

乳牛の個体別体外受精

刈谷 亮介・笠井 裕明・後藤 充宏

要 約

高能力でありながら、事故等により廃用処分となったホルスタイン種経産牛 4 頭の個体別体外受精を実施した。卵巣から採取した未成熟卵子数は、4 頭で A ランク 68 個、B ランク 41 個、C ランク 57 個の計 166 個であり、吸引法に加え、掻き出し法および細切法の併用が効果的であった。これらを市販の乳用種雄牛凍結精液で体外受精した後、胚盤胞期胚まで発生した 12 個を、受卵牛にそれぞれ 1 卵ずつ移植した結果 3 頭が受胎した。このうち 2 頭は流産したが、1 頭は雌産子を分娩した。精子の授精能獲得条件、発生培養方法等の改善の余地はあるが、本技術が高能力乳用牛から後継牛を得るための最後の繁殖手段として有効であることが示唆された。

目 的

牛の体外受精技術は、食肉センターで廃棄される卵巣中の未成熟卵子を有効利用するため、主に和牛精液を使用した肉用素牛の増産手段として発達した。一方、乳用牛では、食肉センターで処理される個体の能力が不明であることから、高能力乳用牛の増産には結びつかなかった。しかし、高能力でありながら何らかの理由で廃用とせざるを得ない特定された個体については、出荷日が分かれば、その卵巣を採取することが可能である。

今回、農家から体外受精の要望があった高能力ホルスタインの廃用日にあわせ、食肉センターからその卵巣を持ち帰り、効率的な未成熟卵子の採取方法、乳用種雄牛精液を用いた体外受精技術および受胎性について検討した。

材料及び方法

(1) 材料

供試牛は高能力であるにも関わらず事故、疾病等で廃用された農家繋養ホルスタイン経産牛 4 頭を用いた(表 1)。これらの牛の卵巣を食肉センターで採取後、37℃の生理食塩水に浸漬して持ち帰り 2 時間以内に処理した。

表 1 供試牛の概要

No.	産地	産歴	検定成績	廃用理由
1	米 国	3	13,359 kg	産後起立不能
2	自家産	3	13,517 kg	右後肢骨折
3	北海道	2	10,648 kg	肢蹄疾患
4	米 国	5	12,029 kg	肢蹄疾患

(2) 未成熟卵子の採取

18G 注射針を装着した 5ml シリンジで直径 3~5mm の卵胞から卵胞液とともに卵子を吸引した(吸引法)後,手術用メスで卵胞を切開し薬匙で卵胞内を掻き出した(掻き出し法)。さらに,ペトリ皿上で卵巣をカミソリ刃で細切し,3mg BSA(SIGMA A-3311)加 PBS で切片を洗浄し集卵した(細切法)。

(3) 体外受精

採取した未成熟卵子を 10%FCS を加えた TCM199 培地で 22~24 時間成熟させた後,BSA(SIGMA A-4378)20mg/ml およびヘパリン(ヘキスト薬品 ノボ・ヘパリン注 1000)5 単位/ml を加えた BO 液で洗浄した。精液は市販の凍結乳用種雄牛精液を融解し,10mM テオフィリン(SIGMA T-1633)を添加した BO 液で 2 回洗浄後,5×10⁶/ml に希釈し,100μl のドロップを各々作成し,1 ドロップ当たり 10 個の卵子を入れ 6 時間媒精した。媒精終了後ピペティングにより卵子を裸化し,48 時間まで 3mg/mlBSA(SIGMA A-8806)添加 CR1aa 培地 ,以後 10%FCS 添加 CR1aa 培地で 50 個/750μl ,90%N₂ , 5%O₂ , 5%CO₂ , 38.5 で培養した。

(4) 移植

体外受精日を 0 日として,7~8 日目に胚盤胞期胚となったものを,発情後 7 日目前後のホルスタイン種受卵牛の黄体側子宮角へ,頸管経由法で 1 卵移植した。妊娠鑑定は移植後 60 日前後に直腸検査により実施した。

結 果

採取された未成熟卵子は 4 頭の合計が 166 個で,1 頭当たり 41.5 個であり,これらを 2 層以上の顆粒膜細胞に覆われたものを A ランク ,顆粒膜細胞が 1 層あるいは部分的に付着しているものを B ランク ,裸化卵子を C ランクとし分類したところ 1 頭当たり,それぞれ 17.0,10.3,14.3 個であった(表 2)。これは,現場が通常実施している吸引法のための採取成績より良好な成績であった(表 3)。

