

牛 胚 の 頸 管 経 由 移 植

内海恭三・湯原正高

(家畜繁殖学研究室)

Received November 1, 1982

Successful Trans-cervical Transfer of Cow Embryo

Kyozo UTSUMI and Masataka YUHARA

(Laboratory of Animal Reproduction)

At the eleventh day of the cycle, a Holstein cow was superovulated by injection of 3,000 I.U. PMSG, and after 48 hours by 30 mg $\text{PGF}_{2\alpha}$. The heat of the cow was detected by standing behavior about 48 hours after $\text{PGF}_{2\alpha}$ injection, and then the cow was inseminated with the frozen Japanese Black breed (Wagyu) bull semen three times every 12 hours.

At the seventh day of the ovulation, the embryos were non-surgically recovered by uterine flushing with 200 ml Eagle's M.E.M., using balloon catheter. Six hours after embryo recovery, one early blastocyst was non-surgically transferred into a synchronized Holstein uterine horn through the cervix, using Cassue gun. The two other embryos were frozen and stored.

The transferred embryo developed into a new born young on 14 th of March, 1982. The young hybrid weighed 30 kg at birth and had a gestation period of 283 days. These figures are between those of Wagyu and of Holstein.

緒 言

凍結精液の技術の開発に伴って発展した牛を中心とした家畜の人工授精は家畜の改良増殖に大いに貢献した。このような雄系の優良遺伝子の有効利用に対して、ごく最近人工妊娠という技術を使って雌系の遺伝子についてもそれらを有効に利用できる道が開かれつつある。しかし、人工妊娠の技術体系の問題点として、供卵牛の発育ステージと受卵牛子宮の妊娠ステージが同期化されねば着床から分娩に至らないという点と、できるだけ簡単に効率よく供卵牛からの採卵と受卵牛への移植がなされねばならない点が指摘されている。

種々の問題点の中でも、とくに前者に対しては胚の凍結保存、後者に対しては胚の非外科的(頸管経由)移植の開発が待たれている。

著者らは、これまでに9例の牛受精卵移植のうち、4例の頸管経由による分娩産子を得ている。本研究では著者らの研究室で行なわれている牛胚の非外科的採卵法と非外科的移植法を述べると共に、特に頸管経由移植による最初の分娩成功例を詳述し、それらに関連した問題点を考察した。

材 料 と 方 法

牛受精卵の採卵と移植は次に示されるような手順に従って行なわれた。

受精卵移植の各過程

1. 供卵牛および受卵牛の選択と性周期の確立
2. 供卵牛の過排卵誘起
3. 供卵牛の誘発発情の検査と人工授精

4. 受卵牛の発情の同期化
5. 供卵牛に対する卵回収処置
6. 回収卵の保存(凍結保存も含む)
7. 受卵牛に対する卵移植
8. 受卵牛の妊娠診断および妊娠受卵牛の管理と分娩
9. 新生児の登録
10. 供卵牛の反復過排卵処置

以下において、各過程の手順を順を追って詳述する。

1. 採卵および移植に至るまでの供試牛の選択とホルモン処置

1) 供試牛の選択：健康な供試牛を使うことが第一の条件である。供卵牛および受卵牛は少なくとも2周期以上、発情と排卵およびその後の黄体形成を追跡することによって健康な生殖機能を持つことを確認する。また、性周期の変化に伴った正常な子宮の変化を示すことを確認する必要がある、さらに経産牛を用いる場合は産歴も調べて、供試牛を決定しなければならない。

2) 供卵牛の過排卵処置と受卵牛との同期化：黄体期(発情周期の9～14日)に妊馬血清性腺刺激ホルモン(PMS)を3,000～4,000 IU皮下注射し、40～60時間後にプロスタグランディンF_{2α}(PGF_{2α})を30 mg(PGF_{2α}誘導体, ONO-1052の場合は1 mg)を臀部に筋肉注射し、48時間～60時間後のスタンディングによって発情とみなす。発情開始時から12時間ごとに少なくとも3回、凍結精液を子宮内へ深部注入すれば受精卵が得られる。受卵牛の自然発情に供卵牛の発情を同期化させる場合には、受卵牛の発情予定日に供卵牛の発情が起るように逆算して過排卵処置を開始する。あるいは両者の発情日のズレが1週間以内であれば、供卵牛のPGF_{2α}処置時(周期の11日～16日)に合わせて(又は12時間遅らせて)同様のPGF_{2α}処置を受卵牛に施せば、ほぼ同時期に発情を招来させることができる。採卵した受精卵を凍結保存する場合は受卵牛との同期化は必要としない。

