



日本中央競馬会
特別振興資金助成事業



公益社団法人 日本馬事協会

馬受精卵移植の 手引き



令和7年3月 公益社団法人 日本馬事協会

目次

人工授精の 手順について

- ① 排卵誘発剤の投与から人工授精後の検査までの流れ 4
- ② 排卵誘発剤と投与のタイミング 5
- ③ 人工授精のタイミング 5
- ④ 外陰部の消毒 6
- ⑤ 複数本ストロー精液の融解 7
- ⑥ 子宮角深部授精法と体部授精法 7

受精卵移植の 概要と 手順について

- ① 受精卵移植の利点 9
- ② 受精卵回収の手順 9
- ③ 受精卵の移植方法 15

受胎しない 理由と その対処法

- ① 凍結精液の質 16
- ② 牝馬のステータス 16
- ③ 牝馬のマネジメント 17

はじめに

我が国における乗用馬生産は、乗馬人口の増加、乗用馬頭数の増加等に伴い、内国産馬の質の向上も図られてきた。しかし今後、さらなる国内の馬産振興を効率的に図っていくためには、乗用馬の一層の活性化と内国産優良乗用馬の安定的生産が重要な命題となっている。

平成30年よりフランス国から優良な凍結精液を輸入することが可能となり、人工授精技術を活用し、種牡馬については優良な遺伝子を手に入れる環境が整った。しかし種牡馬と比べ、牝馬側では繁殖生理等の技術の伝承が行われず、旧態依然のままとなっている。

このような中、平成30年度から国立大学法人北海道国立大学機構帯広畜産大学において乗用馬における受精卵移植技術の研究が行われている。学術的には受精卵移植技術は確立されているものの、フィールドにおいては、受精卵移植技術が定着されていない状況となっている。

今後、少生産頭数で、より質の高い馬が求められる中、競技等に供用しつつ、優良な牝馬の産駒が得られる受精卵技術の普及は、我が国における乗用馬の生産対策を検討する上で必要不可欠な技術であると考えられる。

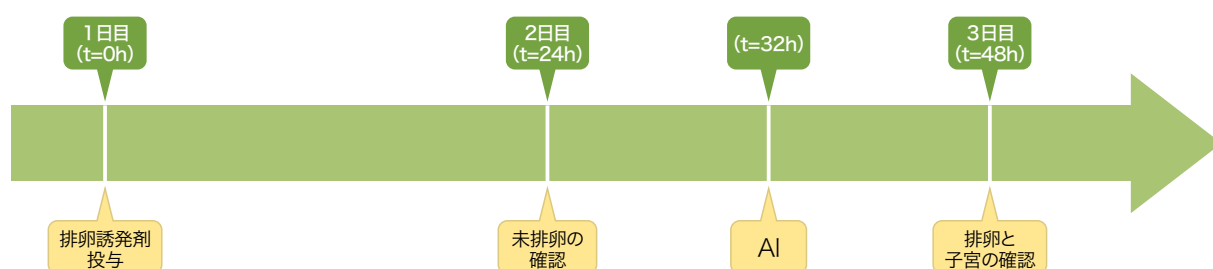
そのため、令和4年度から6年度にかけて、日本中央競馬会特別振興資金助成事業「馬受精卵移植技術の実用化推進事業」を実施し、我が国における受精卵移植技術の早期定着の実現を目指している。その一環として『馬受精卵移植の手引き』を刊行する。この小冊子が受精卵移植技術の早期定着に寄与することを願っている。

令和7年2月28日

公益社団法人日本馬事協会

人工授精の 手順について

① 排卵誘発剤の投与から人工授精後の検査までの流れ



本事業では上記のように排卵誘発剤投与から人工授精(AI)後の検査を行った。

まず、排卵誘発剤(ヒト絨毛性性腺刺激ホルモンhCG1500～3000IU、または持続型性腺刺激ホルモン放出ホルモンデスロレリン1mg/500～600kg馬)の投与にふさわしい子宮、卵巢の状態であることを確認し、誘発剤を投与する。hCG静脈投与により36時間±4時間後に排卵が起こる。誘発剤の投与の際には、hCGは静脈内投与、性腺刺激ホルモン放出ホルモンGnRHの場合は筋肉注射の方法を用いる。普段温厚な馬でも注射に慣れていない場合は特に十分注意して実施する

必要がある。次に排卵誘発注射後32時間頃に主席卵胞が排卵していないことを確認し、AIを行う。

排卵誘発注射後48時間に、排卵と子宮の状態を確認する。この時に、子宮内に貯留液が確認された場合などは治療を考慮する。未排卵であった場合には経済的な状況を考えて再度AIを行うか検討する必要があるが、一般的には次回発情で再試行することを推奨する。排卵確認時にオキシトシン10～25IU(国内動物用オキシトシン製剤は通常50IU含まれているので半量)を筋肉内投与することも多い。

治療などが行われた場合は経過観察することが望まれる。

2 排卵誘発剤と投与のタイミング

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要である。以下に示す投与量は我々が北海道和種(350～450kg)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: ギナトロピン3000、ゲストロン1500 など

投与量、方法: 1500～3000IUを静脈内投与(帯広畜産大学では、ポニーや日本在来馬には1500IU、重種馬には3000IU、サラブレッドや日本乗系統種には、2000～2500IUの投与を実施して有効な結果を得ている)

Deslorelin (GnRH アナログ)

※輸出品(日本では未承認)

