

マンクス・ロフタン種めん羊における自家製プロジェステロン徐放剤および馬絨毛性腺刺激ホルモンを用いた発情同期化と凍結精液を用いた人工授精

齋藤希実¹・三浦 弘¹・桃沢健二¹・永野昌志^{1*}

¹北里大学獣医学部, 青森県十和田市東二十三番町 35-1 〒034-8628

2021年6月4日受付, 2022年2月21日受理

要約

本研究では, 絶滅が危惧される家畜であるマンクス・ロフタン種めん羊の遺伝的多様性を維持することを目的に, 自家製のプロジェステロン (P₄) 徐放剤 (P₄ スポンジ) を利用した発情同期化と腹腔内視鏡を用いた凍結精液による人工授精 (AI) を試みた. P₄ スポンジを腔内に9日間留置し, スポンジ除去前日に300 IU (n = 3) あるいは500 IU (n = 4) の馬絨毛性腺刺激ホルモン (eCG) を投与した. AIは, スポンジ除去後40~48時間に各eCG投与群2頭ずつに凍結精液を用いて腹腔内視鏡により実施した. P₄ スポンジ挿入日を0日とし, 頻回採血を行って血中P₄およびエストラジオール (E₂) 動態を調べた. P₄ スポンジ挿入中の血中P₄濃度は0.6~2 ng/mlを維持したが, スポンジ抜去後2日目には7頭中4頭のP₄値が検出限界以下となった. 血中E₂濃度はeCGを500 IU投与した場合, 300 IUに比べて高値を持続する傾向にあった. また, eCG投与量300 IUおよび500 IUともに1頭ずつが妊娠した. 投与量にかかわらず妊娠個体はAI実施日にP₄濃度が検出限界以下となり, 血中E₂濃度ピークはAI前日であった. 一方, 非妊娠個体では, AI当日にE₂濃度がピークとなり, AI後にP₄濃度が基底値となったことから, 排卵が遅れたものと推察された.

キーワード: 人工授精, 性ステロイドホルモン, 凍結精液, 発情同期化, マンクス・ロフタン

東北畜産学会報 72(1) : 1~7 2022

緒言

マンクス・ロフタン種はイギリスのマン島原産のめん羊で, 英国の希少家畜保護トラストの保護下にある絶滅が危惧される家畜である. 日本国内には1990年にオス5頭メス15頭の20頭が導入され, 現在では100頭程度が飼育されている (正田, 2015). 現在は, それぞれの農場内における自然交配によって維持されており, マイクロサテライトによる解析で, 他のめん羊種に比べて遺伝的多様性の低いことが報告されている (古川, 2018; 田

原ら, 2019). 北里大学獣医学部においても, 2011年に日本獣医生命科学大学から導入された雄1頭および妊娠中の雌1頭とその後導入された雄1頭および雌2頭による自然交配によって品種を維持してきたため, 近交度の高まりが問題となっていた. そこで, 2017年に1頭の雄をハイジ牧場 (北海道夕張郡長沼町) から導入したが, 根本的な解決には至っていない. この問題を解決するため, 北里大学では, 2019年にレア・シーブ研究会 (東京都西多摩郡檜原村) からマンクス・ロフタン種凍結精液の提供を受け, 人工授精 (AI) を実施することとなった. しかし, 世界的にもマンクス・ロフタン種における人工授精の報告はなく, 国内では他品種においてもめん羊のAIは普及していない. その理由として, めん羊は発情徴候がわかりにくく, 凍結精液を用いた経腔での人工授精 (AI) 受胎率が一般に20%程度と低いこと

* 連絡者: 永野昌志 (ながの まさし)
(北里大学獣医学部)
〒034-8628 青森県十和田市東二十三番町 35-1
TEL & FAX: 0176-24-9407
E-mail: mnaga@vmas.kitasato-u.ac.jp

が考えられる(河野ら, 2007)。一方, ニュージーランド等ではプロゲステロン (P_4) 徐放剤であるCIDRを用いた発情同期化と腹腔内視鏡を用いたAIが一般的に行われている。しかし, 日本ではめん羊用CIDRは認可されておらず使用が困難である。そこで本研究では, マンクス・ロフタン種の遺伝的多様性を維持することを目的に, Kohnoら(2005)がサフォーク種において報告した自家製の P_4 徐放剤を利用した発情同期化と腹腔内視鏡を用いた凍結精液によるAIを試みた。また, マンクス・ロフタン種の成熟雌は体重が40 kg程度(Wade-Martinus, 1990)とサフォーク種より小型であることから, 発情同期化時のホルモン投与量についても検討を行った。

