

受賞論文

牛の受精卵移植に関する研究

北海道立新得畜産試験場 生物学グループ

山本 裕介・南橋 昭・陰山 聡一・森安 悟・  
北野 則泰・芦野 正城・八畝 隆司・遠谷 良樹・  
増地 進<sup>1)</sup>・本郷 泰久<sup>2)</sup>・工藤 卓二<sup>3)</sup>・伊東 季春

(<sup>1)</sup>現自営, <sup>2)</sup>現滝川畜試, <sup>3)</sup>現中央農試)

Yusuke YAMAMOTO, Akira MINAMHASHI, Soichi KAGEYAMA, Satoru MORIYASU  
Noriyasu KITANO, Masashiro ASHINO, Takasi YAKUWA, Yoshiki TOYA  
Susumu MASUCHI, Yasuhisa HONGO, Takuji KUDO, Sueharu ITO

Hokkaido Prefectural Shintoku Animal Husbandry Experiment Station

キーワード：受精卵移植, 牛

Key words: embryo transfer, cattle

はじめに

牛の受精卵移植技術は、牛の改良増殖を効率化する手段として我が国では1980年代初め頃から試験的に開始され、現在では普及段階に至っている。農水省および北海道の統計(図1)によるとここ10年あまりの間、全国で受精卵移植により産まれる子牛の数は増加の一途をたどっており、昭和57年度に207頭(北海道150頭)だったのが平成7年度には11,322頭(北海道2,219頭)まで増加した。平成8・9年も増加し続けており、今後も増加すると予想される。受胎率では北海

道の場合、新鮮卵移植で60%に近づき、凍結卵移植では50%を越えた。また最近では、体外受精、受精卵の性別別、クローン牛の作出等の新技術の開発が進んでおり、これらの応用が期待されている。新得畜試生物学グループは、1982年より牛受精卵移植技術の試験を開始し、技術の改良、開発、普及に取り組んできた。ここでは、15年間におけるこれらの試験研究の概要について報告する。

