

酪農生産基盤強化に向けた黒毛和種体外受精卵生産技術の確立 および乳牛の受胎環境改善方法の検討

久々宮 萌果・澤野 貴之¹⁾・倉原 貴美
大分県農林水産研究指導センター畜産研究部

要 約 雌選別精液の利用による計画的な後継牛確保対策が進められる中で、黒毛和種の胚移植を活用した子牛生産を取り入れることは、酪農家の所得向上につながる有効な手法と考えられる。本研究では、体外受精胚の耐凍性向上が期待される無血清培地への添加剤の利用と、受胎牛の受胎環境を改善する飼料添加剤の効果について検討した。無血清培地への L-carnitine (以下, Car) や Rifampicin (以下, Rif) 及び Forskolin (以下, For) を添加した効果について検討した結果、媒精 7 日目の細胞数、媒精 8 日目の胚盤胞発生率については、血清添加区と無血清への各添加区間に有意な差は認められなかった。凍結融解後の透明帯脱出率については、Car を添加した無血清区で有意に高い脱出率を示し、添加剤の使用による耐凍性の高い胚生産の可能性が示唆された。また、胚移植前後で飼料添加剤の給与試験を行い、受胎環境の改善の有無を検討したところ、B/G 比の低下効果が期待される飼料添加剤について、胚移植前後 25 日間の利用は、胚移植 15 日前の B/G 比が 0.3 以下である乳牛に対しては効果が認められないことが明らかとなった。受胎率向上を図るため飼料添加剤の利用を行う牧場は、B/G 比の事前調査を行う必要があると考えられた。

(キーワード: 体外受精胚, 耐凍性, 胚品質評価, 無血清培地, 飼料添加剤)

緒 言

近年、酪農業では後継牛確保対策として雌選別精液の利用が行われ、効率的な雌子牛の生産が実施されている。一方、余剰の経産牛へは、乳価の低迷及び生産コストの増加による対策として、黒毛和種精液による人工授精、若しくは黒毛和種の体内・体外受精胚による移植が取り組まれ、所得向上を図るための経営対策が行われている。体外受精胚については、体外培養条件が体内での胚の発生環境と異なることから、体内受精胚に比べて胚の品質が低下し、受胎率が低いという課題がある¹⁾。これらを解決するために、Takahashi らは Car を、森らは Rif 及び For を血清添加培地に添加することにより胚の耐凍性向上に成功している^{2,3)}。これは、Car には脂肪代謝を促進することによる細胞内脂肪を減少させる効果、Rif 及び For には P 糖タンパクを過剰発現させるこ

とによる代謝物排出機能を強化する効果があるためだと考えられている。

また、受胎牛については、その受胎環境を評価する指標として従来から各種血液検査項目が用いられている。中でも血糖 (Glu) 及び血液尿素態窒素 (BUN) は、繁殖性に影響を与える重要な項目であり⁴⁾、黒毛和種受胎牛において移植前発情日から 28 日後までに給与した非繊維性炭水化物/分解性摂取タンパク比の指標として BUN 及び BUN/Glu 比 (B/G 比) が有用であること⁵⁾やホルスタイン経産牛では Glu, BUN, B/G 比, 血中アンモニア濃度 (NH₃) が受胎牛としての適性の有無を判定する指標となること⁶⁾が報告されている。

今回、これらの報告を参考にして、血清添加培地に比較し耐凍性の高い胚生産が可能な無血清培地への Car または Rif 及び For の添加による、更な

1) 宇佐家畜保健衛生所

る耐凍性向上の検討を実施した。また、分娩後の乳牛の受胎環境改善を図るため、B/G比を低下させる添加剤の給与を行い、耐凍性向上試験によって得られた受精胚を用いた移植による受胎成績と血液性状について調査した。

材料および方法

1. 卵子回収

食肉処理場由来の黒毛和種の卵巣を 100 U/ml ペニシリン G カリウム (ペニシリン G ; Meiji Seika ファルマ, 東京), 100 µg/ml 硫酸ストレプトマイシン (ストレプトマイシン ; Meiji Seika ファルマ), 0.9% 塩化ナトリウム (関東化学, 東京) 添加超純水で洗浄後, 10 ml シリンジと 18 G 注射針を用いて卵丘細胞卵子複合体を含む卵胞内容物を吸引した。卵丘細胞卵子複合体の検索の際には, 100 U/ml ペニシリン G, 100 µg/ml ストレプトマイシン, 5%ウシ胎仔血清 (FCS ; Thermo Fisher Scientific, USA) 添加乳酸加リンゲル液 (ハルゼン V 注射液 ; 日本全薬工業, 福島) を使用した。

