

牛の受精卵移植

(1) 過剰排卵誘起処置、卵回収及び移植成績について

渡久地 政 康 福 山 喜 一
 仲宗根 實 嘉 陽 孝 吉
 屋富祖 幸 栄

I はじめに

自然条件下では牛は1年1産であり、生涯を通じて、その産子は10頭内外である。近年、この繁殖生理を人為的に操作することによって、多数の産子を取得できる牛の受精卵移植技術が開発され、特に、ここ3、4年この技術の進展はめざましいものがある。又、この技術は牛の育種改良、増殖面で大きな期待が寄せられており、1982年度からは牛の受精卵移植技術利用促進事業も実施されるとともに、全国的な広がりをみせ、実用化へ向けて普及の段階に入っている。本県においても、牛の改良、増殖を進める手法として、牛の受精卵移植の実用化における諸問題について検討を図るため、1986年度より試験を開始したので今回はその概要について報告する。

II 供試材料及び方法

1. 供試牛の選定

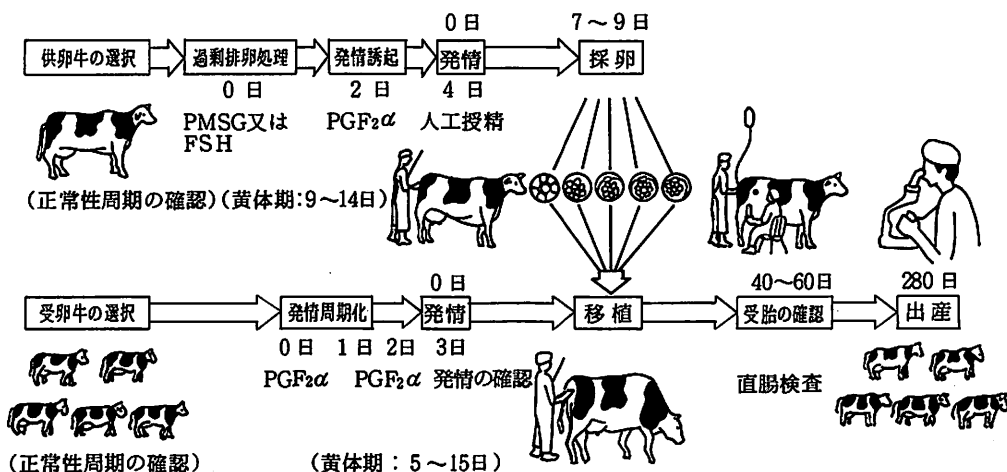
供卵牛は表1に示す通り、黒毛和種の経産牛で繁殖良好なものを選定した。

表-1 供卵牛リスト

品 種	No.	名 号	生年月日	最終分娩月日
黒毛和種	2	ひろこ	55. 8. 26	62. 8. 9
"	5	くにこ	56. 7. 16	62. 5. 8
"	6-1	おくたに	57. 5. 31	60. 7. 10
"	6-2	なきじん	58. 6. 2	61. 9. 22
"	11	あかね	58. 6. 2	60. 6. 3
"	13	やんぼる3号	58. 6. 22	
"	3319	まさみち	60. 5. 10	62. 5. 10

2. 過剰排卵誘起処置法

過剰排卵誘起処置法はFSH減量法とPMSG法で行った。図1



図一 受精卵移植の方法

(1) FSH 減量法

供卵牛は発情後9～14日目の黄体期に1日2回朝夕にかけて4日間連続して筋肉内投与した。投与量は1日目に5AUの2回、2日目、4AUの2回、3日目、3AUの2回、4日目、2AUの2回を減量しつつ合計28AUを投与した。

(2) PMSG法

投与開始日はFSH減量法と同じであるが第1日目に3000IUを1回投与した。

(3) 発情誘起法

発情誘起はFSH法及びPMSG法による処理開始から48時間経過後にプロスタグランジン(PGF₂α)を30mg、3回に分けて朝15mg、昼10mg、夕5mgで投与した。同時に発情確認用マーカ―を十字部にはりつけた。

使用ホルモン剤

FSH (アントリン)

PMSG (ピーメックス)