1. 牛の受精卵移植技術の改善に関する試験

肉専用種における1986~1990年の5年間にわたる

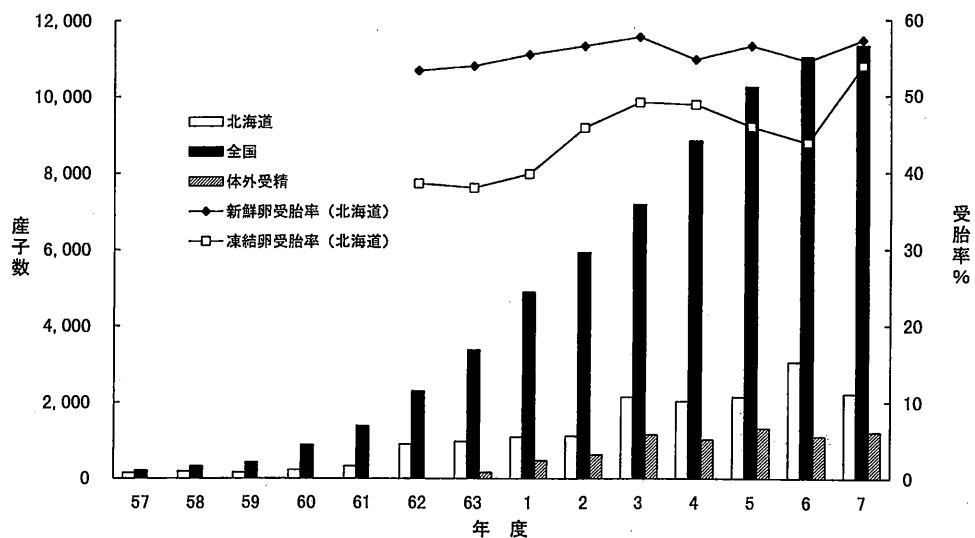


図1 受精卵移植による産子数と受胎率の推移

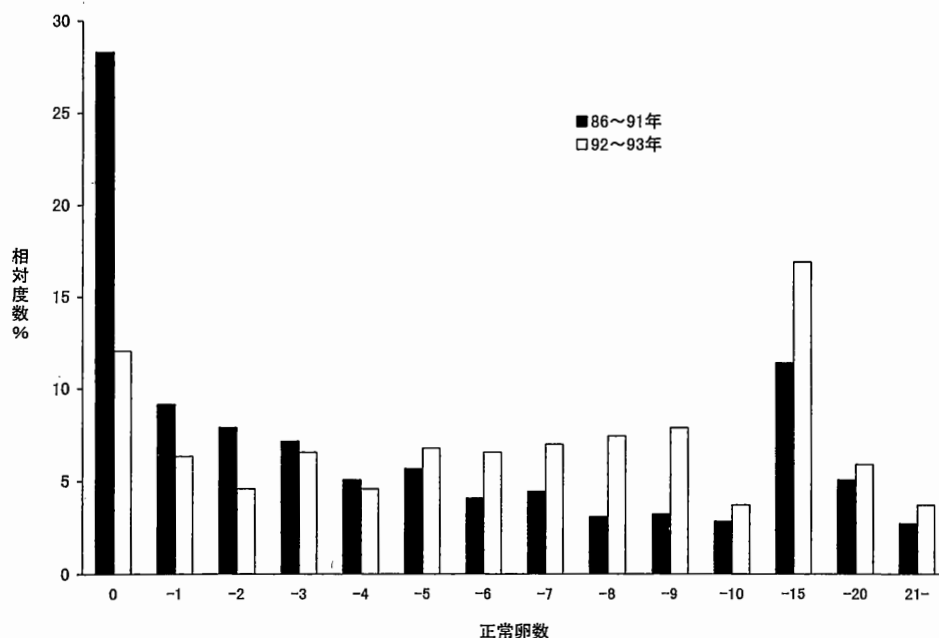


図2 正常卵数の度数分布

表1 牛品種別卵回収成績

品 種	供試頭数	採卵回数	回収卵数	正常卵数
アンガス	61	219	9.3	5.8
ヘレフォード	62	178	9.9	5.2
黒毛和種	40	251	10.3	6.0

表2 FSH投与方法別卵回収成績

投与方法	頭数	推定回収黄体数	回収卵数	正常卵数	正常卵率(%)
漸減3日間	68	11.8	11.6	8.1	70.1
漸減4日間	82	11.4	10.7	7.0	66.9

過剰排卵成績を集計した結果、卵回収1回当たりの回収卵数は黒毛和種、アンガスおよびヘレフォードでそれぞれ10.3個、9.3個および9.9個、そのうち移植可能な正常卵数はそれぞれ6.0個、5.8個および5.2個であった(表1)。品種別では、黒毛和種の成績が他の外国種よりもやや高いことが示された。牛による成績のばらつきは極めて大きく、正常卵数の度数分布を調べると、図2のように全く回収されないものから20個以上回収されるものまでさまざまであり、全く回収されない牛の割合は全体の1/8~1/4であった。回収される卵数を前もって予測することは困難であるが、同一牛を連続して過剰排卵処理に供する場合、初回および2回目の成績の良好な牛は3回目以降の成績も良好であることが明らかになった。

表3 PGF<sub>2α</sub>の投与回数別卵回収成績

PGF <sub>2α</sub> 投与回数	回収頭数	平均回収卵数	平均正常卵数	正常卵率(%)
1	138	10.4	5.6	74
2	271	9.5	5.1	76

FSH漸減投与方法の簡易化について検討した結果、従来4日間8回であったFSHの投与は3日間6回に短縮できることが示された(表2)。また、通常2回行われているPGF<sub>2α</sub>の投与(表3)および人工授精(表4)も1回に簡易化できることが示された。

表4 人工授精方式の違いによる卵回収成績

方 式	回収卵数	正常卵数	正常卵率(%)
A(朝一朝)	15.3	10.4	69.8 <sup>a</sup>
B(約24時間)	8.8	6.4	65.8 <sup>a</sup>
C(夕一朝)	14.0	7.5	50.5 <sup>b</sup>
D(夕一夕)	9.6	8.6	88.1 <sup>a</sup>
E(2回)	8.4	6.7	76.4 <sup>a</sup>

受精卵の凍結・融解法の検討では、凍結過程における-5℃から-30℃までの凍結速度を従来の0.3℃/minから0.5℃/minに速めても融解後の生存性に影響がないことが示された。また、液体窒素から取り出したストローを直ちに37℃の温水に浸漬して融解す

