

凍結卵の生存性及び供卵牛との発情日差が受胎率に及ぼす影響

研究開発第二課 武平 有理子

要 約

凍結卵によるダイレクト移植の受胎率は、一般的に新鮮卵より低い。凍結卵を培養し、移植可能卵だけを移植することで受胎率がどのように変わるか調査した。また、移植適期とされる日を過ぎて移植したもののほうが受胎率が高いのではないかという疑念を抱いたため、移植日を発情後日数ごとに集計し、検討した。

凍結卵の生存性については、牧場内で生産した凍結卵で H31 年度に移植のために培養した 132 個の成績をまとめた。発情日差の影響については、H28～R4 年度に牧場内で飼養している交雑種 (F1) のべ 210 頭と未経産の乳用種のべ 340 頭の計 550 頭の移植成績を用いた。

凍結卵の生存性については、移植可能卵は 65.2%であり、移植不適卵が 5.3%、死滅卵が 29.5%であった。移植可能卵 (培養卵) だけを移植することで、F1 の受胎率は 39.3%(24/61)から 55.4%(31/56)に、乳用種は 40.0%(16/40)から 62.0%(31/50)と向上した。発情日差の影響については、培養卵は、F1 で 8.5 日目以降、乳用種で 9.0 日目以降にすることで新鮮卵と遜色のない受胎率となった。また、新鮮卵においては、9.0 日目までの成績となるが、7.5～9.0 日目まで受胎率は良好であった。

受卵牛の発情後日数は、供卵牛と必ずしもシンクロしている必要はなく、ある程度長いほうが受胎率は高い傾向にあった。また受胎可能な幅があることで移植のチャンスも格段に広がり、空胎日数の短縮も期待できる。

緒 言

みつえ高原牧場は、県の試験研究機関である奈良県畜産技術センターに公設民営の育成牧場が併設されている。当センターは、県有の供卵牛 (黒毛和種) から採卵し、育成牧場所有の交雑種 (F1) と酪農家から預かり育成している未経産の乳用種に体内受精卵移植を実施しており、みつえ高原牧場は県内の肥育素牛の生産基地としての役割を担っている。

当センターで実施する受精卵移植は、採卵日に合わせて受卵牛を同期化し、新鮮卵移植を基本としているが、採卵成績不良により新鮮卵が足りない場合、または自然発情がきた牛において移植日が採卵に合わない場合は凍結卵のダイレクト移植を実施してきた。しかし、凍結卵移植の受胎率は、新鮮卵移植に比べて低いのが通例である。当センターは受精卵の処理施設を保有しているため、凍結卵のダイレクト移植にこだわらず、手間はかかるものの、凍結卵を培養し、生存を確認し質の良い胚を選別して移植 (培養卵移植) することで、受胎率を上げる取組を H30 年度より実施している。

また、当センターでは、飼養している供卵牛のうち育種価の低い牛を受卵牛として、高育種価や優良血統の和牛受精卵を移植する取組を H30 年度より実施し、供卵牛の改良を図ってきた。受精卵移植は、受精卵と受卵牛の同期化が 24 時間以上ずれると受胎率が低下するとされている¹⁾ことから、人工授精から 7 日目に採卵した受精卵を、発情から 7.5 日目の受卵牛に移植してきた。しかし、当初は受胎率が低かったため、精査したところ、受胎していたのは発情予定日には排卵していた牛のみであり、発情からの日数が 1 日程度長かった。この結果を受けて、F1 と乳用種に対する移植においても受卵牛の移植日に幅を持たせて実施し、発情後日数ごとに受胎率を集計し、移植適期あるいは受胎可能な移植日の許容範囲

があるか検討した。

培養卵移植では、培養した胚が死滅あるいは質が悪く使用できなかった場合、移植予定の受精卵が足りなくなる。その場合は、再度培養を行うが、その分受卵牛の移植日が後になり、発情後日数が延びてしまうという問題がある。受胎可能な移植日の許容範囲があれば、移植予定の受精卵が足りなかった場合でも、培養卵で再度移植の機会を持つことができる。

