

遺伝情報を利用した乳牛における採卵成績予測技術の開発

[令和3～6年度]

大関和也・及川主基・牛島 仁*・太田久由・三宅結子**

(畜産技術科・*日獣大) **現食料安全課

【要約】ホルスタイン種において、血中抗ミュラー管ホルモン (AMH) 濃度は過剰排卵処置後の卵巢反応性や採卵成績との間に正の相関が認められた。300 日月齢以降や過剰排卵処置前に血液を採取し、AMH 濃度を測定することで供卵牛を選抜する際の指標となる

【目的】

受精卵移植技術は牛群改良を効率的に進めることができるが、過剰排卵処置に対する卵巢反応性には個体差があり、採卵成績の良好な供卵牛を選定する方法は確立されていない。そこで、黒毛和種では採卵成績予測指標として利用される AMPA1 型グルタミン酸受容体 (GRIA1) 遺伝子型と血中 AMH 濃度が、ホルスタイン種における体内胚および体外胚の生産現場においても利用可能か検証し、採卵成績予測指標の活用方法を検討する。

【成果の概要】

1. 体内胚採卵における GRIA1 遺伝子型および血中 AMH 濃度と採卵成績との関連性

当センターおよび都内酪農家飼養牛延べ 55 頭 (未経産牛 11 頭, 経産牛 44 頭 (産次 1～5 産, 分娩後日数 81～572 日, 乳量 10～45kg/日, 乾乳牛 1 頭含む)) を用い、黄体確認後に膈内留置型プロジェステロン製剤 (CIDR) を挿入し、挿入日を 0 日として、7 日目に主席卵胞を除去、9 日目から卵胞刺激ホルモン製剤 (FSH) を 4 日間漸減投与 (総量 20～36AU) した。11 日目に CIDR 抜去、プロスタグランジン F_{2α} 製剤投与、14 日目に人工授精 (AI)、性腺刺激ホルモン放出ホルモン製剤 (GnRH) を投与し、AI 後 5～8 日目に採卵を実施した。なお、発情が確認できない個体では 12 日目に GnRH を投与し、24 時間後に授精した (表 1)。供卵牛は CIDR 挿入時に血液を採取し、血液生化学検査 (T-cho, Ca, GOT, GGT, Glu, BUN, Alb, B/G 比) の実施および Anti-Mullerian Hormone ELISA Kit (WLS 社製) を用いて AMH 濃度を測定した。また事前に毛根を採取し、(一社)家畜改良事業団に委託し GRIA1 遺伝子型を解析した。AI および採卵時に 8 mm 以上の卵胞数、推定黄体数を記録し、過剰排卵処置に対する卵巢反応性ならびに採卵成績との関連性を調査した。

供卵牛延べ 55 頭のうち、GRIA1 遺伝子型は GG 型が 4 頭、GA 型が 28 頭、AA 型が 23 頭であった。GRIA1 遺伝子型の違いによる卵胞数、推定黄体数、回収胚数および正常胚数に有意差は認められなかった (表 2)。血中 AMH 濃度は卵胞数、推定黄体数および回収胚数との間に正の相関、正常胚数との間には弱い正の相関が認められる (表 3)。さらに、AMH 濃度と回収胚数について、それぞれ近似曲線と平均値の交点 (1.32ng/mL) を基準に高 AMH 群 (28 頭)、低 AMH 群 (27 頭) に分類した。高 AMH 群は低 AMH 群と比べて卵胞数、推定黄体数および回収胚数が有意に多かった (表 4)。乳量や血液生化学検査の各項目との相関関係は認められなかった (データ表示なし)。以上より、過剰排卵処置時の血中 AMH 濃度は卵巢反応性および回収胚数の予測指標として利用できる可能性がある。しかし、正常胚生産との関連性は低く、遺伝情報よりも飼養管理等の要因が深く影響していると考えられる。

