ホルスタイン種供胚牛の過排卵処理による胚生産成績における季節、分娩年齢、分娩後の経過時間および処理間隔の影響

磯 貝 保

農林水産省家畜改良センター 〒961 福島県西白河郡西郷村

要 約 ホルスタイン種供胚牛の過排卵処理による胚生産成績に影響する要因を検討した。分析には84頭延455回の処理記録を用い、回収総数、回収胚数、正常胚数、受精率、正常率の5項目について、回収時における季節、年、季節と年の交互作用、分娩年齢、分娩後経過時間、分娩年齢と分娩後経過時間の交互作用および処理間隔を変動因とする分散分析を行い、さらに、処理回数毎の分娩後経過時間の影響を分析した。

その結果、回収総数、回収胚数、正常胚数において季節が、回収総数、回収胚数、受精率、正常率において分娩年齢が、回収胚数、正常胚数、受精率、正常率において分娩後経過時間が有意な影響を示したのに対し、年、季節×年、分娩年齢×分娩後経過時間および処理間隔には明らかな影響は認められなかった。各効果の最小二乗平均値をみると、季節については春先にあたる4～5月の上昇と暑熱期にあたる8月を最大とする低下が示された。分娩年齢については採卵数、正常率ともピーク以降加齢に伴う成績低下がみられたが、そのピークにずれ（それぞれ3歳と5歳）がみられ、正常胚数には3～6歳の間に顕著な差が認められなかった。分娩後経過時間については、その影響が反復の効果とは別に単独で存在することが示唆され、分娩後1年目と2年目に差がみられなかったのに対し、3年目以降の胚生産成績は明らかに低下した。一方、処理間隔の長短による差は全くみられなかった。

キーワード：Superovulation, Season, Age, Time after calving, Cattle

(Journal of Reproduction and Development, 38: j1-j6, 1992)

牛の胚移植技術では、移植・受胎効率とともに胚生産効率の向上が期待されている。加えて、Nicholas と Smith [1] が論じた MOET (Multiple Ovulation and Embryo Transfer) 法など育種計画への応用にあたっては、現状の胚生産技術あるいはその技術水準を把握し、それに立脚することが必須と考えられる。また、牛肉資源の拡大策である誘起多胎法では、排卵数の制御と排卵する卵の質が問題となっている [2, 3]。これらのことから、過排卵処理後の胚生産成績について、ホルモン処理方法とともに、金川 [4] があげている年齢、品種、栄養状態、体重、産歴、季節、地域、分娩後の経過時間など環境あるいは個体条件の影響に関する検討が重要と考えられる。

乳用牛では、農家繋養牛のように分娩後1～2回の処理後再び受胎させる場合と、ステーションにおいて継続的に胚生産を行う場合とが考えられ、後者においてとくに、効率的生産に適した季節、年齢や分娩後の経過時間あるいは卵巢機能の異常後の成績等に関わる情報が求められる。しかし、それらの情報は十分ではなく、国内についてはほとんど得られていない。

そこで、本研究では最近の我が国における乳用牛の胚生産成績に対する、季節、分娩年齢、分娩後の経過時間および処理間隔等の影響を調査した。

材料と方法

分析材料：1985年12月～1989年8月に最終分娩した後、家畜改良センターにおいて1991年3月あるいはそれ以前まで種畜生産用供胚牛として供用されたホルスタイン種

84頭、延べ455回の過排卵処理による胚生産記録を分析に用いた。これらの過排卵処理は、発情発現後の検診によって黄体形成が確認された後、FSH と PGF_{2α} を用いて行われた。卵子の回収は処理開始後12日目（発情後7～8日目）に非外科的に実施されたが、発情を発現しなかった場合については採卵は行われず成績は0として記録された。回収された卵子は、分割の認否によって未受精卵と胚に区分され、胚は移植可能な正常胚と移植に適さない変性胚に分類された。

統計処理：回収総数、回収胚数、正常胚数、回収総数に占める胚の割合（受精率、回収総数が0の場合には0%）および正常胚の割合（正常率、同）の5項目について、回収時における季節（月）、年、季節と年の交互

