

胚移植後にプロゲステロン製剤を腔内留置した 受胎牛の受胎成績に関する検討

佐々木恵美 長谷川清寿 安部亜津子 高仁敏光

要約 胚移植（ET）による優良子牛の生産体系への技術応用を目指して、移植後の受胎牛へのCIDR留置について、受胎牛における血中ホルモン動態、ならびにCIDR処置が受胎成績に及ぼす影響を調査し、その処置効果を検討した。交雑種受胎牛（n=4）に1胚を移植（Day7）、その直後からCIDRを腔内留置、14日後（Day21）に抜去して、血中ホルモン動態を調査した結果、受胎牛（n=2）の血中プロゲステロン（P4）濃度は、Day7では5.6および8.3ng/mL、Day14～21では9.0ng/mL以上を維持し、CIDR抜去翌日（Day22）に一過性の低下がみられたものの、Day24～30では5.0ng/mL以上のレベルで推移した。不受胎牛（n=2）のP4は、Day7では5.0および6.5ng/mL、Day17時点で5.0ng/mL以下に、さらにDay22には1.0ng/mL以下に低下、発情徴候が認められた。また、交雑種受胎牛（n=69）を対象として、受胎成績（Day30、Day60）を調査した結果、CIDRを留置した試験区（n=24）の受胎率（58.3%、50.0%）は、対照区（n=45）の受胎率（46.7%、42.2%）と比べて高い傾向であった。同時に、Day30時点で明らかに不受胎と診断した受胎牛について発情再帰を調査した結果、試験区（n=10）の再帰率（70.0%）は対照区（n=24）の再帰率（70.8%）と同等であった。発情再帰までの所要日数（平均±標準偏差）をETの起点となった発情日（Day0）から算出したところ、試験区（23.0±2.5）と対照区（20.8±2.6）では有意差が認められなかった。今後一層の検討を要するが、移植直後の受胎牛へのCIDR腔内留置は、妊娠維持に対する悪影響を認めず、むしろ受胎率を向上させる可能性があることが示唆され、不受胎牛においては極度の発情延長を来たさないことが明らかとなった。

キーワード：ウシ 胚移植 CIDR 受胎率

胚移植（ET）に供用する受胎牛は、移植胚を胎子へと発育させ正常に分娩させる役割を担うため、そのコンディションは受胎成績を左右する一要因として極めて重要である⁶⁾。したがって、①適正な繁殖管理がなされ、移植に適した子宮内環境をつくることができるかどうか、②技術者が移植に適した受胎牛を選定できるかどうか受胎率向上へのポイントであろう。しかし、フィールドにおいては、飼養管理の手法が農場ごとに異なり、また、農家や技術者の技術レベルも様々であり、必ずしも理想的な状況での移植が行われていない可能性もある。そこで、仮に、効果的かつ簡易な受胎牛への処置法が実用化されれば、より多くの受胎牛の子宮内環境を最適化することができ、その結果として地域の受胎率が向上することも想定され、経済的効果は絶大であると思われる。このような効果を期待して、既に、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン製剤（hCG）^{1,8,13)}、性腺刺激ホルモン放出ホルモン製剤（Gn-RH）^{1,8,22)}、プロゲステロン製剤（腔内留置型プロゲステロン製剤：CIDR）^{7,10,14,17,21)}等の投与が検討されている。それらはいずれも、母体の子宮内環境を胚の発育に適した状態に整えるための処置である。このうち、移

植後の受胎牛の腔内へCIDRを留置することによって受胎率が向上するかどうかについては、研究者によって意見が分かれている^{2,7,10,14,17,21)}。しかし我々は、移植直後からCIDRを用いてプロゲステロン（P4）を徐放させれば1回の処置で持続的な効果が期待できることから¹²⁾、再検討の余地があると考えた。

よって本報では、ETによる子牛生産体系への技術応用を目指して、移植後の受胎牛へのCIDR留置について、受胎牛における血中ホルモン動態（実験1）、ならびにCIDR処置が受胎成績に及ぼす影響（実験2）を調査し、その処置効果を検討した。

