

鹿児島大学農学部附属農場の黒毛和種における 採卵および受胎成績に及ぼす諸要因

柳田宏一・紙屋 茂・花田博之・谷本保幸*・後藤和文*・中西喜彦*

(1993年9月20日受理)

Factors Influencing Embryo Collection and Pregnancy Rate of Japanese Black Cows in the Experimental Farm of Kagoshima University

Kōichi YANAGITA, Shigeru KAMIYA, Hiroyuki HANADA, Yasuyuki TANIMOTO,
Kazufumi GOTO and Yoshihiko NAKANISHI

緒 言

肉用牛における胚移植は、産肉能力の高い系統を急速に増加させ、改良速度を高めるために有効であるとされている⁸⁾。採卵行程では、採取される胚の数や質に個体差があり²⁰⁾、年齢^{5, 9)}、FSH投与開始日¹⁴⁾、PG投与方法²⁾、反復処理回数¹³⁾、ホルモンの種類¹⁾、季節¹⁸⁾、栄養状態^{6, 16)}および内分泌状態^{3, 6)}などの影響が示唆されている。更に、受胎牛の受胎性においても、血液性状²⁰⁾、ビタミン^{4, 19, 20)}および血中ホルモン濃度^{7, 10, 20, 21)}などの影響が示唆されており、技術要因は多岐にわたっている。従って、供卵牛および受胎牛の飼育管理を含む採卵から移植に関する技術レベルが高くない場合には、肉用牛経営では人工授精より大幅にコスト高になり、経営を圧迫する可能性があることも指摘されている⁸⁾。このため、胚移植を肉用牛経営に組み入れる場合、個々の経営内への胚移植技術の有効な組み入れ方を含めての採卵と移植技術の向上が重要である。

そこで本研究は本学附属農場学内畜産部と同入来牧場との連携により、採卵および移植を開始した1986年から1992年までの間の採卵成績および受胎牛の受胎成績を検討し、これらに対する個体、年度および処理方法の違いについて明らかにしようとした。

材料と方法

供胎牛は入来牧場で放牧飼養していた産肉性の高い黒毛和種雌牛を学内畜産部へ移し、舎飼とした。受胎牛は1988年から1991年の間は供胎牛と同様な飼養を行ない、胚移植後に受胎が確認されたものを入来牧場へ移し放牧飼養したが、1992年には入来牧場で移植を行った。学内飼養期間中の飼料給与は、1日当たりケーントップ不断給与、ヘイキューブ2 kg給与とし、繁殖用の配合飼料は牛のBody condition scoreに応じて0.5~1 kgの範囲内で調節し給与した。

過剰排卵処置はFHS漸減(総量18A.U. 3日間 朝夕)ープロスタグランジンーアナログ法により行った。FSHはLH含量の少ない製品(アントリンR)を用いた。各供胎牛ともスタンディング発

*家畜繁殖学研究室

情後9～14日目に過剰排卵処置を行ない、処置3日後にPGF 2α （エストラメイト）を朝夕1.5mlずつ筋肉内に投与した。PGF 2α 投与後2日目にスタンディングまたは粘液発情確認後、ほぼ12時間間隔で凍結精液を左右の子宮角に注入した。また、一部の個体には初回人工授精時にLH-RH（コンセラール）を200 μ g投与し、排卵を誘起した。

採卵は発情後6～8日目にバルーンカテーテルを用い、非外科的に行った。採卵用の灌流液はリンゲル液(500ml)中に抗生物質500 μ l（ペニシリンG20万単位+ストレプトマイシン0.2g/2ml）、フェノールレッド500 μ lおよび血清5mlを加えたものを使用した。

採卵前に5～10mlの塩酸リドカインにより尾椎硬膜外に麻酔を行い、直腸の運動を停止させた。バルーンカテーテルの先端を子宮角内に挿入後、注射筒で15～20ccの空気を注入し、バルーンを膨らませて子宮角に固定した。灌流は左右の子宮角について、それぞれ500mlの灌流液を数回に分けて灌流した。灌流液はメスシリンダーに回収し、検卵まで35 $^{\circ}$ Cの微温水中で保温した。

