

牛の受精卵移植

(2) 受精卵採取、凍結保存、移植試験

渡久地 政 康 野 中 克 治

仲宗根 實* 福 山 喜 一**

I はじめに

牛の受精卵移植技術の実用化を図るため受精卵採取技術及び -196°C (液体窒素) 下における受精卵の凍結保存技術、凍結保存卵の融解技術及び移植技術について検討したので報告する。

II 試験材料及び方法

1. 試験期間

1988年4月から1990年4月

2. 供試牛

供試牛は全て場内飼育牛で、表-1に示す通り延べ73頭を用い、その内、供卵牛は黒毛和種の経産牛47頭、受卵牛は主に乳用牛(ホルスタイン種)の23頭を用いた。

表-1 供試牛

		供 卵 牛	受 卵 牛	計
経 産 牛	肉 用 牛	47	2	49
	乳 用 牛	0	11	11
	小 計	47	13	60
未 経 産	肉 用 牛	0	1	1
	乳 用 牛	0	12	12
	小 計	0	13	13
合 計		47 (19)	26 (17)	73 (36)

() 内数字は実頭数

3. 過排卵誘起法、人工授精、受卵牛の選定、採卵方法、灌流液作製及び卵の検索等は既報¹⁾に基づき実施した。

* 沖縄県北部家畜保健衛生所

** 沖縄県農林水産部畜産課

4. 保存液

調整した磷酸緩衝液 (M-PBS) に牛血清を 20% 加え、更に牛血清アルブミンを 0.4% 添加して作製した。

5. 凍結用メディウム

M-PBS に牛血清 20% 及び牛血清アルブミンを 0.4% 添加し、更にグリセリンを 10% になるように添加した。

6. 耐凍剤の添加方法

耐凍剤はグリセリンを用い最終 10% になるよう 3 段階により添加した。

10 分 5 分 10 分
3 段階方法 0% -----> 3 -----> 6 -----> 10%

7. 凍結方法

凍結器はプラナー社製の R-204 型器を用いて図-1 の通り室温から毎分 1°C で植水温度の -7°C 迄冷却し、植水後 10 分間保持した。更に毎分 0.3°C で -35°C まで冷却し、5 分間保持後毎分 0.2°C で -37°C 迄冷却後液体窒素に投入し保存した。

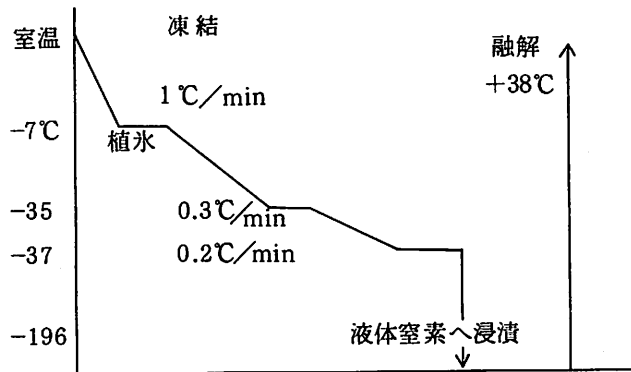


図-1 凍結曲線 +38°Cの水で急速融解

8. 融解方法

恒温槽内で 38°C の温湯に 10 から 15 秒間浸し急速融解を行った。

9. 耐凍剤の除去方法

耐凍剤の除去は 3 段階方法により、耐凍剤の添加方法と逆の過程で実施した。

10. 移植方法

受精卵は 0.25 ml のストロー精液管 (富士平工業社製) を用い、図-2 の通り封入を行った後、受精卵注入器に装着しシース管カバーをセットした。受卵牛は後躯を洗浄、消毒及び尾椎硬膜外麻酔を施した後、膣鏡により、膣部を開口し、外子宮口を確認の上、受精卵注入器が膣壁に触れぬように外子宮口へ誘導し、シース管カバーが子宮頸管内へ 2~3 cm 挿入した所でシース管をシース管カバーから徐々に押し出し、子宮壁に傷をつけないように子宮角中央部付近まで挿入した。そして、1 卵または 2 卵を片側または両子宮角に移植した。なお、注入器は富士平工業社製の未經産牛用ステップ式注入器を使用した。

