

氏 名(本籍) 鈴 木 達 行

学位の種類 農 学 博 士

学位記番号 農 第 3 4 4 号

学位授与年月日 昭 和 63 年 3 月 10 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学位論文題目 牛の受精卵移植に関する開発的研究

論文審査委員 (主 査)

教授 正木 淳二

教授 勝野 正則

助教授 菅原 七郎

論文内容要旨

家畜の受精卵移植（胚移植，ET）は，遺伝的にすぐれた雌や利用価値ある雌から多数の受精卵を回収し，これを他の雌の子宮内に移植して多くの産子を得ることを主な目的とする。これを実現するために，ET 技術を構成する一連の操作について，実用化へ向けての開発的研究が続けられている。

牛のETについては，Sugie (1965) による非手術的移植法の開発が一つの契機となり，国内の外において，より有効簡易なET法の確立をめざした実験が進められてきた。しかしながら実用化を確実にするためには，技術面においてもなお多くの課題が残されている。

本研究は，牛の受精卵回収から移植までの操作を中心に問題点を追求し，それを解決するために関係器具類の開発を含む方法の改良を試み，それらの効果を検討したものである。

1. 受精卵の回収

牛受精卵の非手術的回収には，子宮内挿入カテーテルの性能，灌流方法，灌流液中の受精卵検索法などが重要な意味を有する。このうち子宮内挿入カテーテルについては，一般に用いられている2穴式のもの，灌流の際，子宮粘膜に密着するため卵回収に支障があった。また，妊娠7日目の子宮頸管は閉鎖されて内部に多量の粘液が満たされているため，カテーテルが目づまりを起こしやすい欠点があった。さらに，灌流液中の受精卵の短時間の回収は，凍結保存や移植までの時間を短縮させるための重要条件である。以上から，本研究では特に多孔式カテーテル，頸管粘液除去器，メッシュをそなえた卵回収用シャーレおよび自動灌流器を試作して，その有効性をしらべた。

自動灌流器 (Fig. 1) については，現行法 (Fig. 2) に比べて灌流が1人で実施でき，衛生的であるほか，灌流液が外気温の影響を受けないなどの利点を実証された。頸管粘液除去器 (Fig. 3) は，粘液によるバルーンカテーテルの目づまりや，粘液内への受精卵の混入を防止する上に有効であった。多孔式カテーテル (Fig. 4) は従来の2穴式のものに比べて卵回収率を向上させた (Table 1)。また，75 μm 大のメッシュをそなえたシャーレ (Fig. 5) の使用により，卵回収から検索までの時間を1時間以上短縮させることができた。

2. 受精卵の培養

受精卵の体外培養は，受精卵の生存性や発育の機構をしらべるために重要である。牛受精卵の場合は，培養液として重炭酸系緩衝液に牛血清を添加して炭酸ガスの存在下で培養することが多いが，培養条件についてはなお検討の余地が多く残されている。本研究は，リン酸緩衝液 (PBS) および各種の牛血清の効果を中心に，牛受精卵に対する体外培養液の有効性を検討した。

受精後7-8日目の供卵牛から血清を採取し，56°C30分の不活化処理後，20%の割合でPBSに添加して培養液とした。正常卵が得られなかった供卵牛の血清で培養した24個の受精卵は発育が進まなかったのに対し，正常卵が80-100%にみられた供卵牛の血清で培養した35個では30個が発育し，このうち72時間まで培養した15個では14個 (93%) が脱殻した胚盤胞にまで発育した

(Table 2)。

3. 受精卵の凍結保存

牛の凍結保存卵による最初の受胎成功例は Wilmut & Rowson (1973) によって報告され、国内でも杉江ら (1979) が続いた。当時の方法はDMSOまたはエチレングリコールを用いた緩慢凍結融解法であったが、著者らは Bilton (1982) の方法に準じてグリセロールを用いた急速凍結融解法により、これまで6頭の受胎例を得た。しかし、この方法ではグリセロールの添加および除去が5-6段階で行われるため操作が煩雑であった。そこで本研究では、グリセロール添加および除去を1段階で行う方法について検討し、グリセロールの除去は受精卵を封入したストロー内で行えるように工夫した。これによって凍結融解後の受精卵を外部へ取り出すことなく、農家の庭先で直接移植することが可能になった (Fig. 6, 7, 8)。

