

ウシ胚の凍結保存技術および黒毛和種における過剰排卵誘起処置技術の
改善に関する研究

佐野将之(家畜繁殖学)

【目的】 本研究では、1) 乾凍結器で凍結保存したウシの体外受精胚および体内受精胚の生存率および受胎率、および 2) CIDR と EB 投与による黒毛和種の過剰排卵誘起処置における FSH 投与開始日が胚回収結果に及ぼす影響、について検証した。

【方法】 1) 乾式凍結器で凍結保存したウシ体外受精胚および体内受精胚の生存率および受胎率

本研究では乾式凍結器 2 種類 (YT1、YT2) とアルコール液槽式 (ET-UM) の 3 種類を用いた。実験 1 では、受精後 7 および 8 日目に発生した IETS Code-1 の体外胚を 1.5MEG+0.1M ショ糖を用いてそれぞれの凍結器で凍結した。凍結保存胚は 72 時間体外培養して生存性を調べた。実験 2 では上記と同じ方法で凍結した黒毛和種(44 個)およびホルスタイン種(36 個)の体内胚を黒毛和種 (37 頭) およびホルスタイン種 (43 頭) に移植して受胎率を調べた。

2) 黒毛和種の過剰排卵誘起処置における FSH 投与開始時期が卵巣反応および採胚成績に及ぼす影響

本研究では、CIDR と EB を用いた黒毛和種の過剰排卵誘起処置における FSH 投与開始日が胚回収成績に及ぼす影響について検討した。供胚牛の発情周期の任意の時期に CIDR を膈内に挿入すると同時に EB2 mgを筋肉内に注射した (0 日目)。A 法では、CIDR 挿入後 6 日目に FSH 投与を開始した B 法では、CIDR 挿入後 4 日目に FSH 投与を開始した。C 法では、CIDR 挿入後 5 日目に FSH (30AU) 全量をアルミニウムゲルに溶解して 1 回で投与し、D 法では、FSH (30AU) 生理的食塩水に溶解した以外は C 法と同様の方法で実施した。胚回収は全ての方法で人工授精後 7 日目に実施した。

【結果】 1)体外培養 72 時間目の脱出胚盤胞率は、YT1 に比べ YT2 および ET-UM が有意に高かった($p<0.05$)(表 1)。 胚移植後の受胎率は、YT1 が 57.1% (4/7)、YT2 が 64.1% (25/39)、ET-UM が 52.9% (18/34) で凍結器の間に差はなかった (表 2)。

2)A 法の黄体個数は、B ($P<0.01$) および C 法($P<0.05$)に比べ有意に黄体数が多かった。回収胚数は、A および B 法は、D 法に比べ有意に個数が多かった($p<0.01$ 、 $p<0.05$)。正常胚数は、A 法が B および D 法に比べ有意に個数が多かった($p<0.01$ 、 $p<0.05$)。Good 胚の個数は A 法および C 法は、D 法に比べ有意に個数が多く($p<0.01$)、A 法が B 法に比べ多い傾向が見られた($p<0.0577$)。

以上から、乾式凍結器は従来のアルコール液槽式と同等の生存率および受胎率が得られ実用性の高いことが示された。また、黒毛和種の CIDR と EB を用いた過剰排卵誘起処置において CIDR と EB 処置後 6 日目に FSH 投与を開始すると胚回収成績が向上する

可能性が示された。本研究のこれらの結果は、牛の育種計画への胚移植技術の利用促進に貢献する内容である。

表 1. 凍結器の方式が体外受精胚の凍結融解後の生存率に及ぼす影響

凍結器	個数	24 時間	48 時間	72 時間
		脱出胚盤胞数(%)	脱出胚盤胞数(%)	脱出胚盤胞数(%)
乾式 YT1	50	6(12.0)	12(24.0)	15(30.0) ^a
乾式 YT2	103	28(27.2)	45(43.7)	52(50.5) ^b
液層式 ET・UM	100	24(24.0)	40(40.0)	47(47.0) ^b

ab:p<0.05

表 2. 凍結器の方式が体内胚の移植後の受胎率に及ぼす影響

凍結器の種類	移植頭数(頭)	受胎頭数(頭)	不受胎頭数(頭)	受胎率(%)
新鮮胚	59	42	17	71.2
乾式 YT1	7	4	3	57.1
乾式 YT2	39	25	14	64.1
液層式 ET - UM	34	18	16	52.9

表 3. FSH の投与開始時期および投与方法が、卵巢反応および採胚個数に及ぼす影響

区分	供試頭数	実施頭数	供試率 (%)	黄体個数	残存卵胞個数	回収胚数	正常胚数
A 法	16	16	100	18.9±7.1 ^{*ac}	7.0±6.5 ^a	20.3±12.9 ^a	13.8±10.6 ^{ac}
B 法	50	50	100 ^c	16.1±8.8 ^a	3.4±3.8 ^{bc}	16.1±8.8 ^c	8.7±9.2 ^d
C 法	20	19	95.0	5.1±5.2 ^{ab}	2.1±1.9 ^b	16.4±10.8	10.7±8.3 ^c
D 法	65	57	87.7 ^d	13.3±10.5 ^{bd}	1.8±2.7 ^{bd}	11.5±11.3 ^{bd}	5.7±6.1 ^{bd}

*:平均±標準偏差 ab:p<0.01,cd:p<0.05

表 4. FSH の投与開始時期および投与方法が、各品質の採胚個数に及ぼす影響

胚の品質						
区分	供試頭数	Good	Fair	Poor	変性胚数	未授精卵
A 法	16	7.9±6.1 ^{ae}	3.9±3.6 ^{ac}	2.0±2.5	4.4±4.2	1.9±3.4
B 法	50	5.1±6.1 ^f	1.8±2.2 ^b	2.0±3.8 ^c	4.0±8.6	2.8±5.0
C 法	20	7.6±5.9 ^a	1.9±1.9 ^d	1.5±1.4	4.5±5.5	0.4±1.2
D 法	65	3.6±3.4 ^b	1.5±2.4 ^b	0.8±1.5 ^d	2.6±5.6	2.5±6.9

*:平均±標準偏差 ab:p<0.01,cd:p<0.05,ef:p<0.0577