

乳用種育成牛由来の雌受精卵による効率的後継牛確保対策

滝澤 亮・倉原 貴美

大分県農林水産研究指導センター畜産研究部

要 約 乳用種育成牛に対する雌性判別精液を用いた受精卵作出のための過剰排卵処理法と、その受精卵を受胎率の低い経産牛へ移植する際、黒毛和種の受精卵移植技術で用いられている黄体機能強化・発情同期化処理を行うことが、受胎率の向上に及ぼす影響についての検討を行った。育成牛への過剰排卵処理には、FSH 製剤のワンショット法が簡便で有効であった。経産牛への黄体機能強化・発情同期化処理には、FSH30AU 投与が有効であった。また、子宮頸管粘液をキモトリプシン製剤（消炎酵素剤）で軟化させることで、採卵工程の簡略化を図ることができるとともに、検卵作業の効率化につながる事が示唆された。

(キーワード: 乳牛雌性判別精液, ワンショット法, キモトリプシン製剤)

緒 言

酪農家にとって安定的な後継牛確保は大きな命題であり、雌性判別精液はその命題を解決する重要なツールである。近年、乳用種経産牛は、育種改良により泌乳能力が飛躍的に向上し、そのため負のエネルギーバランスに陥りやすく、発情兆候の微弱化さらに受胎率の低下へと問題は深刻化している^{1) 2)}。そこで、受胎率の低い経産牛を活用した後継牛確保対策として、①黒毛和種の受精卵採取技術を雌性判別精液を用いた乳用種育成牛へ応用できるかの検証と、②人工授精で見送られてきた経産牛の発情兆候不明瞭牛及び暑熱期への受胎率向上へのアプローチとして用いられる黄体機能強化・発情同期化処理法を用い、乳用種育成牛由来雌受精卵を経産牛へ移植し、効率的な後継牛の確保並びに受胎率向上へ向けた検討を行った。

材料および方法

1. 乳用種育成牛への過剰排卵処理法の検討

黒毛和種の過剰排卵処理法は、畜産研究部内繋養ホルスタイン種育成牛延べ 26 頭を用いて、FSH 製剤の漸減投与法と単回投与方法（以下ワンショット法）を実施し、その採卵成績について比較・検討を行った。漸減投与法は、黄体期を確認後、腔内留置型黄体ホルモン製剤（以下 CIDR）を挿入（day0）。day4 に FSH 製剤（アントリン R・10）を朝夕 2 回 3 日間

（5AU×2 回，3AU×2 回，2AU×2 回（計 20AU））皮下投与し、併せて PGF_{2α} を頸部筋肉内に投与した。day6 に CIDR を撤去し、day7 に GnRH を投与後 day8 に人工授精（以下 AI）を実施、day15 に子宮灌流により受精卵を回収した。ワンショット法は、FSH 製剤の投与を day4 に FSH 製剤（アントリン R・10）20AU の単回皮下投与を実施する他は漸減投与法と同様の手法で実施した。

2. 低濃度の FSH 製剤投与を用いた黄体機能強化・発情同期化処理による受胎率調査

研究部内繋養ホルスタイン種経産牛 13 頭を用いて、低濃度 FSH 製剤投与での複数卵胞の形成による黄体数及び受精卵移植後の受胎率調査を行った。手法は、黄体期を確認後、CIDR を挿入（day0）。day4 に低濃度 FSH 製剤を皮下投与し、併せて PGF_{2α} を投与した。day6 に CIDR を撤去し、day7 に GnRH を投与後 day8 に発情を確認し、day15 に受精卵移植を実施した。投与する FSH 製剤の AU 数は、黒毛和種に用いられている 20AU と 30AU について比較検討を行った。

3. 乳用種育成牛からの採卵率（回収受精卵数/推定黄体数）向上対策の検討

（1）プレ試験

と場由来卵巣より作出した体外受精卵9個を用い、頸管粘液の影響を減弱させることを目的として使用するキモトリプシン製剤（キモチーム：消炎酵素剤）

の受精卵に及ぼす影響と至適濃度の検討を行った。方法は子宮灌流液に対してキモトリプシン製剤 0.01%～10%混合し、体外受精卵を感作させた。感作温度は 37℃、感作時間を 10 分～over night とした。

(2) 本試験

乳用育成牛4頭を供試し、灌流液 1,000ml に対しキモトリプシン 25,000 単位 10ml(1%)を注入し、頸管粘液の減弱化を目的とした採卵試験を実施した。従来の採卵工程³⁾では、子宮頸管拡張棒で頸管を拡張後、粘液除去棒で子宮頸管粘液を除去し、バルーンカテーテルを挿入し、子宮灌流を実施するところ、本試験では粘液除去棒の工程を省き、直接バルーンカテーテルを挿入し、1%キモトリプシン添加灌流液にて子宮灌流を実施し、採卵率等を確認した。

