

黒毛和種供胚牛の年齢と発情後7日目回収胚の発育ステージの関係

坂元克弥・村田宏之・山下秀幸・佐藤敦男*¹・石田和昭*²

Relationship Between Developmental Stages of Embryos Collected on Day 7 after Estrus and the Age of Donor Cow in Japanese Black

Katsuya SAKAMOTO, Hiroyuki MURATA, Hideyuki YAMASHITA, Atsuo SATO *¹
and Kazuaki ISHIDA *²

要 約

2006年度から千葉県肉牛生産農業協同組合を事業主体として実施した「県産和牛ブランド化推進事業」について、2009年度までの4か年、延べ87頭の採胚成績を供胚牛の年齢の観点から分析した。

採胚成績では、1採胚当たりの回収胚数（以下、平均回収胚数）が16.7個、1採胚当たりの正常胚数（以下、平均正常胚数）が9.0個で、全国的な成績（平均回収胚数：13.5個、平均正常胚数：8.2個、2008年度の全国体内受精卵移植実施状況）を上回った。

供胚牛の年齢と採胚成績について分析した結果では、平均回収胚数及び正常胚率は年齢が上昇すると低下し、11歳を超えると正常胚率は50%を下回った。また、凍結保存が可能なAまたはBランク胚の1採胚当たりの回収数（以下、平均AB胚数）は4.5個となった。

供胚牛の年齢と発情確認後7日目に回収した胚の発育ステージの関係では、回収した正常胚に発育ステージに応じた発育係数を設定し、採胚毎の平均発育係数を求めて採胚の発育値として計算したところ、供胚牛の年齢と発育値に負の相関が確認（ $P < 0.01$ ）され、回帰式 $y = -0.0778x + 7.0036$ ($R^2 = 0.2528$) が得られた。

以上のことから、黒毛和種では11歳未満の牛を供胚牛として選抜することが効率的な採胚を行う上で重要であることが確認された。

また、供胚牛の年齢と胚の発育ステージの関係では、同じ7日目の採胚であっても若い供胚牛からは発育の進んだ胚盤胞が、高齢な供胚牛からは発育の遅れた後期桑実胚が回収される傾向が確認され、胚回収後の新鮮胚移植や凍結保存処理を計画的に実施するためには、採胚を計画する上で供胚牛の年齢を考慮することが必要であることが示唆された。

緒 言

牛の胚移植技術における採胚では、良質な胚をいかに多く回収するかが重要な課題である。しかし、採胚の対象となる供胚牛は遺伝的に優れた能力を有することが明らかな個体を選抜して用いるため、産次の進んだ高齢な牛が使用されることが多い。一般的に牛の繁殖成績は年齢の上昇とともに低下すると考えられ、黒毛和種供胚牛の採胚成績に及ぼす産次と年齢の影響については、5～

6産をピークに低下することが報告されている¹⁾。

そこで、2006年度から千葉県肉牛生産農業協同組合（以下、肉牛生産農協）を事業主体として県内優良黒毛和種繁殖雌牛の増頭を目的に行われた「県産和牛ブランド化推進事業」（以下、「ブランド事業」）について、2009年度までの4か年の採胚成績を分析し、供胚牛の年齢と採胚成績及び回収した胚の発育ステージについて検討した。

材料及び方法

1. 採胚成績

分析には、2006年4月から2010年3月までに「ブランド事業」で実施した延べ87頭の採胚成績を用いた。

平成23年8月31日受付

*¹千葉県農業共済組合連合会北部家畜診療所

*²元千葉県肉牛生産農業協同組合

採胚を行った供胚牛は、本事業の要領に基づき育種価で選抜された県内農家繋養の黒毛和種雌牛であった。採胚は千葉県農業共済組合連合会（以下、ちばNOSAI連）の獣医師が行い、事前の繁殖検診で採胚の可否を確認した。

多排卵処置及び採胚の手法については採胚担当者の判断としたが、ほとんどが「採胚の手引き」²⁾に基づき計画されていた。その方法は、卵胞刺激ホルモン（以下、FSH）を朝夕2回、3日間、合計18～20アーマー単位（AU）を漸減投与し、FSH投与開始3日目にプロスタグランジンF2α（以下、PGF2α）を合計4～6ml、朝夕2回投与する方法である。PGF2α投与後48時間目に発情を確認し、その約12時間後に1回の人工授精を行っていた。使用した精液は、供胚牛の血統を考慮し肉牛生産農協が購入した民間あるいは家畜改良事業団の精液を用いた。採胚は、発情確認後7日目（一部は6または8日目）にバルーンカテーテルを用い農家の庭先、一部はちばNOSAI連診療所の手術室で非外科的に行った。