材料および方法

1. 供試動物

北里大学獣医学部附属フィールドサイエンスセンター十和田農場で飼育されている2009~2018年生まれ, 体重28.8~39.2 kgのマンクス・ロフタン種雌めん羊7頭を実験に供試した。めん羊の発情期である秋季(2019年9月28日から11月28日)に, 発情同期化を行い, 4頭(2013~2018年生まれ)には人工授精(AI)を実施した。本実験は北里大学獣医学部動物実験倫理委員会の承認を受けた(承認番号19-138)。

2. 自家製 P_4 徐放剤の作製

発情同期化のために腔内に留置する P_4 徐放剤を下記のとおり作製した(Kohnoら, 2005)。まず, 1.5 gのオロナイン[®]H軟膏(大塚製薬, 東京)に0.5 g(1頭のみ0.3 g投与したが, 0.5 g投与と同等の血中 P_4 濃度を示したためまとめてデータ解析を行った)の P_4 粉末(富士

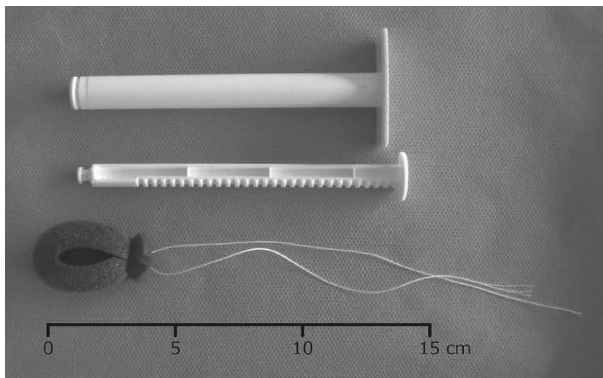


図1. 挿入用アプリケーターと P_4 スポンジ
挿入用アプリケーター(図上)内に P_4 スポンジ(図下)を挿入した後, 内芯(図中)を用いて腔内にスポンジを排出する。

フィルム和光純薬, 大阪市)を添加し, 均一になるまでよく混ぜ合わせて P_4 クリームを作製した。次に, ウレタンスポンジを幅1.5 cm, 厚さ1.0 cmおよび長さ10.0 cm程度に切断した後, スポンジを2つ折りにして両端を重ね合わせ水糸で縛った。水糸は, 縛ったところから15 cm程度の長さを残した(図1)。

3. 発情同期化とAI

発情周期の不明であるめん羊の腔内に上述の P_4 クリームを投与することで発情周期の同期化を行った。 P_4 クリーム投与にはエクイバランペースト(DSファーマアニマルヘルス, 大阪市)用のアプリケーター(図1)を用いた。まず, アプリケーターの後方から作製したスポンジを挿入したのち, 先端部に P_4 クリームを注入した。外陰部を消毒した後, アプリケーターを腔深部まで挿入し, 内芯でスポンジを P_4 クリームとともに腔内に押し出して9日間留置した(P_4 スポンジ)。スポンジを除去する前日に馬絨毛性腺刺激ホルモン(eCG; 動物用セロトロピン, あすかアニマルヘルス, 東京)を300あるいは500 IUをそれぞれ3および4頭に筋肉内投与した。AIは, スポンジ除去後40~48時間に凍結精液(卵黄トリソ液で精子濃度が4~9億個/mlとなるように希釈, 0.5 mlストローに封入)を用いて腹腔内視鏡により左右子宮角に1本ずつ注入し(300および500 IU eCG投与のそれぞれ2頭), AIから約1か月後に超音波画像診断装置を用いて妊娠診断を行った。 P_4 スポンジ挿入日を0日とし0, 1, 4, 8~13, 18および25(あるいは27)日目に頸静脈から採血(ベノジェットII真空採血管EDTA-2Na; テルモ, 東京)し, 1,500 x gで20分間遠心して血漿を分離した。血漿はホルモンアッセイまで-28℃で凍結保存した。

4. 性ステロイドホルモンの測定

P_4 およびエストラジオール-17 β (E_2)濃度測定は, 既報(Miuraら, 2019)に従って酵素免疫測定法(ELISA)により実施した。血中 P_4 濃度測定は全てのサンプルについて行い, E_2 濃度は8~13日目に採取したサンプルのみ測定した。

