

### 生体由来胚のダイレクト移植法による受胎成績

川畑健次・窪田 力・\*太田 均・堤 知子・加治佐修・\*\*溝下和則・横山喜世志

(鹿児島県畜産試験場・\*鹿児島県中央家畜保健衛生所熊本支所・\*\*肉用牛改良研究所)

Kenji KAWABATA, Chikara KUBOTA, Hitoshi OHTA, Tomoko TSUTSUMI, Osamu KAJISA,  
Kazunori MIZOSITA and Kiyoshi YOKOYAMA : Effects on Pregnancy with Direct  
Transfer of Frozen Bovine Embryo

牛胚の凍結保存技術において、近年融解後の操作が簡易で実用性が高いダイレクト法について数多く報告されており、本方法の確立を目的として、他法との受胎成績について検討したので報告する。

#### 1. 試験方法

供試胚は、当場で繋養中の黒毛和種雌牛よりFSH-R(アントリン)を投与して過剰排卵処理を行い、人工授精後7日目に得られたAランク胚(桑実胚~拡張胚盤胞)を用いた。凍結は、ダイレクト法については、20%CD加m-PBSを基礎培養液とし、耐凍剤として10%エチレングリコールを用い、植氷(-7°C)~-30°Cまでの冷却速度が0.3°C/分及び0.5°C/分の2種類と、33%CS加BMOC-3を基礎培養液とし、耐凍剤として1.4Mグリセリン、0.3Mシュクロースを用いた2ステップ法で行った。移植は場内及び県内農家牛延べ201頭(黒毛和種71頭、ホルスタイン種118頭、交雑種6頭)の牛に、43人の移植者が、発情後7~8日目に行った。

#### 2. 結果及び考察

凍結胚の融解後の移植時間による受胎成績の比較を、第1表に示した。各凍結法の受胎率は、2シスツブ法、ダイレクト法0.3°C区、ダイレクト法0.5°C区の順となったが、有意差は見られなかった。また、ダイレクト法では、移植時間が伸びるにつれて受胎率が低下し、2ステップ法では移植時間において差は見られなかった。これは、ダイレクト法では、胚が融解後のストロー内において、耐凍剤を含む液に曝されたままであり、時間の経過とともに、耐凍剤の毒性が胚に悪影響を及ぼしたものと考えられる。このことから、ダイレクト法により凍結した胚は、融解後できるだけ短時間で移植することが、受胎率向上につながると考えられる。

第1表 融解後の移植時間による受胎成績

移植時間 (分)	ダイレクト法		2ステップ法
	0.3°C区	0.5°C区	
~3	60% (3/5)	60% (6/10)	
~5	45% (13/29)	36% (8/22)	60% (3/5)
~7	30% (6/20)	29% (2/7)	67% (2/3)
~9	45% (5/11)	0% (0/3)	0% (0/3)
~11	46% (6/13)	14% (1/7)	47% (7/15)
~20	43% (3/7)	20% (1/5)	44% (8/18)
20~	0% (0/2)	0% (0/1)	45% (5/11)
計	41% (36/87)	32% (18/57)	45% (25/55)

ダイレクト法において、胚の耐凍剤への平衡時間による受胎成績を分類した結果を第2表に示した。0.3°C区では15分、0.5°C区では14分を超えると受胎率が低下する傾向にあった。このことから、ダイレクト法において胚の

耐凍剤への平衡時間は、10~15分が適当と考えられる。

第2表 胚の耐凍剤への平衡時間による比較

平衡時間(分)	0.3°C区	0.5°C区
~10	50% (8/16)	25% (3/12)
~11	43% (6/14)	25% (2/8)
~12	60% (6/15)	43% (3/7)
~13	37% (7/19)	43% (3/7)
~14	56% (5/9)	45% (5/11)
~15	38% (3/8)	17% (1/6)
16~	17% (1/6)	17% (1/6)

受胎牛の分娩後日数と凍結法による受胎成績を比較した結果を第3表に示した。50日以内では低い値を示し、51~70日で最も高く、以後低下する傾向にあった。

第3表 受胎牛の分娩後日数と凍結法による比較

日数	ダイレクト法		2ステップ法	計
	0.3°C区	0.5°C区		
~50日	17% (1/6)	20% (1/5)	0% (0/2)	15% (2/13)
~70日	45% (5/11)	43% (3/7)	54% (7/13)	48% (15/31)
~100日	38% (5/13)	29% (2/7)	38% (3/8)	36% (10/28)
100日~	33% (5/15)	24% (4/17)	27% (3/11)	28% (12/43)

受胎牛の発情状況(スタンディング発情確認の有無)と、黄体ランクの良否による受胎成績の比較を第4表に示した。スタンディング発情の有無しによって差は見られず、黄体ランクが下がると受胎率が低下する傾向にあった。このようなことから、黄体の良否の把握が受胎率向上につながると考えられる。

第4表 受胎牛の発情状況と黄体ランクによる受胎成績

黄体ランク	A	B	C	D	計
スタンディング 確認有	34% (10/29)	41% (16/39)	27% (6/22)	20% (1/5)	35% (33/95)
スタンディング 確認無	43% (6/14)	70% (14/20)	42% (22/53)	27% (4/15)	45% (46/102)
計	37% (16/43)	51% (30/59)	37% (28/75)	25% (5/20)	40% (79/197)

以上のことから、エチレングリコールを用いたダイレクト法の有用性が示唆され、凍結培養液の平衡時間を10~15分、凍結時の冷却速度を0.3°C/分とし、融解後は短時間で移植することが、受胎率向上につながると考えられた。