

黒毛和種における抗ミュラー管ホルモンを用いた効率的な体内胚生産方法の検討

谷島優平・千ヶ崎健太・飯盛和也¹⁾・加藤由紀乃

1) 現：茨城県農林水産部畜産課

Development of an efficient method for producing *in vivo* embryos using anti-müllerian hormones
in female Japanese black cattle.

Yuhei YAJIMA, Kenta CHIGASAKI, Kazuya ISAGARI, Yukino KATO

要 約

本県の銘柄和牛である常陸牛のトップブランド化を推進する中で、黒毛和種受精卵の需要が高まっている。一方で、ウシの体内胚生産能力の個体差は大きく、安定した胚生産を支援する技術開発が喫緊の課題である。本研究では、ヒト生殖補助医療領域において、活用が進んでいる血中抗ミュラー管ホルモン濃度 (AMH 値) に着目し、効率的な体内胚生産方法を検討した。12-13 か月齢のウシにおける血中 AMH 値は初回採胚における回収胚数および正常胚数と正の相関を示し、一定の日齢以下のウシの血中 AMH 値と回収胚数および正常胚数において正の相関を示すことが確認された。また、相対的に血中 AMH 値が高いウシに対して高力価での過剰排卵処理を実施することで採胚における回収胚数の増加が見込まれる可能性が示唆された。

以上より、血中 AMH 値は体内胚生産能力の評価によるウシの早期選抜、個体に応じた過剰排卵処理の製剤量の決定に一助する可能性が示された。

キーワード：黒毛和種、体内胚生産、抗ミュラー管ホルモン、常陸牛

緒 言

本県の銘柄和牛である常陸牛のトップブランド化を推進するなかで、安定的なウシ体内胚生産技術の確立が急務である。ウシ体内胚生産において、卵胞刺激ホルモン製剤 (FSH) を投与することで、通常より多くの卵子を排卵させる過剰排卵処理 (SOV) が一般的に行なわれている¹⁾。一方で、SOV に対する卵巣の反応性や体内胚採取 (採胚) 成績については個体差が大きく²⁾、安定した体内胚生産が難しいという課題がある。この課題を解決し、本県において安定的なウシ体内胚生産基盤を確立するには、育成期における早期段階での体内胚生産能力の評価による早期選抜、採胚成績を事前に評価し、個体に応じた採胚回数や SOV 時の FSH 投与量を決定できる仕組みを構築することが有効である。

抗ミュラー管ホルモン (anti-müllerian hormone: AMH) は、卵巣内の発育過程にある卵胞の顆粒膜細胞から産生される糖タンパク質であり³⁾、卵胞発育に影響を与える内分泌物質の一つである⁴⁾。また、ウシ血中 AMH 濃度 (AMH 値) と採胚成績との関連性を示す報告もあり⁵⁾、AMH 値はウシの体内胚生産能力を予測する生物学的指標 (バイオマーカー) として有用である可能性が示されている⁶⁾。また、ヒト生殖補助医療 (ART) 領

域においては、AMH 値は薬理的補助により成熟卵子の排卵を誘起する調節卵巣刺激の採卵数と高い相関性を示すことが報告されている⁷⁾。そのため、AMH 値は適切な治療方針を決定する指標の一つとして活用がなされており、その臨床的有用性は高いといえる。しかしながら、黒毛和種雌牛体内胚生産においては、ヒト ART 領域にて見受けられるような AMH 値の活用報告は少ない。そのため、本研究では黒毛和種雌牛の AMH 値と採胚成績との関連性を解析することで、AMH 値が、採胚成績の良い個体の早期選抜、個体に応じた採胚回数の決定および過剰排卵処理時の FSH 投与量を決定する指標に資するか検討した。

