

牛胚移植における回収正常胚数及び発育段階の受胎率への影響

村田宏之・井上 貢*・田島敏夫

Influence of Collected Transferable Embryo Number and It's Growth Stage
on Bovine Embryo Transfer in Conception Rate

Hiroyuki MURATA, Mitsugu INOUE * and Toshio TAJIMA

要 約

採卵毎の回収正常胚数及び発育段階と受胎率の関係について、ホルスタイン種未経産牛 961 頭に実施した黒毛和種体内受精凍結胚移植成績をとりまとめ、同時期に行った新鮮胚移植と比較検討した。得られた結果は以下のとおりである。

1. 採卵毎の回収正常胚数を、1 ~ 6 個、7 ~ 12 個、13 ~ 18 個および 19 個以上区の 4 区に分類し、それぞれの区の受胎率を比較した。凍結胚移植では回収正常胚数の増加に伴い受胎率が低下する傾向が見られ、7 ~ 12 個区と 19 個以上区で有意な差が認められた。これは、採卵毎の正常胚数の多少がその後の処理時間の長短となり、受胎率へ影響したものと推察された。
2. 胚の発育段階を後期桑実胚・初期胚盤胞・胚盤胞及び拡張胚盤胞の 4 区に分類しそれぞれの受胎率を比較した。凍結胚移植では発育段階が進むほど受胎率が低下し、後期桑実胚区・初期胚盤胞区と胚盤胞区に有意な差が見られたが、新鮮胚移植では区間に差は見られなかった。これは凍結胚移植において、耐凍剤をエチレングリコール単独で使用した場合、後期桑実胚、初期胚盤胞が胚盤胞、拡張胚盤胞に比べて受胎率が高いという報告⁵⁾⁷⁾と同様であった。

緒 言

千葉県内における胚移植は、黒毛和種やホルスタイン種に過剰排卵処置を施し、発情後 7 日目に胚を回収した後、発情が一致したホルスタイン種受胎牛に移植し、新鮮胚では 50%以上の受胎率を得ている。しかし回収胚と受胎牛に過不足が生じることが多く、一部の胚は凍結保存胚として移植せざるを得ないが、新鮮胚と同程度の受胎率が求められている。そこで凍結胚の受胎率を、新鮮胚の受胎率 50 ~ 60%に近づけるため、採卵毎の回収正常胚数及び発育段階と受胎率の関係について検討した。

材料及び方法

調査は、当センター市原乳牛研究所で実施したホルスタイン種未経産牛 961 頭の胚移植成績を使用した。

1. 調査期間

1997 ~ 2001 年度の 5 年間とした。

2. 移植胚

当所繋養の黒毛和種に過剰排卵処理後、発情後 7 日目に非外科的に回収し、倒立顕微鏡下で、変性部位 10%以下を A、10 ~ 30%を B、30 ~ 50%を C、50%以上を D とする胚のランク付けを行った。胚の凍結には A ランク胚を用い、新鮮胚移植には A 及び B ランク胚を用いた。凍結融解法はダイレクト・トランスファー法であり、耐凍剤は 1.8 M エチレングリコール (牛胚移植用凍結保存液: 機能性ペプチド研究所) を用いた。

3. 受胎牛

群管理された 14 ~ 15 カ月齢、体重 350 kg 前後のホルスタイン種 (当所第 48 ~ 57 期受託牛) を対象に、自然発情あるいは同期化処置による発情後 6 ~ 8 日目に黄体検査し、千葉県畜産総合研究センターの分類¹⁾

平成 20 年 8 月 31 日受付

* 現千葉県農林水産部畜産課

によるA, A1, B, B1と評価した牛の中から選定した。これに前述の凍結胚または新鮮胚を頸管経由法により移植した。

4. 調査項目

調査項目は凍結胚移植における、採卵毎の回収正常胚数及び胚の発育段階と受胎率の関係を調査し、同時期に行った新鮮胚移植成績と比較検討した。

1) 回収正常胚数

今回調査した平均回収正常胚数は1頭あたり約6.9であった。そこで採卵毎の回収正常胚数による影響を見るため、1～6個(平均以下)、7～12個(平均よりやや上)、13～18個(平均の約2倍)及び19個以上(平均の約3倍以上)区の4区に分類して受胎率を比較した。

2) 胚の発育段階

発情後7日目の採卵であることから後期桑実胚・初期胚盤胞が多数を占めたが、胚盤胞・拡張胚盤胞も少ないながら混在した。そこでこれらの発育段階を後期桑実胚・初期胚盤胞・胚盤胞及び拡張胚盤胞の4区に分類しそれぞれの受胎率を比較した。

