食肉処理場で採取した卵巣を用いた牛体外受精胚作出過程での細菌分離と細菌汚染が体外受精胚の発生能に及ぼす影響

内布 幸典・増岡 和晃¹⁾・堤 尚三¹⁾
小森 敏宏¹⁾・音井 威重²⁾

福岡県中央家畜保健衛生所 〒816 福岡市博多区井相田2-1-3

¹⁾ 福岡県北九州家畜保健衛生所 〒800-02 北九州市小倉南区中吉田3-20-13

²⁾ 徳島県肉畜試験場 〒774 徳島県阿南市下大野町渡り上り

要 約 牛体外受精胚の作出過程で用いた卵巣輸送用の生理食塩液、卵巣洗浄液、卵子吸引液、成熟培養液、媒精後2日目および8日目の発生培養液にペニシリン(PC)+ストレプトマイシン(SM)を添加した区並びに無添加の区を設け、それぞれについて細菌の分離および分離菌株の薬剤感受性の検討を行い、併せて体外受精胚の卵割率と胚盤胞への発生率を比較した。PC+SM添加区の卵巣輸送液および卵巣洗浄液からは、 $10^1 \sim 10^3$ Colony Forming Units (CFU) / ml の細菌が分離されたが、それ以降の卵子吸引液および各培養液からは分離されなかった。一方、無添加区においては、発生培養液を含む全供試材料から、 $10^1 \sim 10^6$ CFU / ml の細菌が分離された。また、卵巣輸送液から分離された細菌は、グラム陰性桿菌が主体を占め、その中でも腸内細菌が優勢で、分離菌株の多くは、ペニシリン系、マクロライド系、テトラサイクリン系、セフェム系に耐性を示した。PC+SM添加区の体外受精胚の卵割率および発生率は、抗生物質無添加区に比べ有意に高い値を示した($P < 0.01$)。以上から、体外受精胚作出過程におけるPC+SMの添加は、細菌の除去並びに胚の発生に有効であることが示されたが、PCおよびSMに対し耐性を示す細菌が分離されたことから、胚による病原細菌の伝播を防御するためには抗菌範囲の広い抗生物質の選択が必要であることが示唆された。

キーワード：Antibiotics, Bacteria, Bovine oocyte, *In vitro* development.

(*Journal of Reproduction and Development*, 42 : j1-j6, 1996)

近年、牛体外受精技術は、肉用肥育素牛を経済的、かつ効率的に増産できることから、国内において積極的な取り組みがなされている。一方、本技術は屠畜牛由来の卵巣を利用することから、卵子の処理および胚の発生過程において病原微生物感染の危険にさらされている。体内受精胚においては、細菌もしくはウイルスの胚に対する付着能または洗浄による清浄化を検討した研究〔1-4〕が多くなされてきたが、牛の体外受精胚についての報告は少ない。そこで本研究では、

牛体外受精胚の作出過程における細菌汚染の実態を確認するため、卵巣輸送に用いた生理食塩液、卵子採取後から胚発生までに用いた修正リン酸緩衝液および培養液から細菌の分離を試み、分離した菌株の薬剤感受性を検討した。

また、体外培養過程での細菌汚染が受精胚の卵割率、胚盤胞への発生率に及ぼす影響についても検討した。

材料と方法

体外受精胚の作出

北九州市立食肉センターで屠殺されたホルスタイン

種および黒毛和種の卵巣を、内臓検査台上で切り取り、30～33℃に保温した滅菌生理食塩液（卵巣輸送液）に浸し、1時間の行程で実験室まで輸送した。実験室に到着後、新しい滅菌生理食塩液（2L；卵巣洗浄液）で卵巣をもみ洗いし、この間洗浄液交換を5回行った。次いで卵巣表面を滅菌紙タオルで清拭し、0.3%牛血清アルブミン加修正りん酸緩衝液（mPBS）を約1 ml吸った18Gの注射針の付いた5 ml滅菌シリンジを用いて卵巣から卵子を吸引した。採取した卵子はmPBSおよび5%牛血清（CS）を添加した25 mM HEPES緩衝TCM-199（成熟培養液）でそれぞれ2回洗浄し、成熟培養に供した。体外成熟、媒精および培養は、梶原ら〔5〕の方法に準じて行った。なお、体外受精に使用した精液は家畜改良事業団所有の熱富士を用いた。

