

## 1. 牛の受精卵移植技術の実用化に関する研究

### (1) 受胎率向上のための CIDR 活用の検討

Examination of CIDR Insertion Method for Pregnancy Rate Improvement in Bovine Embryo Transfer.

梅木 英伸・木下 正徳

#### 要 旨

胚移植における、受胎牛の血中プロゲステロン（以下 P）値を上昇させることによる受胎率の改善を目的に、試験 1 区は胚移植直後に受胎牛の腔内に腔内留置型黄体ホルモン製剤（以下 CIDR）を挿入し 7 日間留置後に除去、試験 2 区は胚移植後 5 日目に CIDR を挿入し 7 日間留置後に除去、試験 3 区は対照区として無処置とし、受胎成績と血中 P 値の濃度測定を行い、胚移植における CIDR の留置効果について検討した。

1. 受胎成績は、当県分の成績において試験 1 区の受胎率は 66.7 % (8/12 頭)、試験 2 区は 75.0 % (6/8 頭)、試験 3 区は 50.0 % (6/12 頭) であり、試験 2 区の受胎率が最も高く試験 1 区、試験 3 区の順であったが、各試験区間に有意差は認めなかった。また、共同試験 (11 県参加) の成績では、試験 1 区は 37.8 % (42/111 頭)、試験 2 区は 39.4 % (41/104 頭)、試験 3 区は 52.1 % (61/117 頭) であり、試験 1 区は試験 3 区と比較して試験 3 区の受胎率が高く有意差 (P=0.03) を認めた。また、試験 3 区は試験 2 区と比較して試験 3 区の受胎率が高い傾向 (P=0.058) を示した。
2. 血中 P 値の動態は、試験 1 区は CIDR 挿入後速やかに P 値は上昇し、CIDR 除去後は速やかに P 値が下降した。また、試験 2 区は移植後 5 日目の CIDR 挿入後速やかに P 値は上昇し、CIDR 除去後は P 値の急激な下降を示し、試験 1 区と同様な血中 P 値の動態を示した。

以上のことから、受胎牛への胚移植直後または胚移植後 5 日目に CIDR を挿入し 7 日間留置した後に除去する手法は、CIDR 除去後に受胎牛の血中 P 値を急激に下降させ、このことが受胎牛の黄体に対して不活的に作用を及ぼしたことにより、胚移植における受胎牛の受胎性に悪影響を及ぼしたと思われる。

**キーワード：胚移植、CIDR、受胎率、血中プロゲステロン**

#### 背景及び目的

当県で 1983 年から実施してきた受精卵移植事業は 20 年を経過し、当场より供給された胚からすでに 1,000 頭以上の胚移植産子が生産されている。また当场の供胚牛は、産肉性等の能力が高い牛を選抜し、種雄牛造成を目的の一つとして県下へ胚を供給していることから、雌牛が産まれた場合には高い割合で保留され、農家の牛群産肉形質に関する遺伝能力の向上を図るなど家畜改良の一端を担っている<sup>1)2)3)4)5)</sup>。

しかし、県下の胚移植の実施頭数はここ数年伸び

悩んでおり、また凍結胚移植において受胎率は 40 %程度に停滞している。この受胎率の低迷が県内における胚移植が農家段階で普及定着しない最大の障害と考えられ、更なる普及を図るためにもより一層の受胎率向上が望まれている。

この胚移植において受胎率を高めるのには胚移植前に受胎の可能性の高い受胎牛の選定と、品質の良い胚の移植が必要と考えられるが、受胎牛（品種、産歴、移植時期等）や胚（ステージ、ランク、凍結方法等）の受胎を左右する要因は様々あり未解決な問題が多く現在に至っている。

