

過排卵誘起家兎の排卵及び受精卵の採取と移植に関する研究

町田 隆彦・上松 康夫・青木 晋平

(農学部 畜産学研究室)

Studies on the Ovulation, Fertilized Ova Collection and the Ova Transfer of the Superovulated Rabbits with Gonadotrophins

Takahiko MACHIDA, Yasuo UEMATSU and Shimpei AOKI

Laboratory of Zootechnical Science, Faculty of Agriculture

Abstract: An experiments were designed to determine in relation the hormonal does on the number follicles, number of ovulation, number of ova recovered and percentage of ova recovered for the superovulated rabbits with gonadotrophin, when the pregnancy rate of transferred ova from donor into the uterus or oviduct of a recipient rabbits. The results are summarized as follows:

(1) When rabbits were treated with 50 IU of HCG after pretreatment with PMSG (40, 50, 75 IU) the average number of developed follicles was ranged from 71.3 ± 4.9 to 108.9 ± 9.2 . The other group treated with FSH (0.6, 1.0 AU) responded with an average of 81.4 ± 5.1 follicles.

(2) The average number of ovulated ova was ranged from 43.3 ± 4.6 to 72.4 ± 8.4 in superovulated rabbits treated with PMSG and in those treated with FSH was 53.2 ± 4.6 , respectively. There were minus correlation ($r = -0.266$) in the relationship between ovulation points and body weight. There were no significant in the number of ovulated ova between the left and right ovaries of adult rabbits.

(3) The number of collected ova were ranged from 9.6 ± 3.2 to 18.8 ± 3.0 in rabbits with gonadotrophin, average number of ova per female was 14.1. The rate of collected ova of the 24 to 72 hours after treated with HCG were decreased in order to the superovulation.

(4) On the times of cleaved stages of ova in superovulation rabbits, 1 to 4 cell stages was 24 to 30 hours after HCG injection, 2 to 8 cell stages at 47 to 54 hours, 8 to 32 cell or morla stages at 72 to 74 hours, respectively.

(5) When fertilizing ova were transferred to the oviduct and uterus of pseudopregnant recipient females, the percentage of females becoming pregnant were 58.6%, and the rate of ova implantation was 24.7%. The pregnancy rate was higher for morla stages than for 2 to 32 cell eggs.

近年人工授精の技術が急速に進歩して1頭の種雄畜から年間1万頭に近い優良な子畜を生産することが可能となった。これに対して雌畜の場合、生後2、3ヶ月で数万個存在する原始卵胞も¹⁾1発情期に排卵する卵胞数は牛では1個、緬山羊で1~3個、豚や家兎などの多胎動物でも10個内外しか卵巢外に排出されない。そして大部分の卵子は閉鎖卵胞として消滅していく。そこでこのように卵巢内に数多く存在している潜在的卵子を人為的に取り出し、これを同一体内あるいは他の雌個体の体内に移植して子畜を得ることができれば母系からの優秀な形質を有効に利用でき産業的に貢献するところ大である。その1手段として母体内で多胎を得るための誘起多胎の方法が考えられるが、杉江²⁾らによると中では一時に多数の排卵が起った場合、受精卵は發育段階の早期にへい死する例が多いと報告している。また石島³⁾も PMSG と Prolactin の投与により着床数を増加させることができたが、胚の途中にへい死が多く、殆んど分娩まで生存させることができなかったと報告

している。以上のように誘起多胎による方法は未だその成果があがっていない。そこでこれら優秀な雌畜の母体内で多数排卵した受精卵を早期に取り出し、他の個体に移植して胎児として発育させる方法が Heap⁴⁾ Pincus & Enzmann⁵⁾ らによって家兎で試みられ産子を得ることに成功して以来数多く報告がある。とくに最近 Polge ら⁶⁾ によって豚及びその他の家畜で高い成功例が報告されている。この受精移植の術式を進展することは家畜の改良増殖上大きな役割を果たすとともに着床、妊娠などの機構解明に極めて重要な意義を持つものと考えられる。

