

ウシ胚の受胎率向上のための凍結・融解・移植方法の検討

大下雄三・妻由道明・米村功

要 約

本県では、平成14年度より14府県の畜産研究機関と共同で受胎率向上のためのダイレクト法による受精卵の凍結・融解方法に関する試験を実施している。

平成15年度は、前年度の試験において受胎率の最も高かった耐凍剤1.8Mエチレングリコール+0.1Mシュークロースをもとに、基礎溶液にCS(子牛血清)またはBSA(牛血清アルブミン)を加えた場合で、どちらが最適な凍結液であるか比較検討した。また、受胎牛の要因・移植状況等と受胎率との関連等についても検討した。

- 1 基礎溶液のCSとBSAでは受胎率に大きな差は認められなかった。
- 2 受胎牛の年齢が2歳未満であり産歴が未経産のもので受胎率が高い傾向にあった。
- 3 黄体の長径が20mm以上で実質の充実したもので受胎率が高かった。
- 4 人工的に発情同期化し移植した牛では、極端に受胎率が低い傾向にあった。
- 5 子宮角分岐(外側)から3~5cmの浅部において受胎率が高かった。
- 6 子宮頸管での出血は受胎率にあまり影響しないと考えられた。

結 言

胚移植技術の普及定着には、胚の凍結保存技術が不可欠である。特に我が国は飼養規模が小さく、一度に多数の受胎牛を準備できないため、必要に応じて現場で簡易に移植できる凍結・融解方法の確立が望まれている。

現在、主にエチレングリコールを耐凍剤としたダイレクト法が広く普及しているが、我が国では、ここ10年近く受胎率が47%前後を推移しているため、受胎率の向上が急務となっている。

平成14年度の共同試験では、エチレングリコールにシュークロースを添加することにより、良好な成績が得られることが確認された。また、耐凍剤に糖無添加のエチレングリコールを用い、基礎溶液に牛血清アルブミン(BSA)を加えた区と子牛血清(CS)を加えた区における比較試験では、両区に受胎率の差はほとんど認められなかった。結果より、BSAが安定した製剤であることからCSに代替できると考えられた。

本年度は、耐凍剤をエチレングリコール+シュークロースに統一し、基礎溶液のBSAとCSを比較検討する

試験をおこなった。また、受胎牛、移植状況等の要因と受胎率の関係についても調査した。

試験方法及び材料

1) 供試胚

生体から7日目に回収した intact 胚で、发育ステージはCM以上、ランクはA、A'およびBのもの。供胚牛の品種は黒毛和種主体とした。

2) 耐凍剤および基礎溶液

1区: 1.8M エチレングリコール + 0.1M シュークロース + 0.4% BSA in PBS

2区: 1.8M エチレングリコール + 0.1M シュークロース + 20% CS in PBS

BSA: 牛血清アルブミン CS: 子牛血清

3) 凍結・融解方法

ア. 凍結前処理

室温(20~25℃)で10~15分をめぐりに耐凍剤の平衡を行い、ストローに封入。

イ．凍結

- 7 の冷却槽にストローを入れ2分後に植氷して10分間保持し、- 30 まで毎分 0.3 で冷却。- 30 に達したら液体窒素に投入。

ウ．融解方法

液体窒素からストローを取り出し空气中に6秒保持後、30 の微温湯で20秒。

4) 移植

受胎牛1頭に1個の胚を直接移植する。技術者は各府県の平均レベル以上の2, 3名に限定。また、技術者には可能な限り各区の凍結胚を均等に配布する。

5) 調査項目

ア、凍結溶液の要因：受胎率

イ、受胎牛の要因：品種、年齢、産歴、黄体の状態同期化の有無(方法)

ウ、移植状況：移植部位、出血の有無、移植所要時間

結 果

移植は当場の技術者2名と臨床獣医師1名の計3名で行なった。供試牛は、畜産試験場繋牛の黒毛和種及びホルスタイン種と一部農家飼養のホルスタイン種に移植した。

(黒毛和種14頭 ホルスタイン種8頭計 22頭)

