

2.7 経膈採卵を用いた”一卵性多子生産技術”の検討とその応用可能性

農林総合研究所畜産試験場 ○錫木淳 瀬尾哲則※
 (※現所属：公益財団法人鳥取県畜産振興協会)

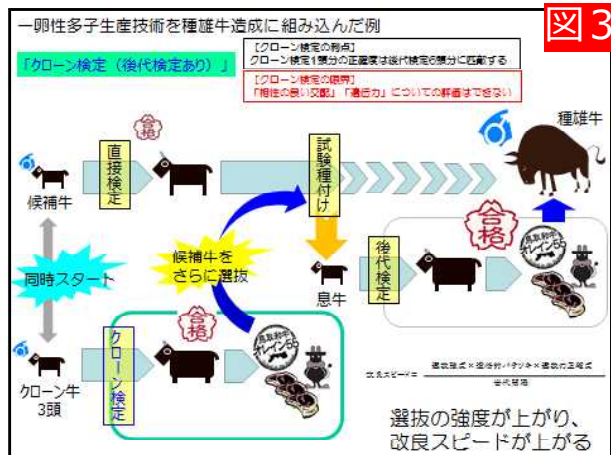
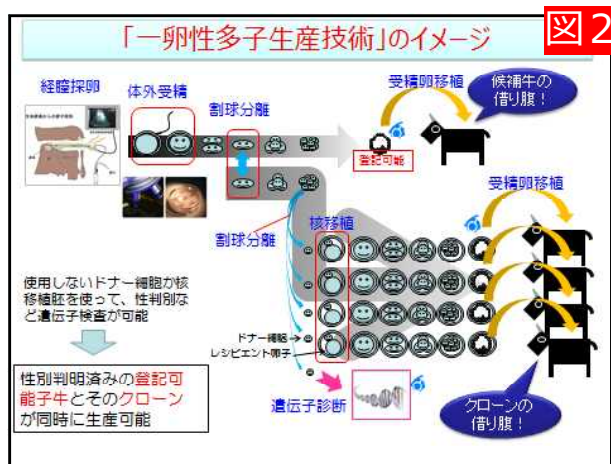
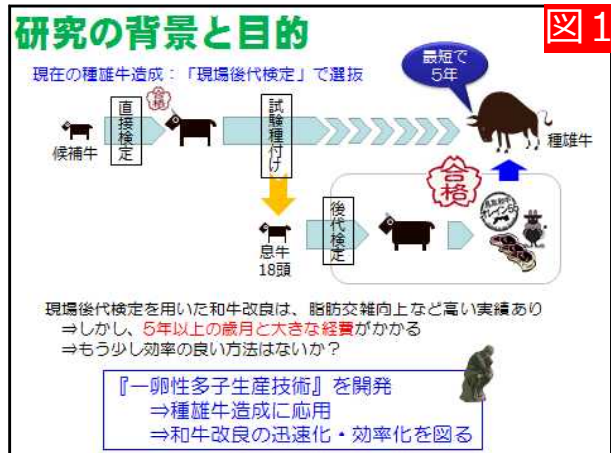
1 背景と目的

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5年以上の歳月と多くの経費が必要である(図1)。そこで、種雄牛造成の効率化を目的として、複数の受精卵技術(経膈採卵、体外受精、割球分離、核移植)を組み合わせた”一卵性多子生産技術”の応用可能性について検討した。

一卵性多子生産技術は、具体的には経膈採卵-体外受精-割球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して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(図2)。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用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、種雄牛候補と同時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を選抜することができ、後代検定までの選抜強度が上がることによる改良スピードの増加が期待できる。また、クローン検定の実績が蓄積されて信頼度が高まれば、後代検定頭数の削減あるいは後代検定自体の廃止という方針も可能であり、前者では検定頭数削減によるコストダウン、後者の場合は頭数削減効果に加えて種雄牛選抜までの期間が3年半まで短



縮でき、世代間隔短縮による改良スピードの増加という追加効果も期待できる（図3）。

今回、一卵性多子生産の技術検討と生産効率の評価を行ったので概要を報告する。

2 材料と方法

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図に記載の方法により行った（図4）。経膈採卵は黒毛和種経産牛から卵子を採取し（以下「経膈採卵由来卵子」）、体外受精に供した。それ以外の体外受精あるいは核移植（レシピエント）のため、と畜牛（黒毛和種、F1、ホルスタイン種の混合）から採取した卵子を用いた（以下「と畜牛由来卵子」）。