材料および方法

1 黒毛和種育成雌牛の AMH 値を指標とした、供胚牛の早期選抜方法の検討

1) 供試動物

当センター繋養の黒毛和種育成雌牛を供した。

2) 採血

1ヶ月齢から13ヶ月齢の各時点において、採血を行った。採取した血液は真空採血管に分注後、遠心分離 (3000rpm、15分、4℃) し、血漿を得た。

血漿は測定まで-20°Cで保存した。

3) 体内胚生産スケジュール

体内胚生産のスケジュールは飯盛らの方法を参考に図1のとおり設計した(図1)⁸⁾。膣内留置型黄体ホルモン製剤(CIDR: Controlled Internal Drug Release)挿入日を0日とした。またSOV時における卵胞波を最適化するために、コンセラルール(MSD アニマルヘルス株式会社、東京)を性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH: Gonadotropin releasing hormone)として筋肉内投与した。9~13日目にアントリン(共立製薬株式会社、東京)をFSHとして総計18Uになるように、朝夕時に漸減的に筋肉内投与した。プロナルゴンF(ゾエティス・ジャパン株式会社、東京)をPGF2 α (PGF2 α : Prostaglandin F 2 α)として13日目に、朝20mg、夕15mgを筋肉内投与し、最初のPGF2 α 投与時にCIDRを抜去した。14日目の夕に、コンセラルールを筋肉内投与し、15日目の夕に、人工授精(AI: Artificial insemination)を行った。AIから1週間後にあたる21日目に採胚(ER)を行なった。

4) 採胚および胚の品質判定

胚は、左右の子宮角を、計1Lの(日本全薬工業株式会社、福島)を胚回収用灌流液として用いて、子宮内灌流法により回収した。ERは2%キシロカイン(サンドファーマ株式会社、東京)を鎮静剤として尾椎硬膜外に5mL投与し、ウシ鎮静下で実施された。採取した胚の品質判定は、実体顕微鏡下で観察し、家畜人工授精テキスト⁹⁾に基づき、可視域の細胞変性率が0%のものをexcellent(Aランク)、15%以下のものをgood(A'ランク)、50%以下のものをfair(Bランク)、75%以下のものをpoor(Cランク)とし、上記ランクと判定された胚を正常胚と定義した。

5) AMH値の測定

AMH値はELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)法により測定した。測定はキット(Ansh Labs、テキサス州)添付の説明書に準拠した。

6) 統計解析

2要因の関連性を明らかにするために相関解析を実施した。相関の有意性を無相関検定により検討した。 $p < 0.05$ で有意差があったとした。統計解析はMicrosoft® Excel® 2016により実施した。

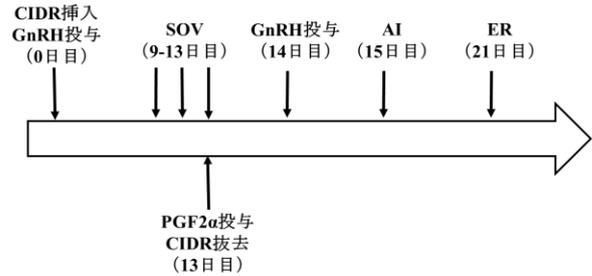


図1: 体内胚生産スキーム

2 黒毛和種繁殖雌牛のAMH値を指標とした、個体の受精卵生産能力に応じた採卵回数適正化の検討

1) 供試動物

当センター繋養の黒毛和種繁殖雌牛を供した。

2) 体内胚生産スケジュール

1の3)と同様に実施した。

3) 採血

体内胚生産スケジュールにおける4時点(CIDR挿入時、FSH投与開始時、AI時、ER時)で採血を行った。採取した血液は真空採血管に分注後、遠心分離(3000rpm、15分、25°C)し、血清を得た。血清は測定まで-20°Cで保存した。

4) 採胚および胚の品質判定

1の4)と同様の方法で実施した。

5) 大卵胞数のカウント

ER時における卵巣の状態を超音波診断装置(メディカルタスクフォース株式会社、大阪)で観察した。最大径が1.0mm以上の卵胞を大卵胞と定義し、カウントした。

6) AMH値の測定

1の5)と同様の方法で実施した。

7) 統計解析

2要因の関連性を明らかにするために相関解析を実施した。相関の有意性を無相関検定により検討した。2群間の検定にはウェルチT検定を実施した。 $p < 0.05$ で有意差があったとした。統計解析はMicrosoft® Excel® 2016により実施した。

3 黒毛和種繁殖雌牛の血中AMH濃度を指標とした、過剰排卵処理時の適切なFSH投与量の検討

1) 供試動物

当センター繋養の黒毛和種繁殖雌牛を供した。

2) 体内胚生産スケジュール

1の3)の一部を改変して、実施した。具体的には、2回の採胚のうち、初回のSOV時におけるFSH投与量を総計18Uとし、2回目のSOV時におけるFSH

投与量を総計 24U とした。

3) 採血

2の3)と同様に実施した。

4) AMH 値に基づいた群分け

供試牛から初回 ER 時に血液を採取し、AMH 値を測定した。取得した AMH 値のデータに基づき、AMH 値が上位の 5 頭 (High)、下位の 6 頭 (Low) に分類した。

