

BULLETIN OF THE  
FUKUI PREFECTURAL ANIMAL EXPERIMENT STATION

No. 13

1995

---

---

# 福井県畜産試験場研究報告

第 13 号

---

---



## 福井県畜産試験場

(福井県三国町)

Fukui Pref. Animal Experiment Station  
(Hirayama, Mikuni, Fukui, Japan. 913)

略 号  
福井畜試報  
Bull. Fukui Pref.  
Anim. Expt. Sta.

福井県畜産試験場研究報告 第13号

場	長	河	本	治	瑯
次	長	多	田	憲	市
酪農肉牛課長		吉	野	則	夫
養豚課長		井	部	正	興
養鶏課長		加	藤	武	市
飼料課長		川	崎	英	夫

BULLETIN OF THE  
FUKUI PREFECTURAL ANIMAL EXPERIMENT STATION

No. 13

Director	Ziroh Komoto
Vice-Director	Kenichi Tada
Chief of Dairy and Beef Cattle Section	Norio Yoshino
Chief of Hog Section	Masaoki Inobe
Chief of Poultry Section	Takeshi Katoh
Chief of Forage crop Section	Hideo Kawasaki

# 福井県畜産試験場研究報告 第13号

## 目 次

牛の胚移植技術の実用化に関する研究 (III) —凍結胚のダイレクト移植試験— 前田淳一・小林修一・笹木教隆 .....	1
肉豚の放飼における放飼密度に関する研究 小林直樹・河部恭一・井筒重樹 .....	7
採卵鶏における鶏卵サイズ調整に関する研究 土谷耕作・笠原香澄・加藤武市 .....	10
採卵鶏銘柄によるロイコチトゾーン病感染の相違 笠原香澄・松田隆一・土谷耕作・加藤武市 .....	18
鶏糞乾燥施設における消臭装置の開発 加藤武市・津田良治・松田隆一・土谷耕作 .....	23
場外学術雑誌掲載論文抄録	
黒毛和種高齢牛の17回反復過剰排卵処置成績 前田淳一・小林修一・笹木教隆・新谷圭男・酒井暹・北村徹 .....	28
ウシ体外成熟卵子の凍結保存—耐凍剤にDMSOを用いて 前田淳一・福井幸昌・根上晃・佐々木博正・小林修一・酒井暹・北村徹・富永敏朗 .....	29
ウシ未成熟卵に施したP Z D法—その後 (体外成熟・体外受精) の胚発育の検討 小林修一・根上晃・前田淳一・酒井暹・北村徹・富永敏朗 .....	30
ウシー卵性双子生産技術 小林修一・前田淳一・笹木教隆・新谷圭男・酒井暹・北村徹 .....	31
若狭牛の低コスト肥育技術確立試験 栄養水準の違いが肥育性に及ぼす影響について 田辺勉・高岸実・新谷圭男 .....	32
Serono GPM (Gamete Preparation medium) を用いたウシ卵子の体外受精 (英文) 前田淳一・小林修一・笹木教隆・新谷圭男・酒井暹・北村徹 .....	33
胚移植子牛の哺育育成技術 前田淳一・辻本賢二郎・明間基生・松井司・小林修一 .....	34
高品質肉用鶏 (越前地鶏) の食肉の理化学的特性に関する研究 加藤武市・藤田徳子・笠原香澄 .....	35

# 牛の胚移植技術の実用化に関する研究 (III) —凍結胚のダイレクト移植試験—

前田淳一・小林修一\*・笹木教隆\*\*

Studies on direct transfer method of frozen-thawed  
bovine embryos

Jun-ichi MAEDA, Syuichi KOBAYASHI\*, Kiyotaka SASAKI\*\*,  
\*現福井県嶺南牧場 \*\*福井県家畜保健衛生所

## 要 約

黒毛和種供胚牛の過剰排卵処置によって得られた胚を、1.8Mエチレングリコール、または1.6Mプロピレングリコールを耐凍剤として凍結保存し、ダイレクト移植法により移植を行った。対照には、当場の常法である10%グリセロールと0.6Mシュークロースを用いた2ステップ法により移植を行った。その結果、ダイレクト移植法による受胎率は、それぞれ46.9% (38/81)、46.3% (31/67) であり、2ステップ法による受胎率の46.0% (52/113) に比べ差はなかった。以上のことから、1.8Mエチレングリコールまたは1.6Mプロピレングリコールを耐凍剤とするダイレクト移植法は、野外における移植の簡易化が図られる技術と考えられた。

