

経膈採卵を用いた一卵性多子生産技術の種雄牛造成への応用可能性

錫木 淳、瀬尾哲則*

*現公益財団法人鳥取県畜産振興協会

要 約

黒毛和種種雄牛造成の効率化を目指して一卵性多子生産の技術検討を行った。経膈採卵－体外受精－割球分離では5%子牛血清添加KSOMaaを用いて一定の成果（ペア胚盤胞発生率（29.7%））を得た。核移植技術の検討において、と畜当日採取したレシピエント卵子、新鮮ドナー胚および5%子牛血清添加CR1aa培地が最適条件であることがわかった。しかし、割球分離胚をドナーとして核移植を組み合わせた場合の胚盤胞発生率は10.2%と低く、今回の実験条件での生産効率では種雄牛造成への応用は困難であると考えられた。

今後は、経膈採卵－体外受精－割球分離技術を和牛の増産と改良に応用していく予定である。

緒 言

現場後代検定は、黒毛和種種雄牛造成の検定法として現在主流であり、脂肪交雑の改良などで高い実績を持つが、種雄牛の造成までに少なくとも5年以上の歳月と多くの経費が必要である。

種雄牛造成の効率化の方法としては、尾形らにより分割卵検定とクローン検定を組み合わせた方法が提案されている¹⁾²⁾。これは一卵性多子生産技術の一つであり、具体的には経膈採卵－体外受精－割球分離（2分離）により生産したペア胚の片方（もう一方の胚は培養後に移植し種雄牛候補とする）を桑実胚まで発育させ、これをさらに割球分離（単離）し、ドナー細胞として核移植に供し、同一の遺伝情報を持つ胚を複数個得るという方法である。余ったドナー細胞あるいは核移植胚を利用して遺伝子診断が可能であるため、胚移植前に性別等の遺伝情報（全ての胚で共通）が判明する。この方法が実現すれば、黒毛和種として登記可能な胚がひとつと、核移植胚が複数個できるため、種雄牛候補と産肉調査牛（クローン牛）を同時に得ることができる。

一卵性多子生産技術の種雄牛造成への応用が実現すれ

ば、直接検定とほぼ同時期に開始されるクローン検定の結果をもって試験種付けを実施する種雄牛候補が選抜でき、選抜強度が上がることにより、年あたり改良量（改良速度）が増加する。一方、クローン検定を後代検定と完全に置換した場合、成績判明までの期間が約3年半に短縮され、世代間隔短縮により改良速度が増加する。

今回、当场で実施可能な条件下で一卵性多子生産の技術検討を行い、その応用可能性について調査した。

材 料 及 び 方 法

経膈採卵、体外成熟培養、体外受精、割球分離および核移植は下記の方法により行った。経膈採卵における卵子回収実績の蓄積、体外受精（無処理／割球分離）における発生培地の検討、核移植によるドナー細胞処理の検討、レシピエント卵子採取時期の検討、および発生培地の検討を行い、最も効率的な方法を検討した。さらに、これらの方法を組み合わせた一卵性多子生産の試行を行い、その生産効率を評価した。

有意差検定はカイ二乗検定により行った。

1 体外受精胚（ドナー胚含む）の生産

1) と畜牛由来卵子

株式会社鳥取県食肉センターおよび鳥取県食肉衛生検査所に依頼し採材したと畜牛卵巣（黒毛和種、ホルスタイン種および F1 の混合）を 20 °C に保温した生理食塩水中で一晩保存し、翌日に卵子を吸引採取した。

2) 経膈採卵由来卵子

超音波画像診断装置（HS-2100V、本多電子）、経膈採卵用コンベックスプローブ（HLV-4212M）及び穿刺針（COVA ニードルタイプ A、ミサワ医科工業）を用い、吸引圧 100 mmHg により黒毛和種経産牛から採卵を行った。回収液として 10U/ml ヘパリン及び 1 % 子牛血清添加乳酸リンゲル（ハルゼン V 注射液、日本全薬工業）を用い、EMCON フィルター（Immuno Systems）でろ過後、卵子の検索を行い、定法³⁾に従い格付けを行った。

