

ウシ胚移植に使用する移植器の違いが 受胎成績に及ぼす影響の検討

佐々木恵美 長谷川清寿 安部亜津子 高仁敏光

要約 ウシ胚移植の受胎率向上を目指して、子宮角内での移植器の挿入操作の簡易化・平準化に焦点を絞り、入手可能な2つの市販移植器について受胎成績を比較検討した。調査は島根県内でのETメインセンター(当場およびフィールド3地域(A、BおよびC)を対象に行った。調査対象とした市販移植器はカテーテル型およびシース管型であり、移植胚はダイレクト法で凍結融解した体内胚とした。カテーテル型およびシース管型の受胎率を比較した結果、ETメインセンターでは46.2%(6/13)および44.4%(8/18)とほぼ同等であったが、フィールドでは46.7%(05/225)および35.6%(94/264)であり、カテーテル型の受胎率がシース管型と比べて有意($p<0.05$)に高かった。同様に、フィールド地域別では、A地域が26.7%(4/15)および24.5%(12/49)、B地域が39.2%(38/97)および30.3%(27/89)、C地域が55.8%(63/113)および43.7%(55/126)であった。また、フィールドの未経産牛では47.4%(9/19)および45.2%(33/73)であったが、経産牛では46.6%(96/206)および31.9%(61/191)であり、カテーテル型の受胎率がシース管型と比べて有意($p<0.01$)に高かった。以上の結果から、フィールドでのカテーテル型移植器の受胎率向上効果が示唆され、カテーテル型移植器の活用によって受胎率の向上が期待できると考えられた。

キーワード: ウシ 胚移植 移植器 受胎率

島根県立畜産試験場研究報告第37号, 6-10, 2004

ウシ胚移植(ET)において良好な受胎成績を得るための重要なポイント⁹⁾は、(1)胚が十分な発育能を有していること、(2)受胎牛の子宮内環境が胚発育に適していること、ならびに(3)胚の注入が適正に行われることである。仮に、農家段階でこれらすべての要件を高いレベルで網羅できれば、受胎率が高位安定的に維持され、本技術のさらなる普及定着が実現できると考えられる。

胚の注入操作について、子宮角深部への注入²⁾、子宮内の物理的損傷や刺激の防止^{9,10)}などによって受胎成績が向上することが既に指摘されている。そして、移植経験を積み重ねて技術的な熟練度が高まれば受胎率が向上していくこと¹⁸⁾も示されているが、実際には、技術者個々の成績のばらつきが島根県内における受胎率の高位安定化の障害となっている。

そこで我々は、フィールドでの受胎率の向上を目指して、子宮角内での移植器の挿入操作の簡易化・平準化に焦点を絞り、入手可能な2つの市販移植器の使用効果を比較、検討した。調査は県内でのETメインセンター(当場およびフィールド3地域(A、BおよびC)を対象に行い、移植器の種類別に受胎成績を比較した。

材料および方法

移植器の構造および使用方法

カテーテル型 移植器(図1 :SK 式牛用受精卵移植

器 ;ファームサービス)は、ステンレス製パイプ部分およびテフロン製カテーテル¹⁵⁾で構成され、移植用ストローの内容物をカテーテル内に充填して使用した。移植操作(図2)は、直腸腔法で子宮頸管部をステンレス管で疎通し、子宮角基部に到達した時点でカテーテル部のみを子宮角に沿って押し進めて胚を注入することで行った。

シース管型 移植器(図1 :カスー式未経産牛用受精卵移植器 ;IMV)は、ステンレス製の本体に移植用ストローおよびプラスチック製シース管(2 穴式)⁷⁾を装着して使用した。移植操作は、外陰部から子宮角内の注入部位までのすべての過程において、直腸腔法で移植器を誘導することで行った。

移植胚および受胎牛

移植に用いた胚は、常法⁵⁾に基づいて過剰排卵処理した供胚牛から人工授精後7日目に回収し、1.5M エチレングリコール(Sigma)を耐凍剤としたダイレクト法^{3,11)}で凍結融解した。凍結保存時の胚のランクは Excellent から Fair、発育ステージは後期桑実期から胚盤胞期とした¹⁷⁾。胚の移植は、発情後7日目の機能性黄体を確認した受胎牛を用いて行い、その後の経過を観察した。妊否判定は、胎齢60日前後に行った。