本試験では家兎の過排卵誘起、受精卵の採卵及び移植法に関して供試ホルモンの種類、投与量、投与時間、採卵方法、移植時期等について検討した。

材料及び方法

Donor 家兎としては体重 2.0~5.0kg の成雌を 107 頭、Recipient 家兎として 29 頭、計 136 頭を供試した。

過排卵誘起：過排卵誘起には PMSG (Serotropin—帝国臓器)、FSH (Antrin—東芝) を Fig. 1 に示す方法で投与した。すなわち A 区 (38 頭)、B 区 (32 頭)、C 区 (18 頭) は PMSG 40, 50, 75

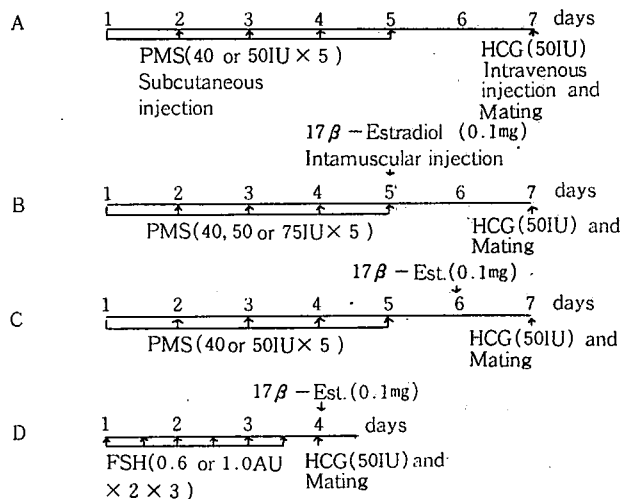


Fig. 1. Procedure of superovulation in rabbit

iu を 5 日間皮下注射した後、B 区は PMSG 投与開始から 5 日目、C 区は 6 日目に 17β -estradiol (Ova hormone benzoate—帝国臓器) 0.1 mg を筋注した。A, B, C, の 3 区とも排卵を誘発させるため 7 日目の交配と同時に HCG (Synahorin—帝国臓器) 50 iu を静注した。一方 FSH を用いた D 区 (19 頭) は 0.6~1.0 Au を 1 日 2 回 3 日間皮下注射した後、投与開始から 4 日目に 17β -estradiol 0.1 mg を筋注して交配と同時に HCG 50 iu を静注した。

採卵：HCG 静注後 24~30 時間、47~54 時間、72~74 時間に開腹し、生殖器を摘出して卵巣を観察したのち、上向性灌流法 (H 法)⁷⁾ あるいは下向性灌流法 (A 法)⁸⁾ によって卵管及び子宮より採卵した。採取した卵子は直ちに実体顕微鏡下 ($\times 50 \sim \times 100$) で卵子を計数するとともに分割程度ならびに形態を観察した。

受精卵の移植：Recipient 家兎は Donor と同一時期に HCG を静注後、精管カット雄兎と同居させ偽妊娠誘起して同期化した。Donor より採取した 2, 4, 8, 16 分割卵は開腹した Recipient

の卵管采から卵管へ、また32及び桑実胚の卵は子宮角上部へ3~15 μ l の卵子浮遊液 (Ringer 液 2 : 兎血清 1) とともにガスクロ用マイクロシリンジを用いて注入移植した。なお受精卵の体外での取扱時には室温を 30°C に保ち、採卵後 1 時間以内に移植するようにした。Recipient は移植後 14 日目に開腹し、子宮及び卵巣を剖見し、胎児の着床状態ならびに卵巣の黄体を観察した。

結果及び考察

1. 発育卵胞数及び排卵数

従来過排卵処理に用いる Estrogen の投与に関しては 2 つの方法が試みられてきた。すなわち Estrogen を前投与して PMSG の反応を安定させる目的と、PMSG 処理で卵胞が発育した時期に Estrogen を投与して両者の協同作用で排卵効果をあげる 目的で用いられてきた。その機序については Estrogen のフィードバックによる間接作用か、あるいは卵巣に対する直接作用か、または両者の相互作用によるか未だ不明な点が多い。(Hafez et al⁹⁾, Wyss & Pincuss¹⁰⁾, 石島¹¹⁾) 本試験では後者の方法、すなわち PMSG 投与後 5 日目か 6 日目に 17 β -estradiol を投与する方法を試みた。

