

経膈採卵と過剰排卵処理の併用による 和牛胚の生産効率化に関する検討 (第3報)

澤香代子 坂本洋一¹⁾ 岡崎尚之²⁾ 山本裕美 長谷川清寿

要約 和牛胚の生産効率向上およびドナー牛の年1産が可能な胚生産手法を検討するため、2つの実験を行った。実験1：黒毛和種経産牛20頭を用い、経膈採卵 (OPU) による体外胚生産と OPU 後3日目からの過剰排卵処理 (SOV) による体内胚生産を組み合わせた手法 (OPU-SOV) について検討した。分娩後の適用時期により D30OPU-SOV 区および D60OPU-SOV 区の2区を設定し、さらに、分娩後60日以内に SOV のみを開始する D60SOV 区を加えた3区間で胚生産成績を比較した。その結果、体外胚生産成績ではすべての調査項目において D30OPU-SOV 区および D60OPU-SOV 区の間には差は認められなかった。体内胚生産成績は、D60SOV 区の黄体数 (27.4 ± 3.3) および採取卵数 (24.7 ± 3.3) が他の2区 (D30OPU-SOV 区: 17.6 ± 2.0 および 15.4 ± 2.1 、D60OPU-SOV 区: 17.6 ± 2.0 および 14.7 ± 1.9) よりも多く ($P < 0.01$)、移植可能胚数は D30OPU-SOV 区 (8.9 ± 2.2) が D60SOV 区 (14.7 ± 2.6) よりも少なかった ($P < 0.05$)。しかし、移植可能胚率には各試験区間の差は認められなかった。また、良質胚数については差がなかったが、良質胚率は、D60OPU-SOV 区 (57.7 ± 6.4) が他の2区 (D30OPU-SOV 区: 37.9 ± 8.0 、D60SOV 区: 35.8 ± 5.8) と比較して高率であった ($P < 0.05$)。体外胚と体内胚を合わせた移植可能胚の総生産数には、各試験区間の差は認められなかった。実験2：OPU 後3日目の卵巣における卵胞の機能的状態を調べるため、黒毛和種経産牛11頭を用いて OPU を3日間隔 (Day0 および Day3) で行い、卵丘細胞-卵子複合体 (COC) における FSH receptor (FSHR)、チトクロム P450 aromatase (P450arom)、 3β ステロイド水酸化脱水素酵素 (3β HSD) の各遺伝子発現量を調査した。FSHR は Day3 において Day0 よりも発現量が高い傾向があり、P450arom および 3β HSD は Day0 と Day3 で有意な差はなかった。また、形態的評価では Day3 が Day0 と比べ変性 COC 率が低かった ($P < 0.05$)。以上のことから、D30OPU-SOV 区では SOV 成績が不良となる可能性はあるが、体外胚を合わせれば他の2区と同等数の移植可能胚が得られた。また、D60OPU-SOV 区と D60SOV 区では胚生産数に差はないが、D60OPU-SOV 区の場合は体内胚の良質胚率が高く、その理由として SOV 開始時に発育過程の卵胞の割合が高いことが示唆された。

キーワード：牛 黒毛和種 経膈採卵 過剰排卵処理 年1産

経済価値の高い黒毛和種牛の効率的増産のため、ドナー牛当たりの移植可能胚の増数が生産現場から要望されている。加えて、和牛繁殖農場からはドナー牛の胚生産と年1産の同時実現が強く望まれている。そこで我々は、これら要望の実現を目標として、経膈採卵 (OPU) による体外胚生産ならびに過剰排卵処理 (SOV) による体内胚生産の2つの技術の併用 (OPU-SOV) の有効性について検討してきた。OPU-SOV の SOV 開始時期は OPU 後3日目からに設定し¹⁾、分娩後30日または60日目で適用する場合と SOV 単独処理の場合の3つの胚生産手法を比較し、OPU-SOV は分娩後60日目で適用した場合に良質胚 (品質コード: 1 - 2)²⁾

