

鳥取に適したウシ胚移植成績向上のための技術開発

米村 功・永田麻理子・瀬尾哲則・妻由道明*

*現（財）鳥取県畜産振興協会

要 約

優良な種牛の生産手法としてウシ胚移植が活用されている。鳥取県の状況として、当県は北海道や九州等と比較して牛の飼養頭数が少ないため発情の合った受胎牛の確保が困難であり、新鮮胚移植が少なく凍結胚移植が多い。当県におけるウシ胚移植の受胎成績を高めるためには、受胎成績が高い新鮮胚移植の利用を増加させること、また胚の凍結技術をさらに改善して受胎成績を向上させることが有効と考えられた。

試験Ⅰ 受胎牛の移植可能な性周期範囲の拡大

新鮮胚移植は受胎率が高いので、受胎牛の移植可能な性周期を膣内残置黄体ホルモン製剤を用いて発情後 10 日目まで広げる技術を検討した。その結果、10 日目の移植は受胎促進処理をしない場合では受胎例(0/4)は得られなかったが、CIDR の利用により性周期が発情後 10 日目で分娩率 25%(2/8)が得られ、移植範囲を拡大出来る可能性が示された。しかし通常の 7 日目の分娩率 42%(5/12)と比べて低かった。

試験Ⅱ 凍結保存液に卵黄の添加及び耐凍剤をグリセロールに変更する効果

胚の凍結技術の改善ため、凍結溶液に卵黄を添加する場合及び耐凍剤を低濃度のグリセロールに変更した場合の効果を検討した。その結果、卵黄添加では受胎成績は変わらなかった。低濃度のグリセロールへの変更では低い受胎成績であった。

試験Ⅲ 凍結溶液に蔗糖を添加する効果

胚の発育が進んだ段階（拡張胚盤胞から胚盤胞）では、蔗糖の 0.1M 添加により受胎率が 50%(7/14)となり、糖を添加しない場合の 41%(7/17)に比較して有意でないが成績が向上した。この結果を農家採卵受託事業などで凍結する胚に適用し、凍結胚の品質改善に活用する。

緒 言

優良種牛の生産手法としてウシ胚移植が活用されている。ウシ胚移植の鳥取県での問題として、鳥取県は北海道や九州等と比較して牛の飼養頭数が少なく受胎牛の確保が困難なため、新鮮胚移植が少なく凍結胚移植が多い。この改善のためには、新鮮胚移植の利用性を高めること、また胚の凍結技術を向上させることの検討が有効と考え

られた。

新鮮卵で移植するためには、受卵牛の発情同期化が必要でその利用は伸び悩んでいる。もし発情を同期化する必要がない、もしくは受胎牛の移植可能な同期化の範囲が拡大できるならば、移植可能な受胎牛を多く確保できるので新鮮胚移植を増加させることが出来る。そこで受胎牛の移植可能な性周期を膣内残置黄体ホルモン製剤（以下、CIDR）を用いて 10 日目に広げる技術を検討し

た。

また当県では、必要に応じて現場で移植できる凍結胚移植が主に行われており、凍結胚の受胎性向上は重要な課題である。既にウシ胚の凍結保存技術は高い水準を達成しほぼ確立しているが、生産者は凍結技術のさらなる改善を要望している。そこで凍結胚移植成績の向上の試みとして、凍結溶液への各種保護物質の添加効果及び耐凍剤の変更を検討した。

近年のウシ胚のダイレクト移植に対応した凍結保存溶液^{1) 2) 3)}には、リン酸塩緩衝液（以下 PBS と略す）を基本溶液に 1.8M エチレングリコール（以下、EG）を耐凍剤に用い、血清またはウシ血清アルブミンを添加して蔗糖（以下、Su）等の糖類を保護物質として用いた溶液が利用されることが多い。一方、グリセロール（以下、Gly）はウシ胚のステップワイズ法²⁾により広く用いられていたが、ダイレクト移植に対応しにくいことにより、近年利用されなくなっていた。

最近、富永ら⁴⁾はバイオプシーしたウシ体外受精胚の凍結保存に Gly を比較的低い濃度である 0.7M 含む凍結溶液により、ダイレクト移植で高い受胎性を得たと報告している。この方法はウシ体内受精胚では検討されていないので、本研究で受胎成績を調査し可能性を検討した。