A, B, C, D の各処理区における発育卵胞数及び排卵数は Table 1 に示す通りである。発育卵胞数を A, B, C, D の各処理別にみると C 区が最高で平均 108.9 \pm 9.2, 以下 A 区 89.4 \pm 9.1, D 区 81.4 \pm 5.1, B 区 71.3 \pm 4.9 であった。また C 区の中でも PMSG 50 iu 投与区が最も多く、平均 109.0 \pm 13.0 であった。A, B, C の 3 区において PMSG 40 iu 投与区に比べて 50 iu 区が発育卵胞数が増加する傾向を示した。しかし B 区で 75 iu 区は 50 iu 区よりもむしろ若干発育卵胞数が減少した。また D 区の FSH 投与においても 0.6 Au 投与区よりも 1.0 au 区が減少した。しかしながら各処理区が発育卵胞数と投与量間には統計的に有意な差は認められなかった。

A, B, C, D 各区の排卵数は C 区が最も多く平均 72.4 \pm 8.2 で次いで A 区 66.2 \pm 9.5, D 区 43.3 \pm 4.6 の順であった。とくに C 区の PMSG 40 iu 投与区が 75.4 \pm 15.4 と最高の排卵数が得られた。A, B 区の PMSG 40 iu 投与区よりも 50 iu 区が排卵数が増加したが、B 区の 50 iu と 75 iu 区間の排卵数には差が認められなかった。C, D 区においては PMSG あるいは FSH 投与量の増加に伴い排卵数は逆に減少した。しかし排卵数においても過排卵誘起ホルモンの投与量間には有意差はなかった。Estrogen の投与時期については杉江¹²⁾ は牛において PMS 注射後、卵胞が発育し始めた時期に Estrogen を投与して好成績を得ている。また石島ら¹³⁾ はゴールデン・ハムスターを用いて PMSG 注射後 36 時間で最も排卵数が多かったと報告している。さらに菅原ら¹⁴⁾ は PMSG 処理ラットの卵管分泌液の変化を経時的に調べ、最終 PMSG 投与後 24 時間に発情徴候を示し、48 時間で最もよい発情状態となり、さらに Estrogen 投与によって卵管分泌液量が増大すると報告している。家兎の過排卵誘起ホルモンの種類に関しては PMSG は FSH に比較して効果が少ない (Pincus¹⁵⁾, 佐久間¹⁶⁾, 石島¹⁷⁾) と報告されているが、本試験では両ホルモン間の効果には差が認められなかった。また PMSG 投与量と排卵数との関係については石橋¹⁷⁾, 佐藤¹⁸⁾ のラットの実験で 40~50 iu が最多排卵数を得る限界であり、それ以上の投与量ではむしろ減少すると述べている。供試家兎の排卵数と体重との間には負の相関 $r = -0.266$ ($p < 0.5$) が認められ、供試した体重の大きい個体では HCG 量が不足し排卵数が減少した。(Fig. 2) 石島¹⁹⁾ は排卵数と体重との間には相関はないと報告しているが、VARIAN et al²⁰⁾ は過排卵処理家兎の体重と LH 投与量を検討した結果 2.0 mg/kg の投与で最も多い排卵数を得られたと述べている。

排卵数の季節的変異をみると 7, 8, 9 月の高温多温期及び換毛期に減少する傾向が認められた。(Table 2) 石橋^{19, 21)}, 竹内ら²²⁾ も同様の報告をしている。

Table 1. Number of developmental follicles, ovulation points and ova recovered in different hormonal treatments at superovulation rabbits

