



日本中央競馬会
特別振興資金助成事業



障がい者や初心者に安全な馬の 新しい生産法

凍結精液による人工授精・受精卵移植法の手引



令和2年3月

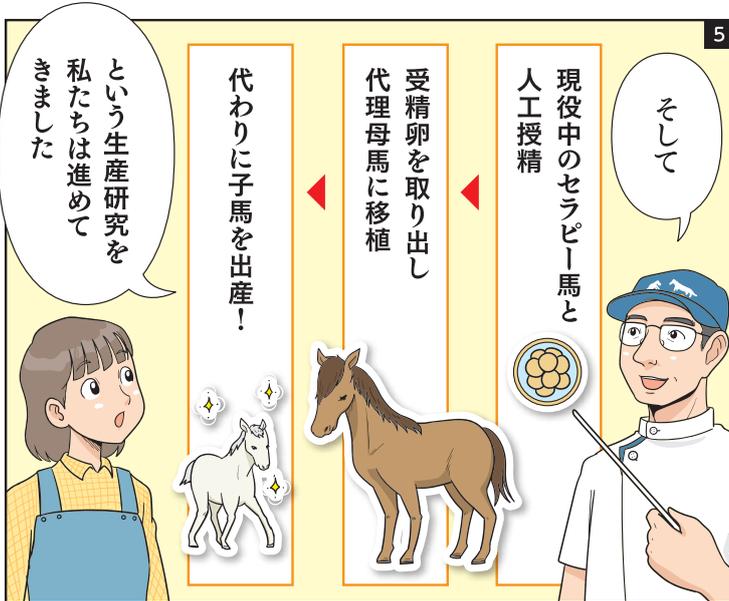
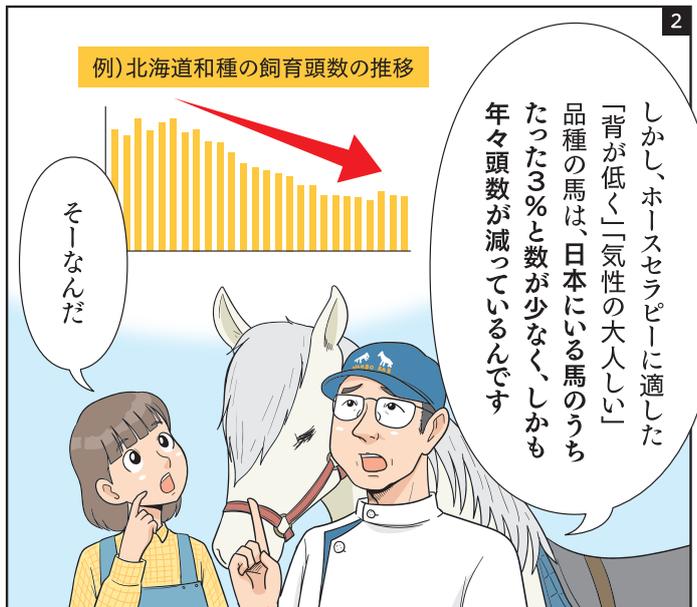
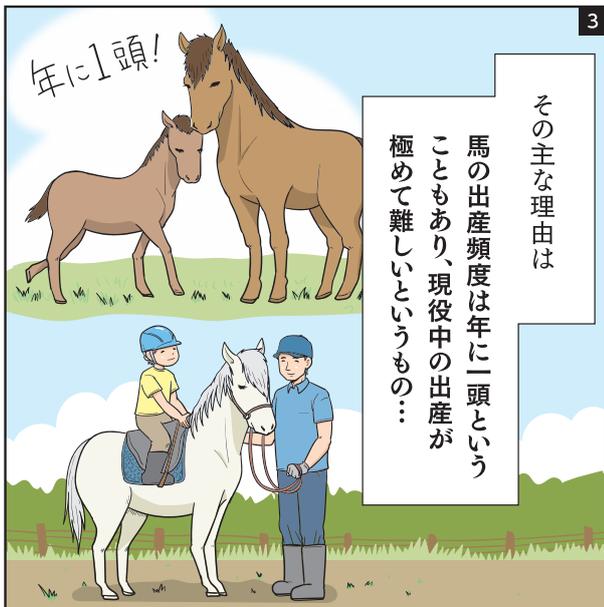
国立大学法人 帯広畜産大学

ホースセラピー普及への貢献と 減少する日本馬を守る活動

帯広畜産大学



障がい者や高齢者・初心者に安全な乗用馬の生産研究

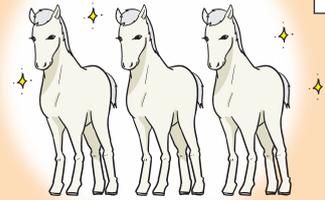


この技術によって、
母馬は現役で働きながら



年に何頭もの
ホースセラピーに適した
子馬の誕生が可能に
なったのです！

へえ



国内初の 快挙!

その結果、令和元年には
3頭の子馬が生まれ
今もまた新たに
3頭が生まれる予定です

わあ、楽しみ♪



さらに、
この技術を発展させ、
ホースセラピーに
向いている馬を増やし

心身に障がいがある方や
初心者、高齢者が

もっともっと
馬と触れあう機会を
増やしていきます！

素敵ですね



また、この技術を使って
絶滅しそうな希少な和種を
増やす計画も進行中！



助手の本多さん

応援してね!!

私たちは、これからも
ホースセラピーの普及に貢献し
減少する日本馬を救うため、
この研究を続けて参ります



この取り組みに関するお問い合わせ先

帯広畜産大学 グローバルアグロメディシン研究センター 教授/馬介在活動室 室長 南保 泰雄
〒080-8555 帯広市稲田町西2線11番地 E-mail:ynambo@obihiro.ac.jp http://univ.obihiro.ac.jp/~dosanko/



目次

国内の小格馬の現状	1
障がい者乗馬とは	1
帯広畜産大学で事業を実施した経緯	2
事業の概要	3
人工授精 (AI) の手順について	4
1 凍結精液を用いた人工授精の概要	4
2 排卵誘発剤投与から人工授精まで	4
使用する排卵誘発剤	4
排卵誘発剤の投与のタイミング	4
人工授精のタイミング	5
3 深部人工授精の手順	6
人工授精の手順	6
4 凍結精液の深部人工授精手順	6
馬の保定	6
卵巢、子宮の状態の確認	6
外陰部の消毒	7
カテーテルの子宮角深部への挿入	8
ストロー内精液の融解および子宮角深部への注入	8
正常に精液が注入されているか確認	9
5 人工授精後	10
まずは排卵確認	10
子宮の状態を確認	10
排卵誘発剤の投与から人工授精後の検査までの流れ	10
6 受胎しない理由	11
なぜ受胎しないか	11
①凍結精液の質	11
②牝馬のステータス	11
まとめ	11
受精卵移植 (ET) の概要と手順について	12
1 概 要	12
2 受精卵移植の利点 [2]	12
受精卵移植までの流れ	12
受精卵移植の手順	14
パドックで飼養している北海道和種の分娩管理	21
分娩前	21
分娩徴候・予測	21
いよいよ分娩へ	21
初乳の重要性	21
ライトコントロール	22
ウマのライトコントロールとは	22
ブルーライトマスクの利用	22
北海道和種へのライトコントロールの効果	22

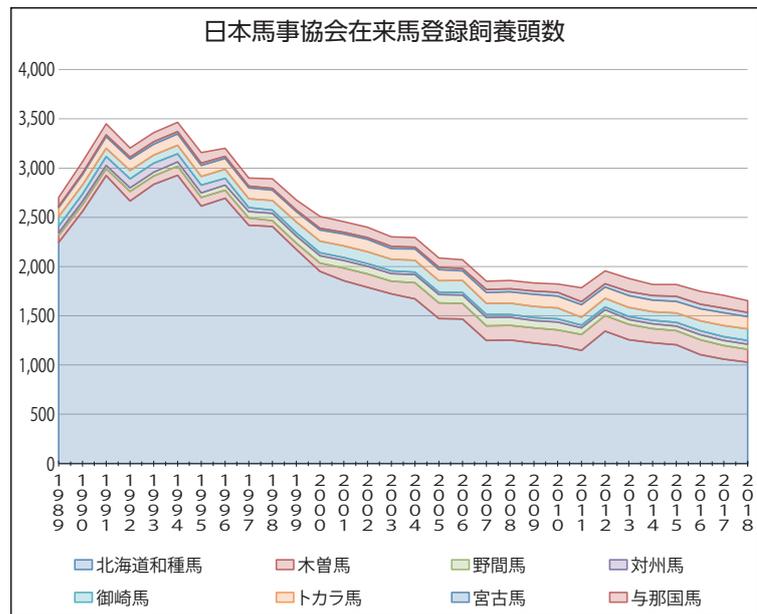
国内の小格馬の現状

国内には約70,000頭の馬の飼養、登録がされているが、その中の小格馬と在来馬の割合は、全体のわずか3%程度（約2,486頭）に過ぎない（平成29年度農林水産省馬関係資料）。また、体高130-140cmの乗用に適した性格のおとなしい馬を生産するために、雄雌の交配を計画的に実施する生産計画や、あるいはおとなしい優秀な馬とされる品種であるコネマラポニー（写真）等の生産はほとんど実施されておらず、安全に実施可能な乗馬の資源確保が非常に難しい状況にある。