回収した子宮頸流液は、畜産総合研究センター（生産技術部、嶺岡乳牛研究所）あるいはちばNOSAI連北部家畜診療所に持ち込み、胚の検索、鑑別及び処理を行った。胚の鑑別は限定した数名の熟練者が「採胚の手引き」及び家畜人工授精師講習会テキスト（受精卵移植編）³⁾に基づき行った。胚のランク分けでは、A（変性割合0%）、A'（同10%以下）、B（同10～30%）、C（同30～50%）、D（同50%以上）及び未受精の6ランクとしたが、「ブランド事業」では集計時にA、A'をAとして集計した。また、A、A'、B、Cを正常胚、Dを変性胚と判定したが、「ブランド事業」では、A、A'、Bのランクの胚のみを事業の対象胚と

した。

2. 調査方法

分析には、採胚計画時に担当獣医師が作成した「和牛の採胚計画表」、胚の鑑別時に作成した「牛胚形態記録表」、胚の形態記録写真及び肉牛生産農協が管理している本事業の採胚・移植記録データを用いた。

3. 年齢階層

供胚牛の年齢は、血統登録書の生年月日と採胚年月日から計算した。また、全国和牛登録協会が2005年度に調べた繁殖成績から、平均初産分娩年齢と平均分娩間隔の値を用いて標準的な産次と年齢の関係を計算し、表1に示したようなAからGの7つの年齢階層を作成した。

4. 発育係数と発育値

各採胚で回収された胚の発育状況を知るため、独自に採胚の発育値を設定した。発育値は、表2に示した胚の発育ステージ別発育係数と各採胚で回収した発育ステージ別正常胚数から、1回の採胚における発育係数の平均値を計算して求めた。ただし、発情日から採胚までの日数で胚の発育は異なるため、7日目に行われた採胚のみを対象として発育値を計算した。

5. 統計分析

採卵成績から回収胚数、正常胚数等の基本統計量を求めた。供胚牛の年齢と発育値の相関では、発育値の分布が正規分布とみなせなかったため、スピアマン順位相関係数検定⁴⁾により検討した。また回帰分析では、年齢を説明変数、発育値を目的変数として回帰分析を行った。

結 果

1. 採胚成績

表3に4か年の採胚成績を示した。延べ87頭の採胚を実施し、1,453個の胚を回収した。うち780個が正常胚で正常胚率は53.7%であった。1採胚当たりの回収胚数（以下、平均回収胚数）は16.7個、1採胚当たりの正常胚数（以下、平均正常胚数）は9.0個であった。また、凍結保存が可能なA及びBランク胚の1採胚当たりの合計胚数（以下、平均AB胚数）は7.1個であった。

2. 供胚牛の年齢階層分布

表4に採胚を行った87頭について、年齢階層別の頭数を示した。また、採胚を行った87頭のうち、7日目以外に採胚を行っていた6頭及び正常胚の回収がなかった9頭を除く72頭について、年齢階層別の割合

表1 年齢階層

年齢階層	年齢 (才)	推定産次
A	0.0 ~ 2.0	未経産
B	2.0 ~ 4.3	1 ~ 2
C	4.3 ~ 6.5	3 ~ 4
D	6.5 ~ 8.7	5 ~ 6
E	8.7 ~ 11.0	7 ~ 8
F	11.0 ~ 13.2	9 ~ 10
G	13.2 ~	11 ~

平成17年度全国和牛登録協会

初産月齢：24.6ヶ月

平均分娩間隔：13.4ヶ月

表2 胚の発育ステージと発育係数

ステージ	桑実胚	後期桑実胚	早期胚盤胞	胚盤胞	拡張期胚盤胞	脱出期胚盤胞	脱出胚盤胞
	M	CM	EB	Bl	Exp.Bl	Hi.Bl	Hd.Bl
発育係数	5.5	6	6.5	7	7.5	8	8.5

表3 採胚成績

のべ頭数 (頭) *	回収胚数 (個)	正常胚数 (個)			変性・不受精胚 (個)			正常胚率		
		A**	B	C	変性	不受精	計			
87	総数	1453	435	185	160	780	375	298	673	53.7%
	1採胚当たり	16.7	5.0	2.1	1.8	9.0	4.3	3.4	7.7	

* 回収数が0個の9頭を含む

** A及びA'の合計

坂元ら：黒毛和種供胚牛の年齢と発情後7日目回収胚の発育ステージの関係

表4 年齢階層と採胚頭数

年齢階層	採胚頭数(頭)	7日目に正常胚が回収された	
		頭数(頭)	割合(%)
A	0	0	0.0%
B	4	3	4.2%
C	15	11	15.3%
D	19	16	22.2%
E	26	25	34.7%
F	19	16	22.2%
G	4	1	1.4%
計	87	72	100.0%