作用、分娩年齢、分娩後の経過時間、分娩年齢と分娩後経過時間の交互作用、処理間隔を変動因とする分散分析を行った（モデル1）。また、分娩後経過時間については処理回数（何回目の処理か）との相関が高かった（ $r=0.70$ ）ことから、処理回数毎にその効果を調べた。統計モデルには処理回数、処理回数内分娩後経過時間に加え、モデル1で影響が示唆された季節と分娩年齢を取り上げた（モデル2）。各変動因の詳細とデータ分布および統計モデルは表1に示した。なお、分散分析はHarvey [5] によった。

結 果

モデル1による分散分析の結果を表2に示した。回収

表1. 分析に取り上げた変動因と数学モデル

モデル・変動因	区 分 (観 測 数)
モデル1 ¹⁾ : $y_{ijklm} = \mu + S_i + Y_j + (S \times Y)_{ij} + A_k + T_l + (A \times T)_{kl} + I_m + e_{ijklm}$	
S_i (季節)	1月 (42), 2月 (30), 3月 (23), 4月 (36), 5月 (35), 6月 (38), 7月 (43), 8月 (36), 9月 (43), 10月 (42), 11月 (47), 12月 (40).
Y_j (年)	1988年 (137, 1987年15含む), 1989年 (188), 1990年 (130).
A_k (分娩年齢)	3歳 (109, 2歳9含む), 4歳 (110), 5歳 (108), 6歳 (90), 7歳以上 (38).
T_l (分娩後経過時間)	分娩後1年目 (111), 2年目 (211), 3年目以降 (133).
I_m (処理間隔)	初回 (84), 前回との間隔が21-90日 (134), 91-150日 (144), 151日以上 (93).
モデル2 ²⁾ : $y_{ikno} = \mu + S_i + A_k + N_n + NT_{no} + e_{ikno}$	
S_i, A_k	モデル1に同じ
$N_n + NT_{no}$ (処理回数+処理回数内分娩後経過時間 ³⁾)	1回目 (84, 前44後40), 2回目 (80, 前42後38), 3回目 (73, 前38後35), 4回目 (65, 前34後31), 5回目 (47, 前23後24), 6～7回目 (63, 前31後32), 8回目以降 (43, 前24後19).

1) 2) y : 観測結果, μ : 全平均, e : 残差.

3) 各回とも平均分娩後日数によって前・後期に区分.

表2. 最小二乗分散分析結果 (モデル1)

変動因	自由度	平 均 平 方				
		回収総数	回収胚数	正常胚数	受精率	正常率
季節 (月)	11	108.87*	62.40*	45.32*	2205.2	2295.4
年	2	44.30	7.60	12.13	2540.0	3540.1
季節×年	22	57.97	41.72	29.45	1308.8	1055.0
分娩年齢	4	238.84**	90.86*	49.84	5613.7**	4953.8**
分娩後経過時間	2	98.26	243.59**	121.04**	8494.7**	5181.4*
分娩年齢×分娩後経過時間	12	44.86	24.59	5.12	1723.9	1009.8
処理間隔	3	27.07	2.71	15.78	1379.6	711.0
残差	402	54.47	33.60	23.84	1613.1	1460.7

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

図1. 季節、分娩年齢、分娩後経過時間および処理間隔の効果の最小二乗平均値±標準誤差 (モデル1).

() 内に a~e の記号で示した項目について次の各値間に有意差あり ($P < 0.05$).
 季節: 1月と8月 (a, b, c), 3月と8月 (a, b, c), 4月と7月 (a, c), 4月と8月 (a, b, c, e), 4月と9月 (c, d, e), 5月と7月 (a, b, c), 5月と8月 (a, b, c), 5月と9月 (a, b, c), 5月と12月 (b), 6月と8月 (e), 6月と9月 (d, e), 8月と10月 (a, b, c), 8月と11月 (a, b, c, e), 分娩年齢: 3歳と5歳 (a, e), 3歳と6歳 (a), 3歳と7歳以上 (a, b, d), 4歳と6歳 (a), 4歳と7歳以上 (a, b, c, d, e), 5歳と7歳以上 (b, c, d, e), 6歳と7歳以上 (b, d), 分娩後経過時間: 1年目と3年目以降 (b, c, d, e), 2年目と3年目以降 (b, c, d, e).

