

牛の受精卵移植技術に関する研究

第1報 過剰排卵処理および凍結方法

余谷行義*・濱口 勇*・伊藤雄一**・山田陽稔*

Studies on Embryo Transfer Techniques in Cattle

1. Examination of superovulation and deep freezing method

Yukiyoshi YOTANI, Isamu HAMAGUCHI, Yuichi ITOH, Harutoshi YAMADA

はじめに

牛の改良を促進し、効率的増殖を進めるための受精卵移植については、近年急速に技術が進歩し、普及・実用化に向かって盛んに試験研究が行なわれている。受精卵移植は、いくつかの特殊な技術の組み合わせであり、主な技術としては、(1)一度に多数の卵子を生産するための過剰排卵処理、(2)供卵牛から受精卵を取り出す採卵技術、(3)取り出した受精卵の検査・保存技術、(4)受卵牛への移植技術、(5)供卵牛と受卵牛との発情同期化技術などがあげられるが、このうち過剰排卵処理と受精卵の保存、特に凍結保存技術については多くの問題点があり、未だ技術が確立されたとはいえない。

そこで、今回、過剰排卵処理に使用されるホルモン剤の種類による比較と、反復処理による影響を調査するとともに、受精卵の簡易な凍結方法として、超低温冷凍庫内でのアルコールによる凍結を検討したので報告する。

材料および方法

1. 供卵牛

供卵牛は、当部繋養のホルスタイン種8頭、黒毛和種7頭を用い、それぞれ12回と9回、延べ21回の過剰排卵処理を実施した。

2. 過剰排卵処理方法

発情日を0日目として、性周期の8～12日目に妊馬血清性腺刺激ホルモン(以下PMSGという)2,500IU～4,000IUを1回筋肉内注射するか、または、卵胞

刺激ホルモン(以下FSHという)を1日2回、3日間漸減法により総量28AU～40AUを皮下注射した。プロスタグランジンF_{2α}(以下PGF_{2α}という)は、ホルモン剤投与開始後48時間または56時間目に1～3回、全量で24～30mgを筋肉内注射した。

また、反復過剰排卵処理は、ホルスタイン種4頭と黒毛和種2頭の計6頭で実施した。

3. 発情および人工授精

発情鑑定は、1日3回の発情観察と、ヒートマウントディテクターの発色により鑑定し、スタンディング発情のみを発情と判定した。人工授精は原則として、スタンディング発情から8～16時間後に2本、24時間後に2本の計4本の凍結精液を子宮内に注入した。

4. 受卵牛および発情同期化处理

受卵牛は、すべて当部繋養のホルスタイン種を用い、自然発情または発情同期化处理により、供卵牛との性周期が同調(発情日差±1日以内)した未経産牛10頭、経産牛13頭に延べ31回の移植を実施した。

なお、発情同期化处理は、PGF_{2α}の12～18mgを2回または3回に分けて筋肉内注射する方法で実施した。

5. 採卵方法

最終授精後、6～8日目に子宮頸管経由法により採卵した。灌流液には10～20%非動化子牛血清加リンゲル液(CS・R液)500～1,000mlにペニシリン(300IU/ml)とストレプトマイシン(50μg/ml)を添加したもの、または、イーグルMEM500～1,000mlを用い、2way

バルーンカテーテルにより子宮角灌流を行なった。灌流した液は、500mlの液量計に受けて静置した。

6. 卵の検査

回収した灌流液は30分以上静置したのち、底の沈渣を駒込ピペットで吸引し、時計皿数枚に分けて実体顕微鏡下で卵検索を行なった。回収卵は基礎媒液(33%CS・R液または20%CS・PBI)に数回移しかえることにより洗浄した。その後、倒立顕微鏡下(100~400倍)で卵の発育および形態を観察し、A~Cランクに分類し、A、Bランクの胚を移植可能卵(正常卵)とした。

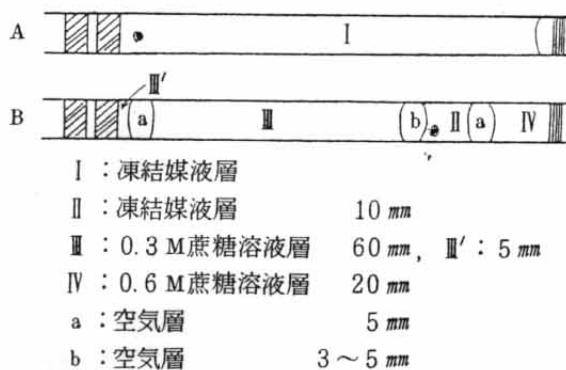
7. 移植方法

移植可能と判定した正常卵は、プラスチックのサヤを付けたカスーガンで黄体側子宮角へ頸管経由法により移植した。

8. 凍結方法

耐凍剤はグリセロールを用い、10%グリセロール加基礎媒液を凍結媒液とした。グリセロールの添加は室温において1~3段階で行ない、最終濃度での平衡時間は約30分とした。