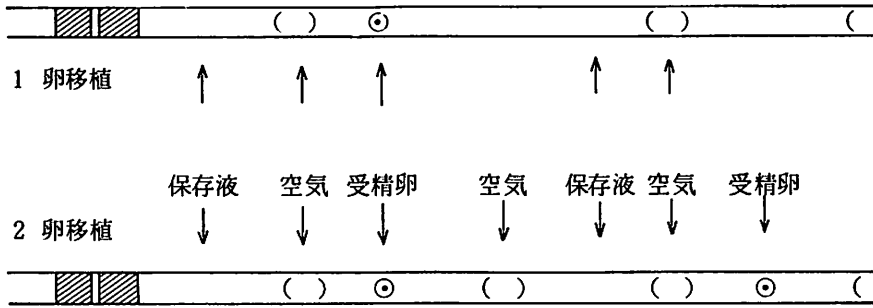


図-2 ストローの詰め方

III 結果及び考察

1. 卵回収成績

1988年度から1989年度において、延べ47頭から人工授精後7日から8日目に卵回収を実施した結果は表-2の通りであった。回収成功率は1988年度88.9%、1989年度93.1%であった。回収卵数ではそれぞれ95個、199個であった。1頭当たり平均回収卵数は1989年度で7.4個と前年度の5.9個より高い値を示しながら正常卵率の低下により、1頭あたりの正常卵数は4.0個で低い値を示した。

表-2 年度別過剰排卵処理成績

項 目	1988	1989
処 理 頭 数	18 (13)	29 (17)
回 収 実 施 頭 数	18	29
回 収 成 功 頭 数	16	27
回 収 成 功 率 (%)	88.9	93.1
回 収 卵 数	95	199
正 常 卵 数	63	108
正 常 卵 率 (%)	63.3	54.3
卵 胞 数	2.4±2.0	1.1±1.5
黄 体 数	10.8±5.9	14.0±5.3
1 頭 当 り 平 均 回 収 卵 数	5.9±4.2	7.4±5.8
1 頭 当 り 平 均 正 常 卵 数	3.9±3.4	4.0±5.0
推定黄体数による推定採卵率(%)	55.0	52.6

() 内数字は実頭数

2. 移植成績

1988年度から1989年度において、延べ26頭に移植を実施した結果は表-3の通りであった。受

胎率は1988年度で41.0%（12頭中5頭受胎）、1989年度においては57.1%（14頭中8頭受胎）であった。受胎牛13頭の内、流産4頭、母牛の病死1頭及び妊娠中1頭により分娩頭数は7頭でその内2頭は雄雌の双子であった。産子数は9頭（雄6頭、雌3頭）であった。

表-3 受精卵移植成績

受卵牛 番号	産 歴	移 植 年月日	胚の 種類	移 植 卵 の 状 況			発情同期化		受 胎	分 娩 月 日	産 子	
				卵数	ステージ	ランク	移植角	処置				日差
B-7	経	88.4.23	新鮮	1	CM	B	片	×	0	-	0	
F-19	未	88.6.24	新鮮	2	EB.B	A.B	両	×	0	+	88.8.17	流
F-20	未	88.7.15	凍結	1	CM	B	片	×	0	-	0	
F-20	未	88.9.16	凍結	1	EB	B	片	×	+1	-	0	
F-22	未	88.12.5	新鮮	2	CM	B.C	両	×	+1	-	0	
B-6	経	89.1.6	体外	2	CM	A.B	両	×	+1	-	0	
F-23	経	89.2.21	凍体	2	CM	A	両	×	0	+	89.11.18	2
F-19	未	89.3.24	新鮮	2	CM	A	両	○	0	+	90.1.1	1
F-21	未	89.3.24	新鮮	2	CM	A	両	○	0	+	89.12.28	1
F-22	未	89.3.24	新鮮	2	CM	A	両	○	0	+	89.12.24	2
F-18	未	89.3.30	凍結	1	B	A	片	×	0	-	0	
F-20	未	89.3.30	凍結	1	B	A	片	×	0	-	0	
C-3	経	89.4.7	新鮮	1	CM	A	片	×	0	+	89.7.27	流
ET-1号	未	89.4.13	凍結	1	CM	A	片	×	0	+	90.1.20	1
D-16	経	89.4.12	新鮮	1	CM	B	片	×	0	-	0	
F-18	未	89.4.18	凍結	2	CM	A.B	両	×	0	+	89.7.18	流
F-13	経	89.5.23	凍結	1	CM	B	片	○	0	+	89.8.16	死
D-16	経	89.5.23	体外	1	CM	B	片	○	0	-	0	
C-4	経	89.5.26	凍結	2	EB.CM	B.C	片	○	0	-	0	
156	経	89.5.27	凍結	2	CM	A.C	片	○	0	+	89.8.28	流
F-20	未	89.5.27	凍結	2	CM	A.B	片	○	0	+	90.3.5	1
F-4	経	89.6.19	凍追	2	B.B	A.A	片	○	0	+	90.4.1	1
159	経	89.7.6	凍結	2	B.B	A.B	両	×	0	-	0	
D-16	経	89.8.19	凍追	2	CM	A	片	×	0	-	0	
F-18	未	89.9.7	新鮮	1	B	A	片	×	0	+	妊 娠	
A-3	経	89.9.8	凍結	1	B	A	片	×	0	-	0	