コネマラポニー

一方、国内に8種類いる在来馬は、国や地方自治体により天然記念物に指定されて保護活動が盛んに行われているものの、平成6年の3,400頭から平成27年には1,817頭まで飼養頭数が減少している。希少な日本在来馬の生産頭数の改善、解決のため、様々な団体が保存に対する事業を実施しているが、生産頭数の増加には至っておらず、日本在来馬を基礎とした多様な利活用の拡大・発展、そして何よりも生産性の向上が希求されている。



障がい者乗馬とは

心身に障がいがある方が馬に乗る活動全般を呼び、ホースセラピー、乗馬療育と呼ばれる。心身に障がいを持つ人のためのリハビリテーションとして、100年ほど前にイギリスで始まった。

近年普及されつつある、リードおよび両サイドの3名のサポートにより障がい者が安全に騎乗するために実施する乗馬（障がい者乗馬）を安全確実に実施するためには、コネマラポニー等、障がい者乗馬の用途に適した馬が有用であるものの、その用途に適した馬資源が著しく不足している状況にある。したがって、障がい者乗馬用ならびに希少な日本在来馬の生産頭数の激減の解決は、社会福祉の向上や生物多様性保全の促進を目指す我が国において憂慮すべき喫緊の課題となっている。



馬は季節繁殖性を有し、かつ妊娠期間が11ヶ月と長く、また、1分娩に1頭の子馬しかを出産することが出来ないため、牛や豚などの家畜と比較すると極めて生産効率の低い家畜である。現状の生産方法への改善の限界を考えると、その問題を解決する手段として、生殖補助技術を利用することが最も効果的と考えられる。すなわち、馬精液の採取、冷蔵希釈、冷蔵または冷凍保存精液を用いた人工授精により、国内全地域において2日以内で配達が可能であることや、受精卵を他の牝馬の子宮に移植することにより、他の馬に分娩させることができる。また、発情周期は3週間であることから、複数回の受精卵移植を実施することにより、特定の子馬を1年に複数頭生産することが可能となる。しかしながら、サラブレッド生産国となっている我が国の現状では、生殖補助技術の使用がまったく許されていないサラブレッド生産界からの技術伝達は難しい状況にある。

このような背景から、馬の生産管理学および生殖補助技術に精通した獣医畜産系の大学組織が中心となってただちに小格馬、在来馬の効率的生産に関する研究事業に着手する必要がある。本研究事業は、生殖補助技術による障がい者乗馬に適した馬の生産法の確立ならびに在来馬の繁殖効率の向上を目指すものである。

帯広畜産大学で事業を実施した経緯

十勝地方は、元来国内有数の馬の生産育成に適した地域であり、帯広畜産大学（写真）は、1941年にその前身である帯広高等獣医学校として設立された。戦後、時代の変遷とともに、馬の用途は縮小したものの、馬の存在を見なおすことが提言され、馬を活用した教育研究の充実、馬を介した地



域社会・福祉への貢献、国際的に比肩した馬学教育の向上を主たる目的とし、本学畜産フィールド科学センター内の組織として2014年に馬介在活動室が設置された。

「馬のいるまち帯広」をひとつのキーワードに、帯広市が目指す地域活性のモデルとして本学の社会貢献室および馬介在活動室が中心となって、障がい者乗馬を年に約10回実施している。これらの事業には、障がい者が潤いのある生活を送ることができる

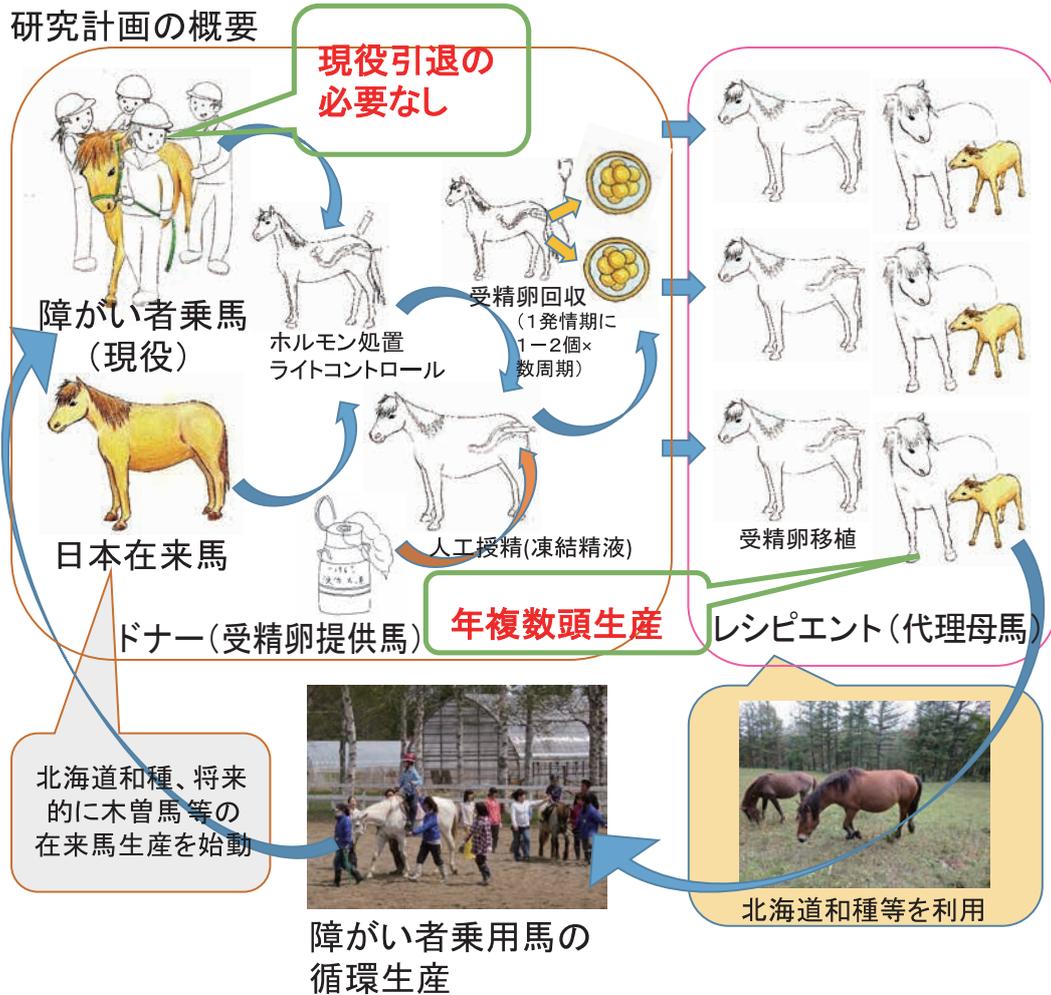
ように、そして本学の学生が参画して地域社会に貢献することを目的に実施されており、帯広市および地域社会からの評価が高く、しばしば地元のメディア、新聞で紹介されている。これにより、家畜のいる風景の創出、少子化対策に対する促進的な効果等が期待されている。

一方、本学のみならず、全国各地の障がい者乗馬実施機関において、障がい者乗馬に適した馬の購入やその後の調教が大変難しい状況にある。その理由の根本には、近年の馬の購買価格の高騰に加え、障がい者乗馬に適したおとなしく優秀な馬を生産する研究開発や体制が整っていないことが挙げられる。研究事業が軽種馬生産とは異なる生殖補助技術を利用するため、サラブレッド生産分野からの技術譲渡が不可能な研究領域である。

したがって、小格馬の生産効率の向上ならびに社会に貢献する馬の利活用の促進に本学が大きな役割を果たすものと考えられる。

事業の概要

障がい者乗馬等に適した馬の効率的生産ならびに日本在来馬の繁殖効率の向上を目的として、現役乗用牝馬としての用途を継続しながら繁殖検査、人工授精、受精卵回収を実施し、代理母馬（レシピエント）への移植による生産モデルを確立する。これにより、付加価値の高い乗用馬および希少な在来馬に対する生殖補助技術を用いた生産モデルを確立するとともに、若者が創出する馬を介した福祉活動の実現・発展を目指す。