こういったことから、新鮮卵と培養卵移植を組み合わせる当センターの移植業務に適した、高い受胎率が望める凍結卵培養計画も検討した。

材料及び方法

1. 材料

採卵は、牧場内で飼養している黒毛和種供卵牛に過剰排卵処理を行い、人工授精後7日目に実施した。

回収卵のうち、ステージが後期桑実胚 (CM) ~胚盤胞 (BL) で、品質が A (Excellent) 及び A' (Good) ランクのもの、従来型のアルコールを用いたプログラムフリーザーを使用し、耐凍剤としてエチレングリコールを用いた緩慢凍結法により凍結処理を行い、液体窒素中で保存した。

凍結卵の生存性については、上記の凍結卵を用いた。H31年度に移植のために培養した132個の成績をまとめた。

発情日差の影響については、技術的な要因を排除するために、私自身が移植を行ったものだけを抽出した。H28~R4年度に牧場内で飼養しているF1のべ210頭と未経産の乳用種のべ340頭の計550頭の移植成績を用いた。

2. 方法

凍結卵の培養は、液体窒素中で保存している凍結卵を、室温空气中で10秒保持した後、30℃の温湯中で10秒間融解し、裸化受精卵培養液 (IVD101) の50 μ lドロップ中で一晚培養した。インキュベーターの設定は、5%CO₂、5%O₂、90%N₂、38.5℃とした。

発情日差の影響については、発情後日数7.5~10.0日目までを半日間隔で区切り、F1・乳用種ともに新鮮卵・凍結卵・培養卵ごとに受胎率を集計した。

3. 統計処理

受胎率の比較においては、Tukeyの多重比較法を用いた。

結 果

培養した凍結卵の写真の一例を図1に示した。上段は移植可能な受精卵で、下段は移植不適と判断した受精卵と死滅している受精卵であり、下段の左端は、右4つと比較すると、ある程度生存している割合は多いが、経験上ハッチすることは不可能に近い。下段のような受精卵を排除し、上段のような受精卵のみを培養卵移植には使用した。

凍結卵の培養成績を表1に示した。移植可能卵は65.2%であり、移植不適卵が5.3%、死滅卵が29.5%だった。移植不適卵と死滅卵を合わせた移植不可能卵が約35%あった。

図1 培養した凍結卵の写真の一例

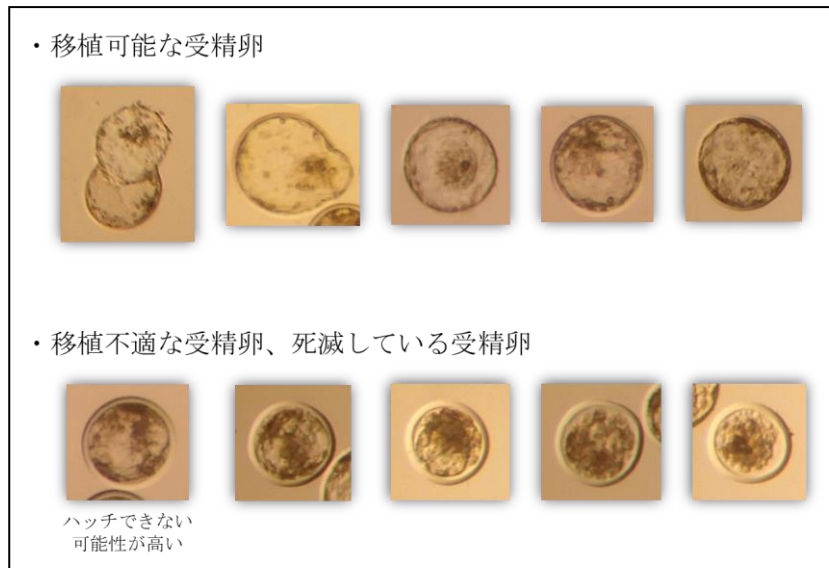


表1 凍結卵の培養成績

移植可能卵	移植不適卵	死滅卵	計
86	7	39	132 個
65.2	5.3	29.5	100%

F1 と乳用種における受精卵の区分及び移植日の発情後日数別受胎率を表2及びグラフ1に示した。

新鮮卵による移植は、9.0日目までの成績となるが、7.5～9.0日目まで受胎率は良好であり、ある程度長いほうが受胎率は高い傾向にあった。

凍結卵によるダイレクト移植は、現在あまり行っておらず、当時は、供卵牛と受卵牛をシンクロさせなければならないと考えていたため、7.5日目のみの結果となっており、F1・乳用種ともに、約40%の受胎率であった。

