

老令肥育和牛の多排卵誘起に関する研究

湯原正高・内海恭三

(家畜繁殖学研究室)

Received November 1, 1983

Induction of Superovulation in Aged and Fattened Japanese Black Cattle

Masataka YUHARA and Kyozo UTSUMI

(Laboratory of Animal Reproduction)

This study was undertaken to know a possibility of superovulation by hormonal treatment in aged and fattened Japanese Black Cattle with subestrus or anestrus. Eight cows were divided into two experimental groups. Group 1 consisted of 2 cows with subestrus, and 6 cows with anestrus were allotted to Group 2. The subestrus cows, Group 1, were injected with 4,000 IU of pregnant mare's serum gonadotrophin (PMSG) on the 16 th day, and then with 2 mg estradiol benzoate (EB) on the 19 th and on the 20 th of the estrus cycle respectively. Human chorionic gonadotrophin (HCG), 2,000 MU, were injected intravenously within 12 hours after the onset of estrus. In Group 2, anestrus cows, 4,000 IU of PMSG treatment started on a given day and 2 mg of prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PgF_{2\alpha}$) was injected intra-uterinally 48 hours after PMSG. HCG treatment was performed in the same manner as in Group 1.

The cows in both groups were inseminated with the frozen Wagyu bull semen three times at every 8 hours during estrus. At the 4 th or 5 th day of the ovulation, ova were recovered by flushing of dissected female reproductive tract with saline-serum medium.

Both cows in Group 1 ovulated and all of recovered ova (1 and 6 respectively) were fertilized. In Group 2, anestrus cows, ovulation was observed in 4 out of 6 cows, and fertilized embryos (8-16 cells stage) were recovered from 2 cows, 5 and 10 respectively. The average number of the recovered ova in Group 2 were 11, and 22.4% (2.5 embryos per cow) of the recovered ova were fertilized.

The present data suggest that the induction of superovulation in aged and fattened cow with subestrus or anestrus is possible, but the more reliable method of superovulation for obtaining fertilized ova remains to be studied.

緒 言

これまで牛の改良増殖は人工授精の発達によって著しく進歩したが、しかしどのように優れた雄牛でも雄だけによる改良には限度がある。雌遺伝子の重要性は古くから指摘されていたが、いかに優れた雌牛でも一生に産む子牛の数は限られていて、最も多い場合でも十数頭であり、通常は数頭に過ぎない。このように雌系による改良は生産される子牛の数が制限されるために改良の速度が極めて遅い。近年、この問題を解決する手段としてホルモンによる多排卵誘起とその移植—人工妊娠—が大きくクローズ・アップされてきた。牛の受精卵移植技術は、受精卵の凍結を含めて著者ら⁶⁾ および多くの内外の研究者によってほぼ確立されつつある。受精卵移植のためには、まず移植可能な多数の卵子を採卵するためのホルモン処置が必要であり、現在では PMSG (妊馬血清性腺刺激ホルモン) 及び FSH (濾胞刺激ホルモ

ン)と $\text{PgF}_{2\alpha}$ (Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$) の組合せ投与によってこれを行っている^{5,6)}。しかしながら、この処置は、正常な繁殖能-発情周期-をもつ牛に適用される方法である。

肉用牛、乳用牛ともに繁殖牛は老令その他の理由で、その繁殖生涯を終える時、そのまま廃用にされるか、又は肥育されて肉用に供される。このとき、これらの牛の卵巣内にはなお利用しうる多数の卵子が存在している。これまで、このような老廃牛または繁殖障害牛からの多排卵誘起についての報告はほとんど見当たらない。本研究は、優れた雌遺伝子の有効利用を目的として、繁殖生涯を終えた肥育中の老令牛からの多排卵誘起の可能性を検索するために行った。

材 料 と 方 法

供試牛 本研究には老令または卵巣機能減退、無発情および原因不明不妊症などの理由により肥育した黒毛和種8頭を用いた。これらを2群に分けて、微弱ながら発情および発情周期の認められる牛を第1群(2頭)とし、発情のほとんどまたは全く認められない牛を第2群(6頭)とした。これらの牛は供試前に2回以上の直腸検査によって卵巣の状態を把握した。供試牛の繁殖歴の概略はTable 1に示す通りで、年齢は5~10歳で平均8.2歳、産次は2~7産で平均4.4産であった。肥育前の発情の状態は同じくTable 1に示したように微弱発情、無発情または発情は認められるが原因不明の不妊症であった。