2. 供卵牛からの受精卵の回収

1) 供卵牛に対する卵回収の準備：原則として7日目(排卵日を1日目として)の子宮へ下降した受精卵(この時期には初期胚盤胞期に发育している)を回収するために6日目に供卵牛における黄体の状態と子宮の状態を調べて、採卵の可能性を前もって調べる。残存濾胞が少なく良好に发育した黄体が確認された場合は絶食させて翌日の採卵に備える。

採卵用バルーンカテーテル(ヒト用Bard尿道カテーテル・16 FR.)の管を長くなるように改造したもの、Fig.1-A)や移植用ビニールストローや、紙さやなど熱に弱いものは1週間以上前からガス滅菌する。

子宮灌流用の媒液として組織培養用イーグルのMEM培地を用いる場合、日水製粉末培地を3回蒸留水で溶解後、オートクレーブで滅菌する。生食またはリンゲルと血清培地(不活性化牛血清10～20%)を用いる場合は滅菌濾過フィルター(ミリポアフィルター0.33μ)によって滅菌後、冷蔵保存する。卵子保存用の培養液(生食またはリンゲルと不活化子牛血清, 4:1または2:1)は同様に滅菌濾過する。その他、灌流液回収用の100 cc血清ビンや検卵用ペトリ皿やシャーレ等は加熱滅菌する。さらに卵子を一時保存したり、培養したりする加温板や炭酸ガス培養器を試運転しておくとともに、採卵器具(Fig.1-A)や移植器具(Fig.1-B)を点検しておく。

2) 供卵牛に対する卵回収処置(Fig.2-A,B)：バルーンカテーテルを使った卵回収法は以下の手順にそって行なわれる。(1)牛体の洗浄,(2)尾椎麻酔,(3)直腸の排糞と外陰部の清浄,(4)頤管の拡張,(5)頤管を介して子宮角へのカテーテルの挿入,(6)灌流液の注入と、子宮内容

液の回収の反復操作。反対子宮角についても(4)～(6)の手順によって卵子を回収する。回収液は30℃の恒温槽中で静置する。

3. 検卵と洗卵

血清ビンに回収された子宮灌流内容物をパスツールピペットで吸入して時計皿か、シャーレへ移し、実体顕微鏡で卵子を検索する。細いパスツールピペットで吸入した受精卵は3回以上新しい培養液に移し換えることによって洗浄し、外観上の形態と発育程度から移植可能な受精卵かどうかを判定する。直ちに移植に供しない場合は炭酸ガス培養器中に静置するか、試験管内に密封して20～30℃の恒温水槽内で保管する。

4. 受精卵の移植

受卵牛を前もって直腸検査によって卵巢の黄体と子宮の状態から、移植可能牛かどうかを判断する。

人工授精用の0.25 cc プラスチック・ストロー中の2ヶ所の空気にはさまれた媒液中に受精卵を封入する。ストローを人工授精の精液注入用カスーガン(フランス製, 0.25 cc スパイラル型)の先端に装着する(Fig.1-B)。

牛体を洗浄して保定後、尾椎麻酔(2% 塩酸プロカイン, 4～5 cc)をして、排糞と外陰部の洗浄を施す。紙さやに包まれた拡張棒を頸管の入口まで誘導して、紙さやを破って拡張棒のみを頸管に通して頸管拡張する。続いて紙さやに包まれたカスーガンを頸管の入口まで誘導し、紙さやのみを手前に引いて、カスーガンを頸管を介して黄体側の子宮角へ誘導する。子宮角の中央部でカスーガンの先端を軽く保定して、受精卵をストローから子宮角へ排出させる。

5. 供卵牛と受卵牛の予備観察

1) 供卵牛: 供卵牛は子宮洗浄後、抗生物質を子宮内注入し、その後の正常な発情回帰を待つ。繁殖に供用する場合は、回帰した1回目の発情で授精可能であるが、2度目の採卵に供用する場合は、50日以後の発情回帰後の黄体期にホルモン処置が可能である。3度目の採卵はその100日以後に供用し得る。