## 結 言

近年、牛胚の凍結保存法として融解後耐凍剤を除去することなく直接移植できるダイレクト移植法が、いくつかの方法で報告されている。凍結胚移植において、耐凍剤除去のための操作を一切必要としないダイレクト移植法の開発は、移植の簡易化が図られるのみならず、ワンステップ法や2ステップ法などの融解後の操作の煩雑さから生じる移植者の技術差が解決されると考えられる。ダイレクト移植法における最初の研究報告は、1984年のMassipら<sup>1)</sup>の1.4Mグリセロールと0.25Mシュークロースの混合液で凍結した牛胚を耐凍剤を除去せず受胎牛に直接移植して受胎例を得たことに始まる。その後、

Suzukiら<sup>2)</sup>の1.6Mプロピレングリコール、また堂地ら<sup>3)</sup>の1.8Mエチレングリコールを用いた報告が行われ、いずれも60%を越す高い受胎率が得られている。EGではVoelkelら<sup>4)</sup>によって1.5Mが有効であったとの報告もある。本県においては、これまで10%グリセロールと0.6Mシュークロースを用いた2ステップ法により凍結胚移植を実施してきた<sup>5)</sup>が、融解後の操作の煩雑さからダイレクト移植法の実用化が強く望まれている。そこで本試験では、黒毛和種供胚牛に過剰排卵処置を行い、回収された胚を、Suzukiらの方法と堂地らの方法に準じて凍結を行い、従来の2ステップ法と受胎率の比較検討を行った。

## 材料と方法

### 供試胚

当場で飼養されている黒毛和種供胚牛に過剰排卵処置<sup>5)</sup>を行い、人工受精後7日目に回収されたAランクまたはBランクの後期桑実胚から拡張胚盤胞期胚を供試胚に用いた。

### 耐凍剤の調整

耐凍剤の調整は「ウシ胚のダイレクト移植法実験マニュアル」(農林水産省家畜改良センター)に従って行った。すなわち、20% (V/V) の割合に非働化子牛血清 (CS, GIBCO) を加えたダルベッコPBS (D-PBS, GIBCO, Cat. No. 310-4287) を基礎媒液とし、耐凍剤には、1.8M (10%V/V) エチレングリコール (EG, 和光, Lot No.LKJ5493)、1.6Mプロピレングリコール (PG, 和光, 12%V/V, Lot No.DSH1236) を使用した。対照には、33% (V/V) の割合にCSを加えたリングル氏液 (扶桑) を基礎培液とした1.4M (10%V/V) グリセロール (GL, 石津, Lot No.59199) を用いた。抗生物質は、結晶ペニシリンGカリウム (明治) を100単位/ml、硫酸ストレプトマイシン (明治) を100 $\mu$ g/ml加えた。

### 胚の凍結

胚の凍結は実験マニュアル(上述)により行った。供胚牛より回収した胚を20%CS加D-PBSま

たは33%CS加リングル氏液で3回以上洗浄後、凍結処理を行った。EGを用いる場合は、室温下で20%CS加D-PBSから凍結媒液に移し、直ちにストローに吸引した。PGを用いる場合は、室温下で20%CS加D-PBSから凍結媒液に移し、直ちにストローに吸引して凍結開始まで水上にて保持した(図1)。耐凍剤の平衡時間(胚を20%CS加PBSから凍結媒液に移してから冷却を開始するまでの時間)は基本的に10分~20分としたが、一部の胚については21分以上平衡した場合もあった。一方、GLを用いる場合は、室温下で33%CS加リングル氏液から直接に凍結媒液に移し、直ちにストローに吸引した。平衡時間は、15分~20分とした。胚のストローへの吸引方法は、図2に示した。ストローへの胚の封入は、ストロー1本あたり1個としたが、一部のストローにおいては2個を封入した。次いでストローを、プログラムフリーザー(ET-1, 富士平)のメタノール液槽内に横置に浸漬し、EG、PGの場合は、-7℃に保ったアルコールバスに浸漬、2分後に植氷を行った。その後8分間保持後、-30℃まで0.3℃/分で冷却し、液体窒素に投入した。一方、GLの場合は、0℃に保った液槽内に浸漬し、-5.3℃まで1.0℃/分で冷却し、2分後に植氷後8分間保持した。その後-30℃まで0.3℃/分で冷却し、液体窒素に投入した。