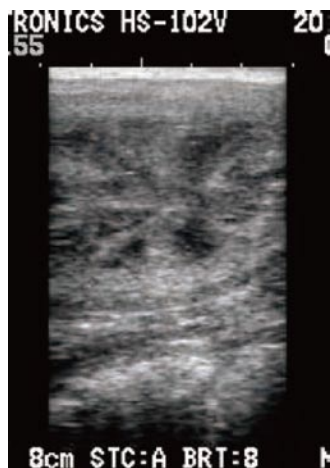
投与量、方法: サラブレッドまたはそれ以上の重量の馬に対して1.5mgを筋肉注射、帯広畜産大学の北海道和種には0.75mgの筋肉投与で90%以上の排卵率)



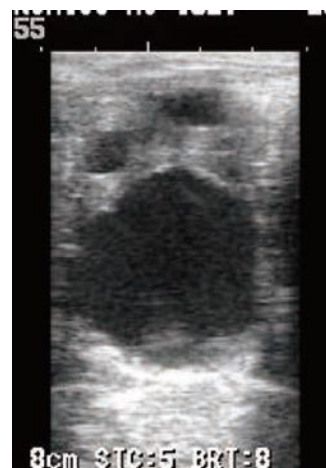
ギナトロピン3000(hCG)

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以上で行うことが推奨される。サラブレッドでは、直径が40mmを超えるぐらい、乗用馬では体格に応じて30～40mmが適期と考えられる。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回までの使用とするべきである。推奨される投与量は1500～2500IUである。重種馬には通常、国内で市販されている3000IUを使用している。hCG静脈投与により36時間±4時間後に排卵が起こる。

hCG静脈投与により、排卵が48時間以内に誘発されない場合は、GnRH筋肉投与が有効である。



浮腫グレード3の子宮像



直径35mm程度の主席卵胞

3 人工授精のタイミング

適期にAIを行うためには、以下の方法が推奨される。まず、排卵が近いと判断した時点から排卵を確認するまで複数回のAIを行う方法。次に排卵が近いと判断した時点から頻回の超音波検査を行い排卵後にAIを行う方法。最後に排卵誘発剤を用いた定時人工授精法である。

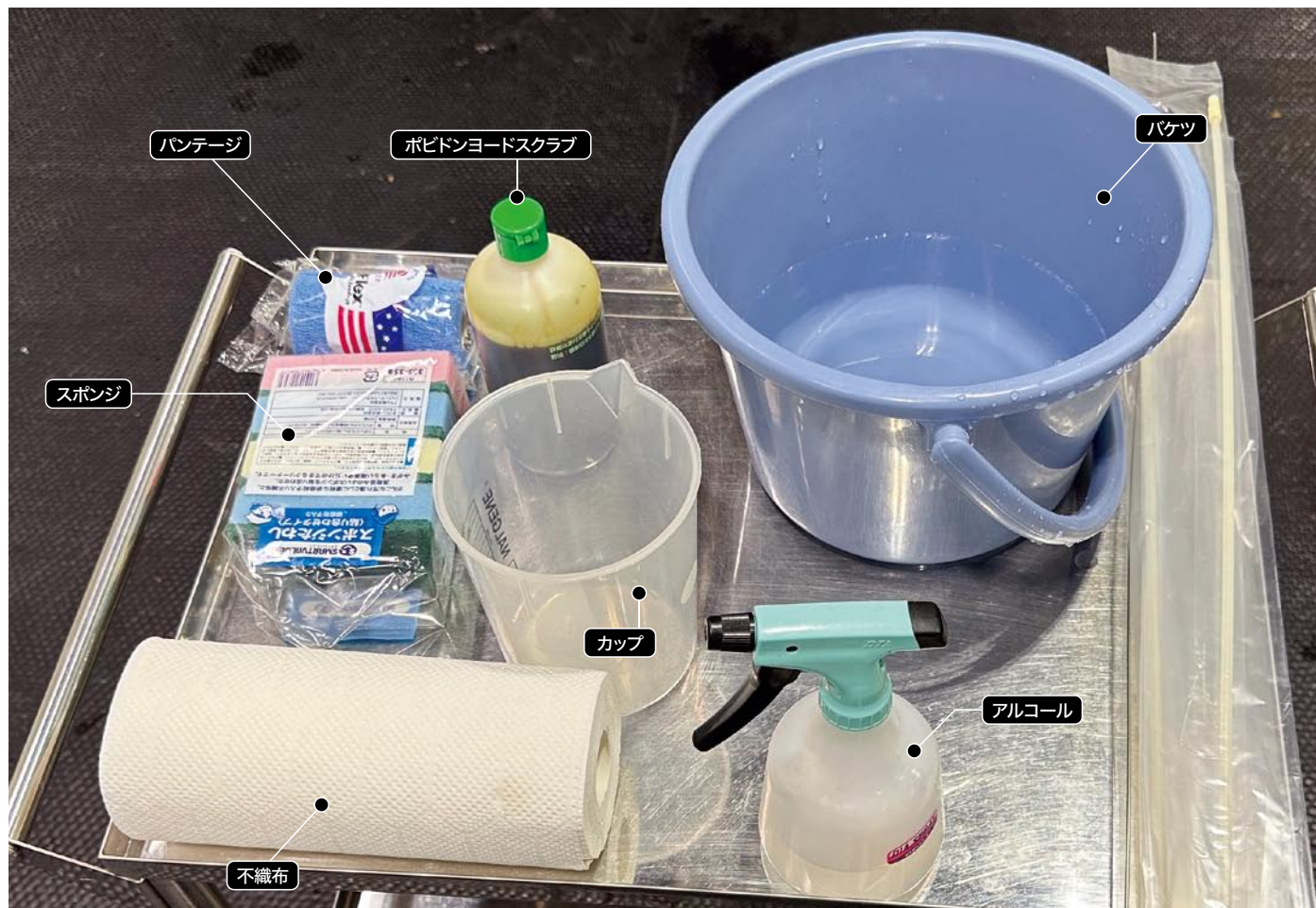
精子の生存時間が長い新鮮精液および冷蔵精液は、交配適期に幅があるためどの方法でも良い。一方で凍結精液によるAIでは、交配適期が排卵12時間前から排卵直後と短

