

牛の胚移植技術要因の受胎率への影響

村田宏之・神山佳三・井上貢・田島敏夫・原康弘*・千葉耕司

Influence of various Factors on Bovine Embryo Transfer Techniques in Conception Rate

Hiroyuki MURATA, Yoshimi KOHYAMA, Mitsugu INOUE
Toshio TAJIMA, Yasuhiro HARA * and Koji CHIBA

要 約

牛の凍結胚移植の受胎率を向上させるため、移植方法（移植操作時間・発情後の日数・移植者の個人差）の各要因と受胎率の関係について、ホルスタイン種未経産牛 961 頭に実施した黒毛和種体内受精凍結胚移植成績をとりまとめ、同時期に行った新鮮胚移植と比較検討した。得られた結果は以下のとおりである。

1. 移植器を受胎牛膈内に挿入後から移植完了までに要した移植操作時間を 4 分間未満、4 分間以上～6 分間未満、6 分間以上の 3 区に分類し、それぞれの受胎率を比較した。凍結胚移植においては時間の経過に従い各区で受胎率は低下し、4 分間未満区と 6 分間以上区間に有意な差が見られたが、新鮮胚移植は各区とも時間の経過による差は見られなかった。
2. 胚移植全体における受胎牛の発情後の日数別（6～8 日目）の移植操作時間出現率に差は見られなかった。また、上記の移植操作時間及び発情後の日数別受胎率を比較すると、凍結胚移植においては日数の経過により低下する傾向がみられ、6 分間以上区においては 6 日目および 7 日目と 8 日目の間に有意な差が見られたが、新鮮胚移植においてはこれらの差は見られなかった。
3. 本試験を実施した 12 名の移植者について受胎率を比較したところ、凍結胚移植では移植者間に有意差を認めたが、新鮮胚移植では移植者間に差は見られなかった。

緒 言

千葉県内における牛の胚移植では、黒毛和種やホルスタイン種に過剰排卵処置を施し、7 日目に胚を回収した後、発情が一致したホルスタイン種受胎牛に移植し、新鮮胚では 50% 以上の受胎率を得ている。しかし回収胚と受胎牛に過不足が生じることが多く、一部の胚は凍結保存して移植せざるを得ないが、新鮮胚と同程度の受胎率が求められている。そこで凍結胚の受胎率を、新鮮胚の受胎率 50～60% に近づけるため、受胎に影響を及ぼす各種要因（移植操作時間・受胎牛の発情後の日数・移植者の個人差）と受胎率の関係について検討した。

材料及び方法

調査は、当センター市原乳牛研究所で実施したホルスタイン種未経産牛 961 頭の胚移植成績を用いた。

1. 調査期間

1997 年度～2001 年度の 5 年間とした。

2. 移植胚

当所繋養の黒毛和種供胚牛に過剰排卵処理後、発情後 7 日目に非外科的に子宮還流液を回収し、倒立顕微鏡下で、変性細胞割合 10% 以下を A、10～30% を B、30～50% を C、50% 以上を D とする胚のランク付けを行った。胚の凍結には A ランク胚を用い、新鮮胚移植には A 及び B ランク胚を用いた。凍結融解法はダイレクト・トランスファー法であり、耐凍剤は 1.8 M エチレングリコール（牛胚移植用凍結保存液：機能性ペプチド研究所）を用いた。

* 現千葉県中央家畜保健衛生所
平成 19 年 8 月 31 日受付

記号	形状	基準	記号	形状	基準
A		黄体形状は丸く大きく、黄体実質の充実したもの	A1		黄体形状、黄体実質とも中等度のもの
B		黄体突起部から実質にかけ内腔が認められるが、黄体実質は中等度に充実しているもの	B1		黄体実質に大きな内腔が認められ、実質の脆弱なもの

図1 受胎牛の黄体分類

3. 受胎牛

群管理された14～15カ月齢、体重350kg前後のホルスタイン種牛(当所第48～57期受託牛)を対象に、自然発情あるいは同期化処置による発情後6～8日目に黄体検査し、図1に示す千葉県畜産総合研究センターの分類によるA, A1, B, B1と評価した牛の中から選定した。これに前述の凍結胚または新鮮胚を頸管経由法により移植した。