受胎成績の調査および解析

調査期間は平成3年6月から平成15年7月までの間で、調査対象は島根県内でのETメインセンター(当

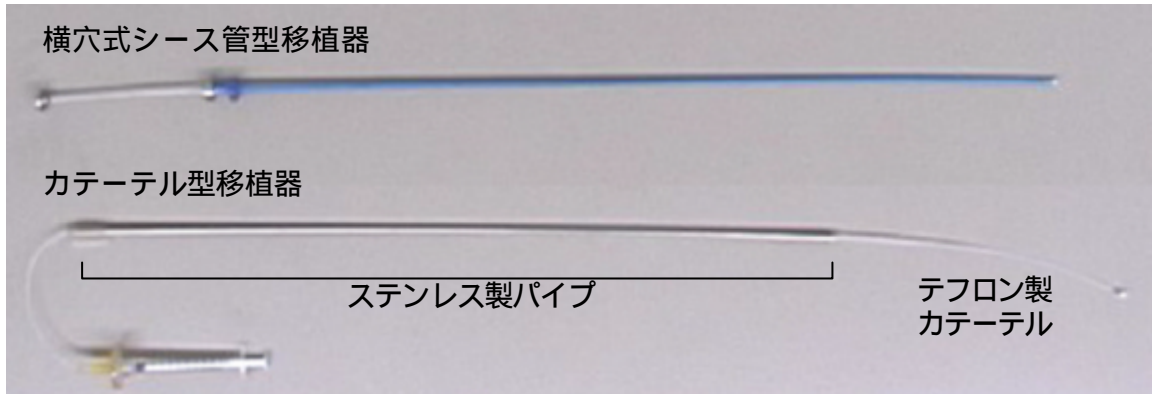


図1 調査対象とした移植器

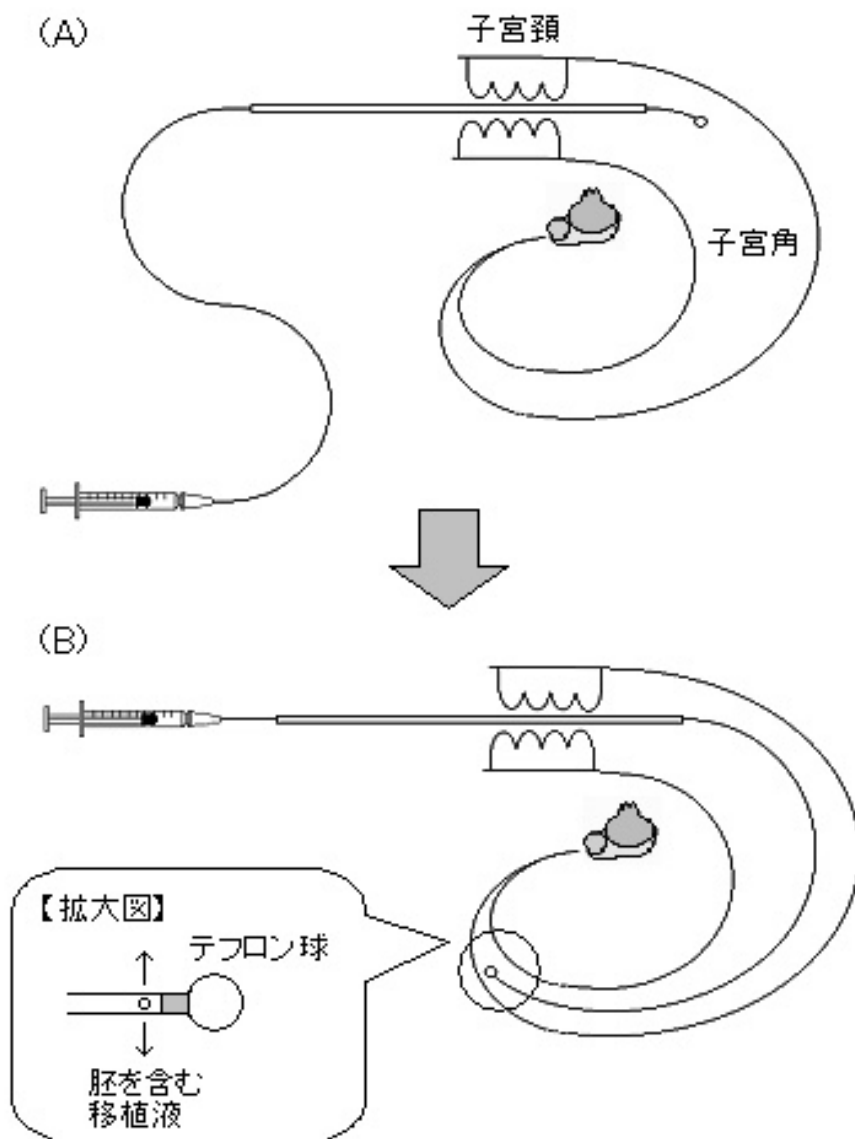


図2 カテーテル型移植器の操作法

- (A)移植直前にストローからカテーテル内に胚を含んだ移植液を無菌的に注入し、シリンジを装着する。
外子宮口まで外筒を装着したままで誘導し、子宮頸管部はステンレスパイプで疎通する。
- (B)移植器の先端が移植子宮角の基部に達したら、外部からカテーテルを押し込み、シリンジ内の空気を約1mL注入して、テフロン球基部の小孔から排出する。

場およびフィールド3地域(A、BおよびC)とした。ただし、移植技術者は十分な移植経験を有する技術者とし、フィールドでは各地域1名(それぞれの地域でET業務を行っている有資格家畜人工授精師)とした。受胎成績は2つの移植器別に分析し、ETメインセンターとフィールド(調査1)、フィールド地域別(調査2)、ならびにフィールドでの受胎牛の分娩経験別(調査3)での受胎成績を比較した。なお、得られた成績の統計解析は、²検定法で行った。

成 績

調査対象の受胎牛は、ETメインセンターでは交雑種¹⁾(延べ31頭)、フィールド3地域ではホルスタイン種(延