Table 1. Reproductive history and estrus state of aged and fattened Japanese Black cow

Experimental group	Cow No.	Age (years)	No. of calving	State of estrus	
				Before fattening	After fattening
Group 1	1	5.1	2	Subestrus	Subestrus
	2	6.2	3	Normal *	Subestrus
Group 2	3	6.4	3	Anestrus	Anestrus
	4	7.9	5	Subestrus	Anestrus
	5	10.3	5	Normal *	Anestrus
	6	10.5	5	Anestrus	Anestrus
	7	10.3	7	Subestrus	Anestrus
	8	8.9	5	Subestrus	Anestrus

* Repeat breeder

多排卵誘起処置と採卵 第1群の牛に対しては性周期第16日目にPMSG(セトロピン：帝国臓器製)4,000 IU、3日後と4日後すなわち性周期19日と20日目にEB(エストラジオールベンゾエイト2 mg, 油溶)を皮下注射した。さらに発情の発現をまってHCG(ゴナトロピン：帝国臓器製)2,000 MUを静脈内に注射した。第2群の牛に対しては、直腸検査によって卵巣がほぼ静止状態にあることを確認した後、任意の日にPMSG 4,000 IUを注射し、48時間後に $\text{PgF}_{2\alpha}$ (パナセラン：第1製薬製)2 mgを子宮内に注入した。さらに、発情開始後12時間以内にHCG 2,000 MUを静脈内に注射した。これらの方法をFig. 1に示した。凍結精液による人工授精は、第1、第2群ともに発情後6~8時間間隔で3回行った。排卵後4日目および5日目に卵巣および生殖器道を摘出し、黄体数によって排卵数を推定した。採卵は摘出した卵管・子宮を生食・血清(4:1)で灌流して行い、回収液を実体顕微鏡下で検索して卵子数と卵子の発育状態を調べた。

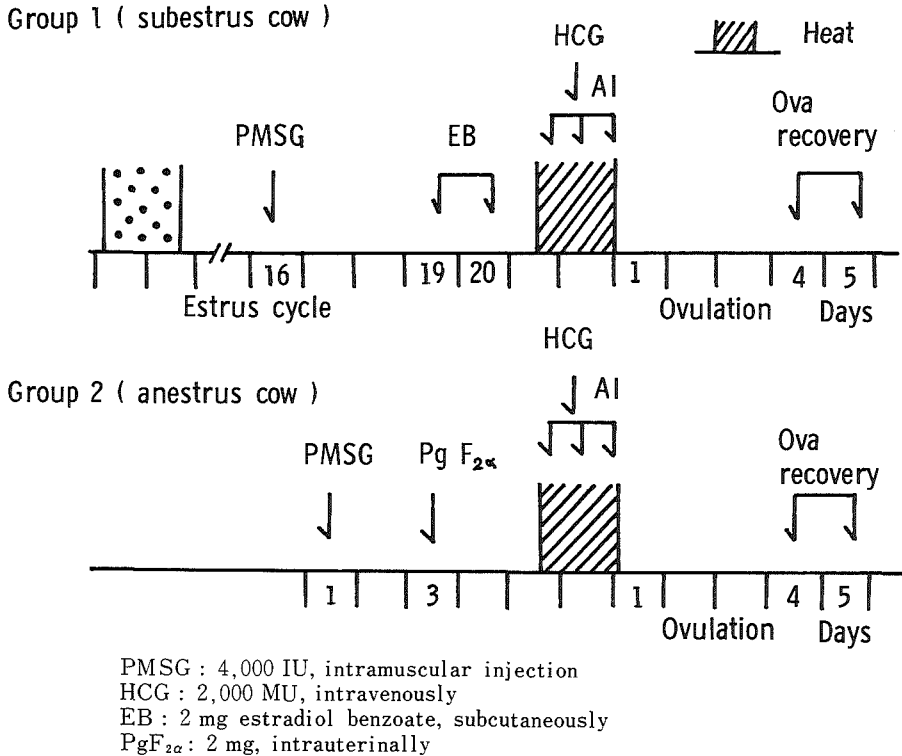


Fig. 1. Hormonal treatment for superovulation in aged and fattened Japanese Black cow with subestrus or anestrus.