回収液をフィルターで濾過し、3～5枚のシャーレ（直径90mm）に分け、倒立顕微鏡下で胚を検索した。検索後の胚はm-PBS（修正リン酸緩衝液）の入ったシャーレ（直径35mm）に移し、室温で保持した。胚の判定はKuzan¹⁹⁾の分類に基づいて分類（A, A', B, B', C, C', D）し、Dランク卵は未受精、変性および発育遅延卵として凍結しなかった。

胚の凍結は年度により3種の異なる耐凍剤を含むm-PBSを用い、30～60分以内にストローに封入した。凍結は0 $^{\circ}$ Cに保持したアルコールバス式プログラムフリーザー（ET-1）のアルコールバス中にストローをセットし、1 $^{\circ}$ C/分で-7 $^{\circ}$ Cまで冷却後、植氷を行い15分間保持した。その後-7 $^{\circ}$ Cから-30 $^{\circ}$ Cまで0.3 $^{\circ}$ C/分で温度を下げ、同温で10分間保持した後、液体窒素中に投入し保存した。

受胎牛の発情を確認し、その後7～9日目に黄体の良否や共存卵胞の有無にかかわらず、凍結胚を融解し、尾椎硬膜外麻酔後に移植した。妊娠診断は超音波妊娠診断装置を用い、30～60日目に行った。

結果と考察

採卵成績に及ぼす年度の違いをTable 1に示した。合計処理頭数79頭中反応不良牛は5頭であった。推定黄体数は1986年から1987年に少なく、その後、年度の経過に伴って増加する傾向が認められ、1990年が最も多い黄体数が認められた。回収卵数は推定黄体数にほぼ対応して年度の経過に伴って増加する傾向を示した。移植可能胚数は年度の経過に伴って増加する傾向は示したが、1989年に平均5.5個を示した以降は増加の傾向は見られなかった。未受精卵は推定黄体数の変動にほぼ対応した変動が認められ、特に推定黄体数や回収卵数が増加した1990年には未受精卵数も最も高い値を示した。残存卵胞数、変性卵数および発育遅延卵数には年度間で有意な差は認められなかった。

1987年から1988年における採卵成績は、研究に取り組んで間もない時期であり、過剰排卵処置や採卵などの技術の影響が大きいと考えられた。1990年には推定黄体数、回収卵数および未受精卵数が有意に増加したが、移植可能胚数は平均3.6個になった。採卵数および移植可能胚数を同時に増加させる観点から、その原因を今後追求する必要があると考えられた。

採卵に関する技術が安定した1992年における、2回ずつ採卵された5頭の供卵牛の回収卵数、移植可能胚数、未受精卵数および発育遅延胚数の違いをTable 2に示した。回収卵数は個体間で有意な差が認められたが、移植可能卵数では個体間で有意な差は認められなかった。採卵数の多い供卵牛は移植可能胚数が多い傾向が認められ、1回目の採卵で移植可能胚数が多いと、2回目の採卵で