近年、受胚牛に性腺刺激ホルモン放出ホルモン<sup>6)7)8)</sup>や絨毛性性腺刺激ホルモン（以下 hCG）<sup>9)</sup>を移植後に投与することによる受胎率向上の検討がなされており、その効果の有効性には結論が得られていないが、当県が参画して実施した受精卵普及定着化事業（2001～2003 年）において、受胚牛への移植直後の hCG1,500 単位の投与は受胎性の改善効果を認め<sup>10)11)12)</sup>、野外における胚移植の受胎率を向上させる手法として活用できると思われた。しかし、hCG の投与は獣医師に限られており、また、牛体での抗-hCG 生産の容易性を考えると頻繁な投与はできないことから、簡単な手法による受胎率向上の検討が必要と考えられた。

そこで本試験では、牛における胚移植の受胎率向上のため、受胚牛に CIDR を留置することにより血中 P 値を上昇させ胚の発育に適する子宮環境を整えることによる受胎率向上の可能性について、受胎成績と血中 P 値濃度測定により 2005 年度から検討を行っている。その結果、受胚牛への胚移植直後に CIDR を挿入し 12 日間留置した後に除去する手法は、CIDR 除去後に受胚牛の血中 P 値を急激に下降させ、このことが受胚牛の黄体に対して不活的に作用を及ぼし受胎性の低下を招いたのではないかと思われたが、CIDR の 7 日間留置手法は当県の受胎成績で最も良好な成績を示し受胚牛の受胎性を改善させる可能性が示唆された<sup>13)</sup>ことから、今回は、受胚牛への CIDR の留置期間を 7 日間として、CIDR の留置開始が最も容易である胚移植直後と、早期の胚生存性に重要と思われる時期（14 日目頃）に血中 P 値を高位に推移出来ると思われる胚移植後 5 日目の CIDR 留置開始について、胚移植における受胎率向上効果について検討を行った。

なお、本試験は受精卵普及定着化事業（技術高度化）の 11 県（青森、宮城、奈良、宮崎、秋田、神奈川、静岡、大阪、高知、山口、大分）による共同試験で実施した当場の成績である。

## 試験方法

### 1. 供試牛

受胚牛は、当场および県下の農家で飼養している

黒毛和種または交雑種（ホルスタイン種♀×黒毛和種♂）経産牛 32 頭を用いた。

発情後 7 または 8 日目に直腸検査により副生殖器に異常が認められず、また黄体は Lindner と Wright<sup>14)</sup> の分類により、Excellent、Good あるいは Fair と判定した牛を受胚牛とし本試験に供試した。

### 2. 試験区分

試験区は 1 区、2 区、3 区とし、受胚牛を無作為に各区に区分し、計 32 頭の受胚牛を供試した。

胚の移植日は受胚牛の発情日を 0 日目とし、7 日目または 8 日目とした。

表 1 で示すように試験 1 区は、胚移植直後に受胚牛の腔内に CIDR（イージーブリード：天然型プロジェストロン 1.9g 含有）を挿入し、7 日間留置した後に除去した。試験 2 区は、胚移植後 5 日目に CIDR を挿入し、7 日間留置した後に除去した。試験 3 区は対照として無処置区とした。

### 3. 胚の採取方法

表 1 試験区分

試験区	頭数	処 理 方 法
1 区	12	CIDR を移植直後に挿入し、7 日間留置する
2 区	8	CIDR を移植後 5 日目に挿入し、7 日間留置する
3 区	12	無処置（対照区）

当场で採胚牛として飼養している黒毛和種経産牛のうち、発情日を 0 日として発情確認後 7～14 日目の供胚牛に対して過剰排卵処理を施した。過剰排卵処理は FSH 製剤（アントリン R・10：川崎製薬）の総量 20AU を 3 日間減量法（5・5・3・3・2・2AU）により朝夕 2 回頸部筋肉内に投与し、FSH 処理開始後 48 時間目に PGF<sub>2α</sub> アナログ（エストラメイト：ナガセ医薬）をクロプロステノールとして 0.75mg を頸部筋肉内投与した。人工授精は発情確認後 2 回実施し、初回人工授精後 7 日目に非外科的に採胚した。採胚後ポビドン・ヨード（PVP ヨード液 L：フジタ製薬）50ml を子宮内注入し、同時に PGF<sub>2α</sub> アナログをクロプロステノールとして 0.75mg を頸部筋肉内投与した。回収胚は 20%子牛非働化血清 +0.4%牛血清アルブミン添加修正ダルベッコの PBS（以下 mPBS）で洗浄し移植及び凍結に用いた。