5) 採胚および胚の品質判定

1の4)と同様の方法で実施した。

6) AMH 値の測定

1の5)と同様の方法で実施した。

7) 統計解析

群間の検定にはウェルチ T 検定を実施した。p 値はボンフェローニ法により調整し、 $p < 0.05$ で有意差があるとした。統計解析は Microsoft® Excel® 2016 により実施した。

本研究は茨城県畜産センター動物実験委員会の承認を受け、実施した。

結果

1 黒毛和種育成雌牛の AMH 値を指標とした、供胚牛の早期選抜方法の検討

5-6 か月齢、9-10 か月齢における AMH 値と初回採胚における回収胚数および正常胚数の間には相関性は確認されなかった。一方で、12-13 か月齢における AMH 値と初回採胚における回収胚数および正常胚数の間に有意な正の相関が確認された (図 2)。12-13 か月齢における AMH 値と初回採胚における回収胚数、正常胚数および正常胚率の関係性を散布図で示した (図 3 A-C)。回収胚数および正常胚数は AMH 値と正の相関を示したが、正常胚率と AMH 値には相関性は確認されなかった。次に、12-13 か月齢における AMH 値と初回採胚成績、2 回目における採胚成績および 3 回目における採胚成績との相関性を確認した (図 3 D)。AMH 値と採胚成績の相関性は採胚を繰り返すごとに低下していく傾向が確認された。

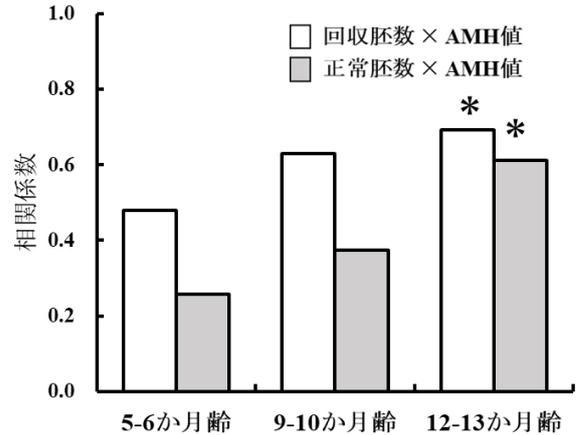


図 2：黒毛和種育成雌牛の各月齢における AMH 値と採胚成績との関連性。* $p < 0.05$

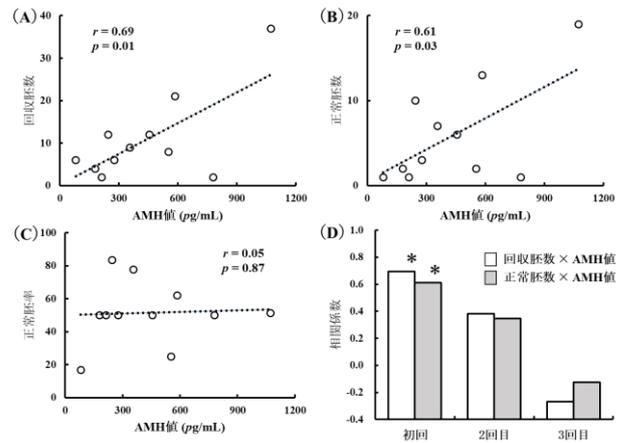


図 3：黒毛和種育成雌牛 12-13 か月齢における AMH 値と初回採胚における回収胚数の散布図 (A)、AMH 値と初回採胚における正常胚数の散布図 (B)、AMH 値と初回採胚における正常胚率の散布図 (C)、AMH 値と初回、2 回目、3 回目の採胚における採胚成績との関連性 (D)。* $p < 0.05$

2 黒毛和種繁殖雌牛の AMH 値を指標とした、個体の受精卵生産能力に応じた採卵回数適正化の検討

本研究で用いた供試牛の ER 時における日齢の分布を示した (図 4 A)。次に、ER 時における AMH 値と採卵成績の関係性について相関解析を実施したが、有意な相関は確認されなかった。ER 時の日齢に基づき、供試群における日齢が上位 25% (Q3) 群とそれ以外 (Other) の群に分類した。各群における AMH 値と採卵成績の相関解析を実施したところ、Other 群の AMH 値と回収胚数において有意な正の相関が確認された。一方で、Q3 群の AMH 値と回収胚数において正の相関が確認されなかった (図 4 B-C)。Other 群および Q3 群に