第1表 採卵成績に及ぼす年度の影響

Table 1. Effects of year on embryo collection from beef donors

項目 Items	年 Year						
	1986 ⁽¹⁾	1987 ⁽¹⁾	1988 ⁽¹⁾	1989 ⁽¹⁾	1990 ⁽¹⁾	1991 ⁽¹⁾	1992 ⁽¹⁾
処理頭数 No. of superovulated donors	2	15	16	11	12	10	13
採卵頭数 No. of donors collected embryos	2	15	14	11	11	9	12
推定黄体数 No. of estimated corpus luteums	10.5±1.1 ^{b(2)}	11.3±1.4 ^b	14.0±1.8 ^{ab}	13.2±2.7 ^{ab}	21.4±4.1 ^a	16.1±3.5 ^{ab}	16.8±2.1 ^a
残存卵胞数 No. of nonovulated follicles	0	1.0±0.8	1.1±0.3	0.5±0.4	0.9±0.4	1.0±0.5	0.7±0.3
回収胚数 No. of collected embryos	4.0±2.1 ^c	4.0±0.9 ^c	6.8±2.0 ^{bc}	8.7±2.8 ^{abc}	16.7±3.4 ^a	10.1±3.5 ^{abc}	11.8±2.7 ^{abc}
移植可能胚数 No. of transferable embryos	3.5±1.8 ^{ab}	1.6±0.5 ^b	3.4±1.1 ^{ab}	5.5±1.6 ^a	3.6±1.2 ^{ab}	3.2±0.9 ^{ab}	5.5±1.5 ^a
未受精卵数 No. of unfertilized eggs	0	1.7±0.8 ^{ab}	2.5±1.9 ^{ab}	1.0±0.4 ^b	10.2±4.1 ^a	3.7±2.1 ^{ab}	3.9±1.8 ^{ab}
変性胚数 No. of degenerating embryos	0	0.5±0.3	0.6±0.3	0.7±0.4	1.7±0.6	1.9±1.0	2.1±0.7
發育遅延胚数 No. of retarded embryos	0.5±0.4	0.2±0.1	0.2±0.2	0.3±0.2	0.9±0.6	1.2±0.5	0.3±0.2

(1) 列間の異符号はダンカンの多重検定法により5%水準で有意差があることを示す。

Means within a row not followed by the same superscripts differ significantly by Duncan's multiple range test at 5% level.

(2) 平均値±標準偏差

Mean ± Standard deviation

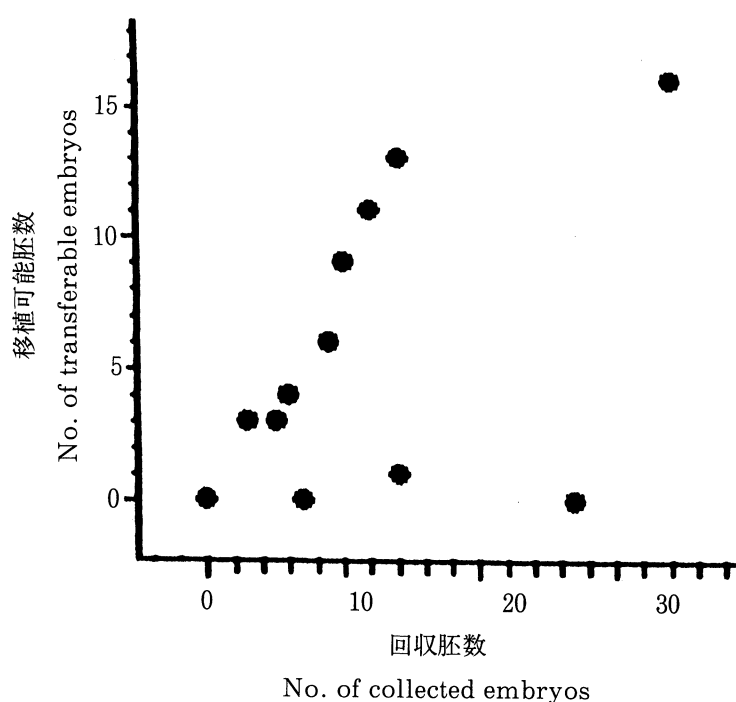
第2表 供卵牛による回収胚, 移植可能胚, 未受精卵, 変性卵および發育遅延胚数の違い

Table 2. Differences in the total number of recovered embryos, transferable embryos, unfertilized eggs, degenerating embryos and retarded embryos

供胚牛 Donor	回収胚数 Recovered embryo		移植可能胚数 Transferable embryo		未受精卵数 Unfertilized egg		変性卵数 Degenerating embryo		發育遅延胚数 Retarded embryo	
	1回目 First	2回目 Second	1回目 First	2回目 Second	1回目 First	2回目 Second	1回目 First	2回目 Second	1回目 First	2回目 Second
1481	7	12	0	11	5	1	2	0	0	0
39	5	0	3	0	1	0	1	0	0	0
1854	27	34	0	16	21	8	6	7	0	3
1453	14	9	13	6	0	0	1	3	0	0
1580	10	3	9	3	1	0	0	0	0	0
平均 Average	12.6	11.6	5.0	7.2	5.6	1.8	2.0	2.0	0	0.6