2. 成熟培養

成熟培養法は, Sakagami らによる方法⁷⁹⁾を用いた。すなわち, 0.02 AU/ml FSH (アントリン R10 ; 共立製薬, 東京), 1 µg/ml Estradiol-17β (SIGMA, 神奈川), 0.2 mM ピルビン酸 (SIGMA), 100 U/ml ペニシリン G, 100 µg/ml ストレプトマイシン, 5%FCS 添加 TCM-199 (Thermo Fisher Scientific) を成熟培養液とし, ドロップを作成して流動パラフィン (ナカライテスク, 京都) でカバーし, 38.5 °C 20 ~ 22 時間, 5%CO₂ in air, 湿潤の条件下で培養した。ドロップの液量は 1 胚あたり 5 µl, 5 胚以下の場合には 20 µl とした。

3. 媒精

黒毛和種「隆誉」の精液を 38°C で融解後, IVF100 (機能性ペプチド研究所, 山形) で 2 回遠心洗浄した (2,000rpm, 38°C)。精子濃度 1 x 10⁷/ml の 100 µl IVF100 のドロップ内に卵子 20 個を入れ, 38.5 °C 6 時間, 5%CO₂ in air, 湿潤の条件下で媒精した。

4. 発生培養

媒精終了後, ピペッティングにより透明帯周囲の

余分な卵丘細胞や精子を取り除き, 発生培養を行った。発生培養法は西野らによる方法⁷⁴⁾を用いて, 発生培養法として 4 つの試験区を設定した。血清添加区の発生培養液は mSOF (機能性ペプチド研究所) を基礎培地として 2%BME (SIGMA), 1%MEM (Thermo Fisher Scientific), 5%FCS を添加した。無血清区の発生培養液は mSOF を基礎培地として 2%BME, 1%MEM, 1 mg/ml Polyvinyl alcohol, 100 ng/ml EGF, 50 ng/ml IGF- I, 5 µg/ml トランスフェリン, 5 ng/ml セレンを加え, 発生培養開始後 6 日目に 4.0 mM Glu を添加した⁹⁾。また, 3, 4 区については, 無血清区と同じ発生培養液に 0.6 mg/ml Car (SIGMA) を添加した無血清+Car 区, 10 µM Rif (SIGMA) 及び 10 µM For (SIGMA) を添加した無血清+Rif+For 区とした (表 1)。各試験区ごとにドロップを作成して流動パラフィンでカバーし, 38.5 °C, 5%CO₂ 5%O₂ in air, 湿潤の条件下で培養した。ドロップの液量は 1 胚あたり 5 µl, 5 胚以下の場合には 20 µl とした。

表1 胚生産試験の試験区設定

試験区	発生培養方法
血清添加	血清添加培養
無血清	無血清培養
無血清+Car	無血清培養 + 0.6mg/ml Car
無血清+Rif+For	無血清培養 + 10uM Rif + 10uM For

注1) 血清添加培養: mSOFaa+5%FCS+2%BME+1%MEM

注2) 無血清培養: mSOFaa+2%BME+1%MEM+PVA+EGF+IGF- I +Tf+Se

注3) 無血清培養では、媒精6日後にGlu添加

5. 胚の二重染色

胚の二重染色は, de la Fuente らによる方法⁷⁾を用い, 発生培養 7 日目の胚盤胞及び拡張胚盤胞を使用した。Propidium Iodide (SIGMA), 0.2% Triton X-100 (ナカライテスク) を添加した PBS(-) (ナカライテスク) に胚を約 1 分間浸した後に, 25 µg/ml Hoechst33342 (SIGMA) 含有 99.5% エタノール (和光純薬, 大阪) に移し, 4 °C 遮光下にて 3 時間染色した。その後, glycerol (ナカライテスク) に浸して余分な染色液を除き, スライドガラスに移しカバーガラスを用いて押しつぶしを行い, 落射蛍光顕微鏡にて青色に染色された内細胞塊と赤色に染色された栄養膜細胞の観察を行った (図1)。