取り組み内容としては、①経膈採卵技術の向上、②体外受精-割球分離胚の生産技術の向上、③核移植胚の生産技術の向上、さらに全てを組み合わせた④一卵性多子生産技術の応用可能性の検討を行った。

①経膈採卵について、回収卵子数および利用可能卵子数の確認した。②体外受精-割球分離について、と畜牛由来卵子を用いて無処理胚（割球分離なし）と割球分離胚それぞれで最適な培養液の検討を行い、胚盤胞（BL）発生率により評価を行った。さらに、と畜牛由来卵子で優れていた培養液を経膈採卵由来卵子に適用し、BL発生率を確認した。培養液として、「5%子牛血清添加HP-SOF」（以下「SOF」）、「IVD101」（以下「IVD」）および「5%牛血清添加KSOMaa」（以下「KSOM」）の3種類を用いた。③核移植について、経膈採卵由来卵子を体外受精後培養し桑実胚に達した胚を割球分離しドナー細胞とするが、割球分離前にガラス化凍結したもの、新鮮なままのものというドナー細胞の処理条件の比較を行った。また、レシピエント卵子はと畜牛由来卵子を用いたが、と畜当日に卵巣から吸引採取したもの、翌日まで保存後吸引採取したものについて比較を行った。さらに、核移植胚の発生培地について、「5%子牛血清添加CR1aa」（以下「CR1」）および「KSOM」で比較した。これらもBL発生率により評価した。

④技術の組合せによる一卵性多子生産技術（経膈採卵-体外受精-割球分離-核移植）について、5回の試行を行い、核移植胚のBL発生率および生産胚の移植成績による生産効率の評価を行った（図5）。

有意差検定はカイ二乗検定により行った。

材料と方法 図4

経膈採卵 (Ovar Pick Up: OPU)
黒毛和種経産牛から屠体検視後麻酔下で吸引圧100mmHgで卵巣から卵子を吸引

卵子の体外成熟培養 (In Vitro Maturation: IVM)
FSH添加10%子牛血清添加TCM199培地 (Gibco) を用いて5%CO₂、38.5°Cで22時間培養
※卵子はOPU由来のほか、と畜牛卵巣由来のものも利用

体外受精 (In Vitro Fertilization: IVF)
卵凍融IVF100 (縦断性ベクトル研究所) を用いて5%CO₂、38.5°Cで5時間培養

体外培養 (In Vitro Culture: IVC)
i) 5%子牛血清添加KSOMaa培地 (Zenith Biotech) を用いて、5%CO₂、38.5°Cで24時間。
ii) その後、5%CO₂、5%CO₂、38.5°Cで7日間培養

割球分離 (Blastomere Separation: BS)
i) IVC24時間後の初期胚(2-4細胞期)を0.5%アクチナーゼにより透明帯除去
ii) ガラスベレットにより機械的に2分離し、IVCを継続

核移植 (Nuclear Transfer: NT) (独) 農研機構 畜産学地研究所の方法に準じた
i) IVM後の卵子を除核
ii) 除核卵子をCaイオンフォア及びシクロヘキシミドにより活性化(レシピエント卵子)
iii) 初期胚(IVF後5日目)の単細胞をドナー細胞としてレシピエント卵子の透明帯内に注入
iv) 融合液 (Zimmerman's Fusion medium) 中で電気刺激により融合融合
v) 融合後、再構築胚として5%CO₂、5%CO₂、38.5°CでIVC(8日間)

取り組み内容 図5

※BL発生率、胚数

①経膈採卵技術の向上
回収卵子数、利用可能卵子数の確認

②体外受精-割球分離胚の生産技術の向上
最適条件を検討 (BL発生率※により評価)
と畜牛由来卵子を用いてまず検討 ⇒ 経膈採卵由来卵子で確認
I. 無処理胚を用いた培地の検討: HP-SOF、IVD101、KSOMaa
II. 割球分離胚 (BS胚) を用いた培地の検討: 同上 (3種類)