いため、排卵誘発剤を用いた定時人工授精法もしくはこれらを組み合わせた方法が一般的である。費用、馬へのストレス、関係者の都合等を考慮し選択する必要がある。

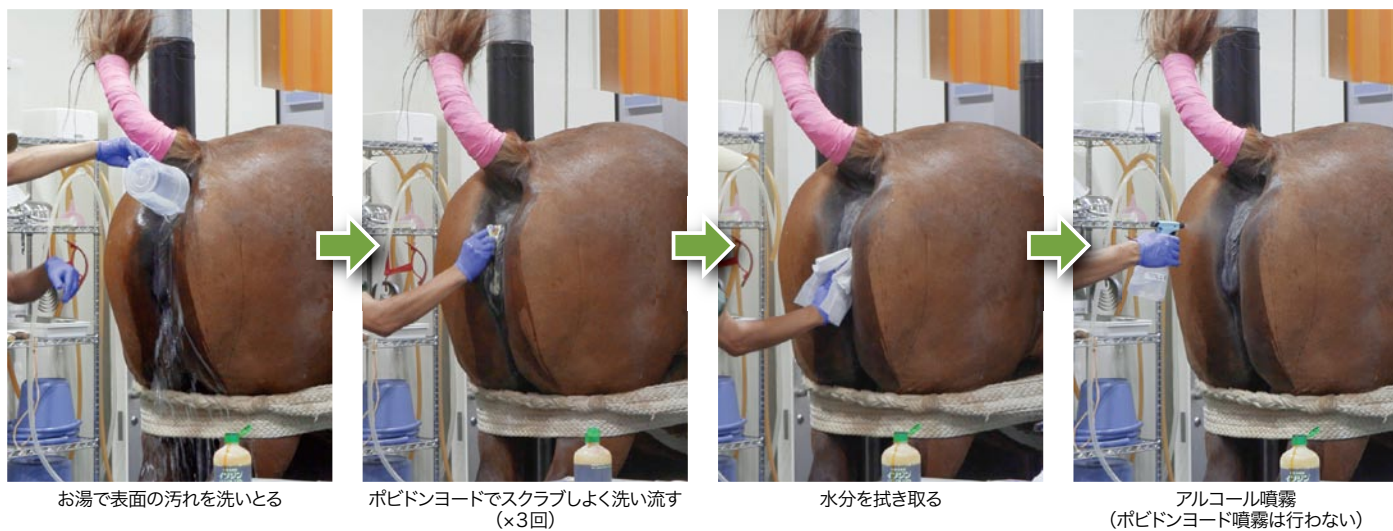
受胎率は精液の質によって様々であるが、フランス国立種馬場における凍結精液の受胎率は47%、新鮮精液の受胎率は58%とされている。また遠野馬の里における国産凍結精液の受胎率は20%、新鮮精液の受胎率は59%と報告されている。

4 外陰部の消毒

外陰部洗浄に用いるもの



消毒の流れ



5 複数本ストロー精液の融解

凍結精液人工授精用カテーテルを子宮角深部に挿入出来次第、精液の融解に取り掛かる。液体窒素中のストローを冷やしたピンセットで取り出し、すぐに水温37～38.5℃に調整されたウォーターバスに入れる。ストローは融解開始から30秒後にもう一つの冷やしていないピンセットで取り出す。

ストローを取り出したら表面の水気をとり、よく絞ったアルコール綿で拭う。アルコール綿であらかじめ消毒したストローカッター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、破損やストロー内の精液の残存などの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。(ウォーターバスの水温に注意し、ハサミやマンドレルなど使用する器具はその都度よく絞ったアルコール綿で消毒する)

