

凍結胚受胎牛へ胚移植前日に性腺刺激ホルモン放出 ホルモン類似体を投与すると受胎率は向上するか

西貝正彦^{1)†}田中知己²⁾加茂前秀夫²⁾

1) 那須ET研究所 (〒329-3152 那須塩原市島方7-5)

2) 東京農工大学農学部獣医学科獣医臨床繁殖学教室 (〒183-8509 府中市幸町3-5-8)

(2010年8月10日受付・2011年3月9日受理)

要 約

GnRH投与が凍結胚移植の受胎率に及ぼす効果を明らかにする目的で黒毛和種受胎牛80頭を無作為にA, B群に区分し、発情後6日にGnRH群40頭にはGnRH類似体(酢酸フェルチレリン)100 μ g, 対照群40頭には生理食塩液2mlを筋肉内に注射し、発情後7日に胚移植を行った。発情後14日に両群の各10頭について卵巣の状態と血液中プロゲステロン(P₄)濃度を調べた。胚移植後40~50日に妊娠診断を行った。その結果、誘起黄体の形成がGnRH群の90%(9/10頭)にみられたが、対照群ではまったくみられなかった。血中P₄濃度の平均 \pm 標準偏差はGnRH群が4.57 \pm 1.55, 対照群が3.72 \pm 2.39ng/ml, 受胎率はGnRH群が50.0%, 対照群が40.0%であり、有意差は認められなかった。これらのことから、凍結胚移植前日にGnRH類似体を投与することにより新たに黄体が形成されることが認められたが、血中P₄濃度上昇効果及び受胎率向上効果はみられなかった。

—キーワード：牛胚移植, 受胎率, 性腺刺激ホルモン放出ホルモン。

----- 日獣会誌 64, 712~714 (2011)

黒毛和種経産牛における凍結胚移植において、排卵後5日あるいは発情後6日にヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)1,500IUを筋肉内注射することにより、黄体形成が刺激されるとともに、誘起黄体が形成され、血中プロゲステロン(P₄)濃度が有意に増加し、受胎率が有意に向上することを筆者ら[1, 2]は明らかにした。しかし、hCGについては反復投与によって抗体が産生されることが知られている[3]。他方、GnRH類似体は分子量が小さいために抗体産生能がほとんどないことから[4]、hCGと同様の黄体形成及び黄体機能刺激作用を有するとすれば、胚移植の現場において反復使用して受胎率の向上を図ることが可能となる。

本試験では、胚移植和牛に対し、発情後6日にGnRH類似体を投与して翌日に凍結胚移植を行い、黄体形成誘起効果と血中P₄濃度上昇効果及び受胎成績向上効果について検討を行った。

材料及び方法

供試受胎牛：栃木県那須地域の和牛繁殖農家19戸に

飼育されている黒毛和種経産牛80頭を供試し、1999年10月から2000年12月の間に試験を実施した。供試牛を無作為に2群に区分し、GnRH群40頭には発情後6日にGnRH類似体の酢酸フェルチレリン(GnRH-A)100 μ g(スポルネン注[®], 共立製薬株, 東京)を頸部筋肉内に1回注射し、対照群40頭には発情後6日に生理食塩液(生食液)2mlを同様に1回注射した。

誘起黄体の検査及び血中プロゲステロン濃度の測定：両群から無作為にそれぞれ10頭を選定し、発情後14日(胚移植7日)に直腸検査を行って卵巣の形状を調べるとともに、頸静脈から採血を行って血中P₄濃度を調べた。血液は採取後ただちに遠心分離してヘパリン血漿を分取し、測定まで-20℃で凍結保存した。血漿中のP₄濃度の測定は二抗体法によるラジオイムノアッセイ法[5]で行った。

胚の採取、凍結・融解及び移植方法：既報の方法[2]に従って胚の採取、凍結・融解を行い、品質がExcellentまたはGoodと判定された融解胚1個を発情後7日に子宮頸管経由法で黄体と同側の子宮角深部に移植し

† 連絡責任者：西貝正彦(那須ET研究所)