Treatments	A												B						C						D	
	40		50		27		14		40		50		75		40		50		50		0.6		0.0			
	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R		
Hormone does																										
No. of females	11																									
No. of developmental follicles	34.9	37.4	46.5	49.0	30.7	33.1	38.1	40.5	38.6	37.7	38.6	37.7	55.7	53.0	54.3	54.8	41.8	43.5	40.3	39.2						
Mean±S.E.	72.3±21.6		96.6±9.2		63.1±6.2		78.6±9.5		76.3±11.5		108.7±13.0		109.1±13.0		89.0±8.1		77.8±6.5									
No. of ovulation points	24.1	29.0	33.9	36.2	19.4	19.8	20.7	25.7	24.3	22.3	38.9	36.6	33.3	37.3	25.0	29.0	26.4	26.6								
Mean±S.E.	55.3±22.8		71.7±9.7		39.2±6.8		46.5±8.1		46.6±10.1		75.4±15.4		70.5±10.3		54.0±6.3		53.0±6.2									
No. of follicles	10.2	8.8	12.2	12.3	11.4	12.4	17.4	14.8	14.3	15.4	16.9	16.4	21.0	17.5	16.8	14.5	12.4	16.2								
Mean±S.E.	19.0±3.6		24.8±4.1		23.9±3.0		32.2±3.8		29.7±4.6		33.3±10.6		38.5±8.4		35.0±5.7		24.8±3.5									
Rate of ovulation (%)	55.6		70.3		59.4		57.9		59.5		68.3		65.7		60.7		66.8									
Mean±S.E.	73.3		74.3		62.2		59.1		61.2		69.4		64.7		66.7		68.1									
No. of ova recovered	3.8	4.6	6.4	6.0	11.0	11.0	6.5	9.3	10.0	7.0	10.7	6.1	2.1	2.9	9.3	6.7	7.0	8.7								
Mean±S.E.	8.5±4.6		12.5±3.3		22.0±5.1		15.7±4.9		17.0±5.5		16.9±5.9		5.0±3.0		15.8±10.1		15.7±3.1									
Rate of ovum recovery (%)	27.1		22.3		51.2		33.1		35.7		25.2		6.4		26.5		33.3									
Mean±S.E.	15.9		17.4		56.1		33.9		36.5		23.3		7.1		29.3		29.6									

