

経膈採卵・性判別技術を用いたホルスタイン種雌牛生産の実証

日高 健雅¹⁾ 尾形 康弘²⁾ 今井 佳積¹⁾
松重 忠美³⁾ 吉上 渉¹⁾
(受付：平成 23 年 12 月 20 日)

Validation of production of female Holsteins using transvaginal egg collection and sex discrimination technologies

TAKEMASA HIDAKA¹⁾, YASUHIRO OGATA²⁾, KAZUMI IMAI¹⁾, TADAMI MATSUSHIGE³⁾ and WATARU YOSHIGAMI¹⁾

- 1) Hiroshima Prefectural Technology Research Institute Livestock Technology Research Center, 584, Nanatuka-cho, Shobara, Hiroshima 727-0023
- 2) Hiroshima Prefectural Technology Research Institute, 10-52, Motomachi, Naka-ku, Hiroshima-shi, Hiroshima 730-8511
- 3) Northern stock raising office, 1-4-1, Higashihonmachi, Syobara-shi 727-0011

SUMMARY

To collect sample cells for sex discrimination of bovine embryos, we developed a simple sample cell collection method using enzyme treatment (cell detachment method) and established an efficient female embryo production system consisting of serial procedures from egg collection to implantation.

Two or more female embryos could be produced by a single vaginal egg collection in the center and on dairy farms, and 0.9 cows could be fertilized per cow from which eggs were collected on dairy farms.

The amount of milk secretion decreased by 0.80 L in the afternoon of the day of transvaginal egg collection and by 0.51 L in the morning on the day after egg collection, with a mean total decrease in milk secretion of 1.31 L (maximum: 1.83 L).

All cows after egg collection could be fertilized by artificial insemination, and no prolongation of the period until the next conception was observed.

Since 0.9 cows could be obtained by a single egg collection, and since no marked effect of transvaginal egg collection on the amount of milk secretion or fertility was observed, this system is expected to contribute to the efficient production of female embryos.

1) 広島県立総合技術研究所 畜産技術センター (〒 727-0023 広島県庄原市七塚町 584)
2) 広島県立総合技術研究所 (〒 730-8511 広島県広島市中区基町 10-52)
3) 北部畜産事務所 (〒 727-0011 庄原市東本町一丁目 4-1)

要 約

ウシ胚の性別用のサンプル細胞採取方法として、酵素処理によりサンプル細胞を採取する簡易な採取方法（細胞剥離法）を開発し、採卵から移植までの効率的な一連の雌胚生産システムを構築した。

センター内及び酪農家での採卵成績は、1回の経膈採卵で2個以上の雌胚を生産し、酪農家において採卵牛1頭当たり0.9頭の雌牛の受胎を確保できた。

経膈採卵においては、採卵日の午後0.80ℓ、採卵翌日の午前0.51ℓの泌乳量の減少が認められ、平均1.31ℓ（最大1.83ℓ）泌乳量の減少を認めた。また、採卵後の雌牛は人工授精により全頭が受胎し、空胎日数の延長もなかった。

1回の採卵で0.9頭の雌牛が確保できたこと、経膈採卵による泌乳量や繁殖性への影響は少ないことから、本システムによる効率的な雌胚生産の普及が可能と考えられた。

（本文項11, 表5）

序 文

妊娠期間が長く単胎動物であるウシにおいて、生まれてくる子牛の性が畜産経営に与える影響は少なくない。特に酪農家では搾乳用の雌牛を継続かつ安定的に確保するために多額の外部導入費用が必要となることから、自農場で確実に雌牛を確保できる技術開発が求められている。

そこで、我々は性別別胚の実用化を図ることを目的として、新しい性別用細胞の採取法を開発し、採卵から移植までの一連の雌胚生産システムを構築した¹⁾。

現在最も普及している受精胚からの性別用サンプル細胞採取法は、体内受精7日目の栄養膜細胞の一部を金属製ブレードで物理的に切断するもの^{2,3)}で、都道府県の公設試験場でも性別別に用いられている。このブレード切断法による性別用サンプル細胞の採取は、マイクロマニピュレータ等の高価な機器や熟練した技術が必要とすることや、金属製ブレードでの切断による細胞損傷によって性別別胚の受胎性と保存性を低下させてしまうなど大きな問題があった。