最後のストロー内の精液を注入し終えたら、カテーテルをまっすぐに抜き出し、部品に破損がないか、カテーテル内に精液が溜まっていないかなどを確認する。

ストロー精液の融解に用いるもの



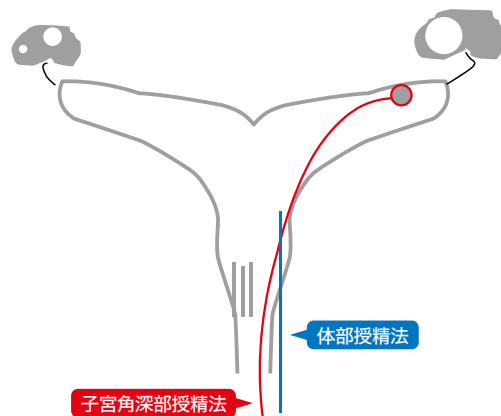
コトンの入っていない側を端から3～4mmのところまで切る

6 子宮角深部授精法と体部授精法

凍結精液を用いたAIでは、体部授精法よりも子宮角深部授精法が基本的に推奨されている。

体部授精法:子宮体部に精液を注入する
子宮角深部授精法:排卵前後の卵巢側子宮角深部に精液を注入する

AIの様子



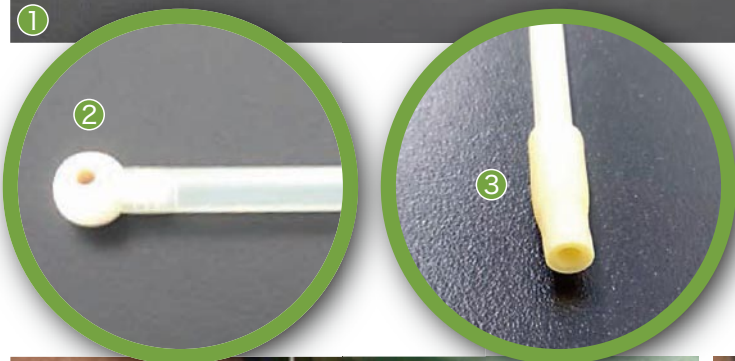
子宮角深部授精法の方法

深部授精は授精者1名の他に1、2名の補助者が必要である。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（EOガス滅菌を使用）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膣内に触れないように注意しながら子宮内部へと挿入する。子宮頸管を通過するときは挿入した指をガイドにして、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、膣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を前方に引き伸ばす、中央寄りに位置させる、子宮角への移行部分を直腸越しに持ち上げる、などの技術を駆使し、基本的には直腸越しの手の感覚でカテーテルの先端が子宮角の入口に入ったことを認識する。



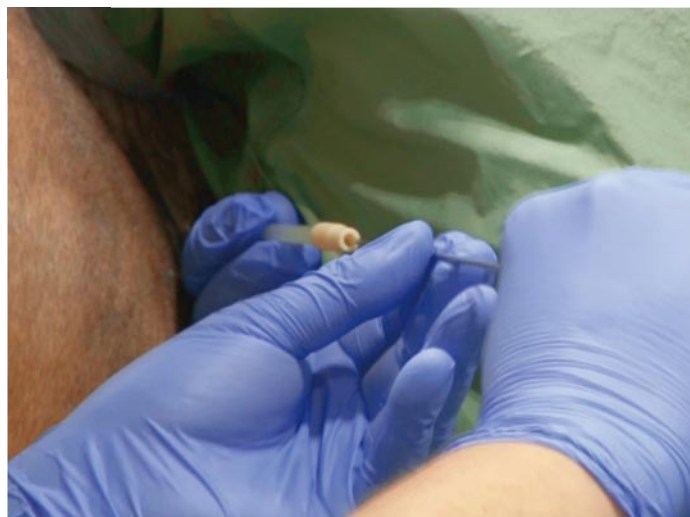
排卵側の子宮角を指先で触診することにより、カテーテルが目標の子宮角へ挿入されていることを確認できるとともに、カテーテルをさらに深部へ挿入しやすくなる。最終的にはカテーテルの先端を認識し、子宮角先端までカテーテルを深く挿入する。人工授精中はカテーテル先端が子宮深部からずれないように子宮角に握っておく。



カテーテルの全体(①)と細部(先端:②、ストローを入れる側:③)



カテーテルに融解したストローを差し込んでいる



マンドレル(心棒)でストローを押し込んでいる

受精卵移植の概要と手順について

① 受精卵移植の利点

- 競技や乗馬用として活躍する馬が役割を継続しながら、あるいは日常的な練習や訓練を行いながらその馬の子馬を生産できる
- 1頭の母馬から年に複数頭の子馬の生産が可能である

- 子宮の疾患や老齢が理由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
- 交尾感染による伝染性疾患を予防できる

② 受精卵回収の手順

受精卵移植までの流れ

受精卵移植をする場合にはドナーとレシピエントの発情周期の同期化が必要となる。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(レシピエントがドナーの排卵日と比較して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。

発情周期の同期化のためには、黄体を退行させるPGF2 α 製剤(以下PG)やhCG(商品画像は5ページ参照)・GnRHなどの排卵誘発剤の投与が必要不可欠となる。

PGは前回の排卵日の5～10日後に投与する。

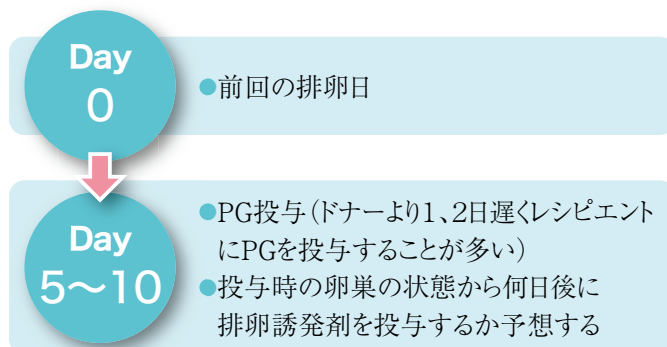
具体的にはPGF2 α 類縁体のクロプロステノール0.1mgを筋肉内投与する。

PGを投与する際の卵巣の状態によってその後の排卵日に7～12日と幅があり、また投与する際に成熟卵胞が存在する

場合、発情行動がみられる前に排卵してしまうことがある。そのためエコーにて卵巣状態を確認し、おおよそ何日後に排卵するかを予想したうえでPG投与する。海外のレシピエント牧場のように、豊富にレシピエントがそろっている環境がないため、国内で受精卵移植を実施するには、レシピエントの同期化に苦慮することが予想され、基本的にはドナーの排卵後、1～3日以内にレシピエントが排卵するよう同期化する事が重要である。