媒精後、成熟培養に供した4穴シャーレを用いて発生培養を行った。発生培養液は、25 mM HEPES緩衝TCM-199に10%CSを添加した液とした。媒精48時間後に発生培養液の交換および胚の裸化を行い、体外受精胚の卵割率を検査した。培養は媒精日を0日として8日目まで行い、媒精後8日目に、初期胚盤胞から脱出胚盤胞に発育した数を記録した。なお、卵割率および発生率の有意差検定は χ^2 検定で行った。

抗生物質添加の有無による分離細菌の数と種類および胚の発生率を比較するために、卵巣輸送液、卵巣洗浄液、卵子吸引液、成熟培養液、精子処理液および発生培養液にペニシリン（PC；100IU/ml）＋ストレプトマイシン（SM；100 μ g/ml）（以下、PC＋SM）を添加した区と無添加区の2群を設けた。

細菌検査

1) 供試材料

卵巣輸送液および輸送後、滅菌生理食塩液で5回液を交換した最終の卵巣洗浄液、卵巣から卵胞液を吸引し試験管に移動後のmPBSを含む上澄み液（卵子吸引液）、卵子を採取後20～24時間培養した成熟培養液、媒精後2日目および8日目の発生培養液について細菌の分離を試みた。

2) 細菌の分離

供試材料を5%馬血液加トリプトソイ寒天培地、デスオキシコーレイト寒天培地、卵黄加マンニット食塩寒天培地、ハートインヒュージョンブイヨンを用い39℃、5%CO₂、95%空気の条件下、24～48時間培養を行った。細菌数は、3枚の5%馬血液加トリプトソイ寒天培地上に現われたコロニー数を計測し、その平均を求めた。

なお卵巣輸送液からの分離菌について、グラム染色による鏡検およびアビ20E・アピスタフシステム（シントック社）により生化学的性状の同定を行った〔6〕。

3) 薬剤感受性試験

抗生物質添加区および無添加区の卵巣輸送液からの分離菌のうち、*Escherichia coli* (*E.coli*) 10株、*Enterobacter cloacae* (*Ent.cloacae*) 8株、*Proteus vulgaris* 4株、*Salmonella* spp. 4株、*Pseudomonas aeruginosa* (*Ps.aeruginosa*) 5株、*Acinetobacter* spp. 4株、*Staphylococcus capitis* (*St.capitis*) 6株、*Staphylococcus epidermidis* (*St.epidermidis*) 3株、*Staphylococcus aureus* (*St.aureus*) 2株の計46株について、ベンジルペニシリンカリウム（PCG）、クロキサシリンナトリウム（MCIPC）、ジクロキサシリンナトリウム（MDIPC）、アンピシリン（ABPC）、アモキシシリン（AMPC）、メシリナム（PMPC）、硫酸ストレプトマイシン（SM）、硫酸カナマイシン（KM）、硫酸フラジオマイシン（FRM）、硫酸ゲンタマイシン（GM）、エリスロマイシン（EM）、オレアンドマイシン（OL）、スピラマイシン（SPM）、塩酸テトラサイクリン（TC）、塩酸オキシテトラサイクリン（OTC）、セファゾリン（CEZ）、セフロキシムナトリウム（CXM）、チアンフェニコール（Tp）、コリスチン（CL）の薬剤に対する感受性を感受性ディスク用培地－N（ニッスイ）を用い感受性ディスク（昭和）により実施した。感受性は昭和ディスクユーザーズマニュアルにより－～++++の4段階に区分し、++以上を感受性を有する菌株と判定した。

結 果

細菌分離

PC＋SM添加区においては、卵巣輸送液から $1.8 \times 10^2 \sim 8.5 \times 10^3$ Colony Forming Units (CFU/ml)の範囲で、また卵巣洗浄液からは、 $1.0 \times 10^1 \sim 1.3 \times 10^2$ CFU/mlの範囲で細菌が分離された。しかし、卵子吸引液、成熟培養液、発生培養液からは細菌が検出されなかった。一方、抗生物質無添加区において卵巣輸送液から、 $6.4 \times 10^3 \sim 8.5 \times 10^4$ CFU/mlの範囲で、また卵巣洗浄液から、 $1.1 \times 10^2 \sim 3.5 \times 10^3$ CFU/mlの範囲で細菌が分離された。それ以降の卵子吸引液および成熟培養液からも細菌が分離され、媒精後8日目の発生培養液からは、 $3.7 \times 10^3 \sim 2.6 \times 10^6$ CFU/mlの範囲で細菌が分離された（表1）。