の割合が高率となり、分娩後30日目よりも安定した胚生産成績が得られる可能性を報告した³⁾。今回も、同一ドナー牛に対し3産次にわたり異なる手法を適用し、例数を追加した胚生産成績を比較した (実験1)。また、SOV 前の OPU の効果を検証するため、OPU を3日間隔で2回行い、採取した卵丘細胞-卵子複合体 (COC) の卵丘細胞 (顆粒層細胞) を用い、発育卵胞で発現の高い⁴⁾ FSH receptor (FSHR) およびチトクロム P450 aromatase (P450arom)、直径8mm以上の主席卵胞で発現が認められる⁵⁾ 3β ステロイド水酸化脱水素酵素 (3β HSD) の遺伝子発現量を調査した (実験2)。

1) 畜産課家畜病性鑑定室

2) 西部農林振興センター

材料および方法

実験 1

当センター繫養の黒毛和種経産牛 20 頭を供試し、各供試牛に対して 3 つの胚生産手法を産次ごとに任意の順序ですべて適用した。胚生産手法は既報^{1, 3)}に基づき、分娩後 30 日目および 60 日目時点(±4 日)で OPU を行い、その 3 日後から SOV を行う「D30OPU-SOV 区」および「D60OPU-SOV 区」、SOV 開始日を分娩後 60 日以内とする「D60SOV 区」の 3 区を設定した(図 1)。

OPU による体外胚生産

当センターの常法⁶⁾に基づき、OPU で採取した卵丘細胞-卵子複合体(COC)は変性 COC を除いて成熟培養後、体外受精(IVF)を行い、5%CO₂、5%O₂、90%N₂の気相条件下の改変 TCM199 培地(IVD101; 機能性ペプチド研究所)内で 7 日間体外培養した。調査項目は、OPU 時卵胞数、採取 COC の数および品質⁷⁾、IVF による胚発生成績とした。

SOV による体内胚生産

SOV はブタ由来卵胞刺激ホルモン(pFSH)製剤(アントリン R・10; 共立製薬)の 3 日間漸減投与(総量 20AU)および pFSH 最終投与時のプロスタグランジン(PG)F_{2a}類縁体(クロプロステノール; エストラメイト、シェリング・プラウ アニマルヘルス)0.75mg の投与により行い、PGF_{2a}投与 48 時間後に性腺刺激ホルモン放出ホルモン類縁体(酢酸フェルチレリン; スポルネン注、共立製薬)

100 μg を投与後、定時に人工授精し、その 7 日後に子宮灌流による胚採取(ER)を行った。ただし、D30OPU-SOV および D60OPU-SOV では OPU 直後から PG 投与までの 6 日間、膈内留置型プロジェステロン製剤(CIDR; イージブリード、(一社)家畜改良事業団)を留置した。胚採取後、すべての供試牛を対象として、次産繁殖のための人工授精(一部は胚移植)を行った。調査項目は、胚採取時の形成黄体数、採取卵数、移植可能胚(品質コード: 1-3)数および良質胚(品質コード: 1-2)数とした²⁾。

実験 2

当センター繫養の黒毛和種経産牛 11 頭を供試し、発情周期の任意の時期(Day0)およびその 3 日後(Day3)に OPU により COC を採取した。採取した COC は個体ごとにプールし、FSHr、P450arom、3 β HSD の各遺伝子発現量を real time PCR 法により測定した。その他の調査項目は、採取した COC の品質⁷⁾とした。

統計解析

解析ソフト(エクセル統計 2008 for Windows、社会情報サービス)を用い、試験区分間の各数値について、実験 1 では分散分析を行い、多重比較検定(Bonferroni 法)を適用した。実験 2 では、COC の形態的評価にはカイ二乗検定を、遺伝子発現量には t 検定を行った。