### 4. 胚の凍結保存方法

回収した胚は mPBS で洗浄した後 A ランク（正常な発育ステージで、輪郭が明瞭、色調も正常、ほ

とんど変性部位無し；Excellent)、A' ランク (正常な発育ステージで、輪郭が明瞭、ほぼ正常な形態を示すが、一部突起した細胞あるいは不均整が見られる、変性部位が 10 %以下有り；Good)、B ランク (正常な発育ステージで、部突起した細胞あるいは不均整がやや目立つが、変性部位が 10 ~ 30 %以下有り；Fair) の 3 ランクの胚を選別し、このうち後期桑実胚 (以下 CM)、初期胚盤胞 (以下 EB)、胚盤胞 (以下 BL) 及び拡張胚盤胞 (EXB) を以下のダイレクト法で凍結した。

凍結方法は、mPBS を基調液とした 1.8M エチレングリコール+0.1M トレハロース液を耐凍剤として用い、胚を 1.8M エチレングリコール+0.1M トレハロース加 mPBS に浸漬した後、0.25ml プラスチックストロー (IVM、CASSOU 社製 straw、フランス) に充填した。ストローの冷却は無水エタノールを入れたプログラムフリーザー (ET-U5；チノー社製) を用い、 $-7^{\circ}\text{C}$  10 分間保持 ( $-7^{\circ}\text{C}$  浸漬 1 分後に自動植氷) 後、毎分  $-0.3^{\circ}\text{C}$  で  $-30^{\circ}\text{C}$  まで冷却し液体窒素に投じた。

#### 5. 胚の融解方法

ストローを液体窒素ボンベから出し、空中で 10 秒間保持後、 $30^{\circ}\text{C}$  の温水に 12 秒間浸漬し融解した。

#### 6. 胚の移植方法

胚の移植は、受胎牛を梓場に保定し直腸内の糞を排出し、仙骨と第 1 尾椎間の麻酔部位を毛刈りした後軀を水洗後、アルコール綿花で消毒して 3 ml の 2% 塩酸リドカイン (2% キシロカイン注、藤沢薬品) で尾椎硬膜外麻酔を行った。尾を保定し外陰部を水洗、アルコール綿花で消毒した後、消毒した腔鏡を挿入して腔部を開口し、移植器 (カス一式牛移植器、CASSOU 社製、フランス) を腔壁に触れないようにして外子宮口に挿入して腔鏡を除去した。移植は頸管経由法により非外科的に黄体が確認された卵巣と同側の子宮角の基部から中央部の部位に新鮮胚または凍結胚を 1 胚移植した。なお、胚の移植は場内 19 頭及び農家 13 頭で、それぞれ 1 名の移植師により行った。

#### 7. 調査項目

##### 1) 受胎率

##### 2) 血中 P 濃度

#### 8. 血液の採取および処理方法

##### 1) 採血時期

試験 1、2、3 区全て共通に、7、8、12、13、14、15、19、20 日目の計 8 日間 (発情日を 0 日目) 採血を実施した。

##### 2) 採血及び処理法

受胎牛の頸静脈から、18G の採血針を用いて真空採血管に採血し、採血後直ちにクラッシュアイスを充填したコンテナに採血管を投入し、採血作業終了後速やかに冷却遠心 (3000rpm、180min、 $4^{\circ}\text{C}$ ) してヘパリン血漿を採取した。採取した血漿は測定まで  $-25^{\circ}\text{C}$  で冷凍保存した。