2) 受卵牛: 受卵牛は60日齢で直検による妊娠診断が行なわれているが、最終的には100日齢を経て始めて妊娠が確実となり、分娩を待つのみとなる。

6. 新生児の登録

移植卵が無事に分娩に至った場合、供卵牛と授精に用いた種雄牛と受卵牛の血液型と、新生児の血液型による親子鑑定(我国では家畜改良事業団で受託)によって、新生児が登録される。

結 果 と 考 察

本試験では受卵牛の自然発情に合わせて供卵牛のホルモン処置を施した。ホルスタイン種の6産の乾乳牛(広大附属農場繋養)の発情周期の11日目のpm 7:00にPMS, 3,000 IU(東芝製ピーメックス)を皮下注射し、続いて60時間後(3日後のam 7:00)にPGF_{2α}誘導体(ONO-1052) 800 μgを殿部に筋注射した。2日後の午前中(PGF_{2α}後, 50時間ぐらい)からスタンディング発情を示し、午前中、夕方、および翌朝の3回、黒毛和種の凍結精液(但馬系梅茂号: 香川県畜試繋養)を授精した。3回目の授精時には発情徴候が落ちていたことから、この日を排卵第1日とした。排卵6日目の卵巢の黄体所見から、右卵巢に×3、左卵巢に×1の明白な黄体を確認した。未経産の受卵牛もほぼ同時期に自然発情し、その後排卵したので供卵牛と同期化したことになる。

排卵7日目(1981年6月12日) am 10:00に両子宮角が洗浄された。子宮灌流液をそのまま広大附属農場(福山市)から岡山大学(岡山市)へ自動車で輸送し、3時間後のpm 1:00に

検卵に供した。右の子宮灌流液から初期胚盤胞×2を回収し、左の子宮灌流液からは胚盤胞×1を回収した。この時、灌流および培養液としては生食・血清を用いた。1つの受精卵 (Fig.3-A) を5回新しい培養液で洗浄後、ストローに封入した状態で、岡山近郊のK牧場へ輸送し、pm 4:00に受卵牛(未経産のホルスタイン種)に頸管經由移植を行った。残りの受精卵は凍結保存した。

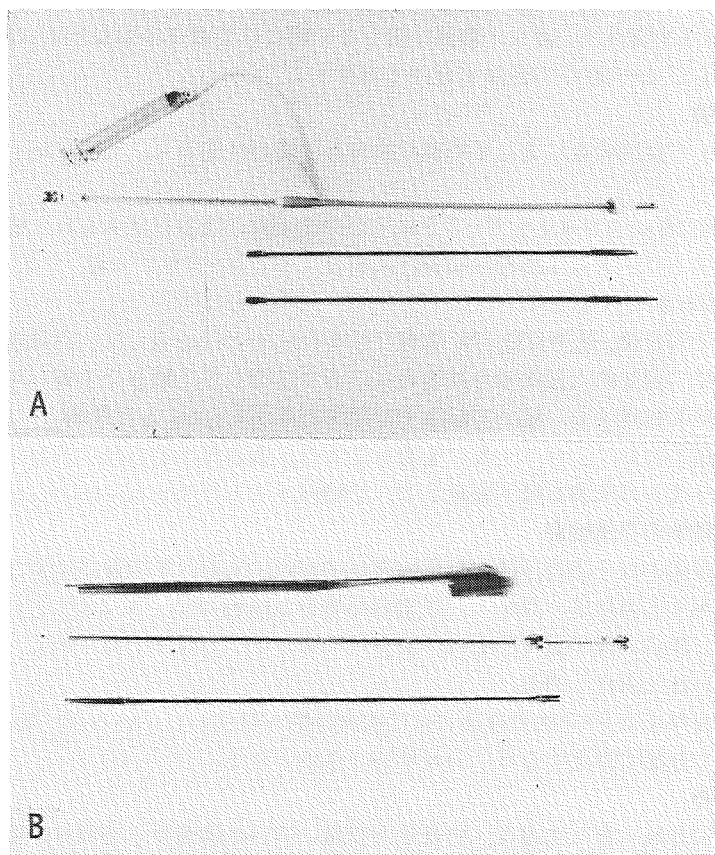


Fig. 1 Non-surgical embryo recovery and transfer in cow.
A: Non-surgical flushing procedure by Foley catheter
B: Trans-cervical embryo transfer by Cassue gun

移植60日後に受胎確認を行ない、続いて1982年3月14日に無事雌を正常分娩した (Fig.3-B)。生時体重は30 kgで、排卵日から計算した在胎日数は283日であり、以後正常に育成している。