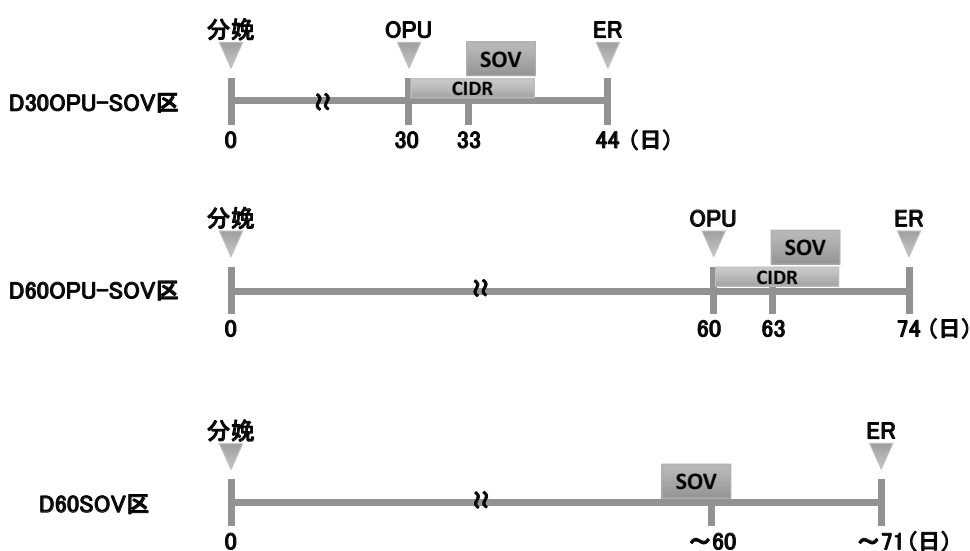


図1 実験1における各区の試験方法. OPU-SOV区は分娩後30日または60日目(±4日)にOPUを行い、直後にCIDRを留置、3日後からFSHの3日間漸減投与によるSOV. D60SOV区は分娩後60日以内に、発情後9-14日目からFSHの3日間漸減投与によるSOV.

結 果

実験1

OPUによる体外胚生産成績は表1に示した。平均採取COC数は、D30OPU-SOV区が29.1個、D60OPU-SOV区が35.1個であり、このうちIVF供試COC数はそれぞれ14.9個、18.4個であった。平均移植可能胚数（Day7胚盤胞数）はD30OPU-SOV区が3.4個、D60OPU-SOV区が4.4個であり、胚盤胞発生率はそれぞれ23.9%および21.5%であった。体外胚生産に関する調査項目において、D30OPU-SOV区とD60OPU-SOV区との間に有意な差は無かった。

SOVによる体内胚生産成績は表2に示した。平均形成黄体数および採取卵数は、D60SOV区が他の2区よりも明らかに多く（ $P < 0.01$ ）、D30OPU-

SOV区が17.6個および15.4個、D60OPU-SOV区が17.6個および14.7個、D60SOV区が27.4個および24.7個であった。また、平均移植可能胚数および良質胚数はD30OPU-SOV区が8.9個および6.4個、D60OPU-SOV区が10.9個および8.3個、D60SOV区が14.7個および10.3個であり、D30OPU-SOV区の移植可能胚数がD60SOV区と比較して有意に少なかった（ $P < 0.05$ ）。一方、平均良質胚率は、D30OPU-SOV区が37.9%、D60OPU-SOV区が57.7%、D60SOV区が35.8%であり、D60OPU-SOV区が他の2区と比べて有意に高率であった（ $P < 0.05$ ）。移植可能胚の平均総生産数は、D30OPU-SOV区が12.3個、D60OPU-SOV区が15.3個、D60SOV区が14.7個となり、有意な差は認められなかった。

表1 体外胚生産成績

試験区	OPU成績			IVF成績		
	総卵胞数	採取COC数	変性COC数	供試COC数	卵割数(%) ¹⁾	胚盤胞数(%) ¹⁾
D30OPU-SOV (n=20)	32.6±2.9	29.1±3.4	11.5±1.5	14.9±2.1	5.8±1.1 (39.3±4.5)	3.4±0.8 (23.9±3.9)
D60OPU-SOV (n=20)	38.9±3.6	35.1±3.7	13.4±2.0	18.4±2.7	9.6±2.1 (47.6±6.6)	4.4±1.1 (21.5±4.1)

数値は平均値±標準誤差

1) 供試COC数に対する割合(%)