しかし、本雌胚生産システムの構築により、細胞損傷が少なく、少数のサンプル細胞の採取が可能となり、胚盤胞期胚の品質及び受胎性の改善が可能となった。

今回は、本システムを当センター及び酪農家において実証試験を実施したので、その概要を報告する。

材料と方法

1. 体外受精胚の作出

供試牛は、当センターの分娩後40～80日の経産牛延べ51頭を用い、2～6回/頭採卵に供した。さらに酪農家4戸の分娩後日数は様々なホルスタイン種

経産牛を延べ16頭を用いた。

経膈採卵は、超音波画像診断装置（アロカ社SSD-1200）に経膈穿刺用コンベックス探触子（アロカ社UHT-9106-7.5）を装着し、ディスプレイ採卵針（ミサワ医科工業株式会社）及び卵子吸引システム（クック社K-MAR-5115）を用いて行った。

回収液は3%ウシ胎児血清（FCS）及び1.8ユニット/mlのヘパリンを添加した乳酸加リンゲル液を用い、吸引圧100mmHgの条件で卵胞液と共に卵胞内卵子を吸引採取した。

それぞれの吸引液から卵丘卵子複合体のみを10%牛胎児血清添加リン酸緩衝液に移し、3回以上洗浄した後、発生用培地TCM-199+5%FCSに移し、22～24時間成熟培養を行った。

体外受精は、当センターの常法⁴⁾に従い、凍結精液を用いて精子濃度を6～12×10⁶/mlに調整し、媒精を6時間行った。媒精後72時間目までmSOF培地+3mg/ml牛血清アルブミン（Sigma A-4378）+0.25mg/mlリノール酸アルブミン（Sigma L8384）で38.5℃、5%CO₂、5%O₂、90%N₂の低酸素条件下で培養し、それ以降は、mSOF培地+10%FCS+10μg/mlインスリン（Sigma I-6634）でVero細胞との共培養を38.5℃、5%CO₂、95%airの気相条件下で行った。

2. 性別用サンプル細胞の採取

性別用サンプル細胞の採取について、栄養膜細胞のブレード切断は体外受精後7日目の胚盤胞期胚を用いた。

顕微操作は、位相差倒立顕微鏡（Nikon Diaphoto 300）と顕微操作システム（Leitz）に金属製ブレード（Micro Feather BLADE K-730）をセットし、栄養膜細胞の1/3程度を切断採取した。

胚の切断は、0.1M サッカロース+20%FCS添加M2液内で行った。

サンプル細胞として採取した切断胚は、20% FCS 添加 M2 液で 6 回洗浄した後、20% FCS 添加 mSOF 培地で Vero 細胞と共培養を 2~3 時間行った。

細胞剥離法は、体外受精後 5 日目の桑実期胚を用いた。

桑実期胚を 0.25% アクチナーゼ E (科研製薬) に 60 秒ほど静置し、透明帯を溶解した後、20% FCS 添加 M2 液で酵素の作用を停止させた。

透明帯を除去した胚を 0.125% トリプシン (GIBCO 27250-042) + EDTA · 4 Na (Sigma E4DS) 添加 PBS⁻ に入れ、市販のガラス製毛細管 (Drummond 057910) をガスバーナーで細く伸ばして加工したピペットで数回ピペッティングすることで胚表層の細胞を剥離させ、数個の細胞が剥離したところで、20% FCS 添加 M2 液で酵素の作用を停止させた。

細胞を剥離した胚は、20% FCS 添加 mSOF 培地で Vero 細胞との共培養を 48 時間行った。

3. 性判別法

性判別は、ブレード切断及び細胞剥離により採取したサンプル細胞共に 20% FCS 添加 M2 液で 6 回洗浄後、1 mg/ml PVA 添加 PBS⁻ 液で更に 6 回洗浄し、Loopamp 牛胚性判別試薬キット (栄研化学) で性判定を行った。

性判別用サンプル細胞及びサンプリング後の胚の細胞数は、蛍光色素 Hoechst33342 で細胞核を染色し、蛍光顕微鏡下で細胞数をカウントした。

4. 受精胚の凍結・融解

受精胚を 10% エチレングリコール, 1.0M シュークロース, 20% FCS を添加した TCM199 培地中で 2 分間平衡した後、30% エチレングリコール, 20% FCS を添加した M2 培地で 60 秒以内に 3 回以上洗浄した後、ピペットを用いて 5 μl 前後のドロップとして液体窒素上に滴下した。ドロップは 10 秒程度液体窒素上を浮遊した後、液体窒素内に沈下した。

融解は、37℃加温の 0.3M シュークロース, 20% FCS を添加した M2 培地にドロップを直接投入して、2 分間保持し、その後 20% FCS を添加した TCM199 培地にて洗浄した。