1段階ストロー法により凍結融解した受精卵を直接移植した結果、18頭中11頭 (61%) が受胎した。この成績はストローから取り出して移植した時の受胎率、25頭中11頭 (44%) に比べて良好であり、改良効果が認められた。

4. 受精卵の移植

黄体期に受精卵の移植が成功しにくいのは、この時期の子宮が細菌感染をうけやすいためであるといわれている。そこで本研究では牛の膣前庭、膣深部および子宮頸管内の細菌叢を検査し、検出された細菌のうち *Corynebacterium hofmanii* による感染試験を行った。同時に、膣内の細菌が子宮内に混入するのを防止するためプラスチック製外筒を考案し、その有効性を検討した。また、頸管粘液の混入防止を目的とした移植器 (Fig. 9) を試作した。その結果、細菌汚染防止のための外筒や新しく開発した移植器の使用により効果が現れ (Table 3)、受胎率が従来の30%から60%以上に向上した。

5. 受精卵の2個移植および分割移植による双子生産

牛受精卵の2個移植、または1卵の分割移植は、特に肉用牛の増殖に有効な方法として期待されている。本研究では技術的煩雑さを軽減させる立場から、1段階ストロー法による凍結融解後の2個移植と、融解後に受精卵を2分割し、同一透明帯内で切断面を反転したまま移植することにより、双子生産を試みた。

ホルスタイン種を受卵牛として凍結融解した2卵を移植した実験では、27頭中21頭 (78%) が受胎し、6対の双子が得られた。また、子牛生産率は133%であった。凍結融解後の2分割卵の移植では13頭中4頭 (31%) が受胎し、1対の1卵性双子が得られた。なお、双子の妊娠期間および生時体重はそれぞれ 279 ± 1.2 日および 24.8 ± 1.9 kgで、単子の 283 ± 1.9 日および 31.1 ± 1.1 kgに比べて妊娠期間は短く、体重は軽かった (Table 4, 5, Fig. 10, 11)。

6. 受精卵移植に関連した過剰排卵処理

供卵牛に対する過剰排卵処理法として卵胞刺激ホルモン (FSH) およびプロスタグランジン $F_2\alpha$ ($PGF_2\alpha$) 併用投与の場合の投与量および方法を検討した。FSH は総量 $28mg$ を 4 日間 8 回に分けて減量投与するか、総量 $40mg$ を 4 日間 8 回に分けて同量投与し、 $PGF_2\alpha$ は FSH 投与 3 日目の朝 $30mg$ を投与するか、朝、昼、夕の 3 回に分けて投与する方法をとった。投与は筋肉内注射によった。FSH $28mg$ を 4 日に分けて減量投与した場合と $40mg$ を 4 日に分けて同量投与した場合、移植可能な卵子数はそれぞれ 5.80 ± 2.88 および 2.40 ± 1.20 となり、前者の方が好結果を得た。また、発情誘起のための $PGF_2\alpha$ を 3 回に分けて投与した場合と 1 回にまとめて投与した場合は発情出現率が $36/36$ (100%) および $23/25$ (85%) となった。以上から、過剰排卵処理には FSH の減量分割投与と $PGF_2\alpha$ の分割投与の併用がより有効で、FSH 量も $40mg$ と $28mg$ では少ない方が好結果をうむことが明らかにされた。過剰排卵処理を 3 回以上反復した 21 頭では、平均移植可能卵数 5 個以上、2 個以上 5 個未満および 2 個未満のものが、それぞれ $8/21$ (38%)、 $5/21$ (24%)、 $8/21$ (38%) を示した。初回の過剰排卵処理で移植可能卵の得られた個体では、2 回目以降も良好な成績を示し、逆に初回に反応が悪かった個体は、以後の処理でも好結果を期待できない成績が得られた。したがって、初回または 2 回目までの過剰排卵処理成績を参考に、供卵牛を選択する必要性が示唆された。

