

ウシ受精卵移植技術の野外実用化試験

石井 孝*・福代 勉**・三代英俊**・森田二郎***

平成元年5月31日受付

Field Trials on the Transplantation of Fertilized Egg in Japanese Black Cattle

Kou ISHII*, Tsutomu FUKUSHIRO**, Hidetoshi MISHIRO**
and Ziro MORITA***

In order to apply the technique of the transplantation of fertilized egg, four Holstein heifers were transplanted Japanese Black-fertilized eggs, in the field on September 28, 1985. The results obtained are as follows. Pregnant recipient Holstein cows were three out of four, and their conception rate was 75%. Three recipients were transplanted two fertilized eggs individually into the same uterine horns in order to obtain twins. Twin pregnancies were two out of three and the conception rate was 66.7%.

One of the produced three cows weighed 35kg. One of twin cows were weighed 26.0 and 30.0kg respectively and both were males. One of other recipient cows was still-birth. Birth weights were 24.5kg male, and 23.9kg female. One of four recipients was transplanted into opposite side of uterine horn which had corpus luteum in ovary. This recipient cow had conceived. Some factors appears to be important to get higher conception rate.

緒 言

近年、牛の受精卵移植技術の応用については、受精卵の凍結保存^{13,14,19}、双子、多胎生産^{1,3,7,9,23}、受精卵の分

割^{12,18,21,29}、遺伝的改良^{5,11,16}、性別判定^{13,14,19}、卵子の体外受精^{6,8,10,24}、および不妊・繁殖障害の究明^{13,14,19}、など多方面に及んでいる。

これらの基礎技術の実用化を図るため、昭和60年度よ

* 島根県出雲家畜保健衛生所

* Izumo Livestock Hygiene Service Center

** 島根県立畜産試験場

** Shimane Prefectural Livestock Experimental Station

*** 鳥取大学農学部獣医学科畜産学研究室

*** Department of Veterinary Science, Faculty of Agriculture, Tottori University

り牛の受精卵移植技術利用促進事業を始め、牛受精卵の移植技術を確立するための野外での移植を実施したのでその概要を報告する。

材料と方法

1. 供卵牛

(1)供卵牛の選択

島根県立畜産試験場に繋養している黒毛和種を用いて2回以上正常発情を起したものに過排卵処理を行った。

受精卵の採取と移植の方法¹⁷⁾については第1図に示すとおりである。

(2)過排卵処理法と発情誘起

現在の過排卵処理の方法については、第1表に示す方法が主として行なわれているが、今回はFSH減量法は供卵牛の発情後9～14日目の黄体期に発情発現まで1日2回朝夕にかけて4～5日間連続して筋肉内投与した。投与量は1日目に5mgずつで2日目に4mgずつ3日目に3mgを投与した。

年令の多いものについては若干増量し投与した。PMS法は投与開始日は同じであるが、第1日目に3,000～3,

500IUを1回投与した。

発情誘起は処理開始から48時間経過後、プロスタグランディン(PGF2α)を30mg1回投与し、翌日からパドックへ出しスタンディングによる発情確認を行った。

(3)人工授精

予定発情確認牛について、発情発現後から6～12時間間隔で人工授精を3回実施し授精後5日目に直腸検査による黄体数の確認を行った。

(4)採卵方法

採卵方法は子宮頸管経路法により、供卵牛をあらかじめ保定、洗浄、尾椎麻酔、陰部周囲の消毒をし、人体用の風船付導尿管を一部加工したバルーンカテーテル(2way)に内芯を入れ子宮角内に挿入後、空気を約20ml注入しバルーンを膨らませ子宮角付近に装着し内芯を抜きとった。