3) 体外成熟培養

卵子は、FSH（2AU/ml）・10 % 子牛血清添加 TCM-199（Earle's 塩、gibco12340-030）で 22 時間成熟培養を行った（気相条件：38.5 °C、5 % CO₂）。

4) 体外受精

精液として具有種雄牛（「勝安波」）の凍結精液を用い、IVF100（機能性ペプチド研究所）により希釈し、精子濃度 6.0×10^6 /ml に調整した後、体外受精を行った（38.5 °C、5 % CO₂、6 時間）。体外受精終了後、発生培地内でピペッティングにより機械的に裸化を行った。

5) 発生培養

発生培地は 5 % 子牛血清添加 HP-SOF、IVD101（ともに機能性ペプチド研究所）または 5 % 子牛血清添加 KSOMaa（evolve、Zenith biotech）を用い、低酸素条件下で発生培養を行った（38.5 °C、5%O₂、5%CO₂、8 日間）。核移植に用いる場合、体外受精後 5 日目に桑実胚となっているものをドナーに供した。

6) 割球分離

体外受精後 24 時間で 2 ~ 4 細胞となった胚を 0.5% アクチナーゼ（科研製薬）で透明帯を除去した後、機械的に 2 分離し、個別管理培養ディッシュ（ID-culture、大日本印刷）に移し、5 μ l/個の培地量で発生培養を継続した。核移植に用いる場合、体外受精後 5 日目にペアで桑実胚となっているものを選び、片方をドナーに供した。

2 核移植胚の生産

1) レシピエント卵子

前述の方法で得たと畜牛卵巣から当日または翌日に卵子を採取し、10 % 子牛血清添加 TCM-199 で体外成熟培養（38.5 °C、5 % CO₂、16 時間）を行い、0.1% ヒアルロニダーゼ内で裸化を行い、極体の放出を確認したものをレシピエント卵子に用いた。

2) 除核

卵子は 20 % 子牛血清添加 TCM-199（Hanks' 塩、gibco12350-039）内でマイクロマニピュレーター（narishige）を用いて透明帯切開後、極体とその直下の細胞質を押し出すことにより除核した。

3) レシピエント卵子の活性化

除核卵子は 10 μ M カルシウムイオノフォアで 5 分間暗所にて反応後、10 μ g/ml シクロヘキシミド・10 % 子牛血清添加 TCM-199（Earle's 塩）で 6 時間処理した（38.5 °C、5%CO₂）。

4) ドナー細胞

経膈採卵由来卵子を用いて前述の方法で体外受精し、体外受精後 5 日目にドナー胚としてそのまま用いるか（新鮮ドナー）、クライオトップ（北里サブライ）によりガラス化凍結保存したものを融解しドナーとして用いた（ガラス化凍結ドナー）。ガラス化は、平衡液として 7.5% エチレングリコール・7.5% DMSO・20% 子牛血清添加 TCM-199、ガラス化液として 16.5% エチレングリコール・16.5% DMSO・20% 子牛血清添加 TCM-199 を用いて凍結し、0.3M スクロース・20 % 子牛血清添加 TCM-199 により加温融解を行った。ドナー胚は 0.5% アクチナーゼにより透明帯除去後（既に割球分離しているものは除く）、0.05% EDTA 添加 0.125% トリプシン液内で割球分離を行い、ドナー細胞とし、2.5 μ g/ml サイトカラシン D・20 % 子牛血清添加 TCM-199（Hanks' 塩）で使用時まで保管した。

5) インジェクション

除核卵子の透明帯切開部からマイクロマニピュレーターを用いてドナー細胞を 1 個ずつ挿入した。

6) 細胞融合

ドナー細胞を挿入した除核卵子は Zimmerman 氏液に移し、ニードル型電極（富士平工業）を装着した細胞融合装置（ネッパジーン、ECFG21）にて直流パルス 25V、50