この受卵牛では、PMSに対する卵巢の反応が弱いためか、発育卵胞数および排卵数とも予期されたものより少なかった。このようなPMSに対する反応の弱い牛にはFSHの連続投与が試みられ、比較的良好な成績が得られている。PMSとFSHを反復過排卵処置に交互に組み合わせることも考えられている。

本実験から生食血清から成る灌流液および培養液中で気温あるいは室温25~28℃の範囲では無菌的に扱われさえすれば採卵から移植まで6時間(灌流液中で4時間、培養液中で1時間、ストロー中で1時間)の後でも受胎し得ることが明らかとなった。

BRANDらおよびNEWCOMBらの受胎例^{1,2)}が報告されるまで牛胚の移植は外科的手術による

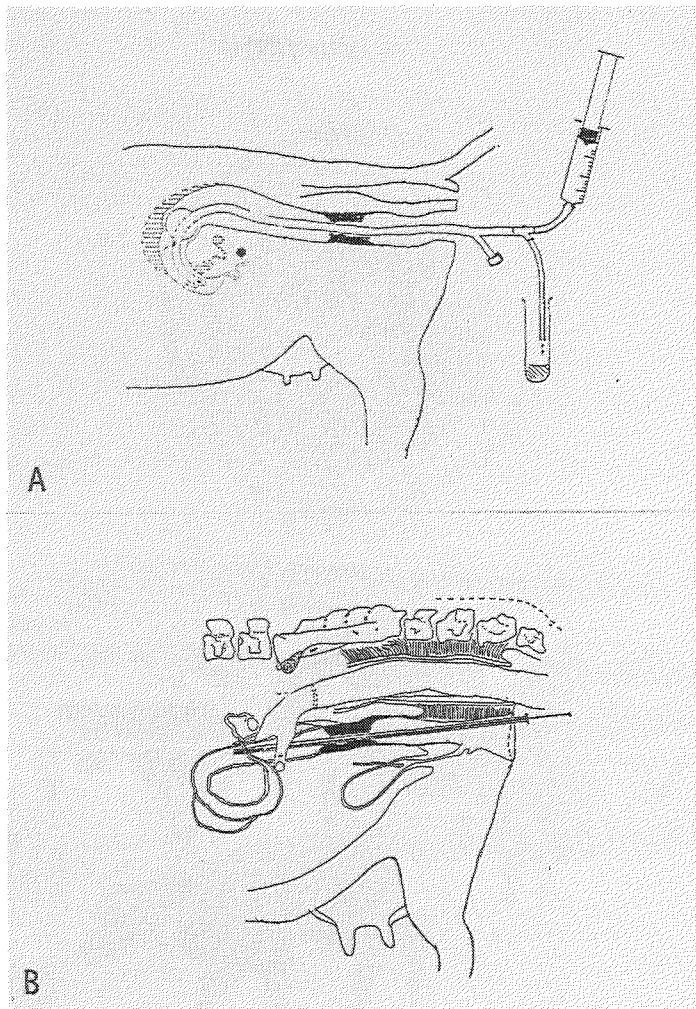


Fig. 2 Aparatus for embryo recovery and transfer.

A: Modified two-way Foley catheter and vervical extender

B: Cassue gun, paper sheath and cervical extender used for embryo transfer

か、もしくは頸管の刺激は子宮内の卵子の排出運動を刺激して不受胎を招くと考えられていたので、膣壁から子宮腔へ直接注入針を誘導する頸管バイパスの移植が考案^{3,5)}されていた。しかし、6日目以後の移植においては外科的手術による移植よりも、むしろ本実験のような頸管経由移植が実用面からも要求されるものと思われる。排卵6日目以後の頸管刺激は前述のような卵子の排出を起さないことが明らかにされてきたが、子宮角深部への注入のため、外性器とくに膣前庭部の細菌の子宮内への持込みが移植卵の受胎性に大きな影響を与えることが懸念される。高橋ら(1982)⁴⁾は紙さやをつけた注入法によって30%から60%へと著しい受胎率の向上を得ている。さらに受精卵牛の体内で発育した移植卵の母体効果についても種々の議論がなされているが、本実験の結果では産子は黒毛和種とホルスタイン種の雑種であり、生時体重、在胎日数とも、丁度両種の間値を示した。著者らは和牛の移植卵を乳牛に分娩させた(未発表, 1982)がいずれも和牛の平均値を示した。少数例からの即断は危険であ

