

牛の受精卵移植技術簡易化試験

(1) 生体摘出卵巣からの受精卵生産

野中克治

I 要 約

遺伝資源の有効利用を図るため、牛生体摘出卵巣から受精卵の生産を試みた。その結果は次のとおりであった。

1. 経産牛5頭からそれぞれ卵子を2~43個採取でき、うち、卵胞嚢腫および乳成分異常で廃用とする3頭からそれぞれ受精卵を5~6個生産することができた。
2. 未経産牛(8~10ヶ月齢)では1頭当たり平均6.6個の卵子が採取でき、これらの卵子から平均0.5個の受精卵が生産された。

これらのことから、生体摘出卵巣を用いた受精卵生産は、経産牛(廃用牛)においては遺伝資源の有効利用になる。未経産牛では受精卵は生産できるものの、1頭当たりの受精卵生産数が少ないため、採取卵子数を増やす方法を今後検討する必要がある。

II 緒 言

牛の体外受精技術が確立されたことで、肥育雌牛や繁殖障害、乳房炎等の疾病により廃用となった牛の卵巣から受精卵をつくるのが可能となった。現在、体外受精卵の生産を行う場合の卵巣採取は、食肉処理場での屠殺牛から行っているが、食肉処理場までの距離および処理の順番等の制約があるため、計画的に卵巣採取できないのが現状である。

近年、雌肥育において、発情による採食量の低下や乗駕等による事故を防ぐために、卵巣摘出器を用いて牛生体から卵巣を摘出除去する方法が行われている^{1,2)}。卵巣摘出器を用いた牛生体からの卵巣摘出は、農家の庭先で計画的に行うことが可能である。

そこで、これまで廃棄された遺伝資源の有効利用を図るため、卵巣摘出器を用いた牛生体摘出卵巣からの受精卵生産を試みた。

III 材料および方法

1. 試験期間

試験は1998年4月から1999年2月までの間に実施した。

2. 供試牛

1) 経産牛 畜産試験場飼養の廃用予定牛5頭を用いた。これら試験牛の概要は表1に示した。

表1 試験牛の概要

牛No	種 類	年 齢	廃用理由
1	黒毛和種	10	卵胞嚢腫
2	黒毛和種	7	卵胞嚢腫
3	黒毛和種	18	卵巣静止
4	ホルスタイン種	8	乳成分異常
5	ホルスタイン種	8	乳成分異常・蹄部膿瘍

2) 未経産牛 J A宮古肥育センター飼養の黒毛和種未経産牛(8~10ヶ月齢)10頭を用いた。

3. 受精卵の生産方法

1) 経産牛

卵巣の採取は2%塩酸プロカインで尾椎硬膜外に浸潤麻酔を行った後、卵巣摘出器（成牛用）を用いて金城ら¹⁾の方法で行った。卵巣は乳酸加リンゲルで保存後、2時間以内に実験室で個体毎に注射器を用いて卵子を吸引採取した。卵子は5%子牛血清とFSH0.2mg/mlを添加したTCM199培地で22時間成熟培養を行った後、修正B0液（BSA2%）で5時間の媒精を行った。発生培養は、5%子牛血清加TCM199培地100 μ lに卵子数15個以下にして媒精終了後8日目まで牛個別に行った。インキュベーター内の気層条件は5%CO₂、90%N₂、5%O₂に設定した。

2) 未経産牛

卵巣採取は卵巣摘出器（未経産用）を用いて行った。卵巣は乳酸加リンゲルで15時間保存後、経産牛と同様の方法で卵子の採取、成熟、媒精および発生培養を行った。

4. 調査項目

1) 経産牛 摘出所用時間、摘出後の牛の状態、卵子の採取数と形態および胚発生成績。

2) 未経産牛 卵子の採取数と形態および胚発生成績。

IV 結 果

1. 経産牛からの受精卵生産

1) 卵巣摘出所用時間と摘出後の牛の状態

卵巣摘出所用時間と摘出後の牛の状態について表2に示した。

卵巣摘出器を膣に挿入して左右の卵巣を摘出するまでに要する時間は、黒毛和種で15分、ホルスタイン種で40分と20分であった。ホルスタイン種は黒毛和種に比べて卵巣摘出器による膣壁の穿孔に時間を要した。

供試牛は卵巣摘出直後から背湾姿勢と食欲の減少が見られたが、2日以内に全頭回復した。

表2 卵巣摘出所用時間と摘出後の牛の状態

牛No	種類	摘出に用 した時間 (分)	牛の状態 (日数)	
			背湾姿勢	食欲減少
1	黒毛和種	15	1	1
2	黒毛和種	15	1	1
3	黒毛和種	15	2	2
4	ホルスタイン種	20	1	1
5	ホルスタイン種	40	2	2

2) 卵子の採取数と形態

卵子の採取数と形態は表3に示した。No1、No2、No3、No4およびNo5牛からそれぞれ28、43、2、17および7個の卵子が採取された。そのうち正常卵子（核不均質および顆粒膜細胞の雲状を呈する卵子を除く）は25、40、1、15および6個であった。

表3 卵子の採取数と形態 (個)

牛No	採取 卵子数	卵子の形態		
		正 常	核不均質	雲状顆粒
1	28	25	2	1
2	43	40	3	0
3	2	1	1	0
4	17	15	1	1
5	7	6	1	0

3) 胚発生成績

胚発生成績は図1に示した。卵胞囊腫牛(No1、No2)から5および6個、乳成分異常牛(No4)から5個の胚盤胞を得ることができ、卵巣静止牛(No3)および乳成分異常・蹄部膿瘍牛(No5)からは胚盤胞を得ることはできなかった。

