

受精卵移植技術を活用した乳用後継牛の効率的な生産と 若狭牛の増産技術の確立

松本 苑子¹⁾・小林 崇之²⁾・笹木 教隆¹⁾

¹⁾福井県畜産試験場 ²⁾福井県家畜保健衛生所

要約 性判別精液（雌精液）の受胎率向上を目的に、雌精液を人工授精（AI）後に雌精液を使用して採卵した受精卵（雌受精卵）を移植する追い移植を行った。また、双子妊娠診断における Interferon-stimulated gene protein 15kDa (ISG15) の有効性について検討を行った。その結果、追い移植牛の受胎率は 36.0% (9 頭/25 頭) となり、受精卵移植受胎率 30.4%(95 頭/313 頭)や雌精液を用いた AI の全国平均受胎率 30.8%に比べて高い傾向となり、雌精液においても追い移植は受胎率の向上に有効と考えられた。追い移植実施牛の移植時の血液検査を実施したところ、血中総コレステロールが受胎牛で有意に高い結果となり、不受胎牛はエネルギーが不足することにより受胎しなかった可能性が示唆された。ISG15 の発現量による双子妊娠牛診断率は 50.0% (双子妊娠診断頭数/双子妊娠頭数:1/2) であり、双子妊娠診断としては不適と考えられた。

キーワード：性判別精液，雌受精卵，追い移植，ISG15，双子

諸 言

近年、乳用牛において改良による高能力化に伴い、空胎日数の延長（一般社団法人 家畜改良事業団, 2017）や受胎率の低下（一般社団法人 家畜改良事業団, 2016）により全国的に後継牛の不足が問題となっている（農林水産省, 2014）。

受胎率を改善する方法として、AI を行い、7 日後黄体の反対側子宮角に受精卵移植（ET）を行う“追い移植”が報告されているものの、双子妊娠率増加に伴う死・流産率と事故率の増加が課題となっている（平山ら, 2014）。また、異性多胎の場合雌胎仔の約 92% が不妊症となるフリーマーチンが懸念される（中尾ら, 2012）。

これらのことから、雌精液の AI 後に雌受精卵を移植することで、受胎率向上とフリーマーチンの防止を図った。また、双子分娩をあらか

じめ予測することで分娩時事故率を低減させるため、双子診断の検討を行った。双子を診断する方法としては超音波検査が挙げられるが、この方法は術者の手技によって左右される（日下, 2011）。ISG15 については妊娠牛において ISG15 mRNA 発現の上昇（Keiichiro Kizaki ら, 2013）や、牛の子宮角への Interferon- τ 投与により ISG15 mRNA 発現の上昇が報告されている（Syuichi Matsuyama ら, 2012）。

これら報告より本研究では、乳用後継牛の効率的な生産と若狭牛の増産を目的とし、雌精液とフリーマーチン防止のために雌受精卵を用いた追い移植を併用した新たな生産技術の確立と、双子妊娠牛は単子妊娠牛よりも ISG15 mRNA 発現が高いのではないかと仮説を立て、双子診断方法としての ISG15 の有効性について検討を行った。

材料および方法

1 雌精液と雌受精卵を用いた追い移植試験

(1) 供試牛

福井県内の農家にて飼養されたホルスタイン種経産牛 24 頭, 未経産牛 1 頭を供試し, うち 15 頭に血液検査を実施した。

(2) 供試雌精液

人工授精には協力農家が各々使用している雌精液を用いた。

(3) 供試卵

福井県畜産試験場および嶺南牧場の黒毛和種を供卵牛とした雌受精卵を供試した。精液は茂晴花の雌精液(一般社団法人 家畜改良事業団, 東京)を用いた。

供卵牛に過剰排卵処置を行った後定時 AI を行い, AI 後 7 日目に採卵を行った(社団法人 日本家畜人工授精師協会・社団法人 家畜改良事業団, 2010)。回収された桑実胚から拡張胚盤胞期胚を A, A', B, C, D の 5 段階で評価し, B ランク以上のものを移植可能卵と判定(社団法人 日本家畜人工授精師協会, 2000)し, プログラム凍結器(Peltier ET Freezer, 株式会社 富士平工業, 東京)を用いて凍結した。

凍結液には 0.1%カナマイシン加 0.1M スクロース加 1.8M エチレングリコールを用いた(小林ら, 2011)。

(4) 試験方法

供試牛の発情確認した後 12 時間後に AI を行い, 6-8 日後に発情卵胞(移植時には黄体)の反対側子宮角に雌受精卵を移植(ET)した。AI より 30 日以降に直腸検査, あるいは, 超音波診断機を用いた検査にて妊娠鑑定を行った。

