

# 効率的な性選別精液活用技術の検討

森川繁樹・紀川将之<sup>\*</sup>・田渕雅彦・東山雅人・川田健太

先川正志・西村公寿・竹縄徹也・福見善之

## 要 約

県内酪農家における性選別精液の利用拡大を目的とし、同精液を経産牛へ使用する場合の人工授精技術について検討を行った結果、発情開始から20～24時間後、カテーテル式人工授精器等により子宮深部へ注入する方法により50.0%の受胎率が得られ、安定した受胎成績を得るために本法が有効であることが示唆された。また、同様の人工授精技術を用いて、体内胚生産に性選別精液を活用した結果、非選別精液を使用した場合と比較して胚の品質は低下したものの、推定されるAランク（国際胚移植学会 code 1）の雌胚率は $28.1 \pm 27.7\%$ と非選別精液使用の場合( $31.6 \pm 16.2\%$ )と同等であり、効率的に後継牛を生産する有効な手段であると考えられた。

## 目 的

近年、高い確率で雌雄の産み分けが可能な性選別精液が実用化され、県内でも利用農家が増加傾向にある。しかし、市販されている性選別精液のストロー1本あたりに充填される精子数は非選別精液の精子数の4分の1程度と少なく、選別の過程で精子運動性も低下している<sup>1)</sup>。そのため、経産牛においては非選別精液と比較して受胎率が低下する傾向にあり<sup>2,3)</sup>、未經産牛への利用が推奨されている。このような背景の中、県内酪農家においても未經産牛への利用が定着しつつあるが、牛群改良という点では、一般的に泌乳能力の判明した経産牛から後継牛を確保する方が効率的であり、性選別精液の利用は酪農経営の効率化に必ずしも直結していないのが現状である。そこで、県内酪農家における性選別精液の利用拡大を目的とし、経産牛へ性選別精液を使用した場合でも、非選別精液と変わらない安定した受胎成績の得られる人工授精技術について検討を行った。また、従来の体内胚生産技術に性選別精液を利用すること

により、経産牛から効率的に後継牛を生産する方法について検討を行った。

## 材料および方法

### 1) 性選別精液の授精方法の検討

対照区としてホルスタイン種経産牛を延べ8頭、（平均産次数1.43）、試験区としてホルスタイン種経産牛を延べ14頭（平均産次数1.64）を供試した。両区とも、一般的に流通しているA社およびB社の販売する性選別精液を使用した。授精方法として、対照区については、発情開始から12～16時間後に従来の人工授精器（ステップ式）により、卵胞を触知した卵巢側の子宮角へ性選別精液を注入した。一方、試験区については、発情開始から20～24時間後にカテーテル式人工授精器により卵胞を触知した卵巢側の子宮角へ注入した。

両区とも、授精後60日後に超音波診断装置を用いて妊娠診断を行い、受胎率を算出した。

### 2) 体内胚生産への性選別精液活用技術の検討

対照区としてホルスタイン種経産牛延べ13頭（平均産次数3.55）、試験区としてホルスタイン種経産牛延べ11頭（平均産次数2.36）、野外試験区と

<sup>\*</sup>徳島県西部家畜保健衛生所

して県内酪農家Aで飼養するホルスタイン経産牛延べ10頭(平均産次数2.6)を供試した。各区とも、過剰排卵処理(表1)としてFSH(前葉性卵胞刺激ホルモン)36AUを、発情から9から13日目を起点とし4日間朝夕に漸減投与し、投与3日目の朝夕にPGF2 $\alpha$ 類似体(クロプロステノール)500 $\mu$ gを投与し発情を誘起した。対照区、試験区については、FSH投与開始96時間前にCIDR(プロジェステロン放出膈内留置製剤)の挿入およびE2(エストラジオール安息香酸エステル)2mgの投与を行い、CIDRは2回目のPGF2 $\alpha$ 投与時に抜去した。使用精液および人工授精方法として、対照区においては発情開始から12~16時間後および、20~24時間の計2回、非選別精液1本を左右の子宮角へ各0.25ml、ステップ式人工精液器を用い注入した。試験区においては、発情開始から20~24時間後および30~36時間後の計2回、性選別精液2本を左右の子宮角へ各0.25ml、カテーテル式人工授精器を用い注入した。野外試験区においては、試験区と同様のタイミングで、性選別精液2本を左右の子宮角へ各0.25ml、ステップ式人工授精器等を用い注入した。なお、各区とも1回目の人工授精時にGnRH(酢酸フェルチレリン)200 $\mu$ gを投与した。採胚は発情から8日後に実施し、正常胚率並びに胚の品質について比較検討した。正常胚のうち、試験区では90%が、対照区では50%が雌の胚と仮定し、Aランク(国際胚移植学会マニュアルcode1)の雌胚率について推定した。

