ホルスタイン種乳牛への胚移植における受胎率に及ぼす要因の検討

大川洋明^{1)†}赤塚修二¹⁾高野敏宏¹⁾藤倉篤史¹⁾

1) ふくおか県酪農業協同組合 福岡乳牛診療人工授精所

(2014年10月30日受付・2015年2月26日受理)

要 約 本研究では乳牛の胚移植技術における受胎性に影響する要因を明らかにし、受胎率向上の一助とすることを目的として、産歴、季節、受胎牛の月齢、分娩後日数、人工授精回数、および胚移植時の黄体所見について調査した。ホルスタイン種乳牛36頭（経産牛21頭、未経産牛15頭）について超音波診断装置を用いて胚移植当日に黄体所見（黄体長径、黄体組織面積）を記録し、黄体長径20mm以上の牛に胚移植を実施した。経産牛、未経産牛ごとに受胎群と不受胎群に分類し、両群間における黄体所見を比較した。黄体長径は20mm～30mm、および30mm以上の2群に分類した。その結果、経産牛では受胎群と不受胎群との間で黄体組織面積に差はなかったが、未経産牛では受胎群が不受胎群より小さい傾向にあった（ $357.6 \pm 60.1\text{mm}^2$ 対 $401.2 \pm 40.6\text{mm}^2$, $p<0.1$ ）。また、経産牛では黄体長径30mm以上の群が、未経産牛では20～30mmの群がそれぞれ高い受胎率であったが有意差は認められなかった。次に、ホルスタイン種乳牛301頭（経産牛210頭、未経産牛91頭）の受胎牛における受胎率を産歴別、季節別、分娩後日数別、人工授精回数別、未経産月齢別に比較したところ、未経産牛の方が経産牛よりも有意に高かった（ $56/91$, 61.5% 対 $103/210$, 49.1%, $p<0.05$ ）。季節別では夏にやや低下したが有意差は認められなかった。分娩後日数別、人工授精回数別ではそれぞれ有意差は認められなかった。以上より、ホルスタイン種未経産牛においては移植時に受胎牛の黄体長径が20mm以上であれば平均的な受胎率を期待できることから、積極的に移植することが望ましく、さらに胚移植は暑熱期のヒートストレス、およびリピートブリーダー対策としても有効な繁殖手段であると考えられた。

——キーワード：受胎率、黄体長径、胚移植、ホルスタイン種、受胎牛

.....産業動物臨床医誌 5 (増刊号): 253-258, 2015

1. はじめに

酪農において繁殖成績は経営に大きく影響する要因の一つである。年々個体乳量が増加する一方で受胎率は低下する傾向にある [1]。胚移植技術は、ホルスタイン種的能力改良、ET和牛子牛生産による経営改善、リピートブリーダーなど繁殖障害の適応に活用されている。胚移植技術に関して、受胎牛の選定、移植手技には技術者の経験や練度が求められているものの、胚移植における受胎牛の選定に明確な基準は示されていない。血中プロゲステロン濃度と受胎率との間、血中プロゲステロン濃度と黄体直径と間で正の相関が報告されている [2, 3] が、黄体所見と受胎率との直接的な関連は明らかではない。また、胚移植は、暑熱期における受胎率向上 [4,

5] や、リピートブリーダーにおける受胎率向上 [6] に寄与することが報告されている。

今回、胚移植技術における受胎性に影響する要因を明らかにし、胚移植技術の受胎率向上への一助とするため、ホルスタイン種受胎牛の黄体所見を、超音波診断装置を用いて記録し、受胎性との関連を検討した（試験1）。また、胚移植における受胎率に影響する要因について産歴、季節、分娩後日数、人工授精回数、未経産月齢ごとに分類し評価、検討した（試験2）。

