—昭和 58 年度佐藤賞受賞講演要旨—

ウシ受精卵移植における非手術的移植に関する研究

高 橋 芳 幸

(農林水産省日高種畜牧場)

ウシの受精卵移植技術は近年著しく進歩し、海外ではいち早く実用化された。いっぽう、本邦においても杉江を中心にして世界に先がけた技術開発や研究が進められ、さらに海外で受精卵移植の実用化に携わった金川により実用技術と多くの研究業績が報告された。しかし、本邦において受精卵移植を実用化し、普及させるためには、本邦の畜産事情に適合した簡易的な技術の開発と確立が望まれた。

本研究を開始した当時 (1976 年)、受精卵を回収する採卵技術は子宮灌流による簡易的な非手術法がすでに普及していた。いっぽう、移植技術は開腹手術を伴う手術法が実用技術として最も一般的に用いられていた。そこで、著者は簡易的で安定した受胎成績が得られる非手術的移植法の確立を目的に検討を重ねた。

主な材料と方法

本研究に供試した牛受精卵は、すべて過剰排卵処理を施した供卵牛から非手術的に回収し、発育および形態がほぼ正常と判定されたものである。供卵牛は、基礎試験ではホルスタイン種の未経産牛を、また応用試験では主にホルスタイン種の育種用基礎雌牛である経産牛をそれぞれ供試した。供卵牛に対する過剰排卵処理および発情の誘起には、PMSG あるいは FSH と PGF_{2α} を使用した。人工授精は、すべて凍結精液を用いて実施した。受精卵の回収は、Foley catheter あるいは 2 way 式採卵器具を用いて、発情周期の 6~9 日目 (発情日 = 0 日) に非手術的に行った。

受精卵の移植は、原則として 1 頭の受卵牛に 1 卵ずつ黄体の確認された側の子宮角に実施した。受卵牛は、自

然の発情周期あるいは PGF_{2α} の投与により、供卵牛との発情日差が前後 1 日以内になるように発情周期を同調したホルスタイン種未経産牛を供試した。移植後の受胎の有無は、供試前の発情日から数えて約 60 日後に直腸検査を行って調べた。

1. 頸管迂回法による非手術的移植試験

杉江らが開発し、本邦で広く利用されていた頸管迂回法を用いて移植試験を行った。供試卵は発情周期の 6~7 日目に回収し、リンゲル氏液に牛血清を添加した保存液で保存および移植した。第 1 回目の試験では、16 卵を 10 頭の受卵牛に 1~2 卵ずつ移植したが、全例不受胎であった。第 2 回目の試験では、44 卵を 24 頭の受卵牛に 1~3 卵ずつ移植した結果、6 頭が受胎した。

本試験成績から、頸管迂回法には熟練を要し、より簡易的な非手術的移植法の検討が必要と考えられた。

2. 人工授精器具を用いた頸管経由法による非手術的移植試験

従来、人工授精のように子宮頸管を経由して受精卵を子宮内に移植する頸管経由法は、移植卵の子宮外への排出あるいは子宮内感染などの原因から、実用化するほどの成果が得られていなかった。しかし、その後発情周期の 5 日目に降に移植を行えば移植卵の排出される危険性が少ないこと、また適当な配慮があれば子宮内感染も不受胎の原因にはなりにくいことが示された。そして、少数ながら好成績の移植報告も見られるようになった。

そこで、人工授精器具を用いた非手術的移植を試みた。

供試卵は発情周期の 7 日目に回収し、BMOC-3 を用いて保存および移植した。移植器具には、金属製の牛用 0.25 ml ストローク注射器を使用した。受卵牛は梓場内に起立保定後、尾椎硬膜外麻酔を施し、外陰部を清拭してアルコール綿花で消毒した。移植に先立ち、予め子宮頸管拡張棒を挿入し、子宮頸管の通過が容易にできることを確認した。移植卵は 0.25 ml ストローク内に吸引し、移植器具にセットした。移植器具は直腸腔法による

Summary of the lecture of the recipient of the SATO Award in 1983.

Studies on non surgical transfer of bovine embryo. TAKAHASHI, Yoshiyuki (National Hidaka Livestock Breeding Station, Urakawa, Hokkaido 057-01)

Japan. J. Anim. Reprod., 29 (3), 1983.