表2 体内胚生産成績および移植可能胚の総数

試験区	形成黄体数	採取卵数	移植可能胚数(%) ³⁾	良質胚数 ¹⁾ (%) ³⁾	移植可能胚総数 ²⁾
D30OPU-SOV (n=20)	17.6±2.0 ^a	15.4±2.1 ^a	8.9±2.2 ^c (52.9±8.0)	6.4±1.8 (37.9±8.0) ^c	12.3±2.3
D60OPU-SOV (n=20)	17.6±2.0 ^a	14.7±1.9 ^a	10.9±1.6 ^{cd} (71.7±6.0)	8.3±1.3 (57.7±6.4) ^d	15.3±2.1
D60SOV (n=20)	27.4±3.3 ^b	24.7±3.3 ^b	14.7±2.6 ^d (52.8±7.2)	10.3±2.0 (35.8±5.8) ^c	14.7±2.6

数値は平均値±標準誤差

異符号間に有意差あり(a,b:P<0.01, c,d:P<0.05)

1) 良質胚数:IETSコード#1および#2と判定した胚の合計数

2) 移植可能胚総数:OPU-IVF胚盤胞数(発生培養7日目)とSOV-ER移植可能胚数の合計数

3) 採取卵数に対する割合

実験 2

COCの品質は、Day3の方がDay0よりも変性COCの割合が低かった(図2)。COCにおける各ターゲット遺伝子の発現量は、FSHrはDay3においてDay0よりも発現量が高い傾向があり、P450aromはDay3でDay0よりもやや低くなった。3βHSDはDay0とDay3で同等の発現量であった(図3)。

考 察

ドナー牛から効率的に胚を採取し、かつドナー牛の分娩間隔を短縮させることを目的に、OPUとその3日後からのSOVによる胚生産手法の分娩後早期での適用について検討してきた。我々はこれまでに、黒毛和種経産牛8頭について今回の実験1と同様の実験を行った成績から、D30OPU-

SOV区よりもD60OPU-SOV区の方が安定的な胚生産成績が得られる可能性を報告している³⁾。今回は、さらに例数を加え、ドナー牛をD30OPU-SOV区、D60OPU-SOV区、そしてD60SOV区の3試験区に産次ごとに1つずつ供試し、胚生産成績を試験区間で比較した。結果はこれまでの成績と同様な傾向であり、分娩後30日目と60日目ではOPU-IVF成績に差がみられず、SOV成績においては試験区間の差がより大きくなった。すなわち、SOV成績は形成黄体数と採取卵数はD60SOV区が他の2区よりも有意に多く、さらに移植可能胚数はD30OPU-SOV区がD60SOV区よりも有意に少なかった。また、良質胚率はD60OPU-SOV区が他の2区よりも有意に高かった。Mertonら⁸⁾はSOV前のOPUについて、SOVのターゲット

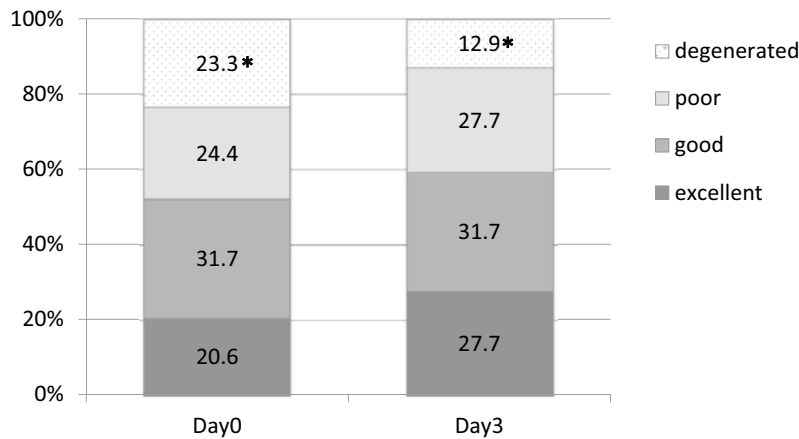


図2 採取COCの形態的品質評価(総採取数に対する割合)
* ; Day0とDay3の間に有意差(P<0.05)