〒329-3152 那須塩原市島方7-5

☎0287-65-3060 FAX 0287-65-3066

E-mail: nisigai@moon.sannet.ne.jp

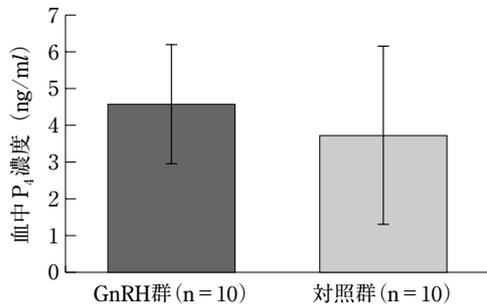


図1 GnRH類似体(酢酸フェルチレリン)100 μ gを発情後6日に投与した受胎牛における発情後14日の血中P₄濃度。

□ 平均 \pm SD, ()内は例数を示す。

た。

妊娠診断: 妊娠診断は発情が回帰しなかった牛について、胚移植後40~50日に直腸検査によって行った。

統計分析: 誘起黄体の形成及び受胎率については χ^2 検定を用いて検定を行った。血中P₄濃度についてはSAS(The general linear models procedure of the Statistical Analysis System) [6]により有意差検定を行った。いずれも危険率5%未満($P < 0.05$)を有意差ありと判定した。

成 績

誘起黄体: GnRH群の10頭中9頭(90%)において、発情周期黄体とは別に新たに形成された黄体(誘起黄体)が1個認められた。しかし、対照群の10頭ではいずれも誘起黄体は認められなかった。誘起黄体形成割合はGnRH群が対照群に比べて有意に高かった($P < 0.001$)。

血中プロジェステロン濃度の推移: GnRH群の平均血中P₄濃度は 4.57 ± 1.55 ng/ml, 対照群のそれは 3.72 ± 2.39 ng/mlであり(図1), 両群間に有意差は認められなかった($P = 0.36$)。

受胎成績: GnRH群の受胎率は50.0%(20/40頭), 対照群の受胎率は40.0%(16/40頭)であり(表1), 両群間に有意差は認められなかった($P = 0.37$)。

考 察

未経産牛において発情後6日にGnRHを投与すると75%のものに誘起黄体が形成されたことが報告されている [7]。また、ホルスタイン未経産牛において発情後5日あるいはホルスタイン種経産の非泌乳牛において排卵後4日にGnRH類似体であるBuserelin 8 μ gを投与したところ、投与群では全頭(100%)の牛に誘起黄体が形成されたが [8, 9], 対照群では誘起黄体の形成は認められず、両群間に有意差が認められたことが報告されている [8]。本成績では、発情後6日にGnRH-A

表1 GnRH類似体を発情後6日に投与した受胎牛の受胎成績

群	処 置	受胎率 (%)
GnRH	GnRH類似体 ^{a)}	20/40 ^{c)} (50.0)
対照	生食液 ^{b)}	16/40 (40.0)

a) GnRH類似体(酢酸フェルチレリン)100 μ g 筋肉内注射

b) 生食液2ml 筋肉内注射

c) 妊娠頭数/胚移植頭数

100 μ gを投与したGnRH群において、調べた10頭中9頭(90%)に誘起黄体の形成がみられ、対照群との間に有意差が認められたことから、本試験におけるGnRH-A投与後の誘起黄体形成率は、これら既報の報告 [7-9] と同等のものと認められた。

ホルスタイン種経産の非泌乳牛において、排卵後4日にBuserelin 8 μ gを筋肉内注射し、処置後の発情周期を通じて血中P₄濃度を測定したところ、血中P₄濃度は対照群よりも高い値で推移したことが示されているが、有意差はみられないと報告されている [9]。本試験においては発情後14日におけるGnRH群の平均血中P₄濃度は対照群に比べて高い値を示したが、有意差は認められなかった。このことはGnRH-A投与により新たに黄体は形成されたが、元々存在した発情周期黄体から分泌されるP₄濃度が高いために顕著なP₄濃度の上昇はみられなかったと推測される。また、本試験においてはP₄濃度を発情後14日についてのみ検討したが、より多くの時期における比較検討が必要なのかもしれない。

胚移植の受胎率を向上させる目的で胚移植時にGnRH類似体を投与する方法 [10, 11] が行われてきた。しかし、胚移植時に投与した場合の受胎率は、GnRH投与群では34%, 対照群では42% [10], 並びに、GnRH投与群では72%, 対照群では68%であり [11], ともに有意差はみられなかったことが示されている。胚移植前日の発情後6日にGnRH-Aを投与した本成績においても、GnRH投与群の受胎率は50.0%であり、対照群の40.0%と有意差が認められなかった。

以上のように、本研究において、凍結胚移植の前日にGnRH-Aを投与することは、新たな黄体の形成に有効であることが認められたが、血中P₄濃度上昇と受胎率向上の効果は認められなかった。受胎率向上に及ぼすGnRH-A投与効果の検証のためには、今後、さらに例数を追加し、黄体機能の良好例と不良例における効果の比較などを行うことが必要と思われる。

