

総 説

宮城県における牛受精卵移植技術の変遷

沼邊 孝*

公益社団法人みやぎ農業振興公社
宮城県仙台市青葉区堤通雨宮町 4-17 〒 981-0914

2015年12月21日受付, 2016年1月18日受理

1. はじめに

宮城県は1979年から黒毛和種種雄牛造成事業を開始し、「茂重波」号を始祖として種雄牛の造成を継続している。

一方、肉用牛の飼養頭数は年々減少傾向であるが、2015年畜産統計では80,800頭であり、全国第7位の飼養頭数となっている。また、乳用牛の飼養頭数は20,400頭で全国第9位となっている。

これらを背景として宮城県畜産試験場では、1983年から牛の効率的な改良、優良牛・肉用牛の増産手法として受精卵移植（以下ETと略す）技術の研究開発に取り組むとともに農家への普及を推進している。主な利用方法は、優良な黒毛和種を供胚牛としホルスタイン種を受胎牛とする方法であり、県有の優良な黒毛和種種雄牛精液を使い増頭及び改良を推進している。

ETは多くの複合技術であり、現在も常に新しい技術の研究開発とともにより安定的で効率的かつ簡便な方法について検討されている。今回は、宮城県畜産試験場における牛ET技術の変遷について紹介する。

2. 宮城県における牛ET技術の変遷

ET技術は、過剰排卵処理、凍結保存及び胚移植が主な技術であり、研究開発テーマである。また、胚の分割・性別別、体外受精（IVF）、クローン技術、経陰採卵（OPU）や顕微授精（ICSI）技術等も開発の対象であり、それぞ

れの技術について波及的に取り組んでいる。

1983年から国の補助事業（牛受精卵移植技術利用事業）に参加し、基礎的な技術開発（過剰排卵処理法、凍結技術、分割技術、性別別等技術高度化、過剰排卵処理の効率的・簡易化技術、胚品質向上）を中心に行ってきた（表-1）。

宮城県畜産試験場において1983年から2013年までに過剰排卵処理し採卵した頭数は延べ2,442頭であり、回収卵数は21,388個（平均8.8個）、正常胚数は12,161個（平

表-1 宮城県における受精卵事業等の変遷

年度	国事業	県研究事業	実証事業(例)	普及事業	移植師講習
1983~1985	ET利用事業 実証事業				1985第1回 講習会15名
1986~1988	ET利用事業 凍結	1988 IVF研究事業	1986 雌供卵牛導入事業		
1989~1991	ET利用事業 分割型	1991 加-Y技術開発	1991 IVF技術利用促進	1989 受精卵供給牛-NOSAI	1990第2回 講習会15名
1992~1994	ET利用事業 技術高度型			1994 NOSAI 宮城ET事業	
1995~1997	ET技術高度 効率の過剰排卵	1996 加-Y品質向上	1995 IVF利用促進		1995第3回 講習会15名
1998~2000	ET技術高度 効率の過剰排卵		1998 OPU活用 事業		2000第4回 講習会15名
2001~2003	ET技術高度 効率の過剰排卵		2002 体細胞加-Y 活用		
2004~2006	高度高品質 「品質向上」	効率的種雄牛造成・胚育成OPU			2005第5回 講習会15名
2007~2009	高度高品質 「簡易化」	2007~IVF種雄牛 検定	2008 IVF生産事業		
2010~		ET実用化促進事業		2010 IVF地域 循環事業	2013 第6回 講習会6名

表-2 過剰排卵処理及び移植成績

過剰排卵処理成績 1983年~2013年				
採卵頭数	回収卵数	正常胚数	変性・未受精卵数	正常胚率
2,442 頭	21,388 個	12,161 個	9,227 個	56.9 %

生体内回収胚移植成績		
移植頭数	受胎頭数	受胎率
6,496 頭	3,330 頭	51.3 %

体外受精由来胚移植成績		
移植頭数	受胎頭数	受胎率
4,211 頭	1,647 頭	39.1 %

* 連絡者：沼邊 孝（ぬまべ たかし）
（公益社団法人みやぎ農業振興公社）
〒 981-0914 宮城県仙台市青葉区堤通雨宮町 4-17
Tel 022-275-9191 & Fax 022-275-9195
E-mail: t-numabe@miyagi-agri.com