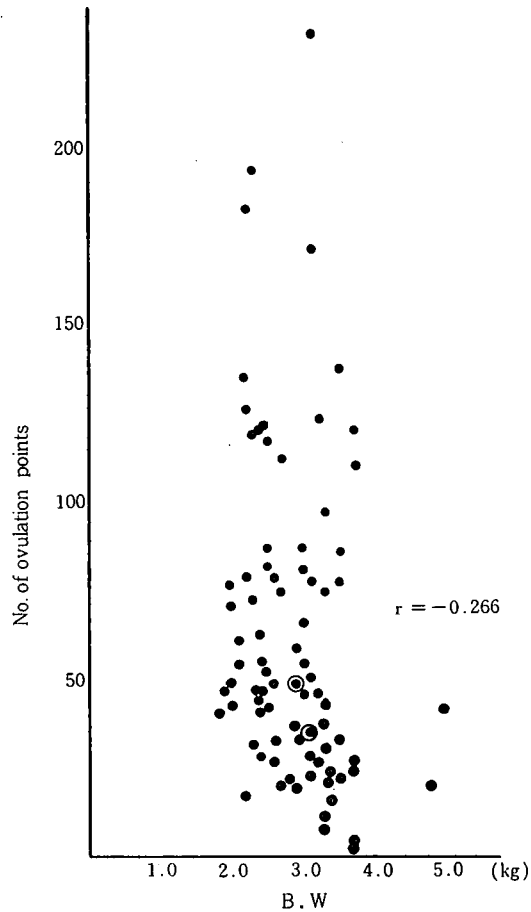


Fig. 2. Relation between No. of ovulation points and body weight

Table 2. Seasonal variation of No. of ovulation points

Month		7	8	9	10	11	12	1
A	No. of rabbits		2	7	14	11	3	
	Range		3 — 23	17 — 81	25 — 195	4 — 182	27 — 23	
	Mean ± S. E.		13.0 ± 10.0	33.1 ± 8.5	86.4 ± 13.0	50.5 ± 15.1	143.0 ± 60.5	
B	No. of rabbits	3		2	7	12	8	
	Range	35 — 42		29 — 35	21 — 55	12 — 101	20 — 126	
	Mean ± S. E.	38.3 ± 2.0		32.0 ± 3.0	36.9 ± 4.5	37.8 ± 6.2	62.0 ± 13.9	
C	No. of rabbits					8	8	2
	Range					32 — 137	35 — 123	44 — 117
	Mean ± S. E.					69.1 ± 12.1	73.8 ± 12.0	80.5 ± 36.5
D	No. of rabbits					1	16	2
	Range					34	20 — 87	55 — 63
	Mean ± S. E.					34.0	73.8 ± 5.3	59.0 ± 4.3
Total	No. of rabbits	3	2	9	21	32	35	4
	Range	35 — 42	3 — 23	17 — 81	21 — 193	4 — 182	20 — 231	44 — 117
	Mean ± S. E.	38.3 ± 2.0	13.0 ± 10.0	32.9 ± 6.5	69.9 ± 10.1	49.8 ± 6.6	67.9 ± 7.6	69.8 ± 16.2

左右卵巢別の排卵数は左卵巢28.0 (48.3%), 右卵巢30.0 (51.7%) で、ほぼ同数であった。ADAMS²³⁾も左右卵巢の排卵数には差がなかったと報告している。

A, B, C, D各処理区の排卵率はそれぞれ74.1%, 60.7%, 66.5%, 65.5%で有意差はなかった。また全試験区とも発育卵胞数及び排卵数に個体差が大きくみられた。

2. 採卵数及び採卵時間

採卵数はB区が最も多く、平均 18.8 ± 3.0 (採卵率43.3%) で以下D区 15.7 ± 3.6 (29.5%), A区 11.3 ± 2.7 (17.1%), C区 9.6 ± 3.2 (13.3%) で全平均 14.1 ± 1.6 であった。中でもB区のPMSG 40iu 投与区が平均 22.0 ± 5.1 で最も多い採卵数が得られた。しかし本試験の採卵率は著しく低かった。ただ過排卵処理による採卵率が低下することについては石島²⁴⁾、杉江²⁵⁾の報告がある。

採卵率と採卵時間との関係を見ると、HCG 投与後24~30時間、47~54時間、72~74時間の採卵率は35.7%, 21.5%, 14.0%と経時的に低下した。なお採卵部位はHCG 投与54時間後までは卵管から、以後74時間までは殆んどが子宮からであったが、この子宮からの卵回収が著しく悪かった。子宮部位の採卵率の低下についてはTsutsumi & Hafez²⁶⁾の報告がある。また上向と下向灌流法との間には採卵数に差が認められなかった。

3. 採取卵の分割程度

HCG 注射後採卵までの各時間における卵子の分割程度はTable 3に示した。24~28時間、30時間、47~54時、72~74時間後に採取した卵子の分割程度は各々1~4分割、2~8分割、8~32分割、桑実胚であり、VARIAN et.al²⁰⁾ 石島¹³⁾らの報告と近似した割合であった。また変性卵子の

Table 3. Relation between degree of cleavage and hours after HCG

Hrs. after HCG	No. of rabbits	Cell stage							
		1-cell	2-cell	4-cell	8-cell	16-cell	32-cell	Morula Denatured	
24	3	2						1	
25	4	12	28	2				2	
26	6	18	19	2					
27	1		13						
28	2	3	47	28				1	
Total (%)	16	35 (19.7)	107 (60.1)	32 (18.0)				4 (2.2)	
30 (%)	21	112 (28.6)	46 (11.7)	165 (42.1)	49 (12.5)	17 (4.3)		4 (0.8)	
47	1	1							
48	25	115	3	12	39	116	4	28	
49	18	69	1	3	52	120	11	36	
50	6	3				24	26	4	
51	7	12		1	12	56	43	22	
54	1		2						
Total (%)	58	200 (24.5)	6 (0.7)	16 (2.0)	103 (12.6)	316 (38.8)	84 (10.3)	90 (11.0)	
72	5							10	
73	6	2			2	1	3	54	
74	1							27	
Total (%)	12	2 (1.8)			2 (1.8)	1 (0.9)	3 (2.7)	64 (58.2)	38 (34.5)