結果と考察

繁殖供用後、肥育し、微弱発情または無発情の状態にある黒毛和種に対する誘起多排卵の結果を Table 2 に示した。

ホルモン投与前、発情微弱ながらほぼ正常な周期を示した第1群の2頭は、何れも PMSG-E-HCG によって誘起排卵が認められ、子宮灌流によって、それぞれ6個および1個の8-16細胞期の受精卵が採取された。卵巣がほぼ静止状態にある無発情の第2群では6頭中4頭

Table 2. Induction of superovulation by hormonal treatment in aged and fattened Japanese Black cow

Experimental group	Cow No.	No. of corpus luteum (ovulation)	No. of ova recovered (%)		
			Unfertilized	Fertilized	Total
Group 1	1	14	0	6 (43)	6 (43)
	2	1	0	1 (100)	1 (100)
	3	9	1 (11)	5 (56)	6 (67)
	4	37	10 (27)	10 (27)	20 (54)
Group 2	5	23	16 (70)	0	16 (70)
	6	0	0	0	0
	7	25	25 (100)	0	25 (100)
	8	0	0	0	0

すなわち 67% の牛に誘起排卵が認められたが、受精卵が回収されたのは 2 頭だけであった。また、この 2 頭の牛では黄体数に基づく推定排卵数は 9 および 37 個とかなり多く、未受精卵の数も 1 および 25 個で平均 13 個と極めて多かった。そのうち受精卵数はそれぞれ 5 個と 10 個 (16~32 細胞期) であった。第 2 群の 1 頭当り平均回収卵数は 11 個とかなり多かったが受精卵数は平均 2.5 個にすぎなかった。以上から供試した第 1 群、第 2 群の 8 頭中 75% の牛でホルモンによる誘起排卵 (平均 8 個) が認められ、50% の牛から平均 2.5 個の受精卵が得られた。しかし、微弱ながらほぼ正常な性周期をもつ牛に比較して、無発情牛群での受精卵率はかなり低かった。

供試時無発情の状態にあった第 2 群の牛において、ホルモンによって誘起された発情持続時間とその強度は必ずしも斉一でなく、発情が長期間持続した 6 号牛および発情が微弱であった 8 号牛では排卵しなかった。受精卵の得られた 1 号牛 (第 1 群) と 3 号牛 (第 2 群) の卵巣写真を Fig. 2 および 3 に示した。

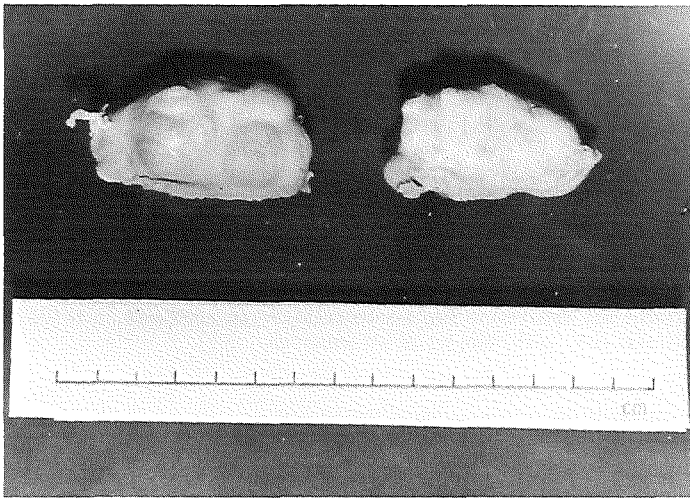


Fig. 2. Ovaries of cow No. 1 (Group 1), 6 fertilized embryos were recovered.



Fig. 3. Ovaries of cow No. 4 (Group 2), 10 fertilized embryos and 10 unfertilized ova were obtained.

また、25個の排卵が認められたが、回収卵子がすべて未受精卵であった7号牛の卵巣像をFig. 4に示した。

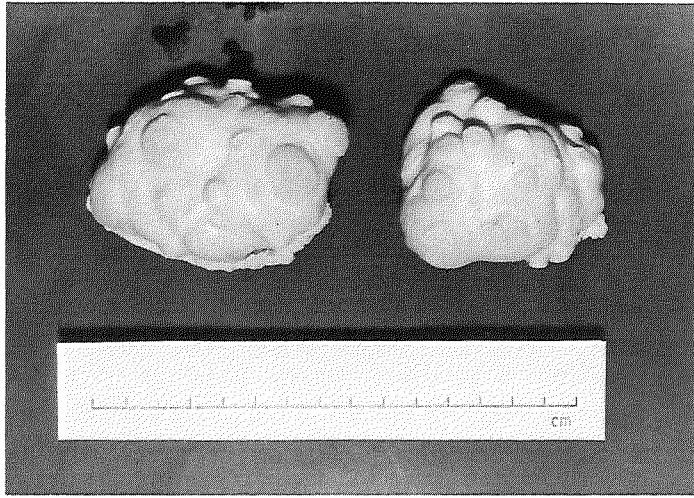


Fig. 4. Ovaries of cow No. 7, only 25 unfertilized ova were obtained.