3. 人工授精

発情確認牛(スタンディング発情)については発情発現後6～12時間間隔で0.5ml凍結精液を2～3回人工授精を実施した。

4. 受卵牛の選択

受卵牛は表2で示す通り、黒毛和種及びホルスタイン種を用い、正常発情後5～15日目のものに発情同期化のためPGF₂αを15mg投与し、投与後3日目の供卵牛と同日にスタンディング発情をしたもの、あるいは自然発情したものを受卵牛とした。

表-2 受卵牛リスト

品 種	名 号	生 年 月 日	最 終 分 娩 月 日
黒毛和種	あ か ね	58. 6. 2	60. 6. 3
"	や ん ぼ る	53. 3. 1	60. 6. 8
"	ひ ろ こ	55. 8. 26	62. 8. 9
"	ふじたに2号	56. 6. 27	61. 6. 10
"	やんぼる3号	58. 6. 22	未 経 産
"	な き じ ん	58. 6. 2	61. 9. 22
"	ふ じ た に	53. 2. 27	61. 5. 3
"	お く た に	57. 5. 31	60. 7. 10
ホルスタイン種	D - 14	51. 8. 16	61. 10. 16
"	E - 4	53. 7. 12	61. 10. 15
"	F - 13	59. 8. 19	61. 12. 29
"	F - 18	60. 9. 12	未 経 産
"	F - 19	60. 11. 9	"

5. 採卵方法

採卵方法は子宮頸管経由法により実施した。まず、供卵牛を保定、洗浄、尾椎硬膜外麻酔、陰部周辺部の消毒を行ない、鈴木らが考案した頸管粘液除去器により頸管粘液を除去した後に、バルーンカテーテル（2Way）に内芯を入れ子宮角内に挿入後、空気を約20ml注入し、バルーンを膨らませ子宮角内に装着し内芯を抜きとった。

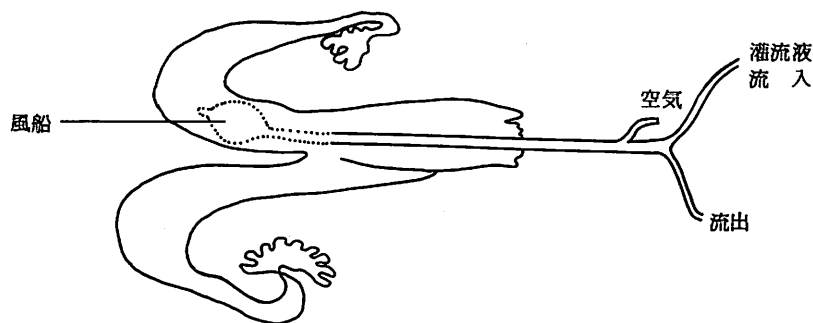


図-2 風船付2Way foley catheterの挿入図

6. 灌流液と保存液

灌流液は修正リン酸緩衝液（PBS）に牛血清アルブミン、ブドウ糖、ピルビン酸ナトリウムを混ぜ、PBS 1ml 当り 100 IU の結晶ペニシリンGカリウム及びストレプトマイシンを 1 ml 当たり、100µg 添加したものを濾過滅菌して使用した。また、保存液は上記灌流液と同様なもの

に子牛血清（56℃30分非動化）を20%添加し、灌流液、保存液ともに浸透圧290～300 Osmに保ち、37℃に加温し、可能な限り一定温度に保持し使用した。

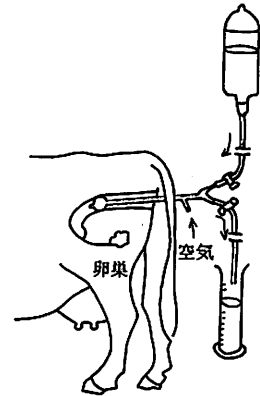
7. 灌流方法

灌流液を子宮角内に40～50 ml注入し、子宮角内洗浄後 100 ml 試験管に回収した。灌流は片側子宮角当り7～8回行ない、両側子宮角の灌流に使用される灌流液量は800～900 mlとした。

図-3

8. 卵の検索

回収卵は 100 ml の試験管のまま37℃の恒温槽内で30～60分間静置した後、底部の液をピペットで10～20 ml吸いとり、プラスチックのシャーレに移し、実体顕微鏡下で検索し、形態の検査を図5により分類を行なった。移植可能な受精卵は保存液で数回洗浄後 0.25 ml の精液用ストローに吸引した。図4、5