割合は絶対的に増加し、2.2%、0.8%、11.0%、34.5%であった。この変性卵子の経時的増加は未受精卵の卵黄の崩壊あるいは収縮による (ADAMS²⁷⁾) が考えられる。

4. 受精卵の移植

過排卵誘起して得られた受精卵を同期化した Recipient へ移植した後、14日目に開腹して子宮内の胎児着床状態を剖見した成績は Table 4 に示した通りである。Recipient 29頭の中妊娠した家

Table 4. No. of ova transfered and implantation

Rabbit No.	Cell stage	No. of ova transfered		No. of corpora lutea		No. of implantation		Rate of implantation (%)
		L.	R.	L.	R.	L.	R.	
1	2-cell	7	7	7	6	0	0	0
2		3	3	11	12	0	0	0
3		4	4	9	4	4	3	87.5
4		9*	9	4	7	2	0	11.1
5		6	5*	6	5	6	3	81.8
6	4-cell	9**	9	3	8	0	0	0
7		4	4	0	7	0	1	12.5
8		4	5	12	11	0	0	0
9		4	4	5	8	0	1	12.5
10	8-cell	6	3	7	6	0	0	0
11		5	5	9	3	3	0	30.0
12	16-cell	6	5	8	7	0	0	0
13		5	4	6	7	5	4	100
14		4	4	7	8	0	0	0
15		7	7	6	8	0	0	0
16		6	6	5	2	2	1	25.0
17		5	5	3	5	0	0	0
18		3	3	5	7	2	1	50.0
19		4	4	2	10	0	3	37.5
20		4	4	8	8	0	2	25.0
21	32-cell	4	4	5	1	0	1	12.5
22		4	4	5	8	0	1	12.5
23		4	4	3	8	0	0	0
24		4	4	2	4	0	0	0
25	morula	3	3	5	4	5	0	83.3
26		4	4	3	8	4	4	100
27		4	4	5	2	0	0	0
28		4	4	4	7	4	4	100
29		4	4	8	2	2	0	25.0

* : 4-cell stage

** : 3 ova were 2-cell stage

兎は17頭 (56.8%) で、総移植卵数275のうち68 (24.7%) の卵が着床した。2, 4, 6, 8, 16, 32及び桑実胚の分割卵子の着床率はそれぞれ 28.3%, 13.0%, 15.8%, 23.3%, 6.3%, 60.5%で桑実胚が最良の成績を示した。CHANG²⁸⁾, BHATT & Bullock²⁹⁾ らも排卵後 72時間以上経過した桑実胚以上の卵において65.6%, 77%の着床率を得ている。移植家兔の平均黄体数は 11.9 ± 0.8 であった。左右卵巣の黄体数と着床数の関係を見ると、黄体数の多い子宮角側に着床しやすい傾向が認められた。

着床した卵子数に対する生存胎児の割合は 2, 4, 8, 16, 32分割及び桑実胚において72.2, 28.6, 100, 65.0, 50.0, 87.0%であった。また移植14日後の平均胎児体長は 1.6~2.2 cm であった。

要 約

本試験は体重 2.0~5.0 kg の家兎136頭を用い、受精卵移植における過排誘起ホルモンの投与方法と量、採卵の方法と時間、移植の時期等について検討した。

1) 過排卵誘起ホルモンとして PMSG (40, 50, 75 iu) を投与した試験区の発育卵胞数は71.3±4.9~108.9±9.2であった。また FSH (0.6, 1.0 Au) 投与区の発育卵胞数は81.4±5.1であった。