るが、これまで得られた結果からは母体効果よりも胎児側の遺伝因子の方が、それらに深い関係を持つように思われる。

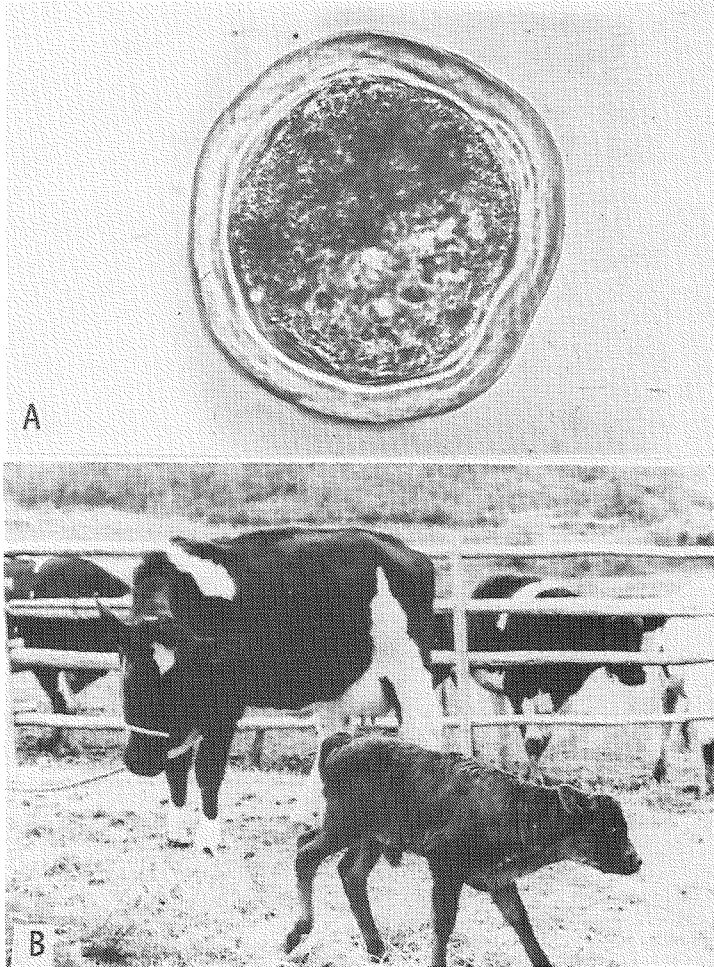


Fig. 3 Transferred embryo and new born young.

A : Early blastocyst

B : New born young and foster mother

摘 要

1. 黄体期に PMS 3,000 IU を投与し, 60 時間後に $\text{PGF}_{2\alpha}$ 誘導体 (ONO-1052) 800 μg によって過排卵を誘起させ, 排卵 7 日後にバルーンカテーテルによる子宮角灌流法によって初期胚盤胞を回収した。

2. 採卵から移植まで室温 (25 $^{\circ}\text{C}$) で 6 時間, 生食・血清媒液で静置させた胚でも受卵牛の子宮で正常な産子にまで発育した。

3. 細菌感染をできるだけ少なくするため牛体の洗浄と, 紙さやの使用とによって, 受卵牛の 7 日目子宮頸管経由移植を行ない受胎例を得た。

4. 分娩した和牛とホルスタイン種の雑種の在胎日数や新生時体重は黒毛和種とホルスタイン種の間値を示した。

謝 辞

本実験の遂行にあたり、プロスタグランディン $F_{2\alpha}$ 誘導体の1つである ONO-1052 を提供いただいた小野薬品工業に深甚の謝意を表します。

文 献

- 1) BRAND, A. and M. DROSET: Embryo Transfer in Farm Animals (K. J. BETTERIDGE eds.), 16—19, Cana. Department of Agriculture Monograph 16, Ottawa (1977)
- 2) NEWCOMB, R., W. R. CHRISTIE, and L. E. A. ROWSON: Control of Reproduction in the cow (J. M. SREENAN eds.), 292—304, Martinus Nijhoff, The Hague, Boston and London (1978)
- 3) SUGIE, T.: J. Reprod. Fert. 10, 197—201 (1972)
- 4) 高橋芳幸・鈴木達行・下平乙夫: 家畜繁殖誌 28 (1), 30—35 (1982)
- 5) TESTART, J., and P. C. LEGLISE: C. R. Séanc Acad. Sci. 272, 2591—2592, Paris (1971)