2. 材料および方法

試験1. 胚移植における黄体所見

供試牛：2013年3月～5月に胚移植を実施したホルス

† 連絡責任者：大川洋明（ふくおか県酪農業協同組合 福岡乳牛診療人工授精所）

〒819-0373 福岡県福岡市西区周船寺1丁目13番4号 ☎ 092-806-1033 FAX 092-806-6980

E-mail: fuku-sinryou@f-rakukyou.or.jp

タイン種乳牛36頭を供試牛とした。診療所管内の酪農家20戸で飼養されている、臨床的に健康で、直腸検査において生殖器に異常を認めず、繁殖に供することのできると判断した牛とした。供試牛の発情周期の正常性については確認できなかった。すべての供試牛は発情確認時に膣鏡を用いて臨床型子宮内膜炎を否定した。内訳は経産牛21頭（産歴 2.3 ± 1.4 産、分娩後日数 464.2 ± 187.2 日）、未經産牛15頭（月齢： 19.0 ± 2.6 カ月齢）であった。

胚移植：黒毛和種体内受精由来凍結胚（ $n=36$ ）を使用した。胚移植には黄体所見として黄体長径が20mm以上の牛に対して胚移植用器具（モ4号：ミサワ医科工業、茨城）を使用して行った。

調査内容：黄体所見は胚移植当日に経直腸用リニア型超音波診断装置（7.5MHz：本多電子HS-101V、愛知）を使用して黄体の最大径の静止画を記録し、黄体の長径と短径、内腔のあるものにはその長径と短径を記録して黄体面積、内腔面積を算出し、黄体面積と内腔面積の差を黄体組織面積とした。供試牛を経産牛、未經産牛ごとに受胎群、不受胎群に分類し、黄体所見の比較を行った。黄体長径については、20～30mmの群、および30mm以上の群に経産牛と未經産牛それぞれにおいて分類し、受胎率を比較した。

試験2. 胚移植における受胎率

供試牛：2012年4月～2014年3月に胚移植を実施したホルスタイン種乳牛301頭を供試牛とした。診療所管内の酪農家24戸で飼養されている、臨床的に健康で、直腸検査において生殖器に異常を認めず、繁殖に供することのできると判断した牛とした。供試牛の発情周期の正常性については確認できなかった。内訳は経産牛210頭（産歴 2.4 ± 1.5 産、分娩後日数 235.5 ± 150.6 日）、未經産牛91頭（月齢： 18.9 ± 4.3 カ月齢）であった。

胚移植：黒毛和種およびホルスタイン種の体内受精由来凍結胚（ $n=301$ ）を使用した。胚移植は移植当日に直

腸検査にて黄体を確認できた牛に対して胚移植用器具（モ4号：ミサワ医科工業、茨城）を使用して行った。

調査内容：胚移植牛における受胎率への影響を明らかにするために、産歴、季節、分娩後日数、人工授精回数について、未經産牛は月齢について分類した。経産牛における産歴は、1産、2産、3産、4産、および5産以上、季節は春（4～6月）、夏（7～9月）、秋（10～12月）、冬（1～3月）、分娩後日数は50～100日、100～200日、および200日以上、人工授精回数は経産牛167頭と未經産牛70頭についてそれぞれ0～2回、3回以上の群に分類した。未經産牛について月齢は12カ月齢以上16カ月齢未満、16カ月齢以上21カ月齢未満、および21カ月齢以上の群に分類した。各群の受胎率を比較した。

妊娠診断

胚移植後30～60日で経直腸超音波診断にて妊娠診断を実施し、胚移植後60日以降に直腸検査による胎膜触診にて妊娠確定とした。

統計解析

黄体所見について黄体長径、黄体面積、黄体組織面積を受胎群と不受胎群の2群間においてStudent's-*t*検定を用いて比較した。受胎率はカイ二乗検定を用いて比較した。例数が5以下の値を含むものはフィッシャーの正確確率検定を用いて比較した。値はすべて平均±標準偏差で示した。

3. 成 績

試験1. 胚移植における黄体所見

経産牛、未經産牛の胚移植における黄体所見を表1、2に示した。胚移植当日と前日の黄体所見において受胎率に差はなかった。経産牛の受胎率は33.3%（7/21）であり、受胎牛群（ $n=7$ ）と不受胎群（ $n=14$ ）の間に黄体所見の差はなかった。未經産牛の受胎率は60.0%（9/15）であり、受胎群（ $n=9$ ）の方が不受胎群（ $n=6$ ）より、