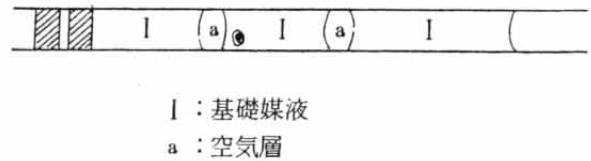
ストローは、0.25ml容凍結精液用プラスチックストローを主に使用し、ストロー内への各溶液の吸引は、凍結融解後のグリセロール除去の方法により第1図のような構成とした。まず、段階的グリセロール除去法では、凍結媒液とともに受精卵を吸引し第1図のAの構成とした。



第1図 ストロー内構成

凍結は、後藤ら¹⁾のアルコールと超低温冷凍庫を用いた方法を応用し、発泡スチロールで被ったプラスチックビーカーに純エタノール約500mlを入れ、このなかに受精卵を入れたストローを立て、-60℃に保持した超低温冷凍庫のなかに静置した。植氷は、あらかじめストロー内液をアルコール面より1部分出しておく方法で行ない、-36℃まで降下した時に(約150分)ストローを液体窒素に移し保存した。融解は、37~38℃の微温水中に直接浸

して行なった。グリセロールの除去は6段階で行ない、各濃度5分間隔、最終の基礎媒液で30分間浸漬した。その後、基礎媒液で数回洗浄し、移植用ストローに第2図の構成で吸引し移植に供した。



第2図 移植時のストロー内構成

一方、1段階ストロー内グリセロール除去法(以下1段階ストロー法という)では、砂川ら⁵⁾の方法に準じて第1図のBの構成とした。蔗糖液は、二次蒸留水で溶解して0.3Mおよび0.6Mの濃度に調整し、20%の割合で子牛血清を入れ、更にペニシリン(100IU/ml)を添加したものを用いた。受精卵の凍結は、プログラム・フリーザー(ダイサン:FFP190型)を用いた方法と、前述の超低温冷凍庫内でのアルコールによる凍結方法を検討した。

プログラム・フリーザーでの凍結は、ストローの線栓部を上にして、受精卵の位置より5cm上方で自動植氷できるようにセットした。冷却速度は室温から-6.5℃までを1.0℃/分とし、-6.5℃で10分間保持している間に自動植氷装置にて強制植氷を行なった。その後、-35℃までは0.3℃/分、-36℃まで0.1℃/分、-160℃まで6.0℃/分とし、-160℃から液体窒素に浸漬した。

また、超低温冷凍庫内でのアルコールによる凍結は、前述同様であるが、第3図に示したようにアルコールの液面を受精卵の位置から上方5cmとした。植氷は、ストロー内液がアルコール液面より15mmほど出ているのを利用し、自然植氷とした。1段階ストロー法における融解後の操作は、37~38℃の微温水で融解後ストローを取り出し、線栓部を持って2~3回振りおろし、凍結媒液と2層の蔗糖溶液を一度に混合した。空気層がすべて線栓部に集まったのを確認した後、線栓部を下方に向けて微温水中に約10分間浸漬放置した。その後、シール部分より約2cmの位置でストローを切除し、直接移植に供した。

成 績

1. 過剰排卵処理および採卵成績

供卵牛に対する初回過剰排卵処理および採卵成績を第1表、第2表に示した。処理頭数はPMSG処理10頭、FSH処理5頭で行なった。採卵時の直腸検査による推

定黄体数は、PMSG処理で1～17個、1頭平均8.5個、FSH処理では5～27個、1頭平均12.8個となり、個体差が大きいもののFSH処理で良好な反応がみられた。

また、残存卵胞はPMSG処理で10頭中6頭にみられ1頭平均1.2個であったが、FSH処理ではまったくみられなかった。PGF_{2α}による発情誘起は、24～30mgを1～3回で投与したが、いずれの方法でも明瞭なスタンディング発情がみられた。投与後の反応時間は、ホルスタイン種で平均52.8時間、黒毛和種で44.6時間となり、黒毛和種で早い傾向がみられた。

