

博士論文

生殖工学技術によるウシの効率的生産に関する研究

平成27年3月

広島大学大学院生物圏科学研究科

尾形 康弘

博士論文

生殖工学技術によるウシの効率的生産に関する研究

平成 27 年 3 月

広島大学大学院生物圏科学研究科  
生物資源科学専攻

尾形 康弘

# 目次

第一章 緒論	1
第二章 ウシ経膈採卵における性腺刺激ホルモン放出ホルモン投与効果について	19
第一節 緒論	19
第二節 材料及び方法	21
第三節 結果	24
第四節 考察	28
要約	32
第三章 マニピュレーターを必要としない性判別用細胞のサンプリング方法の開発	34
第一節 緒論	34
第二節 材料及び方法	37
第三節 結果	42
第四節 考察	46
要約	49
第四章 経膈採卵を用いたホルスタイン種の効率的な増殖方法の開発	50
第一節 緒論	50
第二節 材料及び方法	52
第三節 結果	54
第四節 考察	58
要約	62
第五章 総合考察	63
総括	69
謝辞	74
引用文献	75

## 第1章 緒論

平成24年現在、全国で飼育されているウシは、乳用牛1,449,000頭(20,100戸)、肉用牛2,723,000頭(65,200戸)と報告されている(農林水産省, 2014)。広島県では乳用牛9,740頭(195戸)、肉用牛26,600頭(792戸)が飼養されている。牛肉の輸入自由化が実施された平成3年と比較すると全国では乳用牛70%、肉用牛97%となっているのに対し、広島県では、乳用牛55%、肉用牛70%と飼養頭数の落ち込みが全国平均を上回るスピードとなっている(家畜改良センター, 2014)。中国山地はかつて鉄の生産地であり、ウシはその原材料となる「たたら」を作るための重要な労働力であった。その生産・維持のため遺伝的に優れた温和で力の強いウシが求められ、長い間の育種固定によって目的にあったウシが数多く飼育されてきた。また、中国山地は役牛の生産地として全国的にも評価が高く、竹の谷蔓(岡山県阿哲郡で1830年に造成)、周助蔓(兵庫県美方郡で1845年に造成)、ト蔵蔓(島根県仁多郡で1855年頃造成)、岩倉蔓(広島県比婆郡で1843年に造成)の日本最古の4大蔓ウシが誕生した古くからの和牛の産地でもある。明治時代に入ってから小型で晩熟な役用タイプの和牛を大型化するためにショートホーン種、シンメンタル種、ブラウンスイス種、デボン種、エアシャー種等の外国種が導入された。現在の畜産技術センターの前身である七塚原種畜牧場(庄原市)には、育種改良に用いるため、エアシャー種、シンメンタル種、ブラウンスイス種がこの地域にも導入された。また神石郡においても明治35年に英国から短角種牝牛「レッドナール」号を輸入し、育種改良に用いた。このように和牛と外国種の交雑が国の種畜牧場を中心として行われたが、大型化によって動きも鈍く、本来の役用には不向きな交雑種が増加し、日本の飼養形態になじまない結果となってしまった。この反省から、大正時代になると各県ごとの実情にあわせた和牛の改良の取り組みが行われる様になり、現在の育種改良の原型が

できあがった。広島県では、「比婆」、「神石」、「双三」、「高田」の4つの育種組合が切磋琢磨し、これまで優秀な広島牛を輩出してきた。1961年に農業基本法が制定され、また、日本の高度経済成長によって、農業分野にも機械化が進展すると、それまで農耕や運搬といった役牛として飼養されていたウシは、トラクターや自動車の台頭によりその必要性を喪失した。農耕用や堆肥生産のために飼養されていたウシは手放され、トラクター、自家用自動車、化学肥料がその役割を代替し、ウシの生産頭数や農家戸数が減少していった。第二次世界大戦後に都市部の労働力として地方から人々が流出し、また時を同じくして高度経済成長で人々の暮らしが豊かになるにつれ食生活も欧米化したことで、肉や乳加工品等の需要が急速に高まっていったが、中国地方は、役用として発展してきたこれまでのウシの生産構造を簡単に転換させることはできなかった。中国産地の鉄生産の衰退、第二次世界大戦後の機械化の波、農村から都市部への人口流出、そして牛肉を巡る国際競争によって、広島県内のウシの生産基盤衰退に歯止めがかかっていない。全国レベルで見ても中国地方におけるウシの生産頭数の減少は大きく(家畜改良センター、2014)、畜産を基幹産業として位置付け、力を入れてきた南九州や北海道に大きく水をあけられた状態となっている。

1991年の牛肉輸入自由化やそれに続くガットウルグアイラウンド交渉(平成12年度までに牛肉輸入関税を38.5%まで段階的に引き下げることで日本政府が合意)、さらには、現在交渉中の環太平洋経済連携協定では、さらなる関税撤廃を含む自由化要求も十分考えられ、これまでの国際牛肉競争とそれに続く国内ブランド化競争と合わせて、畜産業界全体に暗い影を落としている。全国各地では、輸入自由化以降、輸入牛肉に対抗する手段として、地域牛のブランド化戦略を打ち出しており、広島県でも比婆牛、神石牛の2大育種圏を統一したブランドとして広島牛を前面に押し出し、消費拡大やブランド化を施策として行っている。しかし、広島牛は、神戸牛などの老舗ブランドに太刀打ちできておらず、後発ブランドである鹿児島牛、佐賀牛、宮崎牛にも生産量、牛肉の品

質、価格とも劣勢のままである（日本食肉格付協会, 2014; 日本食肉市場卸売協会, 2014）。これらの事態を打開するため、広島県においても広島牛の育種改良を進め、産地間競争に勝ち抜くため、様々な方策をとってきた。平成3年からはウシの偏差値とも呼ばれるアニマルモデルによる育種価を導入し、広島牛の改良進度調査を実施し、広島牛群の改良に活用している。また、黒毛和種の種雄牛造成も行っており、農家で飼育されている高い育種価をもつ雌ウシを利用して、種雄牛造成を行い、その精液を全国農業協同組合連合会広島県本部を通じて、県内農家に有償で販売している。広島県では、精液だけでなく体内及び体外受精胚の有償供給も行っている。広島県立総合技術研究所畜産技術センター（庄原市七塚町）では、受精胚移植や分割卵検定、クローン検定といった新技術を導入し、短期間での種雄牛造成や優秀な雌ウシの増頭を行い、育種改良に積極的に取り組んでいる。

しかしながら、長い歴史の中で、地域に根付き、役用として育種改良されてきたものを肉用として転換するためには、生産者の理解と大胆な育種戦略及びそのための時間が必要であり、現時点では十分な成果が得られているとはいえない。地域ブランド化のための育種改良には、本県独自の新技術の導入とその実践が必要となってくる。広島県の黒毛和種飼養頭数は5,000頭を下回る状態となっており（農林水産省中国四国農政局, 2014）、もはや育種改良を行う基礎すら失われつつある。そこで、ホルスタイン種を用いた酪農経営に黒毛和種生産を導入することで、黒毛和種の短期間増頭と育種改良を実施することが重要と考えられる。

本研究は、黒毛和種の増頭及び育種改良（広島牛のブランド化）と酪農経営の安定化（広島県産生乳の安定的供給）を実現するために、生殖工学的技術を駆使したものであり、いくつかのウシ繁殖技術を現実の酪農経営でも利用できるように構築したものである。生殖工学技術の個別的な利用例は全国的にも多く見受けられるが、これらの技術を体系的に構築し、実用化した例は他県においてはあまり見受けられない特徴的なもので

ある。後述する経膈採卵や過剰排卵処置（体内受精胚生産）等の技術を組み合わせた例（長谷川ら，2011）はこれまで報告があるものの，酪農経営の中で連続的にしかも1年1産を実現できる手法は少ないのが現状となっている。

ウシの繁殖技術の進展は，人工授精技術をはじめとして，この一世紀で目覚ましいものがあり，卵胞波制御技術，卵母細胞培養技術，体外受精技術，経膈採卵技術，胚操作技術，遺伝子診断技術や受精胚移植技術など新たな技術が誕生している。以下これらの技術内容や進展についての概要を紹介する。

### 【人工授精技術】

1782年にイタリアのSpallanzaniがイヌで人工授精に初めて成功して以来，ロシアのIvanovらによって積極的に技術開発が行われた。その後，デンマークの研究者によってウシの直腸膈法による人工授精技術も開発され，現在もこの方式が利用されている。1949年にPolgeがグリセロールによる鶏精液の保存に成功し，この方法はウシの精液にも有効であることが確認され，これが精液の凍結保存の原型となっている。精液の凍結保存は，地球規模での雄遺伝子の移動や半永久的な保存を可能にしたほか，いつでも利用可能な雄遺伝子を準備できるという大きなメリットがある（斉藤，2003）。ウシにおいては，一般的に一回の射精で人工授精100回分程度の精液を生産することができ，凍結保存によって半永久的にストックすることも可能となった。人工授精技術の普及は，ホルスタイン種の泌乳に関する遺伝的能力を短期間で大きく改善することに寄与した（Louis et al.，1995）ほか，トリコモナスやブルセラといった伝染性疾患の感染予防にも大きく貢献した。現在では日本の9割以上のウシがこの人工授精技術を利用して後継牛生産を行っている（日本家畜人工授精師協会，2014）。

ウシの繁殖技術に関して，近年問題となっているのが，ホルスタイン種の発情徴候の微弱化と発情持続時間の短期化であり，人工授精による受胎率も50%を下回るほどにな

りつつある（日本家畜人工授精師協会，2014）。ウシの計画的な人工授精実施は，経営に直結する大きな問題であり，現在の様な AM-PM 及び PM-AM 方式は，1948 年に Trimberger らによって開発され，今もこの方法が用いられている。そのため，畜産経営にとって発情発見は欠かせない日常的な作業となっている。しかしながら，ホルスタイン種では遺伝的改良による泌乳量の増加が摂取エネルギーに追いつかないために，負のエネルギーバランスに陥る影響(Lucy et al., 2001)によって，発情持続時間の短縮化や発情微弱化現象(Butler, 2003)が発生し，発情発見が以前よりかなり難しくなっている。

繁殖に用いる薬剤単価が安く，多頭飼育を行っている米国等では，個別管理ではなく，群単位での繁殖管理が行われており，人為的な発情誘起処置と人工授精技術の開発が進んでおり，それが現在の定時人工授精につながっている。かつては，人為的に発情を誘起させるための黄体退行物質が無く，直接的な手による黄体除去等も行われていたが，1970 年代にプロスタグランジン F<sub>2</sub>α (Prostaglandin F<sub>2</sub>α : PG) が登場したことで黄体の人工的制御は，新たな発情周期の人為的コントロールの展開を見せることとなった。この黄体退行因子 PG と色々な外因性ホルモンを組み合わせることで，種々の発情誘起，定時人工授精法及び排卵同期化が可能となっている。

発情確認を必要としない定時人工授精方法として，まず最初に開発されたのが Select-synch であり，性腺刺激ホルモン放出ホルモン (Gonadotropin Releasing Hormone: GnRH) 投与後 7 日目に PG を投与して発情を斉一化させる(Burke et al., 1996) というものである。さらに発情同期化の精度を向上させるために考えだされたのが，Ovsynch であり，この方法は，Select-synch の 30～56 時間後に GnRH を投与し，その 16～20 時間後に発情確認を行わずに人工授精を実施する(Pursley et al., 1995)。この方法は，1990 年代以降，北米，南米を中心に飛躍的に普及した。その後さらに Heatsynch と呼ばれる方法も開発された。この方法は，2 回目投与の GnRH を安息香酸エストラジオール (Estradiol Benzoate: EB) に置き換えるもので，EB 投与後 24～36 時間目に人工授

精を行う方法である (Burke et al., 2000)。また、Presynch と呼ばれる、PG 投与後 14 日目に再度 PG 投与し、その後 12~14 日目に Ovsynch を開始して発情同期化精度をさらに高めようとする方法も存在する。

これらの方法の根底にあるのは、卵胞波の人為的なコントロールがベースとなっている。これらが発展した要因のひとつは、超音波画像診断技術の導入による卵巣内の卵胞発育動態解析 (Curran et al., 1986; Kastelic et al., 1988; Ginther et al., 1989; Adams et al., 1992) が容易となったことが大きく寄与している。

しかしながら、発情周期を直腸検査等で確認することなく、Ovsynch を開始した時、2 回目の GnRH 投与前に発情が起こる確率が 19.7% (68/345 頭)、また PG 投与前にも 4.9% (17/345 頭) の発情がみられたとの報告 (DeJarnette et al., 2001) があるように 1/5 程度は定時人工授精によっては受胎が成立しない可能性がある。排卵同期化の精度を向上させるため、GnRH 投与後に血中プロゲステロン濃度を一定以上維持する膣内留置型のデバイスを用いて定時人工授精の確実性を高めようとする方法が試みられている。これには 2 つの対処法があり、一つは、Ovsynch 開始前の前処置で Ovsynch と同様の作業を行う Presynch や Double-Ovsynch である (Souza et al., 2008)。もう一つは、優勢卵胞を高いプロゲステロン環境下に曝すことで、これによって発情や排卵をコントロールしようとするものである。しかしながら、注射による投与では生体内での血中プロゲステロン濃度維持が一過性のため、膣内留置型黄体ホルモン剤 (Controlled Internal Drug Release Device: CIDR) あるいは、膣挿入プロゲステロン・安息香酸エストラジオール配合剤 (Progesterone Releasing Interavaginal Device: PRID) といった徐放性の膣内挿入型 P4 製剤を用いる方法が現在では広く普及している。

#### 【卵胞波制御技術】

ウシは通常約 21 日 (19~24 日) 周期で発情・排卵を繰り返している。その発情周期

に2〜3回の周期性の卵胞刺激ホルモン (Follicle Stimulating Hormone: FSH) の増加が見られ、その直後に小卵胞の新たな発育 (卵胞波) が見られる (Savio et al., 1988; Sirois and Fortune, 1988; Ginther et al., 1989)。卵胞波の始まりは、多数の小卵胞の発育によって開始し、FSHの上昇によって4〜6 mm程度の卵胞が数個出現する (Kaneko et al., 1993)。FSH濃度の上昇は1〜2日間で終息し、その後、発育を開始した小卵胞のほとんどはその途中で発育を停止するが、その中の1個の卵胞が選択され、発情周期の4〜5日目に優勢卵胞にまで発育する。選択された優勢卵胞は、その過程で、インヒビンA及びエストラジオールの分泌を増加させ、脳下垂体前葉からのFSH分泌を抑制し、卵胞波の新生を阻害する。しかしながら、その卵胞もやがて黄体から分泌されるプロジェステロンの作用によって閉鎖することとなる。黄体退行期の卵胞波で優勢を獲得した卵胞は黄体の影響を受けることなく、大型化して排卵まで至ることとなる。GnRHは、かつてLHRH (Luteinizing Hormone Releasing Hormone) と称されており、10個のアミノ酸から構成される視床下部ペプチドである。現在では脳下垂体前葉に働きかけLHサージ放出のほかFSH放出作用も認められており、卵胞嚢腫や卵巣静止等の幅広い繁殖障害治療に多く用いられている (Dorse and Thatcher, 1992)。また、近年では定時人工授精のための卵胞波を同期化させる目的でも広く利用されている (Pursley et al., 1997; Yamada et al., 1999)。このGnRHは10個のアミノ酸から構成される比較的単純な構造のため、数多くのアナログが合成され、商品化されている。

超音波画像診断技術の進展に伴い、生きたままのウシから卵巣動態をリアルタイムで解析することができるようになった (Spicer and Echtenkamp, 1986; Sirois and Fortune, 1988; Ginther et al., 1996) ため、外部からのホルモン等の投与後の変化が解明されつつある。GnRHは、優勢卵胞存在下で、その卵胞を排卵もしくは閉鎖させること (Retter et al., 1992) が報告されており、これに続く、内因性FSHの上昇 (Gibbons et al., 1994) によって、適切な時期に、新たな卵巣内卵胞の新生や発育が起きれば、経膈採卵に利用

できる可能性がある。

### 【卵母細胞培養技術】

ウシ等の哺乳動物の卵形成には独特なものがある。卵巣内に存在する原始卵胞内には、単層の顆粒層細胞に包まれた一次卵母細胞があり、細胞核は、第一減数分裂前期で停止状態で発育を開始する。発育に伴い、扁平な顆粒層細胞は立体となり一次卵胞となる。卵母細胞は、周囲の顆粒層細胞の増加と重層化により二次卵胞に発育する。さらに顆粒層細胞が増加し、胞胚腔が形成されると胞状卵胞となる。さらに発育を続けると直径 2mm 以上の胞状卵胞となり、卵母細胞の直径も 120  $\mu\text{m}$  となる (Fair et al., 1995)。これらの卵母細胞のうちのいくつかは、個体の性成熟後に GnRH の作用により、細胞核は第一減数分裂を再開し、第二減数分裂の中期に達し、成熟卵となり排卵へと至る。ウシの卵巣内には 10~20 万個の数多くの卵母細胞が存在するとの報告 (Erickson, 1966) があるが、その大部分は発育に至らないで退行、閉鎖し、実際に排卵まで至るのは数百だけである。

卵巣内に存在する多数の卵母細胞を利用できれば、体外受精にとって大きなメリットとなる。卵巣内に存在する卵母細胞を体外で培養する試みが数多く行われてきた。マウスにおいては、原始卵胞中の直径 20  $\mu\text{m}$  の卵母細胞を体外培養することで、発育させ体外受精・培養のより産子を得ることができている (Eppig and O'Brien, 1996)。マウス以外で卵母細胞の体外培養による産子生産の報告は、ウシ (Yamamoto et al., 1999) で 300 個の卵母細胞を培養して、発育したものは 100 個程度、体外受精によって胚盤胞期まで 6 個を発生させている。

### 【体外受精胚生産技術】

哺乳動物における最初の体外受精成功例は、1959 年に報告された (Chang, 1959)。彼らの実験にはウサギが用いられた。その後 1968 年にマウスで (Whittingham, 1968), 1978

年には、ヒト (Stephens and Edwards, 1978) でも成功している。最初のウシ体外受精由来産子は1982年に報告された (Brackett et al., 1982)。世界で最初の体外成熟卵 (卵は以下卵子と表記) 由来の産子の報告は1985年である (Hanada et al., 1986)。研究開発当初に利用されていたウシ体内成熟卵子による体外受精やウサギ卵管を用いたウシ胚培養による受精胚生産方法は、現在、ほとんどおこなわれておらず、完全体外培養系での胚生産が実現している。この体外受精技術は煩雑な作業を必要とする体内受精胚生産に代わって、繁殖障害牛や成熟前のウシからも受精胚を生産できる適用範囲の広い技術として利用されており、MOET (Multiple Ovulation and Embryo Transfer) プログラムにも積極的に活用されている。

体外受精胚生産技術には体外成熟、体外受精、体外培養という3つの大きなステップが存在する。体外受精においては、受精に用いる精子の受精能獲得誘起が重要であり、当初はイオノフォア処理 (Takahashi and Hanada, 1984) が行われていたが、1986年にへパリン処理 (Parrish et al., 1986) による効果的な処理が可能となって以来、この方法が主流となっている。体外培養には当初、卵管上皮細胞 (Eystone and First, 1989) や体外成熟時に採取される卵丘細胞をフィーダー細胞とした共培養が行われていたが、発生培養条件を一定に維持することが難しいため、共培養する細胞の保存や播種条件をコントロールし易い株化細胞である Buffalo Rat Liver 細胞 (Hasler et al., 1995) や Vero 細胞 (Carnegie et al., 1997) の利用も行われている。しかしながら、ウシ胎児血清の添加や共培養細胞の利用は、ウシ胚を効率的に生産する点では優れているが、発生に必要な因子等の調査には適していないため、これらを添加しない完全化学合成培地等の検討も行われている (Yoshioka et al., 1993)。

#### 【経膈採卵技術】

従来法の体外受精技術は、と畜ウシの卵巣を採取して、注射器で卵巣内に存在する卵

胞を吸引する方法であり、この卵巣は1回しか利用することが出来ないこと、また採取した個体識別も困難である。個体識別が出来ない場合は、黒毛和種の登録を実施している公益社団法人全国和牛登録協会において黒毛和種としての必要な血統登録ができないため、種畜としての利用できない。一方、生きたウシから反復して卵巣内卵子を採取する経膈採卵技術は、体外受精技術と組み合わせることで、反復して受精胚を生産することができる大きなメリットがあり、現在、日本で数多く行われるようになってきた。この方法は、ヒトの経膈採卵技術をウシに転用 (Pieterse et al., 1988) した方法であり、個体識別が容易で、生きたウシから反復して卵巣内卵子の採取が可能である。この方法は、1週間に2回のペースで採卵することが可能であり (Garcia et al., 1998; Goodhand et al., 1999; Hagemann et al., 1999)、体内受精胚生産時のように、FSH等の外的ホルモンを投与せずに、卵子採取が可能である。またこの方法は、体内受精胚生産が不可能な未経産 (Galli et al., 2001)、繁殖障害 (Loony et al., 1994)、妊娠初期 (Meintjes et al., 1995; Rust et al., 1999) などのウシからも卵子を採取することができる。

