

腔洗浄による受精卵移植受胎率の向上

畜産試験場 千田 惣 浩

緒 言

本県では昭和57年受精卵移植技術に関する試験研究が始まり、家畜改良や生産性向上に向けた事業が展開されてきた。今日に至るまで、高品質受精卵の採取に関する試験、受精卵の凍結技術、飼養管理を含めた受卵牛の選定方法等、数々の周辺技術が確立されてきた。また、県内の若手農業後継者を中心に、(牛)体内受精卵移植技術者養成講習会を基本2年に1回開催し、多数の技術者が養成されているが、どの時代も最終的にはフィールドでの受胎性の向上が重要な課題となってきた。秋田県の受胎率は年次差はあるものの長年、45%前後で推移しており、受胎率の向上は達成されているとは言えない。

受胎率に関与する要因を大別すると受精卵側、受卵牛側、移植技術者側に区分されるが、受胎にはそれぞれの要因が複雑に関与しており、どれ1つ欠落しても受胎には結び着かない。特に折角コンディションの良い受卵牛が用意できても、技術者の操作が不良となれば結果が着いてこない。経験的に移植後、移植器の先端に粘液の付着があると、出血痕跡と同様に受胎性が低下したり、移植前に腔鏡を用いて受卵牛の腔内を覗くと外口部にねばねばした粘液や白濁性状の粘液が付着してたり、また、高齢牛になると尿と一緒に粘液が貯留している、尿腔だったりする例も散見される。一方で、県の受精卵移植事業が開始された当初から移植を実践し、県内では毎年高い受胎率の熟練技術者であるK.S氏はいち早くから移植前に生理食塩水で腔洗浄を行う手技を取り入れていた。

このような背景の下、受胎率向上を図るため、子宮頸管経由の移植手技における従来法の改善策として、衛生面を重視した的確な移植操作を念頭に、移植前の腔検査、腔洗浄の効果を検証した。

材料と方法

1. 移植牛

移植牛は畜産試験場、秋田県農業公社ならびに農家繁養の黒毛和種80頭、ホルスタイン種32頭、その他日本短角種3頭、交雑種1頭の延べ116頭である。自然発情あるいは同期化処置(CIDRシンク)を行い、発情後7日目を基本(±1日)に移植を実施した。

2. 移植胚

県有供卵牛ならびに農家所有の高育種価採卵牛から、発情後7日目の子宮環流により回収された胚である。回収された胚のステージは①後期桑実胚(CM)、②初期胚盤胞(EB)、③胚盤胞(B)、④拡張胚盤胞(EXB)の4種類、また、ランクは変性部分の割合により概ね10%以下をAランク、10～30%をBランク、30～50%をCランクとした。また、移植胚の形態は新鮮胚、ダイレクト凍結胚、ガラス化处理胚の3形態である。

3. 移植牛の処置

1) 黄体所見

発情後5～7日目に直腸検査、一部超音波診断装置により黄体の形状をA,B,Cの3段階でランク付けした(図)。




ランク	形状	基準
A		黄体の形状は丸く大きく、黄体実質は充実し、黄体突起が明瞭である
B		黄体実質は中等以上に充実している（黄体突起部から実質にかけ水腫が認められる場合を含む）
C		黄体の形状はかなり小さく、黄体実質は硬く感じる


図 黄体のランク付け

2) 同居（共存）卵胞の有無

黄体形成側あるいは非形成側の卵巣を触診し、その有無を記録した。

3) 腔洗浄の方法(写真)

●腔洗浄の器材



①ストマックチューブ
(子牛用強制経口投薬器)

②生理食塩水(500ml)
*人肌に加温

③腔鏡(成牛用)

●腔洗浄の手技


腔検査

➡

生食の流入

➡

生食の排出



①排糞、外陰部を洗浄後、腔鏡を挿入し子宮外口部を確認（腔検査）。

②子牛用強制投薬器（商品名：ストマックチューブ、富士平工業(株)）に人肌に加温した生理食塩水 500ml を入れ、腔鏡を介し先端を外口部付近に誘導し、腔鏡を抜く。