μ sec、1 回の条件で印加を施した。20 %子牛血清添加 TCM-199 (Hanks'塩) に移した後加温し、30 分後に融合確認を行った。

7) 発生培養：5 %子牛血清添加 CR1aa または 5 %子牛血清添加 KSOMaa を発生培地として低酸素下で 8 日間培養を行った (38.5 °C、5 % O₂、5%CO₂)。

3 胚移植

当場で繋養している黒毛和種経産牛を受胎牛として、誘起発情 7 日後に 1 あるいは 2 胚を子宮頸管経由法により移植した。

結 果

1) 経膈採卵は延べ 89 頭について実施し、1 頭あたり 9.0 個の卵子を回収し、このうち利用可能 (C ランク以上) と判定したものは 6.9 個であった (表 1)。

表 1 経膈採卵による卵子回収成績

延べ 頭数	採取 総数	卵子のランク				利用可能 (C以上)
		A	B	C	D	
89	804	214	298	103	189	615
平均 /頭	9.0	2.4 (26.6%)	3.3 (37.1%)	1.2 (12.8%)	2.1 (23.5%)	6.9 (76.5%)

2) 体外受精について、と畜牛由来卵子を用いた場合、5 %子牛血清添加 KSOMaa が無処理胚 (胚盤胞発生率 82.4 %) および割球分離胚 (同 26.6%) の両方で他の 2 種類の培養液と比べて胚盤胞発生率が高い傾向を示した (表 2)。経膈採卵由来卵子の場合も同じく 5%子牛血清添加 KSOMaa により割球分離胚の胚盤胞発生率 47.9 % (ペア胚盤胞発生率 29.7%) を得た。また、割球分離後の個別の胚盤胞発生率において、経膈採卵由来卵子はと畜牛由来卵子よりも有意に高かった (P<0.01) (表 3)。

表 2 発生培地による比較 (と畜牛由来体外受精胚)

	発生培養液	発生培養数		胚盤胞発生数 (率)	
		発生培養数	胚盤胞発生数 (率)	発生数	(率)
無処理胚 (割球分離なし)	5%子牛血清添加 HP-SOF	29	9 (31.0%)		
	IVD101	24	11 (45.8%)		
	5%子牛血清添加 KSOMaa	17	14 (82.4%)		
割球分離胚	5%子牛血清添加 HP-SOF	167	34 (20.4%)		
	IVD101	296	70 (23.6%)		
	5%子牛血清添加 KSOMaa	308	82 (26.6%)		

表 3 卵子の由来による比較 (割球分離胚)

卵子由来	発生培養数	胚盤胞発生数 (率)		
		発生培養数	胚盤胞発生数 (率)	
経膈採卵	個別	96	46 (47.9%)	*a
	ペア	64	19 (29.7%)	
と畜牛	個別	262	67 (25.6%)	*b
	ペア	131	25 (19.1%)	

* 異符号間で有意差あり (P<0.01)

3) 核移植の条件検討により、と畜当日採取したレシピエント卵子の条件で胚盤胞発生率が高く (P<0.05) (表 4)、また、新鮮ドナーの条件 (表 5) および 5%子牛血清添加 CR1aa の条件 (表 6) で胚盤胞発生率が高い傾向を示した。生産した C ランク以上の核移植胚を 5 頭の受胎牛に移植したが、受胎は得られなかった。

表4 レシピエント卵子採取時期による比較

卵子採取	融合 実施数	融合数 (率)	発生 培養数	卵割数 (率)	胚盤胞 発生数 (率)
と畜翌日	113	91 (80.5%)	89	31 (34.8%)	4 (4.5%)
と畜当日	114	83 (72.8%)	93	25 (26.9%)	15 (16.1%)

* 異符号間に有意差あり (P<0.05)

表5 ドナー胚の処理による比較

ドナー処理	融合 実施数	融合数 (率)	発生 培養数	卵割数 (率)	胚盤胞 発生数 (率)
ガラス化 凍結	112	92 (82.1%)	92	65 (70.7%)	7 (7.6%)
新鮮	78	61 (78.2%)	50	38 (76.0%)	8 (16.0%)