P_4 の抽出はジエチルエーテルを用いて行った。融解した血漿0.5 mlとジエチルエーテル2 mlを20分間ボルテックスで混和した後, -20℃に冷却したエチレングリコール槽に試験管を浸漬して水相を凍らせ, ジエチルエーテルのみを新しいガラス試験管に移した。次に, 50℃に温めた試験管内に窒素を吹き付けてジエチルエーテルを蒸発乾固させ, 抽出した P_4 に0.5 mlの0.1%牛血清アルブミン含有リン酸緩衝液(BSA-PBS)を加えて

20分間ボルテックスで混和した後、 P_4 サンプルとした。

E_2 の抽出は、融解した血漿2 mlとジエチルエーテル3 mlを混和して P_4 同様の手順でジエチルエーテルを蒸発乾固させた後、50%メタノール0.5 mlとヘキサン1 mlを加えて20分間ボルテックスで混和し、分離したヘキサン相をアスピレーターで取り除いた。これを2回繰り返した後、エバポレーターで50%メタノールを蒸発乾固させ、BSA-PBSを0.5 ml加えて20分間ボルテックスで混和した後、 E_2 サンプルとした。 E_2 サンプルは4倍に濃縮されているため、測定結果を1/4に補正した。

ホルモンアッセイ用の P_4 標準曲線は、 P_4 （富士フィルム和光純薬）をBSA-PBSに20 ng/mlで融解し、2倍階段希釈を6回行って作成した。また、 E_2 標準曲線は E_2 （富士フィルム和光純薬）をBSA-PBSに1 ng/mlで融解し、2倍階段希釈を6回行って作成した。

ホルモン測定用のELISAプレートは下記のとおり作製した。96穴プレート（NUNC473709; ThermoFisher Scientific, マサチューセッツ州, アメリカ合衆国）に二次抗体（ヤギ抗ウサギIgG抗体; A120-111A; Bethyl Laboratories, Inc., テキサス州, アメリカ合衆国）を融解したリン酸緩衝液を入れて常温下で8時間振盪し、洗浄液（0.1% Tween 20添加生理食塩水）で5回洗浄した。次に、BSA-PBSで希釈した一次抗体（ウサギ抗 P_4 -IgGあるいはウサギ抗 E_2 -IgG, コスモ・バイオ, 東京）をプレートに分注し、2時間振盪した。その後、再びプレートを5回洗浄し、ホルモン測定用プレートとした。

各ELISAプレートにスタンダードとサンプルを1ウェルにつき100 μ lずつ入れ、全てのウェルにホースラディッシュ・ペルオキシダーゼで標識した P_4 あるいは E_2 （コスモ・バイオ, 東京）を25 μ l加え、2時間振

盪した。その後プレートを洗浄し、発色剤（ABTS™; MOSS, Inc., メリーランド州, アメリカ合衆国）を各ウェルに100 μ lずつ分注して1時間振盪した後、プレートリーダー（Epoch; BioTek Japan, 京都市）を用いて415 nmの吸光度を測定することにより、各ホルモン濃度を測定した。 P_4 および E_2 濃度は1サンプル当たり3回測定し、その平均値を測定値とした。各ホルモン濃度が検出限界以下となった場合、 P_4 および E_2 濃度は、それぞれ検出限界値である0.25 ng/mlおよび3.9 pg/mlとした。

5. 統計解析

P_4 スポンジ挿入後日数ごとの血中 P_4 濃度は一元配置分散分析によって比較し、ポストホックテストとしてTukey-KramerのHSD検定を行った。 P_4 スポンジ挿入日に非常に高い P_4 濃度（外れ値）を示した1頭については統計解析から除き、 P_4 スポンジ挿入0および1日目の血中 P_4 濃度はStudentのt検定で比較した。eCG投与後日数（ P_4 スポンジ挿入後8~13日）ごとの血中 E_2 濃度はeCG投与量ごとに一元配置分散分析を行ったのち、eCG投与日（ P_4 スポンジ挿入後8日）の血中 E_2 濃度をコントロールとしてDunnettの多重比較検定を行った。また、eCG投与量300および500 IU群の投与後日数ごとの血中 E_2 濃度をStudentのt検定で比較した。