さらに、凍結保存が難しいブタ胚⁵⁾及びブタ精液の凍結保存²⁾には、凍結による障害の抑制のため、卵黄や界面活性剤（オーバースペース、以下 OEP：宮崎化学薬品株式会社）で処理した卵黄を凍結保護物質に用いることにより生存性を向上させている。これらもウシ体内受精卵で用いられた報告は、ほぼ無いのでこれらの可能性も検討した。

当県では過去の試験研究として、平成 14 年度から 16 年度までの 3 年間、14 府県の試験関係機関と共同で受胎率向上のためのダイレクト移植方法によるウシ胚の凍結・融解方法に関する試験⁶⁾を実施した。このなかで当県の成績では凍結溶液に蔗糖添加区と蔗糖無添加区を比較した場合に差は認められず、さらに受胎成績も糖添加区がやや低かった。このため当県で生産される凍結受精卵においては凍結溶液へ糖添加が採用されず、農家採卵受託事業などでのウシ胚凍結保存にも利用されていなかった。

最近、農家採卵受託事業で採卵した胚盤胞期から拡張

胚盤胞期の胚について凍結胚での受胎成績が低い場合があると利用者から意見が寄せられていた。そこで胚盤胞期から拡張胚盤胞期の胚を用いて耐凍剤に糖添加区と糖無添加区を比較し、その効果を検討した。

材料及び方法

試験Ⅰ：受胚牛の移植可能な性周期範囲の拡大

1) 供試胚

発情後9～14日の黒毛和種供胚牛に、卵胞刺激ホルモン（以下、FSH）の20AU減量投与による過剰排卵処理を行い、処理開始から3日目の午前中にプロスタグランジン製剤（以下、PGF2 α ）投与して発情を誘起し、5日目の午後と6日目の朝に人工授精を実施し、受精後7日目にエンブリオテック（全葉工業株式会社）を用い胚を回収した。回収されたグレード1または2ランクの胚を1.8M EGを含む PBS(+)（インビトロジェン）に10%（V/V）子牛血清（以下、CS）を添加したダイレクト移植用の凍結法により液体窒素中で保存した胚を移植に供試した。

2) 移植時の処置

(1) 性周期が発情後10日目に移植する区分

試験区では、発情後10日目に受胚牛1頭に1個の凍結し融解した胚を直接移植し、移植後CIDRを20日間留置した。対照区では発情後7日目に受胚牛1頭に1個の凍結し融解した胚を直接移植し、CIDRは留置しなかった。受胎成績は受胎妊娠を継続し分娩に至った場合の成績とした。

試験Ⅱ：凍結保存液に卵黄の添加及び耐凍剤をグリセロールに変更する効果

1) 各区分共通な処理部分

(1) 供試胚

発情後9～14日の黒毛和種供胚牛に、FSHの20AU減量投与による過剰排卵処理を行い、処理開始から3日目の午前中にPGF2 α を投与して発情を誘起し、5日目の午後

と6日目の朝に人工授精を実施し、受精後7日目にエンブリオテックを用い胚を回収した。回収されたグレード1または2ランクの胚を試験区別の凍結方法で凍結保存した。

(2) 胚の保存・融解・移植

凍結前処理は、供試胚を室温（20～25℃）下で凍結溶液に10～15分間浸漬し、0.25ml ストロー（クリスタルストロー、IMV社）に封入した。胚の冷却にはプログラムフリーザー（ET-1：富士平工業株式会社）を用いた。

融解方法は、液体窒素からストローを取り出し空気中に6秒保持後、30℃の微温湯で20秒間融解した。

胚の移植は、自然に発情を発現した発情後7日目の黒毛和種雌牛及び乳用種未経産牛に1頭に1個の胚を直接移植した。

(3) 受胎成績の評価

受胎は妊娠を継続し分娩した場合として分娩率を調査した。

2) 試験区別の処理項目

(1) 卵黄・蔗糖添加区

凍結保存溶液には、PBS(+)を基本溶液に2.5%(v/v)卵黄、0.35%(v/v)OEP、20%(v/v)CS、0.1MSu、1.8MのEG濃度に調整し、遠心分離した上清を用いた。凍結プログラムは、氷晶の形成温度が低いため、-9℃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℃で冷却した。-30℃に達した後、液体窒素に投入した。