1) 凍結溶液の違いによる受胎成績

表1に両区の実験結果を示した。凍結溶液の種類は、1区が1.8M エチレングリコール+ 0.1M シュークロース(基礎溶液: 0.4% BSA in PBS)であり、2区が1.8M エチレングリコール+ 0.1M シュークロース(基礎溶液: 20% CS in PBS)である。

受胎率は、2区(基礎溶液が20% CS in PBS)で若干高いが大きな差は認められなかった。

表1 凍結溶液の違いによる受胎成績

試験区	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
1区	10	3	30.0
2区	12	4	33.3
合計	22	7	31.8

2) 受胎牛の品種と受胎成績

1区の黒毛和種で受胎率が42.9%であったが、ホルスタイン種では受胎が確認できなかった。2区では逆にホルスタイン種で60%と受胎率が高く、黒毛和種で14.3%と低い傾向となった。品種別に比較すると黒毛和種で受胎率28.6%、ホルスタインで30%であった。(表2)

表2 受胎牛の品種と受胎成績

試験区	品種	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
1区	黒毛和種	7	3	42.9
	ホルスタイン	3	0	0.0
2区	黒毛和種	7	1	14.3
	ホルスタイン	5	3	60.0

3) 受胎牛の年齢と受胎成績

2歳未満で高い受胎率が得られたが、5歳牛は全く受胎しなかった。(表3)

表3 受胎牛の年齢と受胎成績

年齢	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
2歳未満	4	3	75.0
2歳	7	1	14.3
3歳	5	2	40.0
4歳	4	1	25.0
5歳	5	0	0.0

4) 受胎牛の産歴と受胎成績

受胎した牛すべてが未産牛であり、その受胎率は35%であった。産歴のある牛2頭は受胎しなかった。

(表4)

表4 受胎牛の産歴と受胎成績

産歴	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
未産	20	7	35.0
1産	2	0	0.0

5) 黄体のランクと受胎成績

黄体のランクは、ランク1が黄体の長径が20mm以上で実質の充実したもの。ランク2が長径が15mm前

後で実質の充実が中程度のものとした。

表5にランクと受胎率を示した。移植実施牛はランク1又はランク2のもので、ランク2以下は移植の対象から除外した。ランク1で41.7%、ランク2で20%とランク1で受胎率が高かった。

表5 黄体のランクと受胎成績

ランク	内容	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
1	長径20mm以上 実質充実	12	5	41.7
2	長径15mm前後 実質充実中程度	10	2	20.0

6) 発情同期化の有無と受胎成績

発情の同期化は、CIDR(イージーブリード)を7日～12日間挿入し除去することにより発情をこさせ同期化を行なった。

同期化により移植した牛では極端に受胎率が低い傾向にあった。(表6)

表6 発情同期化の有無と受胎成績

同期化	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
有	7	1	14.3
無	15	6	40.0

7) 移植部位と移植成績

移植部位は、子宮角分岐(外側)を起点に記録を行なった。移植部位が3～5cmのところ受胎率が高く、次いで6～10cmのところであった。2cmと極端に浅い部位では受胎が確認されなかった。また、11cm以上の深部移植はおこなわなかった。(表7)

表7 移植部位と移植成績

移植部位(cm)	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
2	5	0	0.0
3-5	14	6	42.9
6-10	3	1	33.3
11以上	0	0	0.0

8) 移植時の出血の有無と移植成績

出血の有無は、移植後シース管の先端部や小孔の血液の付着程度により4段階で判断を行なった。出血(小・中程度の出血)が認められたにもかかわらず3頭中2頭

で受胎が確認できた。(表8)

表8 移植時の出血の有無と移植成績

出血	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
無	19	5	26.3
小	2	1	50.0
中	1	1	100.0
多	0	0	0.0