結果および考察

めん羊全頭の平均血中 P_4 動態を図2に示した。各測定日ごとの平均 P_4 濃度を比較したところ、 P_4 スポンジ挿入後25あるいは27日が投与0、4および13日目に比べ

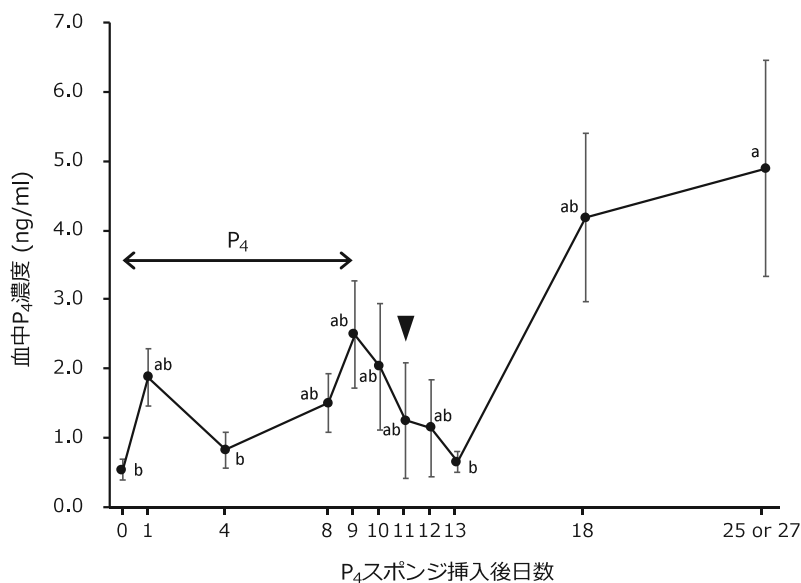


図2. 平均血中プロゲステロン (P_4)

動態 (n = 7)

↔ : P_4 スポンジ挿入期間, ▼ : 人工授精 (AI) 実施日.

a, b異なる文字を付した数値間に有意差あり (P<0.05).

エラーバーは標準誤差を示す.

て有意に高くなった ($P < 0.05$)。めん羊の発情周期は17日間であり、発情同期化処置によって排卵が誘発され、黄体が形成されたと推察された。また、 P_4 スポンジ挿入前に外れ値を示した1頭の血中 P_4 濃度は40.9 ng/mlと非常に高かった。これは、サフォーク種において報告 (Miuraら, 2019) されている原因不明の血中 P_4 濃度上昇 (P_4 スパイク) に類似しており、マンクス・ロフタン種においても同様の現象が起こった可能性がある。 P_4 スポンジ挿入前の血中 P_4 濃度が外れ値を示した1頭を除いた6頭では、 P_4 スポンジ挿入日の平均血中 P_4 濃度は 0.6 ± 0.4 ng/ml であり、1日目の平均血中 P_4 濃度 (2.0 ± 1.1 ng/ml) は投与前に比べて有意に上昇した ($P < 0.05$)。 P_4 スポンジ挿入中の血中 P_4 濃度は、1.0 ng/ml以上を維持し、9日目に P_4 スポンジを抜去した後、有意な変動ではないものの血中 P_4 濃度は徐々に低下した。 P_4 スポンジ抜去後2日目には7頭中4頭の P_4 値は検出限界以下となり、抜去後の血中 P_4 動態はサフォーク種を用いた (Kohnoら, 2005) と同様であった。以上の結果から、マンクス・ロフタン種においても P_4 スポンジの9日間腔内留置により人為的な黄体期の作出が可能であると考えられた。

図3に示したとおり、eCG投与量にかかわらず投与後に血中 E_2 濃度が上昇し、eCG投与量300 IUでは、投与後2日目 (AI前日) において投与前に比べて高い傾向にあった ($P = 0.06$)。一方、500 IU投与では投与後3日目 (AI当日) に、投与前と比べて高い傾向を示した ($P = 0.10$)。また、eCG投与後5日目 (AI後2日目) の血中 E_2 濃度は、500 IU投与群が300 IU投与群に比べて高い傾向となった ($P = 0.08$)。Crossら (2019) はeCGとヒ