4. 調査項目

調査項目は、凍結胚移植における移植操作時間、受胎牛の発情後の日数、移植者の個人差等の各要因と受胎率の関係を調査し、同時期に行った新鮮胚移植成績と比較検討した。

(1) 移植操作時間

移植操作難易度について、移植器を受胎牛膈内に挿入してから移植完了までに要した移植操作時間を指標とし、4分未満、4分以上～6分未満、6分以上の3区に分類して、それぞれの受胎率を比較した。

(2) 受胎牛の発情後の日数

今回の調査対象である胚移植は、すべて受胎牛の発情後6～8日目に実施されたものであるが、各日数に実施された胚移植の移植操作時間を4分未満、4分以上～6分未満、6分以上の3区分に分類して出現率を比較した。

また、移植操作時間及び発情後の日数別受胎率を凍結胚及び新鮮胚移植について比較した。

表1 移植操作時間別受胎率

移植操作時間 (分)	凍結胚移植			新鮮胚移植		
	移植頭数	受胎頭数	受胎率 %	移植頭数	受胎頭数	受胎率 %
<4	286	115	40.2a	191	106	55.5
4～6	109	32	29.4	75	38	50.7
6<	127	34	26.8b	173	96	55.5

注) 異符号間に有意差(小文字: p < 0.05)

表2 発情後の日数別移植操作時間出現率

移植操作時間 (分)	発情後の日数					
	6		7		8	
	移植頭数	出現率 %	移植頭数	出現率 %	移植頭数	出現率 %
<4	121	55.0	287	48.4	69	46.6
4～6	41	18.6	113	19.1	30	20.3
6混	58	26.4	193	32.5	49	33.1
計	220	100	593	100	148	100

(3) 移植者の個人差

移植者の影響を見るために、12名の移植者について、1人で移植作業を完了した事例について受胎率を比較した。

5. 統計処理

Yatesの補正をしたカイ自乗検定を用いた¹⁾。

結果及び考察

5年間に実施したホルスタイン種未経産牛961頭への胚移植受胎率は、新鮮胚で54.7%(240/439)であり、凍結胚で34.7%(181/522)であった。

1. 移植操作時間

表1に移植操作時間別受胎率を示した。凍結胚においては時間の経過に従い各区で受胎率は40.2%、29.4%および26.8%と低下し、4分未満区と6分以上区間に有意な差が見られた。これに対し、新鮮胚は各区とも50%以上であり、時間の経過による差は見られなかった。一般的にダイレクト・トランスファー法による凍結胚移植では、胚は子宮内に注入されるまでの間は凍結防止剤に曝されており、その化学的毒性により生存性が損なわれる危険性があると言われている²⁾。今回の結果は、融解から受胎牛膈内に挿入するまでの約2～3分の経過時間を加えれば、堂地らの融解から移植完了まで11分以上の経過で受胎率が下がるという報告²⁾と概ね同様の結果であった。このことから、凍結胚の移植は短時間に、できれば挿入後4分以内に移植操作を終えることが重要と考えられた。

2. 受胎牛の発情後の日数

表2に受胎牛の発情後の日数別移植操作時間出現率を示した。発情後日数が進むにつれ、黄体の充実による黄体ホルモン値が上昇し、外陰部は緊縮し頸管は細く締まった状態になる。このため胚移植が困難になり、移植完了までに時間がかかることが予想されたが、各発情後日数別の移植操作時間について、4分未満、4

表3 移植操作時間及び発情後の日数別受胎率

移植操作時間 (分)	発情後の日数 (日)	凍結胚移植			新鮮胚移植		
		移植 頭数	受胎 頭数	受胎率 %	移植 頭数	受胎 頭数	受胎率 %
<4	6	72	30	41.7	49	27	55.1
	7	167	69	41.3	120	69	57.5
	8	47	16	34.0	22	10	45.5
4 ~ 6	6	20	10	50.0	21	9	42.9
	7	67	18	26.9	46	27	58.7
	8	22	4	18.2	8	2	25.0
6 混	6	16	7	43.8a	42	22	52.4
	7	78	24	30.8a	115	66	57.4
	8	33	3	9.1b	16	8	50.0

注) 異符号間に有意差 (小文字: $p < 0.05$)