分離細菌の性状

グラム陰性桿菌が主体を占め、その中でも特に腸内細菌類が全体の52.8%と優勢であった。またPC＋SM添

加区からグラム陽性菌は分離されなかった（表2）。

分離細菌の薬剤感受性

ペニシリン系では、46株中ABPC：18株、AMPC：19株およびPMPC：22株に感受性の低下が認められた。マクロライド系では、EM：27株、OL：34株およびSPM：33株が、テトラサイクリン系では、TC：15株およびOTC：15株が、またセフェム系では、CEZ：25株

およびCXM：19株に感受性の低下が認められた。その他の抗生物質においても、TP：32株およびCL：26株に感受性の低下が認められた。一方、アミノグリコシド系では、感受性の低下は、SM：15株、KM：8株、FRM：9株およびGM：3株に認められた。特にGMは46株中43株（93.5%）に薬剤感受性を有していた（図1）。

表1. 牛の体外受精胚作出過程における細菌分離

処理区		卵巣輸送液	卵巣洗浄液	卵子吸引液	成熟培養液	発生培養液(媒精後)	
						2日目	8日目
P C + S M 添加区	(1)	8.5×10^3 *	1.3×10^2	ND**	ND	ND	ND
	(2)	3.9×10^2	2.0×10^1	ND	ND	ND	ND
	(3)	2.1×10^2	3.0×10^1	ND	ND	ND	ND
	(4)	1.8×10^2	1.0×10^1	ND	ND	ND	ND
抗生物質 無添加区	(1)	8.5×10^4	3.5×10^3	2.7×10^2	6.4×10^5	3.7×10^6	2.6×10^6
	(2)	9.2×10^3	2.3×10^2	9.0×10^1	7.6×10^3	2.7×10^3	4.9×10^4
	(3)	7.8×10^3	1.1×10^2	4.0×10^1	6.1×10^3	3.1×10^3	4.8×10^4
	(4)	6.4×10^3	1.7×10^2	3.0×10^1	1.0×10^1	8.2×10^2	3.7×10^3

*CFU/ml

**ND；菌分離陰性

表2. 卵巣輸送液から分離した細菌の種類

菌 種	株 数 (%)		
	計	P C + S M添加区	抗生物質無添加区
腸内細菌科に属するグラム陰性桿菌	28 (52.8)	8 (61.5)	20 (50.0)
<i>Escherichia coli</i>	10	3	7
<i>Enterobacter cloacae</i>	8	3	5
<i>Proteus vulgaris</i>	4		4
<i>Salmonella spp.</i>	4	2	2
<i>Escherichia fergusonii</i>	1		1
<i>Enterobacter agglomerans</i>	1		1
グラム陰性桿菌	10 (18.9)	5 (38.5)	5 (12.5)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	3	2
<i>Acinetobacter spp.</i>	4	1	3
<i>Kluyvera spp.</i>	1	1	
グラム陽性球菌	15 (28.3)	0 (0.0)	15 (37.5)
<i>Staphylococcus capitis</i>	6		6
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3		3
<i>Staphylococcus aureus</i>	2		2
<i>Staphylococcus lentus</i>	2		2
<i>Staphylococcus sciuri</i>	1		1
<i>Staphylococcus cohnii</i>	1		1
合 計	53	13	40

図 1. 分離細菌の薬剤感受性

*感受性は昭和ディスク1濃度法による++以上とした。

PCG:ベンジルペニシリン MCIPC:クロキサシリン MDIPC:ジクロキサシリン ABPC:アンピシリン
 AMPC:アモキシシリン PMPC:メシリナム SM:ストレプトマイシン KM:カナマイシン
 FRM:フラジオマイシン GM:ゲンタマイシン EM:エリスロマイシン OL:オレアンドマイシン
 SPM:スピラマイシン TC:テトラサイクリン OTC:オキシテトラサイクリン CEZ:セファゾリン
 CXM:セフロキシム Tp:チアンフェニコール CL:コリスチン

表 3. 体外培養系における細菌汚染が体外受精後の胚の発生能に及ぼす影響

		供試卵数	卵 割 率 % (数)	細 菌 分 離*	胚 盤 胞 %	発 生 率 (数)	細 菌 分 離*
P C + S M 添 加 区	(1)	99	41.4 (41)	ND **	6.1	(6)	ND
	(2)	78	48.7 (38)	ND	14.1	(11)	ND
	(3)	75	45.3 (34)	ND	10.7	(8)	ND
	(4)	95	51.6 (49)	ND	9.5	(9)	ND
	計	347	46.7 (162) ^a	ND	9.8	(34) ^a	
抗 生 物 質 無 添 加 区	(1)	93	10.8 (10)	10 ⁶	0.0	(0)	10 ⁶
	(2)	81	25.9 (21)	10 ³	1.2	(1)	10 ⁴
	(3)	72	25.0 (18)	10 ³	2.8	(2)	10 ⁴
	(4)	90	27.8 (25)	10 ²	0.0	(0)	10 ³
	計	336	22.0 (74) ^b		0.9	(3) ^b	

a,b 同列間の異符号間に有意差あり (P<0.01)