ト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) の合剤であるPG600 (Merck Animal Health, ニュージャージー州, アメリカ合衆国) を用い、雑種めん羊 (平均体重65 kg) を発情同期化した場合、eCG投与量が160~280 IUで妊娠率が最も高くなり、300 IU以上では低下したと報告している。また、Ryanら (1991) は、メリノ種めん羊に800および1,600 IUのeCGを投与した後、回収される卵子の受精率がそれぞれ80%程度および60%程度であったと報告している。また、1,600 IU eCG投与時は大型卵胞が長期間持続することも確認しており、卵子受精率の低下は血中 E_2 濃度が高値で維持されたためと推察している。本研究において、eCGを300 IU投与した場合、血中 E_2 濃度は投与後2日目に最高値を示したが、500 IU投与した場合は投与後3日目に最高値を示し、AI後2日目に300 IU投与と比較して高い傾向にあった。これは、500 IUのeCG投与により大型卵胞が長期間維持されることで血中 E_2 濃度が300 IU投与群よりも高値で維持されたためと考えられた。めん羊は肉用、乳用および羊毛用と使用目的が多様であり、品種による体格差も大きいことから、発情同期化による定時人工授精を行うには、品種ごとに適切なホルモン投与量および投与後の人工授精適期について検討を行う必要がある。我々の研究グループでは、今後、マンクス・ロフタン種に最適な発情同期化法について検討を行う予定である。

AIを行った4頭のうちeCGを300および500 IU投与した1頭ずつ (それぞれ1および3歳) が妊娠した。例数は少ないものの、本研究における妊娠率50%は既報と同等であった (福井, 2020)。妊娠した2頭は翌春それぞれ双子を分娩した。妊娠個体の血中 E_2 濃度は、300およ

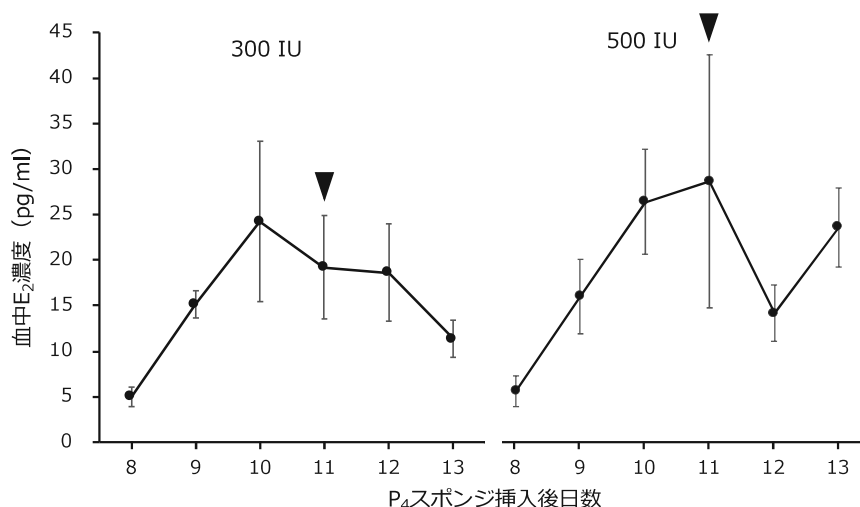


図3. eCG 300 IU ($n = 3$) および 500 IU ($n = 4$) 投与時の平均血中 E_2 動態
▼: 人工授精実施日。
エラーバーは標準誤差を示す。

び500 IU投与ともにeCG投与後2日目（AI実施日前日）に最高値を示したが、非妊娠個体ではAI実施日の血中E₂濃度が最高値となった（図4）。このことから、非妊娠個体では妊娠個体比べて卵巣発育が遅く、排卵までに時間を要したため、妊娠が成立しなかった可能性がある。

AIを行った4頭のうち妊娠した2頭はP₄スポンジ挿入後11日目（AI実施日）においてP₄濃度は検出限界以下の値を示したが、妊娠しなかった2頭では、13あるいは18日後に基底値となった（図4）。このことから、非妊娠個体ではAI時にP₄を産生する機能性黄体が存在したと考えられた。AIを行った4頭のP₄スポンジ挿入日の血中P₄濃度は全て0.6 ng/ml未満であり、機能性黄体は存在していなかったと考えられるが、非妊娠個体では、処置開始直前に発情が発来し、その後黄体が発育した可能性がある。市販されているP₄徐放剤であるCIDRのみで発情を同期化する場合の腔内留置期間は12日間と報告されているが（Kohnoら, 2005）、この報告では、P₄スポンジを用いた場合、血中P₄濃度の低下がCIDRよりも早いとしている。そこで、本研究ではP₄スポンジ留置期間を9日間としたが、めん羊の発情周期は17日間であり、P₄スポンジの9日の留置期間内に自発的な黄