5. 受精胚移植

胚移植は、新鮮胚を発情後 7 日目のホルスタイン種未経産牛の黄体側子宮角内に頸管経由で行った。

妊娠診断は、妊娠 30 日目 (移植後 23 日目) 前後に超音波画像診断装置を用いて行い、胎仔心拍の確認をもって妊娠と判定した。

6. 調査項目

1) 雌胚の生産成績及び移植成績

雌胚の生産率, 受胎率を調査した。

2) 採卵後の泌乳成績調査

泌乳成績調査では、当センター飼養牛において採卵前日, 当日, 翌日の経膈採卵した牛の泌乳量を調査した。

3) 採卵後の繁殖性調査

採卵後の繁殖性調査では、当センター飼養牛において経膈採卵後に PG を投与して発情誘起し、採卵後の発情回帰日数, 人工授精の受胎率を調査した。

成 績

1. 雌胚の生産成績及び移植成績

1) 当センターの牛における成績

雌胚生産成績は、性判別済みの胚盤胞期胚の生産個数は 2.1 個/頭であった。(表 1)

表 1 乳用牛からの性判別済み胚生産成績

供試頭数	供試卵数	胚盤胞期胚	性判別胚	性判別後胚盤胞期
51	712	241	140	107
平均±S.D.	14±9.3	4.7±3.5	2.7±2.4	2.1±2.4

ブレード切断法及び細胞剥離法で作出した新鮮な性判別済み胚盤胞期胚を受胎牛に移植した結果、ブレード切断法の 50.0% に対し細胞剥離法 66.7% と同等な受胎性が得られた。

細胞剥離法により生産した性判別胚のガラス化凍結・融解後の移植受胎率は 50.0% であり、ブレード切断法の 30.0% より高い傾向が認められた (表 2)。

表 2 乳用種の性判別済み体外受精胚の移植成績

試験区	移植頭数	受胎頭数	受胎率	
ブレード切断	新鮮	10	5	50.0
	ガラス化	10	3	30.0
細胞剥離	新鮮	33	22	66.7
	ガラス化	18	9	50.0

2) 酪農家の牛における成績

雌胚生産成績は、性判別済みの胚盤胞期胚の生産個数は 3.0 個/頭であった。

細胞剥離法で作出した新鮮な性判別済み胚盤胞期胚を受胎牛に移植した結果、受胎率 50.0% と良好な受胎性が得られた (表 3)。

表 3 農家別雌胚生産成績及び移植成績

	採卵頭数	性判別	雌胚	移植	受胎
A	4	23	14	9	6
	平均±S.D.	5.8±2.6	3.5±1.7	2.3±1.5	1.5±1.0
B	9	55	24	14	6
	平均±S.D.	6.1±2.7	2.7±1.3	1.6±1.2	0.7±1.0
C	1	2	2	2	0
D	2	11	8	3	2
	平均±S.D.	5.5±2.1	4.0±1.4	1.5±2.1	1.0±1.4
計	16	91	48	28	14
	平均±S.D.	5.7±2.5	3.0±1.4	1.8±1.3	0.9±1.0

2. 採卵後の泌乳成績調査

泌乳量の減少は、採卵日の午後及び採卵翌日の午前にそれぞれ 0.80 l, 0.51 l の減少が認められ、平均 1.31 l (最大 1.83 l) の乳量が減少した。しかし、採卵翌日の午後には乳量は回復し、採卵による泌乳量への影響は小さいと推察された (表4)。

表4 経膈採卵が泌乳量に与える影響

	朝	夕
	平均乳量±S.D.	平均乳量±S.D.
採卵前日	20.09 ^a ±4.39	12.25 ^a ±2.60
採卵日	20.25 ^a ±4.48	11.45 ^b ±2.74
採卵翌日	19.74 ^b ±4.40	12.50 ^a ±2.93

※異符号間で有意差あり (p<0.05)

3. 採卵後の繁殖性調査

経膈採卵後に人工授精し、全頭 (16 頭) が受胎した。最終経膈採卵から人工授精までの間隔は 8.5 日であり、分娩後日数は 85.1 日だった。

経膈採卵後に人工授精で受胎した場合の空胎日数は 96.1±23.5 日であり、未採卵牛の人工授精で受胎した場合の分娩後日数 126.2±110.6 日と有意な差はなかった (表5)。

表5 分娩後の経膈採卵回数と採卵後の人工授精成績

個体	最終採卵日の 分娩後日数	経膈回数	初回 AI 日	AI 回数	最終 AI 日
A	79	6	86	1	86
B	76	5	84	1	84
C	77	6	84	1	84
D	79	6	84	1	84
E	78	4	87	1	87
F	75	4	84	1	84
G	77	6	87	2	124
H	78	2	85	2	129
I	79	5	94	2	113
J	79	4	88	1	88
K	76	2	85	4	162
L	76	3	84	1	84
M	70	3	79	1	79
N	73	5	80	1	80
O	76	5	85	1	85
P	77	5	85	1	85
平均±S.D.	76.6±2.4	4.4±1.4	85.1±3.3	1.4±0.8	96.1±23.5
通常の AI				1.7	126.2±110.