表4 移植者別受胎率

移植者	凍結胚移植			新鮮胚移植		
	移植 頭数	受胎 頭数	受胎率 %	移植 頭数	受胎 頭数	受胎率 %
A	31	17	54.8A	23	16	69.6
B	41	20	48.8a	20	15	75.0
C	31	13	41.9	13	5	38.5
D	34	14	41.2	7	4	57.1
E	37	14	37.8	36	20	55.6
F	19	7	36.8	32	20	62.5
G	74	27	36.5	24	14	58.3
H	29	10	34.5	38	16	42.1
I	35	11	31.4	16	9	56.3
J	49	15	30.6	34	16	47.1
K	43	9	20.9Bb	39	20	51.3
L	7	1	14.3	16	8	50.0

注) 異符号間に有意差 (大文字: $p < 0.01$, 小文字: $p < 0.05$)

分間以上～6分間未満、6分間以上の3区分の出現率を見たところ、有意な差は見られなかった。

また、表3に移植操作時間及び発情後の日数別受胎率を示した。同一移植操作時間区の6、7および8日目間の凍結胚移植においては、4分間未満区で、41.7%、41.3%および34.0%、4分間以上～6分間未満区で50.0%、26.9%および18.2%と日数の経過に従い低下する傾向が明らかとなり、6分間以上区においては43.8%、30.8%および9.1%となり、6日目および7日目と8日目の間に有意な差が見られた。一方新鮮胚移植においてはこれらの差はみられなかった。一般に子宮頸管内の粘液や血液中の補体は、胚の発育性に悪影響を及ぼし受胎率低下の要因の1つと言われている³⁾。今回の凍結胚移植において6分間以上区で8日目の受胎率が顕著に低下した原因としては、8日目の頸管で細く締まった状態のものは、表2より移植器の頸管通過に時間を要する割合が高いことや10分間以上要した割合が8日目に多い傾向にあることから、移植器先端による頸管への損傷が大きくなり、出血度合いが高いものと推察された。また、凍結胚は新鮮胚と比べ外部感作の影響を受けやすく、出血による補体や凍結融解後の凍害防止剤に長時間曝されることにより、胚の生存性が低下したものと推測された。一般に胚の7日目採取は、凍結胚・新鮮胚ともに発情後7日目±1日の6～8日目の移植で、受胎率に大きな変動はみられないという報告³⁾から実施されているが、今回の結

果からは、凍結胚には8日目移植における頸管通過時間と子宮内環境の影響が、より大きく作用されると推測されることから、凍結胚移植においては6～7日目に移植することが望ましいと考えられた。

3. 移植者の個人差

表4に移植者別受胎率を示した。新鮮胚では9名が50%以上の受胎率を得ており、各移植者間に有意な差は認められなかった。一方、凍結胚では50%以上の受胎率は1名、40～50%が3名、30～40%が6名および30%以下は2名と分散しており、特定の移植者間に有意差を認めた。この特定の移植者における移植操作時間出現率を見たところ、受胎率の高い移植者の移植操作時間は低い移植者よりむしろ長い傾向にあった。これらを移植者間の熟練度として移植延頭数との関連を検討したが、一部に移植延頭数との相関傾向が見られたものの、全体としては主要因になりえなかった。この要因については今後さらに究明する必要がある。一般的に移植者間の受胎率に差があることは報告³⁾⁴⁾されており、今回の調査でも同様であり、凍結胚移植においては受胎率の優れた移植者に特定して実施することにより受胎率が向上することが考えられる。今後とも、移植技術の熟練度を高めるため移植者の更なる研鑽が求められる。(表4)

引用文献

- 1) 吉田実(1978) 畜産を中心とする実験計画法: 207 - 208
- 2) 堂地修・山本裕介・嵯峨久光・吉羽宣明・加納直人・前田淳一・宮田幸路・山内昭・富永敬一郎・小田頼政・中島達彦・猪八重悟(1996) 畜産技術: 497. 2 - 11
- 3) 日本家畜人工授精師協会(2001) 家畜人工授精講習会テキスト: 214・229 - 230
- 4) 坂本秀樹・本多巖・菅野美樹夫・篠木忠(2004) 福島県畜産試験場研究報告 12: 3 - 7