A: 朝発情確認翌朝1回授精  
 B: 発情開始後約24時間後に1回授精  
 C: 夕方発情確認翌朝1回授精  
 D: 夕方発情確認翌夕1回授精  
 E: 発情確認後半日間隔で2回授精  
 ※異符号間に有意差有り (P<0.05)

表5 ストロ-融解法別の透明帯損傷率

ストロ-融解法	凍結融解卵	透明帯損傷数	透明帯損傷率
直ちに37℃温湯で融解	181	91	50.3% <sup>a</sup>
約20秒間空气中保持後37℃温湯で融解	148	32	21.6% <sup>b</sup>

※異符号間に有意差有り (P<0.01)

るよりも、約20秒間室温空气中に保持した後に浸漬する方が、封入してある受精卵の透明帯損傷率は低かった(表5)。

## 2. 双子生産技術に関する試験

人為的に双子を生産する方法としては、受精卵を同時に2個移植する方法、通常の人工授精のあとに受精卵を1個移植する方法、低単位のFSHを投与する方法があるが、最も多く行われているのが2卵移植である。そこで2卵移植の有効性について検討した。受胎率は新鮮卵で62.5%、凍結卵で51.6%であり、1卵移植と遜色のないことが示された(表6)。受胎牛のうち53.1%は双胎妊娠であったが、双胎妊娠牛の流産率は23.3%と単胎妊娠牛に比べ高いことが示され、今後の問題点として残された。双胎の妊娠期間は279日と単胎に比べ約1週間短く、生時体重は31.0kgと単子に比べ約9kg小さかった(表7)。また、双子は分娩事故率が高いうえに虚弱であることが多く、分娩監視の強化、適切な人工哺育など分娩前後の管理を万全に行わ

表6 2卵移植成績

卵区分	移植頭数	受胎率(%)	双胎妊娠率	双胎流産率
新鮮	52	61.5	62.5	20.0
凍結	95	51.6	46.9	26.1
合計	147	55.1	53.1	23.3

表7 受精卵移植における妊娠期間と産子の生時体重

受胎牛品種	産子の品種	妊娠期間(日)		産子の生時体重(kg)	
		単子	双子	単子	双子
アングス	ヘレフォード	286	279	45.4	32.8
ヘレフォード	黒毛和種	286	282	37.3	29.3
ヘレフォード	アングス	297	277	35.0	28.2
ホルスタイン	黒毛和種	286	280	-	-
全体		286	279	40.4	31.0

なければ確実な双子生産につながらないことが指摘された。

双子生産の方法として、受精卵を人為的に2つに切断分離して移植し、一卵性双子を得る試みも行ったが、受胎率は41.9%、双子分娩率も22.7%と低く、特別な利用目的以外は実用的ではないと考えられた。

双胎妊娠の維持や双子分娩に備えるためには双胎妊娠診断が不可欠である。しかしながら、従来の直腸検査による妊娠診断では双胎妊娠診断は不可能であった。そこで近年開発された超音波断層診断装置による双胎妊娠診断(図3)を試みたところ、妊娠40~100日目ではほぼ診断可能であることが明らかになった。さらに妊娠150日目以降の双胎妊娠診断については、胎子心電図による診断が可能であることを確認した。

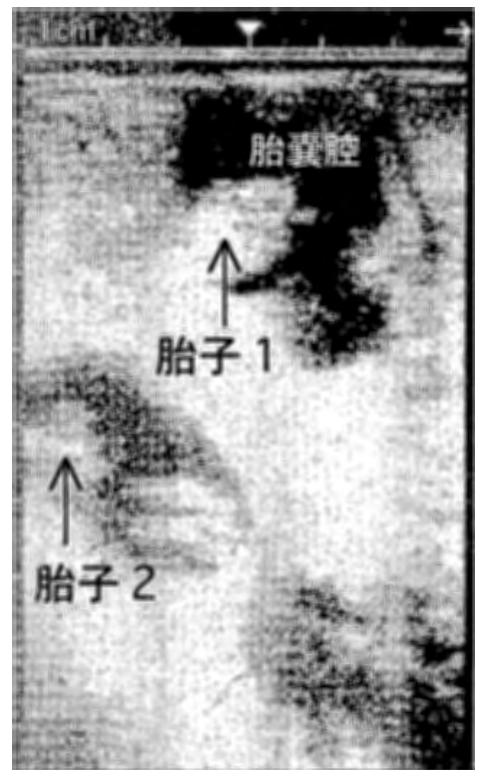


図3 超音波断層診断装置による双子胎子の画像(妊娠44日目)