人工授精の要領で頸管を経由して子宮角内に挿入し、無理のない程度に深部に進めたところで受精卵を注入した。

10 頭の受精卵牛に 1 卵ずつ移植した結果、4 頭の受胎が確認され、実用技術としての可能性が示された。

3. 非手術的移植法と手術的移植法の比較試験

頸管経由法および頸管迂回法の 2 つの非手術的移植法と臍部切開による手術的移植法について、著者がすべて術者となって移植を実施し、その受胎成績および術式の難易性を比較した。供試卵は 10 頭の供卵牛から発情周期の 6~7 日目に回収し、BMOC-3 を用いて保存および移植した。それぞれの供卵牛から回収された受精卵は、できる限り 2~3 種類の移植方法に分け、1 頭の受卵牛に 1 卵ずつ移植した。

受胎成績は、海外で最も一般的に利用されていた臍部切開法が 55.6% (10/18) で最も高い受胎率であり、ついで頸管経由法の 31.6% (6/19) および頸管迂回法の 18.2% (2/11) の順であった。術式については、頸管経由法が最も簡便であり、1 頭の移植は 5~10 分間で終了することができた。

4. 頸管経由法における受胎成績の向上要因の検索

頸管経由法は簡易的な非手術的移植法と考えられたが、その受胎成績は手術的移植法に比べて劣っていたため、受胎成績を向上させる要因を検討した。

まず、発情周期の 6~7 日目に移植を実施するよりも少し遅い 8~9 日目に移植を行った場合、良い成績が得られたという報告が見られた。そこで、発情周期の 7~9 日目に移植を行い、移植時期による受胎成績を比較した。しかし、移植時期によって受胎率に差異は認められず、全体で 33.3% (22/66) の受胎率であった。また、保存液も BMOC-3、牛血清加リンゲル氏液および修正リン酸緩衝液を用いて、保存液による受胎成績の比較も併せて行った。修正リン酸緩衝液の pH は、3~5 時間の保存期間でもほとんど変化しなかったが、BMOC-3 の pH は 7.3 から 8.8 まで上昇した。しかし、保存液による受胎成績の差異は認められなかった。

つぎに、頸管経由法における受胎成績が不良な原因として古くから考えられていた子宮内汚染に着目した。すなわち、移植時の子宮内汚染を防止する意味から紙製の覆いを移植器具に付けて子宮頸管外口部まで挿入し、そこで覆いの先端を押し破り器具だけ子宮頸管から先に進めて移植を行った。発情周期の 7 日目に回収した 22 卵を 22 頭の受卵牛に移植した結果、13 頭 (59.1%) が受胎し、受胎成績の向上が認められた。

5. 頸管経由法における子宮内汚染防止効果の検討

頸管経由法の移植操作による子宮内汚染を防止する目的で移植器具に覆いを付けたが、本試験ではその効果を明らかにするため 2 つの実験を行った。

まず、7 頭の供卵牛から発情周期の 7~8 日目に回収した 46 卵を供卵牛ごとに 2 群に分けた。一群は移植器具に紙製の覆いを付けて移植し、他方は覆いを付けずに移植を行った。なお、移植の術者は、すべて著者が行った。その結果、覆いを付けた群では 63.6% (14/22)、覆いを付けずに移植した群では 33.3% (8/24) の受胎率であり、両群の受胎率の間には有意差が認められた。

つぎの実験では、発情周期の 7~9 日目の黄体期のホルスタイン種未経産牛 20 頭を 2 群に分け、一方は移植器具に覆いを付けて、他方は覆いを付けずに移植操作だけを行った。移植器具には BMOC-3 を満たしたストローをセットし、子宮角内まで挿入した。ストロー内の BMOC-3 は子宮角内に注入せずに、移植器具を腔から引き抜いたのち、すばやく滅菌試験管内に採取して検体とした。検体は静置して中の混入物を調べるとともに、牛血液加寒天平板に塗抹して好気および嫌気培養を行った。

検体中の粘液や粘膜の混入は、覆いの有無にかかわらず全例に認められ、混入物の量は両群に差異を認めなかった。細菌学的検査では、覆いを付けた群においては好気培養で 10 頭中 5 頭から、また嫌気培養で 10 頭中 1 頭から細菌が検出された。いっぽう、覆いを付けずに移植した群では、好気培養で 10 頭中 8 頭から、また嫌気培養で 10 頭中 6 頭から細菌が検出され、検出細菌の量も覆いを付けた群に比べて多量であった。

