

胚移植技術を応用した「1年1産1採胚」技術の確立

有安亮代・小田頼政・小田 亘・山本康廣・塚本章夫

Technical establishment which carries out delivery and one flashing in one year applying embryo transfer technology

akiyo ARIYASU, yorimasa ODA, wataru ODA, yasuhiko YAMAMOTO and akio TUKAMOTO

要 約

黒毛和種において分娩後の生理的空胎期間を活用した胚確保とその後の早期人工授精実施による「1年1産1採胚」技術について検討した。

- 1 分娩後CIDR装着までに初回排卵が認められる率は、早期親子分離区の方が自然哺乳区よりも有意に高率であった。
- 2 過剰排卵処理前の卵巣の超音波診断画像では、両区とも80%以上の牛に大卵胞が認められたが、総採卵数に影響を認めなかった。
- 3 分娩後30日処理区において、分娩後52日目の採胚で平均約4個の正常胚が採取できた。
- 4 子牛の飼育管理方式では自然哺乳区において分娩後85日までの受胎率が60%であった。

以上のことから回収卵の正常胚率を向上させる技術検討が残されたものの飼育方式を考慮する事により胚移植技術を応用した「1年1産1採胚」技術の可能性が示唆された。

キーワード： 採胚、1年1産、繁殖和牛

緒 言

和牛繁殖農家の経営向上にとって1年1産の達成は重要な課題である。また、遺伝的に優れ、改良が期待できる牛を効率よく生産するためには、胚移植技術の活用が有効であるが、一般的な多回の採胚は中小規模農家にとって分娩間隔の延長などの理由から活用が困難であるのが現状である。そこで分娩後初回人工授精までの期間を利用して1年1産のサイクルを崩すことなく採胚を行う方法を確立することを試みた。

また、子牛の飼育管理方式としては親に哺乳させる自然哺乳と人工哺乳する早期親子分離方式があるため、それぞれの飼育方式別の1年1産1採胚技術の実用性についても併せて検討した。

材料及び方法

1 供試牛

当センター繫養の黒毛和種経産牛（1～7産）36頭を供試した。

2 試験区の設定

藪上ら¹⁾は、持続性黄体ホルモン製剤（以下CIDRという、イージーブリード：家畜改良事業団）装着による過剰排卵処理法は、発情周期に関係なく採胚が可能であり、通常処理と変わらない採胚成績であったと報告している。本試験においても、分娩後早期に過剰排卵処理を開始するため発情周期を確認できないことから、この方法を用いた。CIDR装着時期は、分娩後30日目（以下30日区）、40日目（以下40日区）の2区について比較検討した。また、分娩直後に親子分離（以下分離区）および自然哺乳させる（以下哺乳区）飼育方式別の比較検討を併せて実施した（表1）。

表1 試験区分及び供試頭数

	分娩後CIDR装着時期	
	30日(頭)	40日(頭)
分離区	13	3
哺乳区	15	5

3 卵巣の動態

分娩後の卵巣動態を把握するため、全ての供試牛について分娩後10日前後から3～5日毎に日立製作所社製 EUB-200V 超音波診断装置を用いて調査した。また、過剰排卵処理開始時及び採胚時にはアロカ社製、SSD-1200を用いて詳細に卵巣を調査し、大きさによりそれぞれ大卵胞(10mm以上)、中卵胞(6～9mm)、並びに小卵胞(6mm未満)に区分した。

4 過剰排卵処理と採胚方法

分娩後30日目または40日目から膈内にCIDRを装着し、過剰排卵処理は挿入後10日目から卵胞刺激ホルモン(アントリンR:デンカ製薬)の3日間漸減投与法(5,3,2AU朝夕2回)にて行い、プロスタグランジンF2(以下PGF2という、エストラメート:住友製薬、武田シェリング・ブラウアニマルヘルス)750 μ g筋肉内投与により発情を誘起した。人工授精は過剰排卵処理終了後48及び55時間後の2回行い、初回人工授精と同時に性腺刺激ホルモン放出ホルモン製剤(コンセラル:武田シェリング・ブラウアニマルヘルス)を100 μ g筋肉内投与し排卵を促進した。また、採胚は人工授精後7日目に多孔式バルーンカテーテルを用いた子宮洗浄法により行い、回収した胚は鈴木ら²⁾の方法に準じて形態的に正常胚、未受精卵及び変性卵に区分した。胚回収後2%イソジン液(ネオヨジン:三鷹製薬)50mlを子宮内に注入し、PGF2を750 μ g筋肉内に投与した(図1)。