注) 灌流液を外陰部から1mの高さに保ち風船付2Way foley catheterで受精卵を回収する

図-3 灌流図



0.25 ml ストロー

図-4 移植前の受精卵がストロー内へセットされた状況

図-5

- 未受精卵 Non fertilized cell,
- 細胞期 2 cell, 4 cell, 8 cell,
- 桑実胚 Morulla, Compact morulla,
- 胚胞期 Early blastocyst, Blastocyst, Expanding blastocyst, Hatching blastocyst, Hatched blastocyst,

9. 移植

受精卵は保定、洗浄、消毒を行ない、2%塩酸プロカインを5～7 ml尾椎硬膜外に注射麻酔後、子宮頸管拡張棒で頸管を拡張し、子宮頸管経由法で黄体側子宮角に受精卵を移植した。また子宮内に細菌を持ち込まないよう移植時には受精卵注入器に滅菌したビニール鞘及び紙の被いを行ない、受精卵注入器が子宮頸管外口部に到着した時点でそれを破り、黄体のある子宮角先端部に受精卵1個を移植した。妊娠確認は移植後40日目から60日目に直腸検査法で実施した。図6

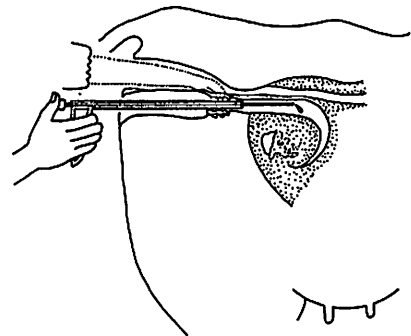


図-6 子宮頸管経由法による移植

Ⅲ 結果及び考察

1. 過剰排卵誘起処置と卵巢反応

黒毛和種7頭に延べ15回、過剰排卵誘起処置を実施した結果は表3のとおりであった。15例中12例は処置開始後4日目に発情発現が確認されたが、その内、持続性発情が1例確認された。更に2例は処置開始後3日目、1例は5日目に発情が確認された。人工授精は1発情中2～3回実施した。

表一3 供卵牛の過剰排卵処理と卵巢反応

牛No	処理年月日	品 種	産 歴	処理法、量	発 情	卵巢反応
6-1	61. 3. 8	黒毛和種	経産牛	FSH 28AU	61. 3. 12	良 好
13	61. 7. 12	"	"	"	61. 7. 16	卵胞多し
11	61. 10. 1	"	"	"	61. 10. 5	良 好
6-1	61. 10. 3	"	"	"	61. 10. 6	"
5	61. 10. 22	"	"	"	61. 10. 26	"
11	61. 12. 15	"	"	"	61. 12. 19	"
6-1	62. 2. 9	"	"	PMSG3000IU	62. 2. 13	"
6-2	62. 4. 4	"	"	FSH 28AU	62. 4. 8	"
11	62. 4. 14	"	"	"	62. 4. 18	"
6-1	62. 6. 22	"	"	"	62. 6. 26	"
11	62. 9. 7	"	"	"	62. 9. 11	"
2	62. 10. 18	"	"	"	63. 1. 23	"
3319	63. 1. 18	"	"	PMSG 3000IU	63. 1. 22	"
2	63. 1. 18	"	"	FSH 28AU	63. 1. 21	"
5	63. 2. 4	"	"	PMSG3000IU	63. 2. 8	大卵胞

2. 卵回収成績

人工授精後7日目に卵回収を行なった。その結果は表4で示すとおりであった。直腸検査で触知した推定黄体数は1頭当り平均11.3個(6～18個)であった。回収卵数は1頭当り平均6.3個(0～15)で、黄体数に対する回収卵数の率は55.9%であった。15例中14例から卵を回収し卵回収成功率は93.3%であった。回収卵のうち、移植可能な正常卵は13例から得られたが、1頭当り平均3.9個(62.1%)で、移植できない幼若卵や変性卵は平均2.4個(37.9%)であった。