以上、本研究は、牛の受精卵移植技術の中核をなす卵回収から移植までの操作を中心に現行法の問題点を追求し、これを改善するための方法を提起した。また、受精卵の回収および移植について器具を試作し、その有効性を実証した。これらの成果は、牛の受精卵移植技術の実用化促進に貢献できるものと考えられる。

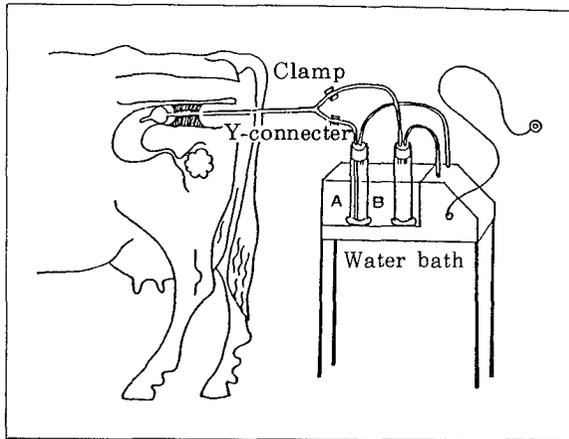


Fig. 1. Flushing instrument.

Scheme showing an automatic flushing instrument for non-surgical collection of embryos in cattle. The medium was infused into the uterus from cylinder A by air pressure and collected into cylinder B by suction. The flushing was accomplished by five successive infusions of 50 ml of medium. During flushing both cylinders were kept at 37 C in a water bath.

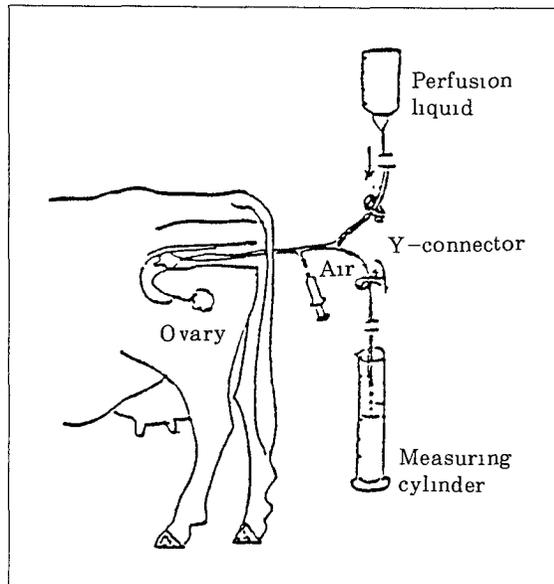


Fig. 2 Conventional flushing method.

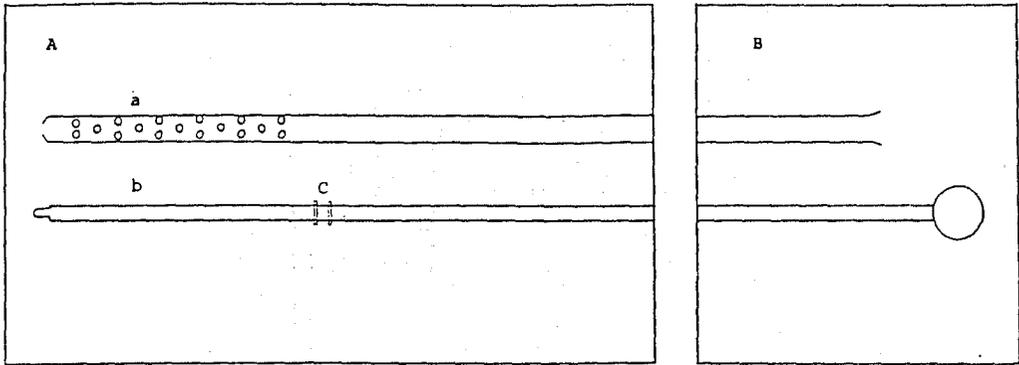


Fig. 3. Instrument for removing cervical mucus before flushing the ova in cattle.