結 果

1. 乳用種育成牛への過剰排卵処理法

乳用種育成牛への FSH 製剤による過剰排卵処理法として、FSH 製剤の漸減投与方法とワンショット法を比較したところ、採卵成績に有意差を認めなかったことから、簡便であるワンショット法を過剰排卵処理法に用いることとした(表1、図1)。

2. 低濃度の FSH 製剤投与を用いた黄体機能強化・発情同期化処理による受胎率調査

乳用種経産牛への FSH 製剤の投与 AU 数は、

20AU 投与群と比較して 30AU 投与群で有意に黄体数が多かったことから、経産牛への黄体機能強化・発情同期化処理には 30AU を用いた(表 2)。FSH 製剤 30AU 処理後の受胎率は、経産牛 13 頭中 4 頭が受胎(受胎率 31%)。また、FSH 投与開始前後 5 日間の乳量については、投与前後で有意差を認めなかった(表 3)。

3. 乳用種育成牛からの採卵率(回収受精卵数/推定黄体数)向上対策の検討

(1) プレ試験

体外受精卵を用いてキモトリプシン製剤の受精卵に影響を及ぼす濃度を検討した結果、キモトリプシン製剤(25,000 単位)を灌流液に 5%添加し、37℃ over night 感作でも変性が観察されなかった(表 4)。

安全域を考慮し、本試験では採卵時灌流液にキモトリプシン製剤(25,000 単位)を 10ml(1%相当)添加した。

(2) 本試験

採卵率は 35.0±40.9%であり(表 5)、添加前の 26.3±37.7%と比較し、採卵率の有意上昇にはつながらなかったが、バルーンカテーテルに子宮粘液が詰まらず、採卵時の一つの工程を省くことができた。また、検卵時の血清由来タンパクによる泡は、キモトリプシン製剤の作用のため消えやすい感触があり、検卵作業の効率化につながることを示唆された。

表1 乳用種育成牛の採卵成績

FSH 投与方法	推定黄体数	回収卵数	正常卵数	未受精卵数	採卵率 (回収卵数/推定黄体数)
漸減投与 (n=10)	7.2±2.6	2.3±2.0	1.3±1.7	0.6±0.7	28.4±23.4
ワンショット (n=19)	5.4±2.7	2.0±3.3	1.3±2.5	0.5±1.2	27.7±34.9

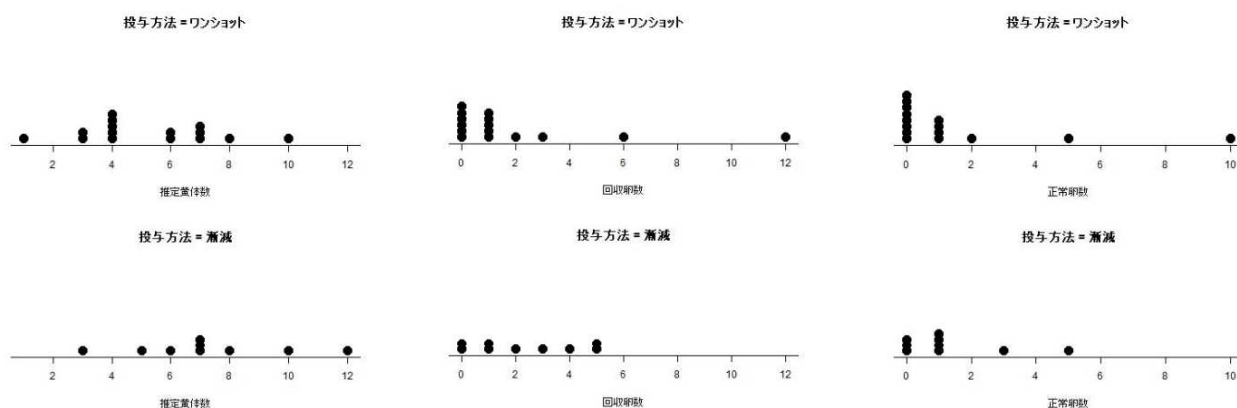


図 1 FSH 製剤の投与方法の違いによる回収卵数・推定黄体数・正常卵数の比較

表2 経産牛FSH投与試験成績

FSH濃度 (AU)	平均卵巣サイズ (cm ³)	黄体数 (個)	
30	39.6	2.4 ^a	n=21
20	8.6	1.3 ^b	n=3

ab間で有意差あり(p<0.05)