を示した。最も頭数の多かった階層はE階層(8.7～11歳:7～8産)で、全体の約3分の1を占めていた。また、11歳を超えるF～G階層でも採胚が多く実施されており全体の20%以上を占めていた。

3. 年齢階層別採胚成績

年齢階層別の採胚成績を図1に示した。平均回収胚数、平均正常胚数、平均AB胚数を棒グラフで、正常胚率と変性胚率(不受精を含む)を折れ線で示した。

D階層(6.5～8.7歳)が平均回収胚数21.7個、平均正常胚数13.6個、平均AB胚数10.8個で最も優れた成績であった。またこの階層では正常胚率が62.5%とB階層の67.6%に次ぐ成績であった。これより年齢の高い階層では、年齢の上昇とともに採胚成績は低下、

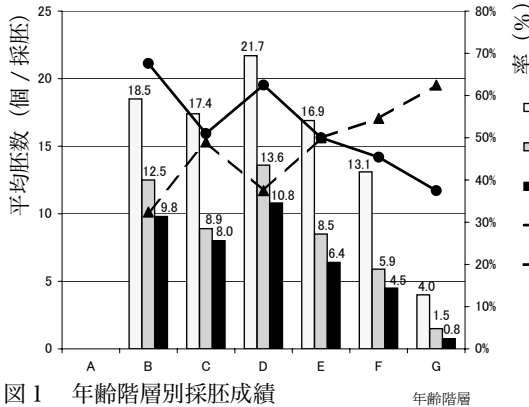


図1 年齢階層別採胚成績

表5 供胚牛の年齢と各採胚の発育値

No.	年齢	発育値	No.	年齢	発育値	No.	年齢	発育値	No.	年齢	発育値
1	8.00	6.50	21	7.92	6.39	41	10.23	6.94	61	5.48	6.56
2	8.32	6.15	22	11.25	6.13	42	5.97	7.30	62	7.61	6.17
3	10.73	6.82	23	8.04	6.50	43	11.30	6.14	63	5.27	6.46
4	10.88	6.11	24	12.10	6.94	44	11.96	6.00	64	9.03	6.00
5	10.76	6.28	25	2.86	6.90	45	9.41	6.00	65	8.62	6.00
6	3.28	7.33	26	6.19	6.95	46	11.29	6.67	66	5.40	6.71
7	11.92	6.00	27	11.35	6.31	47	10.15	6.00	67	5.54	6.67
8	10.82	6.00	28	8.91	6.25	48	10.23	6.12	68	10.80	6.06
9	10.50	6.08	29	5.69	6.60	49	7.70	6.10	69	5.53	6.63
10	8.73	6.00	30	10.06	6.00	50	11.32	6.00	70	6.35	6.00
11	8.84	6.13	31	7.93	6.56	51	7.44	6.62	71	9.27	6.33
12	10.03	6.50	32	14.76	6.17	52	11.48	5.50	72	5.87	6.00
13	11.07	6.25	33	9.76	5.83	53	9.68	6.09			
14	9.93	6.50	34	3.43	7.15	54	11.42	5.50			
15	8.90	6.00	35	7.44	6.11	55	7.69	6.67			
16	11.88	6.00	36	7.40	6.00	56	7.61	6.08			
17	12.01	6.43	37	10.96	6.00	57	13.15	6.14			
18	7.79	6.38	38	12.04	6.13	58	12.29	6.00	平均	9.00	6.30
19	5.93	6.00	39	10.37	6.13	59	7.43	6.10	最高	14.76	7.33
20	7.30	7.22	40	8.82	6.44	60	10.48	6.18	最低	2.86	5.50