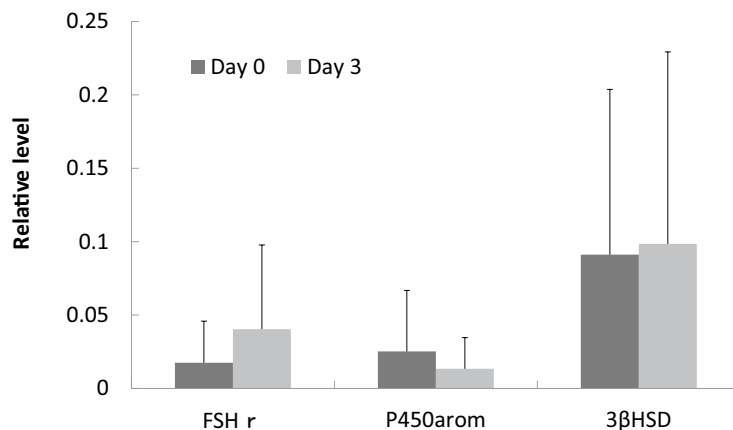


図3 COCサンプルにおけるターゲット遺伝子の平均発現量(± SD)

がOPU後に出現した発育期の卵胞となるために正常胚率が高くなることが期待される一方で、反応する卵胞数の減少、つまり採取卵数が減少することを指摘しており、D60OPU-SOV区の成績は、既報³⁾同様にそれと一致する結果となった。OPU-SOVの設定はOPU後3日目からSOV開始としているが、これはOPU後の卵胞数がOPU後1日目よりも3日目以降で有意に増加していたこと、さらに、OPU後に出現した卵胞波の主席卵胞が直径8mm以上に達した日がOPU後平均4日目であったことから設定した¹⁾。OPU後3日目の卵胞数はOPU時と比較して少なかったが、OPU後3日目から6日目までの卵胞数はほぼ同数で推移した。Kawamata⁹⁾によると、SOV開始時の小卵胞数は採卵時の黄体数と相関を示し、さらに、SOV開始時の直径8mm以上の大型卵胞の存在は正常胚数や正常胚率に負の影響を与える^{10, 11)}とされていることから、OPU後のSOV開始を遅くしても採取卵数の減少は防げず、むしろ正常胚率の向上効果も減少することが予想された。

OPUによるSOV後の正常胚率の向上効果は、今回の成績ではD60OPU-SOV区がD60SOV区と比較して良質胚率が高かったことに現れていると考えられた。通常の発情周期においてもSOV開始を卵胞波の出現に合わせた場合に反応が良好である¹²⁾ことから、OPU後3日目の卵巣では発育期の卵胞の割合が高かったと推察された。対照的に、D60SOV区はSOV開始が発情後9から14日目であり、発情周期における第2卵胞波の出現時期が2卵胞波の場合は発情後10日または11日、3卵胞波の場合は同9日または10日¹³⁾であることから、SOV開始時の卵胞の発育ステージはさまざまであった可能性が高い。したがって、D60SOV区よりもD60OPU-SOV区の方がSOV開始時の卵胞発育ステージの均一性が高かったと推察され、このことが試験区全体の良質胚率の向上につながったと考えられた。

そこで、OPU後の卵巣の状態をさらに詳しく調べるため、OPUを3日間隔で2回行い、COCつまり卵丘細胞(顆粒層細胞)におけるFSHr等の遺伝子発現を調査した。第1卵胞波において、FSHrのmRNA発現は直径0.5~14mmの卵胞の顆粒層細胞で認められ、卵胞波出現後4日目にかけて発現が増加し、その後減少していく傾向がある¹⁴⁾。また、発育卵胞と初期閉鎖卵胞では閉鎖過程の進んだ卵胞と比

