試験区2	平均	2.2	2.7	4.9	2.2	0.7
	SE	0.8	0.9	1.2	0.5	0.2
対照区	平均	1.3	1.8	2.9	2.4	1.3
	SE	0.4	0.5	0.8	0.8	0.5

2. PRIDによる発情同期化処理の検討

黒毛和種4頭について、PRIDの挿入と同時にPGF2αの投与を行い人工授精を実施した結果、50%の受胎率であった。また、PRIDの抜去と同時にPGF2αの投与を実施したホルスタイン育成牛2頭に対し、凍結受精卵を移植した結果、100%の受胎率であった。同様の処置をホルスタイン成牛3頭に対し行った結果33.3%の受胎率であった。また、同様の処置を黒毛和種に対し実施した結果、人工授精(8頭)は63%、受精卵移植(7頭;凍結受精卵)は14%、受精卵移植(6頭;新鮮卵)は83%の受胎率であった。

表14

処理内容	レシエント	処理頭数	実施頭数	受胎率	実施内容
PRID in + PGF2α	黒毛和種 成牛	4	4	50%	人工授精
	ホルスタイン 育成	2	2	100%	受精卵移植(凍結卵)
	ホルスタイン 成牛	3	3	33%	人工授精
PRID out + PGF2α	黒毛和種 成牛	8	8	63%	人工授精
	黒毛和種 成牛	11	7	14%	受精卵移植(凍結卵)
	黒毛和種 成牛	6	6	83%	受精卵移植(新鮮卵)
	合計	34	30	50%	

\*実施頭数の内、黄体形成不全により4頭除外

## 考 察

ウシ受精卵の作出を行うSOV手法は、3日~4日間の漸減投与による手法が広く用いられているが、作業が煩雑性であること、並びに家畜への負担が大きいこと等から、これらを解消することを目的に、水酸化アルミニウムなどの溶媒液を用いた単回投与法の検討、投与位置の検討などが行われてきた。しかし、これら手法は実用化までには至っておらず、フィールドでは今もなお漸減投与法が主要な手法として実施されている。これら溶媒液を用いた単回投与法並びに投与位置の検討などは、pFSHの血中吸収を緩やかに行うことにより、血中pFSH濃度を高値に維持しつつ持続的に卵巣に作用させることを目的に行われてきたもので、いずれも筋肉内投与を行う漸減投与法と同等の採卵成績を示している

2). 漸減投与法又は単回投与法いずれも、発情後の性周期に基づいたSOV手法、又は人為的にSOVの開始が可能な腔内留置型プロゲステロン製剤を用いたSOV手法等様々な手法が実施されている。腔内留置型プロゲステロン製剤は、黄体から分泌されるプロゲステロンと同様に、視床下部からのGnRH分泌を抑制し主席卵胞の成熟並びに排卵抑制を行う作用を有することから、発情同期化処理にも用いられている。また、併用して投与されるエストラジオール製剤は、エストロジェンの負のフィードバック作用によりFSH分泌を抑制し投与時に存在する卵胞を閉鎖退行させる。また、代謝されて血中濃度が低下するとFSH分泌の抑制が解除され新たな卵胞ウェーブが発現する特徴を有する。我々はこれら作用を有する腔内留置型ホルモン製剤（PRID）を用いて、生理食塩水を溶媒液としたpFSH単回投与によるSOV手法の検討を行った結果、溶媒量10ml, 20ml, 50mlの何れも漸減投与法と同等の採卵成績を得ることができた。また、pFSHの投与量についても、単回投与法の20AU, 30AUと漸減投与法の20AUの間に差は認められず、超音波診断装置による卵胞発育割合については、20AU投与が高い発育を示した結果であった。腔内留置型ホルモン製剤抜去時にPGF2 $\alpha$ の投与を行う手法は、発情発現時間に差が認められることから、pFSH投与時にPGF2 $\alpha$ の投与を行い、黄体から分泌されるプロゲステロン作用を消滅させ、ホルモン製剤によるプロゲステロン作用のみによるSOV手法について検討した結果、漸減投与法と同等の採卵成績を得たことは、発情誘起とこれに係る定時授精との整合性が得られた事が示唆された。なお、これにより作業の煩雑性の解消と家畜への負担軽減となった訳だが、多回投与による家畜へのストレス軽減からの良質胚増産には至らなかった。漸減投与法と単回投与法との比較におけるpFSH血中動態調査では、24時間後の単回投与法の濃度が、漸減投与法と比較し低