経膈採卵は、採卵前のホルモン投与することなく反復して卵巣内卵子を採卵することが可能である。また、より多くの卵胞内卵子を採取できれば、その後の体外受精や胚発生も良好な結果が得られるため、多くの研究者が採卵個数を増加させる目的で、外因性ホルモン投与や優勢卵胞の除去等の処置を試みている。多数試みられている方法がFSH投与によるものであり、4~5 mg FSHの3日間投与で採取卵子個数が多く、また、卵丘細胞卵子複合体 (Cumulus-Oocyte Complexes: COCs) の形態学的分類で高い品質グレードである Grade I と Grade II の個数が増加したとの報告がなされている (Looney et al., 1994)。高濃度 FSH 投与 (40 mg) で利用可能な卵子が増加すると報告もある (Meintjes et al., 1995)。さらに単独投与ではなく、FSH と LH の組み合わせによっても体外発生に効果が見られたとの報告もある (Blondin et al., 2002)。肉牛による大掛かりな実験では、160 µg/供卵牛の FSH 投与によって卵巣内卵胞数と採取される卵子数が増加するという

報告(De Roover et al., 2008)がある一方で、週1回の経膈採卵では、モニターで観察される卵巣内卵胞数の増加は見られなかった(Stubbings and Walton, 1995)、4日間にわたる100 mgのFSH投与は観察される卵胞数を増やしたが、採取されるCOCsの品質やその後の胚の発生能には差が見られなかったとの報告(Bungartz et al., 1995)もあり、研究者やFSH投与の条件によって、その効果に一定性は見られず、現時点ではCOCs数増加のための有効な手法は見いだされていない。

### 【胚操作技術】

哺乳動物において世界初の受精胚移植の成功例は、1890年のことであり、ベルジアン種ウサギにアンゴラ種ウサギの受精胚を移植し、産子が得られている(Adams, 1982)。ウシでは1951年が最初で、人工授精後5日目に供胚牛をと殺し、子宮還流して得られた8細胞期胚が用いられている(Willett et al., 1951)。1950～60年代に開発された受精胚の人為的分割技術は、その後、受精胚の効率的利用を目的としても活用されるようになった。すなわち、優秀な個体から得られた受精胚を人為的に2分割して一卵性双子を生産できれば育種改良に与える影響は大きいと考えられる。

ウシの増殖技術として、人工授精技術は雄側からの育種改良を進める技術として発展し、乳牛の改良等に大きな影響を与えた(Lohuis, 1995)。しかし雌側からの改良については過剰排卵・人工授精技術を用いた体内受精胚生産が実用化されるまで進展が見られなかった。過剰排卵処置を用いた体内受精胚生産技術は、1回の処置で多くの受精胚を生産することが可能で、MOET技術(Smith, 1988)に組み込まれて積極的に育種改良に利用された。現在では、体外受精胚技術の開発により、これを経膈採卵技術と組み合わせることで、数多くの受精胚を容易に確保できるようになりつつある。

受精胚の分割技術は、優秀な個体を2倍化させる技術として注目された。マイクロマニピュレーターを用いた顕微操作法が開発されたことで、ミクロン単位の微細な操作が

可能となったことから、眼科用金属刃による機械的な胚盤胞期胚の2分割技術を中心に、ガラス製器具を用いた受精胚の顕微操作が行われ、マウス (Nagashima et al., 1984) やヒツジ (Willadsen, 1979) でも産子が得られている。

Willadsen らはヒツジの4細胞期胚を1個ずつ、もしくは8細胞期胚の2つの細胞を1セットにして一卵生複数子の生産に成功している (Willadsen, 1980 ; 1981)。ウシでは1981年に8細胞期胚を4分割した産子が得られており (Willadsen, 1981)、一卵生4つ子の生産は技術的に可能であることが実証された。しかしながら、Williams et al., (1983) は72例中18例 (25%)、また Ozil et al., (1982) も11例中4例 (36.4%) しか成功せず、その生産効率は高いとは云えず、技術の安定性は決して高くなかった。Moore et al., (1968) はウサギの8細胞期胚の一部を移植して一卵性8つ子の生産を試みたがその成功率は11%と低く、これ以上の割球分割移植は、胚の細胞数が少なすぎて技術的にも限界と考えられた。そこで利用されたのが核移植技術である。この技術は元々、細胞核と細胞質の関係や全能性の限界を調べるために利用されたが、得られる産子数を増やすためにこの方法を用いたところ、8細胞期、桑実期、胚盤胞期胚からも正常な産子が誕生した。その後この核移植技術を応用して、1996年に体細胞からクローン羊ドリーが誕生 (Wilmut et al., 1997) するまでになっている。これら胚操作技術は一卵生複数子を生産するためだけでなく、次に記述する受精胚の遺伝子診断にも用いられるようになりつつある (Cenariu et al., 2012)。

### 【遺伝子診断技術】

これまでウシの遺伝子診断は、血液中から採取したDNAサンプルを用いて行われていたが、着床前の受精胚の段階で遺伝的バックグラウンドが判定できれば、目的とした遺伝子を保有する受精胚のみの利用が可能となる。受精胚から遺伝子診断用のサンプル細胞を採取する方法には大きく分けて2つの方法がある。1つめは胚盤胞期胚の栄養膜細

胞の一部を眼科手術用メスで切断するブレード切断法であり、多くの研究者がこの方法を利用している。もう一つは、割球吸引法と呼ばれる方法で、吸引用のガラス管で桑実期胚以前の受精胚から割球を吸引する方法で、この方法では受精胚に対するダメージが少なく、その後の受精胚凍結保存においても良好な成績をおさめている (Thibier and Nibart, 1995)。これらの方法はいずれもマイクロマニピュレーター等の特別な機器を必要とし、技術的にも熟練が必要である (Herr and Reed, 1991)。

受精胚の性判別に関しては、X-Y 抗原 (Epstein et al., 1980; Anderson et al., 1987) による判定、染色体検査及び Polymerase Chain Reaction (PCR) 法による判定が検討されてきた。X-Y 抗原を用いた性判別方法では、性判定の信頼性が十分でなく、実用的にこの技術が利用されることはなかった。性染色体検査は、胚の一部を取り出して染色体検査を行う必要があり、良好な染色体標本を作製することが難しいため、実用化には適さないと考えられている。PCR 法は、胚の一部の細胞を取り出して、DNA 中に含まれるオス特異的 DNA 配列を増幅させてオスのみに存在する遺伝子の有無を判定するものである。一般的には、マイクロマニピュレーターに眼科手術用のメスを装着して、栄養膜細胞の一部を切断し、その細胞を遺伝子診断用のサンプルとして利用するものである。最終的に電気泳動によってオス特異的遺伝子を可視バンドとして検出可能である。これまで、伊藤ハムや AB テクノロジー社などが性判別キットを販売していたが、現在では栄研化学 (株) が開発した LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法によるものが国内では主流となっている。この方法は、感度が高く、10 個程度の細胞があれば、十分な性判定がおこなえること、判定に要する時間が 1 時間程度と短いこと (Kageyama and Hirayama, 2012)、さらに 1 検体当たり 3,000 円程度で雌雄判定が可能であり、日本国内では、多くの研究者が利用している。

#### 【受精胚移植技術】

受精胚移植 (Embryo Transfer: ET) 技術は、家畜頭数の増加、家畜改良期間の短縮、輸送経費の軽減や不妊・繁殖障害の究明等に役立つ (森, 2001)。ウシにおける ET は、開発当初は外科的な手術方式で実施されていたが、日本の杉江らが 1964 年に開腹手術を伴わない非外科的手法である頸管バイパス法で、また同時期に頸管経由法 (Mutter, et al., 1964) で実現したことで実用的な技術となった。1970 年代に入り、北米ではヨーロッパからのウシを利用した品種改良や肉牛輸入ブームが起こった。しかし、悪性伝染病の侵入を恐れ、輸入に対しては厳しい検疫が実施されたため、ウシ ET を用いた受精胚の輸入へと変化し、その後の ET 関連のビジネス発展へとつながった。

現在の日本では、ウシの ET が頸管経由法によって実施されており、発情後 7 日目の子宮に受精胚を移植することで 50% 程度の受胎率が得られている。ET 技術の発展にともなう、体内受精胚生産技術を利用したウシ受精胚の安定的確保が必要となった。通常、ウシは 21 日に 1 回の割り合いでしか排卵しないため、自然発情を利用すれば、受精胚も 21 日に 1 個しか得られないこととなる。そこで考え出されたのが過剰排卵処理である。1940 年の Casida et al. (1940) をはじめとして多くの研究が実施されてきた。過剰排卵に利用されているホルモンには妊馬血清性腺刺激ホルモン (Pregnant Mare Serum Gonadotropin: PMSG)、卵胞刺激ホルモン (Follicle Stimulating Hormone: FSH) やヒト閉経ゴナドトロピン (Human Menopausal Gonadotropin: HMG) などが多く用いられている。PMSG は発情周期の 9~14 日目に 1 頭当たり 3,000 単位を筋肉投与することで過剰排卵が誘起される (Newcomb, 1980; Lauria et al., 1982)。この PMSG は FSH のように複数回投与する必要が無いことがメリットであるが、シアル酸を多く含む PMSG を投与すると、PMSG が体内に長く存在するため、投与後 10~12 日目でも血中から検出され、それによって卵巣に対し過度の刺激を加え、残存卵胞や 2 次的卵胞発育の原因となるデメリットもある。FSH による過剰排卵処置は、発情周期の 9~13 日目に投与する必要がある (Hasler et al., 1983; Donaldson and Perry, 1984)。FSH は体内におけるホルモンの半減期が

短いため、1日朝夕2回、3～4日連続減量投与する方法（Garcia et al., 1982）が一般的である。投与するFSHの総量は、28～50 mgの範囲となっており、日本ではこの方法が最も広く利用されている。ヒト医学領域で排卵誘発剤として利用されているHMGをウシに利用し、PMSGやFSH（Critser et al., 1982; Alcivar et al., 1983）と遜色ない効果を見せている（Lauria et al., 1982）。このHMGは、PMSGと比較して発情終了時のエストラジオールの降下が速やかで、プロジェステロンの上昇がスムーズとなっており、FSHと同じように複数回投与が必要ではあるものの、その効果としては注目すべきものがある。

過剰排卵・人工授精技術を用いたウシの体内受精胚生産技術の開発は、人工授精が雄側からの育種改良を促進させるのに有効なことに対して、雌側からの育種改良実践に役立つものである。しかしながら、この方法は、ウシへのホルモン投与時期の選定、ホルモン投与作業、人工授精、子宮内灌流による受精胚回収と非常に手間のかかる方法であり、もっと簡易に受精胚を得られる方法が望まれていた。そこで考え出されたものが体外受精胚生産技術である。研究開発当初は、卵子の成熟や発育のため、ウサギ卵管を利用する等の苦勞もあったが、現在では体内受精胚と遜色ない受胎率が得られるまでに技術が進展している。

#### 【本研究の必要性と目的】

ウシはヒトと同じ単胎動物であり、280～285日の妊娠期間で1頭の子牛しか生産することができない。それゆえ短期間での増頭や育種改良は難しい。広島県においては、生産農家数、飼養頭数ともに減少した中で遺伝的多様性を維持しながら育種改良を行い、ブランド化を促進させるためには、新たな技術を導入し、育種改良に必要な期間の短縮と確実な遺伝的改良を行う必要がある。黒毛和種からの子牛生産だけでは、十分な効果が得られないため、これまでの黒毛和種からの産子生産に加えて、ホルスタイン種を借

り腹とした ET 中心の繁殖システムの構築が欠かせない。そのため、長年の乳価低迷や輸入飼料の高騰による経営基盤の弱体化を立て直す必要がある。そのために、まず必要なことは、ホルスタイン種の安定的雌牛生産である。借り腹となるホルスタイン種の雌牛をどのような技術を用いて確実に生産できるかが重要なポイントとなる。そのために用いる技術が、経膈採卵技術と体外胚操作技術を活用した性別別（遺伝子診断）である。通常、ホルスタイン種から受精胚を得るためには、体内受精胚生産技術を用いることが多い。しかしながら、この方法は、泌乳中のウシで実施すると採卵のための空胎期間が長くなることや、泌乳量に影響がでることから、未経産や乾乳中もしくは採卵専用のウシから採取されることが多い。一般的なホルスタイン飼養農家は、自分の経営条件に適合した能力、血統の後継牛を計画的に確保することを目標にしているため、このようなウシの利用方法は酪農家には受け入れがたく、現実的な手法とは言いがたい。そこで、人工授精等の繁殖計画を休止している分娩後の生理的空胎期間（分娩後 40～80 日）を利用して受精胚生産が可能となれば、酪農家にとっても経営的に負担とならず、その上、酪農家の望むウシからの受精胚の確保が可能となれば受け入れ易い。そして次に問題になることは、どれだけの個数の受精胚を確保することができるかということと、経膈採卵終了後に問題なく人工授精を行い、後継牛が確保できるかということである。また、受精胚における雄雌比率は、通常 1:1 であるが、酪農経営において必要とされるのは、雌牛のみであり、これをどのような手法を用いて確保するかということである。近年、ウシ性別別精液も販売されるようになってきており、これらを上手く利用することで希望する性別の産子を得ることもできるようになりつつある。この性別別精液を人工授精でなく、過剰排卵・人工授精による体内受精胚生産や体外受精に利用することで複数の性別別済み受精胚を生産することも可能と考えられる。しかしながら、現時点では、性別別精液の精子活力が低いため、多量な性別別精液を一度に子宮内に挿入する必要があり、まだまだ安定した受胎率が得られないのが現状である。また、農家が希望する個体の性

判別精液が必ずしも必要量生産できているとは限らず、販売されている個体の精液は、本数やそのロットが十分に確保できないことも問題であり、実用化まではもう少し時間が必要と考えられる。

本研究で、まず最初に着目あるいは着手した検討事項は、GnRH 製剤による卵胞波の人為的制御である。GnRH は視床下部から分泌されるペプチドホルモンで、脳下垂体前葉に作用して、FSH と LH の合成と分泌を促進し、卵巢や精巣に働きかけを行い、卵巢では卵胞の発育や排卵、精巣では精子形成を制御を行う。ウシでは排卵障害や子宮内膜症の治療薬として利用されている。近年、GnRH 製剤は、過剰排卵処置や定時人工授精技術にも用いられており、抗体産生や反復性にも問題が無いと考えられている。本研究では、新たな経膈採卵の効率化を目指した。つまり第2章では、GnRH の卵胞波新生作用を利用し、ウシ経膈採卵時に、数多くの卵子を採取することを目的として研究を実施した。本来であれば、ホルスタイン種で実験すべきであるが、研究に利用できるウシの確保が難しく、そのモデルとして黒毛和種を利用することにした。黒毛和種を用いて、これまで研究がなされている優勢卵胞の人為的除去や卵胞刺激ホルモン (FSH) 等の処置とは別の、新たな簡易法で実施可能な GnRH による卵胞波の新生の効果について試みた。発情周期の任意の時期に卵胞波の新生を誘起させるため、2種類のGnRH アナログ製剤 (フェルチレリン及びブセレリン) をウシに投与して、モニター上で観察できる卵巢内卵子数の推移、COCs 採取数やその品質の検討を行った。

次に、特定の性別のみの産子を生産するために、受精胚での性判別技術について検討した。ウシ受精胚からマイクロマニピレーター等の機器を使用せず、簡易な性判別 (遺伝子診断) 用細胞のサンプリング技術開発を行った。この細胞剥離法は、実体顕微鏡と細く伸ばしたガラス管を用い、桑実期胚から遺伝子検査用サンプル細胞を採取するものであり、割球吸引法と同様に、細胞への物理的障害を最小限にすることが可能と考えられる。本研究の第3章では、ウシ体外受精胚から細胞剥離法及びブレード切断法で性判

別用サンプル細胞を採取し、採取される細胞数の比較、採取後の受精胚の生存性、修復培養後の受精胚の総細胞数及び受胎性などの比較を行い、その有効性について検討を行った。

第4章では、年間に生産可能な子牛数を増加させるため、生理的空胎期間を利用して経膈採卵・体外受精胚生産がどの程度可能かを調査するために、分娩後40～80日までの泌乳最盛期のホルスタイン種に、第2章で有効性が明らかにされたGnRH製剤を経膈採卵48時間前に投与し、採取した卵子を用いて体外受精胚生産を試みた。GnRH投与によって経膈採卵・体外受精で胚盤胞期胚の作出を行い、その胚の受胎性に問題がないかどうかの確認を行った。また、複数回の経膈採卵実施後に、人工授精を実施して、その後の繁殖性（受胎性）に与える影響についても調査を行った。

## 第2章 ウシ経膣採卵における性腺刺激ホルモン放出ホルモンの投与効果について

### 第一節 緒言

生きたウシの卵巢から直接卵子を採取できる、経膣採卵法(Pieterse et al., 1988)は、ウシの新たな繁殖技術として用いられるようになってきている。この方法は、生きたウシから反復して、卵巢内から卵子を直接採取できる大きなメリットがある。また、この経膣採卵法は、過剰排卵処置（より多くの体内受精胚生産のためのホルモン処理）を実施できない、妊娠90日齢程度までの初期妊娠牛(Meintjes et al., 1995; Rust et al., 1999)や繁殖障害牛(Looney et al., 1994)からも卵子採取が可能であり、実用性も高いと考えられている。さらに、経膣採卵法は、過剰排卵技術と同様に育種改良に必要な経済的に優良な個体を短期間に増やすことができる技術(Humblot et al., 2010)として期待されている。

1回の採卵作業で多くの受精胚を生産できることは、ウシの育種改良を効率的に進める上で欠かせないことである。また、多くの卵子が採取できれば、体外受精胚が多数生産できるとともに、培養に用いる卵丘細胞卵子複合体(Cumulus-Oocyte Complexes: COCs)数が多ければ、その後の胚盤胞期胚までの発生にも良い影響を与えることも報告されている(O'Doherty et al., 1997)。従って、特に採取される卵子数が限定される経膣採卵においてはその数を増やすことが強く望まれている。これまで、経膣採卵において採取される卵子数を増加させることを目的に、採卵間隔(Shans et al., 1991; Simon et al., 1993)、優勢卵胞の吸引除去(Lindsey et al., 1994; Ooe et al., 1997; Boni et al., 1997)及びFSH投与(Bungartz et al., 1995; Rust et al., 1999; Goodhand et al., 2000; Aller et al., 2010)等の検討が行われているが、まだ、確実な方法は見出されていない。

いのが現状である。従って、経膣採卵を効率的にするためには、簡易かつ反復投与が可能なホルモン処置で採取可能な卵子数を増加させる必要がある。

性腺刺激ホルモン放出ホルモン (Gonadotrophin Releasing Hormone: GnRH) は、かつて Luteinizing Hormone Releasing Hormone (LHRH) と称されており、10 個のアミノ酸から構成される視床下部ペプチドである。GnRH は、脳下垂体前葉に働きかけ、LH 放出のほか FSH 放出作用もあり、卵胞嚢腫や卵巣静止等の幅広い繁殖障害治療に多く用いられている (Dorse and Thatcher, 1992)。この GnRH は、比較的単純な構造のため、数多くのアナログが合成され、商品化されており、繁殖障害治療薬のほか、近年では、定時人工授精のため卵胞波を同期化させる目的で広く利用されている (Pursley et al., 1997; Yamada et al., 1999)。

GnRH は、優勢卵胞存在下で、その卵胞を排卵もしくは閉鎖させると報告 (Retter et al., 1992) されており、これに続く、内因性 FSH の上昇 (Gibbons et al., 1994) によって、経膣採卵のタイミングに合わせて適切な時期に、新たな卵巣内卵胞の新生や発育を誘起することで、モニターで観察できる卵胞数を増加させることが可能であると考えられる。従って、GnRH は、経膣採卵に利用できる可能性が高いと考えられる。本研究では、まず、外部からの GnRH 投与によって卵胞波の新生による経膣採卵時の採取卵子個数の推移を確認し、次に、最も経膣採卵に適した時期を検討した。また、日本で広く利用されている強力な作動薬であるブセレリンと日本で開発されたフェリチレリンを用いて、どちらがより経膣採卵に適しているかを明らかにするため、モニター上で観察できる卵巣内卵胞数の推移と経膣採卵される COCs 数及びその品質について検討した。

## 第二節 材料及び方法

広島県立総合技術研究所畜産技術センター及び県立広島大学で繋養されている黒毛和種経産牛延べ 14 頭をホルスタイン種のモデル動物として用い実験を実施した。超音波画像診断装置（アロカ社 SSD-1200, Tokyo, Japan）に経膈穿刺用コンベックス探触子（アロカ社 UHT-9106-7.5, Tokyo, Japan）を装着し、ダブルルーメンニードル（K-OPSD-1760 Cook Medical Technology, Brisbane, Australia）及び卵子吸引システム（K-MAR-5115 Cook Medical Technology, Brisbane, Australia）を用いて経膈採卵を行った。2 mm 以上の卵胞から卵胞液とともに COCs を吸引採取した。吸引圧を 115 mmHg, 吸引速度を 20 ml/min とした。COCs 検索まで採取した卵胞液を 35°C に加温したチューブ加温器で保持した。

経膈採卵前にアドサン（Riken Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan）で尾椎硬膜外麻酔をかけ、長時間の卵巣操作を容易にした。

