

牛の受精卵移植実用化に関する試験(5)

誌名	香川県畜産試験場研究報告
ISSN	03893553
著者	秋山, 正英 十川, 政典 橋本, 和博 徳武, 健一 馬淵, 武
巻/号	27号
掲載ページ	p. 1-4
発行年月	1990年3月

牛の受精卵移植実用化に関する試験Ⅴ

(受精卵分割技術確立試験)

秋山正英・十川政典[※]・橋本和博^{※※}・徳武健一・馬淵 武[※]

牛受精卵を分割し、一卵性双子を作出するために凍結受精卵(黒毛和種より7日目採卵した初期胚盤胞期)を融解後、松本らの変法で分割後移植を実施した。

1. 10個の供試受精卵のうち4個が均等分割(40%)できた。
2. $\frac{1}{2}$ 分割卵を1対ずつ透明帯に再封入せずホルスタイン種経産牛10頭に移植した結果、4頭が受胎(受胎率40%)した。
3. 4頭の受卵牛のうち、1頭が双子分娩(双子率25%)、2頭が単子分娩、1頭が単子を流産した。

以上、松本らの変法で凍結受精卵を用いて分割後、移植し簡易に一卵性双子を作出できる可能性が示唆された。

受精卵移植技術等を利用した双子生産の方法は、①低単位ホルモン剤投与による方法、②重ね移植による方法、③2卵移植による方法、④分割卵移植による方法がある。低単位ホルモン剤投与方法は簡易な方法であるが、排卵数の制御が難しく、②、③の方法はフリーマーチンの問題があり、④の分割による方法では複雑な分

割技術と保存方法が問題となっている。

今回、著者らは、分割卵移植による一卵性双子作出を目的に、簡易で実用性が高いと思われる松本ら¹⁾の変法を用い、凍結保存していた受精卵を融解後に分割し、双子生産を試みたので、その概要を報告する。

材料及び方法

1. 供試受精卵

供試受精卵は、当场繋養の肉用種雌牛の発情後9~13日に過剰排卵処理(FSH, PGF_{2α}併用)した。

発情に伴い県有種雄牛の凍結精液を人工受精し、発情後7日目に採卵を行い、10%グリセリン添加33%初生子牛血清加リンゲル氏液を用い凍結保存した。

移植は、この凍結受精卵をステップワイズ

法(3~6段階)で融解した。受精卵の発育ステージは、全て初期胚盤胞期で凍結融解後の品質はBランク以上のものを10ヶ供試した。

2. 分割方法

凍結受精卵の分割は、倒立顕微鏡にマイクロマニピコレーター(成茂製)を取り付け、90mmのプラスチックシャーレ内の33%初生子牛血清加リンゲル氏液の小滴中に凍結融解後グリセリンを除去した受精卵を入れ、実施し

※現畜産課、※※現東部家畜保健衛生所

牛の受精卵移植実用化に関する試験Ⅴ

た。分割方法は、松本ら¹⁾の方法に従った。切断刃は刃先角度が水平面に対して15度のマイクロブレード(フェザー社製)をマイクロマニピュレーターに取り付け、受精卵の内部細胞塊(1CM)の中央部に刃の先端部を保持し、垂直方向に徐々に下げ、受精卵をシャーレの底に圧迫して分割を行った。しかし、圧

迫のみで切断できなかった場合には、水平方向に刃を引き分割した。

3. 移植方法

分割した受精卵は、分割比率を分類した後再び透明帯に收容することなく、受卵牛(ホルスタイン種経産牛)10頭の黄体側子宮角に1対ずつ移植した。

結 果 及 び 考 察

1. 受精卵の分割状況

50:50に均等分割に成功したのは10卵中4卵(40%)で、富永ら⁶⁾の報告よりその割合は若干高かった。(表1)その他の分割状況は45:55が3卵、40:60が3卵であった。

今回の供試卵は全て凍結卵であったため、凍結融解過程で障害が大きい卵は、変性部分が均等分割を阻害する場合があった。

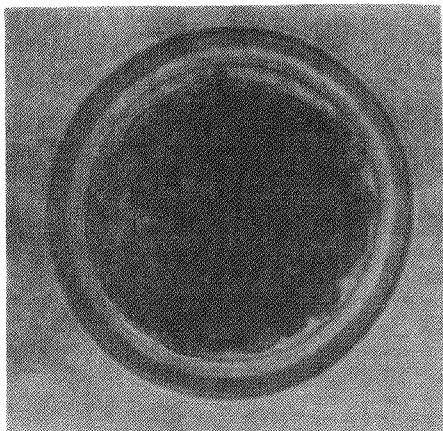
また、発育ステージが全て早期胚盤胞期の

ものであり、透明帯が固く、卵の固定が難しい場合もあったが、牛島ら²⁾の報告したブローナーゼ処置を行うことなく、シャーレ底面にあらかじめ別の微細刃で溝状のキズを付け、その上に卵を置けば、容易に刃のみでも固定できた。しかし、近藤ら⁵⁾の報告による、切断後刃の両側面に受精卵がしばしば付着して、取りはずしに時間を要することがあった。