表1 試験区における体内胚生産プログラム

|    | Day5<br>(~8) | Day9<br>(~12) | Day10      | Day11                    | Day12   | Day13 | Day14   | Day21 |
|----|--------------|---------------|------------|--------------------------|---------|-------|---------|-------|
| AM | CIDR<br>+E2  | FSH<br>6AU    | FSH<br>5AU | FSH 4AU<br>+ PG          | FSH 3AU | 発情    | AI+GnRH | 採胚    |
| PM |              | FSH<br>6AU    | FSH<br>5AU | FSH 4AU<br>+ PG<br>CIDR抜 | FSH 3AU |       | AI      |       |

## 結 果

### 1) 性選別精液の授精方法の検討

性選別精液を発情開始から12~16時間後にステ

ップ式人工授精器により注入した対照区において、受胎率は25.0%(2/8)であった。一方、発情開始から20~24時間後、カテーテル式人工授精器により注入した試験区では50.0%(7/14)の受胎率が得られた(表2)。また、試験区のうち初産次の受胎率は71.4%(5/7)、2産次の受胎率は40.0%(2/5)、3産次の受胎率は0.0%(0/2)と産歴が進むにつれ受胎率が低下する傾向にあった。

表2 性選別精液の人工授精成績

|            | 供試頭数      | 受胎頭数     | 受胎率          |
|------------|-----------|----------|--------------|
| <b>対照区</b> | <b>8</b>  | <b>2</b> | <b>25.0%</b> |
| <b>試験区</b> | <b>14</b> | <b>7</b> | <b>50.0%</b> |
| <b>初産</b>  | <b>7</b>  | <b>5</b> | <b>71.4%</b> |
| <b>2産</b>  | <b>5</b>  | <b>2</b> | <b>40.0%</b> |
| <b>3産</b>  | <b>2</b>  | <b>0</b> | <b>0.0%</b>  |

### 2) 体内胚生産への性選別精液活用技術の検討

性選別精液を体内胚生産に活用した試験区において、平均正常胚率は62.2 $\pm$ 31.7%であり、非選別精液を用いた対照区における平均正常胚率73.8 $\pm$ 29.8%との間に有意な差は認められなかった。また、試験区の平均Aランク胚率は31.2 $\pm$ 25.8%であり、対照区における平均Aランク胚率63.3 $\pm$ 32.3%と比較して有意に低下したものの(p<0.05:t検定)、推定のAランク雌胚率については、試験区(平均28.1 $\pm$ 27.7%)と対照区(平均31.6 $\pm$ 16.2%)との間に有意な差は認められなかった。一方、野外試験区における平均の正常胚率は70.7 $\pm$ 30.0%、Aランク胚率は52.4 $\pm$ 35.9%、推定Aランク雌胚率は47.2 $\pm$ 32.3%と試験区よりも高い傾向にあった(図2)。また、野外試験区において、初産次および2産次(計5頭)の平均正常胚率は93.1 $\pm$ 5.2%、平均Aランク胚率は81.0 $\pm$ 7.5%であり、3産次および4産次(計5頭)の平均正常胚率(48.4 $\pm$ 25.4%)および平均Aランク胚率(23.9 $\pm$ 27.0%)よりもそれぞれ有意に高かった(p<0.05:t検定)(図3)。