Fig. 2 および Fig. 3 に示すようにこれらの牛の卵巣は、排卵後かなり縮小し、大きな濾胞の遺残は認められなかった。しかし未受精卵のみ採取された Fig. 4 の7号牛では、卵巣は黄体とともになお多数の大濾胞をもち、卵巣は多胎性卵巣像を示していた。未受精卵のみ採取された5号牛も、7号牛と同様に排卵4日後においても黄体と共に大濾胞の遺残が認められた。

本研究から、繁殖生涯を終えた肥育中の老令和牛からもホルモンによる誘起多排卵が可能であることが示された。とくに5～6歳で供試時に微弱ながら性周期の認められた牛からは受精卵採取の可能性の高いことが示唆された。

現在、牛の多排卵誘起には PMSG または FSH-Pg 法が一般に行われているが^{5,6)} この場合、牛の発情周期が正常であることが高率に受精卵を得るための必須条件とされている。本研究では、発情は微弱ながら性周期の認められる牛では、黄体の衰退期すなわち16日に PMSG を注射して多数の濾胞発育を促した。次に無発情の牛では任意の時に PMSG を注射したが、直腸検査によって、卵巣にはなお小黄体または卵巣内部の黄体組織からの Progesterone (P) の分泌が推定されたので、PMSG 処理2日後に $PgF_{2\alpha}$ の子宮内注入を行って、P の低下と PMSG による濾胞の発育を試みた。一般に供試牛の排卵数の多かったことは、注射した PMSG の量が 4,000 IU とやや多かったためとも考えられ、この量が受精卵数に必ずしも有利に働いてないように思われる。また、EB は PMSG によって誘起された濾胞発育を揃えるためと、E のフィード・バックによる排卵前 LH 放出²⁾ をもたらすために投与し、HCG はその LH 放出を補うために注射した。PMSG によって、濾胞が揃って発育し、十分な LH の放出が起こるならば、EB と HCG の注射は不必要となろう。しかし、これら一連の系(濾胞発育-E-LH 放出~排卵)が不完全な場合には、EB, HCG の処理も必要と考えられる。

FSH や PMSG が卵巣に結合し、それによって卵胞の発育を起すためには黄体の存在を必要とすることが示唆されている⁴⁾。正常な性周期では黄体期に FSH (PMSG) の結合が起こり、黄体の退行-P レベルの低下-によって濾胞の発育とその後の排卵が起こる。卵巣がほぼ静止状態にある第2群の牛では、供試時に顕著な黄体の認められなかったことから、PMSG を

注射した時点で、このホルモンに対する受容器の活性化も不十分で牛によってその程度も異なっており、このことが濾胞発育数に大きな変動が見られた一因と思われる。

著者らの研究⁸⁾では卵巣のう腫を経て、卵巣機能がほぼ停止し、PMSG、プベローゲンなどにほとんど反応しない長期空胎(7~18ヵ月)の乳牛に適量のPを一定期間前もって注射すると、PMSGの注射に対して卵巣が応答し濾胞発育と排卵が認められたが受胎例はほとんど得られなかった。しかしこのような処置を行い人工授精した牛の子宮を灌流すると、一部の牛では受精卵が得られている。山崎ら⁷⁾は微弱発情または、無発情の乳牛に合成P(Melengestrol acetate)を投与してその発情誘起と受胎性を研究し、合成Pによる発情誘起効果は認められるが、受胎率は必ずしも高くないことを報告している。またCRIGHTON¹⁾らはPの重要性を強調し、Pを羊の性周期におけるorganizerとして位置づけている。筆者らの研究およびこれらの報告は、誘起排卵における黄体-Pの重要性を示唆するものと思われる。