(5)灌流液と保存液

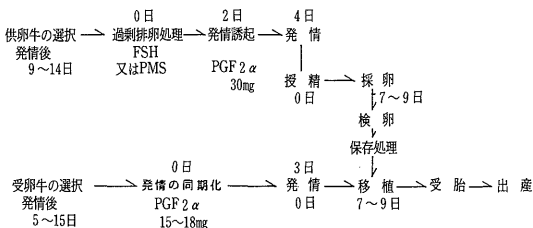
灌流液は修正リン酸緩衝液(PBS)に牛血清アルブミン、ブドウ糖、ピルビン酸ナトリウムを抗生物質としてペニシリンを添加し濾過滅菌をして使用した。また、保存液は上記灌流液と同様なものに牛血清(受精卵培養試験済)を20%添加して用いた。

(6)灌流方法

灌流液を子宮内に30～50ml注入し、子宮内洗浄後メスシリンダーに回収した。灌流は片側子宮角当り5～6回行ない、両側子宮角の灌流液は500～600mlとした。

(7)卵の検索

回収液は、メスシリンダーのまま室温で30分間静置後、サイフォンを用い上部から30分間程度かけて徐々に排液し、底部の液を約100ml程度を残してシャーレ3～4枚に



第1図 受精卵移植の方法

第1表 過剰排卵処理法と発情誘起法

① 過剰排卵処理

下垂体性性腺刺激ホルモン (FSH)

◎ FSH減量法	30～50AU	} 1日1回 4～5日間 投与
FSH同量法	40AU	
FSH:LH減量法	30AU: 6mg	
FSH:LH同量法	40AU: 8mg	

妊馬血清性性腺刺激ホルモン (PMS)

◎ PMSG	2,500～3,000IU	1回投与
--------	---------------	------

② 発 性 誘 起

プロスタグランディン (PGF2α)

◎ 30mg	1回投与
又は 20mg, 15mg	2回投与

移し、実体顕微鏡と倒立顕微鏡下で卵の検索、形態の検査を第2表による分類、判定を行なった。移植可能な受精卵は保存液で数回洗浄後0.25mlの精液用ストローに吸引した。

2. 受卵牛

(1)受卵牛の選択

島根県益田市、市原畜産協同組合および中西酪農組合繋養牛4頭を使用した。

受卵牛については、ホルスタイン種を用い正常発情後5～15日目のものに発情同期化のために、PGF2 α を15～18mg投与し発情発現を確認し、投与後3日目の供卵牛と同日にスタンディング発情をしたものを受卵牛とした。

受卵牛の選択上の留意点としては、性周期を2回チェックし、発情の程度(+, ++, +++)、卵胞の形成(大きさ)排卵の確認、黄体のチェックではその形状、充実度、大

きさ、柔軟さなどをみて性周期の7日目の黄体を検査し、適期に合ったものかどうかを考慮して優秀(A)、優良(B)、普通(C)、不良(D)と判定し、受卵牛を選抜した。

受卵牛の概要は第3表のとおりである。

(2)移植

受卵牛は供卵牛と同様に保定、洗浄、麻酔、消毒をした0.25mlの精液注入器に受精卵を入れたストローを装着した後プラスチックサヤを付け、同様にプラスチックサヤを付けた子宮頸管拡張棒で頸管を拡張した子宮角内へ移植した。移植は昭和60年9月28日に実施した。移植に用いた受精卵の概要は第4表の通りである。

結果および考察

1. 受卵牛の移植成績

移植後の受胎成績は第5表に示した如く、受卵牛4頭中3頭が受胎し、75%の受胎率であった。

第2表 受精卵の分類と判定法

(発育ステージ)		(ランク)		
未受精卵	Non fertilized cell	正 常	Excellent	A
	2 cell		Good	B
細胞期	4 cell		Fair	C
	8 cell		Poor	D
桑実期	Morulla	変 性	Degeneration	E
	Compact morulla			
	Early blastocyst			
胚 胞 期	Blastocyst			
	Expanding blastocyst			
	Hatching blastocyst			
	Hatched blastocyst			

第3表 受卵牛の概要

供試番号	種 類	産 歴	栄 養 度 (栄養状態)	生後月令	備 考
1	ホルスタイン種	未経産	3 (中等度)	18ヶ月	
2	ホルスタイン種	未経産	3 (中等度)	21ヶ月	
3	ホルスタイン種	経産 (2産)	3 (中等度)	3才2ヶ月	60.7 流産
4	ホルスタイン種	経産 (1産)	3-2 (やややせすぎ)	2才	60.7 分娩