2. 経膈採卵 - 体外受精 (OPU-IVP) における GRIA1 遺伝子型および血中 AMH 濃度と採卵成績との関連性

当センター飼養牛延べ8頭を用い、発情日を避けて GnRH を投与した。翌日を0日として、2日目と2.5日目にFSHを5AUずつ投与し、4.5日目を実施した(表5)。なお、8頭のうち2頭は2週間おきに連続してOPUを行った後に、CIDRを挿入し、体内胚採卵を実施した。吸引した卵子は、5%牛胎児血清(FBS)添加TCM199にFSH(0.02AU/ml)を加えた培地で成熟培養を行った。その後、媒精液(IVF100)により精子濃度 5×10^6 個/mlに調整した精子浮遊液に入れ、媒精を行った。媒精日を0日目として、5日目までグルコース不含 Synthetic Oviduct 液、6日目以降を5%FBS・100 μ M β メルカプトエタノール添加TCM199で発生培養を実施し、8日目に胚盤胞数を測定した。供卵牛はOPU実施時に前述の方法で血中AMH濃度とGRIA1遺伝子型を解析し、OPU時に超音波診断装置を用いて総卵胞数を測定した。

供卵牛延べ8頭のうち、GRIA1遺伝子型は、GA型が5頭、AA型が3頭であった。GRIA1遺伝子型の違いによる総卵胞数、回収卵数、胚盤胞数および胚盤胞発生率に有意差は認められなかった(データ表示なし)。また、血中AMH濃度を平均値(1.32ng/ml)を基準として、低AMH群(5頭)および高AMH群(3頭)に分類したところ、総卵胞数との間に強い正の相関が認められ($r=0.74$, $P<0.05$)、高AMH群の方が低AMH群と比べて有意に多かった(表6)。これらの結果より、血中AMH濃度は体内胚採卵と同様にOPUの前処置後の総卵胞数に反映するが、正常胚数(胚盤胞数)には影響しないことが示唆された。連続して2回のOPU-IVPと体内胚採卵を実施した2頭について、正常胚数(胚盤胞数)はOPU-IVPの方が多かった(表7, 8)。体内胚採卵はCIDR挿入から実施まで3週間に要するが、OPU-IVPは3週間で2回実施可能であるため、血中AMH濃度が低い個体においてはOPU-IVPを用いることで体内胚採卵よりも効率的に正常胚を生産できる可能性がある。以上より、ホルスタイン種における採卵成績予測指標として血中AMH濃度1.32ng/mlを基準値として設定し、基準値を上回る個体は体内胚採卵、下回る個体ではOPU-IVPを実施することで、効率的に受精卵の生産が可能であることが示唆された。

3. ホルスタイン種育成雌牛における血中AMH濃度推移と採卵成績との関連性

当センターで飼養するホルスタイン種育成雌牛10頭の血液を450日齢まで50日間隔で採取し、血中AMH濃度を測定した。その後、前述の方法で体内胚採卵を実施し、過剰排卵処置に対する卵巢反応性ならびに採卵成績との関連性を調査した。

育成期の平均血中AMH濃度は出生後250日齢まで上昇を示した。血中AMH濃度およびその変化パターンは個体差が大きかったが、300日齢以降は50日ごとの変化が少なく(図1)、300日齢時の血中AMH濃度と回収胚数に正の相関を示す傾向にあった(図2, $r=0.80$)。これらの結果より、育成牛の血中AMH濃度を評価する時期は300日齢以降が適しており、300日齢時の血中AMH濃度は採卵成績予測指標として、より早期での供卵牛選抜に利用できる可能性がある。

【残された課題・成果の活用・留意点】

受精卵生産現場において、血中AMH濃度は採卵成績予測指標として利用でき、個体ごとに適した受精卵生産手法を選択することができる。GRIA1遺伝子型については、ホルスタイン種での採卵成績予測指標としての利用は推奨されない。

【具体的データ】

表1 体内胚採卵における過剰排卵処置

Day	0	~	7	8	9	10	11	12	13	14	~	19	20	21
AM					FSH	FSH	FSH・PG	FSH	(GnRH)	人工授精				
PM	CIDR挿入		主席卵胞吸引除去		FSH	FSH	FSH・PG CIDR抜去	FSH					採卵	採卵