* CFU / ml

** 菌分離陰性

卵割率および胚発生率

PC + SM 添加区および無添加区における体外受精胚の卵割率は、それぞれ 41.4 ~ 51.6 % (平均 46.7 %), 10.8 ~ 27.8 % (平均 22.0 %) で、胚盤胞発生率はそれぞれ 6.1 ~ 14.1 % (平均 9.8 %), 0 ~ 2.8 % (平均 0.9 %) と PC + SM 添加区が無添加区に比べ有意に高い値 ($P < 0.01$) を示した (表 3)。

考 察

本研究では、抗生物質を添加した卵巣輸送液および卵巣洗浄液から、 $10^1 \sim 10^3$ CFU/ml の細菌が分離された。これは、卵巣採取が内臓検査台で行われるため卵巣への細菌汚染の機会が多く、洗浄操作によっても卵巣に付着した細菌を除去することができなかったものと思われる。洗浄液の肉眼的な観察において、洗浄の回数が進むに従い、透明度が増してくるが、細菌数としては有意な差は認められなかった。音井ら [7] は、細菌暴露した未成熟卵子を、抗生物質無添加の洗浄液で 10 回洗浄しても細菌が除去できないことを報告した。本研究においても同様に抗生物質無添加区においては、卵巣輸送液から発生培養液までの全供試材料から、 $10^1 \sim 10^6$ CFU/ml の細菌が分離されたが、PC + SM 添加区においては、卵子吸引液以降の培養液から細菌が分離されなかった。また、卵巣輸送液や卵巣洗浄液に抗生物質を加えることにより、約 1 / 10 以下に細菌数が減少したこと、抗生物質を加えた洗浄液にも細菌が検出されるが、卵子吸引液、成熟培養液には抗生物質を加えることによって細菌が見られなくなることから、体外受精胚作出過程における抗生物質の添加は不可欠のものであることが示唆された。一方、卵巣輸送液は、多種類の細菌によって汚染されており、それらの細菌には PC と SM に対して感受性の低い細菌が存在することが示唆された。卵巣輸送後、滅菌生理食塩液で卵巣を 5 回洗浄することにより、細菌の数および種類は減少したが、卵巣の洗浄が不十分であると、卵子回収液まで多くの細菌によって汚染される危険性があることが示唆された。

このことから、抗菌スペクトルの広い抗生物質の洗浄液および培養液への添加が必須であると考えられた。

牛の体内受精胚において、*Haemophilus somnus*, *Brucella abortus* との共培養により胚の生存性が低下したという報告 [3, 8] がある。本研究においても、胚の発生過程での細菌汚染により、体外受精胚の卵割率、胚盤胞への発生率を有意に低下することが示された。この発育能の低下は、培養液の肉眼的な観察においても、黄

変・混濁や赤変を伴ったことから、培養液中での細菌増殖による培養液の pH の変動および細菌が産出する毒素によるものと推察された [8]。一方、音井ら [7] は体外受精胚の卵割率、胚盤胞への発生率を損なわないためには牛体外受精胚作出過程において有効な抗生物質の添加が必要であることを示唆している。また、Stringfellow ら [9-11] は、透明帯が正常な牛の体内受精胚を、抗生物質の含まない洗浄液で繰り返し洗浄することにより、付着した *Brucella abortus* を除去できるが、透明帯の欠損胚では洗浄による除去が困難であることを指摘している。Thomson や Riddell ら [8,12] は、洗浄液に抗生物質を添加することにより *Haemophilus somnus* を除去できるが *Mycoplasma* は除去できないことを指摘している。加えて、本研究で分離された細菌のうち *Salmonella* は、人畜の感染症として注意を要する細菌であり、高率な薬剤耐性化、多剤耐性化が指摘されている [13]。

これらのことから、体外受精胚生産過程での細菌汚染は、胚発生率の低下だけでなく、胚の移植による受胎率の低下を誘起する可能性があることから、卵巣の採取方法の改善および輸送液中の細菌増殖抑制に有効な抗生剤の添加が重要であると思われる。