第4表 受精卵の概要

受卵牛 番号	受精卵分類 (ステージ)	判定 (ランク)	備考
1	透明帯から脱出した胚盤胞	A	PBS溶液でガス培養・24時間
2	拡張した胚盤胞 小形化した桑実胚	A A	〃
3	初期胚盤胞 初期胚盤胞	A A	〃
4	初期胚盤胞	A	〃

注. 受精卵の判定: 優秀卵 (A), 優良卵 (B), 普通卵 (C), 不良卵 (D)

第5表 受卵牛の移植成績

受卵番 号	黄体形成		注入方法		注入部位		妊否
	左・右	判定 (ランク)	直腸腔法	腔鏡による 直腸腔法	左・右	注入数	
1	右	B	○		左	1	妊娠
2	右	B		○	右	2	〃
3	左	A	○		左	2	〃
4	右	C	○		右	2	否

注. 黄体形成の判定: 優秀 (A), 優良 (B), 普通 (C), 不良 (D)

今回行なった (60, 9, 28実施) 頸管経由法による受精卵移植の受胎率は一般に50~70%であり, 本試験では例数は少ないがこれらより若干良い成績であった。

受卵牛の移植時の黄体の形状, 充実度, 大きさ, 柔軟さなどをみて黄体を判定し, No.1及びNo.2号牛はB, No.3号牛A, No.4号牛Cであり, B以上の黄体形成牛は受胎した。受卵牛の発情確認, 黄体確認が受胎率の向上に結びつくものと考えられる。

注入方法はNo.1号牛は腔鏡を使用して直腸腔法により注入し, 他のNo.2, 3, 4号牛は直腸腔法により注入を行なった。

移植前日, 消毒液による腔洗浄を行なったが, No.2号牛が子宮外口部周囲の腫脹のため, 腔鏡を使用し直腸腔法による頸管経由法による注入 (移植) を行なった。

注入器は, 鈴木ら²⁵⁾の考案されたものを使用したことは, 人工授精用の注入器に滅菌した外筒をつけて外陰部や膺前庭から子宮頸管外口部まで器具を挿入することによって, 細菌汚染防止に効果があり受胎率向上により結果が

あったものと思われる。

注入部位はNo.1号牛を除いてNo.2, 3, 4号牛は黄体存在子宮角に移植した。No.1号牛については, 注入器の挿入時に容易に反対側の子宮角に入ったので黄体存在子宮角の挿入を中止した。

移植部位については, 通常は受卵牛の黄体存在角 (排卵角) に実施することになっているが, WILLETTら (1951)²⁷⁾ は受精卵移植による最初の産仔は排卵のあった反対側の子宮角に移植したものであり, 反対側に移植しても受胎すると報告している。

今回No.1号牛は黄体存在角の反対側に挿入して受胎したことから, 挿入が容易な子宮角にできるだけ早く確実に挿入すれば受胎に悪影響がないものと示唆された。

No.4号牛は, 注入器の子宮頸管通過がやや困難であったことと, 子宮角の下垂により注入器の挿入に手間取ったため何らかの影響があったものと思われる。

今後, 子宮頸管の通過性の難易, 注入部位等の技術について検討する必要がある。

移植の難易度についてはWRIGHT (1981)³⁰⁾によれば子宮頸管の通過性による受胎率で、容易59.0%、中等度57.0%、困難50.0%であり、有意な受胎率の低下はみられていないと報告している。

又、BOLANDら (1976)²⁾は受胎率で子宮頸管通過性容易のもの32.0%、困難なもの17.0%であると報告し、BOWEN (1978)⁴⁾も子宮頸管通過性の容易のもの20.0%、困難のものは0%の受胎率であったと報告している。