における AMH 値と各項目 (回収胚数、正常胚数、正常胚率) の相関性を示した (図 4 D)。また、ER 時における大卵胞数を超音波診断装置により測定したところ、Q3 群の大卵胞数は Other 群と比較して、有意に大きかった (図 5)。

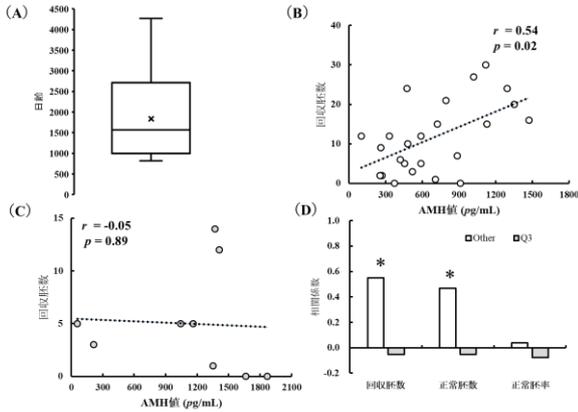


図 4 : 供試牛の日齢分布を示した箱ひげ図 (A)、Other 群における ER 時の AMH 値と回収胚数の散布図 (B)、Q3 群における ER 時の AMH 値と回収胚数の散布図 (C)、Other 群、Q3 群における AMH 値と採胚成績との関連性 (D)。* $p < 0.05$

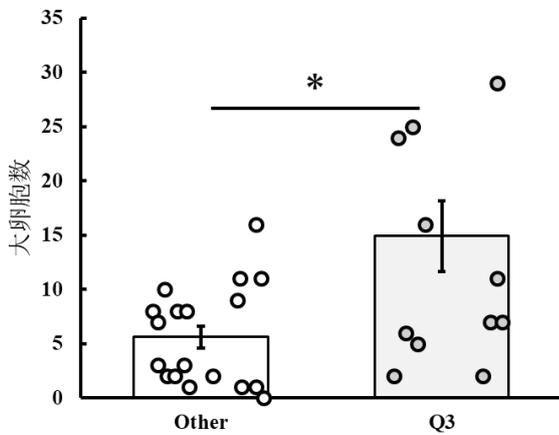


図 5 : Other 群、Q3 群における ER 時の大卵胞数。
* $p < 0.05$, データは平均値±標準誤差で示した。

3 黒毛和種繁殖雌牛の AMH 値を指標とした、過剰排卵処理時の適切な FSH 投与量の検討

供試牛を ER 時の AMH 値に基づき、AMH 値が高値な High 群と低値な Low 群に分類した (図 6)。High 群および Low 群の採胚における SOV を当場の常法である 18U で実施した場合、24U で実施した場合の回収胚数および正常胚数を示した (表 1)。多重比較解析の結果、各群間に有意差は確認されなかった。SOV を 24U で実施した場合、High 群の平均回収胚数は、常法と比較して

約 1.7 倍となったが、Low 群では、ほぼ等倍であった。一方で、High 群の平均正常胚数は、常法と比較して約 1.4 倍、Low 群では、約 0.9 倍であった。

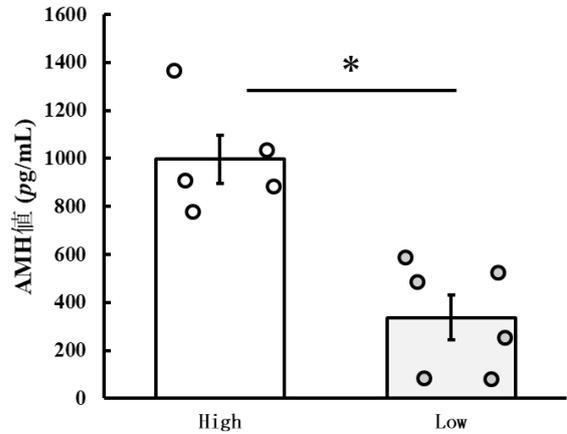


図 6 : High 群、Low 群の AMH 値。* $p < 0.05$, データは平均値±標準誤差で示した。

表 1 : High 群、Low 群において、SOV を 18U および 24U で実施した際の採胚成績

	回収胚数 (18U処置)	回収胚数 (24U処置)	正常胚数 (18U処置)	正常胚数 (24U処置)
High群	11.2 ± 7.37	18.6 ± 11.1	4.20 ± 2.56	6.20 ± 2.56
Low群	5.83 ± 2.09	5.83 ± 2.10	4.33 ± 1.31	3.83 ± 1.54