は移植可能胚数が少なくなる傾向も認められた。また、1回目の採胚で未受精卵や変性卵数が多いと、2回目の採胚では移植可能胚が多くなる傾向も認められた。このように回収卵および移植可能胚数は個体差が大きく、効率的な採卵を行うためには、回収卵および移植可能卵数の多い個体の選定あるいは供胚牛の生理的なステージの選定等や飼養管理を厳密に行う必要があることが推察された。また、経営的な側面から、過剰排卵処理に対する反応が低い個体については、人工授精等により受胎させ、経営全体の生産性を低下させない対応が不可欠であると考えられた。

Fig. 1に1992年における回収卵数と移植可能卵数の関係を示した。回収卵数と移植可能卵数には

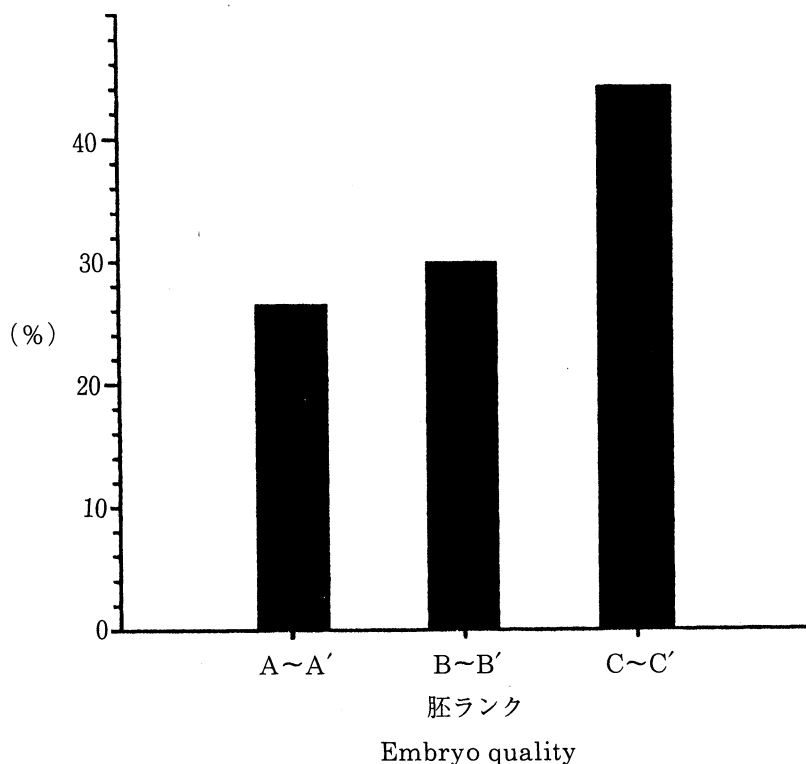


第1図 回収卵数と移植可能胚数との関係

Fig. 1. Relationship between the number of embryos and the number of transferable embryos

相関関係 ($r=0.485^*$) が認められ、回収卵数が多いと移植可能卵数も多くなる傾向を示した。しかし、相関係数は小さく、回収卵が多くても、移植卵数は0～1個の範囲に留まる個体も認められた。また回収卵数が少なく、移植可能卵数も少ない個体もあり、平均移植可能胚数の低下の原因はこれらのことに起因していると考えられた。

Fig. 2に1992年に採卵された胚の凍結前の胚のランクの割合を示した。1992年にはFSH製剤の中でLH含量の少ないアントリンRを用いたために、移植可能胚数は幾分増加したと思われた。しかし、A～B'ランク胚よりC～C'ランクの胚の割合が多く認められた。著者ら²⁰⁾は受胎牛の受胎率はA～B'ランクの胚では、胚ランク間で有意な差が認められないことを明らかにした。しかし、C～C'ランクの胚の割合がなお高いことは、効率的な採卵および受胎性の観点から問題であると考えられた。