較して有意にFSHrのmRNA発現が高い^{4, 14)}。したがって、有意差はないが、Day3の方がDay0よりも発現が高い傾向があったことは、OPU後3日目の卵巣に発育卵胞が多かったためであると考えられた。P450aromは、顆粒層細胞でFSH作用の下にアンドロジェンに作用し、エストロジェンを合成する酵素である。Baoら⁴⁾の報告によると、顆粒層細胞におけるP450aromのmRNAの発現は発育卵胞で高く、閉鎖卵胞ではほとんど発現していないが、直径4mm未満の卵胞では発育卵胞でもわずかにしか発現していない。Day3とDay0の比較では、Day3がDay0よりもやや発現が低かった。しかし、個体ごとにみると、Day3で発現量が増加した例が11頭中8頭であり、Day3の卵巣で発育中の直径4mm以上の卵胞が多いことを反映していると考えられた。平均値でDay0が高かった理由としては、Day0は発情周期の任意の時期であるため、吸引した卵胞はさまざまな発育時期のものが含まれており、発現が高い個体がいたことによると推察された。一方、プレグネノロンをプロジェステロンに代謝する酵素である 3β HSDについては、Baoら⁵⁾は顆粒層細胞で発現が認められるのは直径8mm以上の発育過程の主席卵胞であり、卵胞サイズと相関があることを示している。 3β HSDの発現量はDay0とDay3は同等レベルであり、ばらつきが大きいのが特徴であった。詳細は不明であるが、Day0とDay3のどちらにおいても高値の発現量を示した2頭による影響とみられた。Day3においても発現が認められた理由としては、OPU後3日目ではOPU後に出現した卵胞波における主席卵胞が直径8mm以上に達している場合もあり、今回もDay3で6頭に直径8mm以上の卵胞が存在したためと考えられた。

Day3における 3β HSDとFSHrの発現に関連はみられず、OPU-SOVの設定に関わる主席卵胞の存在とその他の卵胞の発育への影響については明らかでなかった。Mertonら⁸⁾は、OPU間隔が2から3日の場合、5から7日間隔よりもCOCの品質や胚盤胞発生率が高く、主席卵胞の負の影響を受けないためであると推察している。したがって、Day3の方がDay0よりもCOCの品質が高かったことから、OPU後3日目では直径8mm以上の主席卵胞が存在する場合もあるが、他の卵胞への負の影響はまだ大きくない可能性が考えられた。また、COCによる遺伝子発現量調査には、OPUで採取したCOCは顆粒層細胞の一部であること、吸

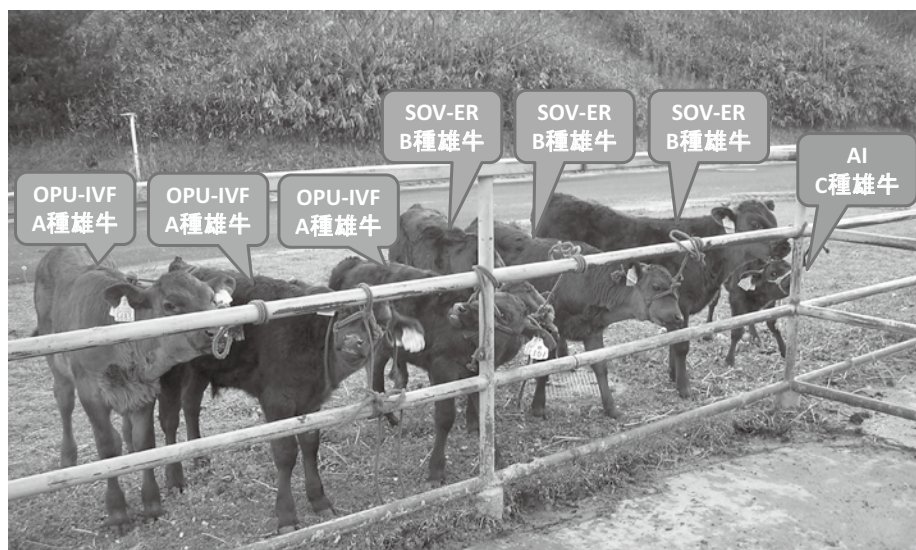


図4 D60OPU-SOVおよび胚生産後の人工授精による同一ドナー牛からの産子生産例。ドナー牛はふくしげかつ2号。体外胚の新鮮胚移植により4頭中3頭が受胎(受胎率75%)し、3頭生産。体内胚の新鮮胚移植により5頭中4頭が受胎(受胎率80%)し、3頭生産。採卵後26日目の人工授精で受胎し、1頭生産。