べ184頭)および黒毛和種(延べ305頭)であった。フィールド3地域における調査対象農家数は、A地域が1戸、B地域が14戸ならびにC地域が48戸であった。調査1(表1):ETメインセンターでカテーテル型移植器を使用した場合の受胎率は46.2%(6/13)、シース管型では44.4%(8/18)であり、それぞれの受胎率間に有意差は認められなかった。フィールドでカテーテル型を使用した場合の受胎率は46.7%(105/225)、シース管型では35.6%(94/264)であり、カテーテル型の受胎率が有意(p<0.05)に高かった。

調査2(表2):フィールド地域別にカテーテル型とシース管型との受胎率を比較すると、A地域が26.7%(4/15)および24.5%(12/49)、B地域が39.2%(8/97)および30.3%

表1 調査地および移植器別の受胎成績

区分		移植延べ頭数 ³⁾	受胎頭数 ⁴⁾	受胎率(%)
調査地	移植器			
フィールド ¹⁾	カテーテル型	225	105	46.7 ^a
	シース管型	264	94	35.6 ^b
ETメインセンター ²⁾	カテーテル型	13	6	46.2
	シース管型	18	8	44.4

- 1) 島根県内指定3地域(A, BおよびC)
 - 2) 島根県立畜産試験場
 - 3) ダイレクト法で凍結融解した体内胚を受胎牛1頭あたり1胚移植
 - 4) 胎齢60日前後での診断
- 異符号間に有意差 (a,b:P<0.05)

表2 フィールド地域および移植器別の受胎成績

区分		移植延べ頭数 ²⁾	受胎頭数 ³⁾	受胎率(%)
調査地域 ¹⁾	移植器			
A	カテーテル型	15	4	26.7
	シース管型	49	12	24.5
B	カテーテル型	97	38	39.2
	シース管型	89	27	30.3
C	カテーテル型	113	63	55.8
	シース管型	126	55	43.7