COCs 回収には、0.31% 乳酸加リンゲルに 3% ウシ胎児血清（Hyclone Fnakoshi K. K., Tokyo, Japan）及び 10 units/ml のヘパリン（Neotube Nipro, Osaka, Japan）を添加した回収液を用いた。COCs 回収後、セルコレクター（Cellcollector, Fujihira Industrial K. K., Tokyo, Japan）を用い、COCs を含む回収液中の夾雑物や血液を除去した。回収された COCs を 10% ウシ胎児血清（Fetal Calf Serum: FCS）を添加した PBS<sup>+</sup> 溶液に移し、実体顕微鏡を用いて COCs を観察した。

採取した COCs を、De Loos et al. (1989) の報告を参考にして、卵子周囲の卵丘細胞の付着状態と卵子細胞質の色調によって形態学的に以下の 4 つに分類した。Grade I は、卵丘細胞が 3 層以上緊密に付着しており、細胞質も均一なもの、Grade II は、卵丘細胞が緊密に付着しており、細胞質も均一なもの、Grade III は、一部卵丘細胞が付着していない箇

所があり、一部の細胞質が黒ずんで見えるもの、GradeIVは卵丘細胞が付着していないもしくは膨化しているもの（粘性を有しているものを含む）とした。

卵巣内の卵胞数や卵胞の直径については、ビデオテープで録画したものを再生してモニター上で数や大きさを確認し、記録した。

### 【実験1】

GnRH 投与後のウシ卵巣内卵胞の発育や発達状態を明らかにするために、黒毛和種をモデル動物として、発情周期に関係なく任意の時期に GnRH の投与を行い、投与0（投与直後）、24、48 及び 72 時間後の卵胞数と卵胞の直径を超音波画像診断装置で計測した。無処理区については、24 時間ごとに超音波画像診断を 4 日間にわたって実施し、卵胞数と卵胞の直径を測定した。GnRH 投与区では、フェルチレリン（Fertirelin acetate Boncirc Injection, Daiichi Seiyaku Co., Ltd., Tokyo, Japan; 商品名 ボンサーク注）を 1 頭当り 200  $\mu\text{g}$  を筋肉内投与し、投与 0、24、48 及び 72 時間目に卵胞数と卵胞の大きさの計測を行った。

### 【実験2】

GnRH 投与後に経膣採卵を実施した。経膣採卵の反復間隔を 1 週間とした。

本研究では、市販されている代表的な GnRH 製剤であるフェルチレリン製剤とブセレリン製剤（Buserelin Estomal Kawasakimitaka Co., Ltd., Tokyo, Japan; 商品名 エストマル注）2 種類を用い、投与量については、前者は 1 頭当り 200  $\mu\text{g}$  を、後者は 1 頭当り 2.5 ml（10  $\mu\text{g}$ ）とした。なお、両製剤とも筋肉内投与を実施した。投与後 48 時間目の経膣採卵成績に対する両製剤の効果について比較した。

### 【統計処理】

統計処理には、統計処理ソフト Statview 5.0 (ABACUS Concepts, Inc Berkely CA, USA) を用いた。実験 1 の卵胞数とその大きさについては、ANOVA で分析を行った。ANOVA で有意差が認められた場合には、Post-hoc test 検定を実施し、各群間における有意差を Tukey-Kamer 多重比較検定を行った。実験 2 も同様に卵胞数とその大きさ及び経膈採卵時の採取個数とグレードについて ANOVA 分析を行い、有意差検定については、Tukey-Kamer 多重比較検定を用い、有意差を  $P < 0.05$  で示した。

### 第三節 結果

GnRH 投与後の各時間 (0, 24, 48 及び 72 時間) における卵巣内の卵胞数と卵胞の直径の推移を表 2-1 に示した。GnRH 投与 48 時間後の 2~4 mm の卵胞において、GnRH 投与区の値 ( $11.0 \pm 4.8$  個) は、無処理区の値 ( $23.7 \pm 13.7$  個) に比較して有意に低かった。一方、4~6 mm の卵胞における 48 及び 72 時間後においては、無処理区ではそれぞれ、 $4.6 \pm 3.1$  個、 $5.0 \pm 3.0$  個であり、GnRH 投与区のそれらは、 $16.8 \pm 5.8$  個、 $10.0 \pm 4.5$  個であり、両時間ともに GnRH 投与区が無処理区に比較して有意に高い値を示した。同様に GnRH 投与 48 時間後の 6~8 mm の卵胞において GnRH 投与区の値 ( $3.8 \pm 2.8$  個) は、無処理区の値 ( $1.2 \pm 1.1$  個) に比較して有意に高かった。モニター上で観察できる卵巣内卵胞数の平均値も GnRH 投与 48 時間後 GnRH 投与区の値 ( $32.6 \pm 9.7$  個) は、無処理区の値 ( $30.0 \pm 12.7$  個) に比較して有意に高かった。

GnRH 投与 48 及び 72 時間後の平均卵胞径においても、無処理区は、それぞれ、 $3.1 \pm 1.3$  mm、 $3.3 \pm 1.7$  mm であり、GnRH 投与区のそれらは、 $4.3 \pm 1.4$  mm、 $3.7 \pm 1.7$  mm であり、両時間ともに GnRH 投与区が無処理区に比較して有意に高い値を示した。

2 種類の GnRH 製剤投与 48 時間後における卵巣内卵胞直径及び卵胞数を表 2-2 に示した。2~4, 6~8, 及び 8 mm 以上の卵胞数及び平均卵胞数においては、3 つの区間では、有意差が認められなかったが、4~6 mm の卵胞数においては、無処理区の値が  $4.9 \pm 2.2$  個、フェルチレリン投与区及びブセレリン投与区の値は、それぞれ  $10.8 \pm 6.7$  個及び  $9.9 \pm 4.6$  個であり、フェルチレリン投与区及びブセレリン投与区の値が無処理区の値と比較して有意に高かった。また、平均卵胞直径においても同様に無処理区で  $3.4 \pm 1.7$  mm、フェルチレリン投与区及びブセレリン投与区でそれぞれ  $3.7 \pm 1.3$  mm、 $3.8 \pm 1.4$  mm であり、フェルチレリン投与区及びブセレリン投与区の値が無処理区の値と比較

して有意に高かった。

GnRH 製剤投与が経膣採卵成績に与える効果を表 2-3 に示した。平均採取個数のうち Grade I, Grade III, Grade IV 及び総採取個数においては, 無処理区とフェルチレリン投与区及びブセレリン投与区の各区間には有意差は認められなかった。しかし COCs の品質における Grade II では, フェルチレリン投与区が  $5.6 \pm 2.9$  個, ブセレリン投与区が  $2.9 \pm 2.6$  個であり, フェルチレリン投与区がブセレリン投与区に比較して有意に高い値を示した。

表 2-1. GnRH 投与後の各時間における卵巣内の卵胞数と卵胞直径

処理法 (供試 頭数)	投与 後時 間(h)	卵巣内卵胞数*				平均数	平均卵胞 直 径 (mm)*
		卵胞の大きさ (x mm)					
		$2 \leq x < 4$	$4 \leq x < 6$	$6 \leq x < 8$	$8 \leq x$		
無処理 (n=9)	0	21.8 ± 11.9	3.0 ± 1.9	0.4 ± 0.5 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.9	26.2 ± 13.2	3.1 ± 1.8
	24	19.1 ± 13.8	5.6 ± 2.8	1.3 ± 1.2	1.0 ± 0.7	27.0 ± 11.6	3.4 ± 1.9
	48	23.7 ± 13.7 <sup>a</sup>	4.6 ± 3.1 <sup>a</sup>	1.2 ± 1.1 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.9	30.0 ± 12.7 <sup>a</sup>	3.1 ± 1.3 <sup>a</sup>
	72	22.0 ± 12.3	5.0 ± 3.0 <sup>a</sup>	0.9 ± 1.3	0.7 ± 0.7	28.6 ± 9.7	3.3 ± 1.7 <sup>a</sup>
GnRH 投与 (n=9)	0	19.8 ± 7.8	4.0 ± 2.7	1.6 ± 1.5 <sup>b</sup>	1.1 ± 2.0	26.4 ± 7.2	3.4 ± 1.8
	24	16.9 ± 9.2	7.6 ± 3.6	1.0 ± 0.9	1.2 ± 0.8	26.7 ± 9.0	3.7 ± 1.7
	48	11.0 ± 4.8 <sup>b</sup>	16.8 ± 5.8 <sup>b</sup>	3.8 ± 2.8 <sup>b</sup>	1.0 ± 1.1	32.6 ± 9.7 <sup>b</sup>	4.3 ± 1.4 <sup>b</sup>
	72	15.8 ± 6.2	10.0 ± 4.5 <sup>b</sup>	1.9 ± 1.5	0.9 ± 1.3	28.6 ± 6.4	3.7 ± 1.7 <sup>b</sup>

\*平均値 ± S. D.

<sup>a, b</sup>同一欄内の同一投与後時間における異符号間に有意差あり ( $P < 0.05$ ).

表 2-2. 2 種類の GnRH 製剤投与 48 時間後における卵巣内卵胞の大きさ及び卵胞数

処理 (供試頭数)	投与後 時間 (h)	卵巣内卵胞数*				平均卵胞直 径 (mm)**		
		総数	卵胞の大きさ (x mm)					
			2 ≤ x < 4	4 ≤ x < 6	6 ≤ x < 8		8 ≤ x	
無処理 (14)	48	326	16.7 ± 12.8	4.9 ± 2.2 <sup>a</sup>	0.9 ± 0.8	0.7 ± 0.6	23.3 ± 12.3	3.4 ± 1.7 <sup>a</sup>
フェルチレリン投与(14)	48	375	14.2 ± 9.3	10.8 ± 6.7 <sup>b</sup>	1.1 ± 1.1	0.6 ± 1.0	26.8 ± 11.7	3.7 ± 1.3 <sup>b</sup>
ブセレリン投与(14)	48	342	12.6 ± 9.3	9.9 ± 4.6 <sup>b</sup>	1.4 ± 1.0	0.6 ± 1.0	24.5 ± 12.8	3.8 ± 1.4 <sup>b</sup>

\*平均値 ± S. D.

<sup>a, b</sup> 同一欄内の異符号間に有意差あり ( $P < 0.05$ ).

表 2-3. GnRH 製剤投与が経膣採卵成績に与える効果

処 理 処理薬剤 (供試頭数)	平均採取個数*				総採取個数
	COCs 品質区分				
	Grade I	Grade II	Grade III	Grade IV	
無処理(14)	1.9 ± 2.7	3.4 ± 3.2	8.4 ± 7.3	3.5 ± 2.7	17.2 ± 14.6
フェルチレリン投与(14)	2.8 ± 2.9	5.6 ± 2.9 <sup>a</sup>	11.9 ± 5.8	3.9 ± 3.7	24.3 ± 11.5
ブセレリン投与(14)	3.6 ± 2.9	2.9 ± 2.6 <sup>b</sup>	8.9 ± 5.3	5.5 ± 3.7	21.6 ± 13.3

\*平均値 ± S. D.

<sup>a, b</sup> 同一欄内の異符号間に有意差あり ( $P < 0.05$ ).

#### 第四節 考察

本研究に用いた、フェルチレリン ( $C_{55}H_{75}N_{16}O_{16}$ ) の分子量は、1213.36、また、ブセレリンの分子量は 1299.48 である。これらの分子量は、卵胞刺激ホルモン (Follicle Stimulating Hormone: FSH)、妊馬血清性腺刺激ホルモン (Pregnant Mare Serum Gonadotropin: PMSG) やヒト絨毛性腺刺激ホルモン (Human Chronic Gonadotropin: hCG) と比較すると、小さいため抗体産生の可能性が少ないと報告 (Shally et al., 1973) されており、反復投与ができる可能性が高く、短期間に反復して卵巣内卵子を採取する経膣採卵に適していると考えられる。

外部からの GnRH 投与によって、卵胞波を新生できることが報告されており (Sato et al., 2005)、本研究でも、1 回当たり 200  $\mu$ g/頭の GnRH を投与し、卵胞の大きさに及ぼす影響を検討した結果、モニター上で観察できる卵巣内の総卵胞数に有意差は認められなかったが、数値的には高くなっていた。また、その卵胞径については、GnRH 投与後 48 時間目以降、有意に大きな値となっており、GnRH 投与によって卵巣内の卵胞が発育していることが示された。

この卵胞発育効果については、フェルチレリン及びブセレリンの両製剤ともに同様な効果を示しており、GnRH 製剤の経膣採卵前投与は、卵胞波の新生や卵胞の発育に効果的であると考えられた。フェルチレリン投与後、血中 LH 濃度が 2~2.5 時間でピークに達する (Chenault et al., 1990; Osawa et al., 1997) こと、黄体形成ホルモン (Luteinizing Hormone: LH) と FSH 放出により様々なステージの卵胞が排卵にまで至ること (Retter et al., 1992) から、本研究においても、GnRH 投与により LH や FSH 放出が起きたことで、GnRH 後 24 時間以降において卵巣内の卵胞動態が変化したと考えられる。

優勢卵胞存在下で GnRH 投与を行った場合、優勢卵胞の排卵が 24~32 時間後に起こる

との報告 (Pursley et al., 1995) があり、その時間の前後において新たな卵胞の動員が開始されると考えられる。GnRH の作用について、内因性 FSH が GnRH 投与後 30 分もすれば上昇する (Nakada et al., 2002)、また、内因性 FSH の上昇は、2 時間でピークを迎えると報告 (Chenault et al., 1990) されている。従って、本研究でも GnRH 投与後 24 時間までは卵巣内の卵胞に大きな変化が見られなかったが、48 時間目以降に 4~8 mm の小型から中型の卵胞が多くなっており、これらの報告の結果と一致している。また、GnRH 投与 2 日後に 4~6 mm の中型卵胞が多くなるとの報告 (Kohram et al., 1998) や優勢卵胞の排卵もしくは閉鎖と内因性 FSH の上昇 (Chenault et al., 1990) による卵胞波の新生が起こると報告 (Wolfenson et al., 1994; Tohei et al., 2001) されており、本研究で得られた結果とほぼ一致している。つまり GnRH 投与によって新たな卵胞波が誘起されたことで、新たな卵胞の動員と卵胞の発育が促進され、GnRH 投与後 48 時間目以降でモニターで観察できる卵巣内の卵胞数の値が多くなり、卵胞径の増大も見られたと考えられる。

本研究において、GnRH 投与後 24 時間目では、投与後 0 時間目と比較すると、4~5 mm の中小卵胞の割合が増加していた。また、GnRH 投与後 48 時間目では、2~3 mm の小卵胞より 4~5 mm の中小卵胞割合が高くなった原因については、GnRH 投与による内因性 FSH の影響で卵巣内の卵胞の発育に変化が生じたことが推測される。

GnRH 投与後 72 時間目では、一旦増加した卵巣内のモニター上で観察できる卵胞数が低下する現象が見られている。この現象に関して、優勢卵胞の排卵もしくは閉鎖は、その卵胞から分泌されるインヒビンによる、他の卵胞の発育抑制を解放するとの報告 (Adams et al., 1992; Walton et al., 1993) や抗インヒビン血清を投与した実験において、血中 FSH 濃度の上昇から 36 時間後に小型卵胞が増加し、血中 FSH 濃度の減少とともにその数を低下させ大型卵胞が多くなるとの報告 (Kaneko et al., 1993) もあることから、本研究におけるモニター上で観察できる卵胞数の低下は、GnRH 投与後 72 時間目では、卵

胞波の新生によって動員された小卵胞が発育後、新たな優勢卵胞選択の過程の中で、閉鎖へと向かった結果であると推察される。

動物用 GnRH 製剤として、日本国内で販売されているものは 3 種類である。天然型（ゴナレリン）とフェルチレリン製剤は同等の作用を有するが、ブセレリンはフェルチレリンと比較すると半減期が長く（Chenault et al., 1990）、また、高い FSH 放出作用を持っている。半減期の短いフェルチレリンは一過性のシャープな LH サージを必要とする卵胞嚢腫や排卵障害の治療に向いている（Kittok et al., 1973）。また卵巣静止の様な持続性 FSH 作用が必要なものにはブセレリンが適していると考えられ、それぞれの治療に使い分けがなされている。また、ブセレリンは 10 位と 6 位の 2 ヶ所を置換することで作用が強力になる様に設計されている。LH 活性はフェルチレリンの 10 倍程度、FSH 活性も高くなっている。GnRH 投与後の LH サージ開始時間は、フェルチレリンが 60～90 分に対しブセレリンは、150 分とやや遅くなるとの報告（Chenault et al., 1990）がある。以上のように両製剤の特徴や作用及び利用方法も差があることは明らかであるが、本研究における経膈採卵の卵胞発育に関しては、両製剤間での顕著な差は確認することが出来なかった。しかしながら、両製剤ともに GnRH 投与後 48 時間目の卵巣内卵胞動態は、無処理区と比較して、モニター上で観察できる平均卵胞径が有意に高い値を示しており、卵胞波の新生と内因性 FSH の作用によって卵胞径が変化したと考えられる。本研究で、フェルチレリン処理区が他の 2 区に比較して有意差は認められなかったがモニター上で観察できる卵胞数が最も高くなっていた。GnRH 投与後 48 時間目における 2～3 mm の小卵胞数は、無処理区に比較して GnRH 投与区では少なくなる一方で、4～5 mm の中小卵胞数は高くなっており、GnRH 製剤投与の効果そのものは確認できたが、フェルチレリンとブセレリン製剤間での大きな差は見られなかった。採取した COCs の品質で Grade II がフェルチレリン投与区で優位に高くなっており、品質に与える影響は、高い FSH 放出作用のあるブセレリンよりも、半減期の短いシャープな効果のあるフェルチレリンの方が効果

が高いのかもしれない。

これらの結果から、ブセレリン及びフェルチレリン製剤のどちらを用いても、モニターで観察できる卵巣内の卵胞数を増加させる効果は有していると考えられる。

投与0時間において6~8 mmの中型卵胞が無処置区に比較してGnRH投与区で高くなっていた。この投与時における両区の差については不明であるが、今回実験に用いた頭数は、9頭であったことや、個体間のばらつきも大きかったことが関係しているのかもしれない。これらの個体間のばらつきについては、試験頭数を増やすなどして正確度を上げる必要があると考えられる。

以上記述してきたように、今回の結果から、どちらの製剤がより経膣採卵に適しているか判断することは難しいが、どちらのGnRH製剤もモニター上で観察できる平均卵胞径は大きくなることで吸引作業性は容易になることが確認された。

## 要約

本研究では、GnRH の卵胞波新生作用を利用し、ウシ経膣採卵時に、数多くの卵子を採取することを目的とした。発情周期の任意の時期に卵胞波の新生を誘起させるため、2種類の GnRH 製剤（フェルチレリンとブセレリン）を投与して、卵巣内卵胞数の推移、COCs 採取数及びその品質を検討した。GnRH 投与 0 時間から 24 時間間隔で 72 時間目まで、卵巣内の卵胞動態を超音波画像診断装置を用いて行った。また、GnRH 投与後 48 時間目に経膣採卵を実施し、COCs 採取数及びその品質を検討した。

実験 1 では、GnRH 投与 48 時間後の 2~4 mm の卵胞において GnRH 投与区の値 ( $11.0 \pm 4.8$  個) は、無処理区の値 ( $23.7 \pm 13.7$  個) に比較して有意に低かった。一方、4~6 mm の卵胞における 48 及び 72 時間後においては、無処理区は、それぞれ  $4.6 \pm 3.1$  個、 $5.0 \pm 3.0$  個であり、GnRH 投与区のそれらは、 $16.8 \pm 5.8$  個、 $10.0 \pm 4.5$  個であり、両時間ともに GnRH 投与区が無処理区に比較して、有意に高い値を示した。同様に GnRH 投与 48 時間後の 6~8 mm の卵胞における GnRH 投与区の値 ( $3.8 \pm 2.8$  個) は、無処理区の値 ( $1.2 \pm 1.1$  個) に比較して有意に高かった。モニター上で観察できる卵胞数の平均値も GnRH 投与 48 時間後 の GnRH 投与区の値 ( $32.6 \pm 9.7$  個) は、無処理区の値 ( $30.0 \pm 12.7$  個) に比較して有意に高かった。

モニター上で観察できる平均卵胞径においても、GnRH 投与 48 及び 72 時間後においては、無処理区は、それぞれ  $3.1 \pm 1.3$  mm、 $3.3 \pm 1.7$  mm であり、GnRH 投与区のそれらは、 $4.3 \pm 1.4$  mm、 $3.7 \pm 1.7$  mm であり、両時間ともに GnRH 投与区が無処理区に比較して、有意に高い値を示した。

2 種類の GnRH 製剤投与効果については、投与後 48 時間目における卵巣内の 2~4、6~8、及び 8 mm 以上の卵胞数及び平均卵胞数においては、3 つの区（無処理、フェルチ