培養卵による移植は、発情後日数が短いと受胎率が低い傾向にあり、乳用種で顕著であった。乳用種はF1で受胎可能である日数でも受胎しなかった。また乳用種は酪農家からの預託牛でもあるため、受胎しづらい日数であると予想がついた時点で、その後の移植をやめた。F1で8.5日目以降、乳用種（未経産）で9.0日目以降にすることで新鮮卵と遜色のない受胎率となった。

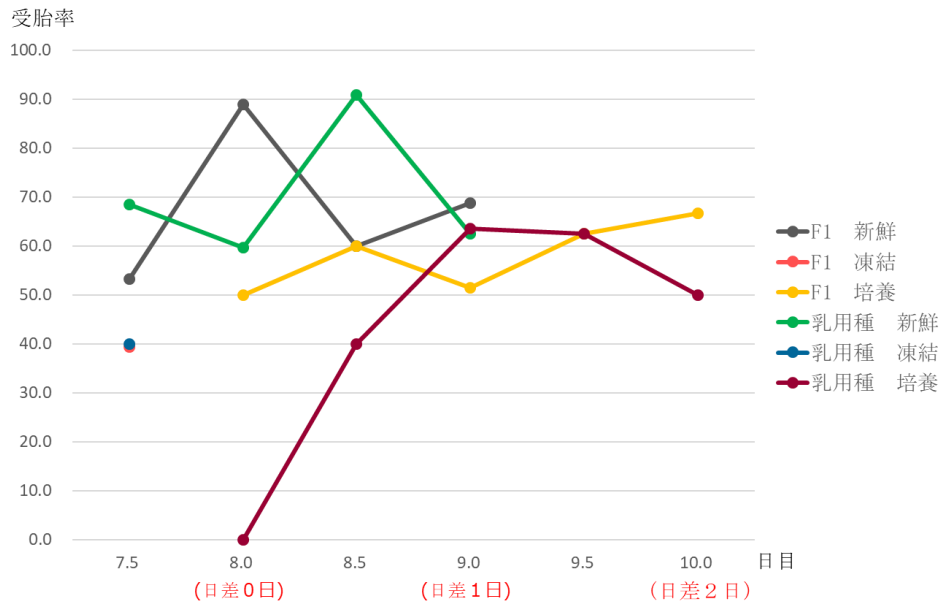
表 2 F1 と乳用種における受精卵の区分及び移植日の発情後日数別受胎率 (%)

受卵牛	受精卵	7.5日目	8.0日目	8.5日目	9.0日目	9.5日目	10.0日目
F1	新鮮卵	53.2 (25/47)	88.9 (8/9)	60.0 (9/15)	68.8 (11/16)		
	凍結卵	39.3 (24/61)					
	培養卵		50.0 (3/6)	60.0 (6/10)	51.4 (18/35)	62.5 (5/8)	66.7 (2/3)
乳用種 (未経産)	新鮮卵	68.4 (117/171)	59.6 (28/47)	90.9 (10/11)	62.5 (5/8)		
	凍結卵	40.0 16/40					
	培養卵		0 (0/3)	40.0 (4/10)	63.6 (14/22)	62.5 (15/24)	50.0 (2/4)

() は受胎数/移植数

各日数の受胎率に有意差なし

グラフ 1 F1 と乳用種における受精卵の区分及び移植日の発情後日数別受胎率 (%)



F1 と乳用種における受精卵の区分別移植成績を表 3 に示した。上記の成績より、F1 の培養卵移植は 8.5 日目以降、乳用種の培養卵移植は 9.0 日目以降を集計し受胎率を算出した。凍結卵によるダイレクト移植と比較して、培養卵による移植の受胎率は、F1 で 39.3% (24/61) から 55.4% (31/56) に、乳用種で 40.0% (16/40) から 62.0% (31/50) と、ともに新鮮卵移植に近い受胎率にまで向上したが、有意差はなかった。一方、新鮮卵移植と凍結卵移植の間には、F1・乳用種ともに有意差があった ($p < 0.05$ 、 $p < 0.01$)。

