

牛の受精卵移植

(3) ワンステップ法による受精卵移植技術の簡易化

野 中 克 治 渡久地 政 康

I 要 約

これまで現場で行ってきた受精卵移植技術であるステップワイズ法を改善し、簡易化を図るため、現場で融解、移植のできるワンステップ法による移植を行い、その移植所要時間、血中プロゲステロン濃度及び融解時の胚の形態と受胎率の関係を調べた。

1. 移植頭数20頭中10頭に受胎が確認され、受胎率は50%であった。
2. 移植所要時間が10分以内では受胎率に差はなかった。
3. 移植時の血中プロゲステロン濃度が4 ng/ml以下では受胎率は明らかに低かった。
4. 融解後のグリセリン除去時に胚細胞の萎縮が確認された場合、受胎率は高かった。

II 緒 言

この数年間の受精卵移植技術の発展は著しく、実用化にむけてさまざまな移植技術の簡易化がなされている。国内において鈴木ら¹⁾が現場で受精卵の融解、移植のできるワンステップ法の成功例を報告して以来、同法を中心に技術改善がすすめられ、九州地区においても1989年には399頭の移植が行われ、受胎率も37.1%に達している²⁾。一方、これまで現場で行ってきたステップワイズ法による移植では、受精卵の耐凍剤除去を実験室内でおこない、ストローに再封入した後に現場へ輸送するため、畜産農家が散在している沖縄県においては効率的に移植を行うことは困難であった。そこで、受精卵移植の実用化にむけては耐凍剤除去の簡易化が課題となり、農家の庭先で受精卵の融解、耐凍剤の除去及び移植のできるワンステップ法のなかでも比較的簡単な方法により移植試験を行った。

III 試験材料及び方法

1. 試験期間

1990年4月から1991年3月まで

2. 受卵牛

場内及び畜産農家飼養の黒毛和種、またはホルスタイン種及びその交雑種で、発情後7日目に直腸検査で黄体の発育が良好と判定した牛について実施した。

3. 供試卵

場内飼養の黒毛和種に過排卵処置して、受精後7日目に回収した初期胚盤胞及び胚盤胞のAランク卵及びBランク卵を使用した。

4. 使用媒液

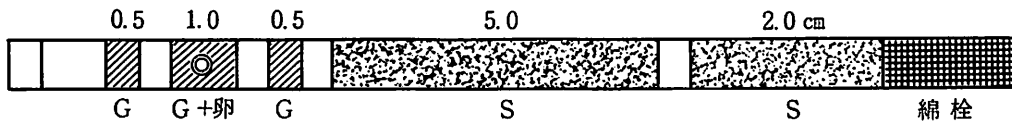
10%グリセリン加調整済 PBS+20%子牛血清 (G)

10%シュクロース加調整済 PBS+20%子牛血清 (S)

5. 封入方法

0.25mlプラスチック製ストローに家畜人工受精講習会テキスト（家畜受精卵移植編）の1段階A法に準じて封入した。³⁾

図-1 封入方法



6. 凍結曲線

耐凍剤との平衡は室温で行い、その後液相タイプのプログラミングフリーザーに入れ20℃から植水温度迄を-1℃/分、植水後は-0.3℃/分で-30℃まで冷却し、10分間保持後、液体窒素に投入した。

7. 融解方法及び耐凍剤の除去

液体窒素から取り出し、5秒間気中で保持後、38℃の温水に10秒間保持、そしてストロー内で受精卵をシュクロース層におとし、グリセリンを除去して10分間保持後直ちに移植した。

8. 受精卵の移植

カスー製未經産用牛受精卵移植器を使用した。

9. 融解卵の形態

富士平工業社製 ETスコープを使用して確認した。

10. 調査項目

直腸検査による受胎及び流産の確認と、移植所要時間、融解後の卵の形態及び移植時における受卵牛の血中プロゲステロン濃度を測定した。プロゲステロン濃度は固相法 EIAにより測定した。

IV 結 果

1. 受胎成績

1990年4月から1991年3月におけるワンステップ法による移植結果は表-1のとおりであった。移植頭数は黒毛和種13頭、ホルスタイン種4頭、交雑種3頭の合計20頭で、うち10頭に受胎が確認され受胎率は50%であった。2卵移植においては2頭とも受胎したが、1頭は妊娠90日齢で流産を確認した。