PGF2 α 製剤



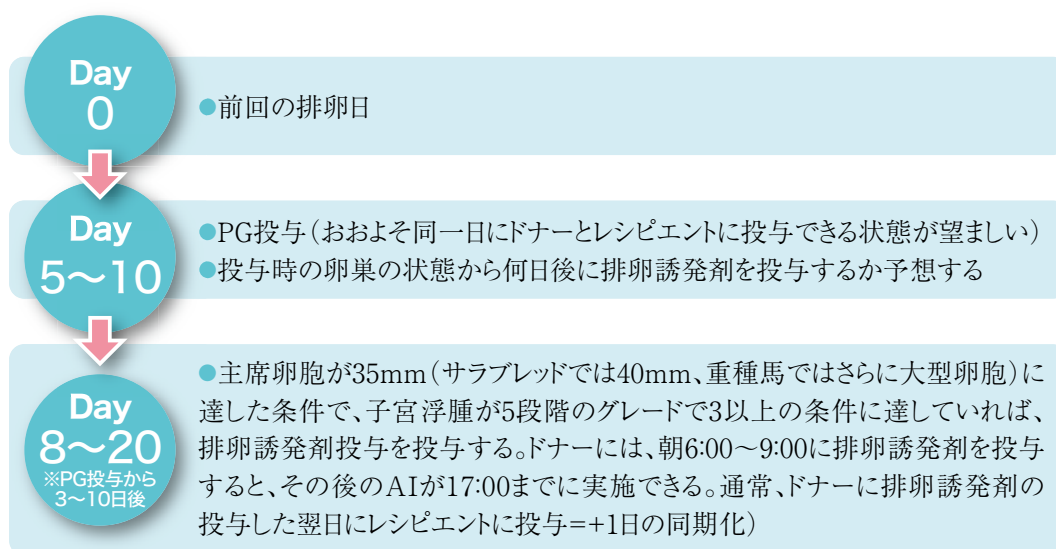
前述したとおり、ドナー・レシピエント間の発情周期の同期化のためにはPGのみではなく、hCGやGnRHなどの排卵誘発剤の使用も必要となる。

投与の詳しいタイミングはAIの資料(最下段の受精卵移植プロトコル(排卵前AI)参照)に記した。

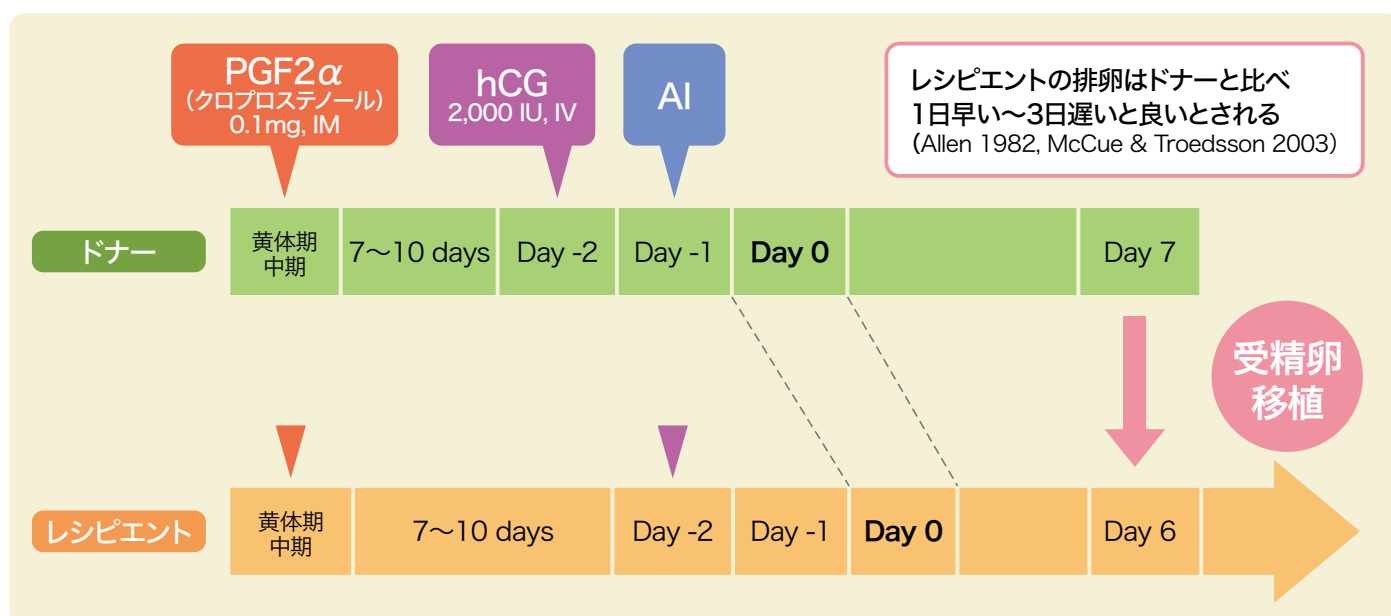
投与方法としては、hCGの場合は1500～2500IU(重種馬は

3000IU)を静脈内投与、GnRHの場合はデスロレリンとして0.75～1.5mgを筋肉内投与するとよい。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う。

