

牛の人工妊娠技術の実用化に関する研究（Ⅱ）

小林修一・前田淳一・笹木教隆*・平井洋士・北村徹

Practical Studies on Embryo Transfer Techniques in Cattle (Ⅱ)

Shuichi KOBAYASHI, Junichi MAEDA,
Kiyotaka SASAKI*, Hiroshi HIRAI, Toru KITAMURA

* 現福井県家畜保健衛生所

要 約

牛の受精卵移植技術（ET）は全国的に実施され実用化から普及の段階に入っている。

当場では、昭和61年度から黒毛和種（若狭牛）の生産を目的にET試験が開始された。また、平成2年度からホルスタイン種を北海道から導入しETの試験を実施した。以下、平成元年度からの3年間で次のような成績を得た。

1. 平成元～3年度における年度ごとの黒毛和種供胚牛1頭からの平均回収胚数は、元年度 11.7 ± 5.9 ($n=35$)、2年度 11.3 ± 6.5 ($n=40$)、3年度 9.2 ± 4.8 ($n=15$)で3年間の平均では 10.7 ± 4.8 であった。また、平均移植可能胚数は、年度ごとに 5.7 ± 5.1 、 6.5 ± 5.9 、 5.9 ± 4.3 で3年間の平均では 6.0 ± 5.1 であった。
2. ホルスタイン種供胚牛1頭からの平均回収胚数（平成3年度）は 5.8 ± 2.0 ($n=5$)で移植可能胚数は 4.4 ± 2.9 であった。
3. 新鮮分割胚移植により3組の一卵性双子を出産した。

緒 言

現在、ホルスタイン種牛を借復とした黒毛和種の子牛を生産するETが、各地で普及している。昭和63年度から福井県では家畜保健衛生所を中心に野外実用化を実施しており成果も着実に向上し、ETによって生産された若狭子牛黒毛和種が100

頭を超えている。生産された若狭子牛の哺育育成方法を当場で検討し、その成果は、マニュアルとなって県内酪農家に普及している。また、平成3年度には若狭牛繁殖基地である県営嶺南牧場に若狭牛受精卵供給センターを併設し、受精卵の安定的供給体制が整った。一方、当場では高能力ホルスタイン種を北海道から10頭導入しET試験を平

成2年度から開始した。特に泌乳量1万キロを超える高泌乳牛の受精卵を利用したETに対しては、農家の期待も大きい。

また、分割胚移植による一卵性双子が平成4年1月中に3組誕生し、優良牛の同一遺伝形質を受け継いだ子牛を生産する技術として農家の期待も非常に大きいものがある。

以下、それらの成績の概要を報告する。

試 験 方 法

1. 実施期間

平成元4月～平成4年3月

2. 過剰排卵誘起処置

1) 供胚牛

当場で繋養している黒毛和種(但馬系)経産牛とホルスタイン種経産牛を用いた。

2) 誘起方法

発情日を0日として性周期の7～14日目に下垂体前葉性卵巣刺激ホルモン(FSH:アントリン、デンカ製薬)を黒毛和種牛は24～28AU、ホルスタイン種牛は30～36AU3～4日間の漸減法により臀部筋肉内に投与した。FSH投与開始48時間後に発情誘起のためプロスタグランディンF_{2α}類縁体(PGF_{2α}:エストラメイト、住友製薬)800μgを臀部筋肉内に投与した。

3) 人工受精

PGF_{2α}投与後、54～56時間(2本)と72時間後(1本)の2回または48時間(1本)、54時間(1本)と72時間後の3回、凍結精液(0.5ml、計3本)を直腸膣法により人工受精を行った。

3. 胚の回収

胚の回収は、発情後7日目に多孔式バルーンカテーテル(16Gまたは20G、30cc、ニプロ社)を用いて非手術的に行った。灌流液は1%子牛血清(GIBCO)加イーグルMEM(白水製薬)を使用し、pH修正には0.2Mトリスアミノメタン¹⁾を用いた。

4. 胚回収後の発情誘起

胚回収後、子宮内に抗生物質(ペニシリンとストレプトマイシンの合成ペニシリン製剤)

を注入し、同時にPGF_{2α}800μgを臀部筋肉内に投与した²⁾。

5. 胚の観察

1ℓまたは500mlの三角フラスコに回収した灌流液を市販のメッシュ(エムコン、イムノシステムズ社)でろ過し、灌流液を90mmプラスチックシャーレに移し実体顕微鏡で胚を検索した。胚をパスツールピペットで培養液Ham's F-10+10%子牛血清に移し倒立顕微鏡下で胚の形態観察を行った。胚のランク分けは、金川³⁾の分類により行い、移植可能胚はCランク以上の胚とした。