均 5.0 個) で、正常胚率 56.9% であった。生体回収胚移植頭数は 6,496 頭、受胎頭数 3,330 頭で受胎率 51.3% であった。体外受精由来胚移植は 1987 年から 2013 年まで、移植頭数 4,211 頭、受胎頭数 1,647 頭で受胎率は 39.1% と生体回収胚移植と比べ 10% 程度低い結果となっている(表-2)。

技術開発の具体的な成果として、1984 年には ET により初めての子牛が得られ、1986 年に凍結胚移植による子牛が生産されている。また、1987 年には分割胚移植による子牛生産、翌年に性別別胚移植(染色体分析)によるホルスタイン種の雌子牛が誕生している。さらに、1988 年に IVF 産子や 1993 年には体細胞クローン産子、1998 年 OPU 由来産子及び ICSI 由来産子(凍結由来産子は世界初)が得られている。

1) 研究開発の推移

(1) 過剰排卵処理法

高品質な胚をより多く安定的に得る過剰排卵処理法の確立は、ET 技術の重要な課題である。一般的な牛の過剰排卵処理は、性周期を 1~2 回確認し、発情後 9~14 日目に処理を開始する。反復処理する場合は概ね 60 日間隔で行う。

過剰排卵処理に用いられる性腺刺激ホルモン製剤は、妊馬血清性腺刺激ホルモン(PMSG)と卵胞刺激ホルモン(FSH)が使用される。当初、PMSG 処理が主に行われていたが、その後 FSH 処理が優れていると報告され、一般的には FSH 処理が用いられている。しかし、FSH 処理は 1 日 2 回、3~4 日間漸減しながら投与する

表-3 FSH漸減投与とPMSG投与による過剰排卵処理成績

処理法	頭数	平均回収卵数*	平均正常胚数*	正常胚率
FSH漸減	158	8.7±7.8	5.1±5.8	48.2
PMSG	61	8.6±7.7	4.6±4.9	45.9

*平均±標準偏差 大久ら

表-4 CIDRを用いた牛の過剰排卵処理成績

クール*	頭数	平均回収卵数**	平均正常胚数**	正常胚率(%)
1	18	8.2±1.4	6.0±1.2	73.1
2	18	8.7±1.3	5.8±1.3	66.7
3	18	11.0±1.9	8.2±1.7	74.5

*:クール35日間隔で採卵しクール間は63日 沼辺ら
 **:平均±標準誤差

方法であり、農家段階での普及性(労力・牛へのストレス等)において改善を必要としていた。PMSG 処理は 1 回投与で可能な方法であることから改善法を検討した。

PMSG の投与量 (2,000 IU)、PG の投与時期 (FSH 投与 72 時間後)、さらに性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH ; 200 ~ 400 μg) を組み合わせた方法を検討し、FSH 処理と同等の成績が得られる方法を開発した(表-3; 大久ら, 1992)。また、FSH を生理食塩水 50ml に溶解し、頸部皮下に 1 回投与する方法が確立され、利用されている(及川ら, 2013)。

一方、留置型黄体ホルモン製剤 (CIDR や PRID) は、膣内に挿入することで体内のプロゲステロン濃度を上昇させ人為的な黄体期を誘発する。この作用を活用し性周期に関係なく過剰排卵処理が可能か検討した。その結果、従来の性周期を確認して行う FSH 漸減投与方法と同等の成績が得られることを明らかにした。また、28 日及

図-1 過剰排卵処理法



び35日間隔で計画的・連続的に過剰排卵処理が可能な方法を確立した(表-4; 沼辺ら, 1997)。具体的な方法を図-1に示した。

これらの処理法が開発されたことで、利用目的や供胚牛の状況、管理状況等により処理法を選択することができるようになった。しかし、いずれの方法においても正常胚が得られない場合が10~20%程度認められることや低採胚牛に対する処理法にはまだ検討が必要である。

(2) 凍結保存法

ETを普及する上で胚の凍結保存法は重要な技術である。従来の凍結保存法では、融解後段階的に希釈し、耐凍剤を除去し移植に供していた。しかし、この方法は手技が煩雑で時間がかかるため普及性に問題があった。

改善する方法として、耐凍剤(1-2Propandiol, glycerol)を希釈する液(sucrose)を用い、ストロー内で1段階希釈する方法(ワンステップ法)及び耐凍剤とsucroseの混合液で胚を凍結し、融解後、耐凍剤を除去することなく移植する方法(ダイレクト法)を検討した。その結果、いずれの方法でも50%前後の受胎率が得られることを明らかにした(表-5; 大久ら, 1991)。