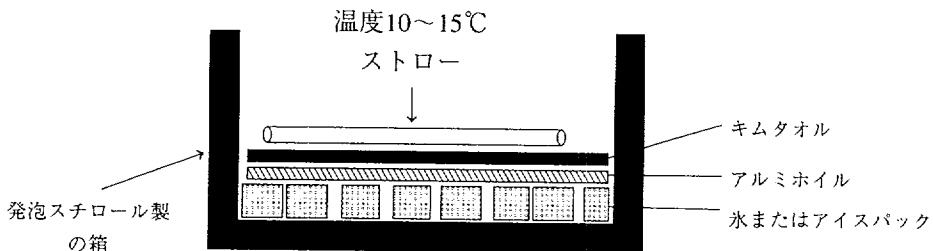
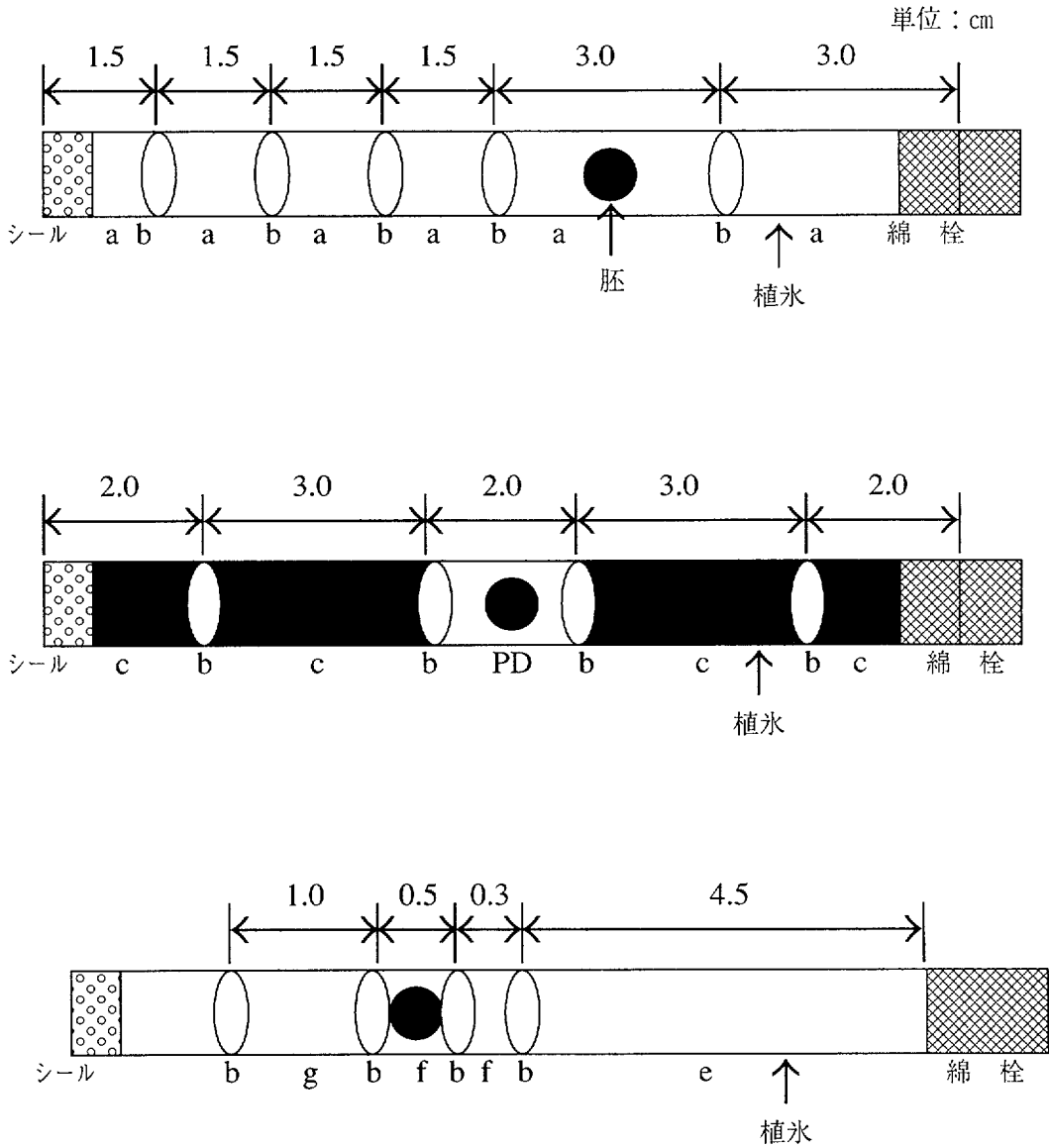