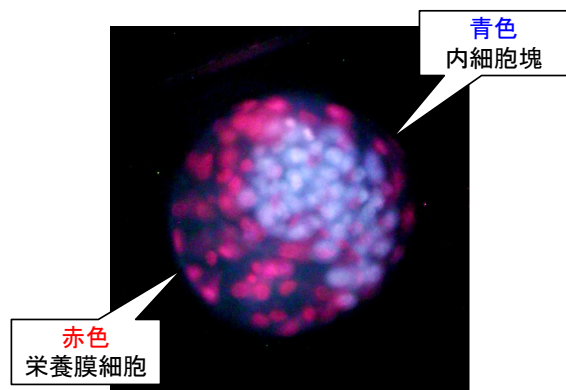


図 1 胚盤胞の二重染色

6. 胚の凍結

発生培養 7 または 8 日目に International Embryo Transfer Society (IETS, 国際胚移植学会) マニュアルの Code1 (正常な発育段階にあり, 輪郭明瞭, 正常ないしほぼ正常な形態を示し, 変性部位が 15% 以下) の拡張胚盤胞を凍結した. 10%グリセリン (SIGMA), 0.25 M スクロース (和光純薬), 20%FCS 含有修正 TCM-199 を凍結液として, 胚を 10%グリセリン, 20%FCS 含有修正 TCM-199 で 15 分間平衡後, 凍結液とともに 0.25 ml プラスチックストローに充填した. ストローの冷却は無水エタノールを冷媒としたプログラムフリーザー (ET-U5; 株式会社チノー, 東京) を用い, -6.0°C に設定したフリーザーにストローをセット, 60 秒後に植氷した. 植氷後, -6.0°C で 8 分間保持した後, 毎分 -0.33°C のスピードで -25.0°C まで冷却し 5 分保持後に液体窒素内に投入した.

7. 凍結胚の融解と培養

凍結胚は液体窒素から出し, 10 秒間大気中で保持した後に $30 \sim 35^{\circ}\text{C}$ の温湯に 15 秒入れ融解した. 融解後は 0.1 mM β -メルカプトエタノール (SIGMA), 100 U/ml ペニシリン G, 100 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン, 20%FCS 添加 TCM-199 を培養液として, 流動パラフィンでカバーし, 38.5°C , 5% CO_2 in air, 湿潤の条件下で 48 時間培養した. ドロップの液量は 1 胚あたり 50 μl とした.

8. 試験方法

(1) 試験 1

試験 1 では, 無血清培地へ Car または Rif を添加して生産した体外受精胚の品質を調査した. 各試験区において分割率, 媒精 8 日後の胚盤胞発生率, 媒精 7 日後の胚盤胞の細胞数を調査した. また, 緩慢凍結した拡張胚盤胞を融解後に培養し, 胚生存率及び透明帯脱出率を調査した. 移植試験では, 供試牛は県内酪農家 4 戸で飼養されている乳牛 108 頭を用いた. 108 頭の産歴は 3.1 ± 1.9 産であり, 未経産牛が 1 頭, 経産牛が 107 頭であった. また, 108 頭中 50 頭は発情同期化処理を行った. 発情同期化処理は, 発情周期の任意の時期にイージーブリード (CIDR, controlled intravaginal drug releasing device; InterAG, New Zealand) を膈内挿入, イトレリン (酢酸ブセレリン; あすか製薬, 東京) を筋肉内投与し, その 8 日後に CIDR 抜去しエストラメイト (クロプロステノール; インターベット, 東京) を筋肉内投与, 次の日にエストラジオール注「KS」(エストラジオール安息香酸エステル; 共立製薬) を筋肉内投与し, さらにその 9 日後に胚移植を行った. 供試胚は全試験区の IETS マニュアルの Code1 の新鮮胚または凍結胚として, 2 人の移植師が移植器モ 4 号 (ミサワ医科工業, 茨城) を用いて受胎牛の黄体側子宮角に胚移植を行った. 胚移植実施から 40 日以上経過後に妊娠鑑定を実施し, 受胎率及び分娩成績を調査した.

(2) 試験 2

試験 2 では, 乳牛の受胎環境を改善する飼料添加剤の給与試験を行い, 血液性状及び胚移植の受胎成績を調査した. 供試牛は畜産研究部内で飼養しているホルスタイン種経産牛 5 頭を用いた. 産歴は 2.2 ± 1.7 産, 分娩後日数は 166.4 ± 164.5 日であった. 飼料添加剤は, ビタミンやアミノ酸, 糖蜜等を成分とし, 主にエネルギーとバイパス蛋白を補うものを用い, 胚移植前 15 日間と移植後 10 日間の計 25 日間で 1 日 1 頭あたり 100 g を飼料に混合した. 胚移植は IETS マニュアルの Code1 の凍結 2 卵を用いて, 1 人の移植師が移植器モ 5 号 (ミサワ医科工業) により受胎牛の黄体側子宮角に行った. 胚移植実施から 40 日以上経過後に妊娠鑑定を実施し, 受胎率を調査した. また, 胚移植から 15 日前及び胚移植