### 3. 体外受精技術の確立

廃棄される牛の卵巣内にある未成熟卵子を利用する体外受精技術は、生体を必要とせず、安価に受精卵を生産することができる。また、屠殺される雌牛の遺伝資源を有効に活用することができる。我々は早くからこの技術に取り組み、1988年5月に体外受精卵移植による初産子を得た。当初の体外受精卵の発生成績および移植成績を表8および表9に示した。発生率は6%と低かったが移植成績は例数が少ないながらも良好であった。

精子の受精能獲得誘起および先体反応誘起にはカフェインを含むBO液にカルシウムイオノフォアまたはヘパリンを添加した受精培地が広く使用されているが、カルシウムイオノフォアおよびヘパリンを単独または組み合わせて試験した結果、ヘパリンを単独使用した場合に前核形成率が最も高いことが示された(図4)。また安定して高率に体外受精卵を生産するために、体細胞との共培養によらない発生培養法を検討した結果、独自に修正したTALP液に3%子牛血清を添加した培地を用い、39℃、5%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub>、90%N<sub>2</sub>の気相条件で培養することにより、40%以上の高率で胚盤胞の得られることが示された(図5)。この方法により、1頭分の卵巣から平均3-5個の胚盤胞が得られるようになった。

高能力の牛が事故や病気で死亡した場合、直ちに卵巣を摘出して体外受精に供すれば、その個体の受精卵を作成することができる。農家の依頼により、骨折牛

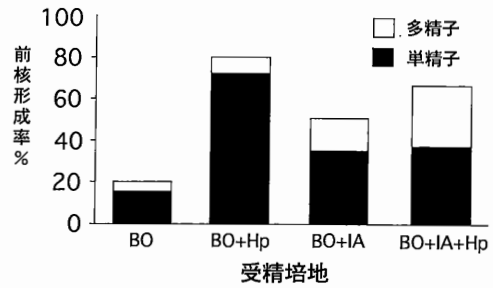


図4 ヘパリンおよびイオノフォアが前核形成に及ぼす影響  
Hp:ヘパリン IA:カルシウムイオノフォア

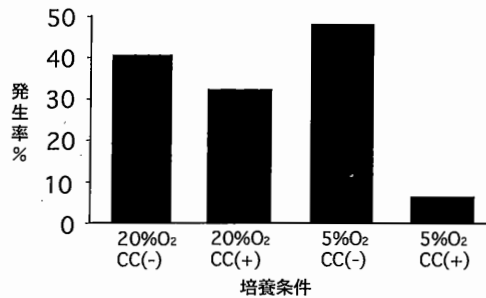


図5 酸素濃度および卵丘細胞の有無が体外受精胚の発生に及ぼす影響  
CC(-):卵丘細胞無し  
CC(+):卵丘細胞有り

表8 体外受精卵の発生成績

供試卵数	分割卵数 (%)	胚盤胞期胚数 (%)
1,328	536 (40.4)	80 (6.0)

表9 牛体外受精卵の移植成績

移植頭数	受胎頭数 (%)	産子数	備考
3	2 (66.7)	2	♂(55kg), ♀(50kg, 死産)

やリピートブリーダーなどで廃用になった牛の体外受精卵を作成し、移植による子牛の生産例を得ている(表10)。

### 4. PCR法による牛受精卵の性別判別と新プライマーの開発

受精卵の性別を判定するには従来染色体検査法が行われていたが、標本作製率の低さから普及するには至らなかった。我々はこれに替わる方法として、目的とするDNA断片を大量に増幅できるPCR法に着目し、受精卵の一部(10-20細胞)をサンプルとして雄に特異的なDNAを増幅・検出することにより、受精卵

表10 個体別体外受精卵の生産移植成績

供卵牛	処分理由	採取卵子数	胚盤胞数	移植頭数	受胎頭数 (%)	産子
1	骨折	26 (3)	3	3	2	♂♀
2	関節炎による起立不能	45 (8)	1	1	0	
3	繁殖障害	16 (4)	3	3	0	
4	リピートブリーダー	14 (2)	1	1	1	(妊娠中)
5	リピートブリーダー	18 (2)	2	2	1	(妊娠中)
計		119 (19)	10	10	4 (40.0)	♂♀

