48 時間体外培養したウシ受精卵の非手術的移植例

高橋 芳幸・鈴木 達行

(農林水産省日高種畜牧場)

前報¹⁾において、発情後 7 日目に回収したウシ受精卵を試験管内で培養した結果、形態学的には 48 時間目まではほぼ良好な発育がみられることを報告した。しかし、これはあくまでも形態学的な検査による成績であり、体外培養技術を卵の短期間保存法として利用するには培養した卵をウシに移植して、その受胎の有無を確認する必要がある。また培養時間もできる限り長く実施できることが望まれる。体外培養した卵をウシに移植した報告の中でも、48 時間以上培養した卵を移植して受胎したという報告は少ない²⁻⁵⁾。

今回は予備試験として少数例ながら発情後 7 日目に回収した卵を試験管内で 48 時間培養したのち、非手術的に移植した結果、受胎例を得た。また試験管を用いた体外培養法(試験管法)も若干簡略化して実施したので、その成績を報告する。

供用卵は、既報⁶⁾に従って過剰排卵処理をした供卵牛から発情後 7 日目(発情日を 0 日)に非手術的に回収したものである。供卵牛はホルスタイン種未経産牛(13~14 カ月齢)3 頭である。回収された卵のうち正常な形態と認められたものは 16 個であったが、本試験にはこのうち 4 卵(図 1)を使用した。卵の回収には TCM-199 を用い、回収後は培養までの間 BMOC-3 とともに 4~5 時間既報⁶⁾に従って室温に保管した。

卵の体外培養法は、前報¹⁾の試験管法をやや簡略化し、混合ガス(5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂)による培養液の気相平衡を培養前日には実施せずに、培養当日にのみ行った。すなわち卵を培養液で 2 回洗浄したのち、ガラス製の培養試験管(10×75 mm)に 1 ml の培養液とともに入れ、シリコン栓(W 栓)をした。ついで前報¹⁾に従って混合ガスを 1 分間流入したのち、約 46.6 cm H₂O 圧の所で止めて気相平衡を行った。この試験管は 37°C の普通の恒温器に納め、48 時間続けて培養を行っ

た。なお培養液は BMOC-3 に 10% の割合でウシ胎児血清を加え、抗生物質は結晶ペニシリン G カリウムを 1 ml あたり 100 単位添加した。

48 時間体外培養した 4 卵のうち、図 2~4 に示したように、1 卵はすでに脱殻胚盤胞に、また 2 卵は有腔胚盤胞にそれぞれ発育していた。移植にはこの 3 卵を供試した。他の 1 卵は早期胚盤胞であった。

移植は、紙の覆いを付けたストロー精液注入器を用いて、既報⁷⁾に従って非手術的に実施した。受卵牛はホルスタイン種未経産牛(15~16 カ月齢)3 頭を供試し、いずれも黄体の存在する側の子宮角に 1 卵ずつ移植した。これらの受卵牛は供卵牛よりも 1 日早い発情周期のもの 1 頭と、1 日遅い発情周期のもの 2 頭である。

移植後の受胎成績は表 1 に示した通りで、3 頭中 2 頭の受卵牛は移植後 31 日目、52 日目および 104 日目に行った直腸検査によって、順調に妊娠を維持していることが確認された。

これら 2 頭の妊娠例では移植した卵はいずれも透明帯を伴った胚盤胞(図 3, 4)であり、しかも受卵牛は供卵牛よりも 1 日遅い発情周期のものであった。従って 48 時間(2 日間)の体外培養を考慮すると受卵牛は供卵牛よりも 1 日早い発情周期に移植されたことになる。いっぽう妊娠しなかった 1 頭は、すでに透明帯から脱出中の発育の進んだ卵を移植し、しかも受卵牛の発情周期は供卵牛よりも 1 日早く同調されていたので、2 日間の体外培養を考慮すると受卵牛と供卵牛との発情同期化の間には 3 日間のズレを生じたことになる。

体外培養をした卵の移植における供卵牛と受卵牛との発情周期については、SCHNEIDER ら⁸⁾は 6~8 日齢の卵を 24 時間体外培養したのち移植に供し、143 頭中 89 頭(62.2%)が受胎したと報告しているが、これらの受卵牛は供卵牛より 12~36 時間遅い発情周期のものを供用している。また PETERS ら⁹⁾は 7 日齢の卵を 48 時間培養し、3 頭中 1 頭の受胎例を得ているが、この場合も受卵牛の発情周期は供卵牛より 1 日遅い。さらに TROUNSON ら⁴⁾は 6 日齢の卵 26 個を 48 時間体外培養したのち、7~9 日目の発情周期の受卵牛 13 頭にそれぞれ 2 卵

Cervical transfers of bovine embryos cultured for 48 hours.

