

豚胚移植に関する研究(2)

誌名	日本養豚学会誌 = The Japanese journal of swine science
ISSN	0913882X
巻/号	311
掲載ページ	p. 16-21
発行年月	1994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



豚胚移植に関する研究

2. ホルモン処理と胚回収成績との関係について

林 哲・小林一彦*・水野仁二*・大石隆一

伊藤忠飼料(株)総合技術研究部, 栃木県黒磯市 325-01

* (株)ミック研究所, 栃木県那須 329-32

(1993年7月28日受付)

要約 伊藤忠飼料(株)総合技術研究部において実施した胚回収事例556例を対象にして、発情誘起、過排卵または発情の同期化を目的として使用したPMSG, hCG, FSHおよびAltrenogestのホルモン処理毎の胚回収成績等について調査した。PMSGに対する反応は、投与量が1000IUを超えると黄体数のばらつきが大きくなり、胚の正常性の低下、遺残卵胞数の増加、卵胞囊腫発生率の増加を示した。hCGを500または750IU投与した場合、回収胚の正常率は良好であった。Altrenogest投与区では胚回収成績に対して特に影響は認められなかった。FSHについては漸減投与方法を行ったが、投与総量12.0~13.5AUでは排卵数が0から135とばらつきが大きく、排卵を認めた個体では異常胚、遺残卵胞数、卵胞囊腫個体数が多かった。投与総量7.75AUでは、6頭中1頭しか排卵せず、排卵した1頭も黄体数7であった。

緒言

豚の胚移植における主要な目的は育種改良に利用することであり、このためには優良な供胚豚からより多くの胚を回収する必要がある。同一供胚豚からより多くの胚を回収するためには反復した胚回収を短期間に回数多く行うこと、個々の胚回収で多くの胚を回収すること、および両者の組合せを行うことが想定される。同一供胚豚からの反復胚回収については、自然発情時と性腺刺激ホルモン処理との組合せによる反復胚回収試験を行い技術的に可能であることを明らかにした¹⁾。しかし、一回の操作でより多数の優良胚をしかも反復して採取できる方法の確立が望まれているが、それには有効な過排卵処理法を開発する必要がある。豚胚移植においては、妊馬血清性腺刺激ホルモン(以下PMSGという)およびヒト胎盤性性腺刺激ホルモン(以下hCGという)による過排卵処理が行われているが、この処理による卵巣反応は必ずしも安定していない。そこで本報告では、筆者ら

は有効な過排卵処理法を開発することを目的として各種ホルモン処理と胚回収成績との関係を検討した。

材料および方法

1) 供試豚: 伊藤忠飼料(株)総合技術研究部または(株)シムコにおいて生産されたLandrace, Hampshire, DurocまたはLarge Whiteの純粋種またはそれらの雑種の未成熟豚を含む未経産または経産雌豚の延べ330頭を用いて、発情誘起、過排卵または発情の同期化を目的として使用したPMSG(商品名ピーメックス, 製造元三共ゾーキ), hCG(商品名ペローゲン, 製造元三共ゾーキ), 卵胞刺激ホルモン(以下FSHという: 商品名アントリン, 製造元デンカ製薬)およびAltrenogest(化学名: allyl trenbolone, 商品名: Regumate: 以下ALTと略記)のホルモン処理毎の胚回収成績等について検討した。

2) ホルモン剤の投与方法: 各々のホルモン剤の投与方法は、原則として次のように行った。すなわち、未成

Studies of embryo transfer in swine 2. The relationship between hormonal administrations and ovarian performances

S. HAYASHI, K. KOBAYASHI¹⁾, J. MIZUNO¹⁾ and R. OHISHI

Itochu Feed Mills CO., LTD. Technical, R & D Department

¹⁾ MIC CO., LTD Research Laboratory

熟豚(体重約80~100kg)に対しては、PMSGを筋肉内投与後72~96時間の間にhCGを筋肉内に投与した。周期性発情の認められる成熟豚に対しては、発情周期15~16日目にPMSGを、その後72~96時間の間にhCGをそれぞれ筋肉内投与した。また、FSHについては、連続した3~5日間に漸減的に3, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 AU (Armour Unit)をそれぞれ朝、夕2回筋肉内に投与し、外科的または屠殺により胚回収を行った。外科的に胚回収を行った10回の事例では、FSHの投与量は、3, 2, 1 AUの合計12 AUおよびさらに0.5 AUを追加した13 AU、屠殺回収では12および13 AUのほかさらに0.25 AUを追加した13.5 AUおよび2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 AUの合計7.75 AUの4区に分けて投与した。ALTに関しては、発情同期化を目的として使用し、いずれも周期性発情の認められる豚に対し4~23日間にわたってALT 16~20 mgを毎日飼料に添加し経口摂取させ、必要に応じて投与最終日にPMSGを、またその3日後にhCGを投与した。

