

膣内クリーム（プロジェステロン混入クリーム）スポンジの留置期間が未経産豚の排卵同期化，採胚および繁殖成績に及ぼす影響

誌名	日本養豚学会誌
ISSN	0913882X
著者名	平山,祐理 大久保,美希 松田,秀雄 吉岡,一 今井,敬 三角,浩司
発行元	日本養豚学会
巻/号	48巻1号
掲載ページ	p. 20-26
発行年月	2011年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



技術ノート

膣内クリーム（プロジェステロン混入クリーム） スポンジの留置期間が未経産豚の排卵同期化、 採胎および繁殖成績に及ぼす影響

平山祐理・大久保美希*・松田秀雄**・吉岡 一・今井 敬・三角浩司

(独)家畜改良センター, 福島県西白河郡西郷村大字小田倉字小田倉原 1, 961-8511

* 農林水産省, 九州農政局, 熊本県熊本市二の丸 1-2, 860-8527

** 農林水産省, 東京都千代田区霞ヶ関 1-2-1, 100-8950

(2010年5月26日受付, 2010年10月4日受理)

緒 言

豚において衛生的に種豚を導入する技術の一つとして、胚移植がある。効率のよい胚移植のためには、供胚豚および受胚豚の発情同期化技術が重要である。発情同期化技術の一つとして、未成熟豚では、妊馬血清性腺刺激ホルモン (eCG) と人絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) の併用投与 (BAKER, 1979) による発情同期化法が胚採取を行う際に最も一般的に用いられている。一方、性成熟豚の発情同期化方法には初期妊娠豚にプロスタグランジン $F_{2\alpha}$ (PGF_{2 α}) を投与し流産を誘起させる方法 (人工流産法: GUTHRIE ら, 1978; LOVE ら, 1993), 経口合成プロジェステロン (P) 製剤 (altrenogest 等) を一定期間摂取させる方法 (MARTINAT-BOTTE ら, 1985; WHITE ら, 1988),

eCG および hCG の低単位合剤である PG600 を投与する方法 (BATES ら, 1991; SOMMER ら, 2007) および PGF_{2 α} 製剤の反復投与による方法 (ESTILL ら, 1993; 岩村ら, 2001) 等が知られている。しかし経口合成プロジェステロンを用いた方法は、薬剤が現在日本では購入できないという問題があり、また PG600 を用いた方法は、離乳豚においては離乳時に PG600 を投与することで発情誘起に有効であるが、発情を繰り返す豚では PG600 投与に先立ち黄体期の豚に PGF_{2 α} 製剤を投与する必要があることから同期化可能な期間が短いこと、さらに PGF_{2 α} 製剤の反復投与による方法は発情周期を約 6.5 日まで短縮することが可能であったが同期化可能な期間に限られているという問題がある。このような背景から、胚移植を行う際には人工流産法が一般的に用いられてきた。し

Influence of Remaining Period of Intravaginal Cream (Progesterone Mixing Cream) Sponge on Synchronous Ovulation, Embryo Collection and Reproductive Performance in Cycling Gilts

Yuri HIRAYAMA, Miki OKUBO*, Hideo MATUDA**, Hajime YOSHIOKA, Kei IMAI and Kouji MISUMI
National Livestock Breeding Center, Odakurahara 1, Odakura, Nishigo-mura, Nishi-shirakawagun, Fukushima 961-8511, Japan

* Ministry of Agriculture, Kyusyu Regional Agricultural Administration Office, Ninomaru 1-2, Kumamoto-shi, Kumamoto 860-8527, Japan

** Ministry of Agriculture, Kasumigaseki 1-2-1, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8950, Japan

連絡者: 平山祐理 (E-mail: y0hiraym@nlbc.go.jp Tel. 0248-25-6165)

かし人工流産法は、交配に手間やコストがかかる上、妊娠期間には注意を払う必要があるという問題を抱えているだけでなく、妊娠豚に流産を強要するといった点で動物福祉上好ましくないことから、人工流産法に代わる発情同期化法の開発が望まれている。

一方、牛では腔内留置型プロジェステロン製剤 (CIDR 等) を使用した胚採取方法についての数多くの報告がある (BARACALDO ら, 2000 ; BARUSELLI ら, 2006 ; Bo ら, 2006)。同様にめん羊では合成黄体ホルモンを混入したクリームをスポンジとともに腔内に留置し、一定期間後にスポンジを除去することにより発情同期化が可能 (腔内クリーム法) との報告が KOHNO ら (2005) によってされている。豚では神山ら (2000) および丹治ら (2006) によって腔内留置型プロジェステロン製剤の使用による発情同期化が試みられているが、神山らの方法は同期化率において、また丹治らの方法は同期化率は高いものの例数が少ないことから、なお課題が残る。また胚採取に応用した報告も我々が知るところない。

