

牛受精卵の分割技術確立に関する試験

相沢 健一・小林 俊博・嵯峨 久光・佐々木 茂

(秋田県畜産試験場)

Bisection of Embryos and Production of Identical Twins in the Cattle
 Kenichi AIZAWA, Toshihiro KOBAYASHI, Hisamitsu SAGA and Sigeru SASAKI
 (Akita Prefectural Experiment Station of Animal Industry)

1 はじめに

牛の双子生産は、受精卵移植や低単位ホルモン剤投与による方法などがある。しかし、いずれの方法によっても同性の双子を得る確立は低く、異性双子の場合、フリーマーチンの発生が想定される。これを排除し、しかも受精卵を有効利用する方法として分割による一卵性双子生産の試験を昭和62年度(1987年)から平成2年度(1990年)までの4年間実施したので、その成績について報告する。^{2) 3) 4)}

2 試験方法

(1) 試験期間

昭和62年4月から平成2年3月

(2) 供試卵及び供試受精卵牛

供試卵は当场及び農家繋養の黒毛和種に過剰排卵処置を行い人工授精後7~7.5日目に回収した正常受精卵(後期桑実胚~拡張胚盤胞)A・Bランク80卵を用い、供試受精卵牛は自然発情牛67頭を用いた。

(3) 耐凍剤及び凍結方法

耐凍剤はDulbecco'sのリン酸緩衝液(以下D-PBSと略す)に10%グリセロールを添加、これに10%非働化子牛血清(以下CSと略す)と抗生剤(ペニシリン100iu/ストレプトマイシン100 μ g)を加え受精卵を直接浸漬し、30分のグリセロール平衡後当场の常法により凍結した。

(4) 融解方法及び耐凍剤除去方法

凍結した受精卵は、室温22℃のクリーンルーム内で6~12秒間放置後、37℃温水中に15~25秒間浸漬し融解した。

耐凍剤除去は4段階ステップワイズ法を用いた。

(5) 受精卵分割方法

マイクロマニピレーターに金属製マイクロブレード(フェザー製:ブレード角度30℃)をセットし、受精卵はプラスチックシャーレ(Rax:5221)内ミネラルオイル(スクイブ社)下培養液ドロップに入れ、直接透明帯ごと真上から切断する垂直切断法により2分割した。

(6) 分割卵の処理及び移植

分割した受精卵は、ミネラルオイル下微小滴中で切断面を修復するため、インキュベーター(37℃:5%CO₂飽和湿度中)内で0.5~1.5時間培養した。培養後、金川の判定基準により形態学的に分類し【++】以上の分割卵を両子宮角又は黄体子宮角に移植した。

3 試験結果及び考察

(1) 受精卵の分割状況

受精卵の発育ステージ別分割状況を新鮮卵の成績は表1に、凍結卵は表2に示した。新鮮及び凍結卵共【++】以上のツイン胚作出率は93.8%であった。

表1 新鮮分割卵作出状況

受 精 卵 の 発 育 ス テ ー ジ	供試卵数 (A) (個)	新 鮮 卵 分割卵作出状況(B)		分 割 卵 作出率(%) (B)/(A)×100
		【+++】:【++】	【++】:【+】	
後期桑実胚(C.M)	14	10(71.4%)	3(21.4%)	92.9
初期胚盤胞(E.B)	4	2(50.0)	2(50.0)	100
胚 盤 胞(B)	10	7(70.0)	2(20.0)	90.0
拡張胚盤胞(EX.B)	4	3(75.0)	1(25.0)	100
合 計	32	22(68.8)	8(25.0)	93.8

※分割卵形態判定記号

【+++】内細胞の輪郭鮮明、細胞密度高く分割細胞の大きさ均等
 【++】内細胞の輪郭やや鮮明、細胞密度と大きさやや均等

表2 凍結分割卵作出状況

受 精 卵 の 発 育 ス テ ー ジ	供試卵数 (A) (個)	新 鮮 卵 分割卵作出状況(B)		分 割 卵 作出率(%) (B)/(A)×100
		【+++】:【++】	【++】:【+】	
後期桑実胚(C.M)	15	7(46.7%)	7(46.7%)	93.3
初期胚盤胞(E.B)	25	13(52.0)	10(40.0)	92.0
胚 盤 胞(B)	6	4(66.7)	2(33.3)	100
拡張胚盤胞(EX.B)	2	2(100)	-(--)	100
合 計	48	26(54.2)	19(39.6)	93.8

※分割卵形態判定記号

【+++】内細胞の輪郭鮮明、細胞密度高く分割細胞の大きさ均等
 【++】内細胞の輪郭やや鮮明、細胞密度と大きさやや均等

(2) 分割卵移植成績

新鮮分割卵の移植成績及び子牛生産状況は表3に示すとおりで、受胎率は51.7%(15/29)で双子発生率は58.3%であった。凍結分割卵の移植成績は表4に示したように、受胎率は47.4%(18/38)であった。