5 採胚後の人工授精

採胚後の人工授精は、1年1産技術の確立を図るため、山田ら³⁾が報告したオブシク法を用いた。オブシク法は、採胚後9日目から行った。妊娠鑑定は、授精後35日目に超音波診断装置を用いて行った。この人工授精で受胎しなかった牛については、それぞれの卵巣の状態を見ながら、自然発情または(PGF2単独、オブシク法、CIDR装着により)発情を誘起して再度人工授精した。

6 普及性の検討

県内4カ所の黒毛和種経産牛7頭を用いて、本試験同様の方法で実証試験を行い、採胚成績及び受胎成績について検討した。

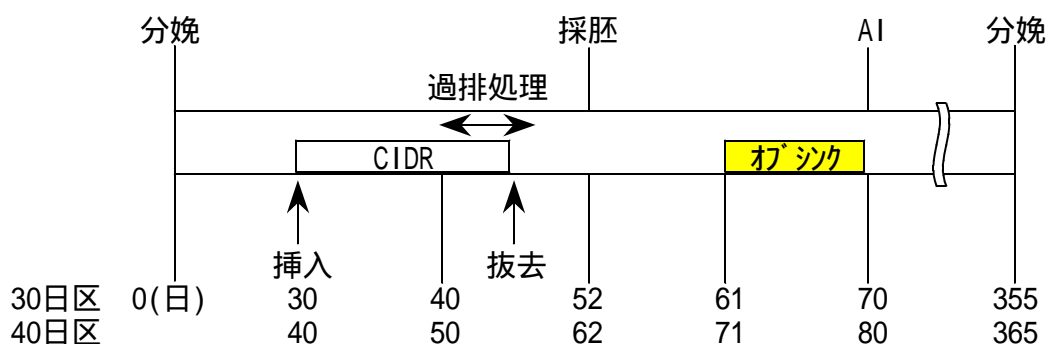


図1 1年1産1採胚プログラム

結果及び考察

1 卵巣動態

卵巣の動態は、超音波診断装置を用いてCIDR挿入時まで調査した。供試牛全てにおいて分娩後10日前後から卵胞の発育が認められ、30日区及び40日区ともに初回排卵は、分離区で93.8%(15/16頭)、哺乳区で45.0%(9/20頭)で確認でき、分離区の方が有意に多い結果であった($p < 0.05$)。また初回排卵日は分離区10～40日で平均23.5日、哺乳区22～39日で平均30.3日であった(表2)。

吸乳刺激は分娩後の繁殖機能の回復に影響を与え、特に卵巣機能については、分娩後の離乳時期

が早いほど卵巢機能の回復は促進される傾向にある⁴⁻⁶⁾。本試験でも同様に、分離区が排卵比率が多く、平均排卵日も早い傾向が見られ、吸乳刺激の有無が卵巢回復に影響していると考えられた。

表2 分娩後の初回排卵の有無

区分	頭数	排卵頭数(頭)	比率(%)	平均排卵日(日)
分離区	16	15	93.8 ^a	23.5±7.8 ^A
哺乳区	20	9	45.0 ^b	30.3±6.6 ^B

異符号間に有意差有り(p<0.05)
平均±標準偏差

2 採胚成績

(1) 過剰排卵処理前の大卵胞と採胚成績の関係

過剰排卵処理開始前に超音波診断装置を用いて卵巢状態を検査し、大卵胞の有無と採胚成績を比較した。過剰排卵処理前の卵巢には両区とも80%以上の牛に大卵胞が認められたが、総採卵数はむしろ大卵胞が存在した牛の方が多い傾向にあった(表3)。下平⁷⁾は、過剰排卵処理前の卵巢に大型の卵胞が共存し、その卵胞が主席卵胞である場合には過剰排卵処理の反応性が不良になると報告しているが、本試験では、大卵胞の存在した牛の方が総採卵数が多い傾向が認められた。このことは、大卵胞の認められなかった供試牛が分離区、哺乳区ともに頭数が少なく、逆に大卵胞が存在する供試牛が多かったことから大卵胞の存在よりも個体差の方が大きく影響したと考えられた。