胚の種類 … 凍体：凍結卵+体外受精卵・凍追：凍結卵の追い移植

ステージ … CM：後期桑実胚 EM：初期胚盤胞 B：胚盤胞

ランク ……… A：輪郭明瞭、色調、細胞の密度良好、突出した細胞がない（優良卵）

B：一部に突出した細胞や水胞が見られる（普通卵）

C：突出した細胞多い・水胞が多いが他の部分に立体感がある。（不良卵）

流 … 流産 死 … 死亡

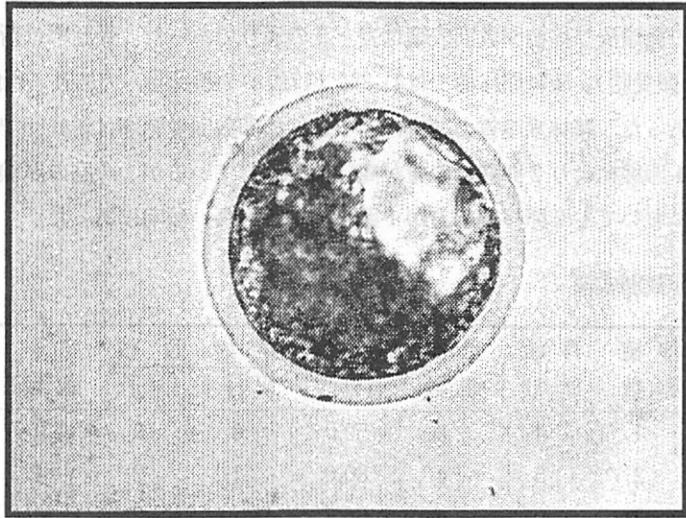


写真-1 移植に供した受精卵

(1) 条件別移植成績

i) 産歴別移植成績

受卵牛 26頭の産歴別移植成績は表-4の通りであった。受胎率は経産牛 38.5% に対し、
 未経産牛では 61.5% と高い値を示した。又、受精卵移植牛に多いとされている流産の発生
 率は未経産 28.6% に対し経産牛では 40% と高い傾向にあった。

表-4 産歴別移植成績

受卵牛	移植 頭数	受胎 頭数	受胎率 (%)	分娩 頭数	産子 頭数	流産頭 数(%)	妊娠 頭数
経産牛肉用牛	2	0	0	0	0	0	0
乳用牛	11	5	45.5	2	3	3(40)	0
小計	13	5	38.5	2	3	3※	0
未経産牛肉用牛	1	1	100.0	1	1	0	0
乳用牛	12	7	58.3	4	5	2(28.6)	1
小計	13	8	61.5	5	6	2	0
合計	26	13	50.0	7	9	5(30.8)	1

※ 母牛の病死1頭含む

ii) 受精卵の種類及び移植卵数別成績

受精卵の種類及び移植卵数別成績は表-5の通りであった。受胎率は新鮮卵移植で66.7%（9頭中6頭受胎）、凍結卵移植では41.2%（17頭中7頭受胎）であり、新鮮卵の受胎率が高い傾向にあった。農林水産省の調査によると移植卵数別受胎率は新鮮卵で殆ど差がなく、凍結卵では1卵移植より2卵移植の方が高い値を示しているが、今回の試験結果では新鮮卵及び凍結卵においても2卵移植の方が1卵移植に比べ高い傾向にあった。

表-5 移植卵数別成績

卵の種類	移植卵数	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)	分娩頭数 双子	頭数 単子	産子頭数	流産頭数	妊娠頭数
新鮮卵	1	4	2	50.0	0	0	0	1	1
	2	5	4	80.0	1	2	4	1	0
	小計	9	6	66.7	1	2	4	2	1
凍結卵	1	8	2	25.0	0	1	1	1※	0
	2	9	5	55.6	1	2	4	2	0
	小計	17	7	41.2	1	3	5	3	0
	合計	26	13	50.0	2	5	9	5	1