3) 胚回収法: 胚回収は、自然発情またはPMSGにより誘起された発情時に自然交配または人工授精を1~数回実施し、初回交配から3~7日後にFSH投与の屠殺回収例以外は全身麻酔下で既報²⁾に従って開腹手術により実施した。

4) 統計処理: PMSGとhCGを投与した試験区に対しては、投与量を各水準とした二元配置分散分析により、その処理区に対してはt検定によって統計学的解析を行った。有意性の限界は $P < 0.05$ とした。

結果および考察

表1は、PMSGおよびhCGの投与量別に卵巣反応、胚回収成績を平均値で示したものである。一方、ALTにより発情同期化処理後の各々のホルモン剤に対する成績を表2に示した。

PMSG単独投与区では、黄体数では、1200 IU処理区が無投与区に比べ多い傾向を示した。正常胚率はPMSG 1000および1200 IU区で無投与区に比べ有意に低下した($P < 0.05$)。また、遺残卵胞数ではPMSG高単位区(1200 IU)が1000 IU区に比べ有意に増加した($P < 0.05$)。PMSG 1500 IU投与群では卵胞囊腫の発生率は、明らかに高かった($P < 0.05$)。その他の項目に対するPMSGの効果は偏差が大きく統計的に有意差は認められなかった。図1は、ALT非投与群のPMSGとhCGの投与量を横軸に、各個体の黄体数を縦軸に分散図として示したものである。この図でPMSG、hCGの何れも投与していない群(対照区)では、最大値22、最小値0であったが、多くの個体では、数個から10数個の排卵数

表1. ホルモン処理(アルトレノジェストを除く)と排卵成績の関係

Table 1. Relationship between hormonal treatments (without ALT) and ovarian responses

Hormonal treatment(IU)		n	Ovarian responses(mean±S. D. #)						Ovarian cyst	
PMSG	hCG		No. of C.L.*	Number of embryos			Residual follicle		Head	Morbidity
				Total	Normal	Rate(%)	1-2cm**	>2cm**		(%)
0	0	340	13.2±4.4	10.6±4.9	8.0±5.8	75.9	0.2	0.2	4	1.18
0	500	3	18.7±2.1	11.3±4.5	11.3±4.5	100.0	0.3	0.0	0	0.00
0	750	5	11.0±3.0	4.4±5.4	4.4±5.4	100.0	0.0	0.0	0	0.00
500	0	5	12.2±1.6	9.6±4.1	9.2±3.8	95.8	0.0	0.0	0	0.00
1000	0	28	18.6±11.3	15.1±8.5	11.4±8.7	75.6	0.2	0.0	0	0.00
1000	500	9	18.8±19.5	8.2±6.7	6.6±5.5	79.7	0.0	0.0	1	11.11
1000	750	2	8.5±3.5	6.5±1.5	5.0±0.0	76.9	0.0	0.0	0	0.00
1200	0	9	24.0±15.1	17.2±10.6	11.6±7.3	67.1	2.4	0.1	1	11.11
1200	500	14	24.6±21.5	10.3±7.6	8.3±6.6	80.6	0.3	0.1	0	0.00
1500	0	4	7.3±7.5	7.8±4.8	5.8±5.8	74.2	0.5	0.0	1	25.00
1500	500	4	24.0±22.5	20.5±22.4	19.8±21.6	96.3	0.0	0.0	1	25.00
1500	750	21	15.5±8.7	12.1±9.0	11.0±9.2	90.6	0.2	0.0	3	14.29
2000	0	5	19.2±15.9	16.6±13.7	16.6±13.7	100.0	0.0	0.0	0	0.00

*: corpora lutea ** : Diameter of residual follicle # : Standard deviation

表 2. ホルモン処理 (アルトレノジェスト使用時) と排卵成績の関係

Table 2. Relationship between hormonal treatments (with ALT) and ovarian responses