また、F1・乳用種の培養卵移植の受胎率 55.4%・62.0%に上記の成績から凍結卵の生存性 65.2%を乗じると、36.1%・40.4%となり、凍結卵移植の受胎率 39.3%・40.0%とほぼ等しくなることもわかった。このことは、凍結卵によるダイレクト移植の受胎率の低下の要因の大部分が、受精卵の品質の低下あるいは死滅であるということを示していると考えられる。

表 3 F1 と乳用種における受精卵の区分別移植成績

(F1 の培養卵は 8.5 日目以降、乳用種の培養卵は 9.0 日目以降を集計し、算出)

受卵牛	受精卵	移植頭数	受胎頭数	受胎率
F1	新鮮卵	87	53	60.9 a
	凍結卵	61	24	39.3 b
	培養卵	56	31	55.4
乳用種 (未経産)	新鮮卵	237	160	67.5 A
	凍結卵	40	16	40.0 B
	培養卵	50	31	62.0

異符号間に有意差あり 小文字：p<0.05、大文字：p<0.01

考 察

凍結卵の生存性より、移植不適卵と死滅卵を合わせた移植不可能卵が約 35%あり、凍結卵のダイレクト移植では、新鮮卵による移植より受胎率が劣ることは明らかであることがわかり、F1・乳用種（未経産）ともに新鮮卵移植と凍結卵移植の受胎率の間には有意差もあった（p<0.05、p<0.01）。また、凍結卵を培養し、生存を確認し質の良い胚を選別して移植（培養卵移植）することで、新鮮卵と同レベルの受胎率にまで向上したが、有意差はなかった。しかし、不受胎の原因から受精卵の品質を排除することが可能となった。

供卵牛との発情日差より、新鮮卵による移植では、受卵牛の発情後日数は、供卵牛と必ずしもシンクロしている必要はなく、7.5～9.0 日目まで受胎率は良好であり、ある程度長いほうが受胎率は高い傾向にあった。培養卵による移植では、発情後日数が短いと受胎率が低い傾向にあり、乳用種（未経産）で顕著であった。移植頭数が少ないものの、乳用種は F1 で受胎可能である 8.0 日目でも受胎しなかった。乳用種はすべて未経産であるため、本来なら経産が主である F1 よりも受胎率は、一般的に高くなると思われるが、8.5 日目でも F1 を下回っていた。このことから、培養卵による乳用種（未経産）の移植適期はもう少し遅いのではないかと推測された。最終的には、F1 の場合は 8.5 日目以降、乳用種（未経産）の場合は 9.0 日目以降にすることで新鮮卵と遜色のない受胎率となった。今回、このような結果となったのは、牛の品種の差というよりは受卵牛の年齢による差ではないかと考える。また、なぜ培養卵による移植の場合、発情後日数が短いと成績が悪いのかは今のところ不明であるが、凍結卵を融解するとシュリンクすることも関係しているのかもしれない。しかし、これは凍結卵のダイレクト移植も同様のはずである。

和牛での成績となるが、現在までに新鮮卵でも 10.5 日目で 1 頭中 1 頭が受胎（経産）、培養卵では 11.0 日目で 1 頭中 1 頭が受胎（未経産）している。受精卵の都合上、培養卵で 12.0 日目の移植となったことが一度だけあるが、不受胎であった（経産）。

乳用種は未経産であるため、発情周期は経産より短めであることが多いはずである。それにもかかわらず、培養卵の移植適期が F1 よりも遅くなるのは、黄体の成熟に時間を要するのではないかと推測した。反対に、黄体の退行は早くなるはずであるから、F1 よりも受胎可能な移植日の許容範囲は短いのではないかと考える。