総数、回収胚数、正常胚数において有意な季節の影響がみられた (いずれも $P < 0.05$). 年については有意な影響はみられず、季節と年の交互作用も認められなかった. 分娩年齢については、回収総数、回収胚数、受精率および正常率において影響が認められ (各々, $P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$), 分娩後経過時間については、回収胚数、正常胚数、受精率、正常率において有意な影響がみられた (各々, $P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$). 分娩年齢と分娩後経過時間の交互作用は認められなかった. また、処理間隔についてはいずれも平均平方の値が小さく影響は全く認められなかった.

そこで、季節、分娩年齢、分娩後経過時間および処理間隔について各効果の最小二乗平均値 (±SE) を図示した (図1). 季節については、回収総数、回収胚数、正常胚数とも7、9月が5月に対し、8月が1、3、4、

5、10、11月に対し低値を示し、さらに、7月は4月に比べ回収総数と正常胚数が、9月は4月に比べ正常胚数が、12月は5月に比べ回収胚数が少なかった. また、9月は4、6月に比べ受精率と正常率が低く、8月は4、6、11月に比べ正常率が低かった. 分娩年齢をみると、回収総数は3歳が5、6、7歳以上に比べ、4歳が6、7歳以上に比べ多く、回収胚数および受精率は3、4、5、6歳が7歳以上に対し、正常胚数は4、5歳が7歳以上に対し、正常率は5歳が3歳に対し、4、5歳が7歳以上に対しそれぞれ高値を示した. 分娩後経過時間については、回収総数に有意差は認められなかったが、回収胚数、受精率、正常胚数、正常率が1、2年目に比べ3年目以降に減少あるいは低下を示した. 処理間隔については21~90日、91~150日、150日以上に差はみられず、初回処理と比較しても差は認められなかった (以

図2. 処理回数内分娩後経過時間の効果の最小二乗平均値±標準誤差 (モデル2).

各処理回とも左側が前期、右側が後期を示す。() 内に a~e の記号で示した項目について、処理3回目 (b, c, d, e) および4回目 (d) の分娩後経過時間に有意な影響が認められた ($P<0.05$).

上、有意差の判定基準は $P<0.05$).

モデル2による分散分析の結果、回収胚数、正常胚数、受精率、正常率に処理回数の影響がみられ (いずれも $P<0.01$), 処理回数内分娩後経過時間の効果については3回目の処理において回収胚数、正常胚数、受精率、正常率に、4回目において受精率に有意な影響が認められた (いずれも $P<0.05$). 図2に示した分娩後経過時間の各効果の最小二乗平均値 ($\pm$ SE) は、1回目の処理における回収総数、回収胚数、正常胚数を除き、前期に対し後期が減少あるいは低下する傾向をうかがわせた.

考 察

過排卵処理成績に対する季節の効果については、影響を認めた報告 [6] に対し、認めないかあるいは明確ではなかったとする報告 [7~9] も少なくない. しかし、受胎率等繁殖成績において経験的に知られる季節差の存在や、高温や暑熱ストレスあるいは日照時間が、受精率および受精卵の生存性あるいは内分泌動態や発育、泌乳、飼料摂取量、発情周期へ影響することを示唆した総説 [10] からは、直接的あるいは飼養条件等を経由した間接的な影響が存在しないとは考え難い. これに関し今回の分析では、回収総数、回収胚数、正常胚数のいずれに

おいても有意な影響を認めた. そして、その影響は、年との交互作用がみられなかったことから各年に共通することが示唆され、各月の効果の最小二乗平均値から季節の移り変わりに伴う変化であることが示された. つまり、埋草飼料が主となる秋から春先 (10~3月) に大幅な変動がなく、気候と飼養条件が好転する春 (4~5月) に向上し、6月以降暑熱期にむけ急激に低下することが推察された. 影響を認めなかった前記の報告では、その地域の特長として複合する直接的および間接的要因の効果が拮抗していたか、あるいは Shea ら [8] のように他の要因の分離が不完全であったことが推測される.