#### 9. 血中 P 濃度の測定

血漿中の P 濃度の測定は EIA 法で測定した。

#### 10. 妊娠診断、卵巣所見

妊娠診断は胚移植後 35 ~ 60 日前後に、直腸壁から超音波診断装置 (日立メディコ社製 ECHOPAL II；EUB405B、リニア探触子 T 型 7.5MHz；EUP-033J) による超音波画像診断法及び、直腸検査による胎膜スリップ法にて調査した。

卵巣所見は胚移植の前日または直前に、直腸壁から超音波画像診断装置を用いた方法、または直腸検査にて調査した。

#### 11. 統計処理

受胎性は、 $\chi^2$  検定および Fisher の直接確率計算法を用いて有意差検定を行い、危険率 5% ( $P < 0.05$ ) 未満を有意差有りと判定した。

### 結果及び考察

各試験区 8 ~ 12 頭、延べ 32 頭に胚移植を行い試験を実施した。

#### 1. 受胎成績

受胎成績は、当県分の成績において試験 1 区の受胎率は 66.7% (8/12 頭)、試験 2 区は 75.0% (6/8 頭)、試験 3 区は 50.0% (6/12 頭) であり、試験 2 区の受胎率が最も高く試験 1 区、試験 3 区の順であったが、各試験区間に有意差は認めなかった (表 2)。

更に、受精卵普及定着化事業 (技術高度化) のうち本共同試験に参画して当県と同様の試験を実施し

ている 11 県の受胎成績において、試験 1 区の受胎率は 37.8 % (42/111 頭)、試験 2 区は 39.4 % (41/104 頭)、試験 3 区は 52.1 % (61/117 頭) であり、試験 1 区は試験 3 区と比較して試験 3 区の受胎率が高く有意差 (P=0.03) を認めた。また、試験 3 区は試験 2 区と比較して試験 3 区の受胎率が高い傾向 (P=0.058) を示し、本県の受胎成績と異なり試験 1 区と試験 2 区の受胎率において試験 3 区と比較して低い受胎率を示した (表 3)。

以上の受胎成績より、胚移植直後または胚移植後 5 日目から CIDR を挿入して 7 日間の留置が受胚牛に与える受胎率向上の効果を判定すると、試験 1 区の CIDR を移植直後の留置と胚移植後 5 日目から留置した試験 2 区はともに試験 3 区と比較して低い受

胎率を示したことは、CIDR を除去することによって受胚牛の黄体に対して黄体不活化作用が働き、受胚牛の受胎性に対して悪影響を及ぼし受胎率の低下を招いたのではないかと思われた。このことから、CIDR を用いた胚移植直後または胚移植後 5 日目からの受胚牛への 7 日間の留置は、受胎率向上には望ましくない手法であると思われた。しかし、11 県共同試験の受胎成績と異なり当県の受胎成績においては、試験 1 区と試験 2 区ともに試験 3 区より良好な受胎成績を示し、受胎率改善の可能性を示唆した。このことは、当県で胚移植を実施した受胚牛において、何らかの要因によって CIDR 除去による黄体機能への悪影響が及ばず受胎性低下を招かなかったと思われる。

表 2 受胎成績 (大分県)

試験区	移植頭数	受胎頭数	受胎率	移植胚の種類
1 区	12	8	66.7%	新鮮胚 3/3、凍結胚 5/9
2 区	8	6	75.0%	新鮮胚 3/4、凍結胚 3/4
3 区	12	6	50.0%	新鮮胚 1/4、凍結胚 5/8
合計	32	20	62.5%	新鮮胚 7/11、凍結胚 13/21

表 3 受胎成績 (共同試験 11 県分)

試験区	移植頭数	受胎頭数	受胎率
1 区	111	42	37.8% <sup>a</sup>
2 区	104	41	39.4%
3 区	117	61	52.1% <sup>b</sup>
合計	332	144	43.4%