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



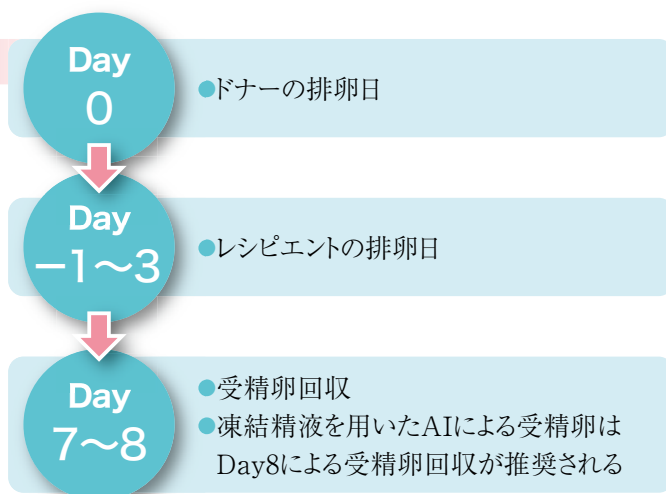
受精卵移植プロトコル(排卵前AI)



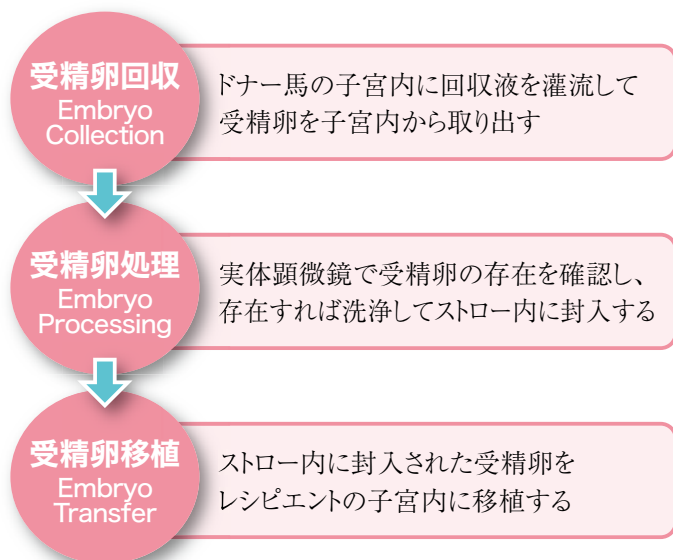
AIはhCG投与の32時間後に行い、その翌日(hCG投与から48時間後)に排卵確認を行う。

受精卵移植の手順

馬の受精卵は排卵後6～6.5日後に子宮に到達するといわれており、7～9日での回収率は排卵後6日での回収率よりも高いとされている。そのため、受精卵移植はドナーの排卵日の7日または8日後に行う。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。



受精卵移植のおおまかな手順は下図の通りである。

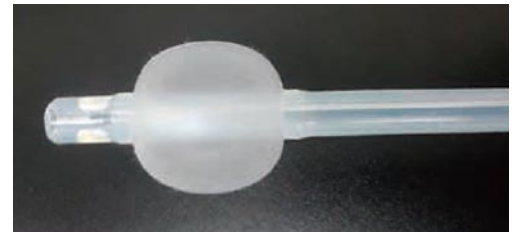
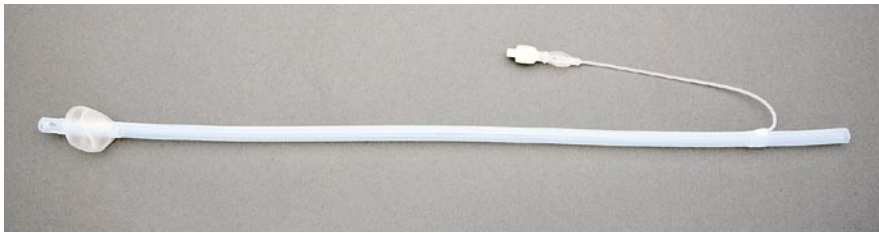


回収法は子宮からの非外科的な子宮頸管経由法である。また使用した回収液は下図のものである(エンブリオテック/日本全薬工業株式会社/福島県郡山市)。馬の受精卵はカプセルに囲まれ器具に粘着しないと考えられていることから、回収液に市販の乳酸リンゲル液を使用しても代用可能と考えられるが、高価な馬から受精卵を回収する際などに、より精度を高めるためには、エンブリオテック液などの受精卵回収液を使用すべきである。回収液は使用前に37℃に保温しておく。過度の高温は悪影響と考えられる。

馬(ドナー)を枡馬に保定したのち卵巢と子宮の所見をとり、AIの際と同じ方法で外陰部を消毒する。よく消毒したら、滅菌された直検手袋(EOガス滅菌を使用)で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を確認するとともに、カテーテル内を回収液で満たしておく)。黄体期の子宮頸管は緊縮しているの、最初に人差し指が外子宮口から子宮側に到達するか確認し、子宮頸管の内腔の方向をイメージしたのち、指を抜いてバルーンカテーテルの先端を外子宮口にあてて、もう一方の手で前方にカテーテルを送りこむ。バルーンカテーテルにゼリーを塗ることは受精卵回収に影響が出る可能性があるため塗布しない。