表1. ホルスタイン種経産牛における胚移植時の黄体所見と受胎性との関係

	産次	分娩後日数	黄体長径 (mm)	黄体面積 (mm ²)	黄体組織面積 (mm ²)
受胎群（ $n=7$ ）	2.0	453.3 ± 213.8	30.7 ± 5.2	523.0 ± 113.6	486.7 ± 101.1
不受胎群（ $n=14$ ）	2.4	469.6 ± 180.9	28.8 ± 5.2	517.0 ± 113.1	488.8 ± 123.4

表2. ホルスタイン種未經産牛における胚移植時の黄体所見と受胎性との関係

	月齢	黄体長径 (mm)	黄体面積 (mm ²)	黄体組織面積 (mm ²)
受胎群（ $n=9$ ）	18.6 ± 2.6	26.3 ± 4.1	384.3 ± 89.6	357.6 ± 60.1^a
不受胎群（ $n=6$ ）	19.7 ± 2.6	27.8 ± 3.9	447.4 ± 104.7	401.2 ± 40.6^b

ab間に有意差： $p=0.073$

黄体組織面積が小さい傾向にあった ($p<0.1$)。黄体長径別の受胎率を表3に示した。経産牛では30mm以上の群が20～30mmの群と比較して高く、未経産牛では20～30mmの群が30mm以上の群と比較して高くなったが、それぞれ2群間に有意差はなかった。

試験2. 胚移植における受胎率

胚移植における産歴の違いによる受胎成績を表4に示した。未経産牛の受胎率が61.5% (56/91)、経産牛の受胎率が49.1% (103/210) であり、未経産牛の方が有意に

高かった ($p<0.05$)。産歴別受胎率では、未経産牛の受胎率が61.5% (56/91) と最も高く、産歴を重ねるごとに低下した。季節の違いによる受胎成績を表5に示した。季節別受胎率では、夏が45.6% (31/68) と最も低かったが、季節間に有意差はなかった。経産牛の分娩後日数の違いによる受胎率を表6に示した。分娩日数別受胎率では差はみられなかった。人工授精回数別受胎率では、経産牛と未経産牛について、0～2回、3回以上の間に差はな

表3. ホルスタイン種における胚移植時の黄体長径の違いによる受胎成績

	経産牛		未経産牛	
	20～30mm	30mm以上	20～30mm	30mm以上
移植頭数	14	7	11	4
受胎頭数	4	3	7	2
受胎率 (%)	28.6	42.9	63.6	50.0

表4. ホルスタイン種における産歴の違いによる胚移植の受胎成績

	全体	未経産牛	経産牛					
			全体	1産	2産	3産	4産	5産以上
移植頭数	301	91	210	76	51	37	21	25
受胎頭数	159	56	103	40	25	19	9	10
受胎率 (%)	52.8	61.5 ^a	49.1 ^b	52.6	49.0	51.4	42.9	40.0

ab間に有意差： $p=0.046$

表5. ホルスタイン種における季節の違いによる胚移植の受胎成績

	春 (4～6月)	夏 (7～9月)	秋 (10～12月)	冬 (1～3月)
移植頭数	64	68	87	82
受胎頭数	39	31	50	40
受胎率 (%)	60.9	45.6	57.5	48.8

表6. ホルスタイン種経産牛における分娩後日数の違いによる胚移植の受胎成績

	50～100日	100～200日	200日以上
移植頭数	33	72	103
受胎頭数	16	37	49
受胎率 (%)	48.5	51.4	47.6

表7. ホルスタイン種における人工授精回数の違いによる胚移植の受胎成績

	経産牛 (n=167)		未経産牛 (n=70)	
	0～2回	3回以上	0～2回	3回以上
移植頭数	100	67	57	13
受胎頭数	51	33	35	10
受胎率 (%)	51.0	49.3	61.4	76.9