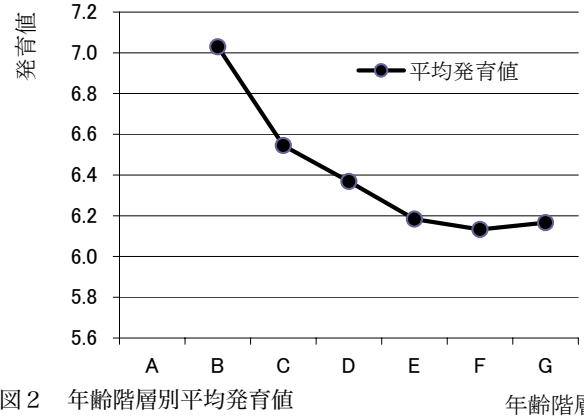


図2 年齢階層別平均発育値

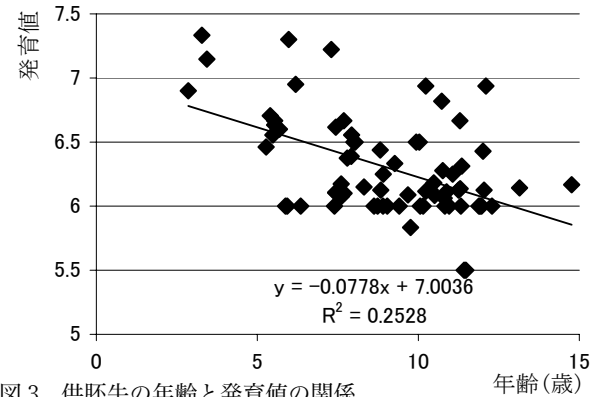


図3 供胚牛の年齢と発育値の関係

F階層では平均AB胚数が4.5個で5個を下回り、正常胚率も45.4%と変性胚率より低くなった。

4. 供胚牛の年齢と発育値

発育値が計算できた計72頭の採胚時年齢と発育値を表5に示した。年齢の平均値は9.00歳、最も若い個体が2.86歳、最高齢は14.76歳であった。また発育値の平均は6.30、最低及び最高値は5.50と7.33であった。

年齢階層別に集計した平均発育値を図2に示した。若いB階層では7.03、また年齢の進んだE階層では6.18であった。BからEの間は年齢階層の上昇とともに

に発育値は低下した。

供胚牛の年齢と発育値の関係を図3に示した。両者の相関について検討するためスピアマンの順位相関係数の検定を行った。その結果、供胚牛の年齢と発育値には負の相関が認められた ($p < 0.01$)。また、年齢を説明変数、発育値を目的変数として回帰分析を行ったところ、 $y = -0.0778x + 7.0036$ ($R^2 = 0.2528$) の回帰式が得られた。

考 察

1. 採胚成績

2008年度の全国調査(全国牛体内受精卵移植実施状況)における肉用種の採胚成績は、平均回収胚数13.5個、平均正常胚数8.2個である。一方、今回の「ブランド事業」の採胚成績は、平均回収胚数16.7個、平均正常胚数9.0個、平均AB胚数7.1個で、全国調査の成績に比べ高い成績であった。本事業の移植成績⁵⁾(受胎率42.8%)を考慮して試算すると、1回の採胚で約3頭の子牛が生産されたことになる。これは、黒毛和種の平均分娩間隔が13.4か月であることを考えると、供胚牛の優良な遺伝能力を受け継いだ産子が3.3年分生産されたことになり、供胚牛自身も採胚後正常に受胎している⁵⁾ことから、胚移植技術を利用した改良・増殖効果は、人工授精だけの場合に比べ3倍以上効率的であった。

2. 年齢階層別分布

供胚牛の平均年齢が9.0歳で、年齢階層別分布では採胚を実施したうちの約3分の1がE階層(8.7～11.0歳)で比較的高齢な牛を対象とした採胚であったことが確認された。これは、供胚牛の選抜が育種価(脂肪交雑:A、枝肉重量:B以上)⁵⁾により行われていたため、産子の肥育成績が必要であったためである。併せて、黒毛和種は乳用牛に比べかなり高齢まで繁殖機能が維持されていることも推察できた。平成21年度酪農全国基礎調査結果の乳用牛の廃用時平均産次数が4.0産⁶⁾であることから推測すると、6～7歳が乳用牛の平均廃用年齢と思われる。これに対し今回の黒毛和種供胚牛では、10歳前後まで十分採胚ができていたことから、10歳を超えても繁殖能力は十分維持されていると考えられた。

3. 年齢階層別採胚成績

年齢を7つの階層に分け採胚成績を検討した結果では、年齢階層が上昇すると平均回収胚数、平均正常胚数ともに低下する傾向であった。小西らは黒毛和種における産次の採胚成績に対する影響について検討しており、未経産牛の採胚成績は低く産次の進行とともに上昇し、5産で平均回収胚数、6産で正常胚数がピークとなる¹⁾としている。また、産次あるいは年齢が採胚成績に影響する大きな要因であるとも報告している。今回の結果では、推定5～6産次の供胚牛で平均