③核移植胚の生産技術の向上
最適条件を検討 (BL発生率※により評価)
I. ドナー細胞の検討: ガラス化凍結、新鮮、新鮮BS
II. レシピエント卵子の検討: と畜当日卵子採取、と畜当日卵子採取
III. 培地の検討: CR1aa、KSOMaa

④全ての技術の組み合わせ『一卵性多子』 試運転
(経膈採卵-体外受精-割球分離-核移植)

3 結果および考察

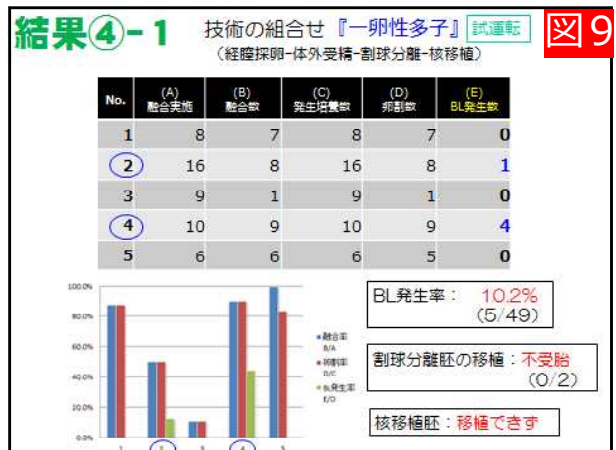
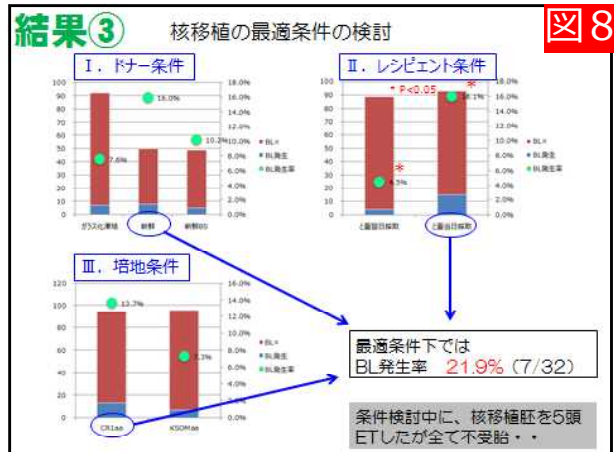
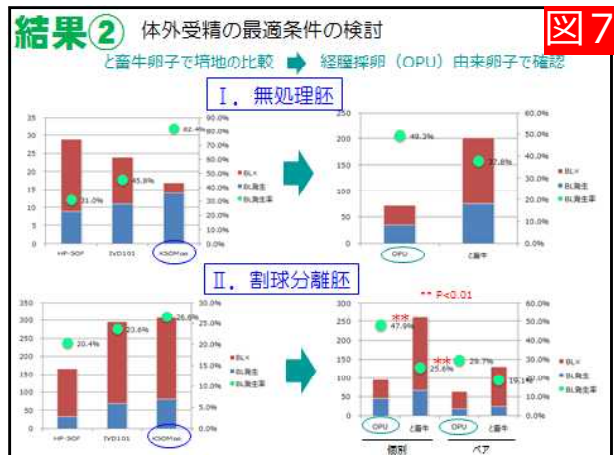
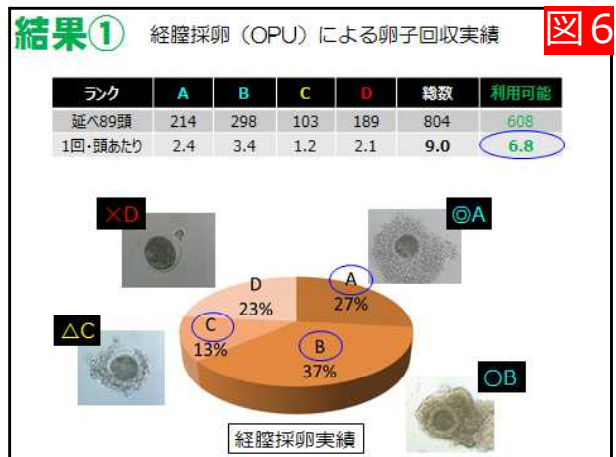
【①経膈採卵】1回・頭あたり9.0個の卵子を回収し、このうち利用可能なものは6.8個であった（図6）。