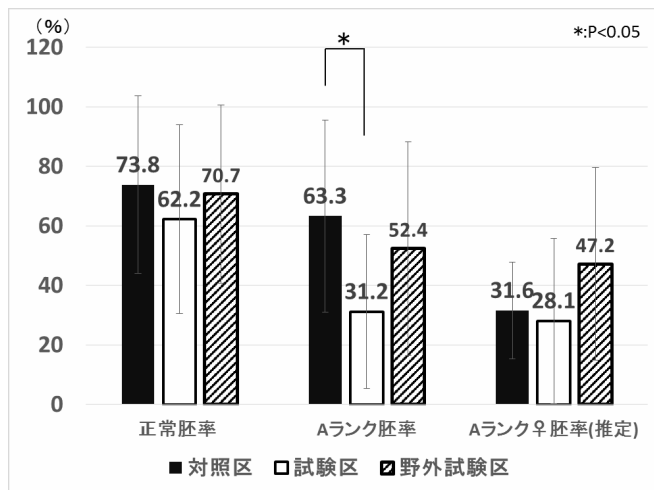


図2：性選別精液を用いた体内胚生産成績

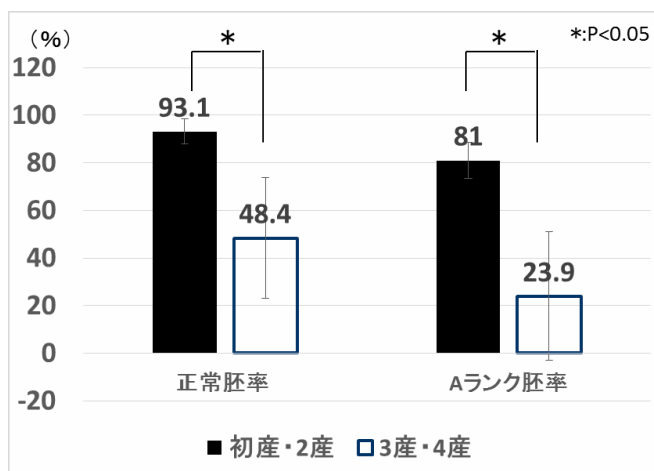


図3：野外試験区における産次の違いによる体内胚生産成績

## 考 察

性選別精液の利用拡大ならびに牛群改良の更なる効率化に向け、経産牛において安定した受胎成績の得られる人工授精方法を検討した。まず、使用する人工授精器については、性選別精液の精子数が少ないことから、卵子との受精場所（卵管膨大部）へできるだけ多くの精子を到着させるため、これまでも報告<sup>4,5)</sup>のあるカテーテル式注入器を使用することで可能な限り子宮深部へ注入する方法を選択した。ただし、従来のステップ式注入器を使用した方が受胎率が高いという調査結果<sup>6)</sup>もあることから、本試験では授精時期についても検討を加えた。牛の人工授精は、一般的に発情開

始から12～16時間後に行うことが望ましいとされている<sup>7)</sup>。しかし、性選別精液の場合、非選別精液と比べ受精能獲得に要する時間が短いという報告もあることから<sup>8)</sup>、従来の授精時期では卵子が卵管膨大部に下降してくる前に、精子が受精能を失う可能性がある。そこで本試験では、授精時期を従来より遅く、発情開始から20～24時間後とした。結果、子宮深部注入に従来よりも遅い授精時期を組み合わせた本方法により受胎率は向上し、安定した受胎成績を得るために有効であることが示唆された。