回収胚数、平均正常胚数とも最も高く、これよりも産次が進むと低下する傾向がみられており小西らの報告と一致した。

多排卵処置を伴う採胚では、1回の採胚で回収した胚から複数の産子が得られなければ胚移植技術を利用する効果があったとは考えにくい。胚移植の受胎率を45%と仮定した試算では、受胎率45%が期待できる優良胚(AまたはBランク)を5個以上移植しなければ2頭以上の産子は得られない。このためには、AまたはBランクの胚が5個以上回収できる採胚を行う必要があり、年齢階層別の採胚成績からE階層より若い、つまり11歳未満の牛を供胚牛として選抜することが重要と考えられた。

4. 供胚牛の年齢と発育値

「ブランド事業」における採胚では、幅広い年齢の供胚牛について採胚が行われていた。我々は、胚の鑑別作業を行っていくなかで、供胚牛の年齢によって回収した胚の発育状況に差があることを経験していた。胚の発育状況は、新鮮胚移植や凍結保存等の胚処理を行う上で重要な要因で、発育ステージとして形態学的に分類されている^{2,3)}。通常、発育ステージの鑑別は経験者により行われており、個々の胚については評価を行っていても1回の採胚で得られた胚全体の評価は行われていない。今回、独自に胚の発育ステージに対し発育係数を設定し、採胚ごとのステージ別回収胚数から発育値を計算して数値化して検討したところ、採胚全体の胚の発育傾向を知ることができた。

採胚の発育値を指標に採胚成績を分析した結果では、通常5～6日目に回収される桑実胚や8日目以降に回収される拡張期胚盤胞^{2,3)}が7日目の採胚でも回収されることが確認された。

また、本事業では初期の移植成績で胚盤胞期以降の凍結胚の受胎成績が後期桑実胚より低かったことから、採胚では後期桑実胚から初期胚盤胞のステージの胚を回収する方針としていた。72頭の平均発育値が6.30であったことは、後期桑実胚から初期胚盤胞の胚が中心に回収されていたことを示し、本事業で用いた採胚の処置プログラムにより、後期桑実胚から初期胚盤胞を主に回収できることが確認できた。併せて、同じ処置プログラムでも幅広いステージの胚が回収されることが確認されたことから、今後はさらに精度を高めて回収胚のステージをコントロールする必要がある。

また、年齢階層別の発育値の分析により供胚牛の年齢と発育値に一定の関係があることが推察されたことから、詳細な年齢と発育値について相関及び回帰分析を行ったところ、両者の間に負の相関があることが確認された。これは、同じ7日目の採胚でも供胚牛の年齢により、高齢牛からは桑実胚から後期桑実胚の比較的若い胚が、若齢牛では発育の進んだ胚盤胞から拡張

期胚盤胞が回収される傾向があることを示している。

牛では、排卵の時期に発情終了後2～26時間と大きな幅があるとされている⁷⁾。また排卵は、発情終了後平均12時間であるが、発情の持続時間は個体により2～30時間(平均15時間)と幅があり、その要因のひとつに産次もあげられている⁸⁾ことから、高齢牛では排卵のタイミングが若齢牛に比べ0.5から1日遅く、採胚までの胚の発育に要する時間が短くなるため、発育ステージの若い胚が回収されると思われる。その他の可能性としては、高齢牛の卵子から形成された胚の発育スピードそのものが遅いことも考えられる。これらについては、今回の分析では明らかにできなかったため今後検討する必要がある。

以上の結果から、供胚牛の年齢を考慮することにより採胚で回収される胚の発育ステージがある程度予測することができ、受胚牛の同期化処理の微調整や凍結処理方法の選択に役立てられると考えられた。特に、胚の性判別を用いた雌雄生み分けでは、判別可能な胚のステージが限られるため、供胚牛の年齢を考慮して多排卵処置を調整することにより、性判別可能な胚の回収数をより多くすることが可能になると考えられる。

引用文献

- 1) 小西一之・鈴木一男 (1994)、J.Reprod.Dev.40:13-17
- 2) ちばNOSAI連臨床研修センター受精卵移植・人工授精技術向上グループ・監修千葉県畜産総合研究センター (2006)、採卵の手引き :4-9,24-31
- 3) 日本人工授精師協会 (2001)、家畜人工授精師講習会テキスト (受精卵移植編) :167-176、170-172
- 4) 柳井久江 (2009)、4Steps エクセル統計、(株)オーエムエス出版 :41-45、157-170、171-178
- 5) 千葉県肉牛生産農業協同組合 (2011)、県産和牛ブランド化推進事業成績書 :11、12-14、26
- 6) 中央酪農会議 (2010)、平成21年度酪農全国基礎調査結果報告書 :27
- 7) 日本人工授精師協会 (1998)、家畜人工授精師講習会テキスト (受精卵移植編) :180-182
- 8) 河田啓一郎・浜名克己 (1988)、獣医繁殖・産科学、文永堂出版 :13 - 14