また、glycerol濃度を従来の10%から5%もしくは6%に低くし、細胞毒性や細胞内外の浸透圧差を抑える方法を検討した。その結果、glycerol単味のダイレクト移植でもこれまで報告されている受胎率と同等であることを明らかにした(表-6; Takada et al 2007)。

これらの技術開発により、農家段階でのET技術の普及性を高めることとなった。

(3) 受胎率向上対策

ETによる受胎率の向上は技術普及する上で最も重要な課題である。ETは発情周期の確認後、発情日を0日として7日目(±1日)に行う。7日目の黄体の大きさや柔軟性等でETを行うか判断するが、客観的に判断する方法として血液中のプロゲステロン濃度(P濃度)に

ついて検討した。発情後7日目のP濃度が1.8ng/ml以上(1.8~4.0ng/ml)必要であることを明らかにした(沼辺ら, 1990)。

一方、黄体機能強化等を目的にホルモン製剤投与による受胎率の向上について検討した。発情日をday0とし、発情後5日目(day5)あるいは7日目(day7:移植日)の受胎牛にhCGを1,500単位を筋肉内投与し、day7にETを行った。無処理の受胎牛にETを行う区を対照区とした。day7投与区の受胎率は対照区に比べて有意(P<0.05)に高く、day5投与区よりも高い傾向にあった。血液中のP濃度を測定したところ、day14におけるP濃度はhCG投与した区が対照区よりも有意(P<0.01)に高く、hCGの投与により黄体ホルモン分泌が促進され、受胎率が向上したことが考えられた(表-7; 高田ら, 2005)。

(4) IVF技術

牛のIVF技術は、と場から得られる卵巣内卵子に体外成熟・体外授精を行い、ウサギの卵管に移植し、5日後に取り出して得られた胚の移植により子牛が生産されたことで大きく進展した(花田ら, 1985)。その後、卵丘細胞との共培養により、体外での胚生産が可能となり子牛が生産された。しかし、IVF技術は、体外成熟、体外授精、体外培養と多岐にわたり、それぞれにおいて技術開発及び詳細な検討が必要であった。

体外授精の精子処理にはイオノフォアやヘパリンが使用されたが、種雄牛個体によるばらつきが認められたため、カフェインとヘパリン処理法及びペントキシフェリンとヘパリン処理法が報告された。それらについて比較検討した結果、カフェインとヘパリン処理、ペントキシフェリンとヘパリン併用処理は高い受精率と種雄牛個体による影響が少ない処理法であることを明らかにした(Numabe et al, 2001)。

また、体外培養法において卵丘細胞との共培養と体細胞との共培養を必要としない合成培地による非共培養法が確立されたが、作出された胚の移植による受胎率及び子牛の生産率、さらに生産子牛の体重が重いことや過大児について報告があり、それらについて詳細に検討する必要があった。結果として共培養と非共培養による受胎率は生体回収胚移植による受胎率より低いこと及び共

表-5 凍結融解した胚のダイレクト・ワンステップ法における受胎率

耐凍剤	方法	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
Propandiol	ダイレクト*	22	10	48
Propandiol	ワンステップ**	57	33	58
Glycerol	ダイレクト	29	15	52
Glycerol	ワンステップ	91	43	47

*: 耐凍剤+希釈液(sucrose)に胚を入れ直接移植 大久ら(一部改変)
 **: 耐凍剤に胚を入れストロー内の希釈液(sucrose)で希釈後移植

表-6 6%グリセロールで凍結したIVF胚の受胎率

耐凍剤	希釈法	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
6%グリセロール	ガリ外	15	7	47
10%エチレングリコール	ガリ外	15	6	40

高田ら

表-7 受胎牛のDay5, Day7(移植日)hCG投与による受胎率

区分	hCG投与	移植頭数	受胎頭数(%)
Day5*	1,500 IU	112	57 (51) ^a
Day7	1,500 IU	117	65 (56) ^a
対照区	-	115	49 (43) ^b

*: 発情日 Day0 高田ら
 a, b: 異符号間で有意差あり(p<0.05)

培養由来胚移植による受胎率が非共培養よりも高いことを明らかにした(表-8; Numabe et al, 2000)。さらに、IVF 由来の生産子牛の出生時体重は、生体回収胚移植及び AI による生産子牛の体重より重く、妊娠期間も長いこと及び共培養は過大児の発生要因ではないことを明らかにした(表-9; Numabe et al, 2001)。