注) 同列異符号間に有意差有り a-b(P<0.05)

## 2. 血中 P 値濃度の測定結果

試験区別の血中 P 値の動態は、試験 1 区は CIDR 挿入後 (胚移植直後 : 5.24ng/ml → 8 日 11.44ng/ml) 速やかに P 値は上昇した (試験 3 区 : 6.89ng/ml → 7.07ng/ml)。CIDR 除去後は (14 日 : 14.91ng/ml → 15 日 10.09ng/ml) 速やかに P 値が下降した (試験 3 区 : 9.93ng/ml → 11.18ng/ml)。また、試験 2 区は移植後 5 日目の CIDR 挿入後 (12 日 : 6.89ng/ml → 13 日 20.06ng/ml) 速やかに P 値は上昇した (試験 3 区 : 10.57ng/ml → 9.66ng/ml)。CIDR 除去後は P 値の急

激な下降 (19 日 : 13.6ng/ml → 20 日 5.37ng/ml) を示した (試験 3 区 : 10.59ng/ml → 10.00ng/ml)。これらことから、試験 1 区、試験 2 区においては CIDR 除去により受胚牛の黄体に対して黄体不活化作用が働き、受胚牛の血中 P 値が急激に下降した結果、受胎性に悪影響を及ぼしたと思われる (図 1)。(血中 P 値の測定値は、試験 1 区 : 受胎牛 1 頭・、試験 2 区 : 受胎牛 1 頭、試験 3 区 : 受胎 1 頭、計 3 等の値を用いた)

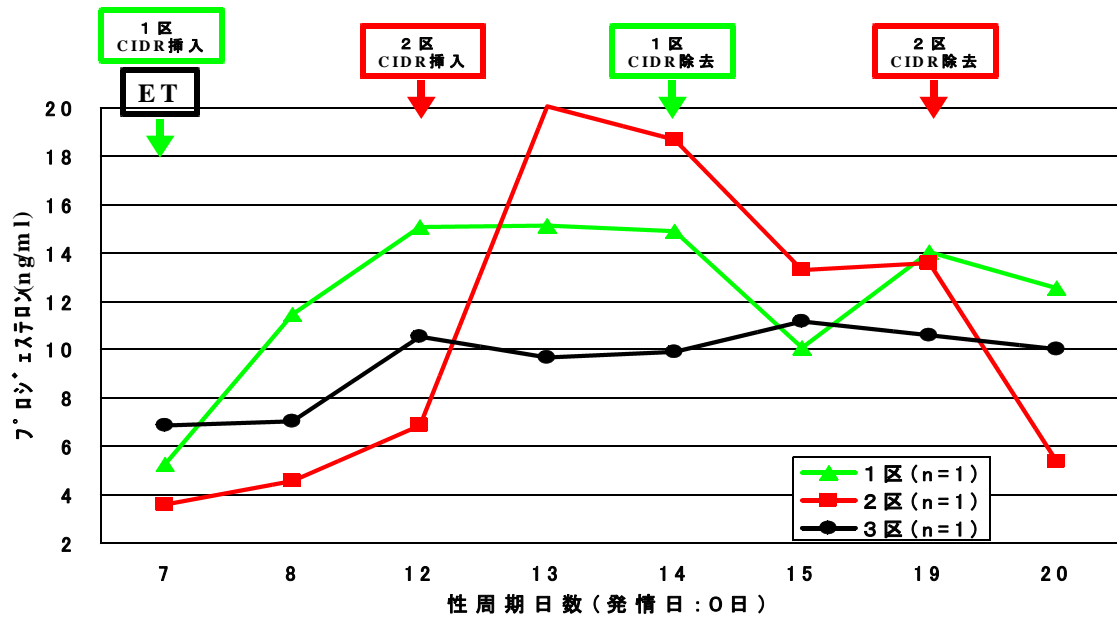


図 1 血中プロジェステロン動態 (受胎牛; n=3)