から 10 日後に採血を行い、血液生化学成分を測定した。血液生化学成分の測定項目は、Glu, BUN, 総コレステロール (T-cho), NH₃, TP, ビタミン A, ビタミン E, β カロチン, セレン, NEFA とした。

9. 統計処理

統計処理は統計解析ソフト R (<http://www.R-project.org/>) を用いて行った。検定には、分割率、媒精 8 日後の胚盤胞発生率及び媒精 7 日後の胚盤胞の細胞数については一元配置分散分析、凍結融解後の胚生存率、透明帯脱出率及び受胎率についてはカイ二乗検定、血液生化学検査値については t 検定を用いて処理区間の有意差を検討した。そして、全てのデータにおいて $p < 0.05$ を統計的に有意と判断した。

結 果

(1) 試験 1

体外受精胚生産時の分割率及び媒精 8 日後の胚盤胞発生率については、各試験区間で有意差は認められなかった。しかし、血清添加区で分割率及び胚盤胞発生率が最も高値となった (表 2)。

媒精 7 日後の胚盤胞の細胞数については、内細胞

表2 分割率及び胚盤胞発生率

試験区	回数	供試卵子数	分割率(数)	胚盤胞発生率(数)
血清添加	11	182	81.5±2.7 (148)	46.4±4.9 (84)
無血清	29	548	74.6±3.3 (409)	37.5±2.2 (205)
無血清+Car	29	532	76.0±2.0 (404)	33.4±1.9 (177)
無血清+Rif+For	19	364	71.2±4.4 (259)	38.2±3.4 (139)

注1) mean±SEM

2) 統計処理: ARCSIN変換後に分散分析

塊、栄養膜細胞及び総細胞数は各試験区間で有意差は認められなかった (表 3)。

表3 媒精7日後の胚盤胞の細胞数

試験区	供試胚数	内細胞塊	栄養膜細胞	総細胞数
血清添加	7	36.6±1.5	79.0±1.6	115.6±2.9
無血清	33	43.9±2.0	73.6±3.1	117.5±4.6
無血清+Car	21	47.0±2.9	77.3±3.0	124.3±4.9
無血清+Rif+For	17	37.9±2.6	69.8±2.0	107.7±3.9

注1) mean±SEM

2) 統計処理: 分散分析

凍結融解 48 時間後の胚生存率は、血清添加区に比較して無血清区及び無血清+Car 区で有意に高値であった。次に、凍結融解 48 時間後の透明帯脱出率は、血清添加区に比較して無血清+Car 区で有意に高値であり、無血清区及び無血清+Rif+For 区で高い傾向が認められた。また、無血清区と比較した場

合には、有意差は認められなかったが、無血清+Car 区及び無血清+Rif+For 区でより高値であった (表 4)。

表4 凍結融解48時間後の胚生存率及び透明帯脱出率

試験区	供試胚数	胚生存率(数)	透明帯脱出胚率(数)
血清添加	82	70.7 (58) B	56.1 (46) Bb
無血清	97	85.6 (83) A	70.1 (68) ABa
無血清+Car	84	86.9 (73) A	79.8 (67) A
無血清+Rif+For	27	88.9 (24) AB	77.8 (21) ABa

注) 統計処理: A-B: $p < 0.05$, a-b: $p < 0.1$ (カイ二乗検定)

受胎率は新鮮胚 (血清添加区から順に 22.2, 25.0, 0%) 及び凍結胚 (17.6, 16.3, 15.4, 33.3%) 移植で有意差は認められなかった (図 2)。また、4 戸の農家ごとの受胎率はそれぞれ 12.9% (6/50), 21.7% (10/46), 20.0% (2/10), 50.0% (1/2) であり、有意差は認められなかった。