TAKAHASHI, Yoshiyuki & Tatsuyuki SUZUKI (National Hidaka Livestock Breeding Station, Urawa, Hokkaido 057-01)

Japan. J. Anim. Reprod., 27 (1), 1981.

PLATE

Explanation of plate

(Scale line=0.1 mm)

Fig. 1. Embryos recovered at 7 days after estrus.

Figs. 2-4. Same embryos as in Fig. 1. Developed into hatching blastocyst (Fig. 2) and expanded blastocysts (Figs. 3 & 4). Transferred to each of 3 recipients (see Table 1).

Table 1. Cervical transfers of Day 7 embryos after being cultured for 48 h

Recipient No.	Synchronization from donor* (day)	Stage of embryos transferred	Pregnant**
1	+1	hatching blast.	—
2	—1	expanded blast.	+
3	—1	expanded blast.	+

* In estrus 1 day before (+1) and 1 day after (—1) with donor.

** Diagnosed by rectal palpation at 31, 52 and 104 days after the transfer.

ずつ移植した結果、全体では受胎率が 61.5% (8/13)、卵の生存率が 50.0% (13/26) であったが、発情周期が 8.5~9 日目の受卵牛 5 頭については、受胎したのはわずか 1 頭であったと報告している。これらのことから体外培養した卵を移植する場合には、卵の発育状態と見合った発情周期の受卵牛を選択することが大切な要因ではなかろうかと考えられるが、今回は例数が少ないので今後さらに例数を増加して検討を続けたい。

本試験における体外培養の手技は、前報¹⁾において培養前日に行った混合ガスによる気相平衡を除き、培養直前にのみ気相平衡のため混合ガスを流す方法であり、より実用的な手技と考えられる。また今回は少数例ながら非手術的方法により移植しても 3 頭中 2 頭の受胎が確認され、試験管法を用いて体外培養した卵は前報¹⁾に示したように形態学的に正常に発育するばかりでなく、実際にウシに移植しても受胎性を有することがわかった。従って、この簡易的な体外培養法は受精卵移植における卵の短期間保存法として、あるいは凍結・融解した卵の発育および受胎性の判定法として実用できるものと考えられた。

終わりに、御指導並びに御校閲を賜った北海道大学獣医学部金川弘司博士に深謝する。また卵の回収及び移植にあたり御協力いただいた日高種畜牧場関係者各位に感謝する。

(1980. 12. 8 受付)

文 献

- 1) 高橋(芳): 本誌, 27, 40, 1981.
- 2) TERVIT, H. R., D. G. WHITTINGHAM & L. E. A. ROWSON: *J. Reprod. Fertil.*, 30, 493, 1972.
- 3) SHEA, B. F., R. B. CHURCH & R. TERVIT: *Proc. Soc. Study Reprod.*, 147 (abstr.) 1974.
- 4) TROUNSON, A. O., S. M. WILLADSEN & L. E. A. ROWSON: *J. Reprod. Fertil.*, 47, 367, 1976.
- 5) PETERS, D. F., G. B. ANDERSON, R. BONDURANT, P. T. CUPPS & M. DROST: *Theriogenology*, 10, 337, 1978.
- 6) 高橋(芳): 本誌, 26, 155, 1980.
- 7) 高橋(芳)・鈴木(達)・斉藤(則): 本誌, 27, 45, 1981.
- 8) SCHNEIDER, H. J., Jr., R. S. CASTLEBERRY & J. L. GLIFFIN: *Theriogenology*, 13, 73, 1980.

Summary

Four embryos, collected from superovulated donor heifers 7 days after estrus, were cultured for 48 h by the technique of stoppered test tube with a gas mixture (5%CO₂, 5%O₂, 90%N₂) in BMOC-3+10% FCS. Gassing was done just before culture only. After 48 h of culture, three embryos were developed into one hatching blastocyst and two expanded blastocysts, and they were transferred to each of 3 recipient heifers with ensheathed AI instrument. Two out of 3 heifers were diagnosed as pregnant at 31, 52 and 104 days after the transfer.