そこで、本試験では、めん羊における腔内クリーム法を豚の排卵同期化および胚採取へ応用し、腔内クリームの留置期間の違いが未経産豚の排卵同期化、採胚および繁殖成績に及ぼす影響を

調査した。

材料および方法

実験 1. 腔内クリームの留置期間の違いが排卵同期化および採胚成績に及ぼす影響

正常な発情周期を示すデュロック (D) 種未経産豚 (11~15 ヶ月齢, 体重 150~180 kg) 6 頭を用いた。腔内クリームは Khono ら (2005) の方法に準じ、合成黄体ホルモンである酢酸メドロキシプロジェステロン (ヒスロン H200, ファイザー) 200 mg と市販の軟膏 (オロナイン H 軟膏, 大塚製薬) 1 ml と混和した。クリームとともに腔内に留置するスポンジは、市販のウレタンスポンジを自作加工した (図 1A)。

自然発情の許容最終日を発情周期 1 日目とし、発情周期 10 日目の豚に合成黄体ホルモンを含むクリームをスポンジとともに腔内へ挿入した。発情の確認は背圧反応により行った。豚の腔内に挿入する際は自作の applicator の先端にクリームを置き、クリームをスポンジで applicator 内に押し込んだ状態で豚の腔内に applicator を挿入し (図 1B)、スポンジとともにクリームを腔内に挿入した。スポンジは、挿入後 6, 11 および 16 日間留置した (6 日区, 11 日区および 16 日区; 各 n=2)。処置後、スポンジ除去時に、PGF_{2α}

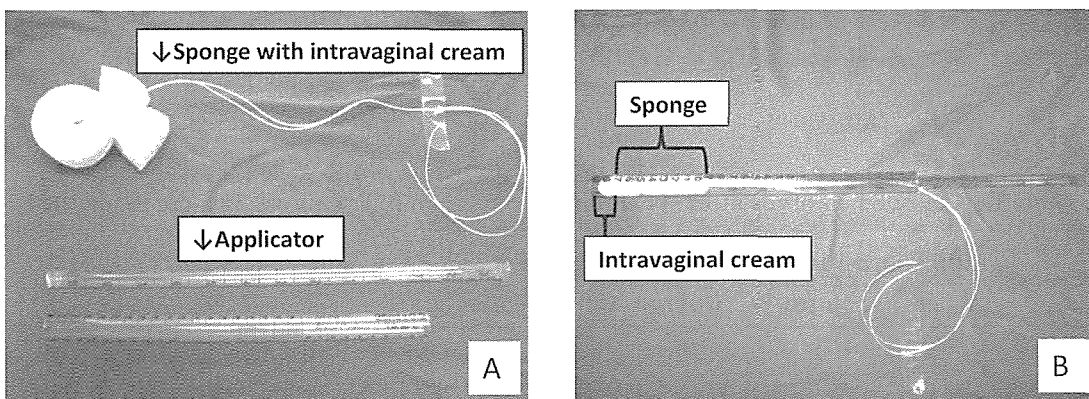


図 1. 腔内クリーム挿入用スポンジおよび applicator (A), および applicator 内に装填された状態のスポンジおよび腔内クリーム (B).

Fig. 1. Sponge and applicator for insertion of intravaginal cream (A), and intravaginal cream and sponge inside of applicator (B).

類縁体であるクロプロステノール（プラネート，インターベット）0.276 mgを投与し，その24時間後に再びクロプロステノール0.276 mg および eCG 1,000 IU（セロトロピン，あすか製薬）を投与した。さらに，eCG 投与から72時間後に hCG500 IU（プベローゲン，三共エール製薬）を投与した。hCG 投与の24，32 および 48 時間後に人工授精（AI）を実施した。発情の観察は試験期間中毎日，背圧反応により行った。初回 AI 時から5日目または6日目に胚を外科的に採取し，黄体数，回収胚数および正常胚数を調査した。