以上の結果から、受胎牛に対して胚移植直後または胚移植後5日目に CIDR を挿入し7日間留置させることによって、胚移植における受胎率の向上効果について検討したが、共同試験(11 県参加)の受胎成績において CIDR を受胎牛に7日間留置した試験1区(胚移植直後 CIDR 留置開始)、試験2区(胚移植後5日目 CIDR 留置開始)ともに無処置の試験3区と比較して受胎率を低下させた。加藤ら<sup>15)</sup>は、胚移植直後に CIDR を挿入し7日間留置することによって受胎率は無処置より受胎率は向上したと報告しているが、しかし本試験において受胎率の向上効果は認められず加藤らの報告と異なった。また、Tribulo ら<sup>16)</sup>は胚移植直後に CIDR を挿入し12日間留置したが受胎率の改善効果を認めなかったと報告しており、本試験より5日間 CIDR の留置期間が長い本試験と同様に CIDR 留置した試験区において受胎率の改善効果は認められていない。

このことは、胚移植における受胎牛への一定期間の CIDR 留置後の CIDR 除去は、受胎牛の血中 P 値を急激に低下させることにより、受胎牛の黄体に不活的に作用し、黄体維持が困難となり受胎性に悪影響を及ぼしたものと考えられる。

以上2年間にわたり、胚移植における受胎牛に CIDR を留置し血中 P 値を上昇させ、これによって

子宮内膜の E<sub>2</sub> 受容体数とオキシトシン受容体数の増加を抑制し、黄体退行の阻止と胚の発育に適する子宮環境に整えることで受胎率の改善を目的として検討<sup>13)</sup>を行った。しかし、受胎牛に対して CIDR 留置による受胎性の改善効果は認められなかったが、当県で実施した試験において、胚移植直後または胚移植後5日目に CIDR を受胎牛に挿入し7日間留置した試験において、受胎成績が良好であったことから、今後は、当場内や一部の野外移植で CIDR 活用による受胎率向上効果の検討を引き続き実施して行きたい。

#### 引用文献

- 1) 広瀬啓二・永山興宣・志賀一穂  
九農研, 57: 123, 1995
- 2) 大竹孝一・藤田達男・志賀一穂  
大分畜試報告, 28: 84-86, 1999
- 3) 梅木英伸・藤田達男・志賀一穂  
大分畜試報告, 29: 99-101, 2000
- 4) 梅木英伸・藤田達男・志賀一穂  
大分畜試報告, 30: 52-54, 2001
- 5) 梅木英伸・藤田達男・志賀一穂  
大分畜試報告, 31: 1-7, 2002
- 6) Drost M, Tan KL, et al.

平成 17 年度試験成績報告書 : 35(2006)

- Theriogenology, 31 : 186 (Abst), 1989
- 7) Ellington JE, Foote RH, et al  
Theriogenology, 36 : 1035-1042, 1991
- 8) Salaheddine M, Spoelder KPE, et al.  
Theriogenology, 45 : 338 (Abst), 1996
- 9) 西貝正彦  
那須 ET センター研究所研究報告書,  
1-120, 1998
- 10) 梅木英伸・藤田達男・志賀一穂  
大分畜試報告, 31 : 56-63, 2002
- 11) 梅木英伸・藤田達男・志賀一穂  
大分畜試報告, 32 : 77-85, 2003
- 12) 梅木英伸・藤田達男・志賀一穂  
大分畜試報告, 33 : 5-11, 2004
- 13) 梅木英伸・藤田達男・志賀一穂  
大分畜試報告, 34 : 64-68, 2005
- 14) Lindner GM, Wright RW Jr.  
Theriogenology, 20 : 407-416, 1983
- 15) 加藤聡・堀澤純・小淵裕子・砂川政広  
群馬畜試研報, 10 : 44-49, 2003
- 16) Tribulo RM, Nigro E, et al.  
Theriogenology, 47 : 372 (Abst), 1997