図1 プロピレングリコールを用いたダイレクト移植法における平衡時の温度管理方法



- |                    |                 |
|--------------------|-----------------|
| a : 1.8Mエチレングリコール  | e : 33%CS加リンゲル液 |
| b : 空気層            | f : 1.4Mグリセロール  |
| c : 0.2Mシュクロース     | g : 0.6Mシュクロース  |
| d : 1.6Mプロプレングリコール |                 |

図2 エチレングリコールを用いた場合のストロー構成

胚の融解

ダイレクト法(EG, PG)では、ストローを液体窒素から取り出してから5~10秒間空気中で保持後、30℃の温水中に氷晶が消えるまで浸漬し、直ちに移植器(カスーガン, カスー)にセットした。

2ステップ法では、同様に5~10秒間空気中で保持し、30℃の温水中に浸漬した。その後、胚の入ったGLの液層とシュークローズ液層を指で軽くたたくことによって混和し5分間保持した。最後にストロー全体を軽く振ることによって胚を33%CS加リンゲル氏液の層と混和し5分間保持後に移植器にセットした。

胚の移植

受胚牛は、当场で飼養しているホルスタイン種雌牛および県内の酪農家、黒毛和種繁殖農家で飼養されているホルスタイン種雌牛とF1交雑種雌牛合計261頭を用い、発情後6~8日目(発情日を0日)の黄体側子宮角内に移植を行った。移植の際には、一部の受胚牛には無麻酔にて実施したが、基本的には臭化プリフィニウム(パドリン, 藤沢)による麻酔を施した。

妊娠鑑定は、移植後33日以降に直腸検査により行った。

結 果

1.8M・EGを耐凍剤にして81頭の受胚牛に移植した結果、38頭が受胎、受胎率は46.9%であった。一方、1.6M・PGを耐凍剤にした場合は、67頭の受胎牛に移植を行い31頭が受胎、受胎率は46.3%であった。対照の2ステップ法では、113

頭に移植を行い52頭が受胎、受胎率は46.0%であり、耐凍剤の違いによる受胎率に差は認められなかった(表1)。胚の各耐凍剤への平衡

表1 凍結融解胚の耐凍剤別の受胎率

耐凍剤	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
P G	67	31	46.3
E G	81	38	46.9
G L	113	52	46.0

時間と受胎率との関係を表2に示した。いずれ

表2 耐凍剤への平衡時間と受胎率の関係

耐凍剤	10-20分	21-30分	計
P G	45.3(29/64)	66.7(2/3)	46.3(31/67)
E G	48.1(37/77)	25.0(1/4)	46.9(38/81)
G L	46.0(52/113)	0(0/0)	46.0(52/113)

の耐凍剤においても、平衡時間が10~20分であれば受胎率との間には特に有意な差は認められなかった。ストロー融解から移植終了までに要した時間と受胎率との関係を表3に示した。PG, EGを用いたダイレクト移植法では、ストロー融解から移植までに要した時間は、耐凍剤をストロー内で希釈する必要のないことから、EGの場合は移植した81頭全頭が融解から移植まで10分以内で移植を終了した。また、PDにおいても融解から移植までの時間は15分以内であった。一方、GLの場合は、ストロー内で耐凍

表3 融解から移植終了までに要した時間と受胎率の関係

耐凍剤	0-5分	6-10分	11-15分	16-20分	21-25分	計
P G	47.8 (22/46)	42.1 (8/19)	50.0 (1/2)			46.3 (31/67)
E G	50.0 (33/66)	33.3 (5/15)				46.9 (38/81)
G L			50.0 (6/12)	43.6 (34/78)	52.2 (12/23)	46.0 (52/113)

