

牛の受精卵移植技術

中嶋達彦（熊本県畜産試験場）

Tatsuhiko NAKASHIMA : Bovine Embryo Transfer

1. はじめに

近年、国内においても牛の受精卵移植技術実用化の兆しが見えてきたが、ここでは牛の受精卵移植技術の意義、方法、熊本県における取組み体制、研究成果および今後の問題点について述べる。

2. 牛の受精卵移植技術の意義と役割

従来、自然条件下では雌牛が高い能力を有していてもその雌牛から得られる産子は生涯10頭前後であった。しかし、受精卵移植技術を利用することにより、同一雌牛の産子を数十頭から数百頭得ることが可能となり、従来の雄畜からの改良に加え雌畜側からも急速な改良ができるため、改良速度の大幅なスピード化が図られる。

また改良面にとどまらず、双子生産等による資源の増大、あるいは性別判定による雌雄の計画的生産や体外受精への応用等が考えられる。以上のことを考慮すると、現在の畜産をめぐる厳しい情勢の中で畜産経営を安定させ、安価で品質の優れた畜産物生産のためにこの技術の果たす役割は非常に大きいと思われる。

3. 受精卵移植技術の実際

1) 供卵牛の選択 受精卵を提供する優良雌牛である供卵牛は、少なくとも過去2回にわたって正常な発情の確認されたものから選定。性周期の不明瞭な繁殖障害牛や子宮内膜炎罹患牛、ならびに長期空胎牛、老齢牛は不適である。

2) 供卵牛に対する処理（過剰排卵処置）

①性腺刺激ホルモンの投与 前回の発情（発情日を0として計算する）の9～14日に性腺刺激ホルモンを投与する。PMSG（妊馬血清性腺刺激ホルモン）を投与する場合、未経産牛で2,500～3,000 IU、経産牛で3,500～4,000 IUである。FSH（卵胞刺激ホルモン）を使用する場合は、投与開始日はPMSGと同じであるが、投与法は発情発現まで1日2回朝夕にわけて4～5日間連続して筋肉内に投与する。通常1回当たり5mg、合計40～50mgを投与するが、1日投与量を10, 8, 6, 4, 4mgと減量投与する方法や、FSH、5に対してLH（黄体形成ホルモン）を1の割合で混合し、減量投与する方法もある。

性腺刺激ホルモンを投与する前には、必ず直腸検査を行い、前回の発情後にできた開花期の黄体が存在することを確認する。黄体が不明瞭な場合はスケジュールを中止して次の周期を待つべきである。

②PGF₂αの投与 PMSG投与48時間経過後PGF₂α（黄体退行ホルモン）を30mg筋肉内投与する。FSHの

場合は、投与開始後3日目の午前中に筋肉内投与する。

③発情検査と人工授精 PGF₂αの投与後2日目に発情検査を行う。良い発情があれば通常直ちに1回目の人工授精を行い、同日の夕方に2回目、翌日の早朝に3回目の人工授精を行う。2回の人工授精で実施する場合は第1回目を省く。発情検査は、朝8時ころと午後4時ころの2回パドックなどに数頭の雌牛と一緒に放飼してスタンディング発情の有無を調べる。この場合ヒートマウントディテクターを利用することにより発情発見が容易になる。発情発見が半日～1日遅れることがあるが、この場合、人工授精も発情にあわせて実施する必要がある。また発情徴候が現れなかったり、鈍性発情の場合は、人工授精およびその後のスケジュールを中止し、次のチャンスを期待する方が得策である。

3) 受精卵の回収

①卵回収 人工授精開始後7～8日目に非手術的に行う。尾椎硬膜外麻酔を実施後、人体用風船付導尿管を子宮角深部に挿入し、導尿管先端にある風船をふくらませる。風船がストッパーになるため、その先の子宮角の先端部まで灌流液で洗われる。灌流液は外陰部より1mの所から流し込み、次いで子宮角先端部をつまみ上げながら回収する。灌流液の量は左右子宮角それぞれ250ml程度である。回収された灌流液は30分間室温で静置後、上清を徐々に除去し、残留液100mlをシャーレに移し、鏡検、受精卵は保存液に移し移植または試験に供するまで室温で保存する。

②灌流液と保存液 受精卵は回収後移植されるまで最も良好な条件に保存されなければならない。通常、灌流液としてTCM 199、イーグルMEMなどの組織培養液や修正PBSが使用される。保存液はBMOC-3や修正PBSに子牛血清、牛血清等を添加して用いる。

③受精卵の検査 人工授精後7～8日目に回収される卵は通常後期桑実胚、初期胚盤胞、拡張した胚盤胞など

第1表 卵回収状況(1982年11月～'85年3月末日)

年度	区分	品種	処理	実施	成功	成功	回 収 状 況				
			頭数	頭数	頭数	率%	卵数	1頭当たり	正常卵数	1頭当たり	正常卵率%
57	馬毛	H	10	11	9	82.0	82	9.1	45	5.0	54.9
			1								
			26	27	27	100	256	9.5	161	6.0	62.9
58	馬毛	H	25	25	24	96.0	398	16.6	232	9.6	58.3
			0								
計			64	63	60	95.2	736	12.3	438	7.3	59.5