表 2 未成熟卵子採取成績

牛 No.	採 取 卵 子 数			計
	A	B	C	
1	9	7	12	28
2	11	9	10	30
3	23	11	18	52
4	25	14	17	56
計	68	41	57	166
	(17.0)	(10.3)	(14.3)	(41.5)

注：() 1頭当たり

表 3 吸引法のみ未成熟卵子採取成績

供試 頭数	採 取 卵 子 数			計
	A	B	C	
23	246	237	76	559
	(10.7)	(10.3)	(3.3)	(24.3)

注：() 1頭当たり

凍結精液は2種類を使用し、精液Iでドナー牛1,2,3から採取した卵子、精液IIでドナー牛4から採取した卵子を体外受精した結果、計12個、1頭当たり3個の胚盤胞期胚が得られた。これらを1卵ずつ12頭の受卵牛へ移植した結果、3頭が受胎し2頭は6ヶ月齢で雄胎児を流産したが、1頭は正常に分娩し雌産子を得ることができた(表4)。

表 4 胚盤胞発生数及び移植成績

牛 No.	使用 精液	胚盤 胞数	移植 頭数	受胎 頭数	備 考
1	I	2	2	0	
2	I	3	3	1	雌 47kg
3	I	2	2	2	流 産
4	II	5	5	0	
計		12	12	3	

考 察

当場で食肉センターより持ち帰った卵巣から未成熟卵子を採取するのはルーチンでは吸引法のみで行っている。今回、吸引法に掻き出し法及び細切法を併用したところ採取卵子数は多い傾向にあった。従って、高能力牛等の貴重な卵巣からより多くの未成熟卵子を採取したい場合には、3手法を併用することが有効と思われた。

体外受精では、種雄牛により受精能獲得に個体差があることが知られている¹⁾。今回使用した2種類の精液については、当場の慣行法でも体外受精能力があることが判明したが、国内外で乳用種雄牛数は多く回転も早い。卵巣を採取した雌牛の血統、農家の要望さらに経膈採卵技術により生体からも未成熟卵子の採取が可能となったこと²⁾も考えると、さらに多くの体外受精能力のある精液の開拓、受精能力を付与する条件の検討が必要である。

移植可能な胚盤胞期胚までの発生数は既報の成績³⁾より低い傾向にあったが、今回は通常なら検卵時点で廃棄してしまうような低ランクの卵子も試験に供したことが一因と考えられる。成熟培地にエストラジオール 17 - ⁴⁾あるいは卵胞液^{5),6),7)}を添加して、成熟率および発生率が改善された報告があることから、ホルモン剤、成長因子等の添加も検討する必要があると思われる。また、体外受精卵の発生において、培養卵数に対する培養液量で発生率に差があるという報告⁸⁾がある。これは、卵子が代謝する何らかの物質と培地成分の相互作用によるものと思われる。今回は一定量の培地中で採取した卵子を培養したが、1頭の卵巣から採取される未成熟卵子は個体によりバラツキがあり、数が限られているので培養液量と卵子数の比率は発生率向上のために十分考慮する必要がある。支持細胞との共培養ではこの条件が緩和されることも考えられ、これについても検討していきたい。

移植成績は、受胎率 25%と低率であったが、突発の事故等で受卵牛の発情同期化ができなかったことが主因であり、今後は廃用計画が立てられるものについては、それにもとずき受卵牛の発情同期化を実施し、また、体外受精卵に適した凍結保存技術についても検討し受胎率向上を図りたい。

参 考 文 献

- 1) Th.A.M.Kruij, R.Boni, Y.A.Wurth, M.W.M. Refsen and M. C. Pieterse *Theriogenology*, 42 : 675-684, 1994
- 2) 藤谷泰裕, 新技術の連携活用による牛の改良増殖の新展開, 家畜人工授精, 165:27-37, 1994
- 3) 笠井裕明, 刈谷亮介, 後藤充宏:徳島県畜産試験場研究報告, 38, 1-3, 1997
- 4) 福士孝一, 平泉真吾, 中島聡, 沼田喜久雄:第 13 回東日本家畜受精卵移植技術研究会講演要旨, 1998
- 5) Elmileik AMA, Maeda T, Terada T : *Anim Repro Sci*, 38 : 85-96, 1995
- 6) Kim KS, Mitsumizo N, Fujita K, Utsumi K : *Theriogenology*, 45 : 787-799, 1996
- 7) Romero - Arredondo A, Seidel GE Jr : *Biol Repro*, 55 : 1012-1016, 1996
- 8) A. T. Palasz and J. Thndathil : *Theriogenology*, 49 : 212, 199