6. 胚の凍結

胚の凍結媒液は、33%CSR(リンゲル氏液:非働化子牛血清を2:1に混合)に10%(V/V)でグリセリンを添加したものを使用した。グリセリン平衡は3段階添加法(平衡時間各5分)により行った。凍結の方法は、プログラムフリーザー(大阪酸素工業kk.FFP190)では富永ら⁴⁾の方法に準じて行った。凍結速度は、室温から-5.3℃までを1℃/分、その間-2.7℃で自動植氷を行い、-5.3℃で7分間保持後-35℃までを0.3℃/分、-35℃から-38℃までを0.1℃/分、-38℃から-160℃までを最大冷却速度とした。凍結終了後液体窒素に浸漬して保存した。一方、アルコール式プログラムフリーザーでは(富士平工業kk.ET-1)では堂地ら⁵⁾の方法に準じて行った。凍結速度は、予め0℃に設定しておいたアルコールバス内に浸漬し、-5.3℃まで1.0℃/分で低下させ植氷を行った。その後8分間保持後-30℃までを0.3℃/分で冷却し、-30℃で10分間保ち液体窒素に浸漬した。

7. 胚の分割

分割の方法は、松本ら⁶⁾の方法に準じ実施した。すなわち、直径90mmプラスチックシャーレの蓋にパラフィンオイルで覆ったHam'sF-10+10%CSのスポットに胚を入れ、金属刃(フェーザー製刃度15度)をマイクロマニピュレーター(ナリシゲ製)を装着し、胚を軽く転がすことによって、内部細胞塊(ICM)を確認し、ICMおよび胞胚腔を均等に切断2分離するように透明帯の上から

下に押すように実施した。分割胚はHlam'sF-10 + 10%CSで3時間または20時間卵丘細胞と共培養した。それぞれの胚は当场繋養または県内の酪農家のホルステイン種経産牛の黄体側に1対移植した。

結果および考察

1. 過剰排卵処置の成績

表1および図1に黒毛和種の胚回収成績を示した。3年間で102頭に過剰排卵誘起処置を行い90頭から採卵を実施し、総数927個、平均10.7個の胚を回収した。その内移植可能胚数は総数548個、

平均6.0個であった。全国平均⁷⁾は平均回収胚数11.8(n=742)、平均移植可能胚数6.1個であり、今回の胚回収成績は全国平均であった。また、昭和61年度から3年間で97頭に過剰排卵誘起処置を行い78頭から採卵を実施し、総数657個、平均7.6個の胚を回収した。その内移植可能胚数は総数419個、平均4.9個であった⁸⁾。平成元年度以降の3年間で平均回収胚数および平均移植可能胚数ともやや良い採卵成績であったが、総回収胚数に対する移植可能胚率は昭和61年度から3年間で63.8%、平成元年度以降の3年間で59.1%で昭和61年度から3年間でやや良い成績であった。また、この6年間で最高の胚回収数は27胚（移植可能胚数26胚）

表1 胚回収成績（黒毛和種）

年度	過剰排卵 処置頭数	胚回収 実施頭数	胚回収 成功頭数	回収胚数		移植可能胚数	
				総数	平均±SD	総数	平均±SD
元	38	35	35	410	11.7±5.9	202	5.7±5.1
2	47	40	40	388	11.3±6.5	263	6.5±5.9
3	17	15	15	129	9.2±4.8	83	5.9±4.3
計	102	90	90	927	10.7±5.7	548	6.0±5.1

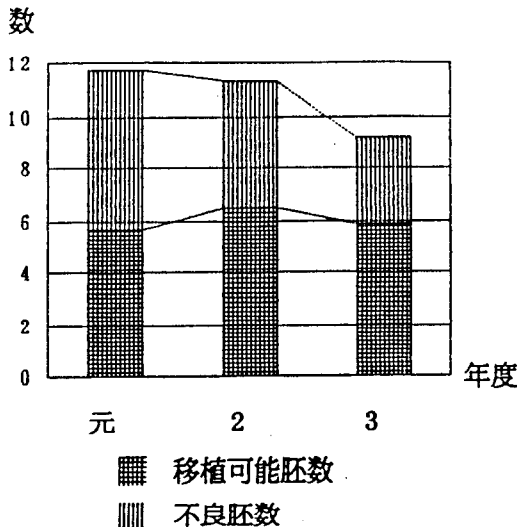


図1 胚回収成績（黒毛和種）

で次に24胚(移植可能胚数14胚)、21胚（移植可能胚数19胚）であった。

表2にホルスタイン種の胚回収成績を示した。全国平均⁷⁾は平均回収胚数8.0(n=208)、平均移植可能胚数4.0で、今回の成績は回収胚数が少なかったが、移植可能胚数はほぼ同程度であった。黒毛和種と比較すると平均回収胚数、平均移植可能胚数いずれも下回る成績であった。全国平均⁷⁾でも同様にホルスタイン種からの採卵成績が下回る成績であった。塚原ら⁹⁾は泌乳量16,720kg（日本記録）のスパークウから採卵した結果、平均胚回収数6.1(n=8)、平均移植可能胚数2.9であったと報告している。加藤ら¹⁰⁾は、高泌乳牛を供胚牛のポデーコンディションや栄養の過不足により採取される移植可能胚数は大きく変わり、特に経産牛は潜在性内膜炎などにより子宮内が汚れている場合があるため、過排卵誘起処置を施す前に子宮