引した卵胞のすべてのCOCが回収されないことの影響も考えられた。D30OPU-SOV区ではOPU-SOVによるSOV成績の向上は認められなかった。既報^{1, 3)}でも述べたとおり、分娩後の生殖器の回復が不十分な個体の存在が推察されるが、分娩後30日目と60日目でのOPU後の遺伝子発現を比較することで新たな知見が得られる可能性もある。

体外胚と体内胚の移植可能胚の総数は各試験区間で差はみられなかった。D30OPU-SOV区は体内胚のみでは生産数がD60SOV区よりも少なかったが、体外胚を合わせることで同等数の移植可能胚が生産できるということであり、分娩後早期の胚生産においてOPU-SOVの利用は胚の確保に有利であると考えられた。D60OPU-SOV区ではOPUによる反応数の減少から、体外胚を合わせてもD60SOV区と比較して生産数は増加しなかった。しかし、移植可能胚率および良質胚率が高いことから、他の2区よりも確実に良質な移植可能胚を得ることが期待できる。また、D60SOV区の成績から、分娩後比較的早期にSOVを開始しても十分に胚生産が可能であることが明らかとなった。

以上をまとめると、分娩後早期でも体外胚生産は可能であるが、分娩後30日でのOPU-SOVの適用は、個体によってはSOV成績が不良となる可能性がある。しかし、体外胚を合わせれば他の2区と同等数の移植可能胚が得られ、また分娩後44日

で胚生産が終了するため、ドナー牛の1年1産も可能である。分娩後60日では、OPU-SOVとSOV単独処理のどちらの胚生産手法でも良好な成績が得られるが、OPU-SOVの場合は体内胚の良質胚率が高く、SOV開始時に発育過程の小および中卵胞の割合が高いことによると推察された。また、図4に示すように、OPU-SOVの1回の適用で、分娩間隔の延長もなく、同一ドナー牛から2種類の受精卵による複数の産子と胚生産後のドナー牛自身の産子を得ることができるのも、OPU-SOVのメリットであり、活用方法の一つである。したがって、これら各手法を適宜選択することで、効率的な胚および産子の生産が可能になると考える。

謝 辞

本試験の遺伝子発現量測定に御協力いただいた国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 近畿中国四国農業研究センター上席研究員の大島一修氏に深く感謝の意を表します。

参 考 文 献

- 1) 長谷川清寿ら. 島根県畜産技術センター研究報告, 42:7-12. 2011.
- 2) 社団法人畜産技術協会. 胚の衛生的取り扱いマニュアル (IETSマニュアル第3版), 164-167. 東京. 2001.

- 3) 坂本洋一ら. 島根県畜産技術センター研究報告, 43: 13-16. 2012.
- 4) Bao B., et al. *Biology of Reproduction*, 56: 1158-1168. 1997.
- 5) Bao B., et al. *Biology of Reproduction*, 56: 1466-1473. 1997.
- 6) 長谷川清寿ら. 島根県畜産技術センター研究報告, 40: 1-5. 2008.
- 7) Hasler J.F., et al. *Theriogenology*, 43: 141-152. 1995.
- 8) Merton J.S., et al. *Theriogenology*, 59: 651-674. 2003.
- 9) Kawamata M. *Journal of Veterinary Medical Science*, 56: 965-967. 1994.
- 10) 高仁敏光ら. 島根県畜産試験場研究報告, 33: 13-16. 2000.
- 11) Lima W. M., et al. *Animal Reproduction Science*, 100: 364-370. 2007.
- 12) Nasser L. F., et al. *Theriogenology*, 40: 713-724. 1993.
- 13) Adams G. P., et al. *Theriogenology*, 69: 72-80. 2008.
- 14) Xu Z., et al. *Biology of Reproduction*, 53: 951-957. 1995.