第2図 凍結前胚数ランクの出現割合

Fig. 2. Quality of embryos before freezing

一般に、良好な採卵成績を得るには採卵日の β -カロチン濃度が $200\mu\text{g}/\text{dl}$ 以上が必要であると言われている。丸尾ら¹⁵⁾は総コレステロール濃度の高い個体で卵巣反応が良いことを報告している。また、柿崎ら¹¹⁾は過剰排卵処置前のGOT値が 100karumen 単位以上の供卵牛で採卵数が多くなることを報告している。これまで、本学での供胚牛は、入来牧場での周年放牧形態で飼養されている黒毛和種雌牛の中から産肉性の高い牛を選定し、学内農場の畜産部で舎飼形態での飼養に移し、発情回帰を待って採卵試験に供してきた。このため飼養形態が大幅に異なる環境への供胚牛の適応に長期間を要し、また、採卵成績不良牛の用途変更の困難性等も加わり、本学のシステムは牛の生理と経営的な対応が一致せず問題の多いシステムであった。このため、採卵試験全体にさまざまな影響を及ぼしたことが推察された。従って、今後供胚牛の飼養法を含め、採卵成績を更に向上させる方策を検討することが必要であると考えられた。

Table 3 に受胎成績に及ぼす年度の違いを示した。受胚牛の受胎率は年度間および耐凍剤間で違いが認められ、1989年には、試験開始2年目であったにもかかわらず、3ステップ法で47.1%の比較的良好な受胎成績を示した。また、1991年には移植頭数は少なかったが、耐凍剤にエチレングリコールを用いて100%の受胎率を示した。1992年においては、耐凍剤に1.6M 1, 2-プロパンジオール+0.2M スクロースを用いて50%の受胎率を得たが、入来牧場での周年放牧および舎飼形態での飼養牛について発情同期化し、移植した成績も加わったため、全体の受胎率は、30.1%で低い値を示した。その原因は、受胚牛として発情徴候が不明確であったもの、卵巣内に卵胞が残っているものおよび黄体の形成が不完全なものも用いたこと等が推察された。その中で、受胎牛はGOT値が正常の範囲内にあり、A/G比が高く、 β -カロチン濃度が正常値内の下限値程度を示した²⁰⁾。従っ

第3表 年度別受胎成績

Table. 3. Pregnancy rates of recipients each year

年度 Year	凍結法 Freezing method	受胎胚数 No. of recipients	受胎牛数 (%) No. of pregnant cows (%)
1988	G. ¹⁾	22	6 (27.3)
1989	G. ¹⁾	17	8 (47.1)
1990	G. ¹⁾	7	2 (28.6)
	G. + T. ²⁾	10	3 (30.0)
	Total	17	5 (29.4)
1991	P. + S. ³⁾	2	0 (0)
	E.G. ⁴⁾	3	3 (100.0)
	Total	5	3 (60.0)
1992	G. + T. ²⁾	5	1 (20.0)
	P. + S. ³⁾	5	1 (50.0)
	E.G. ⁴⁾	29	8 (27.6)
	Total	42	13 (31.0)

1) 1.36M グリセリン

1.36M Glycerol

2) 1.36M グリセリン + 0.25M トレハロース

1.36M Glycerol + 0.25M Trehalose

3) 1.6M 1, 2-プロパンジオール + 0.2M シュクロース

1.6M 1, 2-Propandiol + 0.2M Sucrose

4) 1.8M エチレングリコール

1.8M Ethylene glycol

て、今後受胎牛の受胎率を高めるためには、飼養環境の整備、飼料内容の検討、発情の確認および移植時点での黄体や子宮の状態から判断した受胎牛の厳密な選定等が重要であることが推察された。

摘 要

受精卵移植における採卵および移植成績を向上させるための基礎資料を得るため、鹿児島大学農学部附属農場における1986年から1992年の間に採卵した延べ74頭の採卵成績および受胎牛103頭の受胎成績を分析した。

得られた結果は次の通りである。

1. 回収卵数および移植可能胚数は年次が進むにつれて向上し、移植可能胚数は1989年に平均5.5個となり、その後ほぼ安定した傾向を示した。
2. 回収卵数には個体間で有意な差が認められ、その結果移植可能胚数も個体差が認められた。
3. 回収卵数と移植可能卵数には正の相関関係 ($r=0.485^*$) が認められたが、回収卵数が多くても、移植可能卵数が増加しない個体も認められた。
4. 回収卵でC~C' ランクの胚が42%認められた。
5. 受胎牛の受胎率は年度間および耐凍剤間で違いが認められた。