2. 移植所要時間

移植時間が10分の範囲以内では受胎率に差は見られなかった。

3. 血中プロゲステロン濃度

移植時の血中プロゲステロン濃度は、4 ng/ml未満の値を示した6頭のうち受胎が確認されたのは1頭で1.3 ng/mlの値を示した3頭はいずれも受胎しなかった。

表-1 受胎成績と血中プロゲステロン値

移植 番号	受卵牛 種類	産歴	移植所要 時間	移植卵の状況		移植 卵数	受胎 確認	流産 発生	プロゲステロン (ng/ml)
				ステージ	ランク				
1	黒毛	8	1 min	BL	A	1	-		7.6
2	黒毛	3	1	BL・EB	A・B	2	+		10.0<
3	黒毛	未	7	BL・EB	A・B	2	+	90日齢	10.0<
4	黒毛	未	5	BL	A	1	-		6.0
5	黒毛	未	7	BL	A	1	+		4.8
6	黒毛	未	5	BL	A	1	-		10.0<
7	黒毛	未	7	BL	A	1	+		4.4
8	黒毛	未	3	BL	A	1	+		4.8
9	黒毛	未	7	BL	A	1	-		3.8
10	黒毛	未	7	BL	A	1	-		4.8
11	黒毛	未	3	BL	A	1	+		4.0
12	黒毛	未	3	EB	A	1	-		1.3
13	黒毛	未	1	EB	A	1	-		1.3
14	ホルス	2	7	BL	A	1	-		2.7
15	ホルス	2	5	BL	A	1	+		10.0<
16	ホルス	1	10	BL	A	1	+		10.0
17	ホルス	未	1	BL	A	1	+		10.0
18	交雑種	未	7	BL	A	1	-		1.3
19	交雑種	未	3	BL	A	1	+		2.0
20	交雑種	未	1	BL	A	1	-		10.0<

EB……初期胚盤胞

A……胚の変性率10%以内

BL……胚盤胞

B……胚の変性率10~20%

4. 融解後の受精卵の形態

融解後の受精卵の形態確認は現場での移植を想定してETスコープを利用して行った。その結果は表-2のとおりであった。融解した25個のうち1個に透明帯の破損が、また2個に胚細胞の明らかな損傷がみられ、これらについては移植を行わなかった。

シュークロス層落下時の胚細胞の萎縮が確認できたのは25個中16個で、これらを14頭に移植した結果、8頭に受胎が確認された。胚細胞の萎縮が確認できずに移植した6頭のうち受胎確認されたのは2頭で、胚細胞の萎縮が確認された場合の受胎率が確認されない場合に比べて高かった。

表-2 融解時の卵の形態 (1)

移植番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
胚細胞の萎縮	*	**	**	*	*	*	-	-	-	-	*	*	*	*	*	*	*	-	*	-

**は2卵とも萎縮確認

融解時の卵の形態 (2)

融解卵数	融解後の卵の確認	透明帯の破損	胚細胞の破損	胚細胞の萎縮		移植卵数
				+	-	
25(コ)	25	1	2	16	6	22

V 考 察

今回行ったワンステップ法移植による受胎率は従来行ってきたステップワイズ法にはおよばないものの、ほぼそれに近い50%の受胎率を得ることができた。また、移植時に黄体の発育が良好と判定した牛についてのみ移植を実施したが、血中プロゲステロン濃度が低い個体もあったことから、事前に血中プロゲステロン濃度の測定を実施することにより受胎率の向上が図られることと推察された。

移植所要時間はすべて10分以内で行うことができたが、10分をこえた場合の受胎率及び受精卵の生存率も調べる必要があった。

シュークロース層落下時の胚細胞の萎縮はETスコープではっきりと判別しにくく、そのため胚細胞の萎縮が正確に確認されない場合もあったと思われた。また、明らかな受精卵の損傷が25個中3個に見られ、凍結方法及び融解方法の検討がさらに必要と思われた。

以上のことから、いくつかの問題点はあるものの、実用化にむけた簡易技術として有効と思われた。

VI 引用文献

- 1) 鈴木達行、1983、家畜繁殖雑誌、29
- 2) 1990、第17回九州地区人工妊娠技術検討会資料、5
- 3) 下平乙夫、家畜人工受精講習会テキスト(家畜受精卵移植編)、367

研究補助 小浜健徳