このことから、子宮頸管の通過性の難易のみでなく、挿入操作上の影響（子宮内膜の損傷）が受胎に影響をもたらすものと考えられる。

その他に、受卵牛の黄体形成、受精卵の発育ステージとランクにより受胎に及ぼすものと考えられる。

今回、双子生産の試みとしてNo.2号牛、No.3号牛、No.4号牛に受精卵をそれぞれ2ヶを同一子宮角（片側子宮角）に移植した。その結果受胎したのは2頭であり、No.2号牛は双子（ともに雄）を正常分娩した。No.3号牛については、分娩予定日より約1ヶ月早く双子（雄と雌）を分娩した（死産）。

受精卵移植による双子生産については、手術的移植が非手術的移植（子宮頸管経由法による移植）よりも受胎率が高いといわれている。手術的移植で、ROWSON²³⁾(1971)は片側子宮角への2卵移植で15頭に移植して66.6%が受胎し、このうち50%が双子であった報告をしている。

非手術的移植による双子生産については、片側子宮角への2卵移植した報告は、OZILら²⁰⁾(1982)、WILLIAMSら²⁸⁾(1983)およびLAMBETH¹⁵⁾(1983)が人為的分割した受精卵を2個ずつ片側子宮角へ移植した結果、双子生産率は25～64%の範囲であると報告している。

今回3頭の受卵牛に2個卵を片側子宮角に移植して双子妊娠率は66.7%であり（2頭）、正常分娩率50%であった（1頭）。

今後、受精卵移植による双子生産については、双子妊娠率、正常分娩率を高めるため、受精卵及び受卵牛について十分検討する必要がある。

2. 受卵牛の分娩状況

受卵牛4頭に受精卵を移植し、そのうち3頭が受胎し、その分娩状況は第6表のとおりである。

No.1号牛は雄で生時体重は35.0kgであり、No.2号牛は双子（雄）で、おのおの生時体重26.0、30.0kgであり、1頭が若干体重が低かった。No.3号牛は分娩予定日より約1ヶ月早く分娩したが、死産であった。この受卵牛は双子（雄雌）であり、分娩時の体重は、雄24.5kg、雌23.0kgであった。No.3号牛の1ヶ月早く死産した原因については不明である。

双子生産の技術において、産子が同一性、異なった性の場合の妊娠経過、分娩状況等について例数を増やして究明する必要がある。

総 括

牛受精卵移植技術の実用化を図るため、昭和60年9月28日野外において受卵牛4頭（ホルスタイン種）に黒毛和種の受精卵の移植を行なった。その結果は次のとおりである。

1. 受卵牛の移植成績は、受卵牛4頭中3頭が受胎し、75%の受胎率であった。
2. 双子生産の成績は、3頭の受卵牛に受精卵をそれぞれ2ヶを同一子宮角（片側子宮角）に移植した。双子妊娠は3頭中2頭であり、双子妊娠率は66.7%であった。
3. 受卵牛の分娩状況は、受卵牛3頭のうち、1頭は生時体重35.0kg、双子生産した受卵牛の1頭は生時体重26.0kg、30kgでいずれも雄であった。他の受卵牛1頭

第6表 受卵牛の分娩状況

受卵牛 番号	移植年月日	(分娩予定月日) 分 娩 月 日	性別	生時体重 kg	備 考
1	60. 9. 28	(61. 7. 5) 61. 7. 8	雄	35.0	正常
2	〃	(61. 7. 5) 61. 6. 28	雄 雄	26.0 30.0	正常・双子
3	〃	(16. 7. 5) 61. 6. 4	雄 雌	24.5 23.0	死産・双子
4	〃	(—)	(—)	(—)	不妊

は、分娩予定日より1ヶ月早く分娩したが、死産であった。分娩時の体重は雄24.5kg、雌23.0kgであった。

4. 受卵牛4頭のうち、1頭は黄体存在角の反対側に移植し受胎した。

移植時、注入器の挿入が容易な子宮角にできるだけ早く、確実に移植すれば受胎に悪影響がないものと示唆された。

5. 受胎生を高めるには、供卵牛の正常卵の採取数、受精卵の発育ステージとランクおよび受卵牛の選択するうえ、黄体のチェック(形状、充実度、大きさ、柔軟)し、移植の適期に合ったものかどうかを検討し、受卵牛を選択し移植を行なうことが受胎性を高める要因と思考された。