移植した受精卵からシグナルが発信され、受卵牛の黄体退行のスイッチが入る前に、そのシグナルを

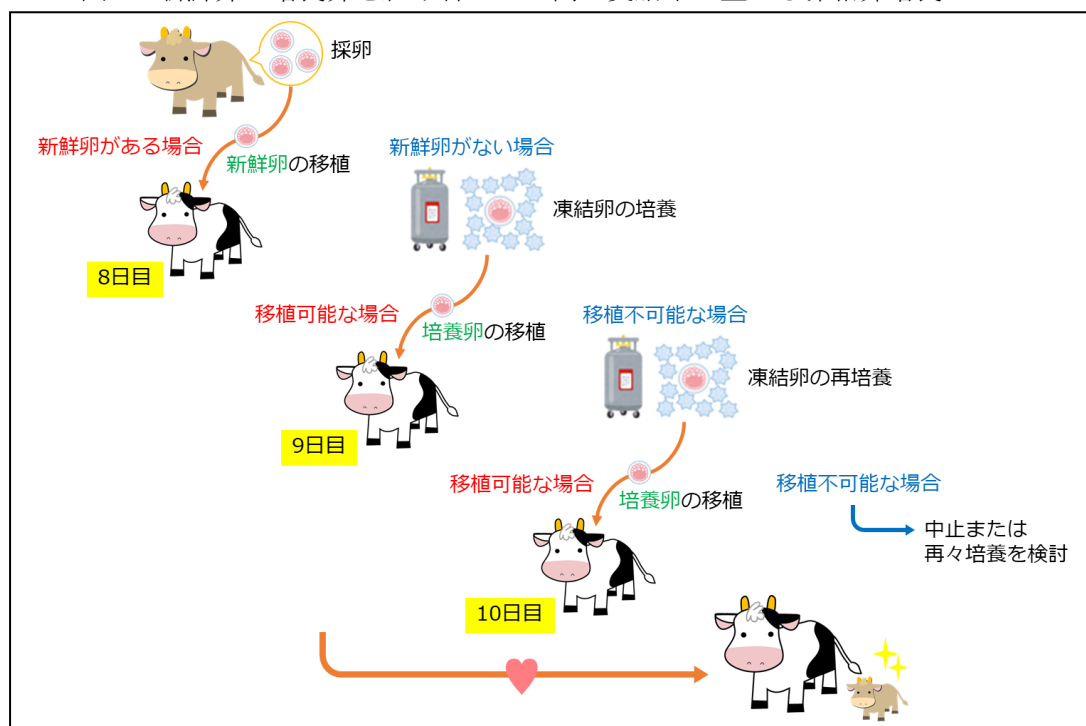
受信できなければ受胎することはないであろうから、12.0 日目くらいが最終移植日の限界ではないだろうかと推測する。今後、例数を増やして更なる検討が必要であると考えている。

移植のタイミングを図 2 に図式化した。採卵により新鮮卵がある場合、翌日午前に新鮮卵による移植を行う。受精卵のステージが進んでおり、胚盤胞や拡張胚盤胞でない限り、基本的に採卵当日に移植は行なっていない。午後の作業時間は短く、翌週の採卵のための AI 等もあり、また少しでも遅いほうが受胎率が高い傾向にあるからである。新鮮卵が不足した場合、移植が早くても F1 は 8.5 日目、乳用種（未経産）は 9.0 日目になるように凍結卵を一晩培養し、翌日午前に移植、培養した凍結卵が移植不可能な場合、再度凍結卵を一晩培養し直して翌日午前に移植する。それでも、培養した胚が移植不可能であった場合、再々培養を行うか、または中止するかを検討する。現在の成績からの判断では、11 日目の移植を行ってもよいと思われる。凍結卵を午前から培養して午後の移植に用いないのは、時間が不十分であり、胚の品質を判定できないことが多いため、出来るだけ行わないようにしている。凍結卵を培養することは一見手間のように感じるが、時間にして 15 分も必要ではなく、不受胎の場合のその後の手間のほうが大変である。また、凍結卵のダイレクト移植は、保存液にエチレングリコールを含むため、速やかな移植が好ましいこともあり、新人には不向きでもある。

下記のようなフローを用いることで、受胎率の高い移植のチャンスが格段に広がり、結果として受卵牛の空胎日数の短縮が期待できる。

また移植時期には、ある程度幅があることがわかったので、受卵牛の発情日が、おおよそしかわからない場合でも移植を断念する必要はなく、この期間に収まるように調整して移植して頂ければ幸いである。

図 2 新鮮卵と培養卵を組み合わせた高い受胎率が望める凍結卵培養フロー



参考文献

- 1) 家畜人工授精講習会テキスト（家畜受精卵移植） 1989. 日本家畜人工授精師協会. 264-267.