の性別別ができることを確認した。しかしながら、コンタミネーションによる誤判別がわずかながらみられ、清浄な環境で作業することの重要性が指摘された。また、細胞のサンプリング時に受精卵を傷つけることが受精卵の耐凍性低下を招くことが明らかにされ(表11)、今後の問題点として残されている。

性別別用のプライマーには特許権を有するものもあり、実用的な利用には制限がある。そこで牛のY染色体に特異的なDNAを新たに探索・解析し、それを基に独自のプライマーを設計することができた。また、このプライマーを用いれば雄特異的なバンドの他に雌雄共通のバンドも得られ、サンプリングミスのチェックと雌雄判別が同時に行えるという利点のあることがわかった(図6)。

### 5. クローン牛の作出に関する研究

遺伝的に同一な牛を多数生産することにより、家畜改良の効率化を図ることができる。初期の受精卵の各割球は個体に発生する全能性を有し、かつ遺伝的に同一である。一つの受精卵の割球から作成される胚のグループはクローン胚と呼ばれ、それらの移植により得られる産子のグループがクローン牛である。クローン胚は核供与細胞と未受精卵子の電気的細胞融合によって作成するが、核供与細胞と未受精卵子の細胞周期の同期化および活性化、電気刺激の条件、発生培養条件などがその作成率を左右する。これらのうち活性化法について、従来の電気刺激のみによる活性化法にカルシウムイオノフォアおよびシクロヘキシミドを併用する複合活性化法を導入したところ、胚盤胞への発生率は2.5%から34.2%に向上した(表12)。また、低率ではあるが凍結融解した核供与胚からも胚盤胞が得られた。

なお今までに作成したクローン胚の最大数は17個である。また、一組のクローン胚の移植により、2頭のクローン牛を生産し(図7)、現在3頭のクローン牛の受胎が確認されている。

受精卵移植技術は、国や地方公共団体が行う牛の改良システムに積極的に取り入れられるようになってき

表11 性別別卵移植成績

卵区分	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
新鮮	13	6	46.1
凍結	43	12	27.9

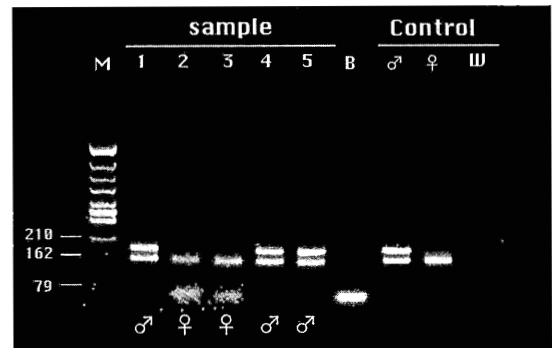


図6 独自プライマーによる性別別(電気泳動像)  
M: サイズマーカー B: 洗浄バッファー  
W: 蒸留水

た。北海道でも風土に適した優秀な黒毛和種の種雄牛の作出や乳牛改良の核となる雌牛群の造成に受精卵移植が利用されている。今後はこのような牛の改良システムに、性別別とクローン牛作出技術が組み込まれ、



図7 クローン子牛  
(品種: ヘレフォード×アンガス)

表12 複合活性化導入によるクローン胚発生成績

活性化法	供試卵数	供試卵子数	融合卵数 (%)	分割卵数 (%)	胚盤胞数 (%)	1卵当りクローン数
電気刺激のみ	13	324	262 (80.9)	139 (53.1)	8 (2.5)	0.6
複合活性化	27	676	565 (83.6)	535 (94.7)	193 (34.2)	7.1
凍結核供与卵	18	350	253 (72.3)	217 (85.8)	26 (10.3)	1.4

より一層効率的な牛の改良増殖が実現できるよう研究  
推進していきたい。

最後に、今回の北海道畜産学会賞を受賞するに当  
り、ご推薦頂きました北海道大学金川弘司教授、研究

の推進とご指導を頂きました新得畜産試験場元場長小  
崎正勝氏、田辺安一氏、平山秀介氏、前場長岸昊司氏、  
現場長清水良彦氏始め試験の実施にご協力頂いた新得  
畜産試験場職員各位に深く感謝申し上げます。