表6 発生培地による比較

	融合 実施数	融合数 (率)	発生 培養数	卵割数 (率)	胚盤胞 発生数 (率)
5%子牛血清添加 CR1aa	98	76 (77.6%)	95	27 (28.4%)	13 (13.7%)
5%子牛血清添加 KSOMaa	141	107 (75.9%)	96	31 (32.3%)	7 (7.3%)

4) 経膈採卵－体外受精－割球分離－核移植 (一卵性多子生産) について、5 回の試行を行い、胚盤胞発生率は 10.2%であった (表 7)。生産した割球分離胚を 2 頭の受卵牛に移植したが、受胎は得られなかった。

表7 割球分離胚をドナーとした核移植成績

試行 回数	融合 実施数	融合数 (率)	発生 培養数	卵割数 (率)	胚盤胞 発生数 (率)
5	49	31 (63.3%)	49	30 (61.2%)	5 (10.2%)

考 察

以上の成績をまとめると、経膈採卵により 1 頭あたり体外受精へ利用可能な卵子が 6.9 個得られ、体外受精－割球分離により 29.7%のペア胚が得られる。つまり、1 頭の経膈採卵により 2.0 対 (6.9 個×0.297) のペア胚が得られることになる。一方、核移植では、新鮮ドナーかつと畜当日採取したレシピエント卵子かつ 5%子牛血清添加 CR1aa という最適条件において胚盤胞発生率 21.9%を得たが、一卵性多子生産の試行、つまり割球分離胚をドナーとして核移植した場合の胚盤胞発生率は 10.2%であった。

経膈採卵－体外受精－割球分離により 1 頭の経膈採卵により 2.0 個のペア胚が得られ、雌雄の発生確率が同じとすると雄胚が 1.0 個生産できる計算となる。一方、割球分離胚をドナーとした核移植において、割球分離による細胞へのダメージが影響したためか胚盤胞発生率が 10.2%と低く、(今回受胎例が得られなかったため) 仮に受胎率を 40%と設定した場合、1 頭のクローン牛を生産するためには少なくとも 25 個の核移植胚が必要となる。枝肉 6 形質のうち遺伝率が最も低いバラ厚でも 0.3 以上であり⁴⁾、後代検定を上回る正確度を担保するクローン検定の頭数は 3 頭以上となる⁵⁾ことから、最低でも 75 個の核移植胚が必要となる。これに対して、ドナーとして供用する桑実胚 (体外受精後 5 日目) は 32～64 細胞程度と推定されること、また細胞融合時など途中工程での損耗あるいは発育停止胚の発生なども考慮すると、目標とする 3 頭のクローン検定牛の確保は非常に困難である。このことから、今回設定した実験条件では、一卵性多子生産技術の種雄牛造成への応用可能性は現時点では極めて低いと言わざるを得ない。実験条件の変更により若干の成績改善を得る可能性はあるが、一卵性多子生産は非常に高度な技術の集積体であり、技術の蓄積、維持およびその継承という点でも容易ではないと考えられる。

今回、最終目標である一卵性多子生産技術の確立には至らなかったが、経膈採卵－体外受精－割球分離でのペア胚発生では一定の成果を得た。今後は、この技術を活用した和牛の増頭と改良に取り組む予定である。

謝 辞

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所の赤木悟史先生、独立行政法人家畜改良センターの小西一之先生、広島県立総合技術研究所畜産技術センターの日高健雅先生をはじめ、本研究にご協力いただいた全ての方々に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) 尾形康広ら：クローン技術を利用した種雄牛造成の効率化, 広島県獣医学会雑誌, No.20, 11-15 (2005)
- 2) 谷本陽子ら：クローン技術による種畜検定システムの検討, 広島県畜技セ研報, 第 14 号, 1-9 (2006)
- 3) ウシ生体卵子吸引・体外受精技術マニュアル, 家畜改良センター技術マニュアル 19
- 4) アニマルモデルに基づく鳥取県枝肉成績育種評価結果について, 公益社団法人鳥取県畜産推進機構, 平成 25 年 6 月
- 5) 古川力：クローン技術を用いた肉用牛の育種法の検討, 畜産草地研究所研究資料, 第 10 号, 5-8 (2010)