体退行が起こらなかったと考えられた。近年、海外ではCIDRを5日間留置し、CIDR抜去時に黄体退行を促すプロスタグランジンF_{2α}を投与することで、約90%のめん羊の発情同期化が可能であることが報告されている（Martinez-Ros と Gonzalez-Bulnes A, 2019）。これらのことから、発情周期が明確でないめん羊に対して発情同期化を行う場合、プロスタグランジンF_{2α}の併用を考慮する必要があると考えられる。一方、妊娠した個体では、P₄スポンジ挿入前の血中P₄濃度が検出限界以下であり、P₄スポンジ抜去後すぐに血中P₄濃度が低下したことから、自然発情の発来以前にホルモン処置を行った可能性が考えられた。

以上の結果から、今回の発情同期化処置においては、個体間で排卵時間にばらつきのあることが示唆され、排卵が遅い個体においてはAIのタイミングを半日から1日程度遅らせる必要があると考えられた。また、eCGを500 IU投与した場合、血中E₂濃度の低下が300 IUに比べて遅く、排卵の遅れた可能性が高いことから、小型めん羊であるマンクス・ロフタン種ではeCG投与量として500 IUは多すぎる可能性があると考えられた。

国内で飼養されているマンクス・ロフタン種めん羊の遺伝的多様性を確保するには、保存されている凍結精

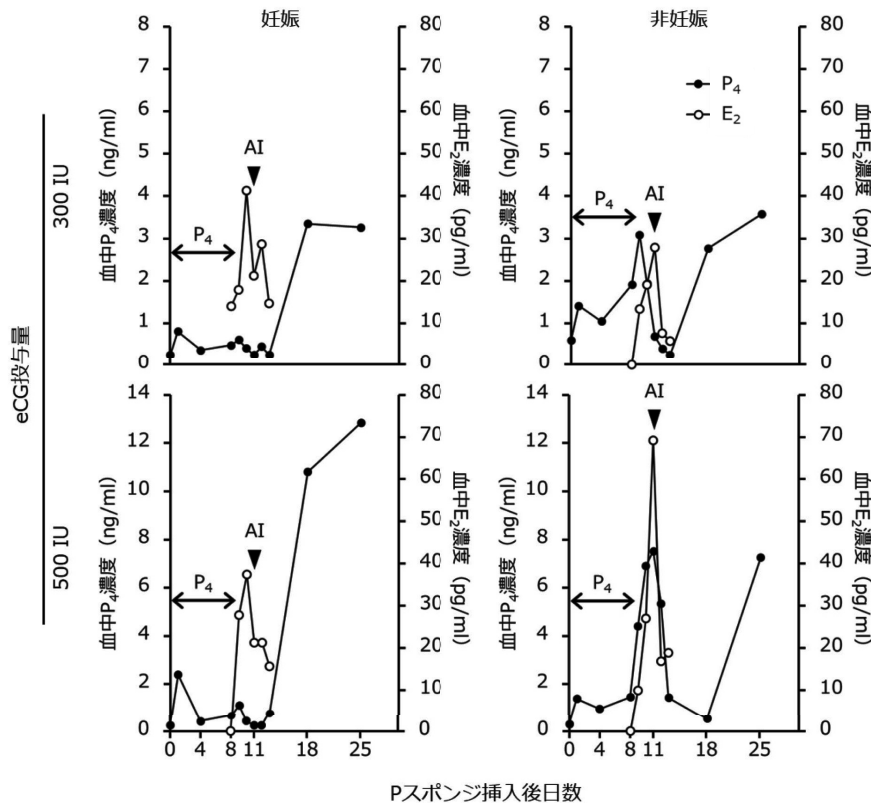


図4. eCG投与量の異なる妊娠および非妊娠個体におけるP₄およびE₂動態
 ⇔: P₄スポンジ挿入期間, ▼: 人工授精実施日.