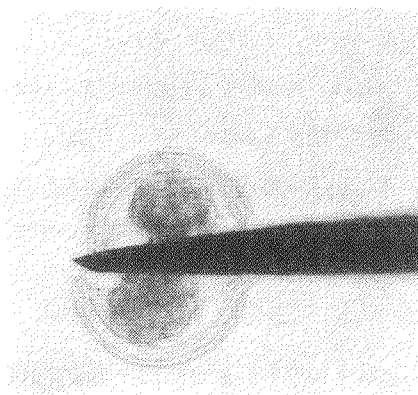
表1 分割比率と移植成績

卵No.	分割比率	分割前の品質と発育ステージ	移植成績	分娩状況	備考
1	50:50	E B A			畜試牛
2		E B A	妊娠	双子(♂)体重 20.6kg, 20kg	〃
3		E B A'	妊娠	単子(♀) 18kg	〃
4		E B A'			〃
5	45:55	E B A			畜試牛
6		E B A	妊娠	単子(♂) 27kg	農家牛
7		E B A			畜試牛
8	40:60	E B A'			畜試牛
9		E B B			〃
10		E B B	妊娠	単子(流産)	農家牛

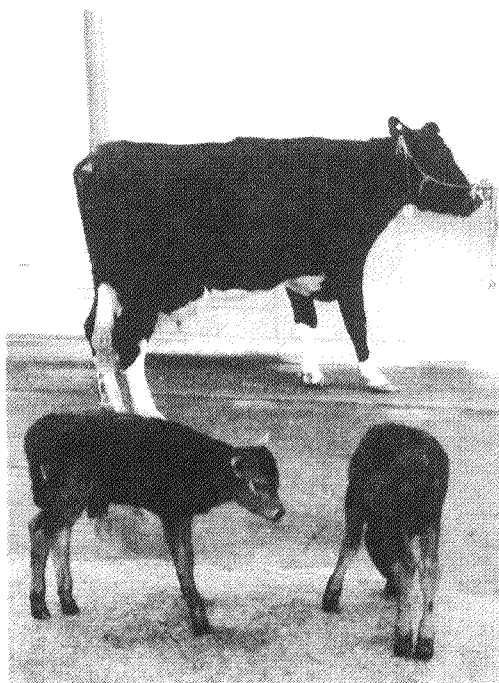
注) 受精卵は、昭和63年3月25日から6月16日までに採卵、凍結処理し、昭和63年4月19日から8月17日までに融解、分割及び移植を実施した。



No. 2 胚 凍結融解後 分割前



No. 2 分割直後



No. 2 胚 分割, 移植後
分娩した受卵牛と双子
(畜産試験場・平成元年 1 月 17 日分娩)

2. 移植成績

分割卵の移植は、10頭のホルスタイン種経産牛の黄体側に一对の分割受精卵を移植した結果、4頭が受胎（受胎率40%）し、そのうち分娩したものが3頭で、流産が1頭であった。（表1）分娩した3頭のうち、双子を分娩したものが1頭（双子率25%）であり、2頭が単子分娩であった。今回の分割方法では、50：50の均等分割成功率が40%であったのに対し、双子率は25%と若干低かった。（1頭双子分娩／4頭受胎）これは、双子生産のためには、将来胎児を形成するICMを確実に均等分割する必要がある。今回はEBばかりで、中には胞胚腔形成が不十分な受精卵もあり、見かけ上は均等分割できていても、必ず

しもICMを2等分できていない場合もあったためと思われる。

今回の移植は、透明帯への再封入を行わずに移植したが、凍結融解後に分割、移植したことを考慮すれば40%の受胎率は低い受胎率でもなく、透明帯への再封入の必要はないものと考えられる。

また、片側に一对の分割卵を移植し、受牛4頭中1頭に流産がみられたが、双子生産を試みる場合、通常の2卵移植では両側2卵移植より片側2卵移植の方が事故率が高いという報告^{3,4)}があるので、今回のような分割卵移植および、2卵移植による双子生産を目的とする場合には移植方法の検討、流・死産防止法等の技術の検討が必要である。

引用文献

- 1) 松本和也ら：家畜繁殖学雑誌33(1)1-5(1987)
- 2) 牛島 仁ら：千葉県畜産センター報告10, 7-9(1986)
- 3) 鈴木達行：畜産の研究42(6), 695-700(1988)
- 4) " : " 42(7), 809-812(1988)
- 5) 近藤正治ら：徳島県畜試研報28, 4-8(1987)
- 6) 富永敬一郎ら：兵庫県立中央農業技術センター報告25, 19-22(1989)