

追い移植技術を利用した乳牛の繁殖改善研究

[平成 29～令和 2 年度]

大関和也・原田紗衣子*・太田久由・三宅結子・小山朗子*²・牛島 仁*³

(畜産技術科・*³ 日獣大) *現福祉保健局 *² 現家保

【要 約】体外受精卵を用いた追い移植により受胎成績が改善されるが、単為発生胚を用いる場合にはさらなる検討が必要である。成熟培地へシステアミンを 0.15mM 添加し、胚盤胞をガラス化保存することで、単為発生胚の効率的な作出が可能である。

【目 的】

体外受精卵 (IVF 胚) を用いた追い移植は受胎成績の改善を期待できるが、双子妊娠によるフリーマーチンの危険があり、乳用後継牛の確保が難しい。そこで移植胚として最大 50 日程度しか生存しない単為発生胚 (PA 胚) を利用した追い移植を行い、受胎成績改善効果の検証および実用化の可能性を探る。さらに効率的な PA 胚作出方法および保存方法を検討する。

【成果の概要】

1. IVF 胚を用いた追い移植による受胎改善のメカニズムの解明

当センター飼養牛を黒毛和種精液により人工授精した AI 区 (10 頭) と AI 後 7 日目に IVF 胚を追い移植する AI+ET 区 (15 頭) に分けた。両区とも発情後 21 日目までインターフェロント (IFN τ) 関連物質 (*ISG15*, *Mx2*) をリアルタイム PCR 法、血中黄体ホルモン値 (P₄ 値) を電気化学発光免疫測定法により測定し、AI 後 40 日目および 60 日目に超音波診断装置を用いて妊娠鑑定を実施した。

受胎成績は AI 区では 10 頭中 3 頭 (30%)、AI+ET 区では 15 頭中 6 頭 (40%) が受胎し、AI+ET 区を受胎牛において親子判定を実施したところ、AI 由来産仔が 5 頭、ET 由来産仔が 1 頭であった (表 1)。

不受胎牛における発情後 14 日目から 17 日目の *ISG15* の変化は、発情後 17 日目において AI+ET 区が AI 区よりも有意に高く、21 日目にはさらに増加した (図 1)。血中 P₄ 値には AI 区、AI+ET 区に差はみられないが (図 2)、IVF 胚を用いた追い移植では、移植胚由来の IFN τ が IFN τ 関連物質の mRNA 発現を促進するものと考えられる。また、供試数が少なく、有意な差はなかったが AI+ET 区では AI 区よりも受胎成績が良かった。

2. 単為発生胚を用いた追い移植技術の検討

当センター飼養牛を、ホルスタイン種性選別精液により人工授精した AI 区 (9 頭)、AI 後 7 日目に PA 胚 1～2 卵を追い移植する AI+PA 区 (11 頭) および、PA 胚のみを移植した PA 区 (1 頭) に分けた。3 区とも上記の方法を用いて、IFN τ 関連物質 (*ISG15*, *Mx2*)、血中 P₄ 値の測定および妊娠鑑定を実施した。

受胎成績は AI 区では 9 頭中 3 頭 (33%)、AI+PA 区では 11 頭中 3 頭 (27%) が受胎した (表 2)。AI+PA 区では、AI 後 40 日目まで胚の存在が確認され、60 日目で不受胎となる牛が 3 頭いた。

PA 胚 1 卵、2 卵いずれの追い移植においても不受胎牛の *ISG15*, *Mx2* の変化が 17 日目か

ら 21 日目にかけて増加し、2 卵移植では *Mx2* の mRNA 発現量が 21 日目に大きく増加し、血中 P_4 値は、14 日目から 21 日目にかけて維持されていた(図 1, 2)。PA 区でも同様に *ISG15*, *MX2* が 17 日目から 21 日目にかけて増加し血中 P_4 値も維持(データ表示なし)されたことから、PA 胚においても $IFN\tau$ の分泌が $IFN\tau$ 関連物質の mRNA 発現を促進し、黄体退行を抑制したことが考えられた。

3. PA 胚を用いた追い移植による受胎成績改善効果の検討

AI+ET 区では、不受胎牛にみられた 14 日目から 17 日目にかけての *ISG15* の変化が AI+PA 区(2 卵移植)よりも有意に高かった(図 1)。AI+PA 区は、その後 17 日目から 21 日目にかけて *ISG15*, *Mx2* ともに増加し、血中 P_4 値も維持されたが(図 1, 2)、IVF 胚と PA 胚では、追い移植後に $IFN\tau$ 関連物質が増加するタイミングが異なる可能性が示唆された。PA 胚の追い移植による受胎成績改善のためには、 $IFN\tau$ 産生、移植個数などさらなる検討が必要である。AI+PA 区を受胎牛には、3 回の人工授精によっても受胎しなかった 1 頭も含まれており、PA 胚の追い移植による長期不受胎牛への応用も期待される。