本試験の結果から、著者の使用してきた人工授精器具は外陰部から腔内を通過するときに嘴管内に細菌を取り込む機会が多く、これらの細菌を子宮内に持ち込むこと、また、この細菌の持ち込みは移植器具に覆いを付けることによってかなり防止できることが示された。さらに移植試験の結果と併せると、移植器具に覆いを付けて子宮内への細菌汚染を防止することによって受胎率が向上することが示唆された。

本試験と並行して受卵牛と同じ月齢のホルスタイン種未経産牛の生殖器道内の細菌叢を調査した結果、①子宮頸管内の細菌数は腔内に比べて少ないこと、②腔内の細菌叢は飼養環境で変化すること、③腔内から検出される細菌の抗生物質感受性は多様であることが判った。このことから、子宮内への細菌汚染を防止する方法として、移植器具に覆いを付けて子宮頸管外口部まで挿入する手

技は効果的と考えられた。

6. 頸管經由法の応用移植試験

これまでの試験から、手技の簡便な非手術的移植法である頸管經由法でも移植器具に覆いを付けて子宮内汚染を防ぐことによって、手術的移植法による受胎成績と同程度の成績が充分望めることが示された。しかし、これまでの移植試験は、著者がほとんど術者となって移植を行ってきた。そこで、この移植手技を育種用基礎牛の増殖を目的とした受精卵移植に利用するとともに、多数の技術者に移植の術者を依頼して、その実用性を調べた。

供試卵は、延 33 頭の育種用基礎雌牛から発情周期の 7~9 日目に回収した。大部分の供試卵 (152 個中 117 個) は、約 70 km 離れた場所で回収し、車で約 1.5 時間の道程を運び移植に供した。移植器具には、これまで使用してきた金属製の人工授精器具とフランス製の人工授精器具 (Cassou gun) を用いた。移植器具の覆いも紙製のほか、先端をセロファン紙で閉じたプラスチック筒も使用した。

移植後の受胎成績は、全体で 42.1% (64/152) の受胎率でやや低い成績であった。しかし、移植実施時期別に成績を調べると、19 頭中 2 頭の受胎例しか得られなかった一時期を除き、約 50% の受胎成績が得られた。成績の特に不良な時期は、保存液に添加した牛血清の滅菌処理が不完全であり、保存液の汚染が低受胎率の原因と考えられた。

本試験の中で 92 例については、人工授精や直腸検査などを日常業務としていた臨床経験の豊かな技術者 9 名 (A 群) と臨床経験の乏しい技術者 9 名 (B 群) に分けて移植を依頼したので、両群の受胎成績を比較検討した。その結果、個人個人の成績あるいは移植卵の品質、保存液の種類、供卵牛と受卵牛の発情日差などいくつかの要因別に見ても、A 群の成績が B 群の成績より良好であった。さらに、A 群の受胎率 60.7% (34/56) と B 群の受胎率 22.2% (8/36) との間には有意差が認められた。B 群の技術者は、受卵牛が未経産牛であり、加えて黄体期のため子宮頸管が緊縮していることから、移植器具の子宮頸管通過が困難なものが 7 例あった。この 7 例は、いずれも A 群の技術者に術者を交替した結果、5 頭が受胎した。このように B 群の技術者は臨床経験が乏しいため、直腸腔法による移植操作に未熟な点が見られたが、B 群の技術者による受胎成績が悪い原因は不明であった。しかし、本試験の成績から、頸管經由法は移植を実施する術者が、たとえ移植経験がほとんど無くとも、人工授精や直腸検査などを日常の業務として行い臨

床経験の豊かな繁殖技術者であれば、簡易的な移植法であり、50% 以上の受胎成績が得られることが示された。

7. 頸管經由法による体外培養卵および凍結保存卵の移植試験

これまでの試験によって、回収された受精卵をその日のうちに移植した場合、頸管經由法でも 50~60% の受胎成績が得られることが判った。そこで、体外培養により 1~2 日間保存した受精卵あるいは液体窒素中に長期間保存した受精卵の移植に頸管經由法を利用した。