表2 胚回収成績 (ホルスタイン種)

年度	過剰排卵 処置頭数	胚回収 実施頭数	胚回収 成功頭数	回収胚数		移植可能胚数	
				総数	平均±SD	総数	平均±SD
3	9	5	5	29	5.8±2.0	22	4.4±2.9

洗浄および子宮内薬液注入を実施し、平均回収胚数11.3 (n=80)、平均移植可能胚数9.1であったと報告している。

また、ホルスタイン種を供胚牛とした場合、過剰排卵誘起処置を施し、誘起されず中止となった率が44.4%、黒毛和種は11.7%でありホルスタイン種が高値であった。

宮澤ら¹³⁾は、搾乳牛における分娩後日数と過剰排卵処置成績との関係で、分娩後0~60日で行うと移植可能胚率が、150~305日と比較すると有意 ($p < 0.05$: 1.7% < 56.9%) に低い結果を報告している。

このようにホルスタイン種の泌乳期に胚回収を行う一連の方法はまだ確立されていないと思われる。今後過剰排卵誘起処置法、過剰排卵誘起処置の時期、ホデーコンディションとの関係等を検討する必要がある。

2. 分割の成績

表3に分割後の培養方法の違いによる受胎率お

表3 分割後の培養方法の違いによる受胎率および産子

培養方法	供試胚の ステージ	分割 胚数	移植 頭数	受胎頭数 (%)	産子
培養液	胚盤胞	8	8	2 (25)	単子2頭
共培養	初期胚盤胞	1	1	0 (0)	
	後期胚盤胞	3	3	3 (100)	双子3組

よび産子を示した。すなわち、分割後3時間の培養では、受胎率25% (2/8) で、産子は単子2頭であったが、卵丘細胞の共培養20時間では受胎率75% (3/4) で、すべてが双子 (3組) であった。

富永ら¹²⁾は、分割後胚を培養液のみで長時間 (18~24時間) 培養すると短時間 (3~4時間) 培養に比べ、胚の品質が有意に低下し、卵管上皮系

細胞との共培養により長時間での品質低下が改善されたと報告している。Volkel¹³⁾らは子宮線維芽細胞との共培養で報告している。今回は、卵丘細胞との共培養で同様の結果が得られた。

また、Gray¹⁴⁾らは分割を行った胚のステージ別の妊娠率 (新鮮胚移植) は、後期桑実胚51.6% (681/1320)、初期胚盤胞47.3% (264/558)、胚盤胞44.4% (48/108) で差がないと報告している。Williams¹⁵⁾らは、初期桑実胚16% (7/44)、後期桑実胚48% (77/162)、初期胚盤胞60% (58/96)、胚盤胞54% (15/28) の妊娠率を、また双子率を初期桑実胚9% (2/422)、後期桑実胚22% (18/81)、初期胚盤胞37% (18/48)、胚盤胞43% (6/14) で初期桑実胚が有意に低値であったと報告している。

今後、さらに例数を増やし分割胚のステージおよび妊娠率、双子率について検討しなければならない。

引用文献

- 1) 大野芳昭ら: 畜産の研究., 40, 423-424 (1986)
- 2) 小林修ら: 繁殖技術研誌., 10, 70-73 (1988)
- 3) 金川弘司: 牛の受精卵移植., 近代出版, 63 (1985)
- 4) 富永敬一郎ら: 兵庫畜試研報., 22, 37-46 (1985)
- 5) 堂地修ら: 東日本ET研報., 7, 76-78 (1991)
- 6) 松本和也ら: 家畜繁殖誌., 33, 1-5 (1988)
- 7) ET情報., No21, 家畜改良センター (1991)
- 8) 前田淳ら: 福井県畜産試験場研究報告., 11, 20-29 (1989)

- 9) 塚原三平ら：北海道牛受精卵移植研究会報.,
9, 36-38(1991)
- 10) 加藤雅通ら：繁殖技術研誌., 11, 24-28
(1989)
- 11) 宮澤宗高：東日本ET研報., 8, 48(1992)
- 12) 富永敬一郎ら：繁殖技術研誌., 13, 65-75
(1991)
- 13) S.A.Voelkel et al.: THERIOGENOLOGY.,
24, 271-281(1985)
- 14) K.R.Gray et al.: THERIOGENOLOGY.,
35, 37-44(1991)
- 15) T.J.Williams et al.:
THERIOGENOLOGY., 22, 521-531(1984)