4. 効率的な単為発生胚の作出方法の検討

IVF 胚の作出では、成熟培地へのシステアミン(CT)添加、発生培地への L-カルニチン(LC)添加によって、胚盤胞発生率が向上することが知られている。家畜バイテクセンター由来の卵巣より卵子を吸引し、0.12IU 卵胞刺激ホルモンおよび 5%ウシ胎児血清を添加した TCM199(Life Technologies)を基礎培地(無添加区)として、CT を 0.15mM 添加した添加区を設け成熟培養を行った後、カルシウムイオノフォア法を用いて PA 胚を作出した。IVD101(株式会社機能性ペプチド研究所)を用いて発生培養を行ったところ、CT 添加区では、培養 7 日目および 8 日目における胚盤胞発生率が無添加区と比べて有意に高かった(表 3)。

家畜バイテクセンター由来の成熟卵子を裸化した後に、カルシウムイオノフォア法を用いて PA 胚を作出し、IVD101 を用いて発生培養を行った。発生培地は LC 無添加区と、添加区(1.5mM, 3.0mM, 4.5mM)を設け、培養 2 日目の卵割率および、7~8 日目の胚盤胞発生率を比較したところ、PA 胚においては胚盤胞発生率の向上は認められなかった(表 4)。

IVF 胚ではガラス化保存により、加温後の生存率が向上することが知られている。今回 PA 胚について、上記試験より作出した拡張胚盤胞を、それぞれ最少容量ガラス化法により保存し、ガラス化保存における LC および CT 添加の影響を調査した。保存した胚は急速加温し、24, 48, 72 時間後の生存率および脱出率を比較した。加温後の培養液は TCM199 に β ME を 0.1mM, 20%FBS およびゲンタマイシンを 10 μ g/mL 添加したものをを用いた。結果として、CT および LC の添加はガラス化保存後の生存率へ影響を及ぼさなかった(表 5)。

以上より、PA 胚作出の際には成熟培地へ CT を 0.15mM 添加することにより、培養 7~8 日目の胚盤胞発生率を向上させることができ、ガラス化保存後の生存率にも影響しないことから、効率的に PA 胚の作出および保存が可能である。

【残された課題・成果の活用・留意点】

1. PA 胚の移植によって人工授精で不受胎であっても黄体退行が抑制され、次回授精が遅れてしまう事例がみられた。
2. PA 胚の $IFN\tau$ 産生量は IVF 胚よりも少ないとの報告もあることから、IVF 胚との $IFN\tau$ 産生能の違いや移植卵数などのさらなる検討を続ける必要がある。

【具体的データ】

表1 IVF 胚を用いた追い移植における受胎成績

	実施頭数 (頭)	受胎頭数 (頭)	受胎率 (%)	双子妊娠 (頭)	親子判定	備考
AI区	10	3	30	1	-	
AI+ET区	15	6	40	1	AI由来 : 5 ET由来 : 1	双子は死産