データは平均値±標準誤差で示した。

考 察

本研究では、ウシ育成期における AMH 値と採胚成績との関連性を調査し、育成期における AMH 値が供胚ウシの早期選抜指標に資するかを検討した。12-13 か月齢における AMH 値と初回採胚における回収胚数および正常胚数の間に正の相関が確認された。そのため、12-13 か月齢における AMH 値が供胚牛の早期選抜の指標となる可能性が示された。一方で、採胚を重ねるごとに AMH 値と採胚成績の相関性は低下した。黒毛和種育成期における血中 AMH 値は、2 か月齢以降から増加を示し、11 カ月齢以降に安定的に推移することが報告されている¹⁰⁾。また、育成期における AMH 値の変動は顆粒膜細胞や種々のホルモン活性、春季発動の個体差の影響を受ける¹¹⁾。これらのことから、成長に伴い、AMH 値を変動させる種々の要因が安定化したため、12-13 か月齢における AMH 値と採胚成績の相関性を見出すことができた可能性が考えられた。しかしながら、育成期において、AMH 値が変動するメカニズムや生理学的意味に関しては不明な点が多く、今後さらなる研

究が求められる。本研究では、採胚を重ねるごとに育成期における AMH 値と採胚成績の相関性は低下した。これまでの研究で採胚成績に影響する要因としてウシの血統構成¹²⁾のような遺伝的要因に加えて、暑熱等の環境要因¹³⁾が挙げられている。また、北元らは、黒毛和種繁殖雌ウシを用いた研究で、採胚回数を重ねるごとに採胚数、供給可能採胚数が減少することを報告している¹⁴⁾。すなわち、採胚を重ねる中で、種々の要因が複合的に影響した結果、育成期における AMH 値と採胚成績の関連性が希薄化した可能性が考えられる。

本研究では、当场繁養の黒毛和種雌牛の AMH 値と採胚成績との関連性を調査し、AMH 値が個体の体内胚生産能力に応じた採胚回数適正化の指標に資するかを検討したが、AMH 値と供試牛の採胚成績との間に相関性が確認されなかった。一方で、供試牛を日齢に基づいて群分けしたところ、Other 群では AMH 値と回収胚数および正常胚数において、有意な正の相関が確認された。しかしながら、Q3 群では AMH 値と回収胚数および正常胚数において、有意な正の相関が確認されなかった。シンメンタール種を用いた研究では、SOV 後の AMH 値が ER 時の回収胚数および黄体数と正の相関を示すこと、ホルスタイン種においては、胞状卵胞数と AMH 値が正の相関を示すことが報告されている^{15), 16)}。このことから、AMH 値と体内胚生産能力との関係性は品種横断的に保存されていることが示唆される。本研究では、Q3 群において、AMH 値と採胚成績との間に相関性が確認されなかった。また、ER 時において、Q3 群の大卵胞数は Other 群と比較して、有意に大きかった。ウシの日齢は採胚成績に影響をおよぼすと考えられ、ER 時における大卵胞の遺残は、加齢等によりホルモン剤への反応性が低下すること等により生じたと考えられる。まとめると、黒毛和種雌牛において AMH 値は、個体の胚生産能力を反映するが、個体の加齢によるホルモン剤への反応性の低下等を受けて、個体の胚生産能力を反映する程度が小さくなることが示された。そのため、AMH 値を採胚回数適正化の指標として活用することは難しい可能性がある。

本研究では、当场繁養の黒毛和種雌牛において、AMH 値が高値な個体および低値な個体に常法の SOV より高い 24U で処置した際の採胚成績を調査することで、AMH 値が個体に応じた SOV 処置時の FSH 投与量を決定する指標に資するかを検討した。High 群および Low 群において、SOV 処置を 18U および 24U で実施した場合の回収胚数および正常胚数は、2 群間に統計学的有意差は確認されなかった。一方で、24U 処置時における High 群の平均回収胚数は、常法と比較して約 1.7 倍で、Low

群では、ほぼ等倍であった。そのため、AMH 値が高値なウシに対しては高力価の SOV 処置を実施することで、採胚数が増加する可能性が示唆された。しかしながら、High 群および Low 群において、SOV 処置を 18U および 24U で実施した場合の正常胚数において違いは確認されなかった。これまでの研究で、抗酸化物質の介入により採胚成績における正常胚数が向上する可能性が報告されている¹⁴⁾。すなわち、AMH 値に基づき SOV 処置方法を決定し、抗酸化物質等のサプリメントを給与することで、良質な胚生産に貢献すると考えられる。しかしながら、個体の加齢や肥満は、AMH 値に影響をおよぼす可能性がある¹⁷⁾。そのため、AMH 値のみを SOV 時における FSH 投与量の指標にするのではなく、従来から用いられている指標である過去の採胚成績、栄養状態²⁾や直腸検査による卵巣所見を参照し、ウシの状態をよく把握し、総合的に判断することが重要である。