(2) 低濃度 Gly 区

凍結保存溶液には、PBSを基本溶液に、20%(v/v)CS、0.1MSu、0.7MのGly濃度に調整し用いた。凍結プログラムは、-3.5℃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0.5℃で冷却し、-30℃に達した後、液体窒素に投入した。

(3) 対照区

凍結保存溶液には、PBSを基本溶液に、20%(v/v)CS、0.1MSu、1.8MのEG濃度に調整し用いた。凍結プログラムは、-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℃で冷却し、-30℃に達した後、液体窒素に投入した。

試験Ⅲ：凍結溶液に蔗糖を添加する効果

1) 供試胚

試験ⅠⅡと同様に採取された胚から、胚盤胞期から拡張胚盤胞期の発育段階の胚を供試した。

2) 凍結溶液

(1) 蔗糖0.1M添加区

凍結保存溶液には、PBSを基本溶液に、20%(v/v)CS、0.1MSu、1.8MのEG濃度に調整した。

(2) 蔗糖無添加区

凍結保存溶液には、PBSを基本溶液に、20%(v/v)CS、1.8MのEG濃度に調整した。

3) 凍結プログラム

各区共に、-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℃で冷却し、-30℃に達した後、液体窒素に投入した。

4) 移植及び調査項目

発情後7日目の黒毛和種雌牛及び乳用種未経産牛に1個の胚を直接移植した。受胎は妊娠を継続し分娩した場合として分娩率を調査した。

IV 統計処理

各試験とも出現率の統計処理は、 χ^2 検定またはFisherの直接確立計算法により行った。

結 果

試験Ⅰ：新鮮胚移植範囲の拡大

発情後10日目の移植は無処置では受胎例が得られなかったが、移植後のCIDRの留置により分娩率25%で受胎した。これにより移植範囲の拡大の可能性が示されたが、通常性周期である発情後7日目の分娩率42%と比べて分娩率が低かった。(表1)

表 1 性周期が発情後 10 日目の受胎牛の移植成績

試験区分	移植頭数	分娩頭数	分娩率
10 日目 CIDR	8	2	25%
10 日目 無処理	4	0	0%
対照区	12	5	42%

試験Ⅱ：凍結保存液に卵黄の添加及び耐凍剤をグリセロールに変更する効果

凍結溶液に卵黄と Su を添加する効果及び Gly に変更する効果の検討したところ、卵黄・Su 添加区では受胎成績は変わらなかった。低濃度 Gly 区は効果が認められなかった。(表 2)

表 2 凍結保存液に卵黄の添加及び耐凍剤を Gly に変更する効果

試験区	移植頭数	分娩頭数	分娩率
卵黄・Su 添加区	26	13	50%
低濃度 Gly 区	9	3	33%
対照区	40	19	48%

試験Ⅲ：凍結溶液に蔗糖を添加する効果

胚の発育の進んだ、拡張胚盤胞期から胚盤胞期の胚で、Su の 0.1M 添加により分娩率が 50%となり、Su 無添加区の 41%に比較して有意ではないが成績が向上した。(表 3)

表 3 凍結溶液に蔗糖を添加する効果

試験区	移植頭数	分娩頭数	分娩率
Su 0.1M 添加区	14	7	50%
Su 無添加区	17	7	41%

考 察

試験Ⅰ：受胎牛の移植可能な性周期範囲の拡大

本報告で移植可能な性周期を移植時に CIDR を用いることにより発情後 10 日目の移植で受胎率 25%(2/8)が得

られた。志村⁷⁾は、発情周期が不明であるが良好な黄体を有する受胎牛に対して移植後に CIDR を挿入したところ、通常を受胎率と変わらない受胎成績 52%(13/25)を得たと報告している。本試験は発情 10 日目で同様な方法により受胎例が得られた。これらのことから、CIDR を利用する処置により、受胎牛の移植による受胎可能な範囲は拡大できる可能性があることが示唆された。しかし、現状では移植範囲が拡大できる可能性は示されたが、CIDR による受胎促進効果^{8) 9)}だけでは受胎成績が不十分であり、農家に普及する段階には至らなかった。