③直腸・腔法で子宮頸管を絞るようにして生理食塩水を排出。

④再度、腔鏡を挿入し残った生理食塩水を排出。

⑤受精卵をセットした移植器の先端を子宮外口部に誘導し腔鏡を抜く。

⑥以下、子宮頸管経由法による移植操作。

4. 細菌検査

洗浄前後の子宮外口部を綿棒で拭い、細菌検査を行った。培地は5%羊血液寒天培地で、希釈倍率を $\times 10$ 、 $\times 10^3$ 、 $\times 10^5$ に調整し、24時間培養後のコロニー数をカウントした。なお、一部、菌の種類を同定するためグラム染色を施した。

5. 調査項目

調査項目は得られた移植成績をa)品種の違い、b)受精卵の形態・ステージの違い、直腸検査や超音波診断による卵巣所見としてc)黄体のランク別、d)同居する卵胞の有無別、

また、e) 腔洗浄の粘液塊の漏出の有無別に受胎性の要因解析を行った。

なお、統計解析はカイ二乗検定を用いた。

結果

1. 品種別受胎成績

全体で116頭移植を行い、68頭が受胎、受胎率は58.6%であった。品種別では、黒毛和種が56.3%、ホルスタイン種が62.5%、日本短角種・F1が75%で、品種間に有意な差は認められなかった(表1)。

表1 品種別受胎成績

品種	頭数	受胎	不受胎	受胎率	有意差
黒毛和種	80	45	35	56.3%	n. s.
ホルスタイン種	32	20	12	62.5%	n. s.
その他*	4	3	1	75.0%	n. s.
計	116	68	48	58.6%	

* 日本短角種3、交雑種1頭

2. 受精卵の形態別受胎成績

新鮮胚は35頭ET、受胎20頭で受胎率57.1%、ダイレクト凍結胚は66頭ET、受胎39頭で受胎率59.1%、低ランク胚を超低温凍結したガラス化胚は15頭ET、受胎9頭で受胎率66.7%で受精卵の形態による有意な差は認められなかった(表2)。なお、ガラス化胚移植牛3頭のうち、2頭が受胎し、1組は同性の双子(雄)が得られた。

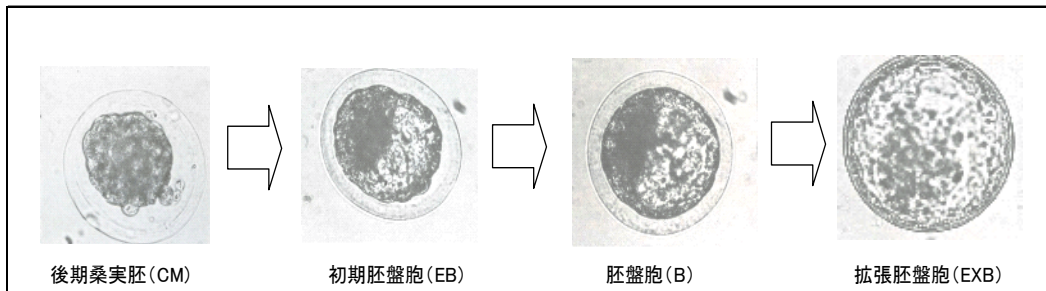
表2 受精卵の形態別受胎成績

粘液	頭数	受胎	不受胎	受胎率	有意差
新鮮胚	35	20	15	57.1%	n.s.
ダイレクト胚	66	39	27	59.1%	n.s.
ガラス化胚*	15	9	6	66.7%	n.s.
計	116	68	48	58.6%	

* 2卵ET、3頭含む

3. 受精卵の発育ステージ別受胎成績

写真のとおり、回収される受精卵の形態には違いがあり、その減数分裂による発育の過程で左から後期桑実胚(CM)→初期胚盤胞(EB)→胚盤胞(B)→拡張胚盤胞(EXB)となる。