10頭生産に
10年間必要

短縮

10頭生産に
わずか3年間

ドナー馬は
一生現役継続

- 達成目標 (中間成果指標)**
- 2019年までに障がい者乗馬に適した現役乗用牝馬から、年2頭以上の子馬を受精卵移植により生産する。
- 達成目標 (最終成果指標)**
- 2023年までに得られた成果を全国に普及し、乗用馬を含め、馬の人工授精、受精卵移植による生産体制を強化し、30頭以上の馬を生産する。

期待される成果

必要性の高い馬の生産率を300-500%とすることが可能。
目標生産頭数達成までの期間短縮が可能。
パフォーマンスホース(オリンピック級乗馬等)への応用。

人工授精 (AI) の手順について

1 凍結精液を用いた人工授精の概要

本研究事業で行った北海道和種（年齢：5～10歳、体重：350～450kg）への排卵の誘発、そして凍結精液を用いた人工授精（AI）の手順を示したものである。

2018年、2019年の繁殖期（3月～9月）に4頭の繁殖牝馬30発情期に対して計33回のAIを行い、うち28回の受精卵回収により合計7個の

受精卵を回収した。7個の受精卵はすべて同一の輸入凍結精液（コネマラポニー種）の授精によるものであった。この2年間における凍結精液AI後の受精卵回収率は25%（7/28）である。

また同一牝馬の連続する3回の発情周期からの受精卵回収にも成功した。

2 排卵誘発剤投与から人工授精まで

使用する排卵誘発剤

凍結精液を用いたAIを行う場合、以下のような排卵誘発剤の使用が必須と言われている [5]。以下に示す投与量はあくまでも今回北海道和種に使用した投与量である。

- hCG（ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン）
商品名：ゴナトロピン3000
投与量、方法：2000IUを静脈内投与
- Deslorelin (GnRH analog)
※輸入品（日本では未承認）
投与量、方法：0.4～0.75ml（1.5mg/ml）を筋肉注射



ゴナトロピン3000 (hCG)

排卵誘発剤の投与のタイミング

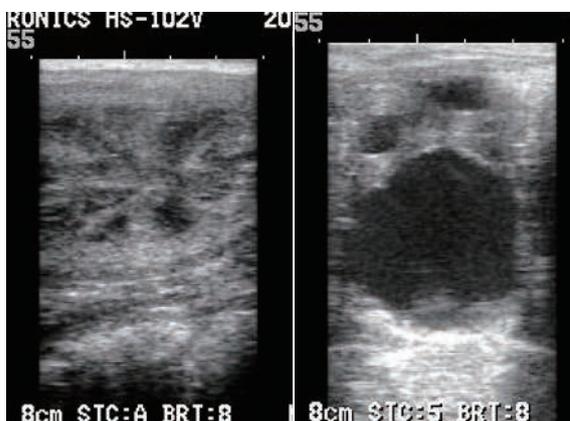
hCG投与のタイミングとしては、子宮の浮腫グレードが0～5のうち3（子宮全体の明らかな

浮腫像）以上で主席卵胞の直径が35mm以上であることが望ましい [2] [3]。

hCGは、複数回の投与により効果が減弱するため、1シーズンで2回までの使用が推奨されている [3]。

推奨される投与量は1500～3300IUである [3]。

正常な発情が見られ、少なくとも35mmの卵胞が存在する場合、hCGの投与から36～48h後におおよそ排卵が起こる [4]。また75%の排卵がhCG投与後24～48hで起こるという報告もある [6]。主席卵胞の大きさだけでなく、子宮の浮腫グレードも把握したうえで排卵誘発剤を投与することが望ましい [3,5]。



浮腫グレード3の子宮像 直径35mm程度の主席卵胞

人工授精のタイミング

凍結精液を用いた人工授精の場合は特に、精子を注入した時間と排卵の時間の間隔を最小限にすることが大切となる。[5]

今回AIを目的とした北海道和種4頭に対して、2種の排卵誘発剤とその投与後にエコーを

用いて排卵（黄体の形成）を確認できるまでの時間をまとめた（表1）。なお排卵誘発剤の投与時間はいずれも午前8時前後であり、投与のタイミングはいずれも主席卵胞の大きさが35mm程度で子宮の浮腫グレードが2または3であった。

表1 2種の排卵誘発剤と排卵時間

	～48hに排卵 (そのうち～24hに排卵)	～48hに排卵しない	合計
hCG (2000IU) i.v.	15 (1)	2	17
Deslorelin (0.6～1.1mg) i.m.	10 (3)	1	11

表1より午前8時にhCGないしはDeslorelinを投与した場合、9割(15/17、10/11)の確率で48hまでに排卵していた。hCG投与から48h以内に排卵しなかった2例のうち、1例はそのシーズンでの3回目の投与によるものであった。

重種馬では同じGnRH analogであるBuserelinを適切なタイミングで用いると48時間までに100%(8/8頭)排卵したという報告もある[8]。

以上より GnRH analogを排卵誘発剤として用いた場合もhCGとほぼ同じタイミングでの排卵の誘発が期待できる。

これらを踏まえて今回行ったAIまでの流れを下に示す。

一般に凍結精液を用いたAIは排卵の12h前から6h後の間に行うことが望ましい[6]とされている。本研究においては、排卵誘発剤投与から32h後にAIを実施している。

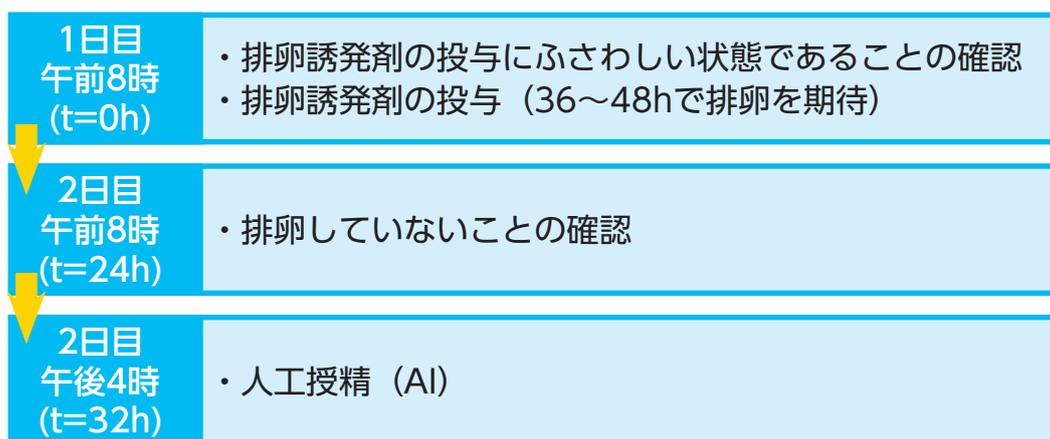


図1 排卵誘発剤投与からAIまでの流れ

3 深部人工授精の手順

人工授精の手順

用意するもの

凍結精液を用いたAIに必要なものは以下の通りである。

- ・凍結精液ストロー（精子数：1億/mlの0.5ml、融解後50%の運動性）×4本
- ・消毒用品（写真上：スポンジ、お湯、イソジンスクラブ、アルコール類スプレー等）
- ・AIセット（写真下：カテーテル、ガイド、ストロー切ばさみ、保温性水筒、温度計、ウォーターバス、アル綿、秒針つき時計）



外陰部洗浄に用いるもの



4 凍結精液の深部人工授精手順

※ここに示す人工授精(AI)はストローに入った凍結された精液を融解し、カテーテルを用いて主席卵胞の存在する側の子宮角の深部に精液を注入する、いわゆる“Deep-horn artificial insemination”である。またこの方法でAIを行うには最低でも2人必要である。

馬の保定

馬を枡場に入れ保定する。なるべく衛生的な環境が望ましい。

AIに慣れない馬は鎮静剤の投与を検討する。

卵巣、子宮の状態の確認

日々の直腸検査同様の手順で行う。

数時間後に排卵すると予想される卵胞はあるか、子宮の状態は正常かなどをエコーを用いて視診する。

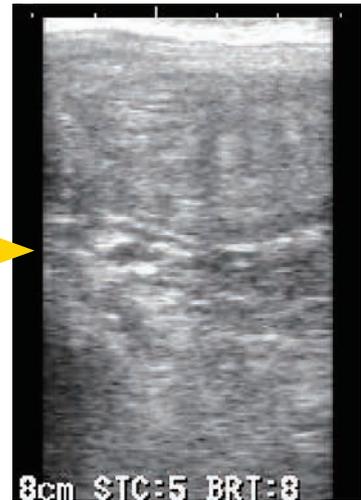


すでに排卵してしまっている、その排卵がいつ起きたか予想できない、子宮に貯留液があるなどの場合はAIの中止を考える。

子宮の浮腫は、排卵に近づくにつれ減少する[4]。浮腫像が増加している場合、内膜炎などの異常も疑う、もしくは排卵誘発剤に反応せず、まだ排卵しない可能性が推測される。



hCG投与時の子宮



AI時の子宮

外陰部の消毒

消毒の流れ



お湯で表面の汚れを洗いとる



イソジンでスクラブしよく洗い流す(×3回)