供試豚は，腔内クリーム挿入から除去までの間は隔日で採血を行い，除去から採胚までは24時間間隔で頸静脈より採血を実施した。採取した血液サンプルは，TAKENOUCI ら（1993）の方法に従いエンザイムイムノアッセイ（EIA）法により血漿中 P 濃度の測定を行った。本測定系では免疫抗原として 11 α -hydroxy-P-HemisuccinateBSA を使用し，最小感度は 1.25 pg/well，変動係数は 4.4 % であった。なお，今回測定したアッセイ系では合成黄体ホルモンを検出しないため，検出された P は豚由来の値である。

実験 2. 腔内クリームの留置期間の違いが繁殖成績に及ぼす影響

正常な発情周期を示した D 種未経産豚（10～14 ヶ月齢，体重 140～170 kg）8 頭を用いた。供試豚は，実験 1 と同様の試験区に振り分けスポンジを留置し，除去後ホルモン処置および AI を行った（各 n=2）。また，対照区として妊娠 25 日目（最

終 AI 日=妊娠 1 日）の豚（n=2）に PGF_{2 α} を投与して流産をを起こした後，試験区と同様のホルモン処置を行い，AI を実施した。供試豚は受胎の有無および産子数を調査した。

結 果

実験 1. 腔内クリームの留置期間の違いが排卵同期化および採胚成績に及ぼす影響および供試豚の血漿中プロジェステロン濃度の変動

表 1 に採胚結果を示した。腔内クリーム処置後の発情誘起処理により，各試験区 2 頭中 1 頭に許容が確認された。残りの豚は陰部に発情徴候が見られたものの背圧反応で許容を示さなかった。試験に供試したすべての豚において 12～24 個の黄体が確認できた。腔内クリーム 6 日および 11 日区ではすべての豚から正常胚が 8～18 個採取でき，さらに正常胚の割合が 100% であった。しかし，16 日区で回収された胚数は 0 および 5 個であり，正常胚の割合は 0 および 29.4% であった。表 2 に採取した正常胚のステージを示した。5 日目胚ではすべて胚盤胞（21/21）であり，6 日目胚では，胚盤胞が 18.9%（7/37），拡張胚盤胞が 56.8%（21/37）および脱出胚盤胞が 24.3%（9/37）であった。

図 2 に各試験区の豚の血漿中 P 濃度の動態を示した。6 日区の 2 頭では，スポンジ挿入時には 40.0 および 51.9 ng/ml であった血漿中 P 濃度は，スポンジ挿入後 2 日目から減少を始め，スポンジ

表 1. 採胚結果

Table 1. Collected embryos after synchronized ovulation following vaginal cream method

Groups	Name of pigs	No. of corpora lutea	No. of collected embryos (%)	Total No. of normal embryos (%)	Notes
6 Days	A	16	16 (100)	16 (100)	
	B	18	18 (100)	18 (100)	
11 Days	C	12	11 (91.7)	11 (100)	
	D	13	8 (61.5)	8 (100)	
16 Days	E	24	24 (100)	0 (0)	All oocytes are unfertilized
	F	17	17 (100)	5 (29.4)	12 oocytes are unfertilized

表 2. 採取した胚のステージ

Table 2. Developmental stage of collected embryos

collection (day)	Groups	Total No. of normal embryos	No. of blastocysts (%)	No. of expanded blastocysts (%)	No. of hatched blastocysts (%)
5	6 Days	16	16	0	0
5	16 Days	5	5	0	0
total		21	21 (100)	0	0
6	6 Days	18	1	10	7
6	11 Days	11	1	8	2
6	11 Days	8	5	3	0
6	16 Days	0	0	0	0
total		37	7 (18.9)	21 (56.8)	9 (24.3)