胚の発育ステージ

表3の通り新鮮胚、ダイレクト凍結胚とも有意な差は認められなかったが、例数の多い後期桑実胚(CM)や初期胚盤胞(EB)ではダイレクト凍結胚で新鮮胚より受胎率が高い傾向にあった。また、例数は少ないものの発育ステージが進んでいる拡張胚盤胞(EXB)は新鮮胚の状態だと6頭中5頭受胎したが、ダイレクト凍結胚では2頭とも不受胎となったことから、凍結には向かないことが検証された。

表3 胚の発育ステージ別受胎成績

形態	ステージ	頭数	受胎	不受胎	受胎率	有意差
新鮮胚	後期桑実胚 (CM)	17	8	9	47.1%	n.s
	初期胚盤胞 (EB)	5	2	3	40.0%	n.s
	胚盤胞 (B)	7	5	2	71.4%	n.s
	拡張胚盤胞 (EXB)	6	5	1	83.3%	n.s
ダイレクト胚	後期桑実胚 (CM)	43	26	17	60.5%	n.s
	初期胚盤胞 (EB)	16	9	7	56.3%	n.s
	胚盤胞 (B)	5	4	1	80.0%	n.s
	拡張胚盤胞 (EXB)	2	0	2	0.0%	n.s

4. 黄体の形状(ランク)別受胎成績

黄体の形状別ではA>B>Cの順番で受胎率が高くAランクは1%水準で有意に受胎性が高く、Cランクは低くなった(表4)。

5. 同居(共存)卵胞の有無別受胎成績

移植の時期には第1次フォリクルウエーブとしてその発情周期中選択された卵胞が卵巣に存在するが、卵巣に存在した場合の受胎率は66.7%で、著明に確認されなかった場合の53.5%と遜色なく、有意な差は認められなかった(表5)。

表4 黄体の形状(ランク)別受胎成績

ランク	頭数	受胎	不受胎	受胎率	有意差
A	48	37	11	77.1%	**
B	49	25	24	51.0%	n.s.
C	19	6	13	31.6%	**
計	116	68	48	58.6%	

* * P<0.01

表5 同居(共存)卵胞の有無別受胎成績

有無	頭数	受胎	不受胎	受胎率	有意差
有り	45	30	15	66.7%	n.s.
無し	71	38	33	53.5%	n.s.
計	116	68	48	58.6%	

次に、同居(共存)卵胞の有無別に有意な差が認められた黄体の3ランクを別にして受胎性を検討した(表6)。同居(共存)卵胞が存在した場合、有意な差は認められなかったが、A>B>Cの順で受胎率は高い傾向にあった。一方、著明な同居(共存)卵胞が存在しなかった場合、A>B>Cの順で受胎率は良く、しかもAランクで1%水準、BおよびCランクで5%水準で有意な差となった。本結果から、受胎性には黄体の形状が大きいことが検証された