表2 PA 胚を用いた追い移植における受胎成績

	実施頭数 (頭)	受胎頭数 (頭)	受胎率 (%)
AI区	9	3	33
AI+PA区	11	3	27

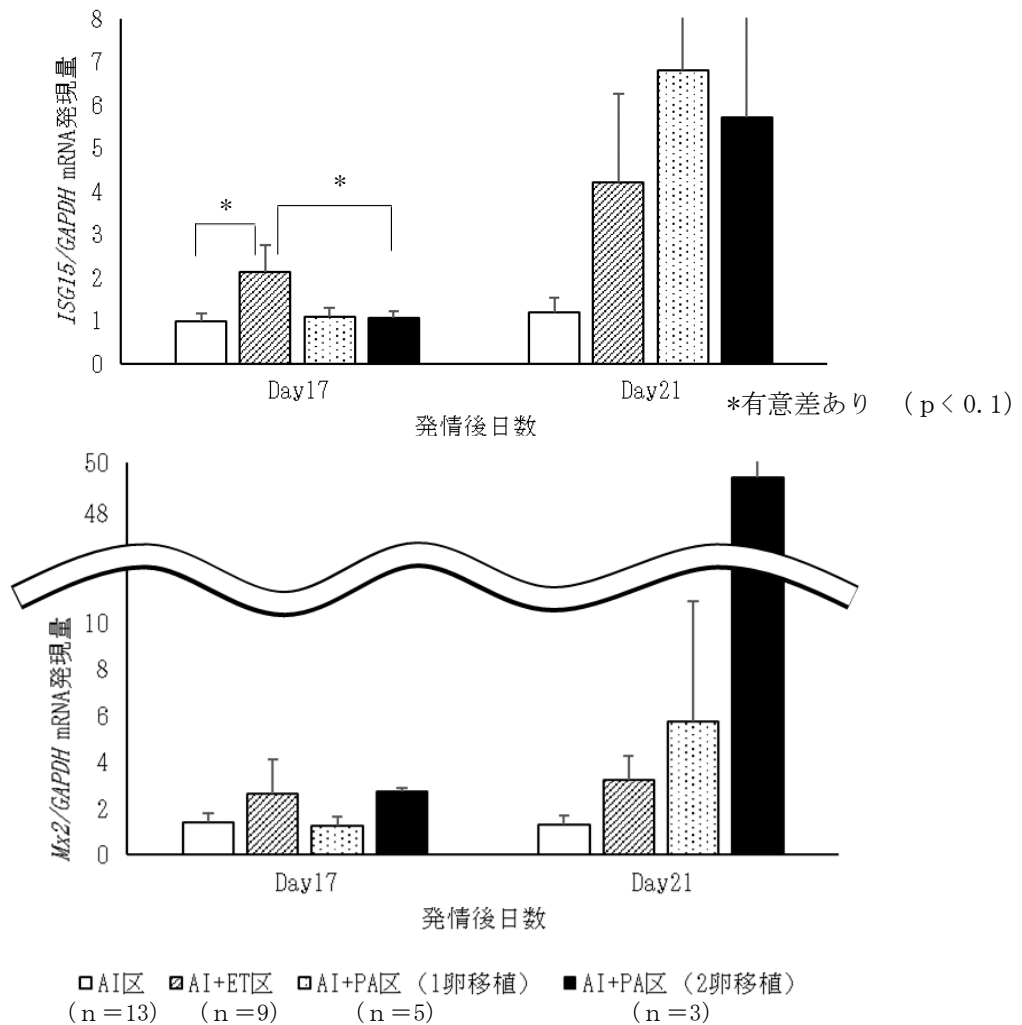


図1 不受胎牛における血中 IFN τ 関連物質 mRNA 発現量 (発情後 14 日を基準とした相対値)

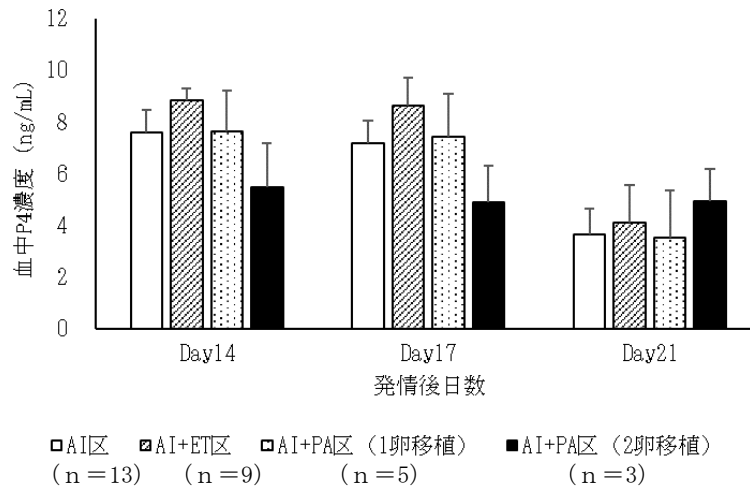


図2 不受胎牛における血中P₄濃度

表3 システアミン添加による単為発生胚の作出

システアミン添加 (mM)	供試卵数	卵割数 (%)	胚盤胞数 (%)	
			7日目	8日目
0	91	80 (87.9)	15 (16.5)	20 (22.0)
0.15	106	97 (91.5)	28 (26.4)	32 (30.2)
χ^2 -test		n. s	P<0.1	P<0.1

表4 L-カルニチン添加による単為発生胚の作出

L-カルニチン添加 (mM)	供試卵数	卵割数 (%)	胚盤胞数 (%)	
			7日目	8日目
0	91	67 (73.6) ^a	16 (17.6)	17 (18.7)
1.5	82	61 (74.4) ^a	16 (19.5)	22 (26.8)
3.0	95	72 (75.8) ^a	15 (15.8)	18 (18.9)
4.5	91	43 (47.3) ^b	14 (15.4)	15 (16.5)

a, b: 異符号間に有意差あり (p < 0.01)

表5 L-カルニチンおよびシステアミン添加によるガラス化保存後の生存性

L-カルニチン添加 (mM)	供試胚数	生存胚数 (%)			脱出数 (%)
		24時間	48時間	72時間	
0	15	13 (86.7)	13 (86.7)	13 (86.7)	10 (66.7)
1.5	21	19 (90.5)	19 (90.5)	18 (85.7)	13 (61.9)

システアミン添加 (mM)	供試胚数	生存胚数 (%)			脱出数 (%)
		24時間	48時間	72時間	
0	16	15 (93.8)	14 (87.5)	13 (81.3)	10 (62.5)
0.15	30	28 (93.3)	28 (93.3)	27 (90.0)	20 (66.7)