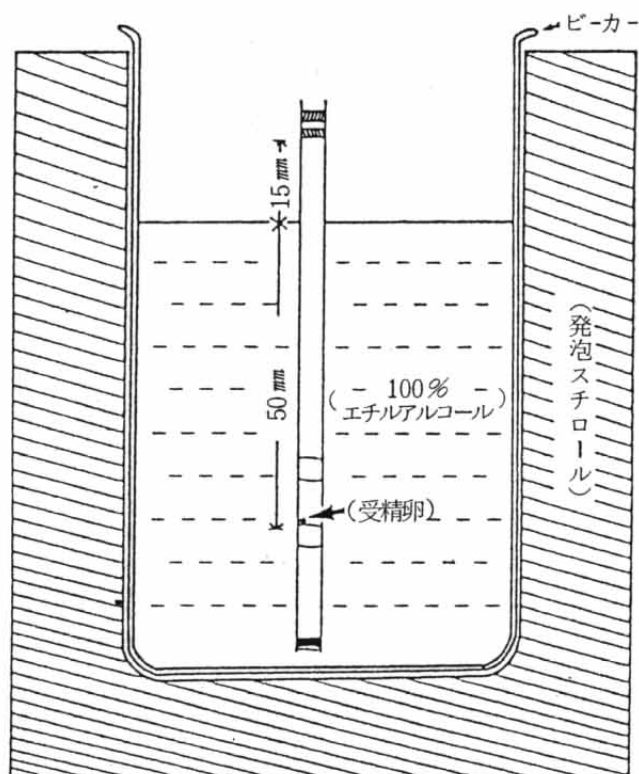
採卵成績は、全体で106個（1頭平均7.1個）が回収され、このうち正常卵は91個（1頭平均6.1個）、正常卵率85.8%であった。また、推定排卵数に対する回収率は71.1%であった。これをホルモン剤別に比較すると、PMSG処理では54個（1頭平均5.4個）が回収され、このうち正常卵は45個（1頭平均4.5個）、正常卵率が83.3%、回収率63.5%であった。一方、FSH処理では52個（1頭平均10.4個）が回収され、このうち正常卵が46個（1頭平均9.2個）、正常卵率88.5%、回収率81.3%となり、PMSG処理に比べFSH処理で良好な成績が得られた。

反復過剰排卵処理は、ホルスタイン種4頭、黒毛和種2頭で実施し、反復処理方法としてはホルモン剤の投与量を増すか、あるいは薬剤を変えて試験を行なった。成績は第3表、第4表に示した。処理間隔は70～325日とまちまちであるが、採卵時の推定黄体数は初回処理で7～27個（1頭平均14.3個）に対して、反復処理では3～18個（1頭平均9.2個）とやや減少したものの、いずれも良好な反応であった。また、PGF_{2α}による発情誘起は、初回および反復処理とも投与後40～60時間に明瞭なスタンディング発情がみられた。しかし、回収卵数の比較では、初回処理で1頭平均10.5個（回収率73.3%）に対し、反復処理では1頭平均4.5個（回収率49.1%）と少なく、反復処理での回収率の低さが大きく影響した。

一方、正常卵数は、初回処理で1頭平均8.8個（正常卵率84.1%）、反復処理では3.5個（正常卵率77.8%）となり、1頭当たりの正常卵数に差がみられるものの、正常卵率では差がなかった。

2. 回収卵の状況

初回過剰排卵処理における回収卵の発育ステージおよびランクは第5表のとおりで、後期桑実期～初期胚盤胞期の卵が全体の69.2%と最も多く回収され、胚盤胞期15.0%、拡大した胚盤胞期5.6%、16細胞以下3.7%、未受精2.8%の順であった。また、回収卵におけるAランク胚の割合は、桑実期25.0%（1/4）、後期桑実期46.3%（19/41）、初期胚盤胞期51.5%（17/33）、胚盤胞



第3図 1段階ストロー法でのアルコールによる凍結方法

期87.5%（14/16）、拡大した胚盤胞期100.0%（6/6）となり、発育ステージが進むほど高くなった。全体としては、Aランクは57個（53.2%）、Bランクは34個（31.8%）、Cランク16個（15.0%）となり、移植可能な正常卵は91個（85.0%）であった。これをホルモン剤の種類別に比較すると第6表のとおりで、PMSG処理では、Aランク25個（46.3%）、Bランク20個（37.0%）、Cランク9個（16.7%）となり、正常卵は45個（83.3%）であった。一方、FSH処理ではAランク32個（61.5%）、Bランク14個（26.9%）、Cランク6個（11.6%）であり、正常卵は46個（88.5%）となり、正常卵率に差はみられないが、Aランクのしめる割合はFSH処理で高かった。

次に、反復過剰排卵処理における回収卵を分類すると第7表のように、初回処理でAランク35個（55.5%）、Bランク18個（28.6%）、Cランク10個（15.9%）となり、正常卵は53個（84.1%）に対して、反復処理ではAランク9個（33.3%）、Bランク12個（44.5%）、Cラ