であるが、さらに正常卵を変性の程度によって A から C まで、また未受精卵、変性卵等の移植不適格卵は D ランクとして分類しておく。

4) 受精牛の選択 自然発情牛を受卵牛とする場合、供卵牛が発情を現した日を 0 とし、前後 1 日までに発情を発現した牛を選択する。自然発情牛が得られない場合は PGF₂α の投与により発情同期化を図る。投与法は供卵牛に PGF₂α を投与する前日に 15mg を投与するか、前日と当日の 2 回 5 mg ずつを投与する。PGF₂α 投与の受卵牛は前回の発情から 5～15 日目のもので、黄体を確認後、投与しなければならない。

発情確認はスタンディングの有無により行う。

5) 受精卵の移植

①受卵牛の確認 移植前日に受卵牛の黄体確認を行い記録しておく。

②受精卵のストローへの吸引 0.25ml ストローに液層を 3 つ設けて中間層に受精卵を吸引しておく。

③移植 受卵牛は外陰部の洗浄消毒後、尾椎硬膜外麻酔を施す。ストローをセットした移植器はプラスチック製サヤをつけ、膣内の細菌を子宮内へ持ち込まないように留意する。子宮頸管通過後、黄体側子宮角深部まで移植器を挿入し移植する。

④受精卵の長期保存 1 モルのグリセリンを耐凍剤として用い、急速凍結法により -36℃ から液体窒素中へ投入し保存する。また融解は 35℃ の温湯中で行い、融解後、グリセリンを 3～6 段階に分けて除去する。

4. 熊本県における取組み体制

畜産試験場をセンターとし、県内 4 か所にサブセンターを設置した。センターについては、供卵牛の飼養管理、受精卵の回収、処理等を行い、サブセンターはセンターより処理された受精卵の移植および参加農家群の指導を行う。

5. これまでの成績

1) 卵回収状況 1982年11月から'85年3月までの卵回収状況を第1表に示した。1頭当たりの回収卵数は12.3個に対し、正常卵は7.3個で、正常率は59.5%と比較的高い値となった。また卵回収1回当たりの回収卵数、正常卵数ともに年々多くなっているが、これは技術の向上に加え、回収卵数の多い供卵牛が選抜されてきたことに起因していると思われる。

第2表 処理方法別成績

※ 処理方法別	① 処理 延頭数	② うち P G 3 回 投与した もの 頭数	③ 採卵 成功 頭数	④ 採卵 成功 率	⑤ 総回収 卵数	⑥ 総正常 卵数	⑦/④ 正常 率	⑧/④ Donor 当たりの 回収 卵数	⑨/④ Donor 当たりの 正常 卵数
FSH-単味減量	14	14	13	92.9	208	120	57.7	16.0	9.2
FSH-LH 減量	44	11	42	95.5	495	304	61.4	11.8	7.2
PMSG	6	0	5	83.3	33	14	42.4	6.6	2.8
合 計	64	25	60	93.6	736	438	59.5	12.3	7.3

注) ※PMSG は他の薬剤 (LH-RH など) 併用した例も含む。

これらをホルモン処理方法別にみると、FSH 単味あるいは FSH-LH の混用減量投与法が PMSG 処理に比較し、回収卵数、正常卵数とも多い傾向にあった (第2表)。

さらに供卵牛の年齢別成績をみると 10才未満のグループが 10才以上の老齢牛に比べ回収卵数、正常卵数ともに多い傾向がみられた (第3表)。

2) 移植状況 新鮮卵、凍結卵それぞれの移植成績は第4、5表のとおりである。受胎率は年々向上しているが、これは技術の向上のほか、受卵牛を厳選したためと思われる。第6表は多胎生産技術確立試験の予備試験の結果である。

次にサブセンター別、受精卵の発育ステージ別、ランク別にみた移植成績を第7～10表に示した。

サブセンター別にみると各サブセンターごとに受胎率に差がみられるが、これは各サブセンター管内の農家の飼養形態の差、移植技術の個人差などが原因として考え

第3表 Donor 年齢別成績

Donor 年齢別	① 処理 延頭数	② 採卵 成功 頭数	③/② 採卵 成功 率	④ 総回収 卵数	⑤ 総正常 卵数	⑥/④ 正常 率	⑦/④ Donor 当たりの 回収 卵数	⑧/④ Donor 当たりの 正常 卵数
	0～3才	9	9	100	91	56	61.5	10.1
3～5才	10	10	100	125	86	68.8	12.5	8.6
5～10才	37	33	89.2	488	276	56.6	14.9	8.4
10～15才	8	8	100	32	20	62.5	4.0	2.5
15才以上	-	-	-	-	-	-	-	-
合 計	64	60	93.6	736	438	59.5	12.3	7.3

第4表 移植状況(新鮮卵) (1985年3月末日現在)