2) 排卵数は PMSG 投与区において43.3±4.6~72.4±8.4で、FSH 区は53.2±4.6であった。排卵数と体重との間には負の相関 $r = -0.266$ がみられた。また左右卵巣の排卵数に有意な差は認められなかった。

3) 採卵数は9.6±3.2~18.8±3.0で供試家兎1頭当りの平均採卵数は14.1であった。HCG 注射後24~72時間後の採卵率は経時的に低下した。

4) HCG 投与後24~30, 47~54, 72~74時間後の採取卵の分割程度は各々1~4, 2~8, 8~32分割及び桑実胚であった。また一方変性卵の割合は経時的に増加した。

5) 受精卵移植家兎の58.6%が妊娠し、移植卵の24.7%が着床した。移植卵の分割程度が桑実胚のとき最も高い着床率(60.5%)が得られた。胎児生存率は67.2%であり、その平均胎児体長は1.8 cm であった。

文 献

- 1) Kapell, J. (1908) Landw. Jb. Schweiz 22, 53.
- 2) 杉江 佶 (1974) 畜産の研究 28, 371.
- 3) 石島芳郎 (1972) 家畜繁殖誌 18, 29.
- 4) Heap, W. (1890) Proc. Roy. Soc. Lond. 48, 457.
- 5) Pincus, G. & Enzmann, E. V. (1934) Proc. U.S. Nat. Acad. Sci. 21, 121.
- 6) Polge, C. & Rowson, L. E. A. (1973) Recent Progress in techniques for increasing reproductive potential in farm animals III World conf. Anim. Prod.
- 7) Hunter, G. L., Adams, C. E. & Rowson, L. E. A. (1951) J. Hered 42, 259.
- 8) Avis, F. R. & Sawin, P. B. (1951) J. Hered. 42, 259.
- 9) Hafez, E. S. E., Sugie, T. & Hunt, W. L. (1963) J. Reprod. Fert. 5, 381.
- 10) Wyss, H. I. & Pincus, G. (1964) Endocrinology 75, 586.
- 11) 石島芳郎, 伊藤雅夫, 平林 忠, 佐久間勇次 (1968) 家畜繁殖誌 14, 43.
- 12) 杉江 佶 (1968) 畜産の研究 22, 1279.
- 13) 石島芳郎, 平林 忠 (1976) 東京農大農学集報 21, 104.
- 14) 菅原七郎, 竹内三郎 (1967) 日畜会報 38, 334.
- 15) Pincus, G. (1940) Anat. Rec. 77, 1.
- 16) 佐久間勇次, 相沢源三郎, 安藤三郎, 安田泰久 (1955) 日畜会報 26, 39.
- 17) 石島芳郎, 佐久間勇次 (1967) 家畜繁殖誌 12, 133.
- 18) 佐藤昌子 (1962) Jap. Jour. Genet. 37, 253.
- 19) 石島芳郎, 伊藤雅夫, 佐久間勇次 (1960) 家畜繁殖誌 15, 26.
- 20) Varian, N. B., Maurer, R. R. & Foot, R. H. (1967) J. Reprod. Fert. 13, 67.
- 21) 石橋 功 (1967) 家畜繁殖誌 12, 127.
- 22) 竹内三郎, 清水寛一, 佐久間勇次, 佐藤匡美 (1960) 家畜繁殖誌 6, 4.
- 23) Adams, C. E. (1956) J. Endocrin. 13, 296.
- 24) 石島芳郎 (1971) 東京農大集報 16, 44.
- 25) 杉江 佶 (1966) 家畜繁殖誌 12, 73.
- 26) Tsutsumi, Y. & Hafez, E. S. E. (1974) J. Morph. 144, 323.
- 27) Adams, C. E. (1970) J. Reprod. Fert. 23, 319.
- 28) Chang, M. C. (1951) Endocrinology 48, 17.
- 29) Bhatt, B. M. & Bullock, O. W. (1974) J. Reprod. Fert. 39, 65.

(昭和55年8月28日受理)

(昭和55年10月30日発行)