- 1) 各地域1名の技術者が移植を実施
- 2) ダイレクト法で凍結融解した体内胚を受胎牛1頭あたり1胚移植
- 3) 胎齢60日前後での診断

表3 フィールドにおける受胎牛の分娩経験および移植器別の受胎成績

区分		移植延べ頭数 ¹⁾	受胎頭数 ²⁾	受胎率(%)
受胎牛の分娩経験	移植器			
未経産	カテーテル型	19	9	47.4
	シース管型	73	33	45.2
経産	カテーテル型	206	96	46.6 ^a
	シース管型	191	61	31.9 ^b

- 1) ダイレクト法で凍結融解した体内胚を受胎牛1頭あたり1胚移植
 - 2) 胎齢60日前後での診断
- 異符号間に有意差 (a,b:P<0.01)

(27/89)、C 地域が 55.8%(63/113) および 43.7%(55/126) であった。それぞれの地域において、移植器間の受胎率に有意差は認められなかったが、カテーテル型を使用した場合の受胎率がシース管型と比べて高い傾向であった。

調査 3(表 3) : フィールドの受胎牛を分娩経験の有無で区分して受胎率を比較すると、未経産牛にカテーテル型を使用した場合の受胎率は 47.4%(9/19)であり、シース管型では 45.2%(33/73)であった。同様に、経産牛ではカテーテル型が 46.6%(96/206)、シース管型が 31.9%(61/191)であった。経産牛でカテーテル型を使用した場合の受胎率は、シース管型と比べて有意($p < 0.01$)に高かった。

考 察

ET を成功させるためには、生存性を有する胚を、受胎能力の高い受胎牛に、適切な技術で移植する必要があること⁹⁾はよく知られているが、フィールドでこれらの要件を網羅することはきわめて難しい。したがって、今回我々は、フィールドでの移植技術にターゲットを絞って、受胎率向上技術を検討した。

子宮頸管経由法によるウシ胚の移植に用いる移植器としては、子宮角内で移植器本体を直腸腔法で誘導するシース管型移植器が国内では多く用いられており、カテーテルを子宮角内に導入するタイプの使用はきわめて限定的である。移植器の形態について、志村¹⁵⁾は我々が調査対象として選択したカテーテル型移植器の原型を開発し、新鮮胚移植で 81.8% と高い受胎率を得ている。また、この報告で、良好な受胎率が得られた理由として、子宮内膜を刺激することなく、胚を子宮角深部に比較的簡単に注入できたためと推察している。フィールドにおいては、保定、麻酔などに関して様々なケースが想定され、必ずしも技術者が望むような良好な条件で ET が行えるとは限らない。現在、志村¹⁵⁾の開発したカテーテル方式に準じて製造された移植器が市販されている。このカテーテル型移植器をフィールドでの ET に用いることによって、子宮角内での操作の簡易化・平準化が実現できれば、多くのケースで、主として過度の子宮刺激の防止が期待できると思われる。そして、その利用を推奨することによって、受胎率の向上も期待できると考えられる。このような理由から、我々はカテーテル型移植器の使用効果について、一般に広く普及しているシース管型との受胎成績の比較を行う必要があった。

今回の調査成績においては、ET メインセンターで行った移植ではカテーテル型移植器とシース管型の受胎率は同等であったが、フィールド 3 地域全体ではカテー

テル型移植器の受胎率が有意に高かった。また、調査対象とした 3 地域すべてにおいて、カテーテル型移植器を使用した場合の受胎率がシース管型を上回っていた。これらに関わる要因の詳細については不明であったが、フィールドにおける凍結体内胚の移植においては、カテーテル型移植器の使用による受胎率の低下は認められず、シース管型の受胎率と比べてむしろ高いレベルであった。

子宮内膜の物理的刺激が受胎成績に及ぼす影響について、Schrick ら¹³⁾が移植直前の PG 合成阻害剤の投与試験で、内膜上皮細胞の損傷によるプロスタグランジン(PG)類の体内合成によって受胎率低下が惹起されることを示している。このことから、移植するための条件設定が難しいフィールドにおいて、子宮角におけるカテーテルの挿入操作による物理的な刺激が、シース管型移植器の挿入した場合と比べて少なかったため、PG の体内分泌を比較的抑制できた可能性も考えられる。このほか、血液中の補体は胚に有害であるとされており^{9,16)}、移植操作時の出血の有無も受胎率を左右する要因としてあげられる。前原ら⁶⁾は、子宮角深部への移植が浅部および中部よりも高い受胎率であるが、出血がある場合はいずれの部位においても受胎率が著しく低下したと報告している。カテーテル型移植器は、子宮角内への挿入がカテーテル部分のみであることから、シース管型と比較して子宮角内への血液の持込みが少ないと考えられ、胚への悪影響が比較的軽減されたと推察される。