第1表 初回過剰排卵処理個体成績

薬剤及び 投与量	供 卵 牛			P G F ₂ α 投与			卵巢反応		採 卵 成 績		
	番号	品種	産歴	投与量	回数	反応時間	黄体	卵胞	回収卵	正常卵	変性卵
			産	mg	回	時間					
P M S G 2,500 IU	B-3	JB*	0	24	1	48	12	2	11	11	0
	B-4	JB	0	24	1	48	10	4	7	7	0
	B-5	JB	0	30	1	40	12	0	10	8	2
	B-6	JB	0	30	1	40	7	0	3	1	2
P M S G 3,000 IU	B-2	JB	0	24	1	48	4	3	2	1	1
	H-4	Hol	2	24	2	46	17	0	6	5	1
	H-5	Hol	7	24	2	73	1	3	1	1	0
	H-6	Hol	4	24	1	24	5	0	3	2	1
P M S G 3,500 IU	B-7	JB	0	30	3	40	5	4	4	4	0
P M S G 4,000 IU	B-1	JB	2	30	3	48	12	2	7	5	2
F S H 28 AU	H-1	Hol	5	27	2	46	7	0	5	4	1
F S H 30 AU	H-2	Hol	2	30	3	48	27	0	26	22	4
	H-3	Hol	5	24	2	70	5	0	5**	5	0
	H-7	Hol	6	30	3	60	11	0	9	9	0
F S H 40 AU	H-8	Hol	6	30	3	55	14	0	7	6	1

* JB：黒毛和種， Hol：ホルスタイン種

** 右側卵巢萎縮のため片側子宮角のみ回収

第2表 初回過剰排卵処理成績

区 分	処理頭数	検定黄体数 (1頭平均)	残存卵胞数 (1頭平均)	回収卵数 (1頭平均)	正常卵数 (1頭平均)	回 収 率 ($\frac{\text{回収卵数}}{\text{黄体数}}$)	正 常 卵 率 ($\frac{\text{正常卵数}}{\text{回収卵数}}$)
PMSG処理	10頭	85個 (8.5)	18個 (1.8)	54個 (5.4)	45個 (4.5)	63.5%	83.3%
F S H処理	5	64 (12.8)	0 (0.0)	52 (10.4)	46 (9.2)	81.3	88.5
計	15	149 (9.9)	18 (0.5)	106 (7.1)	91 (6.1)	71.1	85.8

第3表 反復過剰排卵処理個体成績

供 番号	卵 品種	牛 産歴	処理間隔	薬剤及び 投与量	P G F ₂ α投与		卵巢反応		採卵成績		
					投与量	反応	黄体	卵胞	回収卵	正常卵	変性卵
H-1	Hol*	5	—	FSH 28AU	27 ^{mg}	46 ^{時間}	7	0	5	4	1
			70	PMSG 4000IU	24	48	12	1	7	6	1
H-2	Hol	2	—	FSH 30AU	30	48	27	0	26	22	4
			325	PMSG 4000IU	30	45	18	1	7	5	2
H-4	Hol	2	—	PMSG 3000IU	24	46	17	0	6	5	1
			107	PMSG 4000IU	24	56	7	1	5	5	0
H-7	Hol	6	—	FSH 30AU	30	60	11	0	9	9	0
			189	FSH 36AU	30	60	7	0	5	3	2
B-1	JB	2	—	PMSG 4000IU	30	48	12	2	7	5	2
			145	PMSG 4000IU	30	60	8	2	1	0	1
B-5	JB	0	—	PMSG 2500IU	30	40	12	0	10	8	2
			123	PMSG 3000IU	30	47	3	3	2	2	0

* Hol : ホルスタイン種, JB : 黒毛和種

第4表 反復過剰排卵処理成績

区 分	処理頭数	推定黄体数 (1頭平均)	回収卵数 (1頭平均)	正常卵数 (1頭平均)	回 収 率 ($\frac{\text{回収卵数}}{\text{黄体数}}$)	正 常 卵 率 ($\frac{\text{正常卵数}}{\text{回収卵数}}$)
初回処理	6頭	86個 (14.3)	63個 (10.5)	53個 (8.8)	73.3%	84.1%
反復処理	6	55 (9.2)	27 (4.5)	21 (3.5)	49.1	77.8
計	12	141 (11.8)	90 (7.5)	74 (6.2)	63.8	82.2

第5表 初回過剰排卵処理における回収卵の発育ステージおよびランク

ステージ* 区分	未受精	16 cell以下	Morula	Late Morula	Early Blast	Blast	Exp Blast	計 (%)
卵数(%)	3 (2.8)	4 (3.7)	4 (3.7)	41 (38.3)	33 (30.9)	16 (15.0)	6 (5.6)	107 (100.0)
正常卵(%)			4 (4.4)	37 (40.6)	28 (30.8)	16 (17.6)	6 (6.6)	91 (85.0)
変性卵(%)	3 (18.8)	4 (25.0)		4 (25.0)	5 (31.2)			16 (15.0)
ラ** ン ク	A		1	19	17	14	6	57 (53.2)
	B		3	18	11	2		34 (31.8)
	C	3	4	4	5			16 (15.0)