文 献

- 1) 堂地 修・今井 敬・高倉宏輔：LHを除去した高度精製FSHによる牛の過剰排卵処置. 第84回日本畜産学会大会発表要旨, 76 (1991).
- 2) Donaldson, L.E. : The effect of prostaglandin F2 α -treatments in superovulated cattle on estrus response and embryo production. *Theriogenology*, 20, 279-285 (1983).
- 3) 江副幹太・後藤和文・加治佐修・中西喜彦・小川清彦・柳田宏一・田崎道弘・猪八重悟・立山昌一・太田 均・山田一郎・長谷川善久：黒毛和種供卵牛における血漿中の性腺刺激ホルモン, 卵巣ステロイドホルモンおよびインヒビン濃度と採卵成績との関係. 日畜会報, 61, 683-689 (1990).
- 4) Folman, Y., Ascarelli, I. Kraus, D. and Barash, H. : Advers effect of β -carotene in diet on fertility of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 70, 357-366 (1987).
- 5) Garcia-Winder, M., Lewis, P.H. Bryner, R.W. Baker, R.D. Inskeep, E.K. and Butcher P.L. : Effect of age and norgestomet on endocrine paramaters and production of embryos in superovulated beef cows. *J. Anim. Sci.*, 66,1974-1981 (1988).
- 6) Goto, K., Nakanishi, Y., Ohkutu, S., Ogawa, K., Tasaki, M., Ohta, H., Inohae, S., Tateyama S. and Kawabata, T. : Plasma progesterone profiles and embryo quality in superovulated Japanese Black Cattle. *Theriogenology*. 27, 819-826 (1987).
- 7) 後藤太一・佐々木浩輔・井上 準・吉田 敏・岩住安晃・青柳敬人：牛胚移植におけるプロジェステロン濃度測定の利用. 第76回家畜繁殖学会講演要旨, 88 (1989).
- 8) Hafez, E.S.E. : Embryo transfer, IVF and genetic engineering. In "*Reproduction in farm animals*". (Ed.) Hafez, E.S.E., Lea and Febiger. Philadelphia, 528-570 (1985).
- 9) Hasler, J.F., A.D. Mc Cavley, W.F. Lathrop and R.H. Foote : Superovulatory responses of Holstein cows. *Theriogenology*, 19, 83-99 (1983).
- 10) Hasler, J.F., Bowen, R.A. Nelson, L.D. and Seidel G.E.Jr. : Serum progesterone concentrations in cows receiving embryo transfer. *J. Reprod. Fert.*, 58, 71-77 (1980).
- 11) 柿崎正博・伊藤格郎：E.T. 供卵牛の血液生化学的性状について. 臨床獣医, 8, 74-79 (1990).
- 12) Kuzan, F.B. : Classification of embryos prior to freezing. Colorado State University, Fort Collins Co., 38-49 (1986).
- 13) Lamberson, W.R. and Lamberth, V.A. : Repeatability of response to superovulation in Brangus cows. *Theriogenology*, 26, 643-659 (1980).
- 14) Lindsell, C.E., Mvrphy, B.D. and Mapletoft, R.J. : Superovulatory and endocrine responses in heifers treated with FSH-P at different stages of the estrus csycle. *Theriogenology*, 26, 209-219 (1986).
- 15) 丸尾善之・沢田 勉・稲葉俊夫・小西一之・斉藤則夫・森 純一：黒毛和種供卵牛の過剰排卵処置前後の血漿中コレステロール濃度と卵巣反応. 日畜会報, 58, 711-713 (1987).
- 16) 中西喜彦・加治佐修・江副幹太・後藤和文・田崎道弘・太田 均・猪八重悟・立山昌一・川端 孟・小川清彦：黒毛和種供卵牛の種々の血液成分と卵質の関係. 日畜会報, 61, 683-689 (1990).