レリン及びブセレリン投与区)には有意差が認められなかった。しかし、4~6 mm の卵胞数は、無処理区の値が  $4.9 \pm 2.2$  個、フェルチレリン投与区及びブセレリン投与区の値がそれぞれ  $10.8 \pm 6.7$  個及び  $9.9 \pm 4.6$  個であり、フェルチレリン投与区及びブセレリン投与区の値が無処理区と比較して、有意に高い値であった。また、モニター上で観察できる平均卵胞直径においても同様に、無処理区で  $3.4 \pm 1.7$  mm、フェルチレリン投与区及びブセレリン投与区で、それぞれ  $3.7 \pm 1.3$  mm、 $3.8 \pm 1.4$  mm であり、フェルチレリン投与区及びブセレリン投与区が無処理区と比較して有意に高い値を示した。GnRH 製剤投与が経膈採卵成績に与える効果については、平均採取個数のうち Grade I, Grade III, Grade IV 及び総採取個数においては無処理区とフェルチレリン投与区及びブセレリン投与区の各区間に有意な差は見受けられなかったものの、COCs 品質における、Grade II では、フェルチレリン投与区が  $5.6 \pm 2.9$  個、ブセレリン投与区が  $2.9 \pm 2.6$  個であり、フェルチレリン投与区がブセレリン投与区に比較して有意に高い値を示していた。

以上の結果より、GnRH 投与後 48 時間後において、モニター上で観察できるウシ卵巢内卵胞数が最も多くなり、また、超音波画像診断装置のモニターで観察・吸引作業が容易な 4~6 mm の中小型卵胞が多く認められたことから、この GnRH 投与から 48 時間後に経膈採卵を実施することが有効であると考えられた。また、ブセレリン及びフェルチレリンのいずれも、経膈採卵前に投与することで、体外培養可能な COCs を効率的に採取することができると考えられた。

### 第3章 マニピュレーターを必要としない性判別用細胞の

#### サンプリング方法の開発

##### 第一節 緒言

畜産業にとって希望とする性別の産子生産は、経済的に重要であり、簡便で迅速かつ正確な性判別法が確立できれば、ウシの性判別胚の生産が商業ベースで受精胚移植プログラムに組み込まれ、産業を発展をさせることが可能となる (Geshi, 2012)。多くの研究者がウシの効率的な育種改良を期待し、2分割胚による一卵生双子生産 (Ozil et al., 1982)、顕微授精 (Goto et al., 1990) 及び核移植技術 (Willadsen, 1987) など高度な受精胚操作を実施している。また、顕微操作技術の進展で、受精胚からの細胞サンプリングによる性判別済み産子もウシでも得られるようになっている (Thibier and Nibart, 1995)。

出生前の遺伝子検査を目的として、多くの研究者が受精胚からの遺伝子診断用サンプル採取を試み、性判別 (Hirayama et al., 2004a)、経済的形質 (Hirayama et al., 2008)、遺伝病検査済みの産子 (Hirayama et al., 2004b) が誕生する段階にまで技術が進歩している。受精胚の遺伝的情報を検査するための細胞サンプリング方法として、いくつかの顕微操作法が開発されている。胚盤胞期胚からの金属刃による栄養膜細胞の一部を採取する方法 (Thibier and Nibart, 1995; Leoni et al., 2000)、8細胞期胚や初期桑実期胚の割球を吸引する方法 (Vajta et al., 1997; Shirazi et al., 2010)、拡張胚盤胞期胚のスリットからの脱出細胞採取 (Leoni et al., 2000) や囲卵腔に存在する変性細胞を利用する方法 (Lopatarova et al., 2007) 等があるが、以下にこれらの技術について詳しい説明と問題点を記述する。

日本で最も多く利用されている方法は、ブレードによる栄養膜細胞切断（ブレード切断法）であり、マイクロマニピュレーターに眼科手術用金属刃をセットして行われる（Thibier and Nibart, 1995; Hirayama et al., 2004a; Lopatarova et al., 2007; Shirazi et al., 2010）。この方法が最も多く利用されている理由は、受精胚を切断する顕微操作時に、マイクロマニピュレーターに設置する左右両腕を必要としないこと、市販の眼科用メスをセットするだけで準備が完了することができ、比較的短時間に簡易な作業で遺伝子診断用のサンプル細胞が採取できることにある（Hasler et al., 2002）。しかし、この方法には次のようないくつかの問題がある。①ブレードで栄養膜細胞を採取する方法は、確実な採取が行える一方、受精胚を物理的に切断するため、残りの胚に対するダメージが大きい欠点があり、修復培養後の耐凍性、生存性や受胎性が低下する（Skrzyszowska and Smorag, 1987; Schmidt et al., 1992; Mapletoft and Hasler, 2005）。②ブレード自身に細胞片が付着する（Herr and Reed, 1991）可能性を否定できず、DNAのコンタミネーションを防止するために、個別の受精胚ごとにブレードを交換する必要があり、時間と労力を要するため、商業ベースの実用化向けには課題が残る。

一部の研究機関で行われている、割球吸引法はコンパクションを起こす前の桑実期胚の利用が可能であり、サンプリング細胞数を数個単位で調節することができるメリットがある。また、この方法は、細胞自身を破壊しないため、受精胚に対するダメージも最小限に止めることができ、その後の胚の保存や、受胎性に対する影響も良好なものが多い。さらには、この方法を改良したヘルニア法（Leoni et al., 2000）では、透明帯にスリットを作り、そこから脱出する細胞の一部を採取する。この方法では、数多くのサンプル細胞を採取できるメリットがあるが、サンプル細胞を採取する時期が胚の発育に左右されるため、計画をたてにくいデメリットが存在する。これらブレード切断、割球吸引やヘルニアといった方法はいずれもマニピュレーターといった高価な機器・設備を使用する必要がある。また、マニピュレーターの操作には高度な技術を必要とする（Herr

and Reed, 1991) ため、熟練技術者が不可欠である。また、マイクロマニピュレーターを用いた受精胚の顕微操作には、ガラス管を細く引き延ばすツールの作製や操作において高度な技術が必要であり (Mapletoft and Hasler, 2005), 特別な装置の完備された研究機関でしか実施できない欠点が存在する。さらには、顕微操作によってサンプル細胞を採取した受精胚の生存性や受胎性の低下といった問題点が指摘されている (Schmidt, 1992; Thibier and Nibart, 1995; Mapletoft and Hasler, 2005)。

そこで、本研究では、受精胚の生存性に悪影響を与えず、受胎性も維持できる新たなバイオブシー方法の開発を試みた。この方法は、受精胚クローン作出の際に、ドナー割球の分離技術を応用したもので、割球間の接着性を弱めるトリプシン処理とガラス管によるピペッティング処理による物理的な作用を組み合わせたものである。この方法 (細胞剥離法) では、実体顕微鏡下で処理を行うため、これまでの他の細胞操作の様に倒立顕微鏡とマイクロマニピュレーターを必要としない利点もあり、短時間で簡易にサンプル細胞を採取できる。本研究では、我々が開発した細胞剥離法と最も多く利用されている栄養膜細胞ブレード切断法を用いて、受精胚から遺伝子診断用のサンプル細胞採取を行い、その後に性判別を行い、バイオブシー後の胚の生存性、受胎性について両方法を比較検討した。

## 第二節 材料及び方法

### 【体外受精胚生産】

ウシ体外受精胚生産には、と体卵巣もしくは、広島県総合技術研究所畜産技術センターで繋養されている黒毛和種あるいはホルスタイン種延べ 60 頭の卵巣から経膣採卵によって得られた卵丘細胞卵子複合体 (Cumulus-Oocyte Complexes: COCs) を用いた。と体卵巣を 37°C に加温した生理的食塩水に 0.1 mg/ml カナマイシン (硫酸カナマイシン; 明治製菓, Tokyo, Japan) を添加した溶液に入れ、実験室に輸送した後、21G5/8 注射針 (テルモ, Tokyo, Japan) を装着した 5ml のディスポシリンジを用い、2~10 mm の卵胞から卵胞液と共に COCs を吸引採取した。採取した卵胞液を 38°C に加温した 10%ウシ胎児血清 (Hyclone; フナコシ, Tokyo, Japan) 添加, ダルベッコ修正-PBS 入りの遠心管に集めた。

供卵牛への GnRH 投与については、発情周期に関係なく任意な時期に、経膣採卵 48 時間前に皮下注射により実施した。

経膣採卵を 2 週間に 1 回の間隔で実施した。長時間の直腸からの作業を容易にするため、経膣採卵前に、アドサン 4 ml/頭 (理研製薬, Tokyo, Japan) で尾椎硬膜外麻酔処理を行った。経膣採卵を第 2 章の記述と同様な方法で実施した。

COCs の品質の評価については、第 2 章の記述と同様に実施した。

体外成熟には Grade I から III までを供試し、20%ウシ胎児血清を添加した M2 液 (M-5910, Sigma Aldrich Japan, Tokyo, Japan) で 3 回以上洗浄した。その後 TCM-199 培地 (GIBCO 12340-030, Grand Island, NY, USA) に 20%FCS, 卵胞刺激ホルモン (FSH) 0.12 mg/ml (Kyoritu Seiyaku Co., Ltd., Tokyo, Japan) 及び上皮成長因子 50 ng/ml (E-1264, Sigma Aldrich Japan) を添加した体外成熟培地で 38.5°C, 5%CO<sub>2</sub>, 95%空気の条件下で成熟

培養を 20～22 時間行った。

成熟培養終了後、堀内らの方法 (Horiuchi et al., 2002) に準じて体外受精を実施した。媒精には、凍結精液を用い、精子濃度を  $12 \times 10^6$  /ml に調整し、媒精時間を 6 時間とした。媒精後 72 時間目までは、100  $\mu$ l のドロップレット mSOF 培地 (Takahashi and First, 1992) にミネラルオイル (23306-84, Nakarai Tesque, Kyoto, Japan) を重層し、培養を行った。この mSOF 培地には、ウシ血清アルブミン 3 mg/ml (A-4378, Sigma Aldrich Japan) とリノール酸アルブミン 0.25 mg/ml (L-8384, Sigma Aldrich Japan) を添加し、培養条件を 38.5°C, 5%CO<sub>2</sub>, 90%N<sub>2</sub> とした。また、72 時間目以降の培養には、10%FCS とリノール酸アルブミン 0.25 mg/ml (Sigma L-8384) を添加した培養液を用い、38.5°C, 5%CO<sub>2</sub>, 95%空気の条件下で Vero 細胞 (Carnegie et al., 1997) との共培養を行った。

#### 【受精胚のバイオプシー】

バイオプシーには、体外受精後 7 日目の胚盤胞期胚の栄養膜細胞をブレードで切断したブレード切断法と細胞剥離法の 2 つの方法を用い、サンプリングを行った。ブレード切断法では、位相差倒立顕微鏡 (Nikon Diaphoto 300, Tokyo, Japan) と操作システム (Leitz micromanipulator M Leitz, Germany) と金属ブレード (Micro Feather BLADE) を装備したマイクロマニピュレーターを用い、直径 30 mm のディツシュ (Becton-Dickinson 3002) に 50  $\mu$ l の 0.1 M サッカロース (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Tokyo, Japan) 及び 20%FCS 添加 M2 液ドロップを数個つくり、流動パラフィン (Nakarai) でカバーした後、胚盤胞胚の切断を行った。栄養膜細胞を 1/3 程度切除した胚盤胞期胚を 20% FCS 添加 M2 液で 6 回洗浄後、10%FCS 添加 mSOF 培地に移し、38.5°C, 5%CO<sub>2</sub>, 95%空気の条件下でフィーダー細胞としての Vero 細胞との共培養を 2～3 時間行った。この修復培養後、胞胚腔の再形成を確認し、生存性と発育性を評価した。

細胞剥離法には、体外受精後 5 日目の桑実期胚を用いた (図 3, ①)。桑実期胚を 0.25%

アクチナーゼ E (Actinase E, Kaken Seiyaku Co., Ltd., Tokyo, Japan) 添加した m-PBS に 60 秒間浸漬し、透明帯を溶解した後 (図 3, ②), 直ちに 20%FCS 添加 M2 液に移して、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 (27250-042, GIBCO Grand Island, NY, USA) と 0.02%EDTA4Na (E4DS, Sigma Aldrich Japan) 添加ダルベッコ修正-PBS に入れ、細胞剥離操作を行った。この操作には、ガスバーナーで細く伸ばしたピペット (ガラス切断内径:110  $\mu\text{m}$ ) に加工したガラス製毛細管キャピラリー (057910, Drummond, Broomal, PA, USA) を用い、ピペットで数回ピペッティングすることで胚外層細胞を剥離させた (図 3, ③)。数個の細胞が剥がれたところで、20%FCS 添加 M2 液で酵素の作用を停止させた。細胞を剥離した後、受精胚を 10%FCS 添加 mSOF 培地で 38.5°C, 5%CO<sub>2</sub>, 95%空気の条件下で Vero 細胞と共培養 (48 時間) し、胚盤胞期までの発生能を確認した (図 3, ④)。

#### 【性判別】

ブレード切断及び細胞剥離したサンプル用細胞を 20%FCS 添加 M2 液で 6 回洗浄した後、1 mg/ml Polyvinilalchol (PVA M. W. 30,000-70,000, WAKO, Tokyo, Japan) 添加 PBS (-) で 6 回洗浄し、最後にオートクレーブで滅菌した蒸留水で洗浄した。Agung et al. (2006) の方法に準じて、Loopamp 牛胚性判別試薬キット (EIKEN CHEMICAL Co., Ltd., Tochigi, Japan) で性判定を行った。このキットは LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法を利用して、ウシの受精胚から性判別を行うもので、細胞核内に存在する雄特異的核酸配列を認識するプライマーと雌雄共通核酸配列を認識するプライマーを用いて、核酸の増幅を行った。この核酸の増幅には Loopamp エンドポイント濁度測定装置を利用し、63°C で 10 分間、81°C でさらに 10 分間処理を行い、核酸の増幅反応副産物であるピロリン酸マグネシウムの白濁度を測定することで判定した。

判定作業は、以下の通りである。まずブレード切断法及び細胞剥離法で採取したサン

プル細胞を滅菌蒸留水中で洗浄した後、バイオブシーサンプル液に移した。6  $\mu\text{L}$  を前処理用チューブに移した。その中に、付属の Extraction Solution 6  $\mu\text{L}$  を添加し、室温で5分間以上静置した。静置後、攪拌を行った後、遠心機でスピンドウン処理し、あらかじめ準備した雄反应用マスターミックス溶液 20  $\mu\text{L}$  と雌雄共通反应用マスターミックス溶液 20  $\mu\text{L}$  にサンプル液 5  $\mu\text{L}$  ずつ添加し、攪拌後、スピンドウンを行い Loopamp エンドポイント濁度測定装置にセットして測定した。全ての作業は、約 40 分間で終了した。

採取されたサンプル細胞及び修復培養を行った受精胚における細胞数の算出は、Pursel et al. (1985) の方法に準じた。具体的には、細胞片をワセリンとパラフィンを混合したスポット 4 点をつけたスライドガラス上に置き、そのスポットにカバーガラスを被せ、一定の圧力で細胞を圧して細胞数カウント用の試料を作製した。細胞数のカウントには、10  $\mu\text{g/ml}$  Hoechst 33342 (Dojindo Molecular Technologies Inc., Kumamoto, Japan) 染色液を用い、蛍光顕微鏡下で細胞核が青く染まったものを計測した。

#### 【ET と妊娠診断】

細胞剥離法及びブレード切断法で性判別した胚盤胞期胚を移植し、受胚牛にはホルスタイン種を用いた。受胚牛の発情周期をオブシンク法で人為的に同期化させ、頸管経由法にて黄体が存在する子宮角内に受精胚を 1 個移植した。超音波画像診断装置（本多電子株式会社 HS-1500V, Aichi, Japan）を用い、妊娠 30 日目（移植後 23 日目）以降に妊娠診断を実施し、子宮内腔の存在と胎仔心拍をもって妊娠と判定した。

#### 【統計処理】

統計処理には、統計処理ソフト Statview 5.0 (ABACUS Concepts, Inc., Berkely, CA, USA) を用いた。バイオブシーしたサンプル細胞数の分析には Welch's t-test を用い、胚盤胞期胚まで発育した受精胚の総細胞数については、分散分析で有意差が認められた

場合, Post-poc test を実施し, 各群間の有意差を Scheffe's F-test で多重比較検定を行った。性判定率とバイオブシー後の胚の生存性については Chi-square test で有意差検定を実施した。受胎率については, Kruskal-Wallis test で行った。いずれの方法も,  $P < 0.05$  で有意差ありと判定した。

### 第三節 結果

2つの方法で採取された細胞数についての結果を表3-1に示した。ブレード切断法による胚盤胞期胚の栄養膜細胞の採取数は、 $24.8 \pm 14.0$  個( $n=121$ )であった。一方、細胞剥離法では $2.4 \pm 2.0$  個( $n=241$ )で、細胞剥離法で採取したサンプル細胞数が有意に少なかった。

受精胚のバイオプシー方法が性判定率に及ぼす影響についての結果を表3-2に示した。ブレード切断法区では96.3%(183/190)、細胞剥離法区では94.8%(493/520)であり、両者に有意な差は見られず、同様な判定率を示した。

また、性判定できた胚におけるオスと雌の性比率を表3-3に示した。ブレード切断区におけるオス・雌比率は、それぞれ48.1%(88/183)及び51.9%(95/183)であった。細胞剥離区におけるそれらは、49.1%(242/493)及び50.9%(251/493)であり、両者とも性の偏りは見受けられず、同様の性比率であった。

バイオプシー後培養を行った胚盤胞期胚の総細胞数を表3-4に示した。バイオプシーを行っていない無処理区では $177.5 \pm 29.9$  個( $n=103$ )、ブレード切断後、胞胚腔を再形成した胚の総細胞数は、 $77.3 \pm 24.7$  個( $n=103$ )、細胞剥離後の胚盤胞期胚では、 $96.2 \pm 26.6$  個( $n=100$ )でブレード切断区が他の2区より有意に少ない総細胞数であった。

バイオプシー後の胚の発育性結果を表3-5に示した。ブレード切断法では、切断後胞胚腔を再形成したものは84.4%(103/122)、細胞剥離法で胞胚腔を形成したものは91.7%(100/109)であり、両者に有意差は認められなかった。

バイオプシー胚の移植後の受胎性を表3-6に示した。バイオプシーを行っていない無処理区では68.4%(13/19)、ブレード切断区では56.5%(13/23)、細胞剥離法区では68.0%(17/25)であり、これらの区間に有意差は認められなかったが、ブレード切断法区

の値は他の2区より受胎率が低かった。

表 3-1. 2つの方法で採取したサンプル細胞数の比較

処理方法	供試胚数	1 胚当り採取細胞数 (平均 ± S. D.)
ブレード切断法	121	24.8 ± 14.0 <sup>a</sup>
細胞剥離法	241	2.4 ± 2.0 <sup>b</sup>

<sup>a, b</sup> 異符号間に有意差あり ( $P < 0.05$ )

表 3-2. 受精胚のバイオプシー方法が性判定率に及ぼす影響

処理方法	供試胚数	判定数	不明数	性判定率 (%)
ブレード切断法	190	183	7	96.3
細胞剥離法	520	493	27	94.8

表 3-3. オスと雌胚の比率

処理方法	供試胚数	オス判定胚 (%)	雌判定胚 (%)
ブレード切断法	183	88 (48.1)	95 (51.9)
細胞剥離法	493	242 (49.1)	251 (50.9)

表 3-4. バイオプシー後の修復胚の総細胞数

処理方法	供試胚数	総細胞数 (平均 ± S. D.)
無処理	103	117.5 ± 29.9 <sup>a</sup>
ブレード切断法	103	77.3 ± 24.7 <sup>b</sup>
細胞剥離法	100	96.2 ± 26.6 <sup>c</sup>

<sup>a, b, c</sup> 異符号間に有意差あり ( $P < 0.05$ )