液の有効活用と牧場間での遺伝的交流が重要と考えられる。遠隔地にある牧場間での遺伝的交流には凍結精液を用いたAIが有効と考えられるが、AIの普及には受胎率向上が不可欠である。さらなる受胎率向上のため、今後は排卵のタイミングを厳密にコントロールできる発情同期化法を検討したいと考えている。

謝 辞

腹腔内視鏡によるAI技術の御指導をいただいた有限会社ジャパン・ラム顧問 河野 博英 氏、AIに用いた凍結精液をご提供いただいたレア・シーブ研究会 中川 勤 氏に深謝いたします。また、血液採取や人工授精時の動物の保定に御協力いただいた北里大学獣医学部附属十和田農場職員の皆さまに感謝申し上げます。

引用文献

- Cross LJ, Cross RM, Stormshak F. Optimal dose of PG600 when given to progestogen-synchronized ewes during anestrus as affected by day of the year and temperature. *Transl. Anim. Sci.* 3: 433-442. 2019.
- 古川 力. 希少品種マンクス・ロフトン種の遺伝的特性. *シーブジャパン*. 103: 15-18. 2018.
- Kohno H, Okamoto C, Iida K, Takeda T, Kaneko E, Kawashima C, Miyamoto A, Fukui Y. 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. 2005.
- Martinez-Ros P, Gonzalez-Bulnes A. Efficiency of CIDR-based protocols including GnRH instead of eCG for estrus synchronization in sheep. *Animals (Basel)*. 9: 10.3390/ani9040146. 2019.
- Miura H, Yamazaki T, Kikuchi M, Sakaguchi M. Plasma steroid hormone concentrations and their relationships in suffolk ewes during gestation and parturition. *Anim. Sci. J.* 90: 1426-1431. 2019.
- Ryan JP, Hunton JR, Maxwell WM. Increased production of sheep embryos following superovulation of merino ewes with a combination of pregnant mare serum gonadotrophin and follicle stimulating hormone. *Reprod. Fertil. Dev.* 3: 551-560. 1991.
- 正田 陽一. 上野動物園いまむかし 羊年の年頭に四本角の羊・マロンを憶う. *シーブジャパン*. 94: 7-10. 2015.
- 田原 岳, 山口 隼, 高橋 幸水, 野村 こう, 米澤 隆弘, 古川 力. 日本における希少品種マンクス・ロフトンの遺伝的特性よび遺伝的構成の評価. *日本綿羊研究会誌*. 56: 1-11. 2019.
- 福井 豊. ラパAI (子宮内人工授精) 記: その4. *シーブジャパン*. 108: 16-20. 2020.
- Wade-Martinius P. The manx loghtan story: The decline and revival of a primitive breed. *Geerings of Ashford Ltd. Kent*. 1990.

Artificial insemination using frozen semen after estrous synchronization by handmade intravaginal progesterone insert and equine chorionic gonadotropin in Manx loghtan ewes

Nozomi SAITO¹, Hiroshi MIURA¹, Kenji MOMOZAWA¹, Masashi NAGANO¹

¹School of Veterinary Medicine, Kitasato University, Towada 034-8628, Japan

Corresponding: Masashi NAGANO

(fax: +81 (0) 176-24-9407, e-mail: mnaga@vmas.kitasato-u.ac.jp)

Summary

The objectives in the present study were to maintain genetic diversity of Manx loghtan sheep, an endangered livestock, by artificial insemination (AI) using frozen-thawed semen with estrous synchronization. We attempted estrous synchronization by handmade intravaginal progesterone (P₄) insert and laparoscopic AI using frozen-thawed semen. P₄ insert was left in the vagina for 9 days followed by the injection of 300 IU (n = 3) or 500 IU (n = 4) equine chorionic gonadotropin (eCG) one day before P₄ removal. AI was performed at 40-48 h after P₄ removal of 4 ewes in both 300 IU (n = 2) and 500 IU (n = 2) eCG treated groups. During the experiment, blood was collected for measuring plasma concentrations of P₄ and estradiol-17β (E₂). Plasma P₄ concentrations during the period of P₄ insertion were 0.6-2 ng/ml and decreased to basal level two days after removal of P₄ insert in 4 out of 7 ewes. Plasma E₂ concentrations of 500 IU eCG treatment group tended to maintain higher level than those of 300 IU. After AI, 2 ewes became pregnant; one was treated with 300 IU and another with 500 IU eCG. In the pregnant ewes, P₄ concentrations were basal level on the day of AI and the peak concentration of E₂ was on the day before AI regardless of eCG dose. On the other hands, in the non-pregnant ewes, E₂ peak was observed on the day of AI and P₄ concentrations decreased to basal level after AI, suggesting delayed ovulation.

Key words: artificial insemination, estrous synchronization, frozen semen, Manx loghtan sheep, sex steroid hormone