A and B: The distal and proximal ends.

(a) Eighteen holes of 2 mm in diameter

(b) Steel bar.

(c) Two rings for making vacuum.

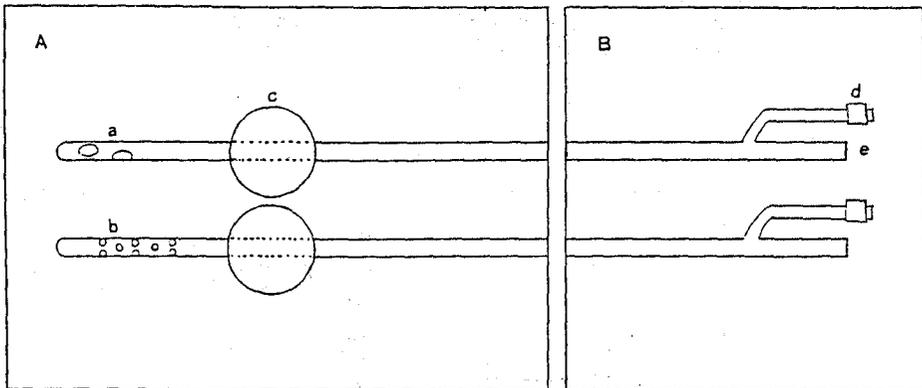


Fig. 4. Balloon catheter for non-surgical flushing of ova in cattle.

A and B: The distal and proximal ends of the two types of balloon catheter.

(a) Two holes of 5mm in diameter. (b) Twelve holes of 2mm in diameter.

(c) Balloon. (d) Airduct for balloon inflation. (e) Cannula for flushing.

Table 1. Recovery of ova using two different balloon catheters with 2 and 12 holes

Catheter	No. of donors	No. of CL palpated	No. of ova recovered
a (12 holes)	21	16.33±8.75*	14.90±8.26
b (2 holes)	21	16.95±6.66	10.00±5.94

* Mean ± SD

a vs b: $P < .05$

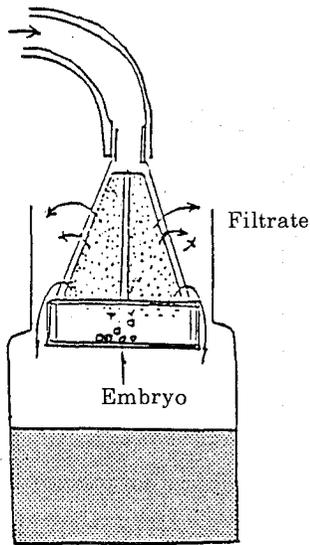


Fig. 5. Mesh filter.

Table 2. Development of bovine embryos cultivated in a modified PBS supplemented with donor's serum.

No. of donor cows	% of A-rank embryos	Duration of culture (h)	Stage of used embryos	% of developed embryos	No. of embryos transferred*	% of hatched embryos
6	0	24-72	Late morula	0 (0/24)	0	0 (0/24)
3	6-50	24-72	Late morula	100 (3/3)	2	0 (0/1)
4	50-80	24-72	Late morula-blastocyst	83 (15/18)	7	75 (6/8)
10	80-100	24-72	Late morula-blastocyst	86 (30/35)	15	93 (14/15)

*Some of the developed embryos were transferred to recipients after cultivated for 24h.