表 3-5. 2つの方法で処理したバイオプシー後の胚の再発育性

処理方法	供試胚数	生存胚数*	生存率 (%)
ブレード切断法	122	103	84.4
細胞剥離法	109	100	91.7

\*修復培養後，胞胚腔を形成したものを生存胚とした。

表 3-6. バイオプシー法が受精胚移植後の受胎性に及ぼす影響

処理方法	供試胚数	受胎頭数	受胎率 (%)
無処理	19	13	68.4
ブレード切断法	23	13	56.5
細胞剥離法	25	17	68.0

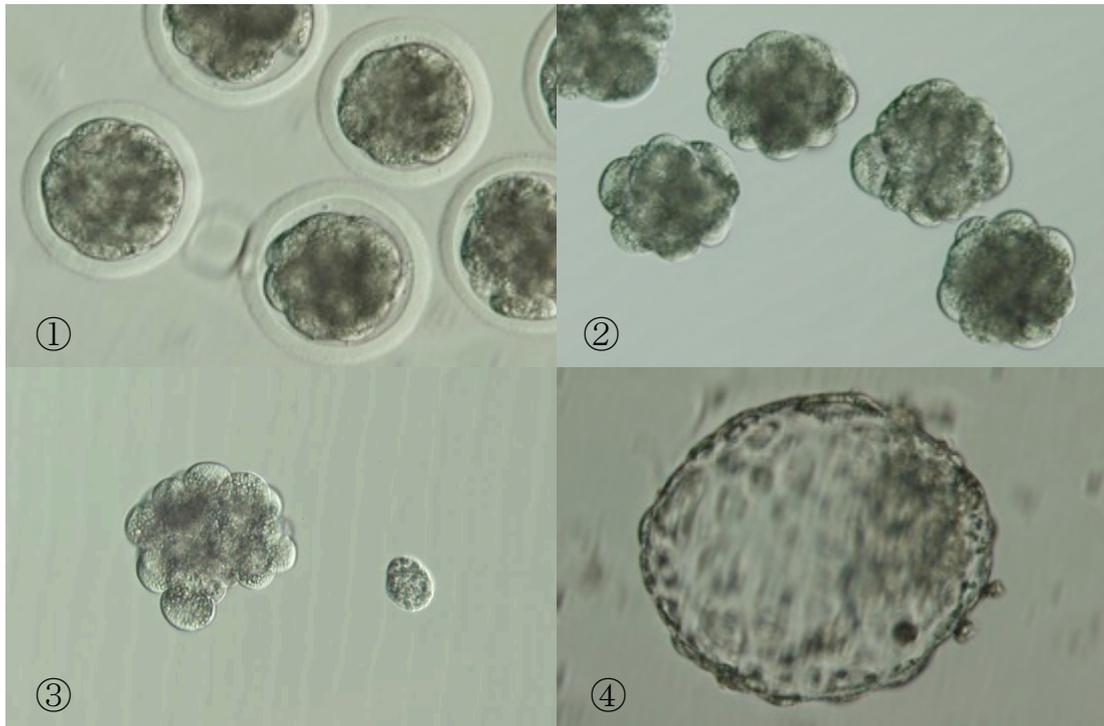


図3. 細胞剥離法によるサンプル細胞採取

①: 体外受精5日目の桑実期胚

②: プロナーゼによる透明帯融解

③: ガラス管のピペッティングによるサンプル細胞の剥離

④: 48時間の修復培養した胚盤胞期胚

#### 第四節 考察

本研究で開発した細胞剥離法は、核移植技術でドナー細胞の単離 (Willadsen, 1987) 操作を応用したもので、この方法を用いることで、マニピュレーター等の高価な設備を必要とせず、実体顕微鏡のみでサンプル細胞を採取することが可能であった。また、これらの操作には、卵子や受精胚を体外で操作可能なガラスツールの加工ができれば対応できる非常に簡易なサンプル採取法である。

ウシ受精胚からのサンプル細胞採取やその採取個数に関して、ブレード切断法では、Hirayama et al. (2004a) は2~12細胞、Herr and Reed. (1991) は4~10細胞を採取している。また、割球吸引法では、1個単位でのサンプル採取が可能であり、Schmidt et al. (1992) は1~5細胞、Shirazi et al. (2010) は1~2細胞、Lopatova et al. (2010) は5~10細胞の採取実績を報告している。本研究の細胞剥離法では、性判別用サンプル細胞の平均採取個数は、 $2.4 \pm 2.0$  個であり、これまで報告されている割球吸引法とほぼ同等な採取実績を示している。

ウシ受精胚から採取するサンプル細胞数は重要であり、その数が多いほど判定率やその精度が高くなるが、逆に多くの細胞をサンプリングすると、残りの胚の生存性や保存性、受胎性に大きな影響を与える (Schmidt et al., 1992)。割球吸引や細胞剥離法のように採取する細胞数が極端に少ない場合、遺伝子診断を行うとき、変性した細胞採取や核の存在しない細胞片を採取する可能性がある (Otsu et al., 2008) ため、判定不能や誤判定の危険性が高くなる。特に低ランク胚の変性細胞を利用した遺伝子診断では判定不能率が高まる危険性が高いとする報告 (Lopotarova et al., 2010) もある。

サンプル細胞数と遺伝子診断の関係においては、サンプル細胞数が多いほど、正確性や判定精度が向上する。性判別の精度については、割球吸引法で Hirayama et al. (2004a)

97.3%, Machaty et al. (1993) 83%, Thibier and Nibart (1995) 72.3%, ブレード切断法では Thibier and Nibart (1995) 94.7%, Costa et al. (2002) 96%との報告があり, やはりブレード切断法が少し高い値を示している。本研究でのブレード切断法では 96.3%, 細胞剥離法では 94.8%であり, 両方法とも同様な判定率を示しており, 細胞剥離法が判定率に与える悪影響は少ないと考えられる。むしろこれまで報告されたブレード切断法と同じような高い判定率を示しており, 本研究で用いた細胞剥離法は, 実用性に優れていると考えられる。

この細胞剥離法においても割球吸引法と同様に, ガラス製のピペットを必要とするが, 割球吸引作業のためのガラス先端の研磨やミクロン単位の加工などは必要なく, 体外で胚を操作するのに必要な先端の直径約 110  $\mu\text{m}$  の太さのガラス製ピペットの作製ができれば, 細胞採取を十分行うことが可能である。より確実に細胞を剥離させるために, 桑実期胚の大きさより少しだけ太いガラス管を用意することで作業はより容易となり, 割球吸引法と同様に, 胚の細胞を傷つけることなく, サンプル細胞を数個, 簡単に採取することができる。

体外で顕微操作した受精胚の受胎性を維持するためには, ある一定程度の細胞数が必要との報告 (Thibier and Nibart, 1995) がある。本研究では, 細胞剥離法の平均総細胞数  $96.2 \pm 26.6$  個であり, ブレード切断法 ( $77.3 \pm 24.7$  個) と比較すると有意に高くなっており, 受精胚移植を行ったときの受胎性も 68.0%と, 過去の報告 (Thibier and Nibart, 1995; Vajta et al., 1997) と同様な結果であった。つまり, 移植前の受精胚の総細胞数が多いと受胎性も高い傾向にあることで一致していた。今回, 体内受精胚とは比較を行っていないが, 細胞剥離法の受胎率は 68.0%を示しており, 他の研究者の報告 (凍結胚で 44%, 新鮮胚で 53%) と遜色ない受胎率 (Schmidt et al., 1992; Thibier and Nibart, 1995; Lopatarova et al., 2010) であった。この受胎性の高さは, 性判別 (遺伝子診断) を行った受精胚を出生まで導き, 確実に産子できる可能性が高くなると

考えられる。

本研究では、マイクロマニピュレーターを使用することなく、実体顕微鏡とガラスピペットで細胞剥離する新規な方法を開発し、受精胚からの性判別（遺伝子診断用）サンプル細胞の採取を行い、受胎までの調査を行った。この方法を用いることで、Almodin et al. (2005)と同様にサンプル細胞の確実な採取が可能で、受胎性の確保もできた。この簡易な方法で採取した細胞から効率的なDNA増幅技術を組み合わせることで、性判別のみならず、多種多様な遺伝情報既知受精胚を容易に作り出すことができると考えられる。

## 要約

本研究の目的は、ウシ受精胚からマイクロマニピュレーター等の機器を利用せず、遺伝子診断用の簡易な、新たなサンプリング方法の開発にある。本研究では、実体顕微鏡と細く伸ばしたガラスツールで桑実期胚から遺伝子検査用サンプル細胞を採取する“細胞剥離法”を検討した。細胞剥離法と従来のブレード切断法でサンプリング後の胚の生存性及び受胎性を比較し、その有効性について検討を行った。

細胞剥離法により、平均  $2.4 \pm 2.0$  個、受精胚からサンプルを採取することができ、ブレード切断より少数の細胞を確実に採取することができた。ウシ体外受精後の桑実期胚もしくは胚盤胞期胚から細胞のサンプリングを行った結果、修復培養後の総細胞数は無処置区で  $117.5 \pm 29.9$  個、ブレード切断区で  $77.3 \pm 24.7$  個及び細胞剥離区  $96.2 \pm 26.6$  個であり、既存法のブレード切断は、他の2区より有意に総細胞数が少なかった。各処置区の実験数は、無処置区で 13/19、ブレード切断区で 13/23、細胞剥離区 17/25 であり、有意差はなかったが、ブレード切断区は他の2区より低い受胎率であった。

以上の結果から、本研究で用いた細胞剥離法は、従来法より少ない細胞採取が可能なこと、受精胚の細胞数に与えるダメージを最小限にすることで、高い受胎性を維持することが可能であると考えられる。また、細胞剥離法は、マイクロマニピュレーター等の特別な器具、機材を用いず、簡易に受精胚から、性判別（遺伝子診断）等に利用可能なサンプル細胞を採取することができ、かつ受胎性を担保できると考えられる。

## 第4章 経膈採卵を用いたホルスタイン種の効率的な増殖方法の開発

### 第一節 緒言

近年、泌乳量の増加と反比例するように乳牛の繁殖性の低下、特に高泌乳牛の人工授精時の受胎率低下が見受けられるようになっている(Butler, 2003; Lucy et al., 2001)。このような、繁殖性の低下は分娩間隔の延長や子牛の生産性低下を引き起こし、酪農経営に大きな影響を与えるとの報告(Kadokawa et al., 1998)があり、畜産農家にとって大きな問題となっている。

Pieterse et al. (1988) によってウシに応用された経膈採卵技術は、ホルモン等の投与を必要としない上、生きたままのウシから卵巣内卵子を反復して採取できる画期的な方法である。この方法を利用して生理的空胎期間(分娩後40~80日)に体外受精胚を生産することができれば、酪農経営に悪影響を与えないうえ、効率的な後継牛生産が可能となる。従来の方法では、過剰排卵処置と人工授精を組み合わせた体内受精胚生産技術が存在するが、泌乳最盛期のウシでは、卵胞刺激ホルモン(Follicle Stimulating Hormone: FSH)等の外部からのホルモン投与に対する反応が悪く、体内受精胚の回収成績も悪いとの報告(Stubbing et al., 1995)がある。現状では、ウシの体内受精胚生産は、乾乳期や未経産牛で行われており、そのほとんどが採卵専用のウシで対応している。

ホルスタイン種は生乳生産を目的として飼養されており、そのため通常1年1産を目標としている。これを実現するためには、分娩後50~80日程度で人工受精を開始する必要がある。つまりこの時期までは、次の繁殖計画は休止されている。この時期に経膈採卵・体外受精胚生産を実施することが可能となれば、分娩期間を延長することなく、しかも乳生産を行いながら、通常的人工授精による次期後継牛生産と経膈採卵のよる体外

受精胚生産も同時に実施できるため、酪農経営にとって大きなメリットとなると考えられる。しかしながらこの時期は、泌乳生産量が最大に達する時期で、摂取するエネルギー量と乳生産のために必要なエネルギーバランスの維持が難しく、多くの酪農家で負のエネルギーバランスとなってしまう時期であり、体内受精胚生産に関する報告(Stubbings and Walton, 1995)にもあるように、どの程度の体外受精胚が生産できるか不確定な要素が多く存在する。実際に外部から投与されたFSHの反応性にバラツキの大きいことも報告(Stubbings and Walton, 1995)されている泌乳最盛期に、効率的な経膣採卵を実現するため、オブシクスの原理(Pursley et al., 1995)を応用して、性腺刺激ホルモン放出ホルモン(Gonadotropin Releasing Hormone: GnRH)を投与することで、卵胞波をリセットさせ、モニター上で観察できる卵巣内卵胞数を増加させることができれば、効率的な体外受精胚生産が可能となる。つまりこの技術は、ホルスタインからの安定的体外受精胚生産技術として利用価値が高いと考えられる。この方法で泌乳最盛期の牛から体外受精胚が生産できれば、泌乳を行いながら酪農家の希望する個体から1年間に複数頭の後継牛を生産することが可能となる。

経膣採卵は、生きたウシの卵巣内に直接17ゲージの針を穿刺するため、卵巣周囲の炎症や卵管采との癒着の可能性があると危惧されている。研究者によっては問題は無いとの報告(Chastant-Maillard et al., 2003)もあるが、実際に、経膣採卵がその後の人工授精におよぼす影響についての報告は見られず、経膣採卵後の繁殖成績に及ぼす影響については、明らかになっていない。

本研究では、分娩後の40～80日の泌乳最盛期にあるホルスタイン種に経膣採卵を実施し、採取された卵子を体外受精に供し、その生産効率について検討を行った。また、経膣採卵終了後、通常的人工授精を行い、その受胎性についても調査を行った。

## 第二節 材料および方法

### 【経膣採卵による卵丘細胞卵子複合体 (COCs) の採取】

本研究には、広島県立総合技術研究所畜産技術センターで繋養している、ホルスタイン種経産牛延べ 35 頭を用いた。分娩後 40~80 日の期間に経膣採卵を 1 週間間隔で実施し、経膣採卵の 48 時間前にフェルチレリン製剤 1.0 ml (商品名:ボンサーク注, 第一製薬株式会社) (GnRH 投与区) を頸部筋肉内投与した。供卵牛を無処理区と GnRH 投与区に区分し、1 週間ごとに処理を入れかえた。つまり、1 週目無処理区のウシを 2 週目は GnRH 処理し、3 週目は再度無処理、4 週目は再度 GnRH 処理した。経膣採卵については、第 2 章に記述と同様に行った。

COCs 品質の評価については、第 2 章の記述と同様に行った。卵巣内に存在する卵胞数とその卵胞径については、卵巣穿刺前に卵巣断面の撮影を行い、画像をビデオ (Handycom, Hitachi, Tokyo, Japan) に録画し、画像で確認できる卵胞数と卵胞直径を計測し、記録した。

卵子の細胞質の検査のためのブリリアントクリジルブルー (Brilliant Cresyl Blue : BCB) 染色を Sugulle et al. (2008) の方法に準じて実施した。実際の操作では、採取した COCs を 52  $\mu$ M BCB 溶液に浸漬して 30 分間染色を行った。染色終了後に 4 mg/ml 牛血清アルブミン (Sigma A-7030: BSA) 添加ダルベッコ修正-PBS で洗浄後、卵子を 50 倍の倒立顕微鏡下で観察し、(1) 細胞質が青く染まっている BCB 陽性グループ、(2) 細胞質が青く染色されていない BCB 陰性グループに分類した。

体外成熟・体外受精・体外発生、性判別及び受精胚移植については、第 3 章の記述と同様な方法で実施した。

### 【経膣採卵後の人工授精】

分娩後 40～80 日までの間、数回の経膣採卵を行った後、最終の経膣採卵終了時にプロスタグランジン F2 $\alpha$  (Veterinary Pronalgon F injection, Zoetis Japan, Tokyo, Japan) を 5 ml (ジノプロストとして 30 mg) を筋肉内注射を行い、黄体を人為的に退行させた。その後、発情が観察された時点で、膣内に凍結精液を通常の人工授精と同様に実施した。1 回の発情において夕方と翌朝、もしくは同日の朝と夕方に 2 回人工授精を実施した。人工授精区では、経膣採卵を実施せず、分娩後に自然発情が確認された時点で通常の人工授精を 2 回行った。また、人工授精後、超音波診断装置を用いて、妊娠鑑定を行い、受胎が見られないものに、次回自然発情時に再度、人工授精を実施した。人工授精によって受胎が確認された時点で、分娩日と最終人工授精の期間（空胎期間）を記録した。また、受胎するまでに要した人工授精回数も記録した。（発情回数＝人工授精回数）。人工授精のみの無処理区については、経膣採卵実施した同一個体の分娩直前の人工授精における受胎実績データ（経膣採卵を実施していない前回の記録）を利用した。

### 【統計処理】

統計処理には、統計処理ソフト Statview 5.0 (ABACUS Concepts, Inc Berkely CA, USA) を用いた。統計処理には Chi-square test もしくは Student's の t 検定を用い、*P* 値が 0.05 以下のものを有意差ありと判定した。

### 第三節 結果

経膣採卵 48 時間前の GnRH 投与が採卵成績に及ぼす影響を表 4-1 に示した。分娩後 40～80 日の泌乳中ホルスタイン種のモニター上で観察される平均卵巣内卵胞数は、無処置区で  $16.0 \pm 1.0$  個 ( $n=101$ )、GnRH 投与区は  $19.5 \pm 1.3$  個 ( $n=102$ ) であり、GnRH 投与区で有意に高い値を示した。また、経膣採卵による平均採卵個数は、無処置区で  $11.5 \pm 1.0$  個 ( $n=101$ )、GnRH 投与区は  $15.3 \pm 1.3$  個 ( $n=102$ ) であり、GnRH 投与区で有意に高い値が認められた。

GnRH 投与が経膣採卵で採取された COCs の品質に及ぼす影響を表 4-2 に示した。経膣採卵した COCs のグレードは、無処置区で、Grade I :  $1.7 \pm 0.2$  個、Grade II :  $4.2 \pm 0.5$  個、Grade III :  $4.2 \pm 0.4$  個及び Grade IV :  $1.3 \pm 0.2$  個であり、また GnRH 投与区では Grade I :  $2.8 \pm 0.3$  個、Grade II :  $5.8 \pm 0.6$  個、Grade III :  $5.1 \pm 0.5$  個及び Grade IV :  $1.6 \pm 0.2$  個であり、GnRH 投与区における、Grade I 及び Grade II の個数が無処置のそれらより有意に高い値を示した。また経膣で採取された卵子細胞質の BCB 染色性を検査した結果、無処置区では、染色性陽性  $9.6 \pm 0.9$  個、染色性陰性  $1.7 \pm 0.2$  個であり、GnRH 投与区では、染色性陽性  $13.7 \pm 1.2$  個、染色性陰性  $1.5 \pm 0.1$  個であり、染色性陽性個数においても GnRH 投与区が無処置より有意に高い値を示した。

GnRH 投与後に経膣採卵された卵子の体外受精成績を表 4-3 に示した。分娩後 40～80 日間の経膣採卵で採取された COCs の体外受精成績については、無処置区 ( $n=935$ ) で卵割率 67.1%、8 細胞期率 31.9%、桑実期胚率 21.2% 及び胚盤胞期率 17.9% であり、一方 GnRH 投与区 ( $n=1,259$ ) では、卵割率 73.2%、8 細胞率 38.3%、桑実期胚率 26.9% 及び胚盤胞期率 24.6% であり、総ての発育ステージにおいて GnRH 投与区が無処置区に比較して有意に高い値を示していた。

泌乳最盛期のウシから生産できる移植可能胚数は、無処置区で  $1.7 \pm 0.2$  個で、GnRH 投与区では  $3.0 \pm 0.3$  個であり、GnRH 投与区が無処置区に比べて有意に高い値を示した。

経膣採卵がその後の人工授精成績に及ぼす影響を表 4-4 に示した。経膣採卵を実施した乳牛が受胎に要した日数（分娩後に受胎に至った最終人工授精までに要した日数）については、無処置区が  $127.8 \pm 114.6$  日（人工授精回数  $1.7 \pm 0.7$  回）、GnRH 投与区が  $96.1 \pm 23.5$  日（人工授精回数  $1.4 \pm 0.8$  回）となった。両者に有意差は認められなかったが、受胎に要した日数は、経膣採卵実施牛の方が無処理牛（経膣採卵を実施しなかった牛）より、短い日数を示していた。

GnRH 投与処理により生産された体外受精胚の受胎性を表 4-5 に示した。GnRH を投与したホルスタインから採取した体外受精由来胚の受胎性は、59.5% (44/77) であり、また無処置区（GnRH 投与処理なしで、通常の間膣採卵・体外受精により生産された胚）では 42.1% (8/19) であり、両者の間には有意差は認められなかったが、GnRH 投与区の数値は、無処理区のそれに比較して、高い値となっていた。

表 4-1. 経膈採卵 48 時間前の GnRH 投与が採卵成績に及ぼす影響

処理方法	供試頭数	卵胞数 <sup>1)</sup>	採取卵子個数
無処置	101	16.0 ± 1.0 <sup>a</sup>	11.5 ± 1.0 <sup>a</sup>
GnRH 投与 <sup>*</sup>	102	19.5 ± 1.3 <sup>b</sup>	15.3 ± 1.3 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>卵巣内に存在する卵胞数をビデオで記録し、モニター上で観察できる卵胞数を計測した。

<sup>a,b</sup> 同一欄内の異符号間に有意差あり ( $P < 0.05$ )。

<sup>\*</sup>GnRH 投与にはフェルチレリン製剤を用いた。

表 4-2. GnRH 投与が経膈採卵で採取された COCs の品質に及ぼす影響

処理方法	COCs の品質区分 (個)				BCB 染色 (個)	
	Grade I	Grade II	Grade III	Grade IV	染色陽性	染色陰性
無処置	1.7 ± 0.2 <sup>a</sup>	4.2 ± 0.5 <sup>a</sup>	4.2 ± 0.4	1.3 ± 0.2	9.6 ± 0.9 <sup>a</sup>	1.7 ± 0.2
GnRH 投与 <sup>*</sup>	2.8 ± 0.3 <sup>b</sup>	5.8 ± 0.6 <sup>b</sup>	5.1 ± 0.5	1.6 ± 0.2	13.7 ± 1.2 <sup>b</sup>	1.5 ± 0.1

<sup>a,b</sup> 同一欄内の異符号間に有意差あり ( $P < 0.05$ )。

<sup>\*</sup>GnRH 投与にはフェルチレリン製剤を用いた。

表 4-3. GnRH 投与後に経膣採卵された COCs の体外受精成績比較

処理方法	供試卵数	体外発生胚数				経膣採卵1回当りの胚盤胞期の胚生産個数
		2細胞期 (%)	8細胞期 (%)	桑実期 (%)	胚盤胞期胚 (%)	
無処置	935	627 (67.1) <sup>a</sup>	298 (31.9) <sup>a</sup>	198 (21.2) <sup>a</sup>	167 (17.9) <sup>a</sup>	1.7 ± 0.2 <sup>a</sup>
GnRH 投与 <sup>*</sup>	1259	921 (73.2) <sup>b</sup>	482 (38.3) <sup>b</sup>	339 (26.9) <sup>b</sup>	310 (24.6) <sup>b</sup>	3.0 ± 0.3 <sup>b</sup>