* Morula : 桑実胚, Late Morula : 後期桑実胚, Early Blast : 初期胚盤胞
Blast : 胚盤胞, Exp Blast : 拡大した胚盤胞

** Aランク : 優良受精卵, 発育正常で形態異常なし
Bランク : 普通卵, 卵細胞に軽度の不均整
Cランク : 未受精卵及び不良卵, 著しい発育の遅れ, 形態異常や変性

第6表 初回過剰排卵処理における回収卵の分類

ランク 区分	A	B	C	計
PMSG処理 (%)	25 (46.3)	20 (37.0)	9 (16.7)	54
FSH処理 (%)	32 (61.5)	14 (26.9)	6 (11.6)	52
計 (%)	57 (53.8)	34 (32.1)	15 (14.1)	106 (100.0)

第7表 反復過剰排卵処理における回収卵の分類

ランク 区分	A	B	C	計
初回処理(%)	35 (55.5)	18 (28.6)	10 (15.9)	63
反復処理(%)	9 (33.3)	12 (44.5)	6 (22.2)	27
計 (%)	44 (48.9)	30 (33.3)	16 (17.8)	90 (100.0)

ランク6個(22.2%), 正常卵数21個(77.8%)となり, 正常卵率に差がないものの, Aランクのしめる割合は初回処理で高かった。

3. 移植成績

新鮮卵移植成績を第8表に示した。黒毛和種2頭より採取した初期胚盤胞期のAランク胚1個とBランク胚2個をホルスタイン種未経産牛3頭に各1個ずつ移植したところ, Aランク胚を移植した1頭が受胎・分娩した。産子は雄で, 生時体重23kg, 妊娠期間は285日であった。また, ホルスタイン種2頭より採取した後期桑実期～拡大した胚盤胞期のAランク胚2個とBランク胚2個をホルスタイン種経産牛4頭に各1個ずつ移植し, Aランク胚を移植した2頭が受胎・分娩した。産子はいずれも雄で, 生時体重は40kgと41kg, 妊娠期間は276日と277日であった。

凍結卵の移植成績は, 凍結融解後のグリセロール除去の方法と, 凍結方法により区分した。

凍結融解後, グリセロールを6段階で除去した後移植した成績を第9表に示した。黒毛和種より採取したAランク胚6個, Bランク胚4個を33～243日間凍結保存した後, ホルスタイン種5頭に各2卵移植したところ, 1頭が受胎・分娩した。産子は双子で生時体重35kgと23kgの雄であり, 1頭は逆子であった。次に, 34～361日間凍結保存したAランク胚9個をホルスタイン種9頭に各1卵ずつ移植したところ, 1頭の受胎・分娩例を得た。

また, 不受胎牛12頭のうち, 発情回帰が30日以上遅延したものが2卵移植で2頭, 1卵移植で3頭みられた。

この結果, グリセロールの6段階除去法での受胎率は,

第8表 新鮮卵移植成績

供卵牛		受卵牛			同期化		受精卵の分類		妊否	発情回 帰日数	産子	妊娠 期間
番号	品種*	番号	品種	産次	方法	日差	ステージ**	ランク				
B-1	JB	ホ-1	Hol	0 ^産	PGF ₂ α 12 mg	-1	Early Blast	A	+	- ^日	雄・23kg	285 ^日
		ホ-2	Hol	0	PGF ₂ α 12 mg	0	Early Blast	B	-	20	-	-
H-6	Hol	ホ-15	Hol	3	PGF ₂ α 18 mg	0	Late Morula	B	-	22	-	-
		ホ-16	Hol	1	自 然	0	Blast	B	-	19	-	-
H-2	Hol	ホ-22	Hol	5	PGF ₂ α 18 mg	0	Exp Blast	A	+	-	雄・40kg	276
		ホ-23	Hol	1	PGF ₂ α 18 mg	-1	Blast	A	+	-	雄・41kg	277
B-5	JB	ホ-34	Hol	0	PGF ₂ α 12 mg	+1	Early Blast	B	-	20	-	-

* Hol:ホルスタイン種, JB:黒毛和種

** Late Morula:後期桑実胚, Early Blast:初期胚盤胞, Blast:胚盤胞,
Exp Blast:拡大した胚盤胞

2卵移植で20.0% (1/5頭), 1卵移植で11.1% (1/9頭), 全体では14.3% (2/14頭)であった。

1段階ストロー法での直接移植成績は、凍結方法別に第10表に示した。黒毛和種より採取したた。Aランク胚5個, Bランク胚2個をプログラム・フリーザーを用いて凍結し, 13~75日間凍結保存した後, ホルスタイン種未経産牛7頭に移植したところ, Aランク胚で1頭, Bランク胚で2頭の計3頭が受胎・分娩し, 受胎率は42.9% (3/7頭)であった。また, 不受胎牛の1頭は, 発情回帰が58日間遅延した。