剤を2段階で希釈する必要があるため、ストローを融解した時点から移植器にセットするまで最低でも10分を要した。このため、移植終了までに要した時間は最高の場合25分となった。しかし、いずれの耐凍剤を使用した場合においても、融解から移植終了までに要した時間と受胎率との間においては有意な差はみられなかった。胚の発育ステージと受胎率との関係を表4

を用いた場合においても、福井県における従来の方法である1.4M GLを用いた2ステップ法に劣らない受胎率であった。1.6M PGを用いたSuzuki<sup>2)</sup>らの受胎率60.6% (20/33)や、1.8M EGを用いた堂地<sup>3)</sup>らの受胎率69.0% (20/29)には及ばないが、今回得られた成績から彼らの使用した耐凍剤が、ダイレクト移植法に有効であることを確認できたと考えられる。今回の成績は、

表4 胚の発育ステージと受胎率の関係

耐凍剤	桑実胚	後期桑実胚	初期胚盤胞	胚盤胞	拡張胚盤胞	計
P G		46.4 (13/28)	55.6 (10/18)	42.1 (8/19)	0.0 (0/2)	46.3 (31/67)
E G	50.0 (1/2)	51.6 (16/31)	47.6 (10/21)	55.6 (10/18)	11.1 (1/9)	46.9 (38/81)
G L		51.2 (22/43)	42.9 (15/35)	48.0 (12/25)	30.0 (3/10)	46.0 (52/113)

に示した。その結果、拡張胚盤胞期胚の受胎率は、いずれの耐凍剤区においても受胎率が低くなる傾向を示した。胚の形態学的品質(ランク)と受胎率との関係を表5に示した。PGを耐凍剤

受胚牛が県内各地に分散している状況の中においての成績であり、対照区のGLの受胎率とほとんど変わらない成績であったことから、EGやPDを耐凍剤とするダイレクト移植法は、野外における凍結胚移植の簡易化移植法として十分利用できる方法であると考えられる。胚の発育ステージと受胎率との関係については、拡張胚盤胞期胚の移植においてダイレクト試験区、対照区ともに低い受胎率であった。移植頭数も他の発育ステージにおけるものと比べ少なく、受胎率の低かった原因については不明であるが、今後移植例数を増やししながら、検討していく必要があると考えられる。

表5 胚の形態学的品質と受胎率の関係

耐凍剤	Excellent	Good	Fair	計
P G	38.9 (14/36)	63.2 (12/19)	41.7 (5/12)	46.3 (31/67)
E G	46.3 (19/41)	48.0 (12/25)	46.7 (7/15)	46.9 (38/81)
G L	47.5 (28/59)	44.1 (15/34)	45.0 (9/20)	46.0 (52/113)

とした場合のGood (A'ランク)胚の受胎率が、63.2% (12/19)と最も高い受胎率であった。

## 考 察

今回、黒毛和種の体内受精由来胚を用いて、凍結融解後耐凍剤を除去することなく直接移植できるダイレクト移植法について検討を行ったところ、1.8M EG、1.6M PGのいずれの耐凍剤

大谷ら<sup>6)</sup>は、1.4M GLと0.25M SUCの混合液を用いて凍結した胚をダイレクト移植したところ、融解後5分以上経過した場合の移植においては、受胎率が著しく低下することを報告している。今回、EGとPGを用いたダイレクト移植試験区における融解から移植までに要した時間は最長15分であったが、受胎率の著しい低下はみられなかった。このことはEGやPGは、GLとSUCの混合液よりも脱水による浸透圧ストレスが低いことを示している可能性も考えられ、EGもし



くはPGを耐凍剤としたダイレクト移植法は、胚移植を広く県内に実用化するための有利な条件の1つとなると考えられる。

なお、本試験は受精卵移植等実用化確立事業（国庫補助）により行われ、全国11道府県の協定試験として実施されたものである。本試験の実施にあたり種々のご指導いただいた農林水産省家畜改良センターの先生方に感謝申し上げます。

### 引用文献

- 1) Massip A and Van der Zwalmen P (1984)  
Vet Rec 115:327-328
- 2) Suzuki T et al (1990) Theriogenology 34;  
1051-1057
- 3) 堂地修ら (1991) 第84回日本畜産学会大会  
講演要旨
- 4) Voelkel SA and HU YX (1992)  
Theriogenology 37;23-38
- 5) 前田淳一ら (1989) 福井県畜産試験場研究  
報告11;20-29
- 6) 大谷健ら (1989) 繁殖技術研究会誌14;14-19