参考文献

- 1) Deguettes, Q., Fattal, E., Moreau, M., Lego, E., & Bochot, A, 2020, Controlled delivery of follicle-stimulating hormone in cattle, International journal of pharmaceutics, 590, 119904
- 2) 渡邊貴之、2021、牛の繁殖技術に関するこれまでの活動と今後の展望、静岡県立農林環境専門職大学・静岡県立農林環境専門職大学短期大学部紀要・年報、1、48-51
- 3) Umer S, Zhao SJ, Sammad A, Weldegebrail Sahlu B, Yunwei P, Zhu H, 2019, AMH: Could It Be Used as A Biomarker for Fertility and Superovulation in Domestic Animals?, Genes (Basel), 10, 10121009
- 4) McGee, E A, and A J Hsueh, 2000, Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles, Endocrine reviews, 20, 200-214
- 5) Monniaux D, Barbey S, Rico C, Fabre S, Gallard Y, Larroque H, 2010, Anti-Müllerian hormone: a predictive marker of embryo production in cattle?, Reprod Fertil Dev, 22, 1083-1091
- 6) Nabenishi H, Kitahara G, Takagi S, Yamazaki A, Osawa T, 2017, Relationship between plasma anti-Müllerian hormone concentrations during the rearing period and subsequent embryo productivity in Japanese black cattle, Domest Anim Endocrinol, 60, 19-24
- 7) 浅田義正、産婦人科の実際、61、1075-1079、金原出版、東京
- 8) 飯盛和也、藤原謙一郎、鹿島悠幹、山口大輔、大

浦俊彦、白谷浩之、2022、デヒドロエピアンドロステロンを用いた牛体内受精卵採取成績向上に関する研究、茨城県畜産センター研究報告、53

9) 一般社団法人日本授精師協会、家畜人工授精テキスト(家畜体内受精卵・家畜体外受精卵編)、5、I-X、京和工業印刷株式会社、東京

10) Hirayama H, Naito A, Fukuda S, Fujii T, Asada M, Inaba Y, Takedomi T, Kawamata M, Moriyasu S, Kageyama S, 2017, Long-term changes in plasma anti-Müllerian hormone concentration and the relationship with superovulatory response in Japanese Black cattle, *J Reprod Dev*, 1, 95-100

11) El-Sheikh Ali H, Kitahara G, Takahashi T, Mido S, Sadawy M, Kobayashi I, Hemmi K, Osawa T, 2017, Plasma anti-Müllerian hormone profile in heifers from birth through puberty and relationship with puberty onset, *Biol Reprod*, 1, 153-161

12) 小松洋太郎、唐澤哲哉、2013、黒毛和種供胚牛における血統別採胚成績の検討、畜産の研究、67、1081—1086

13) 小林政樹、小野寺亨、小玉康子、嵯峨久光、河西直樹、1995、過剰排卵処理した黒毛和種供胚牛の胚生産成績、東北農業研究、48、159-160

14) 北元香菜子、内尾陽子、林みち子、堀登、2018、黒毛和種供胚牛における胚生産能力予測技術および卵巣機能改善技術の検討、石川県農林総合研究センター畜産試験場研究報告、47

15) Sevgi R, Erdem H, Kardeşin T, Yılmaz MA, Satılmış M, Okuroğlu A, Ünal İ, Dursun Ş, Alkan H, Satılmış F, Güler M, 2019, Determination of the relationship between serum anti-Müllerian hormone level and superovulatory response in Simmental cows, *Reprod Domest Anim*, 54, 1322-1329

16) Monniaux D, Drouilhet L, Rico C, Estienne A, Jarrier P, Touzé JL, Sapa J, Phocas F, Dupont J, Dalbiès-Tran R, Fabre S, 2012, Regulation of anti-Müllerian hormone production in domestic animals, *Reprod Fertil Dev*, 25, 1-16

17) Moolhuijsen LME, Visser JA, 2020, Anti-Müllerian Hormone and Ovarian Reserve: Update on Assessing Ovarian Function, *J Clin Endocrinol Metab*, 105, 3361-3373