体外培養は、受精卵を少量の培養液とともに試験管に入れて混合ガスを吹き込み、恒温器内で培養する試験管法を用いた。発情周期の 7 日目に回収した 4 卵を血清加 BMOC-3 で 48 時間培養し、うち 3 卵を 3 頭に移植した結果、2 頭が受胎した。また、7 日目に回収した 11 卵を BMOC-3 で 44~48 時間培養し、11 個全てを移植した結果、3 頭が受胎した。さらに、8 日目に回収した 9 卵を同液で 24 時間培養して 9 頭に移植した場合には、4 頭の受胎が確認された。

凍結保存卵は、1 M のグリセリンを耐凍剤として使用し、BILTON (1980) の方法に準じて $-30^{\circ}\sim-36^{\circ}\text{C}$ まで緩慢に冷却したのち、液体窒素中に浸漬して 9~151 日間保存した。融解は温水 ($20^{\circ}\sim 25^{\circ}\text{C}$) に直接浸して急速に実施し、耐凍剤を除去後 2 時間、 37°C でインキュベートしたのち、形態のほぼ正常なものを移植に供した。第 1 回目の試験では、2 時間インキュベートした 18 卵のほかに 24 時間体外培養も行った 2 卵を移植し、それぞれ 5 頭はおよび 1 頭、合計 20 頭中 6 頭が受胎した。第 2 回目の試験では、25 頭中 5 頭、第 3 回目の試験では 13 頭中 4 頭の受胎が確認された。

8. 受精卵移植後の流・死産の発生

著者が経験した移植例のうち分娩までの経過がこれまで明らかになった 168 例の受胎例について流産および死産の発生を調べた。

採卵当日に移植された「新鮮卵」の受胎例 148 頭のうち、移植器具に覆いを付ける頸管經由法の受胎例は 89 頭であり、うち 80 頭 (89.9%) は無事に仔牛を分娩したが、8 頭は流産、1 頭は死産であった。他の移植法の受胎例における流・死産の割合 (流産および死産頭数/受胎頭数) は、臍部手術法で 2/14、頸管迂回法で 2/10、覆いを付けない頸管經由法で 7/35 と多い傾向にあった。また、凍結保存卵および体外培養卵を覆いを付けた頸管經由法で移植した場合の流・死産の割合も、それぞれ 3/11 および 3/9 と多い傾向にあった。

要 約

牛の受精卵移植技術を実用化し、より広く普及させるために簡易的で安定した受胎成績が期待できる非手術的移植について検討を加えた。

非手術的移植法の中でも、直腸腔法による人工授精と同じように子宮頸管を経由して受精卵を子宮角内に注入移植する頸管経由法は、術式が取り付き易く簡便であった。しかし、移植器具として人工授精用のストロー精液注入器をそのまま腔内に挿入すると、外陰部や腔内に存在する細菌を子宮内に持ち込み、子宮内を汚染することが判った。そこで、この子宮内汚染を防止するために移植器具に覆いを付けて子宮頸管外口部まで挿入する移植手技に改善した。その結果、覆いを付けることによって子宮内汚染防止に効果があり、手術的移植法による受胎成績と同程度の約 60% の受胎率が得られることが示された。さらに、多数の技術者にこの頸管経由法の術者を依頼して応用試験を行った結果、移植経験がほとんど無

い技術者でも、日常直腸検査や人工授精などに携わっている繁殖技術者であれば、50~60% の受胎成績が得られることが実証された。本移植手技によって受胎した受精卵牛の流・死産の発生は約 10% であり、他の移植方法により受胎した場合の発生率より少ない傾向にあった。

頸管経由法をより安定した移植技術として確立するためには、まだ不明の点も多い。しかし、最近本邦においても受精卵移植技術が普及・実用化されようとしており、その中で本移植手技が広く利用されるようになった。今後、より多頭数の移植試験や種々の研究によって頸管経由法がさらに改善され、受精卵移植の普及に役立つことを期待する。

終わりに、本研究に対し佐藤賞の榮譽をお与え下さいました家畜繁殖研究会に深く感謝申し上げます。また、本研究の遂行に終始御指導を賜りました北海道大学獣医学部金川弘司教授ならびに畜産試験場繁殖部杉江信博士に深甚の謝意を表します。さらに、試験にあたり多大の御協力を戴いた農林水産省日高種畜牧場および新冠種畜牧場の関係者各位にお礼申し上げます。