技術者によって受胎率に差が生じることについて、多くの報告^{4,14,18)}がみられるが、本調査においてもフィールドの技術者間でその傾向が認められた。すなわち、フィールドでカテーテル型移植器を用いた場合の受胎率は、それぞれ 26.7%、39.2% および 55.8% とばらつき、カテーテル型移植器の使用によっても技術レベルは平準化されず、地域の技術レベルがそのまま反映されたと考えられる。受胎率のさらなる高位安定化のためには、受胎牛の飼養管理および選定技術を地域単位で向上させるとともに、特に凍結胚の ET においては、融解から移植までの手技をフィールド技術者個々にチェックしていく必要があると思われる。

フィールドの受胎牛を分娩経験の有無で区分して受胎率を比較した結果、経産牛においてカテーテル型移植器の受胎率がシース管型よりも明らかに高かった。胚の注入部位については、子宮角浅部よりも深部に移植した場合の受胎率が高いとする報告^{2,8,12)}が多い。また、経産牛においては移植操作が困難になるような状態(例えば、子宮の骨盤腔内への落ち込み、直腸への空気流

入、強度の腹圧など)が多く、カテーテル型移植器を用いた場合には、その特徴から子宮角への胚の注入操作が容易である。これらの技術的な要因と今回の調査成績から、調査対象としたカテーテル型移植器は、胚の子宮角深部への注入が困難なケースが多い経産牛への使用が有効であると考えられた。

本調査では、フィールドでカテーテル型移植器を使用した場合、シース管型と比べ、(1)個々の技術者の受胎率は低下することなく、むしろ受胎率が高まる傾向が認められ、さらに、(2)経産牛で受胎率が高い傾向であり、フィールドでのカテーテル型移植器の受胎率向上効果が示唆された。したがって、カテーテル型移植器のフィールドでの活用を図れば、受胎率の向上が期待できると考えられた。しかしながら、受胎率を高位安定化させるためには、受胎能力を有する受胎牛に、生存性を有する胚を移植することに十分留意する必要がある、今後はそれらの要因についてもあわせて検討しなければならない。

参 考 文 献

- 1) 安部茂樹ら, 島根畜試研報, 27:10-14 (1992).
- 2) Christie WB. et. al., Vet. Res., 106: 190-193 (1980).
- 3) 堂地修ら, 第 86 回日本畜産学会要旨, 40 (1997).
- 4) Halley SM. et. al., Theriogenology, 12:97-108 (1979).
- 5) 前原智ら, 島根畜試研報, 32:1-5 (1999).
- 6) 前原智ら, 島根畜試研報, 33:1-4 (2000).
- 7) MunarCJ.et.al.,Theriogenology,27:261 (1987).
- 8) Newcomb WB. et. al., J. Repro. Fertil., 59: 31-36 (1980).
- 9) 日本家畜人工授精師協会編, 家畜人工授精講習会テキスト(家畜受精卵移植編) (1999).
- 10) 西貝正彦, 家畜人工授精,155:37-43 (1993).
- 11) 岡崎尚之ら, 第 4 回西日本胚移植研究会要旨 (1999).
- 12) Rowe RF. et. al., Am. J. Vet. Res., 41:1024-1028 (1980).
- 13) ShrickFN. et.al.,Theriogenology,55:370 (2001).
- 14) Schneider HJ. et. al., Theriogenology, 13:73-85 (1980).
- 15) 志村修, 畜産の研究, 39(6) : 75-76 (1985).
- 16) Sreenan JM. et. al., Theriogenology, 27:99-113 (1987).
- 17) 社団法人畜産技術協会, 胚の衛生的取り扱いマニュアル(IETS マニュアル) (2001).
- 18) 高橋芳幸ら, 北獣会誌,27 :244-247 (1983).