

受精卵移植簡易化技術の確立

(簡易採卵技術の開発)

福見 善之, 立川 進

要 約

牛受精卵移植技術の普及に伴い、優れた遺伝形質を有する雌牛の子孫を短期間に多数生産することが可能となった。しかし、受精卵移植技術にはドナー牛からの受精卵の回収・検卵、レシピエント牛の性周期の同期化・移植などの専門技術が要求され、その作業には多大な労力・時間・経費が必要である。そこで、従来の採卵に用いている採卵器具・機材に改良を加え、1人で短時間に採卵できる技術について検討した。

供試牛は過剰排卵処理を行った乳牛2頭、和牛4頭(計)6頭を用い、従来採卵時に使用しているバルーンカテーテル・環流液・フィルター付き受精卵回収容器を三方ストップコックにシリコンチューブで連結させ、伸縮性の物干し竿に固定し、小型エアポンプにより環流液の注入を行い採卵を実施した。また、バルーンカテーテルへのエアの注入方法については血圧計のゴム球を活用し、エアの出し入れを手元で簡単に行えるよう改良した。そして、この採卵方法の有効性を実証するために、推定黄体数に対する総回収胚数(回収率)について調査した。

改良法により6頭から採卵を行った結果、推定黄体数48個に対する総回収胚数41個、回収率85.4%であり、1頭あたり平均26(分)で採卵が可能となった。また、フィルター付き回収シャーレを用いることにより検卵時の時間短縮が図れ、従来3人で行っていた採卵を1人で簡単に行えるようになり、省力的で簡易な採卵技術が確立された。

目 的

牛胚移植技術の普及に伴い、優れた遺伝形質を有する雌牛を短期間に多数生産することが可能となった。

また、近年供卵牛からの胚回収率向上を目的にホルモン剤投与によるOvsynch法及びプロジェステロン製剤(CIDR)との組み合わせによる方法により簡単に発情を確認することが可能となり、労力を払わず任意の日時に過剰排卵処置及び受精卵移植が行えるようになってきている。

しかし、牛胚移植技術には供卵牛の過剰排卵処理、胚の回収・検卵・受卵牛への胚移植までの間様々な専門技術・労力・時間経費が必要であり、今まで回収率向上を目的とした過剰排卵処置法についての報告^{1), 2), 3), 4), 5), 6)}はあるものの、採卵技術の簡易化についての報告^{7), 8), 9)}は数少な

い。そのため、今回我々は、従来使用している採卵器具・機材の改良を図り、1人で採卵できる簡易採卵技術について検討した結果若干の知見を得たのでその概要について報告する。

材料および方法

供試牛は、過剰排卵処置により発情誘起を行い、人工授精後7から8日目の性周期の乳牛2頭、和牛4頭(計)6頭を供試した。

採卵方法は、従来採卵時に使用した器具・機材は(1)~(3)のように改良を図り、非外科的に採卵を実施し、推定黄体数に対する総回収胚数(回収率)について比較検討した。

また、黄体の確認は当日直腸検査により行った。

(1) 灌流液・バルーンカテーテル・回収容器

灌流液は抗生物質及び血清の添加された乳酸化

リングル（ハルゼン液）、バルーンカテーテルは従来採卵時に使用している多孔式バルーンカテーテル（FHK:FA362, 363）、受精卵回収容器にはセルコレクター（FHK:CCA-200）を用い、それぞれを三方ストップコック（COCK PP 4×6mm）にシリコンチューブで連結させ、伸縮性の物干し竿に固定し、持ち運び可能とした。（写真1）

また、灌流液の注入法として乾電池式AIR PUMP1300BH-734(National)（写真2）を用いて電動エアポンプによる簡易な自動灌流装置を設置し、補助者なしで子宮角内に灌流液を注入した。