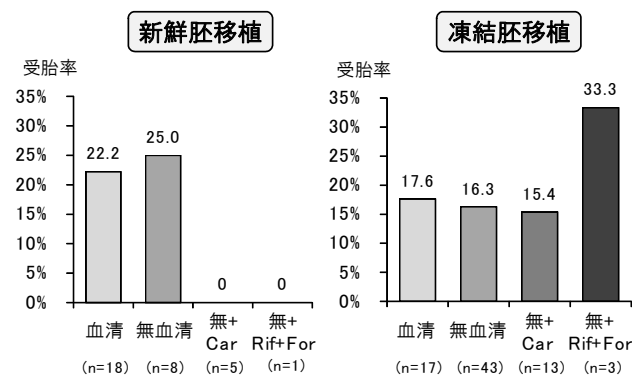


図 2 受胎率

新鮮卵及び凍結卵移植により受胎した 19 頭は全て経産牛であり、2018 年 2 月までに 8 頭が市場にて出荷済み、2 頭が飼養中、3 頭が妊娠中、4 頭が流産、1 頭が死産、1 頭は妊娠中に母牛が廃用となった。8 頭の市場価格は、雌雄ともに F1 スモールの平均価格と比較して約 21 万円高値となった。死産については尾位での娩出に長時間を費やしてしまったとの報告、流産については移植時に壁の薄い囊腫様黄体が認められた受胎牛に移植したところ 60 日齢で流産を確認したとの報告があった。

(2) 試験 2

血液生化学検査値について、胚移植前と胚移植後で有意差は認められず、B/G 比は胚移植前、胚移植後ともに 0.3 以下であった (表 5)。受胎率は 40.0%

(2/5) であった。

表5 胚移植15日前及び胚移植10日後の血液生化学検査値

	Glu (mg/dl)	BUN (mg/dl)	T-cho (mg/dl)	NH3 (μ g/dl)	TP (g/dl)	B/G比
胚移植15日前	66.6 \pm 0.5	10.8 \pm 0.7	163.2 \pm 10.4	31.4 \pm 0.9	8.0 \pm 0.2	0.16 \pm 0.010
胚移植10日後	65.0 \pm 1.3	13.0 \pm 0.7	186.0 \pm 10.3	26.4 \pm 1.1	7.7 \pm 0.3	0.20 \pm 0.013

	ビタミンA (IU/dl)	ビタミンE (μ g/dl)	β カロテン (μ g/dl)	セレン (ng/ml)	NEFA (μ Eq/l)
胚移植15日前	103.8 \pm 5.5	272.2 \pm 29.9	138.8 \pm 14.9	79.1 \pm 1.6	89.4 \pm 5.1
胚移植10日後	133.2 \pm 7.7	320.9 \pm 22.6	157.5 \pm 16.4	71.8 \pm 2.4	103.7 \pm 3.7

注1) mean \pm SEM

2) 統計処理: t検定

考 察

試験 1 より、無血清培地への Car や Rif 及び For の添加による効果を検討したところ、Car または Rif 及び For を添加した区では未添加区と比較して、有意差はなかったものの凍結融解 48 時間後の胚生存率や透明帯脱出率は高値であった。このことから、血清添加培地だけでなく、耐凍性が高い胚の生産が可能である無血清培地においても添加剤の使用によるさらなる耐凍性向上の可能性が示唆された。

また、血清添加区と無血清区の 3 区で比較した場合、分割率や胚盤胞発生率については、無血清区の 3 区で生産された胚は血清添加区のものより有意差はなかったものの劣り、耐凍性については優れる結果となった。これは、血清に含まれる糖や蛋白、細胞性因子等の多種多量な物質が、胚の発育に有効に作用する反面、血清に含まれる脂肪が胚に多量に蓄積されることが誘因となり耐凍性を低下させる^{8,9)} との報告があるが、今回の試験でも同様の結果であったと考えられた。

移植試験について、胚移植の受胎成績に影響する要因には、胚の状態だけでなく、受胎牛の栄養状態や黄体形状といった受胎牛側の条件や移植師の技術など複数ある^{10,11)}。胚生産試験の結果から、他の報告に劣らない胚の生存率及び透明帯脱出率を示したが、今回の受胎成績が低かったのは、受胎牛の選抜及び移植技術による要因が大きく作用したものと考えられた。県では胚移植講習会を開催しており、そのような場なども通して移植師や農家の方々に指導を行っていく必要がある。