材料および方法

実験1

供試牛は、発情日（Day0）を基点とした7日目（Day7）に生殖器等の検査を行い⁶⁾、移植可能と判定した交雑種雌牛4頭を用いた。供試牛は全て1頭あたり1胚を移植、その直後からCIDRを腔内留置し、14日後（Day21）に抜去した。血中P4およびエストラジオール（E2）濃度の測定は、継続的に採取した供試牛の末梢血からの分離血漿を用い、時間

分解蛍光免疫測定法で行った。

実験 2

供試牛は、実験 1 と同様な方法で移植可能と判定した交雑種受胎牛 (n=69) を用いた。供試牛は試験区 (n=24) と対照区 (n=45) に区分し、試験区は実験 1 と同様のCIDR処置を行った。移植胚は黒毛和種供胎牛から採取した体内胚を用い、品質はExcellentないしGood¹⁹⁾、発育ステージは後期桑実期ないし胚盤胞期¹⁹⁾とした。移植胚の凍結方法はエチレングリコールを耐凍剤としたダイレクト法¹⁵⁾としたが、一部の胚 (試験区：7、対照区：15) については凍結融解を行わず移植に供した。移植胚数は、受胎牛 1 頭あたり 1 胚とした。妊娠診断は、Day30およびDay60に受胎産物の有無を超音波画像で確認することで行った。

成 績

実験 1

供試牛は、受胎 (n=2) および不受胎 (n=2) に区分された。Day7の血中P4濃度は、受胎牛では5.6および8.3ng/mL、不受胎牛では5.0および6.5ng/mLであった。その後、受胎牛ではDay14~21において9.0ng/mL以上を維持し、CIDR抜去翌日 (Day22) に一過性の低下がみられたものの、Day24~30では5.0ng/mL以上のレベルで推移した。不受胎牛ではDay17時点で5.0ng/mL以下 (1.0ng/mL以上) に低下し、

CIDR抜去翌日 (Day22) にはさらに1.0ng/mL以下に低下した。

また、血中E2濃度について、受胎牛ではDay7~30の調査期間中14.0pg/mL以下で推移した。これに対し、不受胎牛ではDay7~21まで7.0~9.0pg/mLレベルで推移し、CIDR抜去翌日 (Day22) には23.5および31.1pg/mLに上昇し、発情徴候が認められた (図 1)。

実験 2

全ての供試牛で受胎成績を調査した結果 (表 1)、Day30では、試験区が58.3% (14/24)、対照区が46.7% (21/45)であり、Day60では、試験区が50.0% (12/24)、対照区が42.2% (19/45)であった。妊娠診断の時期による区分において、それぞれの数値間に有意差は認められなかったが、いずれの時期においても試験区の受胎率が高い傾向であった。

Day30時点で明らかに不受胎と診断した受胎牛について発情再帰を調査した結果 (表 2)、その再帰率は、試験区が70.0% (7/10)、対照区が70.8% (17/24)であった。また、発情再帰までの所要日数 (平均±標準偏差) をETの起点となった発情日 (Day0) から算出したところ、試験区 (23.0±2.5) と対照区 (20.8±2.6) では有意差が認められなかった。