5. 統計処理

Yatesの修正をしたカイ2乗検定を用いた²⁾。

結果及び考察

1. 回収正常胚数別受胎率

表1に回収正常胚数別受胎率を示した。凍結胚移植では回収正常胚数の増加に伴い1～6個区37.8%、7～12個区37.6%、13～18個区36.4%および19個以上区25.4%と低下し、7～12個区と19個以上区で有意な差が見られた。新鮮胚移植は、検索・洗浄・選別・評価・ストローへの充填・移植器への装填の手順により行われているが、凍結胚においては、回収後、検索・洗浄・選別・評価・耐凍剤の添加・平衡・ストローへの充填・プログラムフリーザーへのセット・凍結となり、新鮮胚移植と比較すると更に多くの手順が加わる。新鮮胚・凍結胚いずれにしてもこれらの手順は、回収正常胚数が多い場合その後の処理に時間を要することになる。これらから今回の結果は、採卵毎の正常胚数の多少がその後の処理時間の長短となり、受胎率へ影響したものと推察された。胚を体外で長時間培養することは、生体外で活性酸素障害をうける³⁾といわれ、また、胚回収から耐凍剤の平衡開始までの時間と受胎率との関係については、時間の経過に従い受胎率が低下する報告^{4) 6)}があることから、回収から凍結処理開始までの時間はできる限り短時間で行うことが重要であり、今回の結果も同様な傾向であった。また、耐凍剤の平衡時間と受胎率の間には一定の傾向はみられないという報告^{4) 5) 6)}はあるが、ウシ胚の凍結マニュアル(独立行政法人家畜改良センター)では平衡時間

表1 回収正常胚数別受胎率

| 回収正常胚数 | 凍結胚移植 | | | 新鮮胚移植 | | |
|--------|-------|------|-------|-------|------|------|
| | 移植頭数 | 受胎頭数 | 受胎率% | 移植頭数 | 受胎頭数 | 受胎率% |
| 1～6 | 98 | 37 | 37.8 | 161 | 96 | 59.6 |
| 7～12 | 178 | 67 | 37.6a | 140 | 76 | 54.3 |
| 13～18 | 132 | 48 | 36.4 | 90 | 46 | 51.1 |
| 19以上 | 114 | 29 | 25.4b | 48 | 22 | 45.8 |

異符号間に有意差(小文字:p < 0.05)

は15分が推奨されていることから、胚の総処理時間を短縮することは重要であり、特に凍結胚においては効率的な処理の検討が必要と考えられた。

2. 胚の発育段階別受胎率

表2に胚の発育段階別受胎率を示した。凍結胚移植においては後期桑実胚41.4%、初期胚盤胞が36.2%、胚盤胞21.5%および拡張胚盤胞15.4%と発育段階が進むほど受胎率が低下し、後期桑実胚区・初期胚盤胞区と胚盤胞区に有意な差が見られたが、新鮮胚移植においては差はなかった。これは凍結胚移植において、耐凍剤をエチレングリコール単独で使用した場合、後期桑実胚、初期胚盤胞が胚盤胞、拡張胚盤胞に比べて受胎率が高いという報告^{5) 7)}と同様であった。また、吉羽らはエチレングリコール単独では同様であるが、耐凍剤にシュークロースを添加した場合、発育段階別に差がなかったと報告⁶⁾している。胚の発育過程においては容積の増大、胞胚腔の形成、栄養膜細胞の分化などの変化があり、それぞれに最適な凍結条件が異なることが考えられることから、今後更に耐凍剤等の検討が必要と思われた。

表2 胚の発育段階別受胎率

| 発育段階 | 凍結胚移植 | | | 新鮮胚移植 | | |
|-------|-------|------|--------|-------|------|------|
| | 移植頭数 | 受胎頭数 | 受胎率% | 移植頭数 | 受胎頭数 | 受胎率% |
| 後期桑実胚 | 203 | 84 | 41.4A | 236 | 126 | 53.4 |
| 初期胚盤胞 | 199 | 72 | 36.2a | 152 | 90 | 59.2 |
| 胚盤胞 | 107 | 23 | 21.5Bb | 49 | 24 | 49.0 |
| 拡張胚盤胞 | 13 | 2 | 15.4 | 2 | 0 | 0 |

異符号間に有意差(大文字:p < 0.1, 小文字:p < 0.05)

引用文献

- 1) 村田宏之・神山佳三・井上貢・田島敏夫・原康弘・千葉耕司(2007) 千葉畜産研報 7: 9-12
- 2) 吉田実(1978) 畜産を中心とする実験計画法: 207-208
- 3) 西貝正彦.1997. 家畜診療. 403: 3-13
- 4) 日本家畜人工授精師協会(2001) 家畜人工授精講習会テキスト(家畜受精卵移植編).181-188,226-230
- 5) 堂地修・山本裕介・嵯峨久光・吉羽宣明・加納直人・前田淳一・宮田幸路・山内昭・富永敬一郎・小田頼政・中島達彦・猪八重悟(1996) 畜産技術: 497.2-11
- 6) 吉羽宣明(2006) E T ニュースレター. 30.11-17
- 7) 坂本秀樹・本多巖・菅野美樹夫・篠木忠(2004) 福島畜試研報: 12.3-7