Hormonal treatment			n	No. of C.L.*	Ovarian responses(mean±S.D.#)						Ovarian cyst	
PMSG (IU)	hCG (IU)	ALT (mg)			Number of embryos			Residual follicle		Head	Morbidity (%)	
					Total	Normal	Rate(%)	1-2cm**	>2cm**			
0	0	20	11	12.5±2.7	11.8±2.3	10.3±3.9	86.9	0.1	0.2	0	0.00	
1200	0	16	4	36.0±20.3	32.3±12.8	5.3±9.1	16.3	0.0	0.0	0	0.00	
1200	0	18-20	13	15.8±10.7	11.4±10.2	11.1±10.3	97.3	1.5	0.1	1	7.69	
1200	500	16	2	51.5±2.5	14.5±1.5	10.5±4.5	72.4	0.0	0.0	0	0.00	
1200	500	18-20	4	25.8±11.2	16.5±11.7	15.0±13.1	90.9	0.0	0.0	0	0.00	
1200	750	18-20	13	15.8±11.2	9.4±9.5	6.7±8.1	71.3	1.6	0.0	0	0.00	
1250	750	20	6	17.7±10.7	16.2±10.0	12.5±9.8	77.3	0.5	0.0	0	0.00	
1500	0	18-20	3	32.7±11.8	27.7±18.0	2.3±3.3	8.4	0.0	0.0	0	0.00	

* : corpora lutea ** : Diameter of residual follicle # : Standard deviation

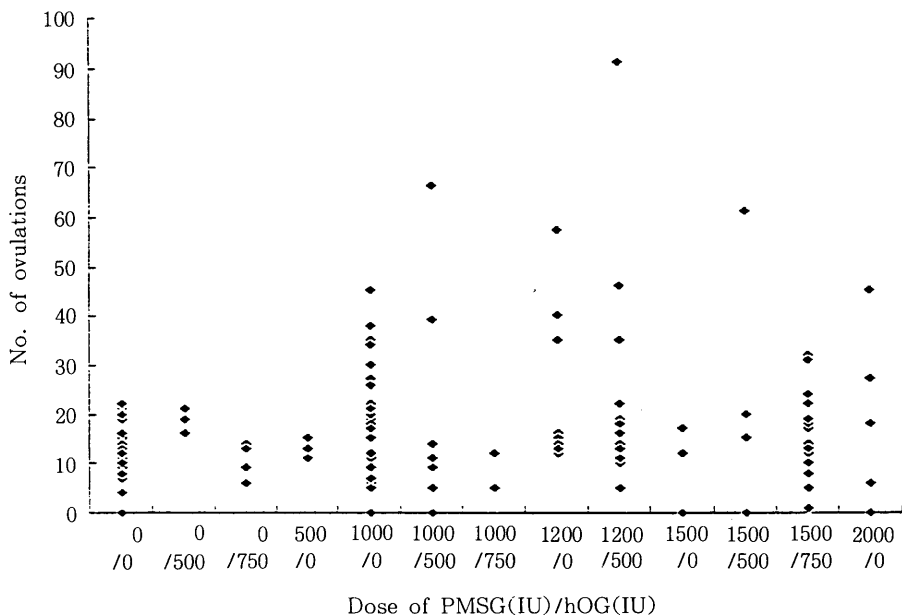


Fig. 1. Effect of dose of PMSG/hCG on ovulation rate

図 1. 排卵数に対する PMSG/hCG 投与量の影響

であった。PMSG 1000 IU 以上の処理区では 0~91 と大きくばらついていた。一方、hCG 処理区では、黄体数は 500 IU 投与区が 750 IU 投与区より多い傾向を示し、正常胚率は無投与区では投与区 (500, 750 IU) と比べ有意に低い値を示した。PMSG 投与による豚での発情誘起または過排卵誘起効果は、未成熟豚^{3,8)}、成熟未経産豚⁹⁻¹¹⁾

および経産豚¹²⁾において多数報告されている。これらのほとんどは、卵胞発育を目的として PMSG を使用し、排卵促進を目的として hCG を組み合わせた投与を行っている。多数の胚を同時に安産に得る方法として、未成熟雌に PMSG および hCG を投与して発情を誘起し屠殺により胚回収を行う方法^{3,5)}が、発情誘起率の面では安

表 3. 文献にみる PMSG 処理時の排卵数
Table 3. Overview of ovulation rate by PMSG on prior studies

Maturity of pigs	Dose of PMSG administered (IU)												Reference No.
	0	200	250	300	400	500	800	1000	1200	1250	1500	2000	
prepuberal			7.2			12.5		19.6				45.8	3
					19.3								4
		9		21	20	20							8
		15		31	29	30							8
					20.8		36.7		55.8				5
postpuberal	12.8								14.5				11
	11.6								19.7				11*
	11.5							15.5		22.5	20.3		9
								12.5			29.7		10*
									14.7				7
									17				4
										15.6		14	
sow	13.1								25.1				12