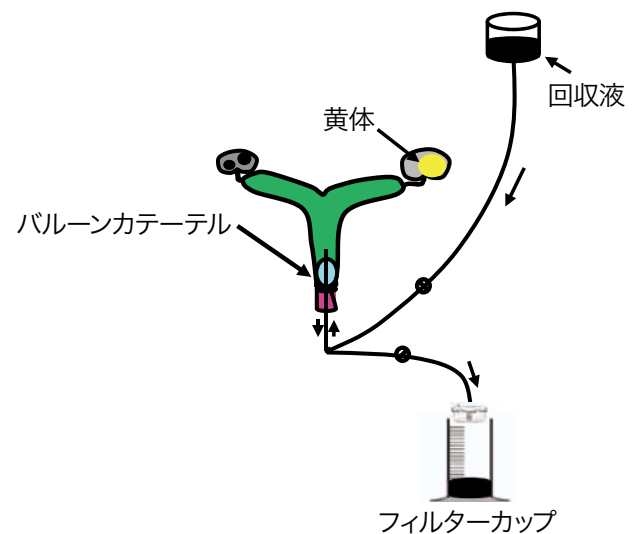
使用した回収液(エンブリオテック/日本全薬工業株式会社/福島県郡山市)



バルーンカテーテルを子宮内に挿入後、直腸検査によってバルーンの位置を確認しつつ膨らませ、カテーテルを子宮頸管頭側に固定する。カテーテルを子宮内に固定したら、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、可能な限りたくさんの回収液を子宮内に2～4Lプールさせる。ポニーは2L程度、重種馬は4L以上であることが多い。馬が不快感を示し始めたらY字チューブのクリップを開口し、子宮内にプールした回収液をフィルターに通過させる。受精卵が子宮内に存在すれば、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。

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、万が一フィルターから溢れた場合に有用である。



使用した器具

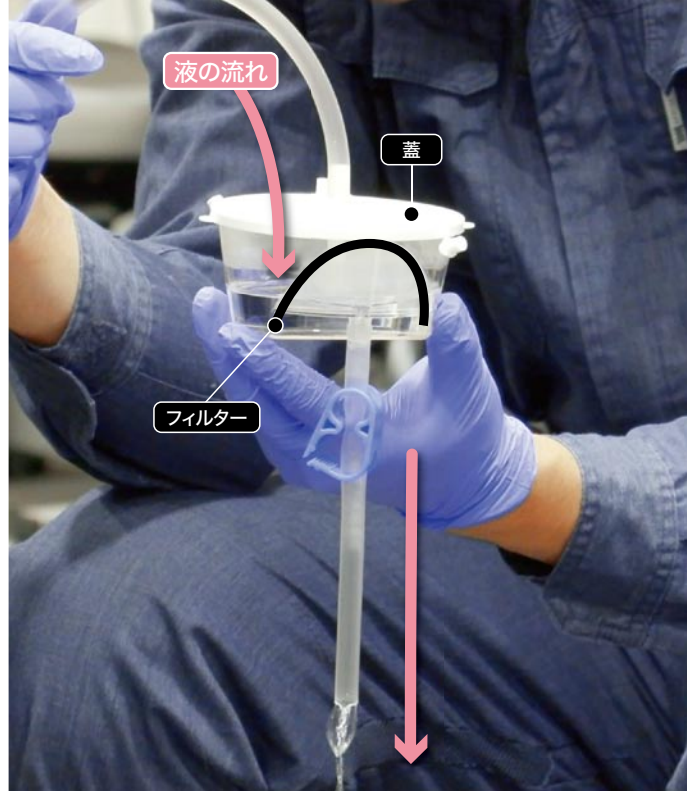
- バルーンカテーテル
(Jorgensen Laboratories, Inc CO, USA等)
- Y字チューブ (SPI-MFG, TX, USA等)
- フィルターカップ
(68 μ m pore)
(EZ-Way Filter, SPI-MFG等)

子宮に一度に灌流できる回収液量は個体にもよるが北海道和種の場合で2L、乗用馬で3Lであった。

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た場合、受精卵はフィルターを通過しないため、カップ内にとどまり存在するはずである。

注意点として回収液の液面がカップの蓋につかないように必要以上に動かさないようにする必要がある。

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、受精卵が採れていない場合に3回目の灌流を行った。その際はカップを別のものに交換し、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右図のように高く上げる。

フィルターカップ内の側面に回収液をかけて洗浄する。

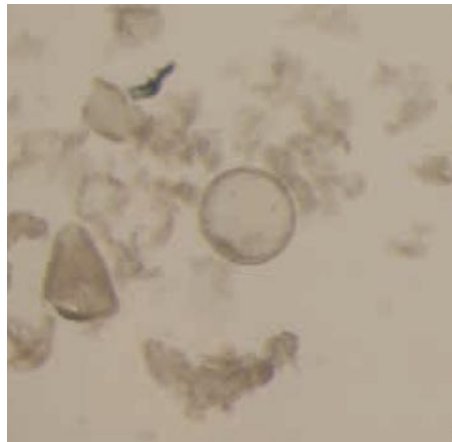
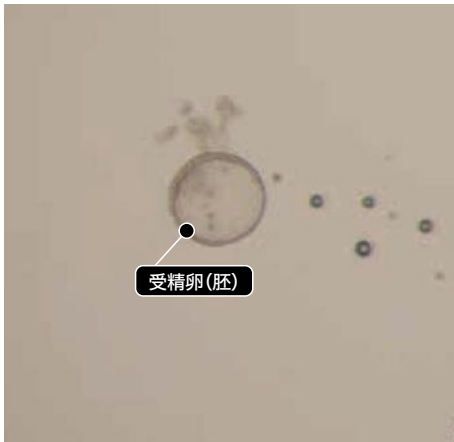
液体中を实体顕微鏡で観察する。