最近、母牛が妊娠を認識する機構の研究¹⁰⁾によりインターフェロン τ が早期妊娠認識物質であることが解明されており、妊娠促進技術への応用が検討されている。これらの妊娠認識物質と CIDR の併用により、胚移植が可能な発情周期を拡大しても受胎性が維持される可能性があり、今後の検討課題と考えられる。

試験Ⅱ：凍結保存液に卵黄の添加及び耐凍剤をグリセロールに変更する効果

胚の凍結技術の改善ため、凍結溶液に卵黄・糖類等の添加及び耐凍剤を低濃度の Gly に変更した場合の効果を検討した。その結果、卵黄と Su 添加では受胎成績は僅かに上回ったが、有意差はなく顕著な効果は認められなかった。卵黄を添加するためには、凍結溶液を作成する際に労力と時間が多く掛かる。また植氷温度がやや低く、別途の冷却プログラムを用いなければならないことなどから、実用するには有効な方法でないと考えられた。

また、低濃度の Gly への変更では、低い受胎成績であったため、実用的でないと判断した。

試験Ⅲ：凍結溶液に蔗糖を添加する効果

過去の試験研究⁶⁾として、ウシ胚の凍結・融解方法に関する試験で当県では耐凍剤に糖添加区と糖無添加区を比較した場合の差は認められず、さらに受胎成績も糖添加区がやや低かった。しかし、近年の報告¹¹⁾により、糖が細胞膜を保護し凍結融解時の障害を緩和していると報告される場合が多く、耐凍剤に糖類を添加することにより胚への凍結融解時のダメージを緩和することが可能

であると考えられ、最近では、糖を添加することにより胚の発育段階に係らず受胎率が安定する報告¹⁾²⁾がされている。本試験により耐凍剤に Su 添加区と Su 無添加区を比較し、胚の発育の進んだ段階（拡張胚盤胞から胚盤胞）で、Su の添加により受胎率が向上することが示された。これにより安心して農家採卵受託事業などのウシ胚の凍結保存に利用ができ、凍結された受精卵からの産子の増加が期待される。

謝 辞

本研究の実施に当たり県内の多数の畜産農家の方々、財団法人鳥取県畜産振興協会鳥取放牧場、鳥取県立倉吉農業高等学校ならびに鳥取県立農業大学校に多大な協力を戴いた、ここに深く感謝する。

参 考 文 献

- 1) 堂地 修ら、ウシ凍結胚の直接移植法、日本胚移植学雑誌、21、28-34(1999)
- 2) 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)
- 3) 福島護之ら、凍結保護物質にエチレングリコールを用いたウシ体外受精由来凍結胚のストロー内希釈・移植法の検討、兵庫農技セン報、31,1-6(1995)
- 4) Keiichiro Tominaga,etal.Conventional Freezing of In Vitro-Produced and Biopsied Bovine Blastocysts in Presence of a Low concentration of Glycerol and Sucrose.J.Reprod.Dev.53.443-447(2007)
- 5) Fujino Yukihiro.etal.Cryoprotective effect of egg yolk in cryopreservation of porcine embryos.Cryobiology;23.518-524
- 6) 大下雄三ら、ウシ胚移植における受胎率向上のための凍結・融解方法の検討、鳥取畜試研報 33、1-7(2005)
- 7) 志村修、発情同期化をしない牛への受精卵移植、家畜人工授精、234、52-53(2006)
- 8) 佐々木恵美ら、胚移植直後にプロゲステロン製剤を膈内留置した受胎牛の受胎成績に関する検討、島根県畜試研報 38、14-17(2005)
- 9) 川崎友子ら、膈内留置型黄体ホルモン剤（CIDR）を利用したウシ胚移植における受胎率向上効果の検討、山口畜試研報 21、14-18(2007)
- 10) 下司雅也ほか、ウシ体外受精由来栄養膜小胞の子宮内投与が発情周期および血清中早期妊娠因子活性に及ぼす影響、Jpn.J.Embryo Transfer.,26(1)、1-6,(2004)
- 11) 堂地 修、ダイレクト法における受胎率向上、シンポジウム、牛胚移植の新たな展開と受胎率向上、20-38(2003)
- 12) 新納正之、牛胚のガラス化保存マニュアル、農林水産省家畜改良センター(1998)