ことから、受精卵の卵巣所見で特に黄体の形状が受胎性に影響があることが明らかとなった。

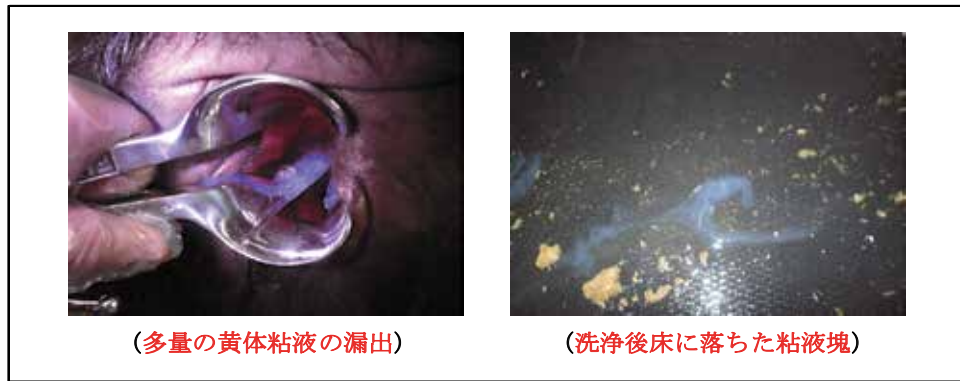
表6 同居(共存)卵胞の有無と黄体ランク別受胎成績

卵胞	黄体ランク	頭数	受胎	不受胎	受胎率	有意差
有り	A	12	11	1	91.7%	n.s.
	B	26	17	9	65.4%	n.s.
	C	7	3	4	42.9%	n.s.
無し	A	36	26	10	72.2%	**
	B	23	8	15	34.8%	*
	C	12	3	9	25.0%	*
計		116	68	48	58.6%	

** P<0.01
* P<0.05

6. 頸管粘液の漏出の有無と受胎成績

移植牛 116 頭中 49 頭の 42.2%と高い割合で、腔洗浄により頸管粘液の漏出が確認された(写真)。



高粘稠、白濁性の頸管粘液漏出例

受胎率を比較すると、粘液の漏出が確認された49頭中27頭受胎 (55.1%) で、確認されなかった場合の67頭中41頭受胎 (61.2%) と遜色のない受胎性が得られた(表7)。

次に粘液の漏出の有無と黄体ランク別に受胎成績を検討した。粘液の漏出の有無にかかわらず、受胎率は黄体ランクに依存し、ランクはA>B>Cの順に高く、特に漏出が確認されなかった場合はAランクで有意に高く、Cランクで有意に低い結果であった(表8)。

表7 粘液漏出の有無と受胎成績

粘液の漏出	頭数	受胎	不受胎	受胎率	有意差
有り	49	27	22	55.1%	n.s.
無し	67	41	26	61.2%	n.s.
計	116	68	48	58.6%	

表8 粘液漏出有無と黄体ランクとの受胎成績

粘液の漏出	黄体ランク	頭数	受胎	不受胎	受胎率	有意差
有り	A	18	11	7	61.1%	n.s.
	B	24	13	11	54.2%	n.s.
	C	7	3	4	42.9%	n.s.
無し	A	30	26	4	86.7%	**
	B	25	12	13	48.0%	n.s.
	C	12	3	9	25.0%	**
計		116	68	48	58.6%	

** P<0.01

7. 細菌検査

検査牛8頭中4頭で、グラム陽性の球桿菌が検出された。洗浄前の、コロニーの数からはその数に差があるが、洗浄後には全頭9個以下に減少した(表9)。特に洗浄前の子宮外口部の汚染が顕著と考えられた管理No. 青4号はめでたく受胎した。

表9 洗浄前後のコロニー数の推移

牛No.	洗浄前				洗浄後			
	原液	×10	×10 ³	×10 ⁵	原液	×10	×10 ³	×10 ⁵
621号	21	4	3	-	1	-	-	-
10号	1	-	-	-	-	-	-	-
青4号	75	14	-	-	9	-	-	-
モリル6号	25	5	-	-	3	-	-	-
651号, 3号 109号 B4号	分離なし				分離なし			

考 察

受精卵移植手技における、腔洗浄効果を検証した。

1. 受胎率は大幅に改善された。
2. 高頻度で粘液の漏出が確認されたが、その受胎性に有意な差は認められず、成績は黄体のランクに左右される結果となった。
3. 粘液塊には頸管炎を疑わせるものも有ったが、
4. 細菌検査から優位な菌は洗浄で洗い流されることが示唆された。

受精卵移植は発情後7日目を基本に行われるが、この時期は細菌感染を受けやすいとされる。頸管粘液を取り除くことで操作中の移植器先端に付着した粘液が子宮内に持ち込まれる等のリスクが軽減されることで、受胎率向上に結び着くものと考えられた。

今後、若手有資格者を中心に技術伝達するとともに、秋田県の(牛)受精卵移植総合推進事業の発展に寄与させたい。