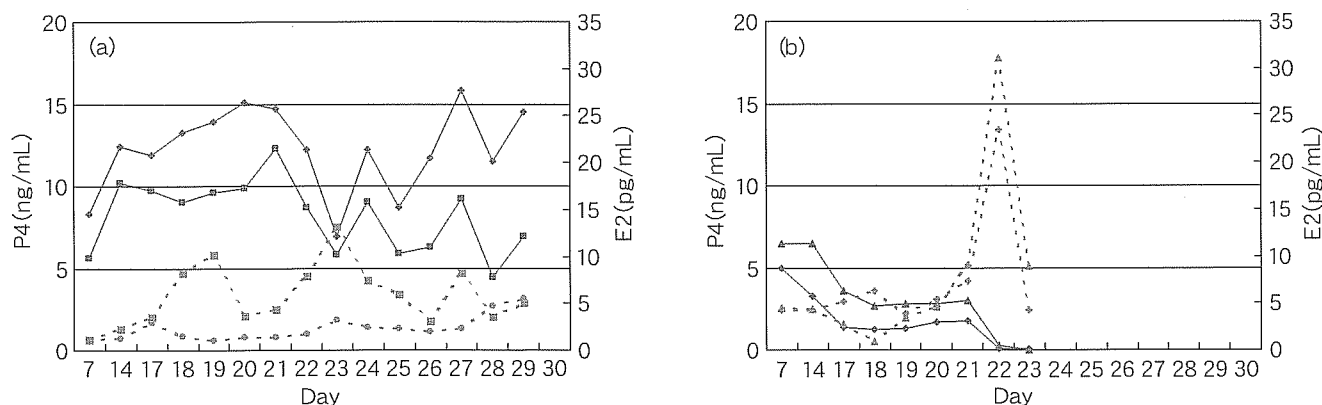


図 1 受胎牛における血中ホルモン濃度の推移
(a) 受胎牛 (n=2) および (b) 不受胎牛 (n=2) における血中ホルモン濃度
実線はP4濃度、破線はE2濃度を示す

表 1 移植成績

区分	移植頭数	受胎頭数	
		Day30 (%)	Day60 (%)
試験区	24	14 (58.3)	12 (50.0)
対照区	45	21 (46.7)	19 (42.2)

表 2 不受胎牛の発情再帰

区分	不受胎頭数 ¹⁾	発情再帰	
		頭数 (%)	所要日数 ²⁾
試験区	10	7 (70.0)	23.0±2.5
対照区	24	17 (70.8)	20.8±2.6

1) Day30時点での不受胎頭数

2) ETの基点となった発情日からの日数、平均±標準偏差

考 察

優良牛生産を目指したETは、国内外で広く行われ³⁾、効果的な育種繁殖手法として認知されてきている⁶⁾。その反面、実際にETの成果を得るためには、供胚牛選定から移植、子牛育成技術に至るそれぞれの技術的ハードルを注意深くクリアすることが求められ、課題も種々残されている。中でも特に、農家レベルでの受胎率の向上は普及開始当初から課題として指摘されており、一層の技術開発が望まれている。ETにおける受胎率向上は農家段階で強く要望されているところであり、様々な角度から技術開発が行われている。このうち、より多くの受胚牛の子宮内環境を最適化する目的で、効果的かつ簡易な受胚牛への処置法が種々検討されている^{1, 7, 8, 10, 13, 14, 17, 21)}。今回我々は、移植直後のCIDRの腔内留置が受胎率の向上に有効かどうかを検討した(実験2)。その結果、明らかな受胎率の向上効果は認められないものの、CIDR処置した牛群では無処置群と比べて受胎率が高い傾向であった。Macmillanら¹⁰⁾も、同様に凍結胚移植後にCIDRを留置し12.8%の妊娠率向上を認めている。CIDR処置の有効性は、継続的なP4の徐放による血中レベルの維持と思われるが¹²⁾、我々の成績では明確にその効果を証明するには至らなかった。

P4が妊娠維持に必要なホルモンであることは、よく知られている^{3, 5, 18)}。それは、P4が子宮内膜上皮の増殖ならびに子宮腺の発育による着床性増殖を促進することで、胚の着床に適した子宮内環境を整える作用を有することにほかならない。また、母体の血中P4濃度は、妊娠認識のシグナルとなるインターフェロン- τ (IFN- τ) の産生量に密接に関連するとされている^{1, 3, 8, 11)}。さらに、受胎例でのIFN- τ の産生はDay14~25に集中的に惹起されることが、ほぼ証明されている^{3, 4, 9, 16, 20)}。したがって、このような妊娠初期ないし着床期に血中P4濃度を人為的に上昇させることは、受胎に好影響を与えることは容易に想定される。このような理由から、受胚牛の血中P4濃度を人為的に上昇させる処置が種々アレンジされている^{1, 7, 8, 10, 13, 14, 17, 21)}。そのなかで、移植後にCIDRを一定期間留置する方法もすでに検討されているが^{7, 10, 14, 17, 21)}、報告は少ないうえにその処置効果を疑問視する意見も多い。我々の手法でも、例数を増やすなど再検討の余地があると思われる。