<sup>a, b</sup> 同一欄内の異符号間に有意差あり ( $P < 0.05$ )。

<sup>\*</sup>GnRH 投与にはフェルチレリン製剤を用いた。

表 4-4. 経膣採卵がその後の人工授精成績に及ぼす影響

処理方法	人工授精 実施頭数	人工授精回数	受胎に要した最終人工授精までの日数
無処置 (人工授精のみ)	16	1.7 ± 0.7	127.8 ± 114.6
経膣採卵実施	16	1.4 ± 0.8	96.1 ± 23.5

表 4-5. GnRH 投与処理により生産された体外受精胚の受胎性

処理方法	移植頭数	受胎頭数	受胎率 (%)
無処置 <sup>1)</sup>	19	8	42.1
GnRH 投与 <sup>2)</sup>	77	44	59.5

<sup>1)</sup>GnRH 投与処置無しで、通常の経膣採卵・体外受精により生産された胚を用いた。

<sup>2)</sup>GnRH 投与にはフェルチレリン製剤を用いた。

#### 第四節 考察

本研究では、分娩後 40～80 日のホルスタイン種に経膣採卵 48 時間前に性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 製剤を投与することで、効率的な体外受精胚生産が可能かどうかの検証を行った。

Oropeza et al. (2004) は、泌乳中のウシから 1 回の経膣採卵で平均 8.9 個の COCs の採取ができたと報告している。本研究においては、泌乳最盛期である分娩後 40～80 日の期間で経膣採卵を行ったが、経膣採卵前 GnRH を投与していない無処置区においても 1 回の経膣採卵当たり体外受精用の COCs を  $11.5 \pm 1.0$  個採取することができており、Oropeza et al. (2004) の報告と同様に分娩後 40～80 日の泌乳最盛期であっても COCs の採取は十分可能であることが改めて確認された。Kendrick et al. (1999) の報告では、分娩後 30～100 日までのホルスタイン種での経膣採卵では、直線的に採取個数が増加していること、Lopes et al. (2006) は、分娩後の経過日数に関わらず、採取された COCs 数や COCs 品質に差は見られなかったものの、胚盤胞までの発生率は分娩後日数と関係があったと報告しており、本研究で得られた結果と合わせてみると、生理的空胎期間における経膣採卵は十分可能であると考えられる。

Ryan et al. (1995) は、GnRH は優性卵胞が選択される前に投与しても排卵は誘起されないと指摘しており、優勢卵胞の閉鎖途中や排卵前後の数日間における発情周期のある時期では効果が見られない可能性もあるが、大半の期間は GnRH の投与効果のある時期であり、卵胞波の確認等の煩雑な作業が必要ないこの方法は大きなメリットがあると考えられる。本研究では、無処置区のモニター上で観察できる卵巣内卵胞数は  $16.0 \pm 1.0$  個、採取された COCs 数は  $11.5 \pm 1.0$  個であり、GnRH 投与区のそれらは、それぞれ  $19.5 \pm 1.3$  個及び  $15.3 \pm 1.3$  個であった。本研究においては、無作為に GnRH 投与したに

もかかわらず、無処置区に比較して GnRH 投与区が有意に高い値を示した。従って、GnRH 投与処置は、性周期を確認する必要が無く、1 回の処置でモニター上で観察可能な卵巣内卵胞数の増加が見込める簡便な方法であると考えられる。

GnRH のアナログ製剤であるフェルチレリン投与後の血中 LH 濃度は 2.0~2.5 時間でピーク値に達し、5~6 時間で基底値に戻ると報告されている (Osawa et al., 1997)。また、ピーク後の約 25 時間で直径 8.5mm 以上の優性卵胞の排卵が起こり、その 24 時間後から FSH の上昇とともに、卵胞波の新生が起こるとの報告がある (Roche et al., 1998)。従って、本研究における GnRH 投与 48 時間後の経膈採卵は、新しい卵胞が発育し始めた時期に一致すると考えられる。

GnRH 投与における卵胞発育に関して、Macmillan et al. (1991) は、GnRH 製剤により卵胞波が新生され、ブセレリン投与で 6~9 mm 卵胞が増加すると報告しており、本研究と一致する結果を示している。

通常、経膈採卵された卵胞内卵子は卵丘細胞の付着状況と、卵細胞質の色調によって区分され、本研究における Grade I, II のような COCs が高い発生率を示すとされている。Madison et al. (1992) も卵子に付着している卵丘細胞の数や培養する COCs 数はその後の胚発生に大きな影響を与えると報告している。本研究において、GnRH 投与区の体外受精胚の発育性が有意に高かった理由としては、形態学的に品質の高い COCs を 1 頭から数多く体外成熟・体外受精に利用できたことで、最終的な発育成績の向上につながったのではないかと推察する。体外受精を行う場合、O'Doherty et al. (1997) の報告では、できるだけ多くの卵子を採取し複数の COCs を同一培地内で培養することでその後の発生率も高いと報告されており、本研究においても GnRH 投与区では卵割率、8 細胞期率、桑実胚期率及び胚盤胞期率、総てにおいて有意に高い発生率を示すことが確認された。

ブリリアントクレシルブルーによる COCs の染色は、この色素がニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸 (Nicotinamido Adenine dinucleotide Phosphate: NADPH) によっ

て還元されることを利用している。この NADPH 生産に関与するグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase: G6PD) 活性が指標となる。未成熟な卵細胞質内は、この酵素活性が高く、色素が還元され無色化し、成熟した卵細胞質では、この活性が低いため、還元されず青色に染色されたままである。近年、細胞質内の G6PD 活性とその後の胚の発生成績についての検討が行われ G6PD を指標に用いる有効性も報告されている (Bhojwani et al., 2007; Manjunatha et al., 2007)。また, Alm et al. (2005) は, BCB 陽性 COCs は, 陰性のものより多く胚盤胞まで発生することを報告しており, 本研究において, 細胞質内の酵素活性から卵子の品質を評価したところ, 無処置区 ( $9.6 \pm 0.9$  個) に比較して, GnRH を投与した群では, 染色性陽性卵子数 ( $13.7 \pm 1.2$  個) が有意に高い値を示しており, GnRH 投与により優勢卵胞が閉鎖もしくは排卵に至ったことや, 新たな卵胞がリクルートされた効果によると推察される。

本研究における胚盤胞期胚までの体外発生数は, 無処置区で  $1.7 \pm 0.2$  個, GnRH 投与区で  $3.0 \pm 0.3$  個となり, GnRH 投与により 1.7 倍の胚を効率的に生産できた。泌乳牛で経膈採卵 1 回当たり平均 1.3 個の胚盤胞期胚が得られたと Oropeza et al. (2004) は報告しており, 本研究では, 経膈採卵 48 時間前の GnRH を投与によって, この報告の 2 倍以上の胚盤胞期胚を生産できており, GnRH 投与は, 多くの移植可能胚を生産するために有効な手法の一つであると考えられる。

経膈採卵は, 3~4 日間隔で実施できるとされている。例えば, 分娩後 40~80 日目までに経膈採卵を 1 週間に一度実施すると仮定すると, この期間に経膈採卵は 6 回実施することができる。つまり, 生理的空胎期間での計算上では  $3.0$  個/経膈採卵 1 回  $\times$  6 回 = 18 個の移植可能胚 (雌胚では 1/2 の 9.0 個) が生産できることとなる。生乳生産を行いながら, これだけの体外受精胚を生産できれば後継牛確保も容易になると推察される。しかも, 経膈採卵終了後に通常と同じ人工授精も行うため, さらに 1 頭分の後継牛も確保できる (雌だと 0.5 頭分) 試算となる。

経膣採卵時の GnRH 投与に関して、定時人工授精実施時にも 1～2 回程度 GnRH 投与を行っているが、問題なく人工授精由来産子も得られている。本研究で経膣採卵 48 時間前に GnRH 投与を行い、生産された体外受精由来の胚盤胞期胚を受胎牛に移植した時の受胎性は、無処理のものと統計学的に差が見られなかった。受胎性についてもこれまで報告されている経膣採卵・体外受精由来のものと同等以上の成績であった。これらの結果から、GnRH 投与で生産されたものは、通常の体外受精胚と同じような受胎能力を持つと考えられる。

経膣採卵終了後の人工授精成績に関しては、本研究の結果では、経膣採卵実施区で平均  $1.4 \pm 0.8$  回で受胎しており、無処置の人工授精のみの場合の  $1.7 \pm 0.7$  回と有意な差は見受けられず、同様な人工授精成績であった。一方、経膣採卵実施牛の平均最終人工授精期間は  $96.1 \pm 23.5$  日と人工授精のみ牛  $126.2 \pm 110.6$  日と比較して有意差は無いものの、日数的には短い期間で人工授精を終了できた。Petyim et al. (2000) も複数回の経膣採卵後でも生殖器の機能低下に繋がる様なことは起こらないこと、Klossok et al. (1997) も経膣採卵によって受胎性を低下させることはないと報告しており、本研究の結果と、これまでの報告とを考え合わせると、生理的空胎期間中に経膣採卵を実施しても、その後の人工授精に悪影響を与えることではなく、体外受精胚生産と人工授精による後継牛生産を乳生産を行いながら同時にすすめることができると考えられる。

## 要約

1 年間に生産可能な子牛数を増加させるため、生理的空胎期間を利用して経膈採卵した COCs からの体外受精胚生産を検討した。採卵数を増加させるために、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) を経膈採卵 48 時間前に投与し、体外受精胚生産を試みた。また、複数回の経膈採卵実施後に人工授精を行い、受胎性に与える影響についても調査した。

実験には、広島県立総合技術研究所畜産技術センターで繋用しているホルスタイン種経産牛を用いた。分娩後 40～80 日までの生理的空胎期間のウシに、経膈採卵を実施し、体外受精胚の生産を行った。経膈採卵 48 時間前に GnRH を投与することで、モニター上で観察できる卵巣内卵胞数が無処置区で  $16.0 \pm 1.0$  個であったのに対し、GnRH 投与区で  $19.5 \pm 1.3$  個と高い数値を示した。採卵成績においても無処置区で  $11.5 \pm 1.0$  個であったのに対し、GnRH 投与区で  $15.3 \pm 1.3$  個と高い数値を示した。また、GnRH 投与区の胚発生率と無処置区のそれとを比較すると、全ての発育ステージにおいて、GnRH 投与区が無処置区より有意に高い値を示した。特に胚盤胞期発生率は、GnRH 投与区は、24.6%であり、無処置区は、17.9%であり、GnRH 投与は、胚発生に好影響を与えることが明らかになった。

生理的空胎期間に経膈採卵を適用し、体外受精胚生産と人工授精による後継牛生産を一度に実施することが可能であることが本研究で証明された。つまり、経膈採卵前の GnRH 投与を組み合わせることで、生理的空胎期間に約 3 個の移植可能胚を生産することができた。

結論として、分娩後 40～80 日前後までの経膈採卵とその後に人工授精を実施すると、1 年に 1 頭以上のホルスタイン後継牛生産の可能性が示唆された。

## 第5章 総合考察

牛肉取り引きのグローバル化，それに伴う産地間競争の激化，輸入飼料価格の高騰，生乳買取り額の頭打ち，高泌乳牛化による繁殖管理の難易度上昇など畜産経営を巡る環境は大変厳しさを増している。広島県は，古くから和牛の産地として全国に知られていたが，食肉専用としての黒毛和種の育種改良は遅れを見せたため，生産頭数は減少に歯止めがかかっていない。これに追い討ちを駆けるように，バブル経済崩壊後の長引く消費低迷による牛肉価格の頭打ち現象，環境対策（ふん尿処理）等の費用増大や円安による輸入飼料の高騰など，これまでの規模拡大や経費節減等の対策のみでは経営は立ち行かない状況になりつつある。これら経済的な側面と，生産者の高齢化による黒毛和種の生産減は，肥育素牛の供給能力低下や子牛価格の高騰を招き，肥育経営を圧迫すると云う悪循環に陥っている。

広島県における畜産経営の維持には，広島牛のブランド化と一定頭数の確保が必要である。広島県酪農・肉用牛近代化計画では，平成32年度には，広島牛の繁殖雌牛5,060頭を8,900頭に，肉専用種6,320頭を10,000頭に増頭させる目標を掲げている。その目標を達成するために，乳牛を活用した受精胚移植の積極的な推進と受胎率向上を目指した研究開発や事業を推進している。これらを確実にしかも短期間で実現するためには，これまでとは違った新たな方法で経営改革を行う必要がある。

ここで一番期待されることは，この半世紀で目覚ましい発展を遂げてきた生殖工学的手法を取り入れた新たな経営スタイルを構築すべきであり，その中でも，酪農家のホルスタイン種を借り腹とした受精胚移植技術を推進するとともに，黒毛和種生産によって，遺伝的改良を行い，より経済的価値の高い子牛増頭を短期間で実施し，肥育素牛の安定的確保と畜産農家の収入確保を同時に行う必要がある。

しかしながら、受精胚移植を含む生殖工学的技術は個別技術としては、ある程度確立され、実用化しつつあるが、まだ普及に至っていないのが現状である。実際に畜産経営を行いながらこれらの技術を取り入れるには、個別技術を改善して現場に適応した手法にしなければ畜産農家での実用化は難しい。特に、酪農経営では乳生産のための雌牛確保が繁殖計画の中では最優先される事項であり、現状でも3割程度が乳用牛生産以外に振り向けられているにすぎず、余剰の乳用牛が存在しない限り、黒毛和種受精胚の移植による子牛生産は進展しないと考えられる。

本研究では、酪農経営において受精胚移植によって黒毛和種を生産し、増頭させることを最終目標として、そのために必要な借り腹となるホルスタイン種の雌牛の計画的かつ安定的確保を可能なものとするため、①性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 投与がウシ経膈採卵に与える影響(GnRH投与によるウシの経膈採卵技術の効率化)(第2章)、②マニピュレーターを必要としない性判別用細胞のサンプリング方法の開発(受精胚からの性判別技術の構築による効率的な生産)(第3章)、③経膈採卵を用いたホルスタイン種の効率的な増殖方法の開発(生理的腔胎期間を利用したウシ受精胚生産技術の構築)(第4章)を行った。以下に本研究で明らかにしたことを記述する。

第2章では、GnRHの卵胞波新生作用を利用し、ウシ経膈採卵時に数多くのCOCsを採取することを目的として研究を実施した。これまで研究がなされている優勢卵胞の人為的除去や卵胞刺激ホルモン(FSH)等の処置とは別の、新たな簡易法で実施可能なGnRHによる卵胞波の新生を試みた。発情周期の任意の時期に卵胞波の新生を誘起させるため、フェルチレリン等のGnRHアナログ製剤を投与して、卵巣内卵胞数の推移、COCs採取数や品質の変化が見られるかどうかを検討した。GnRH投与直後から24時間間隔で72時間目まで、卵巣内の卵胞動態観察を超音波画像診断装置を用いて行った。また、モニター上で観察できる卵胞数の最も多くなる、GnRH投与後48時間目に経膈採卵を実施し、採取されるCOCsの数やその品質についても調査した。2種類のGnRH製剤、ブセレリンと

フェルチレリンを用いて経膣採卵に利用する場合の有効性について比較検討を行った。その結果、GnRH 投与時期については、経膣採卵実施の 48 時間前が GnRH 投与により卵巣内の卵胞径の大きさが高い値を示すことから、GnRH 投与 48 時間後に経膣採卵を実施することが、最も効果的であること、フェルチレリン及びブセレリン製剤ともに、経膣採卵 48 時間前投与により卵巣内の卵胞径が無処置のものより高い値を示すこと、両製剤間での大きな効果の差は見受けられず、どちらも有効性が高いことを明らかにした。

第 3 章では、ウシ受精卵からマイクロマニピュレーター等の機器を使用せず、胚へ生存性を維持可能な新たな性判別（遺伝子診断）サンプリング方法の開発を行った。この細胞剥離法は、実体顕微鏡と細く伸ばしたガラスツールで桑実期胚から遺伝子検査用サンプル細胞を採取するものであり、割球吸引法と同様に、細胞への物理的障害を最小限にすることが可能である。本研究では、細胞剥離法と従来のブレード切断法でサンプリング後の胚の生存性、受胎性などの比較を行い、その有効性について検討を行った。その結果、細胞剥離法では、受精卵からのサンプル細胞採取は 2 個程度と少ない数で採取個数を調節することが可能なこと、細胞剥離によって受精卵の生存性は低下は見受けられないこと、修復培養 48 時間後の胚盤胞期胚の総細胞数は、細胞剥離法がブレード切断法よりも高い数値を示すこと、受胎性についても無処置胚との受精卵移植比較試験で同等の能力を有することを明らかにした。

第 4 章では、1 年間に生産可能な子牛数を増加させるため、生理的空胎期間を利用して経膣採卵・体外受精卵生産がどの程度可能かどうかを検討するために、分娩後 40～80 日までの泌乳最盛期のホルスタイン種に、本研究で有効性が明らかにされた GnRH 製剤を経膣採卵 48 時間前に投与し、採取した卵子を用いて体外受精卵生産を試みた。また、GnRH 投与によって経膣採卵・体外受精で胚盤胞期胚の作出を行い、その胚の受胎性に問題がないかどうかの確認を行った。また、複数回の経膣採卵実施後に、人工授精を実施して、その後の繁殖性（受胎性）に与える影響についても検討した。その結果、分娩後 40～80

日の生理的空胎期間での経膣採卵は、GnRH 投与を行うことでモニター上で観察できる卵巣内卵胞数、採取される COCs 数、その品質も高くなり、体外受精により作出される胚盤胞期胚数も無処置より 1.7 倍以上高くなることが確認され、生理的空胎期間であっても、GnRH 投与によって、受精胚生産が効率的になることが明らかになった。GnRH 投与によって作出された胚盤胞期胚の受胎率も無処置で作出した受精胚と同様であり、受胎性には問題がないことが確認された。また、経膣採卵後の人工授精についても通常の人工授精のみのウシと同様に受胎に要する日数、受胎性ともに差は見られず、経膣採卵によって、その後の繁殖性に与える影響は見られないことを明らかにした。

本研究で得られた結果をもとに、生理的空胎期間に何頭の雌牛が確保できるか試算してみると、分娩後 40～80 日の期間で、経膣採卵を 1 週間間隔で行った場合、この期間で、最低でも、6 回の経膣採卵が実施可能であり、生産される移植可能胚数は  $3.0 \times 6 = 18$  個となる。生産される受精胚の雄雌比率を 50% と仮定すると、雌胚は 18 胚の 1/2 で 9 個となり、これに本研究の第 4 章で得られた受胎率 68.0% を乗ずると 6.1 頭の雌牛生産となる。つまり、1 回の生理的空胎期間中に 6 頭の受精胚移植由来後継雌牛が確保できる試算となる。しかも、これに経膣採卵終了後通常の人工授精を行うため、もう 1 頭の後継牛候補（雌牛の確率としては 1/2 で 0.5 となる）が確保できる計算となる。1 年で 6.5 頭以上の後継牛が確保できるとなれば、ホルスタインの生涯出生数 2.8 頭の 2 倍以上の頭数を 1 回の生理的空胎期間で確保することが可能と推定される。このようにして確保した後継牛には、受精胚移植による黒毛和種生産に利用することができると考えられる（図 5 参照）。

また、本研究で行った技術開発を元に、酪農経営に与える効果額について試算したところ、人工授精のみで繁殖計画を実践する従来型の方法と比較すると、技術適応 1 年目は産子生産のみであり、技術にかかる受精胚移植の技術料金や、受精胚にかかる経費が必要となる関係で、人工授精のみの経営で 3,090 万円の利益に対し、受精胚移植のみの

経営の 2,600 万円の利益で差額は 490 万円の赤字となってしまうが、3 年目以降は、搾乳頭数の増加や黒毛和種子牛販売収入によって、人工授精のみの経営の約 3,500 万円の利益に対し、受精胚移植のみの 5,350 万円の利益となり、その差額は、受精胚移植のみの経営で約 1,800 万円の黒字になると試算され、十分経営として成り立つと考えられる。ホルスタイン種を借り腹とした受精胚移植によって、200 頭規模の酪農家では年間 44 頭の黒毛和種子牛が生産されると試算され、広島県内で、年間に 3,000 頭程度の黒毛和種の取り引きがなされている現状から考えると 90 戸程度の酪農家があれば、この数字を上回る子牛生産が計算上では可能となる（2013 年の農林水産省畜産統計 2 月 1 日調査結果では、広島県では酪農家戸数は 195 戸）。

このようにこれまで十分に利用されていなかった酪農経営に経膾採卵・体外受精技術、性判別技術及び受精胚移植技術を取り入れることで、酪農家から黒毛和種生産を行う新たな経営モデルの構築は、本研究の結果から考えれば十分可能である。また、本研究で開発された経膾採卵前の GnRH 投与、細胞剥離法による受精胚での性判別及び分娩後 40～80 日の経膾採卵の実施等の技術を利用すれば、酪農経営の本業である生乳生産を休むことなく、技術導入を図ることができるため、経営に対するデメリットもほとんどないと考えられる。しかも、経膾採卵が終了した後の人工授精成績も良好であり、通常の酪農を行いながら後継牛生産と黒毛和種生産を同時に両立することが可能である。