現在、1 個の卵巣から 10 個程度の卵子が得られ、IVF 技術により作られる胚盤胞期胚数は 2～3 個(胚盤胞率 25%程度)となっているが、今後もそれぞれにおいてより効率的かつ良質な胚生産技術について検討されるものと考えられる。

OPU による卵子採取は反復性に優れることから、優良個体からの胚生産を向上させ、育種改良速度の向上や増産を可能とする技術である。OPU により多くの良質な卵子を確保するため、ホルモン製剤による前処理法について検討した。安息香酸エストラジオール(EB)製剤を OPU6 日前に 1mg 投与により胚発生成績を向上させることや FSH を OPU の開始 40 時間前から投与することにより胚盤胞数が増えることを明らかにした(早坂ら, 2006)。

OPU 技術による胚生産は、希望の牛(高能力牛)から継続的に胚を作出できることから、より受胎性の高い胚生産技術となるよう研究が進められると考えられる。

(5) 関連技術

胚の性別別技術は、当初染色体分析法について検討した。判別率向上を目的に、細胞分裂阻止剤としてポド

表-8 新鮮体外受精由来胚(IVP)及び体内回収胚(IVD)移植による受胎率

区分(由来)	移植胚数	移植頭数	受胎頭数(%)
IVP	Single	233	100 (42.9) ^c
IVP	Twin	328	171 (52.1) ^b
IVD	Single	942	598 (63.5) ^a
IVD	Twin	410	278 (67.8) ^a
AI control		120	86 (71.7) ^a

a,b,c : 異符号間に有意差あり (P<0.05)

Numabe et al

表-9 体外受精由来胚移植(共培養及び非共培養)及び体内回収胚移植による出生時体重及び妊娠期間

項目	共培養胚	非共培養胚	生体内回収胚
子牛頭数	107	40	121
出生時体重(kg)	31.0±6.0 ^a	31.8±5.7 ^a	27.2±2.9 ^b
妊娠期間(日)	291.9±4.6 ^a	291.0±6.9 ^a	283.6±4.6 ^b

a,b : 異符号間に有意差あり (P<0.01)

共培養: 5%CS加TCM199+卵丘細胞

非共培養: 3mg/mlBSA加CR1aaで3日間, その後5日間5%CS加CR1aa

Numabe et al

フィロトキシンとビンブラスチンを用い、さらに細胞呼吸賦活剤であるソルコセリンを添加することで性別率が向上することを明らかにした(沼辺ら, 1994)。また、PCR 法による胚の性別別法についても検討し野外での応用を可能とした(沼辺ら, 1995)。現在は LAMP 法による方法が主体に利用されている。

ICSI 技術は精子を卵子内に直接注入することで、受精卵を作出する技術である。牛では遺伝的あるいは経済的に優れた貴重な精子や性別別精液を活用する場合に利用される。宮城県畜産試験場では 1998 年に第 1 子を誕生させている。牛 ICSI では胚発生率が低く、安定的な技術ではなかった。改善のため精子注入時のピエゾドライブユニットを活用すること及び ICSI 後の活性化処理としてエタノール、イオノマイシンと DMAP 処理を行うことで、胚発生成績を向上することを明らかにした(Oikawa et al, 2004)。

3. 普及推進

宮城県畜産試験場は技術開発とともに、県内のメインセンターとして位置付け、農家での ET 普及のため、NOSAI 宮城の家畜診療センター獣医師や開業獣医師を対象とした採卵技術者(OPU を含む)の養成を行ってきた。NOSAI 宮城では平成 2 年から事業として取り組み、農家での採卵・移植を行っている。また、県内の開業獣医師グループ及び開業獣医師が採卵・移植に取り組み、年間 3,000 頭を越える移植を行っている。さらに、OPU 技術についても開業獣医師グループで取組みを開始している。

一方、家畜受精卵移植師(家畜人工授精師対象)の養成のため、これまで宮城県畜産試験場において講習会を 1985 年から計 6 回開催しており 81 名が受講し、農家での移植を行っている。

4. ET 技術の応用

ET 生産牛による種雄牛造成、クローン検定及び IVF 産子による現場検定への応用など、利用範囲が広がっている。特に IVF 技術による子牛生産については、生産組織を立上げ循環型生産システムを構築し、若い種雄牛の能力評価の補完データとして活用可能となっている。