※印は母牛の病死

iii) 月別移植成績

月別移植成績は表-6の通りであった。1月から3月において、経産牛2頭、未經産牛5頭の計7頭に新鮮卵を移植した結果、4頭が受胎（57.1%）し、4頭が分娩した。産子数は6頭で2組は異性の双子であった。4月から6月では、12頭中8頭が受胎し受胎率は66.7%であった。その内、経産牛は8頭中4頭が受胎（新鮮卵3頭中1頭受胎、凍結卵5頭中3頭受胎）し受胎率は50%であった。未經産牛では4頭中4頭が受胎（新鮮卵2頭、凍結卵2頭受胎）し受胎率は100%であった。又、受胎率に高い値を示しながらも、産子数が少なく流産頭数が多かった。7月から9月では、6頭中1頭が受胎し受胎率は16.7%であった。

表-6 月別移植成績

項目	月	1~3	4~6	7~9	10~12	計
移植頭数		7	12	6	1	26
受胎頭数		4	8	1	0	13
受胎率(%)		57.1	66.7	16.7	0	50
分娩頭数		4	3	0	0	7
産子数		6	3	0	0	9
流産頭数		0	5	0	0	5
妊娠頭数		0	0	1	0	1

iv) 移植角別 2 卵移植成績

移植角別 2 卵移植成績は表-7 の通りで、受胎率は黄体角 50% に対し両角では 75% と高い傾向にあった。又、新鮮卵移植では黄体角 0% に対し両角では 100% であった。凍結卵移植では黄体角 60% に対し両角では 50% であった。双子分娩率は両角移植で 33.3% (6 頭中 2 頭) であった。産子頭数は黄体角で 2 頭 (生産率 66.3%)、両角移植では 6 頭 (100%) であった。流産率はともに 33.3% であった。鈴木らは受精卵 2 個を黄体角に移植した場合には子牛の流産や事故頭数が増え、両角に移植した場合には流産や事故頭数が少ないと報告し、上田らは黄体角移植において異常分娩率が高いことを報告している。

表-7 移植角別 2 卵移植成績

移植角	移植卵の種類	移植頭数	受胎頭数	受胎率 (%)	分娩頭数		産子頭数 (%)	流産頭数
					単子	双子		
黄体角	新鮮卵	1	0	0	0	0	0	0
	凍結卵	5	3	60.0	2	0	2	1
	小計	6	3	50.0	2	0	2 (66.7)	1
両角	新鮮卵	4	4	100.0	2	1	4	1
	凍結卵	4	2	50.0	0	1	2	1
	小計	8	6	75.0	2	2	6 (100)	2
合計		14	9	64.3	4	2	8 (88.9)	3

() 内は生産率

(2) 流産発生状況

受胎牛 13 頭の内 4 頭に流産が確認され、その発生状況は表-8 に示す通りであった。4 月から 6 月にかけて移植し、受胎した 8 頭の内 4 頭 (50.0%) の受卵牛に移植後 54 日から 111 日の妊娠初期に流産が確認された。流産の発生時期は 7 月から 8 月の暑い時期に確認されたことから、発生要因として気温との関連性が推察された。森らは 1 卵移植 (8.1%) より 2 卵移植 (34.1%) に流産が多く見られ、その発生時期は 1 卵移植の場合は妊娠日令 100 日以内に多発し 2 卵移植では妊娠期間の前半 (妊娠日令 150 日迄) と後半 (妊娠日令 201 日から 270 日迄) に多発することを報告しているが今回の試験では 1 卵及び 2 卵移植ともに妊娠初期に流産が確認された。

表-8 流産の発生状況

受卵牛番号	移植年月日	産歴	胚の種類	移植卵数	移植角	流産年月日	流産日令	確認方法
F-19	88.6.24	未	新鮮	2	両	88.8.17	54	直検
F-18	89.4.18	未	凍結	2	両	89.7.18	91	直検
C-3	89.4.1	経	新鮮	1	片	89.7.27	111	直検
156	89.5.27	経	凍結	2	片	89.8.28	93	直検

3. 分娩成績

分娩成績は表-9の通りで、受胎した13頭の内7頭から9頭の子牛が生産された。分娩状況は全て正常分娩であった。妊娠期間は全体の平均で285.7日であり新城らが報告した肉用牛の妊娠期間とほぼ同じであった。単子では平均288日、双子では平均280日で和牛の妊娠期間に比較すると、単子が約2日長く、双子は5日短かった。生時体重は単子の雄が31.5kg、雌では28kgで黒毛和種の発育推定値内(全国和牛登録協会1989年)にあった。双子ではF-23の雄33kg、F-22の雌27kgは発育推定値内にあった。F-23の雌18kgは極端に発育推定値を下まわった。