GnRH-Aを提供いただいた川崎三鷹製薬(株)(現・共立製薬(株))に感謝する。

引 用 文 献

[1] Nishigai M, Takamura A, Kamomae H, Tanaka T,

- Kaneda Y: The effect of human chorionic gonadotropin on the development and function of bovine corpus luteum, *J Reprod Dev*, 47, 283-294 (2001)
- [2] Nishigai M, Kamomae H, Tanaka T, Kaneda Y: Improvement of pregnancy rate in Japanese Black cows by administration of hCG to recipients of transferred frozen-thawed embryos, *Theriogenology*, 58, 1597-1606 (2002)
- [3] Sundby A, Torjesen PA: Plasma levels of testosterone in bulls: Response to repeated hCG injections, *Acta Endocrinol*, 88, 787-792 (1978)
- [4] Carruthers TD: Current therapy in theriogenology, Morrow DA, 3-13, WB Saunders Co., Philadelphia (1986)
- [5] Taya K, Watanabe G, Sasamoto S: Radioimmunoassay for progesterone, testosterone and estradiol-17 β using ¹²⁵I-iodohistamine radioligands, *Japan J Anim Reprod*, 31, 186-197 (1985)
- [6] StatView User's Resource Forum: StatView 4.5 for Macintosh Official Guidebook, Nankodo Co., Ltd. Tokyo (1996)
- [7] Rusbridge SM, Bramley TA, Webb R. A comparison of GnRH-induced corpora lutea and spontaneously formed CL in heifers. *J Reprod Fertil. Abstr Series*, 9, 33 (1992)
- [8] Schmitt EJP, Diaz T, Barros CM, de la Sota RL, Drost, Fredriksson EW, Staples CR, Thorner R, Thatcher WW. Differential response of the luteal phase and fertility in cattle following ovulation of the first wave follicle with human chorionic gonadotropin or agonist of gonadotropin-releasing hormone. *J Anim Sci*, 74, 1074-1083 (1996)
- [9] Rajamahendran R, Ambrose JD, Schmitt EJ, Thatcher MJ, Thatcher WW. Effects of buserelin injection and deslorelin (GnRH-agonist) implants on plasma progesterone, LH, accessory CL formation, follicle and corpus luteum dynamics in Holstein cows. *Theriogenology*, 7, 1141-1155 (1998)
- [10] Smith AK, Grimmer SP: Pregnancy rates for grade 2 embryos following administration of synthetic GnRH at the time of transfer in embryo-recipient cattle, *Theriogenology*, 57, 2083-2091 (2002)
- [11] Ellington JE, Foote RH, Farrell PB, Hasler JF, Webb J, Henderson WB, McGrath AB: Pregnancy rates after the use of a gonadotropin releasing hormone agonist in bovine embryo transfer recipients, *Theriogenology*, 36, 1035-1042 (1991)

Examining the Impact on Pregnancy Rates by the Administration of GnRH Agonist to Bovine Recipients on the Day Before Frozen-Thawed Embryo Transfer

Masahiko NISHIGAI*[†], Tomomi TANAKA and Hideo KAMOMAE

* *Nasu ET Institute, 7-5 Shimakata, Nasushiobara, 329-3152, Japan*

SUMMARY

To examine the effect of GnRH agonist treatment on pregnancy rates in frozen-thawed embryo transfer, 80 Japanese Black beef cattle recipients were divided at random into 2 groups, and the following administration was conducted: The GnRH group (n = 40) underwent intramuscular (i.m.) injection with 100 μ g of gonadotropin releasing hormone agonist (fertiorelin acetate; GnRH-A) on day 6 (day 0 = onset of estrus), while the control group (n = 40) underwent i.m. injection of 2 ml saline as a control. On day 14, the ovaries were examined and the blood concentration of progesterone (P₄) was determined in 10 recipients of each group. One newly formed induced corpus luteum (CL) was detected in 90% (9/10) of the GnRH group, while no recipient of the control group had induced CL. There were no significant difference between the GnRH and control groups in P₄ concentrations (4.57 \pm 1.55 and 3.72 \pm 2.39 ng/ml; mean \pm SD), or conception rates (50% and 40%). From these results, it is indicated that GnRH-A treatment on the day before embryo transfer have brought new induced CL formation, but have had not increased plasma P₄ concentration or the conception rate.

—Key words: bovine embryo transfer, conception rate, GnRH administration.

[†] Correspondence to: Masahiko NISHIGAI (*Nasu ET Institute*)

7-5 Shimakata, Nasushiobara, 329-3152, Japan

TEL 0287-65-3060 FAX 0287-65-3066 E-mail: nisigai@moon.sannet.ne.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 64, 712 ~ 714 (2011)