(3) 受精卵発育ステージ別移植成績

新鮮分割卵における発育ステージ別移植成績を表5に示した。すなわち、発育ステージが進むにつれて受胎率が高くなる傾向を示した。しかし、双子の生産状況は発育ステージの若い受精卵すなわち拡張胚盤胞より後期桑実胚のほうが双子生産組数が多かった。凍結卵発育ステージ別移植成績は表6に示した。発育ステージ別受胎率は拡張胚盤胞では少数例であるが新鮮卵移植と同様の傾向にあり、双子生産組数も後期桑実胚を分割移植した1頭が1組の双子を生産した。その他10頭は妊娠継続中である。

表3 新鮮分割卵移植成績及び生産状況

年度	新鮮分割卵移植成績			生産状況			
	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)	双子組数	単子頭数	流産頭数	未分娩頭数
62	—	—	—	—	—	—	—
63	6	2	33.3	1	0	1	—
平1	16	10	62.5	5	4	1	—
2	7	3	42.9	1	1	0	1
合計	29	15	51.7	7	5	2	1

() 内数値は双子発生率を示す。

表4 凍結分割卵移植成績及び生産状況

年度	凍結分割卵移植成績			生産状況			
	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)	双子組数	単子頭数	流産頭数	未分娩頭数
62	2	1	50.0	—	1	—	—
63	—	—	—	—	—	—	—
平1	2	0	0	—	—	—	—
2	34	17	50.0	1	3	10	10
合計	38	18	47.4	1	4	10	10

() 内数値は双子発生率を示す。

表5 新鮮卵発育ステージ別移植成績

受精卵発育ステージ	新鮮分割卵移植成績			生産状況	
	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)	双子組数	未分娩頭数
後期桑実胚	13	6	46.2	3	0
初期胚盤胞	4	2	50.0	0	0
胚盤胞	9	5	55.6	3	1
拡張胚盤胞	3	2	66.7	1	0
合計	29	15	51.7	7	1

表6 凍結卵発育ステージ別移植成績

受精卵発育ステージ	凍結分割卵移植成績			生産状況	
	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)	双子組数	未分娩頭数
後期桑実胚	11	4	36.4	1	1
初期胚盤胞	18	9	50.0	0	6
胚盤胞	7	4	57.1	0	3
拡張胚盤胞	2	1	50.0	0	0
合計	38	18	47.4	1	10

(4) 移植子宮角別成績

分割卵の移植子宮角別成績は表7に示した。新鮮分割卵を黄体子宮角に移植したが双子は得られず1頭が単子、1頭が流産であった。しかし、凍結分割卵では1頭が1組の双子を生産した。両子宮角に新鮮分割卵を移植した結果、7頭が双子を生産した。また、凍結分割卵では全て単子であった。分割卵を黄体角及び両子宮角に移植した場合の流

産率は、それぞれ33.3%、21.1%で黄体角に片側移植した方が少数例ながら高い値を示した。

表7 分割卵の移植子宮角別成績

移植子宮角	処理卵別区分	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)	生産状況			
					双子組数	単子頭数	流産頭数	未分娩頭数
黄体角	新鮮卵	4	2	50.0	0	1	1	0
	凍結卵	3	3	100.	1	0	0	2
	小計	7	5	71.4	1	1	1	2
両角	新鮮卵	25	13	52.0	7	4	1	1
	凍結卵	35	15	42.9	0	4	3	8
	小計	60	28	46.7	7	8	4	9
合計		67	33	49.3	8	9	5	11

() 内数値は双子発生率、流産率を示す。

4 ま と め

- (1) 垂直切断法による分割卵作出成績は新鮮卵、凍結卵とも93.8%であった。
- (2) 新鮮分割卵の受胎率は51.7% (15/29)、凍結分割卵では47.4% (18/38)であった。また、双子発生率は新鮮分割卵で58.3% (7/12)、凍結分割卵では未分娩が10頭であるが20.0% (1/5)であった。
- (3) 受精卵の発育ステージ別移植成績は後期桑実胚で受胎率が低い傾向にあった。このことは分割の難易と切断時の細胞のダメージによるものかもしれない。また、双子発生率は発育ステージの若い受精卵で多い傾向にあった。
- (4) 移植子宮角別成績は、黄体角に移植した場合、例数が少ないが、受胎率が高い傾向にあった。しかし、流産率は黄体角移植で33.3%、両角移植21.1%で、黄体角移植でやや高かった。

引 用 文 献

- 1) 金川弘司. 1989. 牛の受精卵(胚)移植. 第2版 16-127.
- 2) 小林俊博, 嵯峨久光, 相沢健一, 与斎俊雄. 1990. 牛受精卵の分割技術確立に関する試験(第3報). 秋田畜試研報5: 27-30.
- 3) 嵯峨久光, 相沢健一, 斎藤昌昭, 与斎俊雄. 1989. 牛受精卵の分割技術確立に関する試験(第2報). 秋田畜試研報4: 37-39.
- 4) 嵯峨久光, 畠山義祝, 杉本宣夫, 与斎俊雄. 1989. 受精卵の分割技術確立に関する試験. 秋田畜試研報3: 51-53.