水分を拭き取る



アルコール噴霧
(イソジン噴霧は行わない)

カテーテルの子宮角深部への挿入

凍結精液人工授精用のカテーテルを、排卵すると予測される卵胞のある側の子宮角深部へと挿入する。

滅菌された直検手袋を装着した手でカテーテ

ルの先端部を包み、カテーテルが外陰部や膈内に触れないようにして子宮内部へと挿入する。子宮頸管を通過するときは指をガイドにして、さらにカテーテル自体の湾曲を利用して目標側の深部へやさしく挿入する。



カテーテルをできるだけ深部に挿入したのち、膈内の手を直腸内に挿入し、カテーテルと子宮の位置関係を確認する。

このときカテーテルを挿入する角とは反対側の子宮角を直腸越しに持ち上げると、カテーテルが目標の子宮角へ挿入されていることを確認できるとともに、カテーテルをさらに深部へ挿入しやすくなる。

最終的にはカテーテルの先端を触診することによってできるだけ深く挿入されているかを確認する。

子宮の収縮によってカテーテルが排出されないよう注意する。



ストロー内精液の融解および子宮角深部への注入

ストローを挿入する準備ができてから精子を融解する。

液体窒素中のストローを、良く冷やしたピンセットで取り出し、すぐに水温37～38.5℃に調整された保温性の水筒に入れる。ストローを水筒に入れるとすぐに水温が下がってしまうためウォーターバスにあらかじめ37～38.5℃のお湯を用意しておくといよい。ストローは水に浮くため水筒のような筒状の入れ物で融解すると



取り出しやすい。

ストローは水筒に入れてから30秒後に取り出す。

ストローを取り出したら表面の水気をとり、よく絞ったアル綿で拭う。

アル綿であらかじめ消毒した、ストロー切ばさみで所定の場所を切り、ストローをカテーテル内に入れ、マンドレル（心棒）で押し込む。

ストロー内の精液を完全に押し出したら慎重にカテーテルからストローを取り出し異常がな

いことを確認する。（この時カテーテルは動かないよう注意する）

この操作を使用するストローの本数分だけ繰り返す。（水筒内の水温に注意し、ハサミやガイドなど使用する器具はその都度よく絞ったアル綿で消毒する）



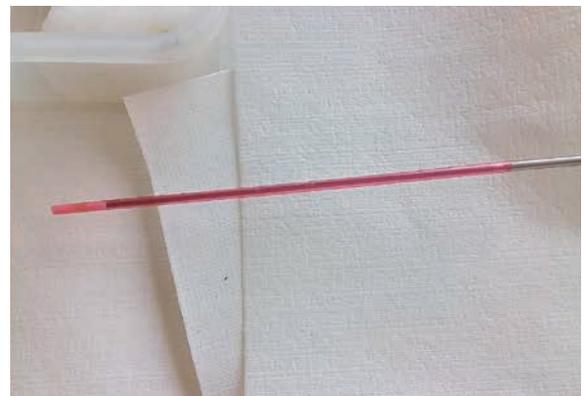
正常に精液が注入されているか確認

最後のストロー内の精液を注入し終わったら、カテーテルを慎重に抜き出し、部品に破損がないか、カテーテル内に精子が溜まっていないかなどを確認する。

以上のAIの手順で大切なことは、

- ・精子を適切な温度で適切な時間融解すること
- ・融解後のストローの水気をよく切ること
- ・慎重にかつ素早く、可能な限り無菌的に作業を行うこと

・馬になるべくストレスをかけないで作業を行うこと
であると考える。



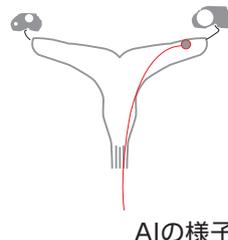
適切に精子が排出されたストローとマンドレル（心棒）

人工授精

* 凍結精液

精子数 2億 (0.5mlストロー×4本、ストロー数は販売元の推奨による)

* 排卵前後の卵巢側子宮角深部に注入



5 人工授精後

まずは排卵確認

夕方にAIをしたならば、必ずその翌日の朝には排卵確認を行う。

もし排卵していない場合、まずはなぜ排卵していないのかを考える。(排卵誘発剤は適切に投与したか、いつ投与したか、そもそも今ある卵胞は排卵するものか、出血性無排卵卵胞(HAF)ではないかなど)

もし数時間以内にその卵胞が排卵すると予想される場合、追加のAIを行うことも考える。

子宮の状態を確認

卵巣の状態をエコーで確認したのち、子宮の状態も確認する。

確認する点としては、

- ・子宮内貯留液はないか。
- ・子宮内膜の浮腫は減少しているか。
- ・交配誘導性子宮内膜炎を疑うレベルの炎症

反応は起きていないか。(精子を子宮内に注入することによって多少の炎症反応は予想される)

異常がみられる場合、治療を行う。

貯留液の程度が低い場合はオキシトシン(25IU)の筋肉内投与、場合によっては子宮洗浄を行う。



排卵したことを示す
黄体の形成



軽度な子宮内液体貯留
(軽度でもオキシトシン投与は必要)

排卵誘発剤の投与から人工授精後の検査までの流れ

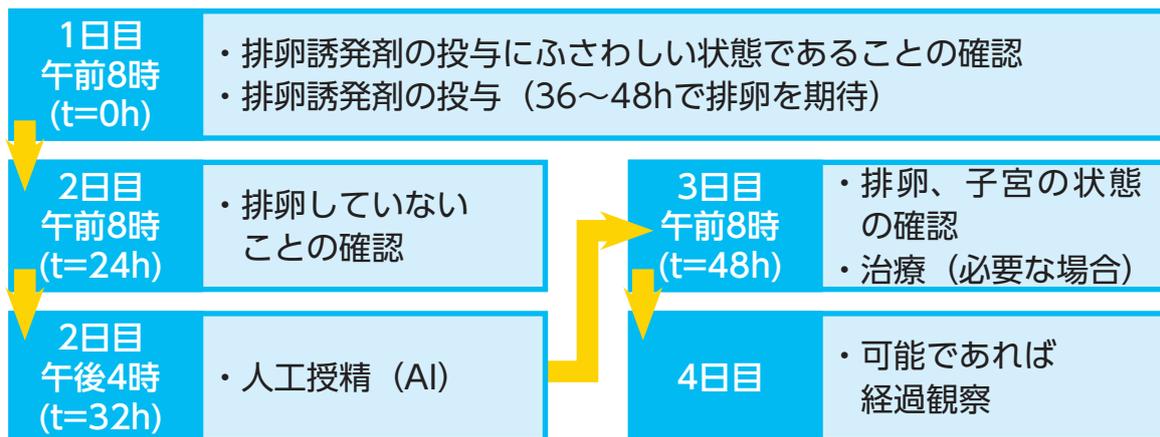


図2 排卵誘発剤投与からAIを行った後の検査までの流れ

6 受胎しない理由

なぜ受胎しないか

凍結精液を使ったAIでは、

- ①凍結精液の質、
- ②牝馬のステータス、
- ③牝馬のマネジメント

が妊娠率に大きく影響を及ぼす [5]。

①凍結精液の質

精子が先体反応を起こすためには細胞内へのCa²⁺の流入が必要であるが、凍結、融解することによって細胞内のCa²⁺の濃度が上昇してしまうため、Ca²⁺の流入が起こりづらくなる [5]。凍結の方法や種牡馬の種類によって、融解後の受精能力に差が生じる。ストロー内の精子数や運動性も大切ではあるが、その精液が凍結精液として受胎実績があるか否かが情報として大切であると推察する。

下の表2は、今回北海道和種4頭に排卵誘発剤を投与したのちに行った24発情期でのAIの結果を、使用した凍結精液ごとに分類した表である。Semen1は、輸入凍結精液（コネマラポニー種）のものであった。

②牝馬のステータス

J.C. Samperの研究によれば [5]、7歳以下の未経産馬、8歳以上の未経産馬、子馬のいない馬、子馬がいる馬の排卵後14日目での妊娠率はそれぞれ、68.8、37.2、56.2、59.3%であった。また、牝馬の年齢は受精卵回収率に影響を及ぼすといわれる [1]。