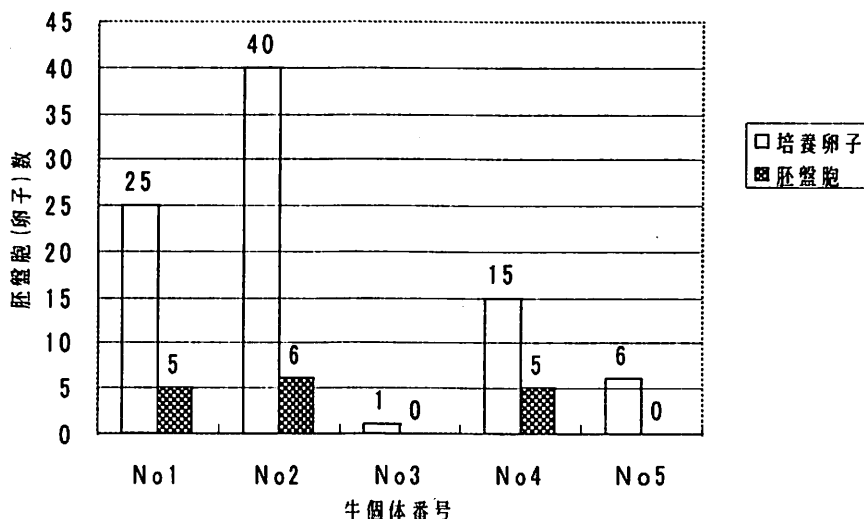


図1 牛個体別胚発生成績

2. 未経産牛からの受精卵生産

1) 卵子の採取数と形態

卵子の採取数と形態は表4に示した。

摘出した卵巣から採取した卵子数の1頭当たりの平均は6.6個であった。これらのうち体外受精に供することが可能な正常卵子は平均5.1個であった。

表4 卵子の採取数と形態 (個)

採取 頭数	採取 卵子数	卵子の形態		
		正常	核不均質	雲状顆粒
10	66(6.6)	51(5.1)	6(0.6)	9(0.9)

注) ()は1頭当たりの平均

2) 胚発生成績

胚発生成績は表5に、牛個体別胚発生成績は図2に示した。

10頭から採取した正常卵子を体外受精した場合の胚盤胞発生率は平均9.8%で、1頭当り0.5個の受精卵が生産できた。牛個体別胚発生成績では、正常卵子が8個採れたNo1、No2、No3牛からはそれぞれ1~2個の胚盤胞を得られたが、正常卵子6個以下で胚盤胞が得られたのは7頭中1頭のみであった。

表5 胚発生成績 (個)

頭数	培養卵子数	胚盤胞数	胚盤胞発生率(%)	胚盤胞数/頭
10	51	5	9.8	0.5

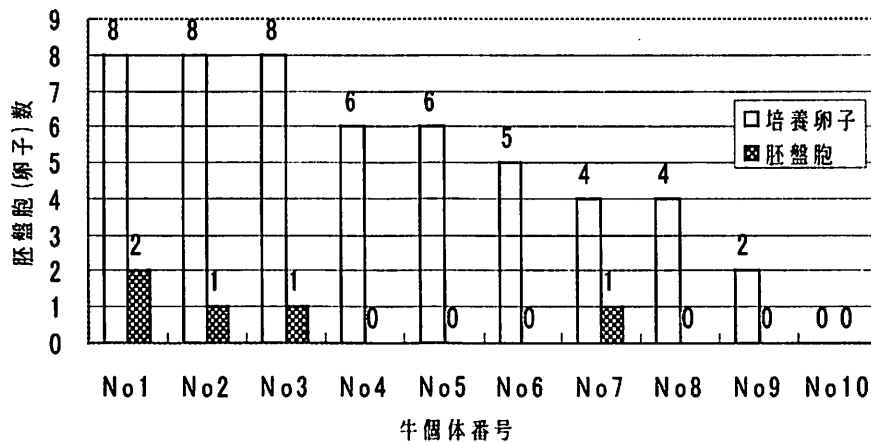


図2 牛個体別胚発生成績

V 考 察

経産牛5頭のうち、卵胞嚢腫および乳成分異常で廃用とする3頭からそれぞれ受精卵を5~6個生産することができ、これらの受精卵を移植した場合の受胎率が40%(本県における平均)と想定すると、2頭の子牛を生産することが可能である。

さらに、卵巣摘出後の食欲減少等は2日以内で回復することから、経産牛(廃用牛)における生体摘出卵巣からの受精卵生産は遺伝資源の有効利用になると考えられた。

未經産牛では、10頭中4頭で受精卵をそれぞれ1~2個生産することができたが、経産牛と同様に、移植した場合の受胎率を考慮すると、1頭の摘出卵巣から子牛を生産することは困難と考えられる。このことから、未經産牛において生体摘出卵巣から受精卵を生産する場合は、ホルモン投与や卵胞波の同期化等により採取卵子数を増やす方法を検討する必要がある。

VI 引 用 文 献

- 1) 金城寛信・島袋宏俊・玉城政信・知念雅昭・荷川取秀樹、1996、黒毛和種雌牛肥育技術の確立、(1)黒毛和種未經産雌牛に対する卵巣摘出が肥育に及ぼす影響、沖縄畜試研報、34、57~64
- 2) 武士哲弥・友松久男・高橋信雄・秀島功・横塚鳳一、1990、乳用雌牛における卵巣摘出が肥育効果に及ぼす影響、家畜診療、323、34~37

研究補助：玉本博之、前田昌哉