我々は、移植後のCIDR処置が受胚牛の血中ホルモン動態に及ぼす影響を調査した(実験1)。その結果、受胎牛ではCIDR留置後からP4レベルが上昇

し、抜去後には若干の低下が認められたものの、妊娠維持への悪影響は認められなかった。不受胎牛では抜去翌日から発情徴候を示し、E2レベルが一過性に上昇した。これらのことから、CIDR留置とその後の抜去が生存胚の存在下でも発情を誘起する可能性があったが、その懸念は不要と考えられた。ただし、今後さらに詳細な血中ホルモン動態を把握する必要があるかもしれない。また、発情周期後半期 (Day10~17) におけるCIDR留置について、Robinsonら¹⁷⁾は黄体からの内因性P4の分泌を抑制すると報告しており、その時期におけるCIDR由来のP4の影響についても詳細に検討する必要がある。

CIDR留置~抜去処置によって、不受胎牛が早期に選別されるとともに次回の繁殖に供することができれば、空胎期間の延長による農家の経済的損失を最小限に抑えることができる。CIDR処置した受胚牛の発情再帰状況をDay30での不受胎牛について調べた結果(実験2)、極度の発情再帰の遅滞は認められず、無処置牛と同等であった。移植直後から一定期間のCIDR留置処置がもたらす効果の一つとして、不受胎牛の早期選別が想定され、その効果が実証できれば牛群全体の空胎期間の短縮につながる。今後は、CIDR処置方法の改良を含め、調査例数を増やして検討していきたい。

以上のことから、移植直後の受胚牛へのCIDR腔内留置は、妊娠維持に対する悪影響が認められず、むしろ受胎率を向上させる可能性があることが示唆された。さらに、不受胎牛において、極度の発情延長を来さないことが明らかとなった。

参 考 文 献

- 1) Binelli M. et. al., *Theriogenology*, 56: 1451-1463 (2001)
- 2) Bo GA. et. al., *Theriogenology*, 57: 53-72 (2002)
- 3) 小山久一ら, 乳牛の受胎率向上戦略, 酪農学園大学エクステンションセンター
- 4) 橋谷田豊, *日本胚移植学雑誌*, 26(1): 25-33 (2004)
- 5) 家畜人工授精講習会テキスト, (社)日本家畜人工授精師協会
- 6) 家畜人工授精講習会テキスト(家畜受精卵移植編), (社)日本家畜人工授精師協会
- 7) 加藤 聡ら, 第18回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会
- 8) Kerbler TL. et. al., *Theriogenology*, 47: 703-

- 714 (1997)
- 9) 小島孝敏ら, 日本胚移植学雑誌, 23(3): 95-105 (2001)
- 10) Macmillan KL. et. al., New Zealand Embryo Transfer Workshop, 34-35 (1994)
- 11) Mann GE. et. al., J. Reprod. Fertil. Suppl., 54: 317-328 (1999)
- 12) 宮脇 豊, 家畜診療, 46(9): 551-563
- 13) Nishigai M. et. al., J. Reprod. Dev. 47(5): 283-294 (2001)
- 14) 岡本 康ら, 北海道牛受精卵移植研究会報, 14: 35-37 (1995)
- 15) 岡崎尚之ら, 第4回西日本胚移植研究会要旨 (1999)
- 16) Roberts M. et. al., Endocrine Reviews, 13(3): 432-452 (1992)
- 17) Robinson NA. et. al., J. Dairy Sci., 72(1): 202-207 (1989)
- 18) 佐藤英明ら, 動物生殖学, 朝倉書店
- 19) (社)畜産技術協会, 胚の衛生的取り扱いマニュアル (IETSマニュアル) (2001)
- 20) 高橋ひとみら, 日本胚移植学雑誌, 26(1): 20-24 (2004)
- 21) Tribulo R. et. al., Theriogenology, 47(1): 372 (1997)
- 22) Tubino A. et. al., Theriogenology, 51: 405 (1999)