年齢については、一般に処理時の年齢が問題とされ、10歳以降での受精率あるいは正常率の低下 [6, 11] や、回収総数のピークが5~6歳であること [12] が報告されている. これに対し本研究では、処理時年齢を分娩年齢と後述する分娩後経過時間およびそれらの交互作用に分割して分析した結果、分娩年齢と分娩後経過時間に影響がみられた. 分娩年齢の影響は回収総数、回収胚数、受精率および正常率では顕著であったが、回収総数と正常率のピークのずれ (3歳と5歳) によって、正常胚数には3~6歳に明らかな差がみられなかった. 加えて、分娩後経過時間との交互作用が認められなかったことから、2産目にあたる3歳の分娩後において供胚牛として良好な胚生産成績を期待できることが示された.

分娩後の経過時間については、搾乳期間内や乾乳前後の各時期あるいは搾乳牛と乾乳牛の比較を行った報告が主であり [2, 6, 13], 分娩後長期間に関する報告は見当たらない. これについて本研究では、搾乳中あるいは早期乾乳後がほとんどである分娩後1年目と、いずれも乾乳後である2年目に顕著な差を認めなかったが、3年目以降では排卵した卵子の質あるいは卵管および子宮環境の悪化をうかがわせる受精率および正常率に低下がみられ、回収胚数および正常胚数に明らかな減少が認められた. そのため、継続的な胚生産が計画される場合には、305日間の乳期終了後ではなく、搾乳中あるいは早期乾乳後からの胚生産が有効と考えられる. なお、本研究に用いたデータが同一供卵牛の同一産次における反復記録であったことから、分娩後経過時間の効果は高い相関を有した処理回数の効果を内含あるいは代替していることが懸念されたが、モデル2によって反復とは別に単独での影響の存在が示唆され、モデル1の結果が支持された.

反復の影響については、金川 [4] が、PMSG 処理に関する報告において卵巢反応の低下をみたものが多い

ことを述べ、Donaldson と Perry [14] および塩谷ら [15] あるいは Hasler ら [6] が、FSH 処理においても移植可能胚の減少あるいは受精率の低下を示唆している。これらに対し、今回の結果も同様な傾向を示したが、図 2 をみると、反復に伴う成績の減退は分娩後の経過時間の効果を含んでおり、その影響が大きいことがうかがえた。継続的胚生産において反復の影響は重要であるため、再現性（反復率）とともにさらに詳細な検討が別途必要と考えられる。

一方、処理間隔に影響がみられなかったことは、卵巢等の疾患により処理不能の状態が続いた場合であっても、正常性周期と発情後の黄体形成にまで回復すれば、胚生産が可能であることを示唆している。

以上、本研究の結果より、ホルスタイン種供胚牛における過排卵処理による胚生産成績は、分娩年齢 3 ～ 6 歳に差はないこと、乳期終了後ではなく搾乳中あるいは早期乾乳後の開始が有効であること、暑熱期への対策が必要であること、卵巢等の疾患は回復後の胚生産に影響しないことが示された。このことは、初産検定成績に基づく 2 産分娩後からの胚生産が実用的であることを示唆している。なお、血統指数により選抜した未経産牛および途中記録により選抜した初産牛の胚生産成績についてはさらに検討が必要である。

謝 辞

本研究は家畜改良センター乳用優良牛群育種改良事業の一環として行ったものであり、ご助言を頂いた下平乙夫家畜改良センター技術部技術第一課長並びにお力添を頂いた木村和生同情報分析課長に感謝する。