次に, 超低温冷凍庫内でアルコールにより凍結したホルスタイン種のAランク胚3個を, 9~222日間凍結保存した後, ホルスタイン種経産牛3頭に移植したところ, 3頭すべてが受胎・分娩し, 受胎率は100.0% (3/3頭)であった。

この結果, 1段階ストロー法による全体の成績は, 移植頭数10頭中6頭が受胎・分娩し, 受胎率は60.0%であった。

なお, 超低温冷凍庫を利用したアルコールによる1段階ストロー法での凍結は, 室温から-4.0℃まで0.5℃/分, その後-30℃まで0.2~0.3℃/分, -35℃近くでは0.1℃/分となり, やや緩慢な冷却速度であったが, 過冷却点から凍結点に至る潜熱の発生は1℃以下であった。

考 察

牛における過剰排卵処理は, 一般に供卵牛の黄体期9~14日目に性腺刺激ホルモンを投与し, 投与後48~72時間目にPGF₂ α が投与されている。しかし, 過剰排卵処理による卵巣反応は, 品種・ホルモンの種類と投与量, 反復処理間隔などに影響されるとともに, 個体差が大きく, 受精卵移植を実施するうえで大きな問題となっている。

このうち, ホルモンの処理については, 杉江⁴⁾, 鈴木ら⁷⁾, 内海⁸⁾によれば, PMSGよりFSH投与の方が良質な受精卵が数多く回収でき, さらに, FSHの等量投与より漸減投与の方が有効と報告されている。

今回の試験でも, 卵巣反応においてPMSG処理では平均8.5個の推定黄体数に対して, FSH処理では12.8個と多く, また, 残存卵胞もPMSG処理で平均1.2個に対して, FSH処理ではまったくみられないなど, FSH処理で良好な反応が得られた。PGF₂ α の投与による発情誘起について鈴木ら^{6), 7)}, 投与量より投与回数を増すことにより発情発現率が高まると報告しているが, 今回の成績では全頭に明瞭なスタンディング発情がみられ, 投与量や投与回数による差は認められなかった。しかし, 品種別では, 投与後の反応時間において黒毛和種がホルスタイン種より早く反応する傾向がみられた。

過剰排卵処理による受精卵の回収は, 供卵牛1頭当たり少なくとも3個以上の正常卵を回収しないとその意味がないとされている。今回の成績では, PMSG処理で

第9表 凍結卵移植成績（耐凍剤の6段階除去法）

受 卵 牛			日差	受 精 卵 の 分 類				妊否	発情回 帰日数	産子	備考
番号	品種*	産次		凍結日数	移植卵数	ステージ**	ランク				
ホ-9	Hol	5 ^産	0 ^日	243 ^日	2	Early Blast	A・A	-	47 ^日		発情遅延
ホ-10	Hol	0	-1	33	2	Blast Morula	A・B	-	34		"
ホ-11	Hol	1	0	34	2	Late Morula	A・A	+		雄・雄	双子分娩
ホ-12	Hol	1	0	34	1	"	A	-	22		
ホ-13	Hol	0	0	34	1	"	A	-	18		
ホ-14	Hol	0	0	52	1	Early Blast	A	-	19		
ホ-17	Hol	1	+1	73	1	Blast	A	-	22		
ホ-18	Hol	7	0	295	1	Early Blast	A	-	26		
ホ-19	Hol	4	0	298	1	"	A	-	71		発情遅延
ホ-20	Hol	2	+1	301	1	"	A	-	30		"
ホ-24	Hol	7	+1	130	2	Late Morula	A・B	-	24		
ホ-25	Hol	1	0	136	1	"	A	+		雄	
ホ-26	Hol	2	0	34	2	Early Blast	B・B	-	23		
ホ-27	Hol	3	0	361	1	Late Morula	A	-	43		発情遅延

* Hol：ホルスタイン種

** Morula：桑実胚, Late Morula：後期桑実胚

Blast：胚盤胞, Early Blast：初期胚盤胞

1頭平均4.5個、FSH処理で9.2個、全体では6.1個が回収され、PMSG処理でやや少ないものの、一応の成果が得られた。

反復過剰排卵処理は、鈴木ら⁷⁾の報告では初回の処理で良好な成績の得られた牛は、その後の処理でも良好な反応を示すとされ、また、金川²⁾、杉江⁴⁾、内海⁸⁾によれば、2回目の処理は40～80日後、3回目は100日以上の間隔をおいて実施するのが良いと報告されている。