表2 体内胚採卵における GRIA1 遺伝子型と卵巣反応性および採卵成績

GRIA1遺伝子型	卵胞数 (個)	推定黄体数 (個)	回収胚数 (個)	正常胚数 (個)
GG (n= 4)	9.5±17.4	8.8±17.1	8.8±17.1	2.0±3.2
GA (n=28)	10.5±4.1	6.5±3.2	3.9±3.6	1.8±2.1
AA (n=23)	11.9±6.6	8.0±4.8	4.4±4.7	2.7±4.1

数値は平均値±標準偏差

表3 体内胚採卵における血中 AMH 濃度と卵巣反応性および採卵成績との相関

	r	P
卵巣反応性		
卵胞数	0.570	<0.01
推定黄体数	0.560	<0.01
採卵成績		
回収胚数	0.510	<0.01
正常胚数	0.260	<0.1

表4 体内胚採卵における血中 AMH 濃度レベル別の卵巣反応性および採卵成績

	卵胞数 (個)	黄体数 (個)	回収胚数 (個)	正常胚数 (個)
高AMH群 (n=28)	13.6±15.5 ^a	9.0±13.9 ^a	5.9±16.0 ^c	2.9±9.2
低AMH群 (n=26)	8.5±13.6 ^b	5.6±10.8 ^b	3.1±10.9 ^d	1.5±8.8

数値は平均値±標準偏差

同じ列の異符号間に有意差あり a-b (P<0.01), c-d (P<0.05)

表5 OPU-IVP における前処置

Day	-1	0	1	2	3	4
AM	GnRH			FSH5AU		
PM				FSH5AU		OPU

表6 OPU-IVPにおける血中AMH濃度と採卵成績

	総卵胞数 (個)	回収卵数 (個)	培養卵数 (個)	胚盤胞数 (個)	胚盤胞率 (%)
高AMH群 (n=3)	12.7±0.6 ^a	5.7±1.5	4.6±0.6	1.3±1.5	28.3±30.1
低AMH群 (n=5)	9.6±1.9 ^b	5.8±1.9	5.2±0.8	1.2±0.9	23.7±9.7

数値は平均値±標準偏差

異符号間に有意差あり a-b (P<0.05)

表7 2頭における体内胚採卵と OPU-IVP 結果の比較

GRIA1 遺伝子型	平均AMH濃度 (ng/ml)	OPU-IVP				体内胚採卵			
		総卵胞	回収卵数	培養卵数	胚盤胞数	卵胞数	黄体数	回収胚数	正常胚数
GA型	0.99	39	25	22	5	20	16	7	2

数値は合計値

体内胚採卵は3週間で1回, OPU-IVPは2回実施

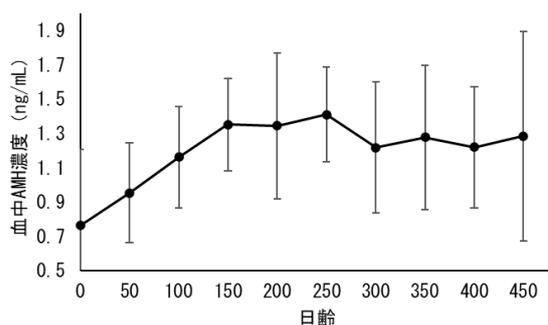


図1 育成期における血中AMH濃度推移

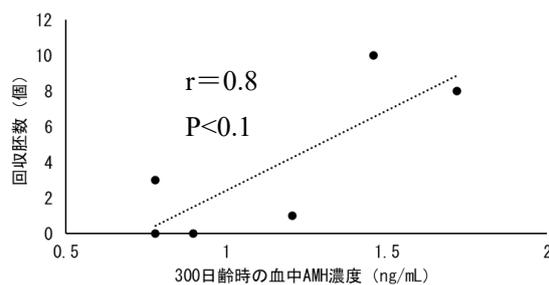


図2 300日齢時血中AMH濃度と採卵成績