試験 2 では、乳牛の B/G 比を低下させる飼料添加剤の給与試験を行い、受胎環境の改善の有無を検討したが、胚移植前と胚移植後で血液生化学検査値

への影響は認められず、供試牛 5 頭の B/G 比は胚移植前、胚移植後ともに 0.3 以下であった。今回利用した飼料添加剤の胚移植前後 25 日間の給与は、胚移植 15 日前の B/G 比が 0.3 以下である乳牛に対して効果が認められないことが明らかとなり、受胎率向上を図るため飼料添加剤の利用を行う牧場は B/G 比の事前調査を行う必要があると考えられた。また、受胎に影響する指標値として、ホルスタイン経産受胎牛では Glu \geq 65 mg/dl, BUN < 15 mg/dl, B/G 比 < 0.3, NH3 < 100 μ g/dl が適性値である⁶⁾ との報告があるが、今回の試験牛 5 頭のうち 3 頭がこれらの条件を全て満たしており、この 3 頭中 2 頭が受胎していた。Glu はエネルギー摂取の指標、BUN は粗蛋白質の摂取や粗蛋白質と非繊維性炭水化物とのバランスに影響される項目であり、飼料の影響を大きく受けて繁殖性にも影響を与えること^{4,12)} が報告されている。今回の結果からも、既存の報告と同様に、移植前の Glu や BUN, B/G 比の測定は受胎牛の選定に利用可能な指標の 1 つであると考えられた。

今回、飼料添加剤給与による受胎環境の改善を図ったが、ホルスタイン種受胎牛の飼養管理について、経産牛では分解性摂取蛋白と非分解性摂取蛋白の給与過剰及び非繊維性炭水化物の給与不足に注意し、そのバランスの適正化を図ることが重要という報告¹⁰⁾ もあり、今後は飼料分析を実施し、適切な飼料給与設計を満たした上で添加剤の給与条件を見直し、ホルスタイン種受胎牛の受胎環境を改善する栄養管理方法の確立に取り組む必要がある。また、無血清培地への Car または Rif 及び For の添加により胚の耐凍性が向上する可能性が示唆されたが、依然例数が少ないため、今後は各調査においてさらに例数を重ね検討していき、高品質な体外受精胚生産を可能とする発生培養方法の確立を図りたい。

文 献

- 1) 松本光晴・音井威重・鈴木達行. 1999. 修正合成卵管液 (m-SOF) に添加した乳酸とグルコースが牛体外受精胚の発生に及ぼす効果. *Journal of Mammalian Ova Research*, 16: 73-76.
- 2) Takahashi, T., Inaba, Y., Somfai, T., Kaneba, M., Geshi, M., Nagai, T. and Manabe, N. 2013. Supplementation of culture medium with L-carnitine improves development and cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*, 25: 589-599.
- 3) 森美幸・笠正二郎・山口昇一郎・磯崎良寛・上田修二・服部眞彰. 2011. 第 104 回日本繁殖生物学会大会, セッション ID: OR1-6.
- 4) 渡邊貴之・小西一之・野口浩正・大福浩輝・岡田啓司. 2012. 黒毛和種受胎牛への高蛋白飼料給与が栄養状態と受胎率に及ぼす影響. *産業動物臨床医学雑誌* 3: 7-12.
- 5) 細川素子. 2009. 受胎率向上のための黒毛和種受胎牛の飼料給与プログラムと血液検査指標値. 平成 21 年度岩手県農業研究センター試験研究成果書.
- 6) 細川素子. 2008. 胚移植時の血液検査値と受胎率・糞便 pH との関係. 平成 20 年度岩手県農業研究センター試験研究成果書.
- 7) de la Fuente, R., King, W. A. 1997. Use of chemically defined system for the direct comparison of inner cell mass and trophectoderm distribution in murine, porcine and bovine embryos. *Zygote*, 5: 309-320.
- 8) 阿部宏之・山下祥子・佐田竜一・辻井弘忠・佐藤威・星宏良. 2000. 高品質ウシ体外受精胚生産を可能とする体外培養システム—無血清培地及び血清添加培地で作出した胚の品質評価—. *Tissue Culture Research Communications*, 19: 17-27.
- 9) 安達聡・渡邊竜二・佐藤恭二・藤田達男. 2012. 経膈採卵-体外受精による良品質胚生産の検討. 平成 23 年度大分県農林水産研究指導センター畜産研究部試験成績報告書 41.
- 10) Sasaki, K., Kawai, T., Kobayashi, S., Syozu, S., Kondo, M., Matui, T., and Maeda, J. 1998. Pregnancy rate following embryo transfer and feeding management in recipient heifers and cows. *Journal of the Japanese Veterinary Medical Association*, 51: 583-587.
- 11) Yamashina, H. 1989. A practical studies for bovine embryo transfer. *The Japanese journal of animal reproduction*, 35: 20-24.
- 12) 渡邊貴之. 2018. 黒毛和種繁殖牛における代謝プロファイルテスト診断マニュアル. 平成 29 年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会講演要旨集, 350-351.