* : treated with methallibure

定しており成功率は高い。しかし、図1に示したように PMSG 無投与に比べ PMSG 投与区では排卵数は増加するが、投与量とは比例せず、ばらつきが大きかった。このようなばらつきは、過去の報告でも認められ(表3)、その変動要因も検討されている。WEBEL と PETERS ら⁹⁾ は、PMSG 投与量、季節と排卵数の関係について調査し、排卵日前4日間の日中最高気温の平均値が上昇すると有意に排卵数が減少することを示している。一方、HOLTZ と SCHLIEPER⁵⁾ は PMSG と hCG の混合投与試験を行い、投与量に応じて平均排卵数は増加するものの各投与区内でのばらつきは非常に大きいことを認めている。しかし、このような変動は、供胚豚の体重や日齢とは係わりがないとしている。その他、実験条件が異なり安易に比較することは出来ないが PMSG 投与量が同じ 1200 IU での文献成績の比較で排卵数が大きく異なること(14.5~55.8)は、実験条件の差のみならず豚の PMSG に対する反応のばらつきを示唆するものである^{4,5,7,11,12)}(表3)。さらに牛においては、PMSG のロット間差、抗 PMSG 抗体の産生による過排卵への影響も指摘されている¹⁵⁾。PMSG 処理区では、黄体数や排卵数は平均値としては PMSG の投与により直線的ではないものの増加するが、個々の成績には大きなばらつきがあり、本実験の結果もそれらと概ね一致した。

本実験では、PMSG 投与群から採取した卵子ないし胚は、1000 IU 以上の投与区で正常なものが有意に少な

かったことを観察した。このように PMSG の過排卵では回収卵の正常率が低下することは他の研究者によっても報告されている^{3,12)}。とくに BAKER と COGGINS³⁾ は、PMSG 投与量の増加とともに核の空胞化卵あるいは多精子受精率の増加を報告している。また、本実験では、PMSG の高単位投与で遺残卵胞数の増加および卵胞囊腫の発生率が高くなった。同様の成績は、HOLTZ と SCHLIEPER⁵⁾ も得ており、高単位の PMSG を投与することで過剰に卵胞が発育するものの排卵できずに遺残卵胞となり、さらには卵胞囊腫となると推察された。

これまでの成績から、豚では PMSG は低単位の投与で比較的安定した過排卵効果が得られるが、高単位投与では反応がばらつき、正常胚率も低下し、さらに遺残卵胞が多くなり易く卵胞囊腫の発生率が高くなることが示された。それ故、同一供胚豚から繰り返し胚を採取する場合は PMSG は低単位の投与を行う方がよいと示唆された。

PMSG 1200 IU と ALT との併用群および hCG との組合わせ処理群では、排卵数、正常胚率において各処理間で有意な差は認められなかった。これまで ALT に関する報告は、発情同期化に関するものがほとんどで^{13,14)}、排卵数、胚の性状との関係を調べた報告は少ない。KAWARASAKI と SONE ら¹⁶⁾ は、未経産豚で PGF₂α 類縁物質を用いた流産の誘起による発情同期化と ALT との比較試験を行い、両処理区で発情発現率には差は認めら

れなかったが、異常胚の出現率が後者で高かったと報告している。

FSH 処理区の成績は表 4 に示した。FSH は、PMSG と同様に牛において過排卵誘起のための性腺刺激ホルモンとして利用されているが、豚での報告は少ない^{17,18)}。これらの報告では、いずれも FSH 15 または 30 AU の 1 回投与で過排卵効果は認められなかった。本実験での FSH の投与は、数日間連続で漸減的に 1 日 2 回合計 7.75~13.5 AU 筋肉内投与する方法で行われた。その結果、総投与量 12~13.5 AU の例では、非常に多くの排卵を示した個体 (13.5 AU で 132 個) がある一方、全く黄体を認めない個体が屠殺回収の 13, 12 AU 投与区でそれぞれ 3 頭中 2 頭, 6 頭中 3 頭あった。この無排卵個体を除く平均黄体数は、17.1 から 102.0 個で、反応にばらつきが認められた。回収胚数は、これにほぼ並行したが、正常胚率はいずれも低かった。よく反応した個体では遺残卵胞数も多く、卵胞囊腫が外科的回収を行った 10 頭中 3 頭で認められた。投与量が少ない 7.75 AU の 6 頭では、そのうち 5 頭で黄体を全く認めず、残りの 1 頭もわずかに 7 個の黄体を有するだけであった。