凍結精液を用いたAIを行うときは、その前に必ずその馬の発情周期を観察して、若い未経産馬以外は子宮内の細胞診や細菌培養を行うべきである。若くても子宮内に貯留液がみられる場合も同様の診断を行うべきである [5]。

細菌検査や細胞診で異常がみられた馬の治療は、本来の抗菌活性の高い発情期にすべきであり、処置後も貯留液がないか必ず確認すべきである。また処置後、排卵した5~7日後にPGを投与し、発情を回帰させるべきである。（子宮内感染が疑われ処置後最初の発情での妊娠率は38.5%と低い [5]）

まとめ

今回北海道和種へのAIを行い28回の受精卵回収を試み、合計7個の受精卵を回収した。7個の受精卵はすべて同一の輸入凍結精液（コネマラポニー種）の授精によるものであった。

使用した排卵誘発剤はhCGまたはDeslorelin（GnRH analog）であり、hCGの使用は1シーズンあたり2回までが推奨されている。投与のタイミングは主席卵胞の大きさが35mm程度であり、子宮の浮腫グレードが3（0~5段階）以上であることが重要である。

排卵誘発剤投与後36~48hでの排卵を期待し、AIは32h後に行った。

AI後の排卵および子宮の状態の確認は重要な検査であり、異常がみられる場合はオキシトシンの投与または子宮洗浄を積極的に行う。

表2 使用した凍結精液と受精卵回収率

	受精卵回収		受精卵回収率
	+	-	
semen1	7	10	41%
semen2	0	5	0
semen3	0	2	0
	7	17	29%

今回行ったAIによって得られた受精卵のすべてが同一種牡馬からの精液によるもので、精液による受胎率の差が予測される。

受精卵移植 (ET) の概要と手順について

1 概要

本研究事業では2018年、2019年に北海道和種をドナーとした受精卵回収を合計29回試み（28AIおよび1本交配による）、8個の受精卵を回収、移植後7頭の妊娠を認めた。

受精卵回収率は27.6%（8/29）、回収された受精卵をレシピエントに移植した際の受胎率は87.5%（7/8）、総じて受精卵移植の成功率は24.1%であった。

そのうち、特定の輸入凍結精液（コネマラポニー種）の人工授精による受精卵回収率は41.2%（7/17）、回収された受精卵をレシピエントに移植した際の受胎率は85.7%（6/7）、総じて受精卵移植の成功率は35.3%であった。



ドナー (donor) とは供胚雌、レシピエント (recipient) とは受胚雌のことであり、ここでいう受精卵移植とはドナーの体内で受精・発生した受精卵を取り出してレシピエントの子宮に移して妊娠・分娩させる技術のことである [9]。

※「受精卵」と「胚」は同義語である。

2 受精卵移植の利点 [2]

- ・競技で活躍する馬が競技を継続しながら、あるいは日常の練習を行いながらその子馬を生産できる。
- ・一頭の母馬から一年に複数頭の子馬を生産できる。
- ・子宮の疾患等で妊娠できない牝馬の子馬の生産も可能である
- ・生体を移動、輸入する必要がない。
- ・伝染性疾患を予防できる。

同期化のためには右図のような、黄体を退行させるPGF₂α製剤（以下PG）や、排卵誘発剤の投与が必要不可欠となる。



PGF₂α製剤

受精卵移植までの流れ

受精卵移植をする場合、ドナーとレシピエントの発情周期を同期化する必要がある。

具体的にはレシピエントの排卵日がドナーの排卵日に比べて-1~+3日（ドナーの排卵と比較して、レシピエントが1日前から3日後までに排卵する条件）であることが望ましい。



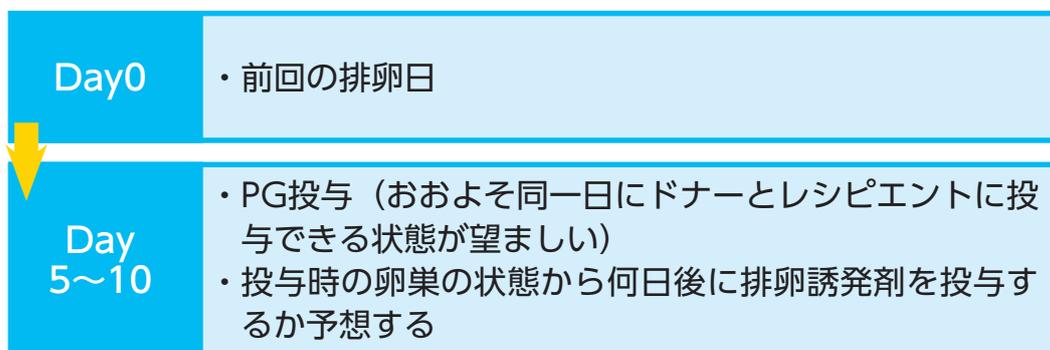
排卵誘発剤 (hCG)

PGは前回の排卵日の5～10日後に投与した。
具体的には 0.1mg のPGF₂α 類縁体クロプロステノールを筋肉内投与した。

PGを投与する際の卵巣の状態によってその後の排卵日が7～12日と幅があり[10]、また投与する際に成熟した卵胞が存在する場合、発

情行動を示す前に排卵してしまうことがある[10]。

そのため、PGを投与する際も卵巣の状態をエコーで確認し、おおよそ何日後に排卵するか予想することが有用な情報となる。



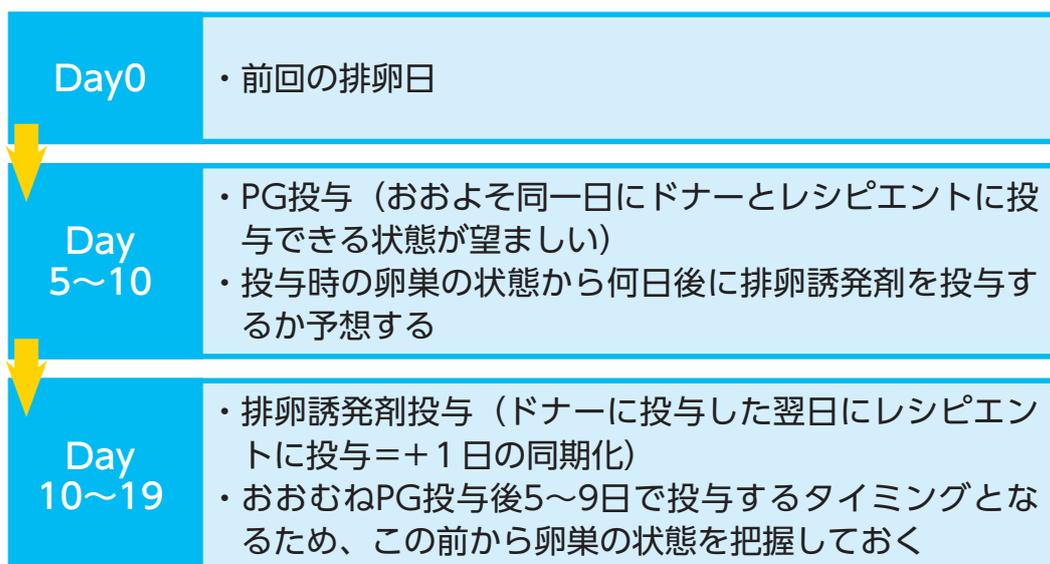
前述したとおり、ドナー・レシピエントの発情周期の同期化のためにはPGの投与だけでは十分ではなく、hCGやGnRHなどの排卵誘発剤の使用も必要となる。

投与の詳しいタイミングはAIの資料に記した。

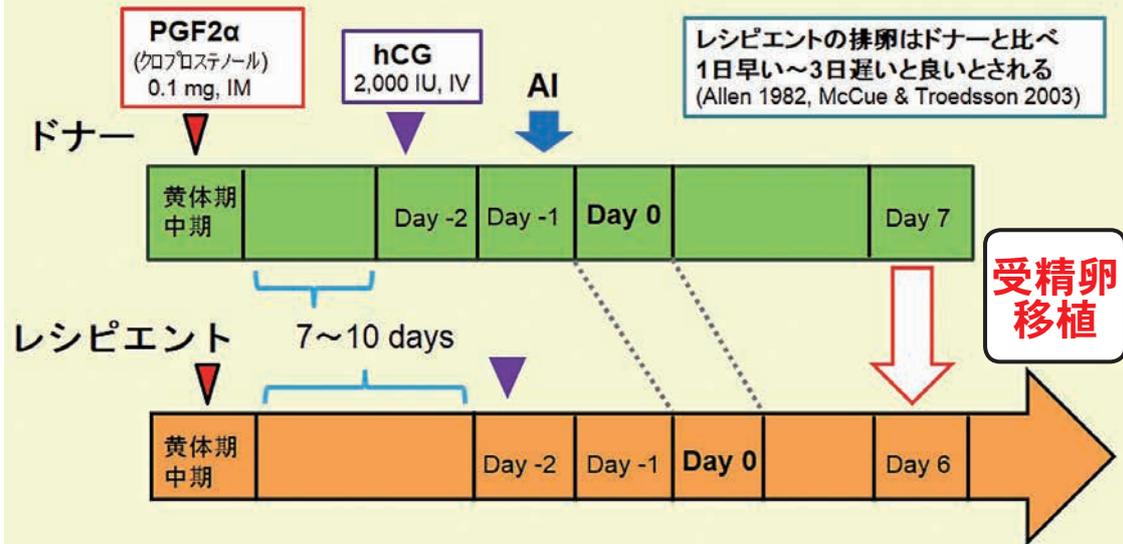
投与方法としては、hCGの場合は2000IUを静脈内投与、GnRHの場合、デスロレリンとし