表8. ホルスタイン種未経産牛における月齢の違いによる胚移植の受胎成績

	12～16カ月齢	16～20カ月齢	20カ月齢以上
移植頭数	29	31	31
受胎頭数	22	18	16
受胎率 (%)	75.9	58.1	51.6

かった。未経産牛における月齢の違いによる受胎成績を表8に示した。未経産の月齢別受胎率では12～16カ月齢未満が75.9% (22/29) と最も高かったが、月齢による受胎率に有意差はみられなかった。

4. 考 察

胚移植における黄体所見では、黄体長径20mm以上であれば、受胎性に影響はなかったが、経産牛では30mm以上の群が、未経産牛では20～30mmの群が高い受胎率であった。内腔の有無に関わらず、黄体組織面積の大きさに血中のプロゲステロン濃度は比例し、黄体組織面積が3 cm²以上であれば妊娠可能な血中プロゲステロン濃度を維持していると報告されている [7]。Spellら [2] は、肉用牛について、黄体直径や黄体組織面積と血中プロゲステロン濃度との正の相関関係は認めるものの、胚移植時の黄体所見は受胎に影響はなく、触知できる黄体であれば胚移植を実施すべきとしている。

本研究での経産牛について、30mm以上の黄体長径を有する群が高い受胎率であり、黄体容積に比例して、より高い血中プロゲステロン濃度を維持していた可能性がある。ホルスタイン種では分娩後、負のエネルギー状態に陥ることが知られ、それに伴う血糖値の低下、特にIGF-1の低下は産後の子宮内膜での炎症の回復を遅延させ、卵巢機能も低下させることが報告されており [8]、受胎率に影響する他の要因も検討する必要がある。

未経産牛において、受胎群は不受胎群より黄体組織面積が小さい傾向にあった。ホルスタイン種経産牛と未経産牛において、黄体期の血中プロゲステロン濃度は未経産牛のほうが高くなる一方、黄体組織容積は経産牛のほうが大きくなると報告されており [9, 10]、未経産牛において、経産牛と比較して小さなサイズの黄体であっても妊娠可能な血中プロゲステロン濃度を維持している可能性が考えられる。Lynchら [3] は、肉用種未経産牛について発情後7日目の黄体サイズとプロゲステロン濃度に相関はみられなかった一方で、プロゲステロン濃度と受胎率は正の相関関係にあり、また発情時の卵胞サイズが大きいと受胎率が低下することを報告している。Vasconcelos JLら [11] は、排卵卵胞サイズが小さいと、その後の黄体サイズと受胎率は低下するとしている。12mm以下の排卵卵胞はその後の黄体からのプロ

ゲステロン分泌を低下させること [12] が報告されており、受胎率低下につながると考えられる。本研究での未経産牛は受胎群の方が黄体組織面積、黄体長径の小さいことから、発情時の主席卵胞の大きさも不受胎群より小さかった可能性があるが、妊娠可能なプロゲステロン濃度を維持していたと考えられる。本研究では黄体長径20～30mmの群と30mm以上の群との間に受胎率の差はなく、黄体長径20mm以上であれば平均的な受胎率を期待できることが示唆された。未経産牛において、有意差はなかったが黄体長径20～30mmの群が30mm以上の群より高い受胎率であり、今後、受胎性に良い影響を与える至適な排卵卵胞、黄体のサイズについて検討する必要がある。

胚移植による受胎率は、未経産牛は経産牛より有意に高い値であった。Silvaら [10] も未経産牛において経産牛より高い受胎率を得ており、その要因として、経産牛における後期胚死滅による受胎率の低下を報告している。本研究では、未経産牛は分娩による子宮内汚染がないことや、胚移植時の子宮の操作が容易であること、あるいは経産牛の潜在性子宮内膜炎による影響などが考えられた。