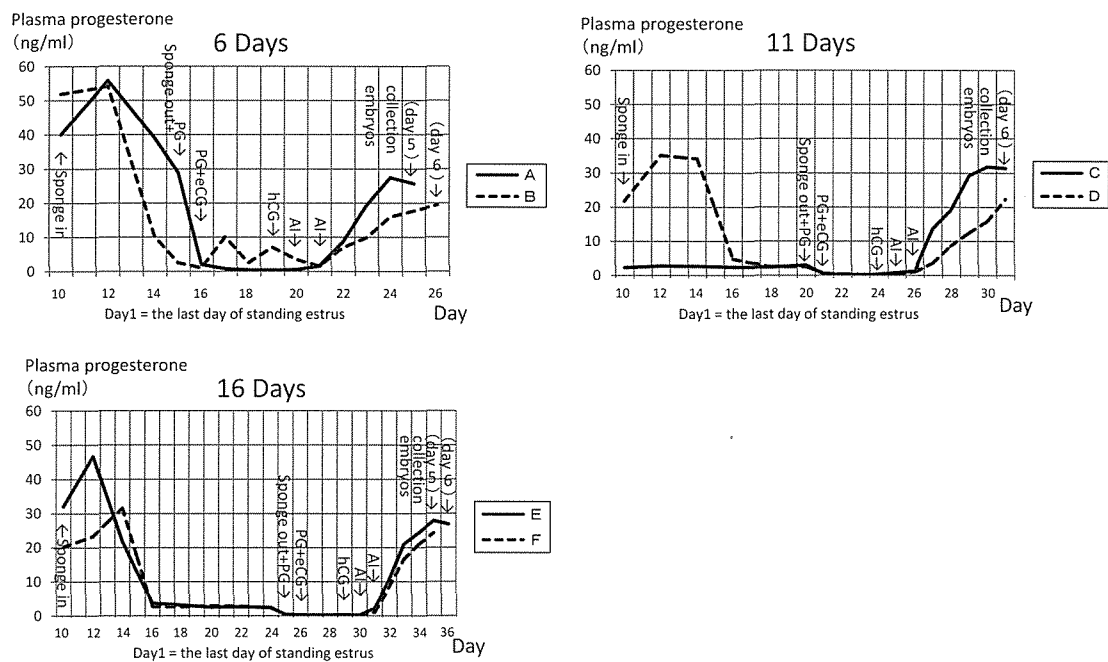


図 2. 各試験区の豚の血漿中プロジェステロン濃度の動態.

Fig. 2. Profiles of plasma progesterone derived from gilts in three treatment groups.

除去時には 28.8 および 2.5 ng/ml だった。スポンジ除去後、1 頭については除去から 2 日後に血漿中 P 濃度が 1 ng/ml 以下に達し、hCG 投与後には再び血漿中 P 濃度が上昇を開始した。残りの 1 頭については除去から 6 日後まで P 濃度が 1.0~7.1 ng/ml の範囲で上下し、その後上昇を開始し

た。11 日区の 2 頭では、スポンジ挿入時の P 濃度に差が認められた (2.3 ng/ml vs 21.8 ng/ml)。スポンジ挿入時に P 濃度が高かった個体では、スポンジ挿入後 5 日目から P 濃度は減少を開始し、9 日目には 2.5 ng/ml に低下し、11 日目のスポンジ除去日も同値であった。スポンジ除去時の P 濃度

表 3. 受胎および産子数結果

Table 3. Pregnancy and litter size after synchronized ovulation following vaginal cream method

Groups	Name of pigs	Pregnancy	Piglet	Note
6 Days	a	-	-	estrus returned 21days after.
	b	+	8	
11 Days	c	+	13	
	d	+	5	
16 Days	e	-	-	estrus returned 22days after.
	f	-	-	
Control	g	+	12	
	h	-	-	

には両個体の間に差は認められず、hCG投与後のP濃度上昇が観察された。16日区の2頭では、スポンジ挿入時には20.2および32.1 ng/mlであった血漿中P濃度は、スポンジ挿入後5日目までにピークを迎え(31.5および46.7 ng/ml)、その後下降に転じて10日目までに3 ng/ml以下に達し、スポンジ除去日まで3 ng/ml以下の低値を維持した。

実験 2. 腔内クリームの留置期間の違いが繁殖成績に及ぼす影響

表3に受胎および産子数の結果を示した。受胎率および分娩率は、対照区で50%、6日区で50%、11日区で100%および16日区で0%であった。対照区および6日区の産子数は、それぞれ12頭および8頭であった。11日区の産子数は13および5頭であった。受胎しなかった豚は、6日区で発情周期36日目、11日区で21日目および16日区で22日および26日目に発情が認められた。

考 察

本研究は、腔内クリーム法を豚の排卵同期化および胚採取へ応用することを目的とし、腔内クリームの留置期間の違いが排卵同期化、採胚成績および繁殖成績に及ぼす影響を調査した。

腔内クリーム法を胚採取に応用するためには、必要なステージの胚を回収するための排卵同期化が必要不可欠である。今回、実験1で供試したすべての豚から黄体が確認でき、さらに初回AIか