黒毛和種の育種改良といえば長い年月を必要とするが、広島県では、ウシの育種価算出事業を平成 3 年度から実施しており、県内のウシの推定能力を把握しており、本研究の成果を黒毛和種に適用することで、多くの育種改良資源としての経膾採卵由来体外受精胚を生産して、これを酪農経営の中に取り入れて、能力の高い黒毛和種を効率的に生産することが可能となる。つまり短い期間で多くの優秀な能力を持つ個体を増頭することで改良のスピードアップを図ることができると考えられる。

以上記述してきた様に、これまで、生物工学的技術を組み合わせて実際の畜産経営に

導入できる様に技術構築した例はほとんどなく、本研究の成果は酪農経営から黒毛和種を生産するための技術として十分利用できると考えられ、それによって酪農経営の経営基盤の安定と、短期間での黒毛和種生産基盤の確保と育種改良の進展の大きな足がかりになると考えられる。

本研究で開発した技術や手法を広島県で展開することにより、日本で初めての新たな畜産経営方式が確立できると考えられる。

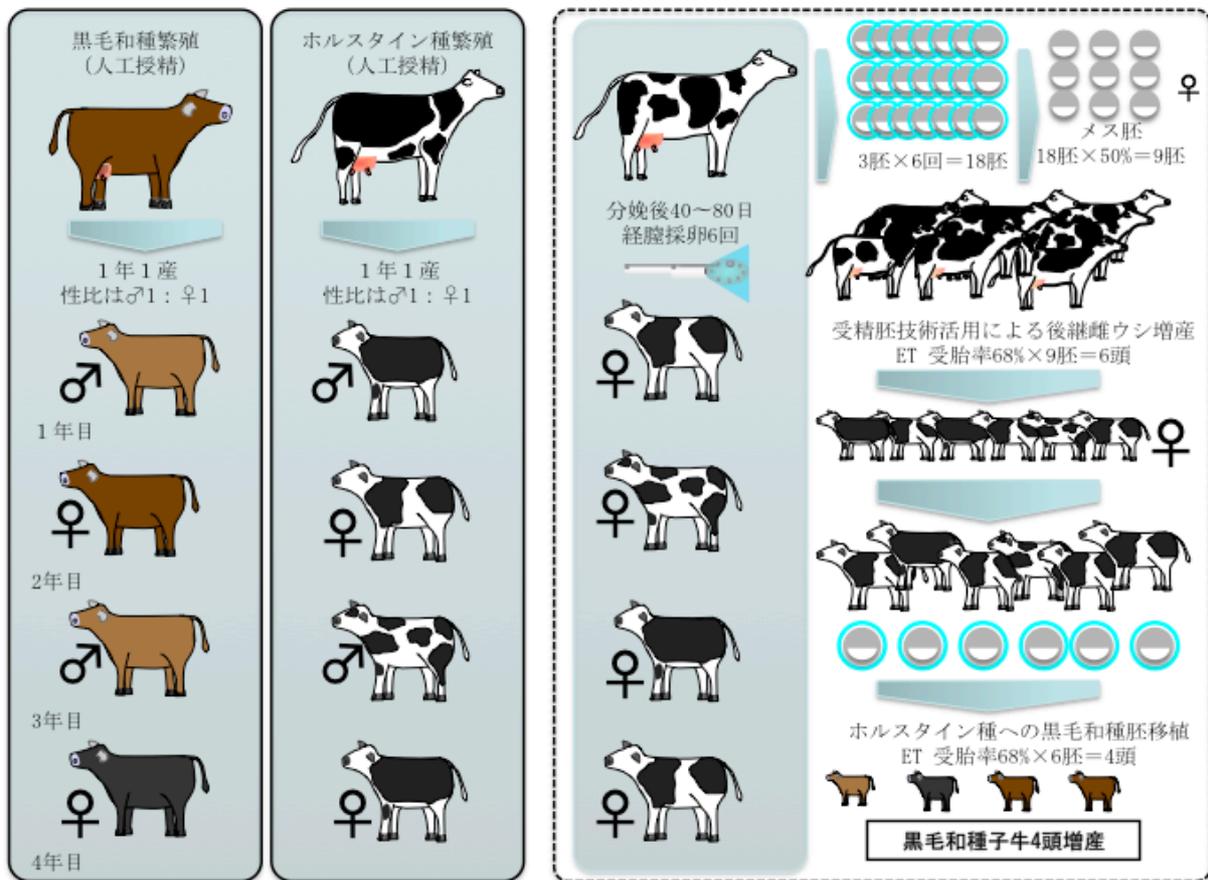


図5. 生殖工学技術による酪農経営体からの黒毛和種増産

## 総括

ウシはヒトと同じ単胎動物であり、280～285日の妊娠期間で、1年に1頭の子牛しか生産しない。それゆえ育種改良や個体数の増産には長い年月が必要となる。広島県のよ  
うに生産農家や飼養頭数ともに減少した中で、遺伝的多様性を維持しながら育種改良を  
行い、ブランド化を図るためには、受精胚移植技術の積極的な利用による優良な遺伝子  
を有したウシの生産と世代間隔の短縮によって、育種改良に必要な期間の短縮と確実な  
遺伝的改良を行う必要がある。これまでの黒毛和種からの産子生産に加えて、ホルスタ  
イン種を借り腹とした受精胚移植活用による黒毛和種生産技術の構築が欠かせない。そ  
のためにはまず必要なことは、ホルスタイン種の安定的後継牛生産である。借り腹となる  
ホルスタイン種の雌牛を如何に効率的に生産するかが重要なポイントとなる。この効率  
的生産を達成するための技術が、経膈採卵技術と体外胚操作技術を活用した性判別（遺  
伝子診断胚）である。通常、ホルスタイン種から受精胚を得るためには、体内受精胚生  
産技術を用いることが多い。しかしながら、この技術は、泌乳中のウシで実施すると、  
後継牛生産のための人工授精を休止する必要がある、そのために空胎期間が延長されて  
しまうこと、採卵のために長い期間乾乳を行えば生乳生産量が減少することから、未経  
産や乳生産を行わない採卵専用のウシに適用されている。一般的なホルスタイン飼養農  
家は、自分の経営条件に適合した能力、血統の後継牛を計画的に確保しているため、体  
内受精胚生産技術活用は現実的でない。そこで、本研究では、分娩後の生理的空胎期間  
に受精胚生産を実施して、酪農経営に悪影響を与えることなく、酪農家の望むウシから  
の受精胚の確保を可能させることを目的とした。

本研究では、上記したような効率的なホルスタイン種の後継牛生産を達成するために、  
第2章では、GnRH投与がウシ経膈採卵に及ぼす影響、第3章では、マニピュレーターを

必要としない性判別用細胞のサンプリング方法の開発，第4章では，生理学的空胎期間に経膣採卵を適用したホルスタイン種の効率的増殖方法についての研究を実施した。

第2章のウシ経膣採卵における GnRH 投与効果については，GnRH の卵胞波新生作用を利用し，ウシ経膣採卵時に，数多くの卵子を採取することを目的とした。発情周期の任意の時期に卵胞波の新生を誘起させるため，2種類の GnRH 製剤（フェルチレリンとブセレリン）を投与して，卵巣内卵胞数の推移，COCs 採取数及びその品質を検討した。GnRH 投与0時間から24時間間隔で72時間目まで，卵巣内の卵胞動態を超音波画像診断装置を用いて行った。また，GnRH 投与後48時間目に経膣採卵を実施し，COCs 採取数及びその品質を検討した。

実験1では，GnRH 投与48時間後の2～4 mm の卵胞において GnRH 投与区の値 ( $11.0 \pm 4.8$  個) は，無処理区の値 ( $23.7 \pm 13.7$  個) に比較して有意に低かった。一方，4～6 mm の卵胞においては，48 及び72 時間後の両時間ともに GnRH 投与区が無処理区に比較して，有意に高い値を示した。同様に GnRH 投与48 時間後の6～8 mm の卵胞において GnRH 投与区の値 ( $3.8 \pm 2.8$  個) は無処理区の値 ( $1.2 \pm 1.1$  個) に比較して有意に高かった。モニター上で観察できる卵巣内卵胞数の平均値も GnRH 投与48 時間後 GnRH 投与区の値 ( $32.6 \pm 9.7$  個) は，無処理区の値 ( $30.0 \pm 12.7$  個) に比較して有意に高かった。

モニター上で観察できる平均卵胞径においても，GnRH 投与48 及び72 時間後においては，両時間ともに GnRH 投与区が無処理区に比較して，有意に高い値を示した。

2種類の GnRH 製剤投与については，投与後48 時間目における卵巣内の2～4，6～8，及び8 mm 以上の卵胞数及び平均卵胞数においては，3つの区には有意差が認められなかった。しかし，4～6 mm の卵胞数は，フェルチレリン投与区及びブセレリン投与区の値が無処理区と比較して，有意に高い値であった。また，平均卵胞直径においても同様に，フェルチレリン投与区及びブセレリン投与区が無処理区と比較して有意に高い値を示し

た。

以上の結果より，GnRH 投与後 48 時間後において，モニター上で観察可能なウシ卵巢内卵胞数が最も高くなり，また，超音波画像診断装置のモニターで観察・吸引作業が容易な 4～6 mm の中小型卵胞が多く認められたことから，この GnRH 投与から 48 時間後に経膣採卵を実施することが有効であると考えられた。また，フェルチレリン及びブセレリンのいずれも，経膣採卵前に投与することで，体外培養可能な COCs を効率的に採取することができると考えられた

第 3 章のマニピュレーターを必要としない性判別用細胞のサンプリング方法の開発では，ウシ受精胚からマイクロマニピュレーター等の機器を利用せず，性判別（遺伝子診断）のための簡易な，新たなサンプリング方法の開発にある。本研究では，実体顕微鏡と細く伸ばしたガラスツールで桑実期胚から性判別（遺伝子診断）用サンプル細胞を採取する“細胞剥離法”を検討した。細胞剥離法と従来のブレード切断法でサンプリング後の胚の生存性及び受胎性を比較し，その有効性について検討を行った。

細胞剥離法により，平均  $2.4 \pm 2.0$  個，受精胚からサンプルを採取することができ，ブレード切断より少数の細胞を確実に採取することができた。ウシ体外受精後の桑実期胚もしくは胚盤胞期胚から細胞のサンプリングを行った結果，修復培養後の総細胞数は無処置区で  $117.5 \pm 29.9$  個，ブレード切断区で  $77.3 \pm 24.7$  個及び細胞剥離区  $96.2 \pm 26.6$  個であり，既存法のブレード切断は，他の 2 区より有意に総細胞数が少なかった。各処置区を受胎率は，無処置区で 68.4% (13/19)，ブレード切断区で 56.5% (13/23)，細胞剥離区 68.0% (17/25) であり，有意差はなかったが，ブレード切断区は他の 2 区より低い受胎率であった。

以上の結果から，本研究で用いた細胞剥離法は，従来法より少ない細胞採取が可能なこと，受精胚の細胞数に与えるダメージを最小限にすることで，高い受胎性を維持することが可能であると考えられる。また，細胞剥離法は，マイクロマニピュレーター等の

特別な器具，機材を用いず，簡易に受精胚から，性判別（遺伝子診断）等に利用可能なサンプル細胞を採取することができ，かつ受胎性を担保できると考えられる。

第4章の経膣採卵を用いたホルスタイン種の効率的な増殖方法の開発では，1年間に生産可能な子牛数を増加させるため，生理的空胎期間を利用して経膣採卵したCOCsからの体外受精胚生産を検討した。採卵数を増加させるために，GnRHを経膣採卵48時間前に投与し，体外受精胚生産を試みた。また，複数回の経膣採卵実施後に人工授精を行い，受胎性に与える影響についても調査した。

モニター上で観察できる卵巣内卵胞数（経膣採卵実施が可能な卵胞数）はGnRHを投与することで $16.0 \pm 1.0$ 個（n=101）から $19.5 \pm 1.3$ 個（n=102）に有意に高くなり，経膣採卵で採取された卵子数も $11.5 \pm 1.0$ 個（n=101）から $15.3 \pm 1.3$ 個（n=102）に有意に高い値を示し，経膣採卵時のCOCs数増加に効果があることが明らかになった。

採取されたCOCs品質についても形態学的な評価でも卵丘細胞が多く付着し，卵細胞質も均質なGrade I～IIがGnRH投与により有意に高い値を示しており，BCB染色による細胞質検査でも，陽性がGnRH投与で形態学的検査結果と同様に有意に発生能の高いCOCsが多く採取されており，GnRH投与は，採取されるCOCsの数だけでなく品質改善にも効果があることが明らかにされた。

体外受精成績も全ての発生ステージでGnRH投与区が有意に高い結果を示しており，1回の経膣採卵で得られる移植可能胚数（胚盤胞期胚）は，GnRH投与区 $3.0 \pm 0.3$ 個，無処理区 $1.7 \pm 0.2$ 個であり，GnRH投与によって，無処置区と比較して1.7倍の移植可能胚を得られることが明らかにされた。

受胎性についても無処置区42.1%，GnRH投与59.5%と両者に有意差はないものの，GnRH投与区が高い数値となっており，GnRH投与で生産された受精胚も無処置区と同様な受胎率で受胎しており，正常な受胎性についても確認された。

分娩後40～80日の間に複数回の経膣採卵を実施した供卵牛に経膣採卵終了後，通常の

人工授精を行い、受胎性について確認したところ、受胎までの平均人工授精回数は GnRH 投与  $1.4 \pm 0.8$  回、無処置  $1.7 \pm 0.7$  回、受胎までの平均日数はそれぞれ  $96.1 \pm 23.5$  日、 $127.8 \pm 114.6$  日と有意差はないものの未処置のものと同様に受胎しており、経膈採卵そのものがその後の人工授精に悪影響を及ぼさないことが明らかになった。

以上の結果より、生理的空胎期間の分娩後 40～80 日目に GnRH を経膈採卵 48 時間前に投与することで、1.7 倍の胚盤胞期胚を生産できることが明らかにされた。また、経膈採卵後を実施した後の、人工授精成績も受精回数、受胎に要する日数についてもいずれも良好であり、受精胚生産と人工授精を併用した効率的な後継牛生産の可能性が示された。

## 謝辞

本研究を遂行し、取りまとめに際して、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜った広島大学大学院生物圏科学研究科前田照夫（家畜生殖学研究室）教授，吉村幸則（家畜生体機構学研究室）教授，都築政起（家畜育種遺伝学研究室）教授，島田昌之（家畜生殖学研究室）准教授に謹んで感謝の意を表します。

また，本研究遂行にあたり貴重な御助言と御協力を賜った広島大学大学院生物圏科学研究科磯部直樹（家畜生体機構学研究室）准教授に心から御礼申し上げます。

本研究に際して広島県立総合技術研究所畜産技術センター一育種繁殖研究部の皆様に多大な御協力をいただきました。ここに御礼申し上げます。

## 引用文献

- Adams CE (1982) Egg transfer in the rabbit. In: mammalian egg transfer. Cyril E, Adams (ed), CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, : 29-48.
- Adams GP (1999) Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *J Reprod Fert*, 54 : 17-32 (Suppl).
- Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JCH, Ginther OJ (1992) Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fert*, 94 : 177-188.
- Agung B, Otoi T, Wongsrikeao P, Taniguchi M, Shimzu R, Watari H, Nagai T (2006) Effect of maturation culture period of oocytes on the sex ratio of in vitro fertilized bovine embryo. *J Reprod Dev*, 52 : 123-127.
- Alcivar AA, Maurer RR, Anderson LL (1983) Superovulatory responses in FSH- or PERGONAL-treated heifers. *Theriogenology*, 19 : 109 (Abstr).
- Aller JF, Mucci NC, Kaiser GG, Rios G, Callejas SS, Alberio RH (2010) Transvaginal follicular aspiration and embryo development in superstimulated early postpartum beef cows and subsequent fertility after artificial insemination. *Anim Reprod Sci*, 119 : 1-8.
- Alm H, Torner H, Lohrke B, Viergetz T, Ghoneim MI, Kaanitz W (2005) Bovine blastocyst development rate in vitro is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Theriogenology*, 63 : 2194-2205.
- Almodin CG, Moron AF, Jr Kulay L, Minguetti-Camara VC, Moraes AC, Torioni MR (2005)

- A bovine protocol for training professionals in preimplantation genetic diagnosis using polymerase chain reaction. *Fertil Steril*, 84 : 895-899.
- Anderson GB (1987) Identification of embryonic sex by detection of H-Y antigen. *Theriogenology*, 27 : 81-87.
- Bhojwani S, Alem H, Torner H, Kanitz W, Poehland R (2007) Selection of developmentally competent oocytes through brilliant cresyl blue stain enhance blastocyst development rate after nuclear transfer. *Theriogenology*, 67 : 341-345.
- Blondin P, Bousquet D, Twagiramungu H, Barnes F, Sirard MA (2002) Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biol Reprod*, 66 : 38-43.
- Boni R, Roelofsen MWM, Pieterse MC, Kogut J, Kruip TA (1997) Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. *Theriogenology*, 48 : 277-289.
- Brackett BG, Bousquest D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA (1982) Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol Reprod*, 27 : 147-158.
- Bungartz L, Lucas-Hahn A, Rath D, Niemann H (1995) Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin pretreatment and in different reproductive stages. *Theriogenology*, 43 : 667-675.
- Burke CR, Day ML, Bunt CR, Macmillan KL (2000) Use of a small dose of estradiol benzoate during diestrus to synchronize development of the ovulatory follicle in cattle. *J Anim Sci*, 78 : 145-151.

- Burke JM, Sota RL, Risco CA, Staples CR, Shumitt JP, Thatcher WW (1996) Evaluation of timed insemination using a gonadotropin-releasing hormone agonist in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 79 : 1385-1393.
- Butler WR (2003) Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livest Prod Sci*, 83: 211-218.
- Carnegie JA, Durnford R, Algire J, Morgan J (1997) Evaluation of mitomycin-treated vero cell as a co-culture system for IVM/IVF-derived bovine embryos. *Theriogenology*, 48 : 377-389.
- Casida LE, Nalbandov A, McShan WH, Meyer RK, Wisnicky W, Smith C (1940) *World Anim Rev*, 65 : 2-10.
- Cenariu M, Pall E, Cernea C, Groza I (2012) Evaluation of bovine embryo biopsy techniques according to their ability to preserve embryo viability. *J Biomed Biotechnol*, Article ID 541384.
- Chang MC (1959) Fertilization of rabbit ova in vitro. *Nature*, 184 : 466-467.
- Chastant-Mailard S, Quinton H, Lauffenburger J, Cordonnier-Lefort N, Richard C, Marchal J, Mormede P, Renard JP (2003) Consequences of transvaginal follicular puncture on well-being in cows. *Reproduction*, 125 : 555-563.
- Chenault JR, Kratzer DD, Rzepkowsiki RA, Goodwin MC (1990) LH and FSH response of Holstein heifers to fertirelin acetate, gonadorelin and buserelin. *Theriogenology*, 34 : 81-98.
- Costa LL, Silva JC, Diniz P, Cidadao R (2002) Preliminary on sexing bovine pre-implantation embryos under the conditions of Portugal. *RPCV*, 97 : 95-98.
- Critser ES, Critser JK, Winch RP, Eilts C (1982) Efficacy of Pergonal as a

- superovulatory drug in cattle. *Theriogenology*, 17 : 83.
- 中国四国農政局. 2014. 中国四国の畜産.  
[www.maff.go.jp/chushi/seisan/chikusan/pdf/130729\\_gaiyou.pdf](http://www.maff.go.jp/chushi/seisan/chikusan/pdf/130729_gaiyou.pdf).
- Curran S, Pierson RA, Ginther OJ (1986) Ultrasonographic appearance of the bovine conceptus from days 20 through 60. *J Am Vet Med Assoc*, 189 : 1295-1302.
- DeJarnette JM, Salverson RR, Marshall CE (2001) Incidence of premature estrus in lactating dairy cows and conception rates to standing estrus or fixed-time insemination after synchronization using GnRH and PGF2 $\alpha$ . *Anim Reprod Sci*, 67 : 27-35.
- De Loos FC, van Viliet P, van Maurik P, Kruip AM (1989) Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Res*, 24 : 197-204.
- De Roover R, Feugang JM, Bols PE, Genicot G, Hanzen C (2008) Effects of ovum pick-up frequency and FSH stimulation: a retrospective study on seven years of beef cattle in vitro embryo production. *Reprod Domest Anim*, 43 : 239-245.
- Donaldson LF and Perry B (1983) Embryo production by repeated superovulation of commercial donor cows. *Theriogenology*, 20 : 163-168.
- Drost M and Thatcher WW (1992) Application of gonadotrophin releasing hormone as therapeutic agent in animal reproduction. *Anim Reprod Sci*, 28 : 11-19.
- Eppig J and O'Brien M (1996) Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol Reprod Dev*, 54 : 197-207.
- Epstein CJ, Smith S, Travis B (1980) Expression of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. *Tissue Antigens*, 15 : 63-67.
- Erickson BH (1966) Development and senescence of then post natal bovine ovary. *J Anim Sci*, 25 : 800-805.