季節別受胎率では、年間を通して有意な差はみられなかった。暑熱期のヒートストレスは、人工授精に関して授精頭数や受胎率の低下を招いていると報告されている [13]。胚移植においては、暑熱期のヒートストレス下での有効性が報告されている [4, 5]。夏季に過排卵処理をしたウシの胚回収において、凍結可能胚が減少したこと [14]、ウシの体外受精卵の作成において、夏季（7月～9月）に採取された卵子の胚盤胞への発生率が低下したこと [15] が報告されており、暑熱による高温環境が子宮内での胚の損失の増加に影響していることが考えられる。本研究においても暑熱期のヒートストレスを受ける発情後7日間をバイパスして胚移植を行ったことにより、年間を通して一定の受胎率を得られたと考えられる。一方で、人工授精後7日間以外の期間におけるヒートストレスの影響により受胎率が低下する報告 [13, 16] があり、本研究においても有意差はないものの、夏季の受胎率は他の季節と比較して低下しており、胚移植ではバイパスできなかったヒートストレスが影響している可能性がある。

分娩後日数別受胎率と人工授精回数別受胎率において、それぞれ差はみられなかった。胚移植は授精回数を重ねたリピートブリーダーに対して有効性が報告されている [6, 17]。その一方で、授精回数を重ねた牛では、子宮内感染症などの問題を抱えていることが多いとされており [17]、子宮の炎症性疾患の除外は移植を実施する際に重要である。本研究においても、他の報告と同様に A I 回数を重ねた牛にも胚移植が有効である可能性が考えられた。リピートブリーダーは、臨床的に異常を認めず、正常な発情徴候を示すものの 3 回以上授精しても受胎せず、正常な周期で発情を回帰する状態にある牛と定義されている [18] が、本研究では 3 回以上人工授精をした牛群がすべてこの定義にあてはまる個体ではないと考えられるため、今後、リピートブリーダーである診断をしたうえでの検討が必要である。

未経産牛の月齢別受胎率は月齢が増加するに伴い受胎率は低下したが、群間に有意差はみられなかった。未経産牛の繁殖供用適齢は 14 ～ 22 カ月齢とされ、性成熟には栄養条件が大きく関与している [19]。本研究では体高、体重に関わるデータを収集できなかったため、今後はこれらと受胎率との関連性についても検討する必要がある。

以上のことから、胚移植当日の黄体所見が 20mm 以上であれば平均的な受胎率を得ることが期待でき、未経産牛については触診で小さいと感じるものでも積極的に移植することが望ましい。高産歴、人工授精回数を重ねた牛では、子宮の炎症性疾患の既往歴などを胚移植の際には考慮する必要がある。胚移植は乳牛における暑熱期のヒートストレス、リピートブリーダーの対策として有効な手段であると考えられた。

5. 引用文献

1. 中尾敏彦：繁殖障害の現状，生産獣医療における乳牛の繁殖管理マニュアル，3-5，全国家畜産物衛生指導協会，東京（2008）
2. Spell AR, et al. : Evaluating recipient and factors that affect pregnancy rates of embryo transfervin beef cattle, *Theriogenology*, 56, 287-297 (2001)
3. Lynch CO, et al. : The relationship between periovulatory endocrine and follicular activity on corpus luteum size, function, and subsequent embryo survival , *Theriogenology*, 73, 190-198 (2010)
4. Drost M, et al. : Conception rates after insemination or embryo transfer in lactating dairy cows during summer in Florida, *Theriogenology*, 52, 1161-1167 (1999)
5. Al-Katanani YM, et al. : Pregnancy rates following timed embryo transfer with fresh or vitrified in vitro produced embryos in lactating dairy cows under heat stress conditions , *Theriogenology*, 58, 171-182 (2002)
6. Dochi O, et al. : The use of embryo transfer to produce pregnancies in repeat-breeding dairy cattle, *Theriogenology*, 69, 124-128 (2007)
7. 金子一幸，他：超音波画像診断装置によるホルスタイン種乳牛における黄体機能の評価，日獣会誌，57, 431-434 (2004)
8. Wathes DC, et al. : Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow, *Theriogenology*, 68, 232-241 (2007)
9. Sartori R, et al. : Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter, *J. Dairy Sci* 85, 2813-2822 (2002)
10. Silva JC, et al. : Plasma progesterone profiles and factors affecting embryo-fetal mortality following embryo transfer in dairy cattle, *Theriogenology*, 58, 51-59 (2002)
11. Vasconcelos JL, et al. : Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate, *Theriogenology*, 15, 56, 307-314 (2001)
12. Busch DC, et al. : Effect of ovulatory follicle size and expression of estrus on progesterone secretion in beef cows, *J anim Sci*, 86,553-63 (2007)
13. Nabenishi H, et al. : Effect of the temperature-humidity index on body temperature and conception rate of lactating dairy cows in southwestern Japan, *J. Reprod. Dev*, 57, 450-456 (2011)
14. Vieira LM, et al. : Donor category and seasonal climate associated with embryo production and survival in multiple ovulation and embryo transfer programs in Holstein cattle, *Theriogenology*, 82, 204-212 (2014)
15. 浜野晴三，他：ウシ卵子の体外成熟，体外受精および体外培養におよぼす季節の影響，日畜会報，67, 983-990 (1996)
16. Garcia-Ispuerto I, et al. : Relationship between heat stress during the peri-implantation period and early fetal loss in dairy cattle, *Theriogenology*, 65, 799-807 (2006)
17. Canu S, et al. : Predisposition to repeat breeding in UK cattle and success of artificial insemination alone or in combination with embryo transfer, *Vet rec*, 167, 44-51, (2010)