9) 移植所要時間と受胎成績

融解から移植までの時間を表9に示した。移植牛の大半が5分以内で移植が完了していたこともあるが、11分以上時間を要した牛も受胎が確認された。

表9 移植所要時間と受胎成績

時間(分)	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
1～5	20	6	30.0
6～10	1	0	0.0
11以上	1	1	100.0

考察及び今後の課題

本試験では、状態の良い受胎牛の確保が困難であったこともあり高い受胎率が得られなかったが、得られたデータより凍結液の選定、受胎牛の選定、移植状況等の要因と受胎率について関係を調査した。

1) 凍結溶液の違いによる受胎成績

受胎率については両区ともほぼ同じ様な結果となったことから、基礎溶液による受胎率の差は殆どないと考えられた。しかしながら、CSはBSAに比べロットによるバラツキがあることから、BSAの方が安定した基礎溶液であると考えられた。

2) 受胎牛の品種と移植成績

品種間による受胎率の差は殆どないと考えられた。

3) 受胎牛の年齢と移植成績

2歳未満で高い受胎率が得られたが、5歳以上になると受胎しなかった。このことは、若い牛の方が子宮の状態が良好で、安定した周期や強い発情が確認されることから、高受胎率につながったと考えられた。

4) 受胎牛の産歴と受胎率

試験に供した経産牛2頭は妊娠が確認できなかった。

例数が少ないため比較はできないが、産歴のある牛は、子宮が下垂しているものや尿膣になっているものがあるため、未経産牛の方が移植が容易である傾向にあった。

5) 黄体のランクと移植成績

ランク A の黄体直径 20 mm 以上と大きく実質の充実している黄体で高い受胎率が得られた。

今回、血中黄体ホルモン濃度の測定はしなかったが、黄体ホルモン濃度が低い場合には胚の早期死滅が高率に起こると¹⁾言われていることから、黄体の大きさや形状、硬さ、充実度に黄体ホルモン濃度を加味した判断が可能であれば、さらに黄体の判断基準の精度が増し受胎率向上につながるのではないかと考えられた。

6) 発情同期化の有無と移植成績

人為的に発情同期化した牛に移植した場合、受胎率が明らかに低くなる傾向にあった。今回、同期化は CIDR にておこなったが、この方法だと CIDR 除去後の発情が自然発情に比べ弱いものが多く、発情が確認できないものもいた。

7) 移植部位と移植成績

移植部位について、山科²⁾は、子宮浅部で (2 - 4 cm) 高い受胎率が得られたという報告をしているが、本試験においても、子宮角分岐(外側)から 3 ~ 5 cm の浅部において高い受胎率が得られており、浅部で十分受胎することが確認された。

今回、2 cm と極端に浅い部位では受胎が確認されなかった。通常、2 cm と浅い部位での移植は受胎牛が高齢で子宮の落込みが激しい牛や過肥気味で子宮が保定できない場合に浅くなる傾向にあるため、受胎牛の選定に際し、ポディーコンディションや産歴等に十分配慮する必要があると考えられた。また、このような牛に移植する場合は、子宮粘膜の刺激を最小限に抑えることのできるカテーテル式の移植器を選定するのも 1 つの方策ではないかと考えられた。

8) 移植時の出血の有無と移植成績

ある程度熟練した技術者は、子宮体や子宮角で出血させることはほとんどないため、出血が確認されたとしたら、その殆どが子宮頸管での出血であると考えられる。

血液中の補体は胚に有害であるとされており³⁾血液を子宮内に持ち込むことは、受胎率の低下につながる可

能性が高いため、子宮頸管で出血した血液や頸管粘液を子宮角内部に持ち込まないための工夫が必要となってくる。

参考文献

- 1) 西貝正彦, 胚移植による受胎率に影響する要因, 乳牛の繁殖プログラム—繁殖成績向上の理論と実際—(中尾敏彦監修), デーリイマン臨時増刊号, 155-159 (2003)
- 2) 山科秀也, 家畜人工授精, 219 4-20 (2003)
- 3) 日本家畜人工授精師協会編, 家畜人工授精講習会テキスト(家畜受精卵移植編)(2001)