（写真1）
簡易採卵装置（全体像）

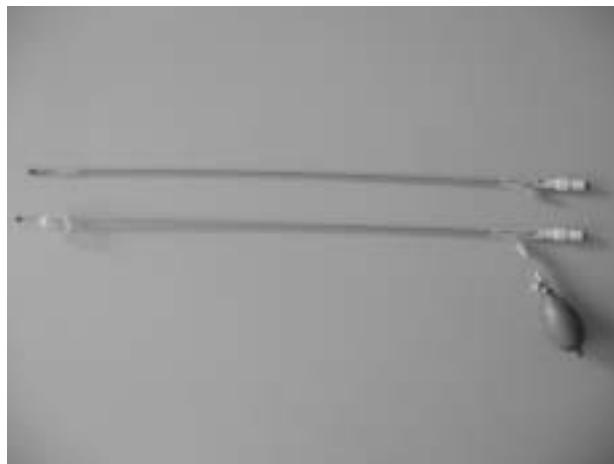


（写真2）
自動灌流式小型エアポンプ

(2) バルーン膨張法

子宮内にバルーンカテーテル挿入後、子宮角内でのバルーンの膨張による固定法として血圧計のゴ

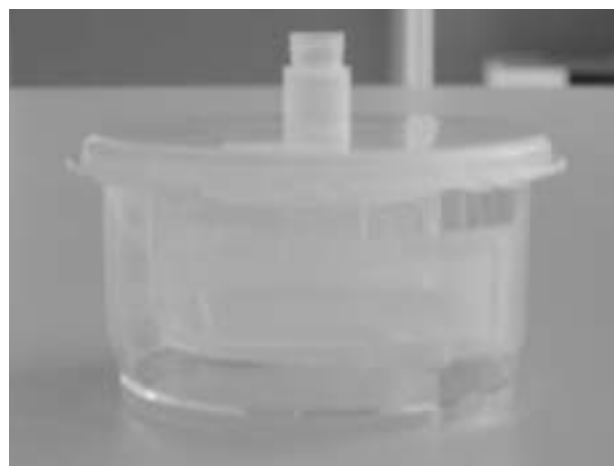
ム球（写真3）利用し、バルーンカテーテルのエアを挿入外口に連結させ手元でエアの出し入れを行えるようにした。



（写真3）
バルーン膨張用血圧計ゴム球

(3) 受精卵回収器

灌流液注入により回収した液をフィルター付き回収シャーレ：セルコレクター（FHK）（写真4）を用い、フィルターにより分離された受精卵のみを、採卵後、直接実体顕微鏡で検索が行えるようにした。



（写真4）
フィルター付き受精卵回収シャーレ

結 果

供試牛6頭（乳牛：2頭，和牛：4頭）を用いて簡易採卵法により採卵を行った結果，表1に示すとおり，推定黄体数48個のうち41個回収（回収率：85.4%）され，従来法による採卵成績と変わらない成績であった。

また、今回の改良法により従来3人で行っていた採卵作業も1人で行えるようになり、牛1頭あたりに係る採卵時間(平均26分)及び採卵終了から受精卵検索までの作業時間の短縮も図ることが可能となった。

表1 簡易採卵法における採卵成績

	供試頭数	推定 黄体数	総回収 胚数	回収率 (%)
乳牛	2	10	7	70
和牛	4	38	34	89.5
従来法	—	—	—	80～90
計	6	48	41	85.4

考 察

これまで一般的に用いられてきた受精卵の回収方法は、灌流液の入った容器を牛の外陰部から1m程度の高さに吊し、その落差によって液を子宮内に数回に分けて注入し、洗い流す方法や灌流液の入った50mlのシリンジをバルーンカテーテルの外口に連結させ必要量を子宮内に注入し、洗い流す方法であったが、これらの方法では補助者が必要であり、手技に手間がかかるなどの難点があった。