表3 過剰排卵処理前の大卵胞の有無と総採卵数の関係

区分	大卵胞	頭数	処理前卵胞のサイズ別卵胞数(個)			総採卵数(個)
			大	中	小	
分離区	-	2	0.0±0.0	2.0±1.4	21.5±12.0	6.5±3.5
	+	10	1.3±0.5	2.5±1.6	16.7±5.9	11.6±7.7
哺乳区	-	2	0.0±0.0	2.5±0.7	14.5±6.4	4.5±4.9
	+	13	1.2±0.4	0.8±0.8	14.4±6.7	7.0±3.5

平均±標準偏差

(2) CIDR装着時期と採胚成績の関係

CIDR装着時期と採胚成績を比較検討した結果、平均総採卵数は30日区で8.4±5.6個、40日区9.3±6.5個であり、同様に平均正常胚数はそれぞれ4.0±3.1個、5.9±5.4個であった。いずれも40日区の方が30日区と比較して、若干良い傾向がみられたが、有意な差は認められなかった(表4)。

分娩後早期の採胚について、小西⁸⁾は通常過剰排卵処理は分娩後100日以上経過したものが理想的であると報告している。また、井口⁹⁾らは分娩後80日以前では安定的に胚が得られなかったと報告している。本試験の採胚成績はこの報告と同等かやや劣る結果であり、これは分娩後52日目の採胚が影響していると考えられた。一方で、山田ら¹⁰⁾は分娩後45日目にCIDRを挿入し過剰排卵処理を開始し分娩後62日目に採胚を行っており、良好な採胚成績を得ている。この中で、CIDR挿入前に前処理として短期間CIDRを挿入しておくことが、正常胚率を高くする傾向があると報告しており、分娩後100日以前の採胚については何らかの正常胚率向上の技術が必要であると考えられた。

表4 CIDR挿入日別採胚成績

区分	頭数	総採卵数(個)	正常胚(個)	未受精卵(個)	変性卵(個)	正常胚(%)
30日区	28	8.4±5.6	4.0±3.1	1.9±2.6	2.7±3.1	50.5
40日区	8	9.3±6.5	5.9±5.4	1.4±0.7	2.0±2.5	52.5

平均±標準偏差

(3) 飼育方式別採胚成績

飼育方式別の採胚成績では、分離区は、平均総採卵数が30日区10.4±6.8個、40日区16.0±5.0個であり、平均正常胚数がそれぞれ4.2±3.5個、11.7±3.8個であった。いずれも40日区の方が30日区と比較して多かった。哺乳区は、平均総採卵数が30日区6.7±3.5個、40日区5.2±3.1個であり、平均正常胚数はそれぞれ3.9±2.7個、2.4±2.3個であり、分離区とは異なり30日区の方が40日区に比べ若干多い結果であった(表5)。

平均総採卵数について比較すると30日区、40日区のいずれにおいても分離区の方が哺乳区に比

べ多い傾向にあり、これは前述のとおり分娩後の早期離乳により、卵巣機能の回復が哺乳区よりも早かったことに起因したと考えられる。また、子宮の状態において、居在家ら及び川西ら^{4,5,11)}は分娩後早期の離乳は、自然哺乳と比較して子宮修復が遅れる傾向があるとの報告しており、本試験においても、30日区と比較すると哺乳区の方が分離区に比べ正常胚率が高い傾向にあったことから子宮の回復度が影響したと考えられる。岡野^{1,2)}は分娩後の子宮は形態的には分娩後遅くとも50日までに修復すると報告しており、今後、直腸検査でわかる範囲の形態的な子宮の変化のみでなく、内面的な子宮状況やホルモン動態等についても検討する必要があると考えられた。

表5 飼育方式別採胚成績

区分	頭数	総採卵数 (個)	正常胚 (個)	未受精卵 (個)	変性卵数 (個)	正常胚率 (%)
分離区						
30日区	13	10.4±6.8	4.2±3.5	2.5±3.2	3.8±3.7	40.8
40日区	3	16.0±5.0	11.7±3.8	1.3±0.9	3.0±3.6	77.5
哺乳区						
30日区	15	6.7±3.5	3.9±2.7	1.3±1.6	1.7±1.8	58.9
40日区	5	5.2±3.1	2.4±2.3	1.4±0.5	1.4±1.4	37.6
平均±標準偏差						