今回は、例数が少ないので今後例数を増やし、受胎率の向上および正常分娩率を高める対策を究明したい。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御協力をいただいた島根県益田市、市原畜産協同組合および中西酪農協同組合に対し、深く感謝の意を表す。

文 献

- 1) Boland, M. P. *et al* : Vet. Rec., 99 274 (1975)
- 2) Boland, M. P. *et al* : Theriogenology, 10 175 (1978)
- 3) Bon Durant, R. H. *et al* : Theriogenology, 17 223 (1982)
- 4) Bowen, J. M. *et al* : Theriogenology, 10 89 (1978)
- 5) Bowman, J. C. : Luxembourg EUR, 5491 323 (1975)
- 6) Brakkett, B. G. *et al* : Biol. Reprod., 24 173 (1981)
- 7) Bruce, D. *et al* : Theriogenology, 21 117 (1984)
- 8) Critser, E. S. *et al* : Theriogenology, 25 164 (1986)

- 9) Gordon, I. *et al* : J. Agric. Sci., 59 143 (1962)
- 10) Hanada, A. : 畜産コンサルタント, 6 10 (1986)
- 11) Hill, W. G. and Land, R. B. : Luxembourg EUR, 5491 355 (1976)
- 12) Hoppe, R. W. and Barister, B. D. : Theriogenology, 19 391 (1983)
- 13) 金川弘司 : 日獣会誌, 33 363 (1982)
- 14) 金川弘司 : 牛の受精卵移植. 近代出版, 東京 (1984) pp. 104-115
- 15) Lambeth, J. C. *et al* : Theriogenology, 20 85 (1983)
- 16) Land, R. B. and Hill, W. G. : Anim. Prod., 25 1 (1975)
- 17) 三代英俊ほか : 島根畜試報告, 20 27 (1984)
- 18) Nieman, H. *et al* : Theriogenology, 25 519 (1986)
- 19) 日本家畜人工授精師協会 : 家畜人工授精講習会テキスト (家畜受精卵移植編). 東京 (1985) pp. 3 ~5
- 20) Ozil, J. P. *et al* : Vet. Rec., 110 126 (1982)
- 21) Roie, R. W. *et al* : Theriogenology, 25 192 (1986)
- 22) Rowe, R. F. *et al* : Am. J. Vet. Res., 41 1024 (1980)
- 23) Rowson, L. E. *et al* : J. Reprod. Fertil., 25 261 (1971)
- 24) Sirard, M. A. *et al* : Theriogenology, 25 198 (1986)
- 25) 鈴木達行ほか : 日獣会誌, 35 388 (1982)
- 26) 高橋芳幸ほか : 家畜繁殖誌, 28 30 (1982)
- 27) Willett, F. L. *et al* : Science, 113 247 (1951)
- 28) Williams, J. J. *et al* : Proc. IXth Ann. Intle. T. Soc., Colorado State Univ., abstr. 45 (1983)
- 29) Williams, J. J. *et al* : Theriogenology, 22 521 (1984)
- 30) Wright, J. M. : Theriogenology, 15 43 (1981)

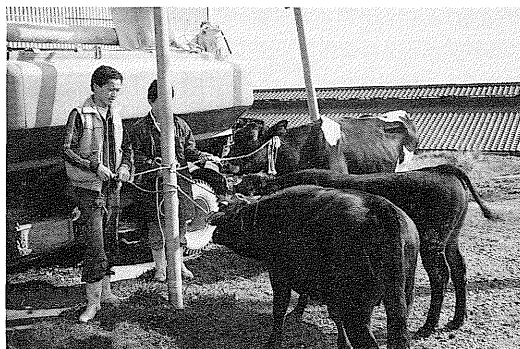


写真1 : 和牛受精卵をホルスタイン母牛に移植して生産された双子