表一 4 回収卵数と性状

牛No	採卵年月日	授精後の 経過日数	卵巣反応		採卵数	正常	変性 幼若	授精～ 細胞期	桑実期	胚胞期
			黄体数	卵胞数						
6-1	61. 3. 19	7	10	0	7	4	3	0	1	3
13	61. 7. 23	7	15	5	5	4	0	1	3	1
11	61. 10. 12	7	13	0	10	5	3	2	4	1
6-1	61. 10. 13	7	6	1	4	2	2	0	2	0
5	61. 11. 3	7	14	0	11	9	2	0	5	4
11	61. 12. 26	7	8	0	5	4	1	0	0	4
6-1	62. 2. 20	7	8	3	1	1	0	0	1	0
6-2	62. 4. 15	7	12	0	5	2	2	1	1	1
11	62. 4. 25	7	18	0	15	9	5	1	2	7
6-1	62. 7. 3	7	7	0	1	0	0	1	0	0
11	62. 9. 19	7	15	0	8	5	3	0	5	0
2	62. 10. 30	7	15	0	1	1	0	0	0	1
3319	63. 1. 29	7	12	1	12	9	3	0	2	7
2	63. 1. 29	7	10	0	10	4	4	2	2	2
5	63. 2. 15	7	7	2	0	0	0	0	0	0
平均 (%)			11.3	0.8	6.3 (55.9)	3.9 (62.1)	1.9 (29.5)	0.5 (8.4)	1.9 (29.5)	2.1 (32.6)

3. 移植成績

黒毛和種9頭、ホルスタイン種5頭、計14頭に移植した。その成績は表5のとおりであった。

表一 5 受精卵移植成績

移植 年月日	受卵牛 No	品 種	産 歴	同期化の 有 無	発情の 日 差	拡張棒 の使用	移植卵		妊 否
							ステージ	ランク	
61. 7. 23	11	黒毛和種	経産	有	0	有	CM	A	—
61. 10. 12	76	"	"	"	0	"	CM	A	—
61. 11. 3	2	"	"	"	0	"	B	A	+
61. 11. 3	4	"	"	"	0	"	CM	A	—
61. 11. 3	13	"	"	無	+1	"	CM	A	—
61. 12. 26	6-2	"	"	有	0	"	ex B	B	—
61. 12. 26	75	"	"	"	0	"	B	B	—
61. 12. 26	6	"	"	"	0	"	B	B	—
62. 2. 20	F-18	ホルスタイン種	未經産	"	0	"	B	A	—
62. 4. 15	F-13	"	経産	無	+1	"	B	A	—
62. 4. 25	D-14	"	"	"	0	"	B	A	—
62. 9. 19	E-4	"	"	"	0	"	CM	A	—
62. 9. 19	6	黒毛和種	"	有	0	"	CM	C	—
62. 10. 30	F-19	ホルスタイン種	未經産	有	0	"	B	B	—

4. 分娩産子

移植後279日目に分娩した産子の状況は表6のとおりであった。

表-6 産子の状況

採卵移植年月日	S61年11月3日
分娩年月日	S62年8月9日
妊娠期間	279日
性別	雌
生時体重	27 kg

IV 要 約

牛の改良増殖を進める手法として、牛の受精卵移植の実用化における諸問題について検討した。その概要については次のとおりであった。

1. 過剰排卵処置を実施した供卵牛は7頭で延べ15頭について卵回収を試み、そのうち、14頭から卵を回収し、その成功率は93.3%と高かった。推定黄体数に対し卵回収率は55.9%と低く採卵技術の検討が必要と思われた。回収卵のうち、移植可能な正常卵率は62.1%であった。
2. 移植した結果、受胎頭数が少なかったことから、移植技術、受精卵の選別技術および使用保存液等の検討、更に供試牛の選定方法についても検討を要する。
3. 供卵牛からの正常受精卵の回収は各個体毎にバラツキが大きかった。
4. 同期化受卵牛が少ないため、移植できない場合が多かった。この点から早急に受精卵凍結保存技術の検討が必要である。

V 参 考 資 料

1. 金川弘司 牛の受精卵移植
2. 社団法人 日本獣医師会 家畜受精卵移植研修会テキスト
3. 社団法人 家畜改良事業団 受精卵移植技術マニュアル