3 受胎状況

(1) CIDR装着時期の違い

CIDR装着時期別採胚後の人工授精での受胎状況は、平均AI回数は30日区1.8回、40日区1.5回であり、分娩後最終AI日までの日数はそれぞれ平均94.8±35.2日、平均100.2±26.4日であった。その内在胎日数を285日としたとき概ね1年1産できると思われる分娩後85日目までの受胎率は30日区46.4% (13/28)、40日区62.5% (5/8)であり、いずれも両区間に有意な差はみられなかった(表6)。

表6 受胎成績

区分	頭数	AI数(回)	最終AI日(日)*	1年1産	
				頭数	率(%)
30日区	28	1.8	94.8±35.2	13	46.4
40日区	8	1.5	100.2±26.4	5	62.5

*最終AI日は受胎を確認した回のAI日

平均±標準偏差

(2) 飼育方式別受胎状況

飼育方式別採胚後の受胎状況は、30日区が平均AI回数は分離区2.1回、哺乳区1.6回であり、分娩後最終AI日までの日数は分離区で平均102.7±41.4日、哺乳区平均88.0±28.5日であった。また、分娩後85日目までの受胎率は分離区30.8% (4/13)、哺乳区60.0% (9/15)であった。いずれも両区間に有意な差はないものの哺乳区の方が良い傾向がみられた。40日区では平均AI回数は分離区1.3回、哺乳区1.6回であり、平均最終AI日は分離区で分娩後98.3±30.1日、哺乳区101.4±27.6日であった。また分娩後85日目までの受胎率は分離区66.7% (2/3)、哺乳区60.0% (3/5)であり、両区間に有意な差はみられなかった(表7)。

表7 受胎成績

区分	頭数	AI数(回)	最終AI日(日)*	1年1産	
				頭数	率(%)
30日区					
分離区	13	2.1	102.7±41.4	4	30.8
哺乳区	15	1.6	88.0±28.5	9	60.0
40日区					
分離区	3	1.3	98.3±30.1	2	66.7
哺乳区	5	1.6	101.4±27.6	3	60.0

*最終AI日は受胎を確認した回のAI日

平均±標準偏差

本試験では採胚後の受胎成績の向上を期待して、採胚終了直後PGF2 投与及びヨード剤の子宮内注入を行った上で、採胚後10日後からオブシンク法を行った。

種子田ら¹³⁾は、採胚後の発情回帰について、採胚後ヨード剤の子宮内注入を行うよりもPGF2 を投与した方が発情回帰日数が早くなり、受胎に要する日数が短縮される傾向にあるが、ヨード剤単独では発情回帰日数にばらつきがあり、採胚後発情回帰日数は8～47日と個体差の影響が大きかったと報告している。一方で一丸ら¹⁴⁾の報告では、採胚後にPGF2 を投与した牛群の平均初回発情は42.4日と遅かったこと、また井口ら⁹⁾は採胚後初回AIまでは平均29日であったとの報告からすると、採胚後の発情回帰日数は、飼養管理や個体差に影響されることが考えられる。

種子田¹³⁾らは、採胚後人工授精したところ分娩後受胎までに要した日数は平均で78.8日であったと報告している。一丸ら¹⁴⁾は農家繫養繁殖牛について調査しており、採胚後受胎までに平均87.8日を要したと報告している。また、井口ら⁹⁾は大規模繁殖農場を調査し、採胚後受胎までに平均63日を要し、平均AI回数は1.9回であったと報告している。本試験では採胚後受胎までに36～50日程度を要しており、農家繫養繁殖牛や大規模農場での結果より短かく、オブシンク法を用いて発情を誘起したことが、有効であったと考えられた。しかし、オブシンク法は、発情を誘起し定時授精できる利点があるがコストがかかる欠点があり、オブシンク法を用いない方法も今後検討する必要があると考えられた。

小規模繁殖農家では1年1産の達成は重要な課題であり、経営に大きな影響を与える。分娩後40日目のCIDR装着時期は、30日目の装着に比べ採胚成績及び採胚後の人工授精による受胎成績が良好であったが、飼育方式では、自然哺乳においてはCIDR装着時期が30日目でも充分早期の受胎が可能であった。このことから、小規模繁殖農家での自然哺乳方式の飼養管理では、在胎日数を285日としたとき、1年1産させるためには分娩後85日までに受胎させるため、採胚後の人工授精が2回行えるメリットがあることとから、CIDR挿入時期は分娩後30日目の方が適当であると考えられた。