ら5日目に採取した胚はすべて胚盤胞、6日目に採取した胚は拡張胚盤胞を中心に胚盤胞～脱出胚盤胞が採取できた。豚胚は、交配後5日目は胚盤胞、6日目は胚盤胞～脱出胚盤胞となることが知られている(丹羽ら, 1994; 亀山, 1996)。今回実験1に供試した6頭のうち胚が採取できた5頭について期待されたステージの胚が採取できたことから、腔内クリーム法により排卵の同期化が可能であることが示唆された。なお、腔内クリームの挿入期間が採取した胚ステージに影響を及ぼすかどうかは、今回の試験では明らかではない。また、実験1における6および11日区では黄体数12～18個、正常胚数8～18個と良好な結果が得られたことから、腔内クリーム法が胚移植において供胚豚へ利用できる可能性が示された。さらに、分娩成績でも両区あわせて分娩率75%、一腹平均産子数8.7頭と、対照区とはほぼ同等の結果を得たことから、繁殖用としても利用できる可能性が考えられ、腔内クリームを6または11日留置した後の発情誘起は人工流産法に代わる方法として利用できる可能性が示された。

供試豚の血漿中P濃度動態については、スポンジ挿入時(発情周期10日目)には6頭中5頭において20 ng/ml以上の高値であり、その後通常の発情周期を営む豚と同様に16日目には5 ng/mlに低下した(NOGUCHIら, 2010)。その後、通常の発情周期を繰り返す豚では発情周期23日(スポンジ挿入から14日目)からP濃度が上昇に転じ

ることが知られているが(DUSZA ら, 1996 ; NOGUCHI ら, 2010), 11 日区および 16 日区の豚では hCG 投与の翌日(発情周期 25 日目および 30 日目)まで 5 ng/ml の低値で推移した。このことから、卵巣上の黄体が退行したあとは、腔内クリームに含まれる P により、発情発現が抑制されると推察された。過去の報告から、経口合成 P 製剤を用いた場合、P 投与中の発情予定日以後の豚由来血漿中 P 濃度は低値で推移し、発情発現も抑制されることが報告されており(伊藤ら, 1990), 腔内クリームに含まれる P でも同様な効果があったと考えられる。スポンジ挿入時に P 濃度が低かった個体(11 日区)では、前回の発情で排卵が起こらず、黄体が形成されなかったことが考えられるが、今回の試験では原因は明らかではない。しかし、その後すべての試験区の豚において hCG 投与翌日より血漿中 P 濃度が上昇を開始していることから、これらの処理によって排卵が誘起され、黄体が形成されたと推測できる。

過去の報告では、経口合成 P 製剤を豚に給与することにより、給与中は卵胞の出現が阻害され、発情発現が抑制されることが報告されている(REDMER ら, 1981)。今回、スポンジ除去時の P 濃度の高低にかかわらず、スポンジ挿入中の発情発現が認められなかったことは、P 濃度の高い豚においては自らの黄体が分泌する P により、P 濃度の低い豚においては腔内クリームに含まれる P により、卵胞の出現が抑制されたためと推察された。

今回、16 日区でも 11 日区と同様にスポンジ挿入中の P 濃度の上昇が抑制され、その後のホルモン処理により排卵同期化が可能であったが、採取された卵は多くが未受精であった。また、分娩成績でも 6 および 11 日区では対照区と同様に分娩が可能であったが、16 日区では受胎・分娩した豚がいなかったことから、採胎成績の結果が裏付けられた。このことから、長期間スポンジを留置することにより、排卵数には悪影響を及ぼさないもののスポンジによる子宮内汚染を含めた子宮環境の悪化により受精や受胎が阻害されている可能性が否定できない。腔内クリーム入りスポンジと子宮環境の関係については、今後さらなる調査が

必要である。

以上のことから、腔内クリームを 6 および 11 日間留置した後の排卵誘起により、排卵の同期化が可能であり、さらに供胚豚および繁殖用豚へ応用できる可能性が示された。今後は、例数の追加や受胚豚への応用、および腔内クリームの挿入を開始する発情周期等の検討を行い、本方法の適用条件を詳細に調査する必要がある。