平均±S.D.

考 察

これまで性判別法として、染色体分析⁵⁾、パーコール密度勾配法⁶⁾による精子分離、H-Y 抗原の利用⁷⁾や胚の発育スピードによる選別⁸⁾など様々な角度から研究が行われてきている。しかし、生産効率の低さや性判定精度が低いことから、生産現場において安定

的に雌牛を生産する技術の構築には、課題が残されている。

また、現場においては優良雌子牛を効率的に生産し、高能力ホルスタイン種による牛群整備のための取組として、泌乳中のホルスタイン種から体内受精胚を採取が実施されているが、確実な後継牛生産方法として広く普及するには至っていない⁹⁾。

性判別胚による安定的な雌牛後継牛生産を普及するためには、少なくとも1回の採卵・性判別で1頭以上の雌牛を生産することが必要と考えられ、そのためには1回の採卵・性判別で2個以上の雌胚を生産すること、さらにその雌胚が50%以上の受胎率が得られることが重要である。

今回、経膈採卵・性判別技術を用いたホルスタイン種雌牛生産システムによる雌胚の生産成績は、センター内において平均2.1個/頭、また、酪農家においても3.0個/頭と1回の採卵・性判別により2個以上の雌胚を生産できた。さらに、受胎率はセンター内及び酪農家において50%以上であった。

このことから、1回の採卵・性判別で1頭以上の雌牛が受胎することが可能となり、雌牛生産における本システムの有効性が示された。

一方で、泌乳中のホルスタイン種から卵子を採取し雌胚を生産するには、経膈採卵が泌乳量へ及ぼす影響を把握しておく必要がある。

泌乳中のホルスタイン種からの体内受精胚生産では、ホルモン処置により泌乳量が減少するという調査報告がある⁹⁾。一方で、秋山らは¹⁰⁾経膈採卵による泌乳量調査では、採卵による泌乳量への影響はないと報告している。

今回の泌乳量調査では、採卵日の午後及び採卵翌日の午前まで泌乳量への影響が残り、1.3 l の泌乳量の減少が認められたが、採卵翌日の午後からは泌乳量は通常に回復していた。このことは秋山らの報告と類似しており、経膈採卵が泌乳量へ及ぼす影響は小さいと考えられた。

この経膈採卵による卵子の採取は、卵巣に直接針を穿刺することや、直腸を介して卵巣を操作することから、畜主が採卵後の卵巣機能などの繁殖性へ悪影響がある可能性を危惧し、受精胚生産を敬遠する場合がある。

今回の調査では、経膈採卵した全頭において、発情の誘起、排卵、人工授精後の通常な受胎が確認された。また妊娠までの空胎日数も、未採卵牛と有意な差は認められなかった。

このことから、卵巣、卵管采、卵管等へ物理的障害を与えることはなく、経膈採卵が繁殖性へ及ぼす影響はないと考えられた。

以上のことから、本システムによる雌牛生産の普及は可能と考えられた。

文 献

- 1) 尾形康弘ら：ウシ胚からの性判別用細胞採取胞の開発, 広島県獣医学雑誌, 22, 16-19 (2007)
- 2) Itagaki, Y., et al: Sexing of bovine embryos with male-specific repetitive DNA by polymerase chain reaction, *Journal of Reproduction and Development*, 39 (1), 65-72 (1993)
- 3) Machaty. Z., et al. Biopsy and sex determination by PCR of IVF bovine embryos, *J Reprod Fertil*, 98, 467-470 (1993)
- 4) 岩水 正ら：ウシ体外受精胚の凍結保存, 広島県獣医学雑誌, 13, 59-62 (1998)
- 5) 沼辺 孝ら：牛胚の性染色体分析法および PCR 法による性判別, *日本胚移植学雑誌*, 17, 183-189 (1995)
- 6) 兼子 智, 押尾 茂：細胞工学, 秀潤社, 13 (7), 605-611 (1984)
- 7) Utumi, K., et al: Embryo sex selection by a rat male-specific antibody and the cytogenetic and developmental confirmation in cattle embryos, *Mol. Reprod Dev.*, 34, 25-32 (1993)
- 8) Avery, B., and Schmidt, M.: Differential cleavage rates and sex determination in bovine embryos, *Theriogenology*, 32 (1), 139-147 (1989)
- 9) 元永利正ら：ホルスタイン種雌牛の搾乳中に採卵を取り入れた牛群整備の検討, *山口県畜産試験場報告*, 16, 115-120 (2000)
- 10) 秋山 清ら：生体内卵胞卵子を用いた胚生産技術の開発, *神奈川県畜産技術センター平成 20 年度試験研究成績書* (2008)