謝 辞

卵巣採材にご協力いただいた北九州市立食肉センターの皆様とご校閲を賜った山口大学鈴木達行教授に感謝の意を表します。

引用文献

1. Del Campo MR, Tamayo R, Del Campo CH. A serologic study of the progeny of a *Brucella abortus* seropositive cow. *Theriogenology* 1989;31:1249-1251.
2. Rohde RF, Shulaw WP, Hueston WD, Bech-Nielsen S, Haibel GK, Hoffsis GF. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from washed bovine ova after *in vitro* exposure. *Am J Vet Res* 1990; 51: 708-710.
3. Singh EL. The disease control potential of embryos. *Theriogenology* 1987; 27: 9-20.
4. Stringfellow DA, Lauerma LH, Nasti KB, Galik PK. Trypsin treatment of bovine embryos after *in vitro* exposure to infectious bovine rhinotracheitis virus or bovine herpesvirus-4. *Theriogenology* 1990; 34: 427-434.
5. 梶原 豊, 後藤和文, 小坂昭三, 中西喜彦, 小川清彦. 牛卵胞卵子の体外受精および体外培養によるふ化. 家畜繁殖雑誌 1987; 33: 173-180.
6. Cowan ST. 医学細菌同定の手びき. (井崎利一訳) 東京: 近代出版; 1974.
7. 音井威重, 立川 進, 近藤正治, 鈴木達行. 牛における未成熟卵子の細菌暴露が体外発生能に及ぼす影響. *J Reprod Devel* 1992; 38: j61-j66.

8. Thomson MS, Stringfellow DA, Lauerma LH. Adherence of *Haemophilus somnus* to bovine embryos after *in vitro* exposure. *Am J Vet Res* 1988; 49: 63–66.
9. Stringfellow DA, Howell VL, Schnurrenberger PR. Investigation into the potential for embryo transfer from *Brucella abortus* infected cows without transmission of infection (a,b,c). *Theriogenology* 1982; 18: 733–743.
10. Stringfellow DA, Wolfe DF, Lauerma LH, Sparling PH. Resistance of preimplantation bovine embryos to infection with *Brucella abortus*. *Am J Vet Res* 1986; 47: 1924–1927.
11. Stringfellow DA, Scanlan CM, Brown RR, Meadows GB, Gray BW, Young-White RR. Culture of bovine embryos after *in vitro* exposure to *Brucella abortus* (a,b,c). *Theriogenology* 1984; 21: 1005–1012.
12. Riddell KP, Stringfellow DA, Panangala VS. Interaction of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma bovis genitalium* with preimplantation bovine embryos. *Theriogenology* 1989; 32: 633–641.
13. 中野達郎, 浜岡隆文, 寺門誠致. 牛の病性鑑定材料由来サルモネラの薬剤耐性. *日獣会誌* 1988; 41: 806–808.

Isolation of Bacteria from *In Vitro* Bovine Embryo Production System and Effect of Bacterial Contamination on the Developmental Capacity of *In Vitro* Fertilized Embryo

Yukinori UCHINUNO, Kazuaki MASUOKA¹⁾, Shozo TSUTSUMI¹⁾, Toshihiro KOMORI¹⁾, Takeshige OTOI²⁾

Fukuoka Prefectural Tyuo Livestock Hygiene Service Center, Hakata, Fukuoka 816,

¹⁾Fukuoka Prefectural Kitakyushu Livestock Hygiene Service Center, Kitakyushu, Fukuoka

800-02, ²⁾Tokushima Prefectural Beef Cattle and Swine Experiment Station, Anan, Tokushima 774.

Summary. The objectives of this study were to isolate bacteria from *in vitro* fertilized (IVF) bovine embryo product system with or without antibiotics (penicillin + streptomycin) and to determine whether bacterial contamination affected the development of IVF embryos. 10^1 to 10^3 colony forming units (CFU)/ml of bacteria were isolated from transport medium and wash medium with antibiotics of slaughterhouse derived ovaries, but no bacteria were recovered from subsequent wash medium of oocytes and *in vitro* culture medium. In contrast, 10^1 to 10^6 CFU/ml of bacteria were isolated from all media without antibiotics used in IVF embryo product system. The bacteria isolated from transport medium were mainly gram negative rods and resistant to antibiotics of penicillin, macrolide, tetracyclin and cephem line. The rates of cleavage and development to blastocysts of IVF embryos produced in IVF embryo product system with antibiotics were significantly higher than without antibiotics. It was concluded that effective antibiotics should be added to IVF bovine embryo product system for removing or killing bacteria adhered to ovaries, oocytes or embryos.