ホルスタイン経産牛の後継牛確保という観点から、体内胚生産への性選別精液の活用方法についても検討した。試験区において、本試験で得られた人工授精方法を応用したところ、非選別精液を用いた対照区と比較して胚の品質は低下したものの、推定されるAランク雌胚率は同等であった。非選別精液を用いて体内胚を採取した場合、雌胚の確保にはバイオプシーにより胚の一部を採取してDNA診断を行う高度な雌雄判別技術が求められるが、性選別精液を用いる場合はこの技術が不要である。同等の雌胚が確保されるのであれば、性選別精液を用いた方が効率的であると考えられる。また、今回、野外での実証として野外試験区を設けたところ、胚の品質は試験区よりも高い傾向にあり、対照区との間にも有意な差は認められなかった。これにより、本試験で検討した技術は酪農家へ広く普及することも可能と考えられる。一方、野外試験区では、人工授精の授精時期は試験区と同じであったが、カテーテル式注入器を使用せず、従来の注入器を使用して可能な限り子宮深部へ注入した。このことは、カテーテル式注入器の使用が必ずしも胚の品質を向上させるとは限らないことを示唆している。また、試験区と野外試験区の間認められた胚の品質の差は、供胚牛の給与飼料内容の差でもありと考えられる。例えば、野外試験区は飼料添加物としてルーメンバイ

パスコリン製剤を給与していた。津田らは、ルーメンバイパスコリン製剤の給与により胚品質の向上が認められたと報告している<sup>9)</sup>。また近年、抗酸化物質給与による胚の品質向上も報告されている<sup>10)</sup>。今後、性選別精液利用による胚の品質低下に対して、これら飼料添加物を含めた飼料給与技術についても検討する必要がある。

人工授精技術に検討において、安定した受胎率が得られた方法であったが、産歴が進むにつれ受胎率が低下する傾向にあった。また、野外試験区の体内胚生産において、若い産次の牛の方が胚の品質が高かった。これらは、産歴が進むにつれ子宮内環境の悪化や、ホルモン動態の異常が増加してくることが要因ではないかと考える。倉原らは性選別精液の定時授精プログラムにより、経産牛において良好な受胎率が得られたと報告している<sup>6)</sup>。産歴が進んだ牛については、排卵のタイミング等について、人工的な調整方法についても今後検討する必要がある、現段階では、性選別精液は経産牛の中でも若い産次の牛へ利用を推奨すべきと考える。

以上、本試験で検討した性選別精液の利用技術は、泌乳能力の判明している経産牛から効率的に後継牛を確保するうえで、有効な手段となることが示唆され、本技術により同精液の酪農家での利用拡大が期待される。

## 文 献

- 1) Blondin P. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. Theriogenology, 71:30-38. 2009.
- 2) 湊 芳明. 牛の選別精液を用いた雌雄産み分け. LIAJ NEWS, No. 109:8-13. 2008.
- 3) 濱野 晴三. 計根別農協における性選別精液の事例. LIAJ NEWS, No. 130:23-24. 2011.

4) 砂川 政弘, 角田 毅, 根岸 淳江, 原田 守也. 過剰排卵処置したホルスタイン種牛への雌雄選別精液の子宮角深部注入. 日本胚移植学雑誌, 33:44. 2011.

5) 石井利通, 梅木俊樹, 島田浩明. ホルスタイン種経産牛における自然発情での雌性選別精液の深部注入による受胎性の検討. 三重県 <http://www.pref.mie.lg.jp/common/content/000165943.pdf>

6) 倉原 貴美, 藤田 達男. 乳牛の雌選別精液を用いた人工授精の受胎率向上に関する研究. 大分県試験成績報告書, 45:1-5. 2015.

7) 日本家畜人工授精師協会. 家畜人工授精講習会テキスト. 279-284. 2010

8) Moce E, Graham JK, Scehnik JL. Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an acrosome reaction. Theriogenology, 66:929-936. 2006.

9) 津田毅彦, 渡邊徹, 紀川将之, 後藤充宏. 乳牛へのルーメンバイパスコリン給与効果. 徳島県畜産研究所研究報告, 7:14-17. 2007.

10) 向野逸郎, 長門正志, 堀登, 岡田徹, 山崎孝一, 西村省治, 葭谷收平. アスタキサンチン混合飼料給与が黒毛和種供卵牛の採卵成績におよぼす影響. 石川県畜産総合センター研究報告, 41:6-8. 2009