文 献

- BAKER, R.D. : 1979, Embryo recovery from prepuberal gilts, *Theriogenology*, **11**, 91.
- BARACALDO, M.I., M.F. MARTINEZ, G.P. ADAMS and R.J. MAPLETOFT : 2000, Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle, *Theriogenology*, **53**, 1239-1250.
- BARUSELLI, P.S., M.F.S. FILHO, C.M. MARTINS, L.F. NASSER, M.F.G. NOGUEIRA, C.M. BARROS and G. A. Bó : 2006, Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle, *Theriogenology*, **65**, 77-88.
- BATES, R.O., B.N. DAY, J.H. BRITT, L.K. CLARK and M.A. BRAUER : 1991, Reproductive performance of sows treated with a combination of pregnant mare's serum gonadotropin and human chorionic gonadotropin at weaning in the summer, *J. Ani. Sci.*, **69**, 894-898.
- Bó, G.A., P.S. BARUSELLI, P.M. CHESTA and C.M. MARTINS : 2006, The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle, *Theriogenology*, **65**, 89-101.
- DUSZA, L., M. OPALKA, B. KAMINSKA, T. KAMINSKU and R.E. CIERESZKO : 1996, The relationship between electrical resistance of vaginal mucus and plasma hormonal parameters during periestrus in sows, *Theriogenology*, **45**, 1491-1503.
- ESTILL, C.T., J.H. BRITT, J.E. GADSBY : 1993, Repeated administration of prostaglandin F_{2α} during the early luteal phase causes premature luteolysis in the pig, *Biol. Reprod.*, **49**, 181-185.
- GUTHRIE, H.D., C. POLGE : 1978, Treatment of pregnant gilts with a prostaglandin analogue, Cloprostenol, to control oestrus and fertility, *J. Reprod. Fertil.*, **52**, 271-273.

- 伊藤米人・近藤ゆり・榎島敏男：1990, Altrenogestの経口投与による豚の発情調整と血清Progesteroneの動態, 東京畜試研報, **23**, 13-20.
- 岩村祥吉・吉岡耕治・鈴木千恵・加茂前秀夫：2001, 豚の発情周期の制御における課題, J Reprod Dev., **47**, j19-j26.
- 亀山賢次：1996, 「胚の検査」, 豚の胚移植マニュアル, 第1版, 68-73, 農林水産省家畜改良センター豚新技術開発研究会, 福島.
- KOHNO, H., C. OKAMOTO, K. IIDA, T. TAKEDA, E. KANEKO, C. KAWASHIMA, A. MIYAMOTO and Y. FUKUI : 2005, Comparison of estrus induction and subsequent fertility with two different intravaginal devices in ewes during the non-breeding season, J. Reprod. Dev., **51**, 805-812.
- 神山佳三・岩村祥吉・内藤昌男：2000, 膣内留置型プロゲステロン投与製剤による豚の発情同期化の試み, 千葉畜産研報, **24**, 7-10.
- LOVE, R.J. and R.G. GREY : 1993, Early abortion of gilts as a way of synchronising oestrus and improving litter size, Aust. Vet. J., **70**, 452.
- MARTINAT-BOTTE, F., F. BARITEAU, B. BADOUARD, M. TERQUI : 1985, Control of pig reproduction in a breeding programme, J. Reprod. Fertil., suppl **33**, 211-228.
- 丹羽太左衛門・丸山純一・小栗紀彦：1994, 「胚移植技術」, 養豚ハンドブック, 第1版, 261-263, 養賢堂, 東京.
- NOGUCHI, M., K. YOSHIKAWA, S. ITOH, C. SUZUKI, S. ARAI, Y. WADA, Y. HASEGAWA and H. KANEKO : 2010, Peripheral concentrations of inhibin A, ovarian steroids, and gonadotropins associated with follicular development throughout the estrous cycle of the sow, Reproduction, **139**; 153-161.
- REDMER, D.A. and M.N. DAY : 1981, Ovarian activity and hormonal patterns in gilts fed allyl trenbolone, J. Ani. Sci., **53**, 1088-1094.
- SOMMER, J.R., E.B. COLLINS, J.L. ESTRADA and R. M. PETERS : 2007, Synchronization and superovulation of mature cycling gilts for the collection of pronuclear stage embryos, Ani. Reprod. Sci., **100**, 402-410.
- TAKENOUCHI, N., Y. IZAIKE, K. OHSHIMA, K. SHIMADA, M. TAKAHASHI : 1993, Enzyme immunoassay for determination of progesterone in bovine plasma, Bull. Chugoku. Nat. Agric. Exp. Stat., **12**, 125-132.
- 丹治敏夫・本多 巖・大西英高：2006, 黄体ホルモン製剤による豚の発情同期化, 福島畜試研報, **14**, 1-3.
- WHITE, K.L., L.L. SOUTHERN, L.F. RICKORDS and T. C. WOOD : 1988, Embryonic development and quality in cycling crossbred gilts following altrenogest synchronization and exogenous gonadotropin administration, Theriogenology, **29**, 326.