18. 大澤健司：牛群の繁殖障害の把握、診断及び評価、
生産獣医療における乳牛の繁殖管理マニュアル，85-
95，全国家畜畜産物衛生指導協会，東京（2008）

19. 大浪洋二：雌の繁殖生理，獣医繁殖学，浜名克己 編，
3 版，60-64，文永堂出版，東京（2006）

Evaluation of factors affecting conception rate following embryo transfer in Holstein cattle

H. Okawa^{1)†}, S. Akatsuka, T. Takano, A. Fujikura

1) *Fukuoka Dairy Cattle Artificial Insemination Clinic, Fukuoka Prefecture Dairy Farming Cooperative*

ABSTRACT The objective of this study was to identify the factors affecting the conception rate (CR) following embryo transfer in dairy cattle. Reproduction history, season, days postpartum (cow) or age (heifers), number of artificial inseminations (AI) and diameter and luteal tissue area of the corpus luteum (CL size) at embryo transfer (ET) were evaluated in Holstein-Friesian recipient cattle. In Experiment 1, total of 36 animals (21 cows and 15 heifers) were examined for CL size on Day 7 after estrus by ultrasonography. Embryo transfer was performed on Day 7 after estrus in animals having a CL diameter of more than 20 mm. Animals were divided into two groups according to the CL diameter, that is, animals having CL of 20 ~ 30 mm and those having CL of more than 30 mm in diameter. Although there was no difference in luteal tissue area between pregnant and non-pregnant cows, the luteal tissue area in pregnant heifers tended to be smaller than that in non-pregnant heifers ($357.6 \pm 60.1 \text{ mm}^2$ vs. $401.2 \pm 40.6 \text{ mm}^2$, $p < 0.1$). In regard to the CL diameter, there was no difference between pregnant and non-pregnant animals for both cows and heifers. In Experiment 2, the CR was compared for factors other than CL size in 301 recipient animals (210 cows and 91 heifers). The CR was significantly higher in heifers than in cows (56/91, 61.5% vs. 103/210, 49.1%, $p < 0.05$). There was no significant difference in CR among seasons. The CR was not affected by the number of days postpartum or by the number of AI. It was concluded that an average conception rate could be expected if a recipient heifer had a CL of 20 mm or greater in diameter and that ET was an effective means of breeding in order to mitigate negative impacts of heat stress and repeated breeding on reproductive performance in dairy cattle.

—**Key Words** : Conception rate, Diameter of the corpus luteum, Embryo transfer, Holstein-Friesian, Recipient cattle

† Correspondence to : Hiroaki Okawa (*Fukuoka Dairy Cattle Artificial Insemination Clinic, Fukuoka Prefecture Dairy Farming Cooperative*)
1-13-4, Susenji, Nishi-ku Fukuoka, 819-0373, Japan
TEL 092-806-1033 FAX 092-806-6980 E-mail : fuku-sinryou@f-rakukyou.or.jp

.....Jpn. J. Large Anim. Clin. 5 (supple) : 253-258, 2015