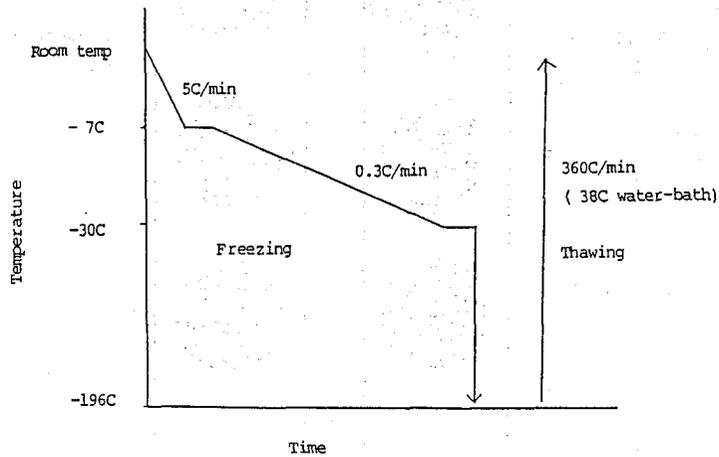


Fig. 6. The program of freezing and thawing.

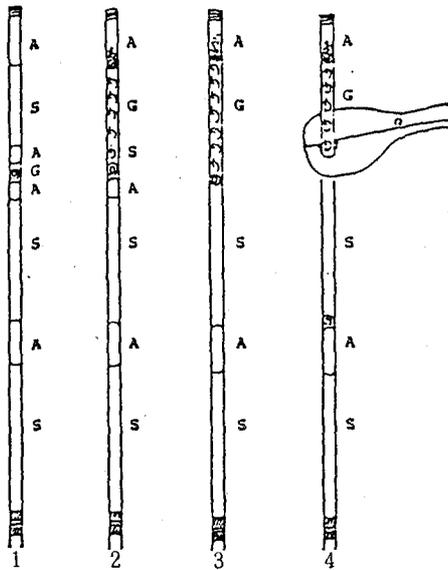


Fig. 7. Position of embryo in the straw after thawing and mixing.
 1. Before and immediately after thawing. 2, 3. Shortly after mixing.
 4. Ten minutes after thawing and mixing. The glycerol layer which moved to the upper part of the straw is scissored. A: Air, S: Sucrose solution, G: Glycerol solution.

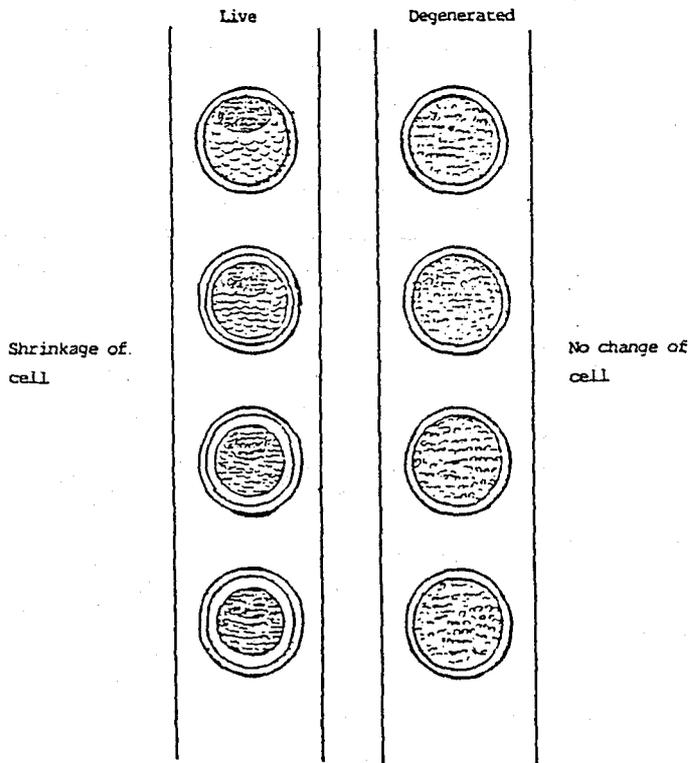


Fig. 8. The change of embryo in the straw after thawing and mixing.

Table 3. Preventive effect of an infector with an outer plastic tube against bacterial contamination at the time of non-surgical transfer.