今回反復処理した牛は、初回処理で卵巣反応が良く、正常卵を5個以上回収した6頭について、処理間隔70～325日で実施した。反復処理による卵巣反応は1頭平均9.2個の黄体が認められ、初回処理の14.3個よりは少ないが良好な反応であった。しかし、回収卵数および正常卵数の比較では、初回処理の1頭平均10.5個、8.8個に比べ、反復処理では4.5個、3.5個と半減した。この原因

としては、正常卵率に差がないことから反復処理での回収率の低さ、特に採卵技術に問題があったと考えられた。

回収卵の発育ステージは金川³⁾、杉江⁴⁾の報告と一致し、後期桑実期から胚盤胞期を中心に回収された。なお、16細胞以下のものも回収されたが、すべてCランクとし、移植には供しなかった。

ホルモン剤の種類別の比較では、杉江⁴⁾によればFSHを用いるとPMSGにくらべ排卵数は減少するが、比較的揃った良質な受精卵が回収できると報告している。今回の成績では正常卵率に差がなかったが、排卵数および正常卵におけるAランクのしめる割合はともにFSH処理で高かった。また、反復処理における回収卵の分類では、正常卵率に差がないものの、Aランクのしめる割合は初回処理で高かった。

移植成績は、新鮮卵の移植において7頭中3頭が受胎

第10表 凍結卵移植成績（1段階ストロー法による直接移植）

凍結方法	受 卵 牛		日 差	受 精 卵 の 分 類			妊 否	発情回 帰日数	産 子	受胎率(%)
	番号	産次		凍結日数	ステージ*	ランク				
プログラム・ フリーザー	ホ-29	0 ^産	0 ^日	30 ^日	Blast	A	+	- ^日	雌	42.9 (3/7)
	ホ-30	0	0	30	Early Blast	A	-	19	-	
	ホ-32	0	-1	58	Blast	A	-	18	-	
	ホ-33	0	0	66	Early Blast	B	+	-	雌	
	ホ-34	0	-1	75	Late Morula	B	+	-	雌	
	ホ-36	0	0	13	Blast	A	-	58	-	
	ホ-37	0	0	13	Blast	A	-	19	-	
アルコール	ホ-28	1	-1	9	Early Blast	A	+	-	雌	100.0 (3/3)
	ホ-31	1	0	11	Late Morula	A	+	-	雄	
	ホ-38	1	-1	222	Early Blast	A	+	-	雌	

* Late Morula : 後期桑実胚, Early Blast : 初期胚盤胞, Blast : 胚盤胞

し、受胎率42.9%であった。移植卵は、後期桑実期から拡大した胚盤胞期のAランク胚3個、Bランク胚4個を供したが、このうち受胎したのはAランク胚の移植例だけで、Bランク胚の移植では受胎例が得られなかった。

このことから、胚のランク分け、特にBランク胚とCランク胚の区分をきびしくする必要があると考えられた。

凍結卵の移植においては、凍結融解後グリセロールを6段階で除去する方法での受胎率が14.3% (2/14頭) と低率であった。この原因として、融解後のグリセロール除去に時間がかかり、この間の温度管理や無菌操作に問題があったことや、融解後の胚の生存性判定がうまくいったことなどが受胎率を低下させたと考えられた。

1段階ストロー法による牛受精卵の凍結は、農家の庭先で融解し、直接移植できるため、実用化に向けての最も有効な技術として注目されている。この方法は、凍結に用いられた同一ストロー内で蔗糖溶液により融解直後の受精卵からグリセロールを除去するものであるが、凍結媒液、蔗糖溶液の濃度およびストロー内構成がいまだに統一されていない。今回、我々が試みた方法は、0.3 Mと0.6 M蔗糖溶液を1本のストロー内に装填したもので、融解後は凍結媒液層と2層の蔗糖溶液層を同時に混合するため、操作が非常に簡便であった。この方法で砂

川ら⁹⁾は62.5% (5/8頭) の高い受胎率を報告しており、我々の成績でも60.0% (6/10頭) と同様に高い受胎率が得られた。このことは、砂川らが推察しているように、融解後に受精卵に加わる浸透圧変化が、高濃度な蔗糖溶液から受精卵と等張な蔗糖溶液に移行するなかで緩やかに進行するため、浸透圧ショックが少なく、高い受胎率が得られたものと考えられた。

凍結方法の検討では、プログラム・フリーザーでの凍結処理で受胎率が42.9%とやや低率であった。この原因としては、受卵牛がすべて未経産牛で子宮頸管への移植器具挿入の難しい牛が多く、出血を伴った牛が2頭あり、これら移植操作のミスが影響していると考えられた。一方、超低温冷凍庫内でのアルコールによる凍結では、やや緩慢な冷却速度であったが、過冷却点から凍結点に至る潜熱の発生が1℃以下と小さく、滑らかな曲線が得られ、この方法で凍結した胚を3頭のホルスタイン種経産牛に移植したところ全頭が受胎した。このことから、超低温冷凍庫内でのアルコールによる凍結方法は、1段階ストロー法においても利用できることがわかり、今後さらに例数を増すとともに、アルコール容量、断熱材の厚さ、庫内温度を検討し実用化をはかりたい。