文 献

- 1) Nicholas FW, Smith C. Increased rates of genetic change in dairy cattle by embryo transfer and splitting. *Anim Prod* 1983; 36: 341-353.
- 2) 磯貝 保, 仲西孝敏, 佐々木一八, 田上順道. 低単位 FSH および PGF_{2α} あるいはその類縁体投与によるウシの誘起多胎と双子生産. *家畜繁殖学雑誌* 1991; 37: 105-113.
- 3) 磯貝 保, 渡辺裕一郎, 仲西孝敏, 有馬真紀子. ウシの誘起多胎における高純度 FSH 製剤の利用とその効果. *家畜繁殖学雑誌* 1991; 37: 219-224.
- 4) 金川弘司. Donor に対する過剰排卵処理. 牛の受精卵移植 (金川弘司編) 東京: 近代出版; 1984: 23-35.
- 5) Harvey WR. User's Guide for LSMLMW PC-1 Version Mixed Model Least-squares Maximum Likelihood Computer Program, Ohio State Univ, Columbus; 1987.
- 6) Hasler JF, McCauley AD, Schermerhorn EC, Foote RH. Superovulatory responses of Holstein cows. *Theriogenology* 1983; 19: 83-99.
- 7) 高橋芳幸. ホルスタイン種未経産牛における PMSG-PGF_{2α} による過剰排卵処理と非外科的卵回収. *家畜繁殖学雑誌* 1983; 29: 74-79.
- 8) Shea BF, Janzen RE, McDermid, DP. Seasonal variation in response to stimulation and related embryo transfer procedures in Alberta over nine year period. *Theriogenology* 1984; 21: 186-195.
- 9) Massey JM, Oden AJ. No seasonal effect on embryo donor performance in the southwest region of the USA. *Theriogenology* 1984; 21: 196-217.
- 10) Tucker HA. Seasonality in cattle. *Theriogenology* 1982; 17: 53-59.
- 11) Donaldson LE. Effect of age of donor cows on embryo production. *Theriogenology* 1984; 21: 963-967.
- 12) Lerner SP, Thayne WV, Baker RD, Henschen T, Meredith S, Inskeep EK, Dailey RA, Lewis PE, Butcher RL. Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows. *J Anim Sci* 1986; 63: 176-183.
- 13) Darrow MD, Lindner GM, Goemann GG. Superovulation and fertility in lactating and dry dairy cows. *Theriogenology* 1982; 17: 84.
- 14) Donaldson LE, Perry B. Embryo production by repeated superovulation of commercial donor cows. *Theriogenology* 1983; 20: 163-168.
- 15) 塩谷康生, 花田 章, 小林 仁. 未経産牛における FSH-PGF_{2α} による 2 回連続の過排卵処理と非手術的胚回収. *家畜繁殖学雑誌* 1985; 31: 5-8.

Effects of Season, Age at Calving, Time after Calving and Interval of Treatment on the Embryo Production in Superovulated Holstein Donors

Tamotsu ISOGAI

National Livestock Breeding Center, Nishigo, Fukushima 961

Summary. Effect of factors affecting the embryo production of superovulated Holstein cows were evaluated. Data were obtained from 455 superovulation-collections using 84 donors. For all of the hormonal treatment, FSH and PGF_{2α} were used. Season (every 12 month), year (1988, 1989, 1990), age at calving (3, 4, 5, 6, ≥ 7 years old), time after calving (1st, 2nd, ≥ 3 rd year), interval of treatment (1st treatment, 21–90, 91–150, ≥ 151 days) and interaction (season $\times$ year, age $\times$ time) were evaluated by analysis of variance for number of total ova/embryos (NT), number of fertilized ova (NF), number of normal embryos (NN) fertilization rate (%F) and normal rate (%N), and time after calving within each flush were evaluated by another model. The effects of season on NT, NF and NN, age at calving on NT, NF, %F and %N, and time after calving on NF, NN, %F and %N were significant ($P < 0.05$), while effects of year, interval of treatment, season $\times$ year and age $\times$ time were not. Seasonal effects suggested the influence of heat. Effects of age at calving indicated a lag of peaks between NT (3 years) and %N (5 years), and no difference was observed among 3–6 years in NN. Influence of time after calving without the effect of repeated treatment was observed, and embryo production during the 3rd year or over was worse as compared with the 1st and 2nd year.