区分 年度	移植 頭数	受胎 頭数	不受胎 頭数	妊否不 明頭数	受胎率 %	産子数		登録 状況	備 考
						雄	雌		
57	20	4	16	0	20.0	1	2	済 み	1頭流産
58	66	24	42	0	36.4	12	6	済 み	6頭流早 死 産
59	95	36	59	0	37.9	10	5	申 請 中	1頭流産
計	181	64	117	0	35.4	23	13		

第5表 移植状況(凍結卵)

区分 年度	移植 頭数	受胎 頭数	不受胎 頭数	妊否不 明頭数	受胎率 %	産子数		登録 状況	備 考
						雄	雌		
57	2	0	2	0	0	0	0	済 み	
58	26	3	23	0	11.5	1	1	済 み	1頭流産
59	24	9	15	0	37.5	1	1	申 請 中	
計	52	12	40	0	23.1	2	2		

第6表 多胎生産技術確立試験

区分	移植 頭数	受胎 頭数	不受胎 頭数	妊否 不明	受胎率 %	産子数		登録 状況	備 考
						雄	雌		
三卵 移植	9	6	3	0	66.7	-	-		
分割卵 移植	3	2	1	0	66.7	-	1		1頭流産

られている。

さらに月別、季節別の移植成績を第11表に示した。冬期あるいは8、9月の夏期にやや受胎率が低下する傾向が見受けられるが、これらに関しては例数が少なく、今後の検討課題としたい。

6. 今後の問題点

以上、現在までの状況を述べたが、この技術の利用に関しては解決すべき問題点が山積している。当面、解決を急がなければならない問題点として、次のようなことが挙げられる。

- 1) 受胎率の向上対策として
 - ①確実な受精卵の確保と提供
 - ②受精卵の厳密な選定
 - ③移植技術の向上
- 2) 受精卵の凍結保存技術の確立。(受精卵移植を広く普及させる上で不可欠の技術である)。
 - ①凍結できる確実な受精卵の確保
 - ②凍結および融解方法の簡素化

第7表 サブセンター別移植成績(新鮮卵)

区 分	移植頭数	受 胎	不 受 胎	妊否不明	受胎率%
A	62	13	49	0	21.0
B	67	31	36	0	46.3
C	31	11	20	0	35.5
D	7	4	3	0	57.7
E	13	5	8	0	38.5
その他	1	0	1	0	0.0
計	181	64	117	0	35.4

第8表 サブセンター別移植成績(凍結卵)

区 分	移植頭数	受 胎	不 受 胎	妊否不明	受胎率%
A	13	6	7	0	46.2
B	15	3	12	0	20.0
C	6	1	5	0	16.7
D	6	2	4	0	33.3
E	7	0	7	0	0.0
その他	5	0	5	0	0.0
計	52	12	40	0	23.1

第9表 ステージ別移植成績

区 分	移植頭数	受 胎	不 受 胎	妊否不明	受胎率%
M	31	8	23	0	25.8
C.M	9	4	5	0	44.4
E.B	41	15	26	0	36.6
B	68	26	42	0	38.2
Ex.B	29	10	19	0	34.5
H.B	3	1	2	0	0.0
計	181	64	117	0	35.4

また、将来、普及上の問題点としては次のような点が挙げられる。

- 3) 供卵牛および受卵牛の的確な確保
 - ①供卵牛の場合は体型、能力ともに優れたもの
 - ②受卵牛の場合は体型に加えて産子の発育に係る泌乳量の問題さらに農家の飼養管理改善。
- 4) 凍結受精卵の利用
- 5) 経済性 現在はコストを無視して実施しているが、このことは避けられない問題点である。
- 6) 採卵、移植までの一連の技術の簡素化
- 7) 技術者の養成
- 8) 農家群に対しての受精卵移植技術に関する認識の徹底
- 9) 受精卵移植技術利用への方向付け
 - ①地域の希望に沿った優良雌牛の増殖
 - ②肥育素牛としての優良牛の増殖
 - ③双子生産による増殖
 - ④育種改良への方向付け 間接検定の利用あるいは兄弟検定を利用した種雄牛づくりへの利用

以上、直面している問題点、さらに将来、考慮されなければならない問題点について簡単に述べてみたが、受精卵移植を広く普及させるために、今後、これらの問題点についてさらに検討を加え、一つ一つ解決するよう試験研究を進めていかなければならないと考える。

第10表 ランク別移植成績

区 分	移植頭数	受 胎	不 受 胎	妊否不明	受胎率%
A	117	42	75	0	35.9
A	49	17	32	0	34.7
B	13	4	9	0	30.8
C	2	1	1	0	50.0
計	181	64	117	0	35.4

第11表 月別移植成績

月	移植頭数	受 胎	不 受 胎	妊否不明	受胎率%
1	13	2	11	0	15.4
2	25	6	15	4	28.6
3	49	9	27	13	25.0
4	10	3	7	0	30.0
5	7	2	5	0	28.6
6	21	7	14	0	33.3
7	20	10	10	0	50.0
8	12	3	9	0	25.0
9	19	3	6	0	15.8
10	9	7	2	0	77.8
11	23	11	12	0	47.8
12	25	8	17	0	32.0
計	233	71	145	17	32.9