また、早期離乳方式が多い大規模繁殖農家では、採胚後の受胎性が高い分娩後40日目装着の方が適当であると考えられ、飼養管理方式により処理方法を変える必要があると考えられる。

4 実証試験結果

県内4カ所の農家で1年1産プログラムに従って採胚及び人工授精を行った結果を表8に示した。平均総採卵数は 12.9 ± 8.7 個であり、平均正常胚数は 6.3 ± 4.3 個であった。平均最終AI日は103.9日であり、平均1.6回の人工授精で受胎させることができた。このうち概ね1年1産できると思われる分娩後85日目までに57.1% (4/7)の牛が受胎し、試験場内の結果とほぼ同様の成績であり、飼養条件の異なるフィールドにおいても本試験のプログラムに従うことにより採胚及び人工授精が可能であることが判明できた。しかし、正常胚が採取されなかったり、受胎までに長期間を要する個体が散見されることから、今後、正常胚率及び受胎率のより一層の向上を図ることにより普及が期待できるプログラムになると考えられた。

表8 実証農家における採胚成績と受胎状況

農場名	飼養区分	総採卵数 (個)	正常胚数 (個)	正常胚率 (%)	最終AI日 (日)	AI数 (回)
A農場(酪農和牛複合)	自然哺乳	12	8	66.7	149	2
B農場(")	"	0	0	0.0	73	1
C農場(")	早期分離	15	14	93.3	71	1
D農場(和牛繁殖)	"	21	4	19.0	124	3
"	"	8	5	62.5	159	2
"	"	8	6	75.0	70	1
"	"	26	7	26.9	81	1
平均		12.9 ± 8.7	6.3 ± 4.3	49.1	103.9	1.6

最終AI日は受胎を確認した回のAI日
平均±標準偏差

引用文献

- 1) 藪上剛・富永敬一郎・有吉哲志(1999)：黄体ホルモン製剤を用いた過剰排卵処理が黒毛和種牛の採胚成績に及ぼす影響．兵庫農技研報(畜産)，35，1-4
- 2) 鈴木達行(1986)：家畜人工授精講習会テキスト(家畜受精卵移植編)，147-202.

- 3)山田恭嗣・三原修正(1997):GnRH-PGF2 -GnRH投与による乳牛の排卵の同期化と定時人工授精による受胎成績.家畜診療,409,23-27
- 4)居在家義昭・岡野彰・島田和宏・大石孝雄(1986):肉用牛における早期離乳が分娩後の繁殖機能回復に及ぼす影響.中国農試報,B29 9-16
- 5)川西隆智・柏木聡・佐藤洋三朗(1987):黒毛和種牛における離乳時期が分娩後の繁殖機能回復に及ぼす影響.神奈川畜試研報,77,1-10
- 6)鈴木修ら(1980):早期離乳牛における分娩後の繁殖機能及び血中プロジェステロン濃度の変化.日畜会報,51,11,760-765
- 7)下平乙夫(1994):牛受精卵移植技術を巡る技術開発の現状と展望.E Tニュースレター,14,21-25
- 8)小西一之(1994):Journal of Reproduction and Development,40,19-23
- 9)井口光国・松野弘・小林直彦(1998):分娩後の過剰排卵処理・採卵がその後の繁殖成績に及ぼす影響.肉用牛研究会報,64,83-86
- 10)山田真・川島敬二(2001):分娩後の黒毛和種牛におけるCIDRの早期装着がその後の胚の生産性に及ぼす影響.群馬畜試研報,8,24-25
- 11)居在家義昭・岡野彰・島田和宏・大石孝雄(1986):肉用牛における分娩後の子宮修復に及ぼす哺乳の影響.中国農試報,B29,17-23
- 12)岡野彰(1984):肉用牛における分娩後の繁殖機能回復について.家畜人工授精,105,27-32
- 13)種子田功ら(1998):胚移植技術による和牛子牛の増産技術.京都淀総牧試研報,19,56-60
- 14)一丸仁・黒川洋介・箆雅生(1997):黒毛和種繁殖雌牛の採卵成績に及ぼす要因及び採卵後の繁殖性.九州農業研究,59,99