そこで、従来の受精卵の回収技術の灌流方法及び回収法の簡易化を図った結果、灌流方法については、伸縮性の物干し竿に灌流液・バルーンカテーテル・回収容器をシリコンチューブで三方ストップコックに連結し、回転スイッチによる小型エアポンプで自動灌流することにより、補助者の必要また手技に手間がかかるなどの難点が解決され、コックをひねることにより簡単に灌流液の出し入れが可能となった。

また、バルーンカテーテルの子宮角内での固定・保持のために従来に25mlのシリンジにより子宮角の大きさにより15～25mlの範囲でエアを送り込みバルーンを膨張させ、子宮角内に固定していた。しかし、エア挿入時に補助者が必要であるこ

とから、1人簡単に操作できるようにするために今回血圧計のゴム球を活用し、バルーンカテーテルのエア挿入外口に連結させることにより手元で容易に空気の出し入れが行えるようになったが、エア注入量の調節などの技術的改善の課題が残った。

回収方法では、灌流により回収された受精卵を実体顕微鏡下で探し出すために、従来回収された容器を30分静置後、容器の底に沈殿した100ml程度の液をシャーレに分注・検索した後、メッシュの付いた容器により濾過した後再度検索する方法が用いられていたが、検索時間を含む作業時間が1時間以上かかっていた。

しかし、今回使用したフィルター付き受精卵回収容器を活用することにより、採卵終了後、シリコンチューブの連結を外し、直ぐに受精卵の検索をすることが可能となり、これまでの作業上の手間及び時間短縮を図ることが可能となり、採卵から検卵までスムーズに行えるようになった。

以上のことから従来の採卵器具・機材に改良を加え1人で簡単に採卵できる技術について検討した結果、少しの技術的課題は残すものの従来法に比べ省力的に行うことが可能であり、また有効であると思われた。今後は、野外での実用化に向けて例数を重ね、その有効性について検討していく予定である。

文 献

- 1) 千田惣浩, 相沢健一, 西宮 弘, 小林正樹, 沼田 恵, 小西潤一 (2000) 効率的過剰排卵処置法の検討 (第2報) 黄体ホルモン製剤を用いた連続採卵におけるE2の投与効果について 秋田畜産研報 15, 62～67
- 2) 野田準一, 永田浩章, 斉藤美英, 佐野文彦, 三宅晃次 (1998) PVP溶解FSH1回投与方法による反復採卵の影響 静岡畜産試研報 23, 92～95
- 3) 三宅晃次, 野田準一, 佐野文彦, 斉藤美英,

永田浩章 (1999) 2 - ピロリドンを溶媒とした FSH1 回投与による過剰排卵処置の検討 静岡畜産試研報 24. 1 ~ 5

- 4) 三宅晃次, 佐野文彦, 土屋聖子 (2000) CIDR を用いた過剰排卵処置法の検討 静岡県畜産試研報 28. 1 ~ 4
- 5) 億 正樹, 上村佳代, 小財千明, 青山 謙 (1998) 牛受精卵の効率的な農家採卵の試み 奈良畜研報 24. 5 ~ 8
- 6) 小島浩一, 櫻井由美, 神辺佳弘, 塩生光男, 岸 善明, 岩倉直行, 久利生正邦 (2000) 胚移植技術を応用した肉用牛の効率生産に関する

試験 - 持続性黄体ホルモン製剤利用による過剰排卵処理に関する試験 - 栃木県畜試研報 16. 1 ~ 5

- 7) 鈴木達行 (1987) ウシ胚移植に関する開発研究 家畜繁殖誌 Vol. 33 No5 11 ~ 23
- 8) 浦野浩司, 片桐成二, 菱沼 貢, 高橋芳幸, 金川弘司 (1987) ウシ胚回収フィルターの検討 家畜繁殖誌 Vol. 33 160 ~ 162
- 9) 鈴木達行 (2003) 獣医繁殖技術の基礎と実際 - 牛の胚回収, 移植, 体外受精用器具の開発と課題 獣医畜産新報 Vol. 56 No12 1001 ~ 1007