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。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 μ mとされる。





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



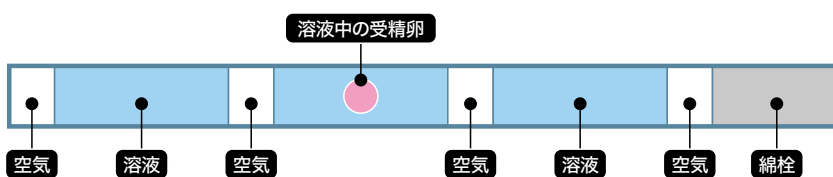
(holding media, ABT360, 1615 NE EASTGATE BLVD, SEC H PULLMAN, WA 99163 USA)



洗浄した受精卵を模式図のように0.25mL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。

ストローの模式図



③ 受精卵の移植方法

事前にレシピエントの卵巣および子宮の所見をとり、外陰部を洗淨、フルニキシンメグルミン (1.1mg/kg) とメデトミジン (3 μ g/kg) を静脈内投与しておく。回収の同日中に目的地に到着し、受精卵移植用カテーテルによる非外科的手法で子宮体部に移植する。受精卵移植用カテーテルには下図のものを

使用した。

このときレシピエントの子宮頸管を刺激するとPGが産生され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カテーテルを挿入した。事前のフルニキシンメグルミン投与も同様の目的である。

受精卵の移植から1週間後に超音波検査により初回妊娠診断を行う。



受精卵の直径800 μ m未満 牛用YTガン(Yamanetech Co., Nagano, Japan)



直径800 μ m以上 DIUI sheath for 0.25 ml straw, sterilized, individually packed (Minitüb GmbH)

受胎しない理由とその対処法

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。

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⁺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。凍結の方法や種牡馬の種類によって、融解後の受胎能力に差が生じる。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。

表1は、今回北海道和種9頭、日本スポーツホース種1頭、

表1 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
	+	-	
Stallion1	3	11	21.40%
Stallion2	14	16	46.70%
Stallion3	5	20	20%

日本乗系種1頭に排卵誘発剤を静脈内投与したのちに行った発情期でのAIの結果を、使用した凍結精液ごとに分類した表である。今回使用した精液は全て、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、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。

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見られる場合も同様の診断を行うべきである。

細菌検査や細胞診で異常が見られた場合の馬の治療は、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)。

③ 牝馬のマネジメント

前項に挙げた牝馬の年齢や細菌感染などは受精卵回収率を低下させる大きな要因であるが、若齢で顕著な繁殖障害

が無いような状態の良い牝馬であっても繰り返し受精卵が回収できないことがある[M. L. H. Campbell 2014]。

① 受精卵回収の繰り返し

子宮灌流による内膜への刺激が急性の子宮内膜炎を引き起こし、それを繰り返すことが慢性の退行性変化に繋がると考えられている[Hoffman et al. 2009]。他にも、ドナーとして使われる牝馬自身は出産しないために子宮頸管の拡張能力が弱くなり、子宮内の自浄能力が低下して子宮内膜炎になりやすくなるという可能性も指摘されている。

② 発情周期の調整の繰り返し

生殖補助医療では正確に発情周期を調整するためにしばしばPGが投与される。PG投与により子宮が低プロゲステロン高エストラジオール環境に十分におかれなまま排卵してしまうことは、初期の胚発生過程に悪影響を及ぼす可能性がある。しかしPG投与は広範に行われているため、大きな問題ではないと考えられる。

③ 熱ストレス

Mortensenらは[Mortensen et al. 2009]、同一馬群において高温多湿環境下で運動を行い体温が上昇した期間と非運動期間の受精卵回収率を比較した。前者では34%、後者で63%となり、環境や運動による熱ストレスは回収率を低下させることが示唆された。

④ 運動ストレス

馬では、運動のストレスにより血中コルチゾール濃度が上昇することが知られている。コルチゾール濃度の上昇は血中の黄体形成ホルモン濃度を低下させるため、排卵の遅延や排卵間隔の延長を引き起こす[Kelley et al. 2011; Smith et al. 2012]。

Smithらによると[Smith et al. 2012]、軽種馬にAIと受精卵回収を行ったところ、受精卵回収率は運動群で43%、非運動群で67%となった。この研究では、運動は受精卵回収率を低下させるというだけでなく、特に排卵前後期間の運動が受胎の過程へ悪影響を及ぼす可能性が指摘されている。

⑤ 輸送ストレス

輸送は短距離の移動であっても血中コルチゾール濃度を上昇させるため、運動と同様に受精卵回収率を低下させる要因となりうる[Fazio et al. 2008][Fazio et al. 2013]。また、黄体期と非発情期における輸送で強いストレス応答が確認されている[Tischner et al. 2006]。

まとめ

精液性状の不良、牝馬の低ボディコンディション、子宮内膜炎といった顕著な低受胎率の原因が認められる際はまずその原因を取り除くべきであるが、原因のわからない不受胎が連

続する場合は、上記のストレスなどについてのマネジメントを考慮する必要があると考えられている。

馬受精卵移植の手引き

発行日 令和7年2月28日

発行人 公益社団法人 日本馬事協会

〒104-0033 東京都中央区新川2丁目6番16号 馬事畜産会館7F

執筆者 南保 泰雄(国立大学法人北海道国立大学機構帯広畜産大学教授)





公益社団法人 日本馬事協会