5. おわりに

紹介した ET に関わる技術は、それぞれの成果が得られた段階で、現場普及を進めており、今後も農家段階で

利用可能な技術開発をメインテーマとし、普及推進を図るべきと考えている。

今回は宮城県畜産試験場において技術開発及び検討を加えて得られた成果をまとめたものであり、関係職員、関係機関の職員及び協力農家に対し謝意を表します。

引用文献

- 早坂駿哉, 千葉和義, 高田直和, 大坪利豪, 志水学, 伊賀浩輔, 平尾雄二, 竹之内直樹. (2006). Estradiol-Benzoate 製剤による卵胞発育制御がウシの生体内卵子吸引成績およびその後の胚発生に及ぼす影響. 日本胚移植学雑誌. 28;3:94-109.
- 花田章, (1985). 家畜繁殖誌, 哺乳動物における体外受精の諸問題 31;5: 56-61.
- 沼辺孝, 大久範幸, 高田直和, 石川勇志. (1989). 宮城県畜産試験場研究報告. 3; 1-3.
- 沼辺孝, 及川俊徳, 菊地武, 伊藤裕之, 佐藤秀俊, 堀内俊孝. (1997). 腔内留置型黄体ホルモン製剤 (CIDR-B) を用いた黒毛和種における連続過剰排卵処置. J Rep Dev. 43; 6: J27-32.
- 沼辺孝, 大久範幸, 高田直和, 石川勇志, 堀内俊孝. (1994). 牛胚の染色体分析による性判別. 日本胚移植研究会誌. 1; 59-62.
- 沼辺孝, 高田直和, 佐藤秀俊, 及川俊徳, 木船厚恭, 亀山賢次. (1994). PCR 法により性判別し凍結されたバイオプシー胚の移植. 東日本家畜受精卵移植技術研究会. 10; 62-63.
- Numabe T. Oikawa T. Kikuchi T. and Horiuchi T. (2000). Production efficiency of Japanese Black calves by transfer of bovine embryos produced in vitro. Theriogenology. 54; 1409-1420.
- Numabe T. Oikawa T. Kikuchi T. and Horiuchi T. (2000). Birth weight and birth rate of heavy calves conceived by transfer of in vitro or in vivo produced bovine embryos. Anim. Reprod. Sci. 64; 13-20.
- Numabe T. Oikawa T. Kikuchi T. and Horiuchi T. (2001). Pentoxifylline improves in vitro fertilization and subsequent development of bovine oocytes. Theriogenology. 56; 225-233.
- Numabe T. Oikawa T. Kikuchi T. and Horiuchi T. (2001). Birth weight and gestation length of Japanese Black calves following transfer of embryos produced in vitro with or co-culture. Jpn. J. Vet. Sci. 63; 515-518.
- Oikawa T. Takada N. Kikuchi T. Numabe. Takenaka M. and Horiuchi T. (2005). Evaluation of activation treatments for blastocyst production and birth of viable calves following bovine intracytoplasmic sperm injection. Anim. Reprod. Sci. 86; 187-194.
- 及川俊徳, 平泉真吾, 西宮弘, 坂上信忠, 土屋貴幸, 杉原達夫, 西野治, 小田亘, 林宏美, 恒石望太郎, 倉原貴美, 重永あゆみ, 橋谷田豊. (2013). 黒毛和種過剰排卵処理の簡易化に向けた共同試験の取り組み. 日本胚移植学雑誌. 35: No2. 84:585-591.
- 大久範幸, 高田直和, 佐藤秀俊, 石川勇志. (1991). 凍結保存したウシ胚の段階および無段階希釈による移植試験. 宮城県畜産試験場研究報告. 5; 1-5.
- 大久範幸, 高田直和, 沼辺孝, 吉村格, 石川勇志. (1992). 卵胞刺激ホルモンと妊馬血清性腺刺激ホルモンによる牛の過剰排卵誘起. 日本獣医師会雑誌. 7, 45; 471-475.
- 高田直和, 早坂駿哉, 千葉和義. (2005). 牛の受精卵移植技術の実証. 宮城県畜産試験場試験成績書. 16; 40-42.
- Takada, N., Hayasaka, S. and Chiba. (2007). Conception rates of in vitro-produced bovine embryos cryopreserved in 6% glycerol and transferred by the direct method. Pro. Ani. Con. IETS. 19; 184-185.