FSH の豚に対する影響を既報^{17,18)} および本実験の結果から総括すると、1 回投与では 15 または 30 AU でも過排卵効果は認められないが、漸減投与ではその反応は 50 個を超える反応がある一方、全く反応しない個体もあるなどばらつきが大きかった。また、正常胚の得られる確率が低いことが示唆された。

本報告を纏めるにあたり、東北大学農学部菅原七老教授に御校閲、御助言をいただきました。ここに深く謝意を表します。

文 献

- 1) 林 哲・小林一彦・水野仁二, 大石隆一: (投稿中)
- 2) 林 哲・小林一彦・水野仁二: 家畜の繁殖と育種, 119-126, 農業図書, 東京, 1990
- 3) BAKER, R.D. and E.G. COGGINS: *J. Anim. Sci.*, **27**, 1607-1610, 1968.
- 4) SCHLIEPER B. and W. HOLTZ: *Anim. Reprod. Sci.*, **12**, 109-114, 1986.
- 5) HOLTZ, W. and B. SCHLIEPER: *Theriogenology*, **35**, 1237-1249, 1991.
- 6) BRITT, J.H., B.N. DAY, S.K. WEBEL and M.A. BRAUER: *J. Anim. Sci.*, **67**, 1148-1153, 1989.
- 7) BAKER, R.D. and E.C. COGGINS: *J. Anim. Sci.*, **25**, 918(Abstr.), 1966.
- 8) BAKER, R.D., G.A. SHAW and B.R. DOWNEY: *J. Anim. Sci.*, **39**, 197 (Abstr.), 1974.
- 9) WEBEL, S.K., J.B. PETERS and L.L. ANDERSON: *J. Anim. Sci.*, **30**, 791-794, 1970.
- 10) POPE, C. E., R. K. CHRISTENSON, V. A. ZIMMERMAN-POPE and B.N. DAY: *J. Anim. Sci.*, **35**, 805-808, 1972.
- 11) POPE, C.E., C.K. VINCENT and D.M. THRASHER: *J. Anim. Sci.*, **27**, 303 (Abstr.), 1968.
- 12) LONGENECKER, D.E. and B.N. DAY: *J. Anim. Sci.*, **27**, 709-711, 1968.
- 13) KRAELING, R.R., P.J. DZIUK, V.G. PURSEL, G.B. RAMPACEK and S.K. WEBEL: *J. Anim. Sci.*, **52**, 831-835, 1981.
- 14) STEVENSON, J.S. and D.L. DAVIS: *J. Anim. Sci.*, **55**, 119-123, 1982.
- 15) 金川弘司: 牛の受精卵移植, 23-31, 近代出版, 東京, 1984.
- 16) KAWARASAKI, T., M. SONE and K. BANBA: *Jpn. J. Anim. Reprod.*, **36**, 99-103, 1990.
- 17) DAY, B.N., F.E. ROMACK AND J.F. LASLEY: *J. Anim. Sci.*, **20**, 969 (Abstr.), 1961.
- 18) GIBSON, E.W., S.C. JAFFE, J.F. LASLEY and B.N. DAY: *J. Anim. Sci.*, **22**, 858. (Abstr.), 1963.

Studies of Embryo Transfer in Swine

2. The relationship between hormonal administrations and ovarian performances

Satoshi HAYASHI, Kazuhiko KOBAYASHI¹⁾, Jinji MIZUNO¹⁾
and Ryuichi OHISHI

Itochu Feed Mills Co., Ltd. Research Laboratory, 919 Aoki,
Kuroiso, Tochigi, 325-01 Japan

¹⁾ MIC Co., Ltd. Research Laboratory, 1-159 Toyohara-otsu,
Nasu, Nasu, Tochigi, 329-32 Japan

The ovarian performances were investigated in the 576 cases of hormonally (PMSG, hCG, FSH, altrenogest) administrated swine.

When treated with above 1000 IU PMSG doses, the number of corpus luteum varied greatly, the rate of normal embryo decreased, and the number of residual follicle and the number of ovarian cyst increased. When treated with 500 or 750 IU hCG doses, embryo quality was better than that of the control. Altrenogest did not affect any ovarian functions, such as ovulatory response to PMSG. The effects of FSH's reductional dose were investigated. When the total doses ranged from 12.0 to 13.5 AU FSH, the ovulated points varied from 0 to 135 and the ovulated animals showed high abnormality in their embryos. In these groups, the animals had a high number of residual follicle and ovarian cyst. At the total dose of 7.75 AU FSH, only one of the six animals ovulated and had seven corpora lutea.

Jpn. J. Swine Science, **31**, 1 : 16-21

Key words : embryo recovery, hormone, ovarian performance, swine