Culture No. of bacteria Isolation	30								21									
	With				Without				With				Without					
	Aerobic		Anaerobic		Aerobic		Anaerobic		Aerobic		Anaerobic		Aerobic		Anaerobic			
###	++	+	Total	###	++	+	Total	###	++	+	Total	###	++	+	Total			
Streptococcus	0	0	1	(3.3)	0	0	0	(0)	4	6	2	12	(57.1)	3	6	1	10	(47.6)
Staphylococcus	0	0	0	(0)	0	0	1	(3.0)	0	0	0	(0)	0	0	0	(0)	(0)	
Micrococcus	0	1	3	(13.3)	0	0	0	(0)	2	0	3	(23.8)	0	0	0	(0)	(0)	
Corynebacterium	0	1	1	(6.7)	0	0	0	(0)	0	0	3	(14.3)	0	1	1	(9.5)	(2)	
Bacillus	1	0	4	(16.7)	0	0	0	(0)	1	3	5	(42.9)	0	0	2	(9.5)	(2)	
Escherichia	0	0	0	(0)	0	0	1	(3.0)	0	3	3	(28.6)	0	2	4	(28.6)	(6)	
Pasteurella	0	0	0	(0)	0	0	0	(0)	2	3	1	(28.6)	2	2	4	(38.1)	(8)	
Neisseria	0	0	0	(0)	0	0	1	(3.0)	0	0	1	(4.8)	0	0	0	(0)	(0)	
Moraxella	0	0	0	(0)	0	0	0	(0)	1	0	1	(9.5)	0	0	0	(0)	(0)	
Clostridium	0	0	0	(0)	0	0	0	(0)	0	0	0	(0)	2	0	1	(14.3)	(3)	
Flavobacterium	0	0	0	(0)	0	0	0	(0)	0	0	0	(0)	0	0	0	(0)	(0)	
Fungi	0	0	0	(0)	0	0	0	(0)	0	0	2	(9.5)	0	0	0	(0)	(0)	
Negative	-	-	-	(73.3)	-	-	-	(96.7)	-	-	-	(14.3)	-	-	-	(38.1)	-	

No. of bacteria = +: 2 - 10, ++: 11 - 50, +++: > 50

Table 4. Production of twins by ipsilateral embryo transfer.

Recipients	Embryos	No. of transferred	No. of recipients		Offspring	Twins	
			Pregnant	Abortion			
Japanese Black	Fresh	Two	36	14 (39)	1 (7)	15 (1) * (115)	2 (15)
		Demi	7	3 (43)	1 (33)	2 (67)	-
	Frozen	Demi	11	2 (18)	1 (50)	1 (50)	-
		Total	54	19 (35)	3 (16)	18 (1) (113)	2 (13)
Holstein	Fresh	Two	16	10 (59)	2 (20)	13 (3) (163)	5 (63)
		Demi	27	21 (78)	3 (14)	24 (3) (133)	6 (33)
	Frozen	Demi	13	4 (31)	-	6 (2) -	2 (50)
		Total	57	35 (61)	5 (14)	43 (6) (143)	13 (43)

* Values in { brackets } refer to no. of dead offspring

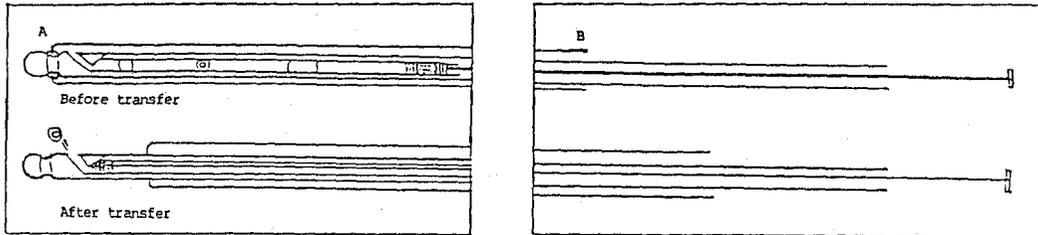


Fig. 9. An improved non-surgical embryo transfer instrument.