値であったことから、pFSHに比べて半減期の長いeCGをSOVの後半に投与した結果、eCG総量400単位の1回投与と2回投与では、無投与区との間で採卵成績に差は認められなかった事は、eCGの薬理作用である、雌性動物に対し主にFSH（卵胞刺激ホルモン）様作用を持ち、LH（黄体形成ホルモン）様作用も弱く持つことによる、無投与区に対して早めのLHサージが発生したことが採卵成績に影響したと考える。このことから、PRID抜去時期を7時間後に変更し、eCG400単位の投与時間をPRID抜去日の9:00と16:00について比較検討したが、対照区と比較し黄体数、採卵総数で多い傾向にあったが採卵成績については有意な差は認められなかった。腔内留置型ホルモン製剤を用いて、ホルスタイン種及び黒毛和種雌牛に対する発情同期化処理について検討を行った結果、PRID挿入時にPGF2 $\alpha$ の投与を行ったもの及びPRID抜去時にPGF2 $\alpha$ の投与を行ったものに対する人工授精の受胎率は、50%以上を示した。また、eCGを用いない単回投与法によるSOV手法と同時にPRIDの挿入を行い、発情同期化処理を行ったものについて新鮮卵移植を行った結果、83%の受胎率を得ることができた。PRIDに含まれる安息香酸エストラジオールは、挿入後150分で高値に上昇後、3日目以降低下し始める薬理動態を示す。この発情同期化処理では、6日間の留置を行うことで、新たな卵胞ウェーブの出現と、プロゲステロンによる主席卵胞の成熟が、発情並びにその後の黄体形成に連動した事と考える。黒毛和種受精卵移植では、胚に関する要因（胚のステージ、胚の品質等）、胚を受け入れる牛（レシピエント）に関する要因（年齢、発情後の日数、黄体発生状況、黄体と子宮の調和等）、移植技術に関する要因（移植器具の取り扱い、凍結胚の融解、注入位置等）について正しく理解し、すべての要因を満たすことで高受胎率を得ることができるとされる。今回の試験では、胚に関する要因について、SOV手法の見直しによ

平成 24 年度試験成績報告書：42 1-8 (2012)

る良質胚生産と胚を受け入れる牛に関する要因として発情同期化処理について検討した結果，SOVを単回投与手法で従前の漸減投与法と同等の採卵成績を得たことは，フィールドでの作業の煩雑性の解消となったと考える．また，発情同期化処理についても，6日から7日間の留置期間で人工授精で50%，新鮮卵移植で83%の受胎率が得られたことは，同期化プログラムとして有用であることが示唆された．しかし，凍結卵移植における受胎率が低値であったことは，凍結処理に対する耐凍性並びに受精卵の品質を評価する手法の検討が今後必要と考える．また，SOV処理におけるeCGの活用法については，継続して検討する．

### 引用文献

1) Demoustier, N.M., Beckers, J.F., Van Der

Zwalmen, P., Closset, J., Gillard, J.L., and F.

Ectors. 1988. Determination of porcine plasma follitropin levels during superovulation treatment in cows.

Theriogenology, 30: 379-386.

2) 磯崎良寛・稲田 淳・浅田研一・古賀鉄也・木村康二・角川博哉・平子 誠. 2007. 黒毛和種雌牛における卵胞刺激ホルモン皮下1回投与による過剰排卵誘起法第1報 水酸化アルミニウムゲル吸着卵胞刺激ホルモン投与牛における血漿中卵胞刺激ホルモン濃度の推移および過剰排卵誘起効果.

3) 西宮弘・高橋利清・伊藤隆. 2011. ウシ過剰排卵処理における安息香酸エストラジオールの経膈投与効果と定時授精に向けたプロスタグランジンF2 $\alpha$ の類縁体制剤および性腺刺激ホルモン放出ホルモン類縁体制剤の応用.

4) 家畜人工授精講習会テキスト（家畜体内受精卵・家畜体外受精卵移植編）. 2011. 平成22年3月発行. 45-73. 社団法人家畜改良事業団. 東京.

5) 家畜人工授精講習会テキスト. 2006. 平成18年3月改訂版. 135-138. 社団法人日本家畜人工授精師協会. 東京.