- Eystone WH and First NL (1989) Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J Reprod Fertil*, 85 : 715-720.
- Fair T, Hyttel P, Greve T (1995) Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev*, 42 : 437-442.
- Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R, Lazzari G (2001) Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology*, 55 : 1341-1357.
- Garcia A, Salaheddine M (1998) Effects of repeated ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development. *Theriogenology*, 50 : 575-585.
- Geshi M (2012) Current status and the future of bovine embryo transfer using sex determined embryos. *J Mamm Ova Res*, 29 : 124-127.
- Gibbons JR, Beal WE, Krisher RL, Fabre EG, Pearson RE, Gwazdauskas FC (1994) Effects of once versus twice weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. *Theriogenology*, 42 : 405-419.
- Ginther OJ, Kastelic JP, Knopf L (1989) Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrus cycle. *Anim Reprod Sci*, 20: 187-200.
- Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM, Gibbons JR, Kot K (1996) Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol Repr*, 55: 1187-1194.
- Goodhand KL, Watt RG, Staines ME, Hutchinson JSM, Boradbert PJ (1999) In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies of following FSH treatment. *Theriogenology*, 51 : 951-961.

- Goodhand KL, Staines ME, Hutchinson JSM, Broadbent PJ (2000) In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine oocyte donors treated with progestagen, oestradiol and FSH. *Anim Reprod Sci*, 63 : 145-158.
- Goto K, Kinoshita A, Takuma Y, Ogawa K (1990) Fertilization of bovine oocytes by the injection of immobilized, killed spermatozoa. *Vet Rec*, 127 : 517-520.
- Garcia GJK, Seidel GE Jr, Elsdon RP (1982) Efficacy of shortened FSH treatment for superovulating cattle. *Theriogenology*, 17 : 90 (Abstr).
- Hagemann LJ, Beaumont SE, Berg M, Donnison MJ, Ledgard A, Peterson AJ, Schumann A, Tervit R (1999) Development during IVP of bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrus cycle stage, follicle size and atresia. *Mol Reprod Dev*, 53 : 451-458.
- Hanada A, Enya Y, Suzuki T (1986) Birth of calves by non-surgical transfer of in vitro fertilized embryos obtained from oocytes matured in vitro. *Jpn J Anim Reprod*, 32 : 208.
- 長谷川清寿・澤香代子・坂本洋一・岡崎尚之。(2011) 経膈採卵と過剰排卵処置の併用による和牛胚の生産効率化に関する検討 (第1報) . 島根県畜産技術センター研究報告, 42 : 7-12.
- Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauley AD, Mower SA, Neely B, Shuey LS, Stokes JE, Timmer SA (1995) Production freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, 43 : 141-152.
- Hasler JF, Cardey E, Stokes JE, Bredbacka P (2002) Nonelectrophoretic PCR-sexing of bovine embryos in a commercial environment. *Theriogenology*, 58 : 1457-1469.
- Herr CM and Reed KC (1991) Micromanipulation of bovine embryos for sex determination. *Theriogenology*, 35 : 45-54.

- Hirayama H, Kageyama S, Moriyasu S, Sawai K, Onoe S, Takahashi Y, Katagiri S, Toen K, Watanabe K, Notomi T, Yamashita H, Matuzaki S, Minamihashi A (2004a) Rapid sexing of bovine preimplantation embryos using loop-mediated isothermal amplification. *Theriogenology*, 62: 887–896.
- Hirayama H, Kageyama S, Moriyasu S, Hirano T, Sugimoto Y, Kobayashi N, Inaba M, Sawai K, Onoe S, Minamihashi A, (2004b) Genetic diagnosis of claudin-16 deficiency and sex determination in bovine preimplantation embryos. *J Repr Dev*, 50 : 613–618.
- Hirayama H, Fujikawa A, Kageyama S, Moriyasu S, Sawai K, Onoe S, Minamihashi A (2008) Multiple genotyping in bovine pre-implantation embryos with whole genome amplification. *J Anim Sci*, 79 : 554–560.
- Horiuchi T, Emuta C, Yamauchi Y, Oikawa T, Numabe T, Yanagimachi R (2002) Birth of normal calves after intracytoplasmic sperm injection of bovine oocytes: a methodological approach. *Theriogenology*, 57: 1013–1024.
- Humblot P, Bourhis DL, Fritz S, Colleau JJ, Gonzalez C, Joly CG, Malafosse A, Heyman Y, Amigues Y, Tissier M, Ponart C (2010) Reproductive technologies and genomic selection in cattle. *Vet Med Int*, 2010 : 1–8.
- Kadokawa H, Takusari N, Takahashi H, Yamada Y, Kariya T (1998) GnRH inducing LH release, nutrition and plasma cortisol in high producing dairy cows postpartum. *J Reprod Dev*, 44 : 197–203.
- Kageyama S and Hirayama H (2012) Sexing of bovine preimplantation embryos using loop-mediated isothermal amplification. *J Mamm Ova Res*, 29 : 113–118.
- Kaneko H, Nakanishi Y, Taya K, Kishi H, Watanabe G, Sasamoto S, Hasegawa Y (1993) Evidence that inhibin is an important factor in the regulation of FSH

- serection during the mid-luteal phase in cows. *J Endocrinol*, 136 : 35-41.
- Kastelic JP, Curran S, Pierson RA, Ginther OJ (1988) Ultrasonic evaluation of the bovine conceptus. *Theriogenology*, 29 39-54.
- 家畜改良センター. 2014. 牛の個体識別情報の集計データ.  
[https:// www.id.nlbc.go.jp/hm/oshirase\\_black.html#2014121901](https://www.id.nlbc.go.jp/hm/oshirase_black.html#2014121901).
- Kendrick KW, Bailey TL, Garst AS, Pryor AW, Ahamadzadeh A, Alers RM, Eystone WE, Pearson RE, Gwazdauskas FC (1999) Effects of energy balance on hormones, ovarian activity and recovered oocytes in lactating Holstein cows using trasvaginal follicular aspiration. *J Dairy Sci*, 82 : 1731-1740.
- Kittok RJ, Britt JH, Convey EJ (1973) Endocrine response after GnRH in luteal phase cows and cows with follicular cysts. *J Anim Sci*, 37 : 985-989.
- Klossok G, Hadelar KG, Lemme E, Rath D, Schindler L, Niemman H (1997) Estrus cyclicity and pregnancy establishment during ultrasound-guided follicular aspiration in dairy cows. *Theriogenology*, 47 : 160.
- Kohram H, Twagiramungu H, Bousquet D, Durocher J, Guilbault LA (1998) Ovarian stimulation after folliclar wave synchronization with GnRH at two different stages of the estrus cycle in cattle. *Theriogenology*, 49 : 175-186.
- Kuroiwa T, Ishibashi A, Fukuda M, Kim S, Tanaka T, Kamomae H (2005) Estrus synchronization and conception rate after progesterone releasing intravaginal device (PRID) treatment from the early luteal phase in heifers. *J Reprd Dev*, 51: 669-673.
- Lauria A, Genazzani AR, Oliva O, Inaudi P, Cremonesi F, Monittola C, Aureli G (1982) Clinical and endocrinological investigations on superovulation induced in heifers by human menopausal gonadotrophin. *J Reprod Fertil*, 166 : 219-225.

- Leoni G, Ledda S, Bogliolo L, Naitana S (2000) Novel approach to cell sampling from preimplantation ovine embryos and its potential use in embryonic genome analysis. *J Reprod Fertil*, 119 : 309-314.
- Lindsey BR, Looney CR, Funk DJ, Faber DC, Gue CS, Kramer AJ (1994) The effect of apparent dominant follicle removal (DFR) prior to FSH treatment on superstimulated response in problem donors. *Theriogenology*, 41 : 238.
- Lohuis M (1995) Potencial benefits of bovine embryo manipulation technologies to genetic improvement programs, *Theriogenology*, 43 : 51-60.
- Looney CR, Lindsey BR, Gonseth CL, Johnson DL (1994) Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology*, 41 : 67-72.
- Lopatarova M, Cech S, Krontorad P, Holy L, Hlavicova J, Dolezel R (2007) Lower quality bovine embryos may be successfully used for sex determination. *Vet Med*, 52 : 540-546.
- Lopatarova M, Cech S, Krontorad P, Holy L, Lalova H, Dolezel R (2010) Conception rate after sex determination and cryopreservation of D7 bovine embryos. *Vet Med*, 55 : 10-18.
- Lopes AS, Martinussen T, Greve T, Callesen H (2006) Effect of days post-partum, breed and ovum pick-up scheme on bovine oocyte recovery and embryo development. *Reprod Dom Anim*, 41 : 196-203.
- Lucy MC, Savio JD, Badinga L, Sota RL, Thatcher WW (1992) Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J Anim Sci*, 70 : 3615-3626.
- Lucy MC, (2001) Reproductive loss in high-producing dairy cattle: Where will it end? *J Dairy Sci*, 84 : 1277-1293.

- Louis MM (1995) Potential benefits of bovine embryo-manipulation technologies to genetic improvement programs. *Theriogenology*, 43 : 51-60.
- Machaty Z, Palidi A, Csaki T, Varga Z, Kiss I, Barandi Z, Vajta G (1993) Biopsy and sex determination by PCR of IVF bovine embryos. *J Reprod Fertil*, 98 : 467-470.
- Macmillan KL, Thatcher WW (1991) Effect of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. *Biol Reprod*, 45 : 883-889.
- Madison V, Avery B, Greve T (1992) Selection of immature bovine oocytes for developmental potential in vitro. *Anim Reprod Sci*, 27 : 1-11.
- Mapletoft RJ and Hasler JF, (2005) Assisted reproductive technologies in cattle: a review, *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 24 : 393-403.
- Manjunatha RM, Gupta PSP, Devaraj M, Ravindra JP, Nandi S (2007) Selection of developmentally competent buffalo oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM. *Theriogenology*, 68 : 1299-1304.
- Meintjes M, Bellow MS, Broussard JR, Paul JB, Godke RA (1995) Transvaginal aspiration of oocytes from hormone-treated pregnant beef cattle for in vitro fertilization. *J Anim Sci*, 73 : 967-974.
- 森純一. 2001. 胚移植: 獣医繁殖学. 第2版. 森純一・金川弘司・浜名克己編. pp. 207-210. 文永堂出版. 東京.
- Moore NW, Adams CE, Rawson LEA (1968) Developmental potential of single blastomeres of rabbit egg. *J Reprod Fertil*, 17 : 527-531.
- Mutter LR, Graden AP, Olds D (1964) Successful non-surgical bovine embryo transfer. *AI Digest*, 12 : 3.
- Nagashima H, Matui K, Sawasaki T, Kano Y (1984) Production of monozygotic mouse

- twins from microsurgically bisected morulae. *J Reprod Fertil*, 70 : 357-362.
- Nakada K, Ishikawa Y, Nakao T, Sawamukai Y (2002) Changes in responses to GnRH on luteinizing hormone and follicle stimulating hormone secretion in prepubertal heifers. *J Reprod Dev*, 48 : 545-551.
- Newcomb R (1980) Investigation of factors affecting superovulation and non-surgical embryo recovery from lactating British Frisian cows. *Vet Rec*, 106 : 48-52.
- 日本家畜人工授精師協会. 2014. 調査情報・年報・速報. [aija.ln.gr.jp/3/tyosa.html](http://aija.ln.gr.jp/3/tyosa.html).
- 日本食肉格付協会. 2014. 牛枝肉, 出荷県別格付結果情報. [www.jmga.or.jp](http://www.jmga.or.jp).
- 日本食肉市場卸売協会. 2014. 食肉市場速報. [www.jmma.or.jp/j\\_02\\_Srh.asp](http://www.jmma.or.jp/j_02_Srh.asp).
- 農林水産省. 2014. 畜産統計. [www.e-stat.go.jp/cgi/estat/List.do?lid=000001127029](http://www.e-stat.go.jp/cgi/estat/List.do?lid=000001127029).
- O'Doherty EM, Wade MG, Hill JL, Boland MP (1997) Effects of culturing bovine oocytes either singly or in groups on development to blastocysts. *Theriogenology*, 48 : 161-169.
- Ooe M, Rajamahendran R, Boediono A, Suzuki T (1997) Ultrasound-guided follicle aspiration and IVF in dairy cows treated with FSH after removal of dominant follicle at different stages of the estrus cycle. *J Vet Med Sci*, 59 : 371-376.
- Osawa T, Nakao T, Nakada K, Moriyoshi M, Kawata K (1997) Pituitary response to exogenous GnRH on day 7 postpartum in high-producing dairy cow. *Reprod Dom Anim*, 31 : 343-347.
- Oropeza A, Wrenzycki C, Herrmann D, Hadelers KG, Niemann H (2004) Improvement of the development capacity of oocytes from prepubertal cattle by intraovarian insulin-like growth factor-I application. *Biol Reprod*, 70 : 1634-1643.
- Otsu E, Sato A, Kido K, Utunomiya T (2008) Points to note in biopsy for

- pre-implantation diagnosis. *J Mamm Ova Res*, 25 : 117-118.
- Ozil JP, Heyman Y, Renard JP (1982) Production of monozygotic twins by micromanipulation and cervical transfer in the cow. *Vet Rec*, 110 : 126-127.
- Parrish JJ, Susko-Parish JL, Liebfried-Ruthledge ML, Critser ES, Eystone WH, First NL (1986) Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 25 : 591-600.
- Petyim S, Bage R, Forsberg M, Rodriguez-Martinez H, Larsson, B (2000) The effect of repeated follicular puncture on ovarian function in dairy heifers. *J Vet Med Pathol Clin Med*, 47 : 627-640.
- Pieterse MC, Kappen KA, Kruip TA, Taverne MA, (1988) Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, 30 : 751-762.
- Pieterse MC, Kruip PL, Willemse AH, Taverne MA (1991) Characteristics of bovine estrus cycles during repeated transvaginal, ultrasound-guided puncturing of follicles for ovum pick-up. *Theriogenology*, 35 : 401-413.
- Pursel VG, Wall RJ, Jr Rexroad CE, Hammer RE, Brinster RL (1985) A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. *Theriogenology*, 24 : 687-691.
- Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC (1995) Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF $2\alpha$  and GnRH. *Theriogenology*, 44 : 915-923.
- Pursley JR, Wiltbank MC, Stevenson JS, Ottobre JS, Graverick HA, Anderson LL (1997) Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. *J Dairy Sci*, 80 : 295-300.

- Rettmer I, Stevenson JS, Corah LR (1992) Endocrine responses and ovarian changes in inseminated dairy heifers after an injection of a GnRH agonist 11 to 13 days after estrus. *J Anim Sci*, 70 : 508-517.
- Roche JF, Mihn M, Diskin MG, Irland JJ (1998) A review of regulation of follicle growth in cattle. *J Anim Sci*, 76 : 16-29.
- Rust JM, Eikelmann E, Frank KU, Niemann H (1999) A comparison between the in vitro embryo production potential of superstimulated and non-stimulated pregnant Holstein Friesian cows. *Theriogenology*, 51 : 329 (Abstr).
- Ryan DP, Snijders S, Yaakub H, O'Farrell KJ (1995) An evaluation of estrus synchronization programs in reproductive management of dairy herds. *J Anim Sci*, 73 : 3687-3695.
- 斉藤則夫. 2003. 家畜繁殖技術の推移. 農林水産技術研究ジャーナル. 26 : pp. 5-10.
- Sato T, Nakada K, Uchiyama Y, Kimura Y, Fujiwara N, Stato Y, Umeda M, Furukawa T (2005) The effect of pretreatment with different dose of GnRH to synchronize follicular wave on superovulation of follicular growth in dairy cattle. *J Reprod Dev*, 55 : 573-578.
- Savio JD, Keenan L, Boland MP, Roche JF (1988) Pattern of growth of dominant follicles during the oestrus cycle in heifers. *J Reprod Fertil*, 83 : 663-671.
- Schmidt M, Avery B, Smith SD, Purwantrara B, Greve T (1992) The freezability of biopsied bovine embryos. *Theriogenology*, 38 : 615-621.
- Shally AV, Arimura A, Kastin AJ (1973) At least nine substances from the hypothalamus control the secretion of pituitary hormones. *Science*, 179 : 341-350.
- Shans A, Westerlaken LAJ, Wit AAC, Eyestone WH, Boer HA (1991) Ultrasound-guided

- transvaginal collection of oocytes in the cow. *Theriogenology*, 35 : 288 (Abstr).
- Shirazi A, Borjian S, Nazari H, Ahmadi E, Heidari B, Bahiraei A (2010) Effects of timing on cell biopsy from pre-compacted morula stage bovine embryos on subsequent embryonic development. *J Reprod Infertil*, 11 : 25-32.
- Simon L, Bungartz L, Rath D, Niemann H (1993) Repeated bovine oocyte collection by means of a permanently rinsed ultrasound guided aspiration unit. *Theriogenology*, 39 : 312 (Abstr).
- Sirois J and Fortune JE (1988) Ovarian follicular dynamics during the estrus cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol Reprod*, 39 : 308-317.
- Skrzyszywska M and Smorag Z (1987) Effect of splitting on cell losses and the quality of bisected embryos. *Theriogenology*, 27 : 276.
- Smith C (1988) Applications of embryo transfer in animal breeding. *Theriogenology*, 29 : 203-212.
- Souza AH, Ayres H, Ferreira RM, Wiltbank MC (2008) A new presynchronization system (Double-Ovsynch) increases fertility at first postpartum timed AI in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 70 : 208-215.
- Spicer LJ and Echtenkamp SE (1986) Ovarian follicular growth, function and turnover in cattle : A review. *J Anim Sci*, 62 : 428-451.
- Steptoe PC and Edwards RG (1978) Birth after reimplantation of a human embryo. *Lancet*, ii : 366.
- Stubbings RB and Walton JS (1995) Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrus cycle and follicular dynamics in Holstein cows.

- Theriogenology, 43 : 705-712.
- Sugulle AH, Douchi O, Koyama H (2008) Development competence of bovine oocytes selected by brilliant cresyl blue staining: Effect of the presence of corpus luteum on embryo development. J Mamm Ova Res, 25 : 50-55.
- Takahashi Y and Hanada A (1984) Penetration of zona-free hamster eggs in vitro by ejaculated bull spermatozoa after treatment with ionophore A23187. Jpn J Anim Reprod, 30 : 30-38.
- Takahashi Y and First, NL (1992) In vitro development of bovine one-cell embryo : influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. Theriogenology, 37 : 963-978.
- Thibier M and Nibart M (1995) The sexing of bovine embryos in the field. Theriogenology, 43 : 71-80.
- Tohei A, Shi FX, Ozawa M, Imai K, Takahashi H, Simohira I, Kojima T, Watanabe G, Taya K (2001) Dynamic changes in plasma concentrations of gonadotropins, inhibin, estradiol-17 $\beta$  and progesterone in cows with ultrasound-guided follicular aspiration. J Vet Med Sci, 63 : 45-50.
- Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H (1997) Comparison of two methods to produce in vitro fertilized, biopsied and vitrified bovine embryo. Theriogenology, 47 : 501-509.
- Walton JJS, Christie NA, Stubbing RB (1993) Evaluation of frequency of ultrasonically guided follicle aspiration on ovarian dynamics. Theriogenology, 39 : 336 (Abstr).
- Whittingham DC (1968) Fertilization of mouse eggs in vitro. Nature, 220 : 592-593.
- Willadsen SM (1980) The viability of early cleavage stages containing half the

- nomal number of blastomeres in the sheep. *J Reprod Fertil*, 59 : 357-362.
- Willadsen SM (1981) The development capacity of blastomeres from 4- and 8- cell sheep embryos. *J Embryol Exp Morphol*, 65 : 165-172.
- Willadsen SM (1987) Nuclear transplantation in sheep embryo. *Nature*, 320 : 63-65.
- Willett EL, Black WG, Casida LA, Stone WH, Buckner PJ (1951) Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. *Science*, 113 : 247.
- Williams TJ, Elsdon RP, Seidel GE (1983) Bisecting bovine embryos : Methods, applications and success rates. *Proc Ann Conf. Artif. Insem. Embryo Transf. in Beef Cattle*, Denver, Natl. Assoc. Anim. Breeders, Colorado, MO. 45-51.
- Wiltbank MC (1998) Information on reguration of reproductive cyclicity in cattle. *Proc Am Asso of Bovine Practitioners*, 31 : 26-33.
- Wilmut I, Schnieke A, Mcwhir J, Kind AD (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385 : 810-813.
- Wolfenson D, Thactcher WW, Savio JD, Badinga L, Lucy MC (1994) The effect of a GnRH analogue on the dynamics of follicular development and synchronization of estrus in lactating cyclic dairy cows. *Theriogenology*, 42 : 633-644.
- Yamada K, Nakao T, Mihara N (1999) Synchronization of ovulation and fixed-time insemination for improvement of conception rate in dairy herds with poor estrus detection efficiency. *J Reprod Dev*, 45 : 51-55.
- Yamamoto K, Otoi T, Koyama N, Horikita N, Tachikawa S, Miyano T (1999) Development to live young from bovine small oocytes after growth, maturation and fertilization in vitro. *Theriogenology*, 52 : 81-89.
- Yoshioka K, Takahashi Y, Hishinuma M, Kanagawa H (1993) In vitro culture of bovine one-cell embryos derived from in vitro fertilization using a semi-chemically

defined medium. J Vet Med Sci, 55 : 901-904.