A and B: The distal and proximal ends.

Table 5. Gestation period and birth weight from single and twin pregnancies.

Recipients	Observation	Single pregnancy			Twin pregnancy			
		Total	♂	♀	Total	♂♂	♀♀	♂♀
Japanese Black	No. of pregnancies	14	7	7	2		2	
	Gestation period (days) ^a	286±1.9	285±1.2	286±2.2	275		275	
	Birth weight (kg) ^a	22.8±1.2	23.8±1.6	21.5±1.3	19.3		19.3	
Holstein	No. of pregnancies	17	12	5	13	5	2	6
	Gestation period (days) ^a	283±1.9	287±1.3	279±1.2	279±1.2	281±1.2	277±1.6	280±1.5
	Birth weight (kg) ^a	31.1±1.1	33.4±1.4	28.7±1.3	24.8±1.9	26.7±0.7	23.5±1.8	24.6±1.6

^aMean±SE (P<0.05)

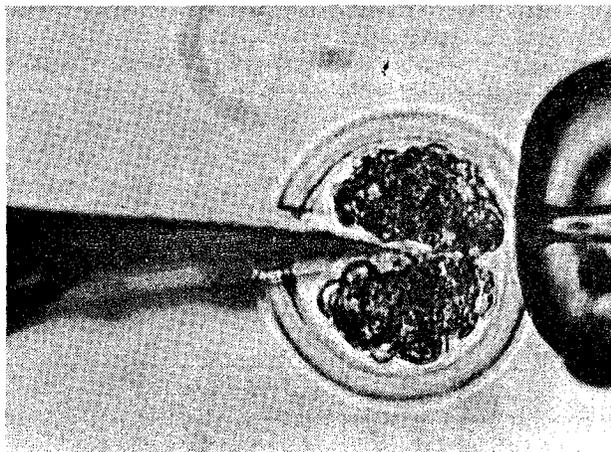


Fig. 10. Frozen-thawed embryo bisected by microblade.



Fig. 11. Identical twin calves produced by the transfer of frozen-thawed demi embryos.

審査結果の要旨

牛の受精卵（胚）移植の実用化については、技術面においてなお多くの課題が残されている。本研究は、受精卵回収から移植までの操作を中心に問題点を追求し、それを解決するために器具類の開発を含む方法の改良を試み、その効果を検討したものである。

受精卵の回収にあたり、頸管粘液除去器、多孔式カテーテル、自動灌流器およびメッシュをそなえた卵回収用シャーレを開発した。これにより卵回収操作を容易にし、回収効率を高めることができた。

受精卵の培養については、供卵牛の血清の利用を検討し、正常卵が高率に得られた供卵牛の血清を受精後7～8日目に採取して培養液に加えることにより、受精卵の発育を促進させることができた。受精卵の凍結保存についてはグリセロールの除去操作を簡易化し、農家の庭先で行える一段階ストロー法の実用化へ発展させた。また、凍結過程で受精卵を損傷しないように植氷操作も改善した。

受精卵移植にあたっては、腔内細菌が子宮内に混入しないように移植器をおおうプラスチック製外筒を考案した。また、移植器自体についても頸管粘液の混入を防止できるものを試作し、それらの有効性を実証した。受精卵移植による双子生産については2個移植または1卵の分割移植を試みた。特に後者については、受精卵を切断後、反転したまま移植する方法を確立し、双子生産技術の簡易化を促進した。

受精卵移植に関連した過剰排卵処理では、卵胞刺激ホルモンおよびプロスタグランジンF₂αの適正な投与条件を見いだした。

以上、本研究は牛の受精卵移植技術について現行法の問題点を追求し、これを改善するための方法を提起した。また、関連器具を試作し、その有効性を実証した。これらの成果は牛の受精卵移植の実用化促進に著しく貢献するものであり、著者は農学博士の学位を授与されるに値すると判定した。