て0.6mgを筋肉内投与した。レシピエントへの排卵誘発剤の投与はドナーに投与した翌日に行った。

これらの製剤を用いることによって、レシピエントの排卵日をドナーの-1～+3日に収めることが大切となる。（特に+1、+2日が望ましい）

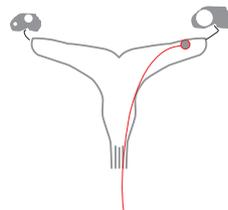


受精卵移植プロトコル (排卵前AI)



今回得られた8つの受精卵のうち、7つが凍結精液を用いた人工授精 (AI) によるものである。

AIは排卵誘発剤投与の32h後に行い、その後排卵確認を行った。



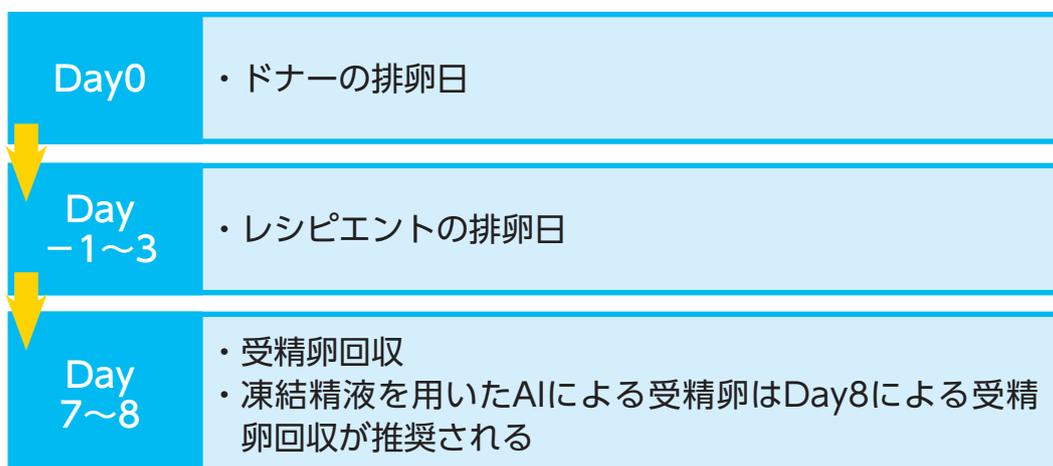
AIの様子



受精卵移植の手順

受精卵移植はドナーの排卵日の7または8日後に行った。これは馬の受精卵は6~6.5日後に子宮に到達すると言われており [10]、7~9日での回収率に比べて排卵後6日での回収率は低いとされている [11] からである。また凍

結精液を用いたAIによる受精卵の回収は通常の排卵後7日ではなく、8日後が推奨されている [10]。



受精卵移植のおおまかな手順は右図の通りである。



受精卵回収
Embryo Collection

ドナー馬の子宮内に回収液を灌流して受精卵を子宮内から取り出す

受精卵処理
Embryo Processing

実体顕微鏡で受精卵の存在を確認し、存在すれば洗浄してストロー内に封入する

受精卵移植
Embryo Transfer

ストロー内に封入された受精卵をレシピエントの子宮内に移植する

今回行った回収法は子宮からの非外科的な子宮頸管経由法である。

また使用した回収液は右図のものである。(VIGRO, Vetoquinol N. -A. Inc., Princeville, QC, Canada)

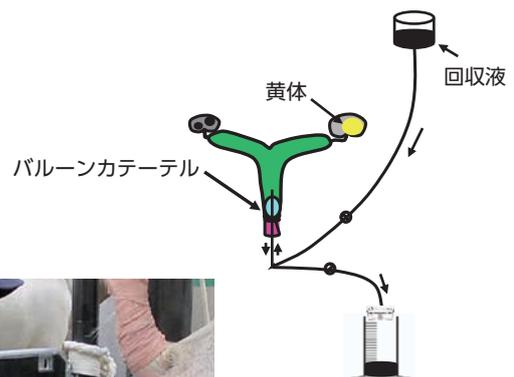
回収液は使用する前に37℃に保温しておく。



馬（ドナー）を枡場に保定したのち、卵巢・子宮の所見をとり、外陰部を消毒する。（洗浄方法はAIの場合と同じ）

よく消毒したら、滅菌された直検手袋（本学ではEOガス滅菌を使用）で右図のバルーンカテーテルを子宮内まで挿入する。（この時、カテーテルが子宮外に触れ、子宮内を汚染しないように注意する。また挿入する前にバルーンが正常に膨らむか確認するとともに、カテーテル内を回収液で満たしておく。）

バルーンカテーテルを子宮内に挿入したら、バルーンを膨らませ、カテーテルを子宮頸管頭側に固定する。（直腸検査によってバルーン的位置を確認する。）



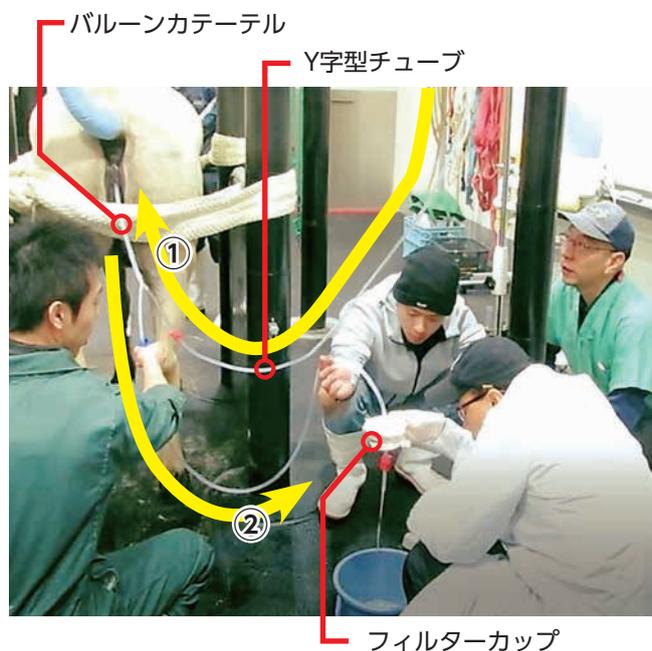
バルーンカテーテルの膨らみ



バルーンカテーテル

カテーテルを子宮内に固定したら、右図のようにカテーテルとチューブ、フィルターカップ等が正しく連結されていることを確認して回収作業を始める。

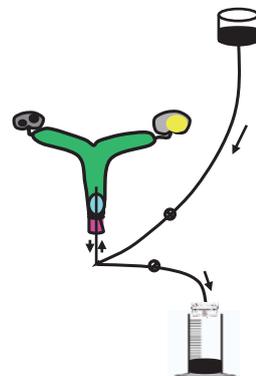
回収液をY字チューブとカテーテルを通して子宮内に灌流させ(①)、可能な限りたくさんの回収液を子宮内にプールさせる。ウマが不快感を示し始めたら、Y字チューブのクリップを操作し、子宮内にプールした回収液をフィルターに透過させる(②)。子宮内に受精卵が下りてきていれば、受精卵は回収液とともに子宮から流出し、フィルターで回収されるはずであ



る。

なお、写真上ではフィルターを通った回収液はバケツに捨てているが、同一個体で回収液中に上皮細胞などの異物が過度に混入していない場合は再度回収液をバッグに戻し、再利用する方法もある。