また、著者ら³⁾は、ラットについてPMSGによって多排卵された卵子は子宮内降下降度が早く、それが受精にも影響することを明らかにした。本研究においてもFig. 4に示した7号牛の卵巣は、排卵後4日後大濾胞が多数遺残しており、採取された卵子はすべて未受精卵であった。一方、高率で受精卵の得られた例(Fig. 3)では、排卵後の卵巣はかなり縮小し、大きな濾胞は認められなかった。このことは、排卵後の大濾胞-Eの存在が、受精および受精後の胚に対して好ましくない環境を与えることを示唆するものと思われる。

牛の人工妊娠技術において、高い妊娠率を望むためには、形態の良好な受精卵を採取することが必要であり、この点からみると老令廃用牛や繁殖不全牛を採卵に使用することは技術上極めて困難と思われる。しかしながら本研究の結果から示唆されるように、老令牛や繁殖不全牛からの受精卵採取も、牛によっては可能であり、その確率を高めるためには、性腺刺激ホルモンに応答する卵巣-牛の選択が必要であり、例数は少ないが無発情群に較べて、微弱発情群で、かなりの成果を得たことは、一つの方向を示すものと思われる。その一つの指標として黄体期の血中および乳汁中のPの測定が考えられている。また、ホルモンに対する応答を導くために何らかの補助的なホルモン処理-例えばP処理-も必要と思われる。さらに受精には精子・卵子と共に卵管、子宮要因が大きく関与するために繁殖不全牛からの受精卵採取は多くの困難を伴う。しかしながら、これらの技術の一つのシステムとして体系づけければ、このような老廃牛や繁殖不全牛からの採卵も或程度可能であると思われる。

これまで、繁殖不全牛-障害牛-からの多排卵誘起に関する研究は極めて少なく、現在では牛の人工妊娠は正常な繁殖能を示す牛からの採卵を前提としている。しかし、廃用前の老令牛や繁殖不全牛からの多排卵誘起と受精卵の採取は、棄てられる運命にある優秀な遺伝子の有効利用の面から牛の改良増殖上大きな意義をもつものと思われる。

摘 要

微弱発情または無発情の老令肥育牛からの多排卵誘起を目的として本研究を行った。

老令および繁殖不全の理由で肥育した黒毛和種8頭を用い、供試時に微弱発情を示した2頭の牛を第1群とし、全く発情を示さない6頭を第2群とした。

第1群の牛には、性周期第16日にPMS 4,000 IUを注射し、19および20日目にEBをそれぞれ2 mg注射し、発情の発現後12時間以内にHCG 2,000 MUを静脈内に注射した。第2群の牛には任意の日PMS 4,000 IUを注射し、2日後にPgF_{2α} 2 mgを子宮内に注入し、さらに発情後HCG 2,000 MUを静脈内に注射した。

ホルモン処理によって発情した牛は、6時間~8時間間隔で3回、和牛凍結精液を人工授精した。採卵は排卵4日後に摘出された卵管・子宮の灌流によって行った。

第1群の牛では、2頭とも排卵(平均3.5個)が認められ、回収された卵子はすべて受精卵でそれぞれ1個と6個であった。第2群の牛については、6頭中4頭に排卵が認められたが、受精卵が得られたのは2頭(5個と10個)だけで残りの2頭からは未受精卵のみが得られた。第2群の平均排卵数は11個とかなり多かったが、このうち、平均2.5個(22.4%)が受精していた。

本研究から、老令肥育牛からも受精卵を採卵しうる可能性が示唆された。しかし、このような牛からの多排卵誘起、特に多数の受精卵を得ることはかなり困難であり、更なる研究を必要とする。

文 献

- 1) CRIGHTON, D. B., N. B. HAYNES, G. R. FOXCROFT, and G. E. LAMMING: *Control of Ovulation*, 33-42, Butterworths, London (1978)
- 2) KENSER, J. S., E. M. CONVEY, and C. R. ANDERSON: *Endocrinol.* 108, 1386-1391 (1981)
- 3) 三宅金也・内海恭三・湯原正高: 岡山大農学報 46, 46-51 (1975)
- 4) ROCHE, J. F., and J. J. IRELAND: *Endocrinol.* 108, 568-572 (1981)
- 5) 杉江 侖: 畜産の研究 30, 1267-1270 (1976)
- 6) 内海恭三・湯原正高: 岡山大農学報 61, 45-51 (1983)
- 7) 山崎大輔・大星健治・寺脇良悟・福井 豊・小野 齊: 家畜繁殖学雑誌 27, 153-156 (1981)
- 8) 湯原正高・内海恭三: 未発表