【②体外受精-割球分離】と畜牛由来では「KSOM」が無処理胚（BL発生率82.4%）と割球分離胚（同26.6%）の両方でBL発生率が他の2種類の培養液と比べて高い傾向を示し、経膈採卵由来ではこの培養液により無処理胚、割球分離胚それぞれ同49.3%、47.9%（ペアBL発生率29.7%）を得た。また、割球分離後の個別のBL発生率において、経膈採卵（OPU）由来卵子はと畜牛由来卵子よりも有意に高かった（ $P < 0.01$ ）（図7）。

【③核移植】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でBL発生率が高く（ $P < 0.05$ ）、また、「新鮮」ドナーおよび「CR1」培養液の各条件でBL発生率が高い傾向にあり、この最適条件ではBL発生率21.9%であった。生産したCランク以上の核移植胚を5頭の受卵牛に移植したが、受胎は得られなかった（図8）。

【④一卵性多子生産】経膈採卵-体外受精-割球分離-核移植（一卵性多子生産技術）について、5回の試行を行い、BL発生率は10.2%であった。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（図9）。

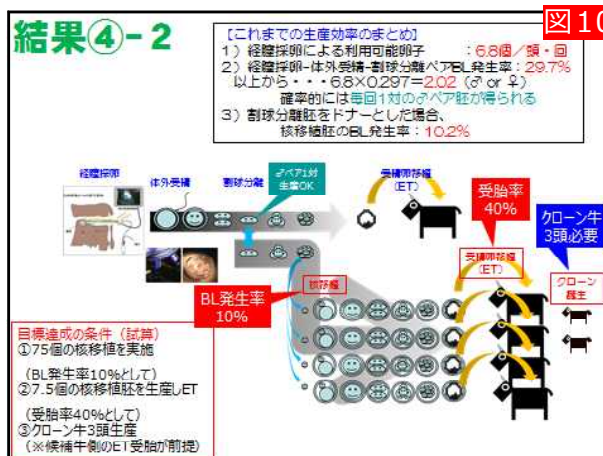
【まとめ】以上の成績をまとめると、①経膈採卵により1回・頭あたり体外受精へ利用可能卵子が6.8個得られ、②体外受精-割球分離により29.7%のペア胚が得られる。つまり、1回・頭の経膈採卵により2.0個（6.8個×0.297）のペア胚が得られることになる。一方、③核移植条件の検討により、「新鮮」ドナー、「と畜当日採取」したレシピエント卵子、および「CR1」培養液という最適条件によりBL発生率21.9%を得たが、④一卵性多子生産の試行により割球分離胚をドナー



とした場合のBL発生率は10.2%であった。

【生産効率の評価】経膈採卵-体外受精-割球分離により1回・頭の経膈採卵により2.0個のペア胚が得られ、雄の発生を50%とすると雄胚が1.0個生産できる。一方、割球分離胚をドナーとした核移植胚ではBL発生率が10.2%であり、(今回受胎例が得られなかったため)受胎率を仮に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。

枝肉形質の遺伝率は0.3以上であり、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頭以上となることから、最低でも75個の核移植胚が必要となる(図10)。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困難である。このことから、現在の実験条件では、一卵性多子生産技術の応用可能性は極めて低いと言わざるを得ない。



4 今後の展望

経膈採卵-体外受精-割球分離までの工程では、実用可能と言える29.7%のペア胚発生率が得られた。今後はこの技術を利用し、同一遺伝情報を持つ双子生産の実用化について検討し、和子牛生産頭数の増加を図る予定である。

5 謝辞

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。

謝辞

- 核移植技術についてご教授いただいた
(独) 農研機構畜産草地研究所 赤木悟史先生
現(独) 理化学研究所 水谷英二先生
- 経膈採卵・体外受精・割球分離技術についてご教授いただいた
(独) 家畜改良センター鳥取牧場 小西一之先生
武井直樹先生
渡邊真之先生
現(独) 家畜改良センター十勝牧場 稲葉泰志先生
- 一卵性多子技術についてご教授いただいた
広島県立総合技術研究所畜産技術センター 日高健雅先生

懇切なるご指導・ご助言をいただき、ありがとうございました

●と畜牛での卵巣採材にご協力いただき、ありがとうございました
(株) 鳥取県食肉センターの皆さま
鳥取県食肉衛生検査所の皆さま