1号牛は1987年8月に県内受精卵移植1号牛として生まれた黒毛和種であるが、今回の分娩により受精卵移植産子牛の繁殖性が明らかにされた。F-4牛は人工授精後7日目に受精卵移植を実施した結果、受精卵移植による単子が生まれた。

表-9 分娩成績

受卵牛	移植年月日	分娩年月日	妊娠期間	生時体重	性別
F-23	89. 2.21	89.11.18	278	33 kg ※	オス
				18	メス
F-22	89. 3.24	89.12.24	282	25 ※	オス
				27	メス
F-21	89. 3.24	89.12.28	286	28	メス
F-19	89. 3.24	90. 1. 1	290	35	オス
1号牛	89. 4.13	90. 1.20	289	26	オス
F-20	89. 5.27	90. 3. 5	289	29	オス
F-4	89. 6.19	90. 4. 1	286	35	オス
平均			285.7±4.3	29.9±4.2	



写真-2 双子分娩牛

要 約

牛の受精卵移植技術の実用化を図るため、受精卵採取技術、受精卵の凍結保存技術、凍結保存卵の融解技術及び受精卵移植技術等について検討した。

供卵牛は黒毛和種の経産牛延べ47頭、受卵牛は主に乳用牛延べ26頭（黒毛和種3頭）で受精卵採取及び受精卵移植した結果は次の通りであった。

1. 卵回収成績

1989年度において1頭当たり平均回収卵数は7.4個と前年度の5.9個に比べ高い値を示したが、正常卵率の低下により1頭当たりの正常卵数は前年度同様4.0個であった。

2. 移植成績

延べ26頭に移植した結果、受胎頭数は13頭（受胎率50%）でその内、流産4頭、母牛病死1頭、分娩頭数7頭で産子数は双子2組を含め9頭であった。

(1) 産歴別移植成績

受胎率は未経産牛の61.5%に対し経産牛は38.5%であった。流産率では未経産牛の28.6%に対し経産牛は40%と高い値をしめした。

(2) 受精卵の種類、移植卵数別成績

受精卵の種類別受胎率は新鮮卵66.7%に対し凍結卵は41.2%であった。移植卵数別受胎率は新鮮卵及び凍結卵において1卵移植に対し2卵移植の方が高い値を示した。

(3) 月別移植成績

1月から6月までに移植した19頭の内63.2%（12頭受胎）が受胎し、7月から12月では7頭中1頭が受胎し受胎率は14.3%とひくかった。

(4) 移植角別2卵移植成績

受胎率は黄体角の50%に対し、両角では75%と高い値を示した。

(5) 流産

流産は4月から6月に移植した8頭の内4頭（50%）の受卵牛に移植後54日から111日の妊娠初期に確認された。

(6) 分娩

受胎した7頭の受卵牛から正常分娩により9頭の子牛が生産された。妊娠期間は全体の平均で285.7日で、単子では平均288日、双子では平均280日であった。生時体重は双子産子の雌18kgを除きすべて黒毛和種の発育推定値内にあった。1号牛の分娩により受精卵移植産子牛の繁殖性が明らかにされた。

謝 辞

本試験の実施にあたり体外受精卵の提供を賜り、ご指導、ご協力いただきました鹿児島大学農学部繁殖学教室の後藤和文先生に深謝いたします。

文 献

- 1) 渡久地政康、他4名、牛の受精卵移植、冲畜試研報第25号 1987
- 2) 第6回九州、沖縄地区家畜人工妊娠技術検討会資料 1989
- 3) 7) 森一樹、他、5名、ETにおける流早産状況、第2回家畜繁殖技術研究会全国大会講演要旨 1988
- 4) 農林水産省畜産局家畜生産課、受精卵移植実施状況 ETニュースレター No.6 1989
- 5) 鈴木達行、ウシ双子生産に関するアンケート調査(62年度)集計結果について ETニュースレター No.4 1988
- 6) 上田淳一、他3名、本県における双子生産の現状、牛の受精卵移植検討会資料 1988
- 7) 新城明久、他1名、沖縄における黒毛和種雌牛の繁殖能力とその遺伝性、琉球応用生物 第2巻 14 1987