北海道和種の場合、子宮に一度に灌流できる回収液は個体にもよるがおおよそ2L(1袋)であった。



使用した器具

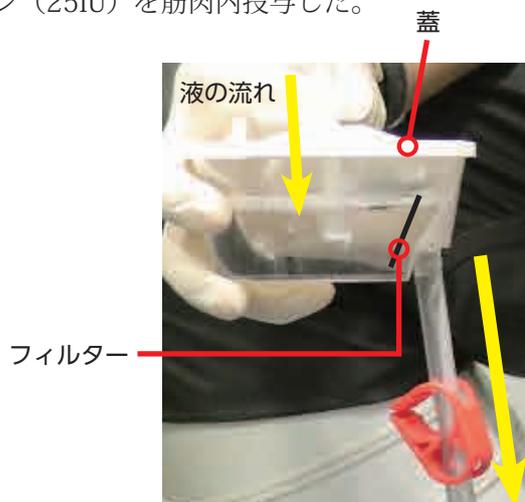
- *バルーンカテーテル
(Jorgensen Laboratories, Inc CO, USA等)
- *Y字チューブ
(SPI-MFG, TX, USA等)
- *フィルターカップ
(70 um pore)
(EZ-Way Filter, SPI-MFG等)

右図は操作後のフィルターカップの様子である。受精卵が回収できていれば、フィルターを通過しないため、このカップ内に存在するはずである。

回収液の液面がカップの蓋につくことを防ぐために必要以上に動かさないように注意する。

今回、子宮内への灌流は1度の回収につき3回行った(回収液はのべ約6L使用)。2回目の灌流が終わり次第、一度フィルターカップ内を確認して受精卵が入っていないければ3回目の灌流を行った。その際は別のカップを使用し、3

回目の灌流液を子宮から回収する際はオキシトシン(25IU)を筋肉内投与した。



完全な回収

Y字チューブとカテーテル内の回収液をすべて回収するために、バルーンカテーテルを高く上げる（右写真）。



フィルターカップ内の側面に回収液をかけて洗浄する（右写真）。

液体中を実体顕微鏡で観察する。

Day6～9に回収した受精卵はカップの底に沈んでいるはずである [10]。

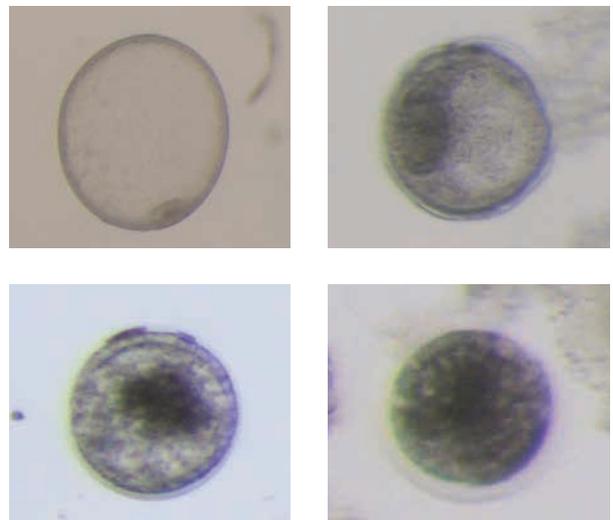
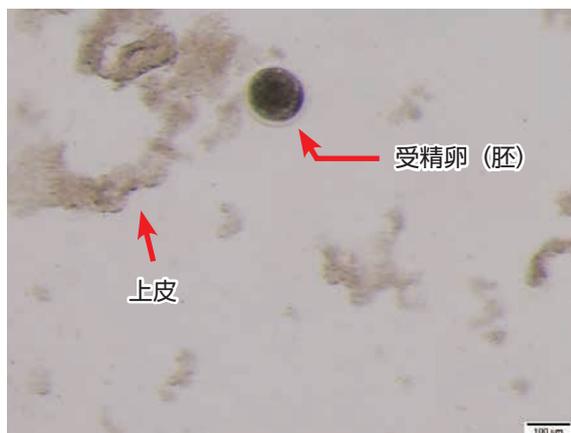
受精卵が確認出来たらその大きさを測定し、ステージおよびグレードを評価する。

(G1 : excellent、G2: Good、G3: Fair、G4: Poor)

受精卵移植に適した大きさは直径150～1000 μm とされる。



実体顕微鏡では受精卵は下、右のように観察される。



確認された受精卵は、右の holding mediaを用いて、ペトリ皿上で5段階で洗浄する。



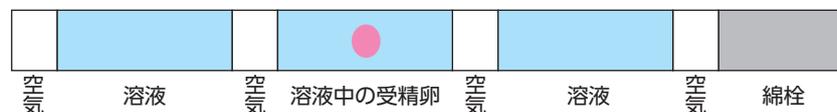
Holding media
(VIGRO, Vetoquinol N. -A. Inc., rinceville, QC, Canada)



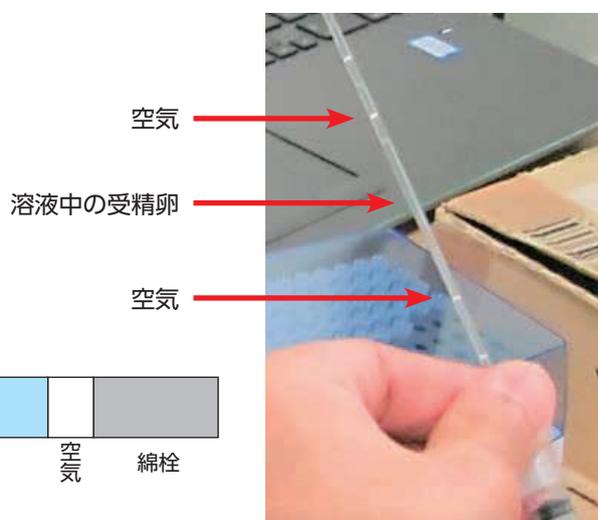
洗浄した受精卵を右の模式図のように、0.25 mlの滅菌されたストローに封入する。

この封入の仕方によって、受精卵を確実にレシピエントの子宮内に輸送できる [10]。

またこの段階で、レシピエント馬も卵巣および子宮の所見をとり、外陰部の洗浄、鎮静剤（メドメジン $3 \mu\text{l}/\text{kg}$ ）を投与しておく。



ストローの模式図



ストローに受精卵を封入したら、ウシ受精卵移植用のYTガンを用いてレシピエントの子宮体深部に受精卵を移植する。

このときレシピエントの子宮頸管を刺激するとプロスタグランジンが産生され、黄体の機能に変化をもたらし、移植後の妊娠が維持されにくくなるため、子宮頸管に過度に触れずに刺激しないようYTガンを挿入する。この操作は移植率を大きく左右すると言われる。またプロス

タグランジンの産生を抑制するため、また移植後の炎症反応を抑制するためにNSAID sであるフルニキシンメグルミン ($1.1\text{mg}/\text{kg}$) を移植前に静脈内投与しておくことで移植後の妊娠率が向上することが確認されている [12]。受精卵は「子宮体部」に移植する。



牛用YTガン (Yamanetech Co., Nagano, Japan)



2019年に代理母馬（レシピエント）から生まれた3頭（A、B、C）のコネマラポニー×北海道和種の全きょうだい



A : 牝 (2019.4.27生)



B : 牡 (2019.4.28生)



C : 牝 (2019.7.5生)

パドックで飼養している北海道和種の分娩管理

分娩前

①運動

分娩予定日約2ヶ月前から週3回引き馬運動を15～20分行いました。
運動不足解消＝肥満の予防＋体力づくり→難産の予防。

②分娩セットの準備

・分娩記録シート・尾巻き用バンテージ・臍帯消毒用消毒薬・難産時の介助ロープ・介助用のゴム手袋・新生子を拭くためのバスタオル・後産を束ねる麻ひも・糖度（Brix）計・浣腸液・胎盤重量測定器

③分娩馬房の準備

馬房を消毒して清潔な寝藁を十分量あらかじめ入れる。新生子の感染予防に有効！



寝藁はふかふかになるくらいたくさん！

分娩兆候・予測

- ・乳房の腫脹
- ・乳やにの付着（分娩24～48時間前）
→付着しない馬もいる。
- ・臀部の平坦化（仙坐靭帯の弛緩による）
→北海道和種は分かりづらく分娩兆候の指標の有用性は低い！
- ・乳汁のpH値測定



乳房の腫脹（分娩1ヶ月前）

乳やにの付着

分娩が起こらない日の推定指標！

市販のpH試験紙（BTB試験紙）を用いて、夕方にpH6.4に達しない場合は明朝までに分娩する確率は約10%とされている。

北海道和種4頭を検査し、pH6.4に達していない場合に分娩が起こった馬は認められなかった。



pH6.8…
まだまだ！

pH6.6
もう少し？

いよいよ分娩へ…

お産が始まる前に尻尾にバンテージを巻いて衛生管理をする。破水後、前肢が産道にきているか確認、あとはできるだけ馬に任せて…。子馬が娩出されても、無理に臍帯を切らない。母馬が子馬を舐めるとよい（母と子の初めのコミュニケーション）。その後、子馬をバスタオルで拭く。また臍帯の消毒をこまめに行う。後産（胎盤）を麻ひもでまとめて自然に落ちるのを待つ（3時間以内）。落ちた後産は広げて欠損がないかチェック。胎盤重量、破水した時間や生まれた時間などは分娩記録シートにすべて記載する。