表3 FSH(30AU)投与試験成績(個体別)

個体No	卵巣サイズ (cm ³)	黄体数 (個)	5日間平均乳量		妊否
			投与前	投与後	
1	62.2	3	24.7	25.9	-
2	24.1	2	25.2	25.2	-
3	24.4	2	25.1	23.9	-
4	24.0	2	34.9	36.5	+
5	39.6	2	26.0	25.4	+
6	120.0	5	非搾乳牛	非搾乳牛	-
7	32.4	2	28.3	36.3	-
8	30.0	2	27.8	28.2	-
9	47.0	2	非搾乳牛	非搾乳牛	-
10	81.0	2	24.3	31.4	-
11	80.0	3	26.6	27.6	-
12	77.0	3	非搾乳牛	非搾乳牛	+
13	375.0	2	非搾乳牛	非搾乳牛	+

表4 子宮頸管粘液軟化試験(プレ試験)

濃度	感作時間(37°C)					
	10分	20分	30分	60分	90分	over night
0.01%	-	-	-	-	-	-
0.05%	-	-	-	-	-	-
0.10%	-	-	-	-	-	-
0.50%	-	-	-	-	-	-
1.00%	-	-	-	-	-	-
3.0%	-	-	-	-	-	-
5.0%	-	-	-	-	-	±
10.0%	-	-	-	-	-	完全融解
対照	-	-	-	-	-	-

変性なし -

表5 子宮灌流液キモトリプシン製剤添加試験結果

キモトリプシン	推定黄体数	回収卵数	正常卵数	未受精卵数	採卵率 (回収卵数/推定黄体数)
添加前 (n=16)	5.2±2.3	1.9±3.2	1.4±2.7	0.3±0.6	26.3±37.7
添加後 (n=3)	7.3±2.3	3.3±4.2	1.0±1.0	2.0±2.7	35.0±40.9

考 察

乳用種経産牛の分娩間隔は、2016 年度（牛群検定速報より）全国平均で 432 日であり、経産牛での繁殖成績の向上が課題となっている。そこで、受胎率の高い育成牛で、さらに性判別精液を用いて作出した受精卵を用い、経産牛へ移植することで、後継牛確保対策および経産牛の繁殖成績向上を目的として試験を実施した。

黒毛和種の受精卵移植技術で用いられている過剰排卵処理法は、乳用種育成牛でも有効であったが、得られた受精卵を乳用種経産牛へ移植した場合の受胎成績の向上は認められなかった（研究部内生産黒毛和種体内受精卵のうち、乳用種経産牛への移植受胎率；39.0%との比較）。また、乳用種育成牛への FSH 製剤のワンショット法と漸減投与方法については、採卵成績に有意差を認めなかったものの、ワンショット法で回収卵数・正常卵数にバラつきがみられことから、個体差が出やすい投与方法であることに留意が必要と考えられた。

経産牛への低濃度 FSH 投与による黄体機能強化・発情同期化処理は、複数黄体の形成により黄体機能の強化が期待でき、その手法は過剰排卵処理と同じ工程であるため、フィールドでの活用が容易であると考えられた。実際、移植技術者は受卵牛に有意と思われる黄体がない限り移植を実施しないため、本処理方法が受精卵移植を予定通りに実施できるためのツールになると考えられた。

キモトリプシンを用いた子宮頸管粘液の軟化については、採卵率の向上は認められなかったものの、バルーンカテーテルへの粘液の詰まりを認めないことから、採卵の一工程を省くことができ、作業時間の短縮および供卵牛へのストレス軽減につながるとともに、キモトリプシン製剤は消炎酵素剤であり、採卵過程での子宮内等の炎症にも有効と考えられた。さらに、検卵作業時の血清タンパク由来の泡は、キモトリプシン製剤のタンパク分解作用により、消え易くなったと考えられることから、よりスムーズな検卵作業ができることが示唆された。キモトリプ

シン製剤の試験については、今後例数を重ね移植成績と胚の品質評価結果を比較していく必要がある。

文 献

- 1) 中川 浩・安野僚太郎・福留信司・佐藤義政・大矢俊行. 2015. ホルスタイン種未經産牛における性選別精液を用いた採卵技術の検討. 新潟県農総研畜産研究センター研究報告, 18, 22-25.
- 2) 平子 誠・高橋ひとみ・櫛引史郎. 2011. 乳牛の繁殖性低下の現状と子宮環境—繁殖性向上に向けた取り組み—. 日本家畜臨床感染症研究会誌, 6巻3号.
- 3) 梅木英伸・木下正徳. 2006. 牛の受精卵移植技術の実用化に関する研究. 平成17年度大分県畜産試験場報告書, 35.