要 約

牛の受精卵移植における過剰排卵処理と、受精卵の簡易な凍結方法として、超低温冷凍庫内でのアルコールによる凍結を検討し、次の結果を得た。

1. 供卵牛として、ホルスタイン種8頭、黒毛和種7頭に延べ21回の過剰排卵処理を行なった。初回処理の結果は、平均推定黄体数9.9個、平均回収卵数7.1個、平均正常卵数6.1個であり、回収率71.1%、正常卵率85.8%であった。ホルモン剤別では、推定黄体数、回収卵数、正常卵数、回収率ともFSH処理がPMSG処理を上回ったが、正常卵率に差はなかった。

また、初回処理と反復処理では、推定黄体数や正常卵率に大きな差がないものの、反復処理での回収率が低く、回収卵数、正常卵数が初回処理とくらべ少なかった。

2. 新鮮卵移植はAランク胚3個とBランク胚4個を各々1卵移植したところ、Aランク胚を移植した3頭が受胎・分娩し、受胎率は42.9% (3/7頭) であった。

3. 受精卵を超低温冷凍庫内でアルコールにより凍結し、融解後のグリセロール除去を6段階で行なった場合の受胎率は、2卵移植で20.0% (1/5頭)、1卵移植で11.1% (1/9頭)、全体で14.3% (2/14頭) となり、2分娩で双子を含む3頭の産子が得られた。

4. 0.3Mと0.6M濃度の蔗糖溶液を1本のストロー内に装填した1段階ストロー法による直接移植により、10頭中6頭が受胎・分娩し、60.0%の受胎率が得られた。このうち、プログラム・フリーザーで凍結した胚の移植で

は7頭中3頭が受胎し、受胎率42.9%、超低温冷凍庫内でアルコールにより凍結した胚では、移植した3頭すべてが受胎し、受胎率100.0%であった。

このことから、超低温冷凍庫内でのアルコールによる凍結方法は、1段階ストロー法においても利用できることがわかった。

引用文献

- 1) 後藤太一ら (1984) : 超低温冷凍庫を用いた牛胚の凍結とその成績, 哺乳卵研誌1 (1), 99~101
- 2) 金川弘司 (1980) : 牛受精卵移植 (人工妊娠) の技術とその実際, 畜産の研究34 (8), 54~58
- 3) 金川弘司 (1984) : 牛の受精卵移植 近代出版
- 4) 杉江信 (1978) : 牛の受精卵 (胚) 移植 (I), 日獣会誌37 (7), 421~430
- 5) 砂川政広ら (1985) : 牛凍結受精卵の1段階ストロー法による直接移植試験, 群馬農業研究 C畜産第2号, 7~11
- 6) 鈴木達行ら (1985) : PGF_{2α}の分割投与がウシの過剰排卵に与える影響, 家畜繁殖会誌31 (4), 216~217
- 7) 鈴木達行ら (1986) : 和牛に対するFSHによる過剰排卵処理試験, 畜産の研究40 (1), 18~22
- 8) 内海恭三 (1985) : 牛の受精卵移植と関連諸問題について, 肉用牛研究会報35, 12~30

SUMMARY

Superovulations were induced by either PMSG or FSH in 8 Holstein cows and 7 Japanese Black cows.

At the first treatment, the mean number of corpus luteums, recovered embryos and normal embryos were 9.9, 7.1 and 6.1. The recovery embryo rate and the normal embryo rate were 71.1% and 85.8%.

The mean number of corpus luteums, recovered embryos and normal embryos, and the rate of recovery embryo in FSH treated cows were superior to those of PMSG treated cows. However, there was no significant difference in the rate of normal embryo between FSH and PMSG treated cows.

The repeatedly treated 6 cows were inferior to the first treated in the mean number of recovered embryos and normal embryos.

Each fresh embryo in A-ranked of 3 and B-ranked of 4 was nonsurgically transferred to seven Holstein cows. Therefore, 3 recipients were pregnant and 3 calves were born.

The pregnancy rate of frozen embryos by Step Wise method was 14.3% (2/14).

On the other hand, those of frozen embryos by One Step Straw method was 60% (6/10).

The pregnancy rate was 42.9% (3/7) When the embryos were frozen in the program freezer and

plunged in liquid nitrogen.

Three of the 3 embryos, which were frozen in the ultra low temperature refrigerator and plunged in liquid nitrogen, were conceived.

We got 8 calves from the frozen embryos.