馬名	種別	性別	年齢
山崎 太郎	純血種	雄	4歳
山崎 次郎	純血種	雌	3歳
山崎 三郎	純血種	雄	2歳
山崎 四郎	純血種	雌	1歳
山崎 五郎	純血種	雄	0歳
山崎 六郎	純血種	雌	0歳
山崎 七郎	純血種	雄	0歳
山崎 八郎	純血種	雌	0歳
山崎 九郎	純血種	雄	0歳
山崎 十郎	純血種	雌	0歳

分娩記録シート



バンテージを巻いて清潔に！



お母さん馬は子馬を舐めて刺激！



バスタオルで拭いている様子



後産(胎盤)のチェック

初乳の重要性

子馬にとって最も大切なのは初乳（分娩から24時間後までにお母さんから分泌される特殊な乳汁のこと）である。子馬を細菌やウイルスから守る抗体が豊富に含まれている。糖度（Brix）計で乳汁中のBrix値をあらかじめ確認する（20%以上が好ましい）。子馬は産まれて1時間までに起立、2時間までに哺乳を開始することが好ましい。

哺乳後、胎便（生まれてから最初のうんち）が出るまでは油断禁物！胎便が出なければ人の赤ちゃん用の浣腸液を使って排出を促す！

出生12-24時間後、新生時黄疸（貧血では粘膜が蒼白、黄疸では黄色に…）、感染症（体温が39度以上に）をチェック→異常が認められたら獣医師に相談。



糖度(Brix)計



哺乳開始！
お乳の方へ子馬を誘導する優秀なお母さん(代理母！)。



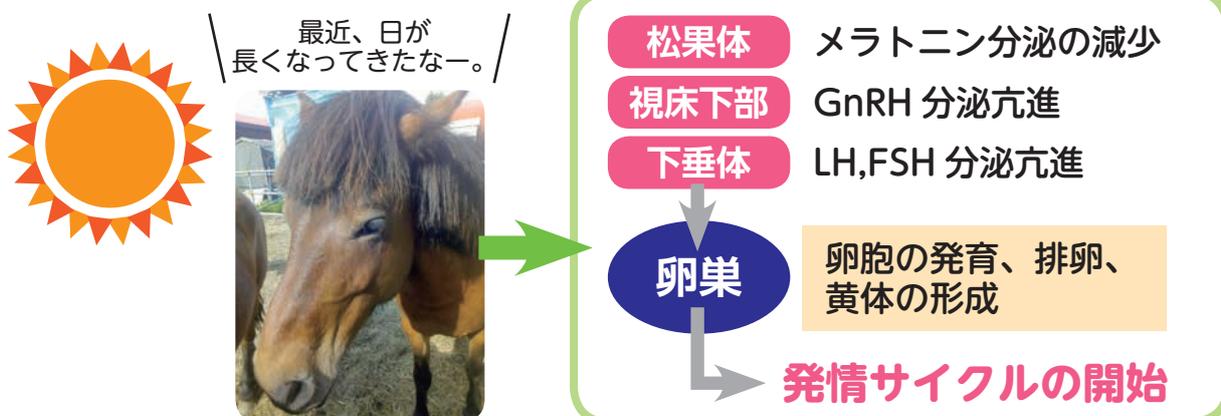
口腔内粘膜の確認
貧血はなし！



胎便排出の瞬間

ライトコントロール

ウマの季節繁殖性



日が長くなると発情が始まり繁殖シーズンになる！

ブルーライトマスクの利用

日長が短い冬であっても夕方から夜までブルーライトマスクを装着することによって…



日が短い環境(冬から春先)においても日が長い環境を作り出すことが可能!

北海道和種へのライトコントロールの効果

◎初回排卵日→発情サイクルの始まり

ライトコントロール群：3/3～4/16 対照群：5/6～5/12

※前年の12/20からブルーライトマスクを装着したケース

ライトコントロールにより
通常よりも早期に繁殖期を始めることが可能。
受精卵移植による生産性向上が期待できる!!!
〈初回排卵後の発情サイクルにも異常は見られなかった。〉

参考文献

1. E.L. Squires, P.M. McCue, D. Vanderwall. The Current Status Of Equine Embryo Transfer. Theriogenology. 1999
2. MA. Hannan, S. Haneda, Y. Itami, S. Wachi, T. Saitoh, Soon Hon Cheong, Y. Nambo. Successful embryo transfer from Hokkaido Native pony after artificial insemination with frozen semen. J. Vet. Med. Sci. 2019
3. D. Miyakoshi, H. Ikeda, M. Maeda, R. Shibata, M. Siki, K. Ito, K. Sonoda, Y. Nambo. Efficacy of Human Chorionic Gonadotropin for Inducing Ovulation in Thoroughbred Mares Relative to Follicle Diameter and Uterine Edema Pattern. J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 2014
4. J.C. Samper. Ultrasonographic Appearance and the Pattern of Uterine Edema to Time Ovulation in Mares. 1997
5. J.C. Samper. Management and fertility of mares bred with frozen semen. Animal Reproduction Science. 2001
6. S. Barbacini, P. Gulden, V. Marchi, G. Zavaglia. Incidence of embryo loss in mares inseminated before or after ovulation. Equine Vet. Ed. 1999
7. S.P. Brinsko, T.L. Blanchard, D.D. Varner, J. Schumacher, C.C. Love, K. Hinrichs, D. Hartman. Manual of Equine Reproduction Third Edition. 2011
8. W. Miki, H. Oniyama, N. Takeda, Y. Kimura, S. Haneda, M. Matsui, K. Taya, Y. Nambo. Effects of single use of the GnRH analog buserelin on the induction of ovulation and endocrine profiles in heavy draft mares. J. Equine Sci. 2016
9. 『獣医繁殖学 第4版』 中尾敏彦、津曲茂久、片桐成二編 2017年10月文永堂出版
10. S. Brinsko, T. Blanchard, D. Varner, J. Schumacher, C. Love, K. Hinrichs, D. Hartman. Manual of Equine Reproduction 3rd edition. 2011
11. E. Squires, P. McCue, D. Vanderwall. The Current Status of Equine Embryo Transfer. 1999
12. P. Koblichke, S. Budik, J. Mülleer, C. Aurich. Practical Experience with the Treatment of Recipient Mares with a Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug in an Equine Embryo Transfer Programme. 2010

受精卵移植 (ET) の概要と手順についての研究事業で得られた成果発表

論文発表

- Successful embryo transfer from Hokkaido native pony after artificial insemination with frozen semen. Hannan MA, Haneda S, Itami Y, Wachi S, Saitoh T, Cheong SH, Nambo YJ. Vet. Med. Sci. 81(2) 241-244, 2019.
- Birth of first foals through embryo transfer after artificial insemination using frozen semen in Japan. Hannan MA, Haneda S, Murata K, Takeuchi S, Cheong SH, Nambo Y. J. Reprod. Dev. Jan26, 2020.

学会発表

- 和智荘平ら ドナーに北海道和種馬を用いた受精卵移植の実施効率 (平成30年度北海道獣医師会3学会、札幌、2018年9月)
- 伊丹泰雪ら 馬における連続した発情周期での凍結精液による人工授精—受精卵移植の成功例 (第161回日本獣医学会学術集会、つくば 2018年9月、日本獣医繁殖学・優秀発表賞)
- Yasuo Nambo Status and prospect of Horse breeding and reproductive treatment in Japan. Joint Polish-Japanese Seminar "Cutting edge of Reproductive Physiology-Key processes for birth of a new life, Warsaw, Poland, 2019年9月
- Hannan MA et al. Birth of first foals through embryo transfer from Hokkaido native pony after artificial insemination using frozen semen. 第112回日本繁殖生物学会学術集会、札幌 2019年9月



本パンフレットは、日本中央競馬会特別振興資金助成事業「障がい者乗用馬ならびに在来馬の生産法確立事業」の情報発信事業として作成されています。

執筆者

南保 泰雄 (帯広畜産大学グローバルアグロメディシン研究センター (兼) 獣医学研究部門 教授)

羽田 真悟 (帯広畜産大学獣医学研究部門 准教授)

齊藤 朋子 (帯広畜産大学畜産フィールド科学センター 助教)



発行

国立大学法人 帯広畜産大学

〒080-8555 北海道帯広市稲田町西2線11番地
帯広畜産大学 畜産フィールド科学センター 馬介在活動室