また, ET 時にヘパリン入り真空採血管を用いて尾根部より採血後, 氷温で運搬後直ちに血中アンモニア(NH₃)を測定(DRI-CHEM 7000V, 株式会社 富士フィルム, 東京)した。その後, 4°C, 3000rpm にて 15 分間遠心分離を行い, 血漿中プロゲステロン(P4, mini Vidas, 株式会社

シスメックス・バイオメリュー, 東京), および, 活性酸素(d-ROMs, フリーラジカル解析装置 FREE carpe diem, 株式会社 エル・エム・エス, 東京)測定, 血液生化学検査(DRI-CHEM 7000V, 株式会社 富士フィルム, 東京)を実施した。

血液生化学検査は, グルコース(Glu), グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ/アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(GOT/AST), カルシウム(Ca), リン(IP), アルブミン(ALB), 尿素窒素(BUN), 総蛋白(TP), 総コレステロール(T-chol)の 8 項目について実施した。

t 検定により統計処理を実施した。

2 双子妊娠診断における ISG15 の検討

(1) 供試牛

農家にて飼養されたホルスタイン種 21 頭を供試し, うち追い移植を 14 頭, 一卵移植を 1 頭, 二卵移植を 6 頭に実施した。

(2) 試験方法

発情より 18-24 日の間に 1 度 EDTA 入り真空採血管を用いて尾根部より採血し, 氷温で運搬した。その後, Gifford et al. (2007) の手順に準じて末梢白血球を採取し, 分析まで -80 度で保存した。ISG15 の発現量も C. A. Gifford et al. (2007) の手順に準じて Real-time PCR (CFX Connect™ Real-Time System, 株式会社 BIO RAD, USA)にて定量を行った。アニーリング温度は 60°C, リファレンス遺伝子には Cyclophilin A (Cyc A) を用いた。

ISG15 のプライマーは, Accession no. NM_174366, 配列は Forward (5' - GGTATCCGAGCTGAAGCAGTT-3'), Reverse (5' - ACCTCCCTGCTGTCAAGGT -3') を使用した (C. A. Gifford et al. 2007)。

双子判定は発情より 30 日以降に直腸検査, あるいは, 超音波診断機を用いた検査にて妊娠鑑定, および, 双子判定を行った。

定量解析には CFX Manager software ver.3.0(株式会社 BIO RAD, USA)を用いた。

結 果

1 雌精液と雌受精卵を用いた追い移植試験

(1) 受胎成績

追い移植試験と受精卵移植と雌精液を用いた人工授精の農家別受胎率を表 1 に示した。追い移植試験の受胎率は 36.0%(9/25)で、各農家の雌精液の AI 受胎率に比べ高い傾向にあり、追い移植実施農家の ET 受胎率 30.4%(95/313)、全国の雌精液 AI の 30.8%を上回った(表 1)。

双子妊娠率は 22.2%(双子妊娠頭数/受胎頭数:2/9)であった。

表 1 農家別追い移植受胎率, 雌精液 AI 受胎率, および ET 受胎率の比較

農家	追い移植頭数	受胎頭数	受胎率 (%)	雌精液 AI 受胎率 (%)	ET 受胎率 *
A	12	4	33.3	0(0/5)	28.1(32/114)
B	9	3	33.3	未実施	30.0(3/10)
C	3	1	33.3	未実施	30.9(30/97)
D	1	1	100	31.8(7/22)	32.6(30/92)
計	25	9	36	25.9(7/27)	30.4(95/313)

* : H24-28 年度の乳用経産牛へ凍結受精卵移植した受胎率

(2) 血液検査

受胎牛と不受胎牛で ET 時の血液生化学検査結果の比較を表 2 に示した。T-chol について受胎牛が不受胎牛より有意に高かった。他の項目について有意差はなかった。

表 2 ET 時血液検査の受胎牛と不受胎牛の比較

項目	受胎牛(N=2)	不受胎牛(N=12)
NH3(μg/dl)	30.0±13.1 ^{*1}	32.0±3.9 ^{*2}
GOT/AST(IU/L)	78.0±13.8	86.1±5.6
BUN(mg/dl)	12.6±2.6	12.5±1.1
Ca(mg/dl)	10.4±0.4	9.9±0.2 ^{*2}
IP(mg/dl)	8.25±0.8	6.8±0.3
ALB(g/dl)	3.8±0.2	3.7±0.1
TP(g/dl)	7.3±0.5	8.1±0.2
Glu(mg/dl)	75.0±5.5	62.9±2.3
T-Chol(mg/dl) [*]	321.5±31.7	191.8±12.9
P4 (ng/dl)	6.6±2.1	3.7±0.9
d-ROMs(U)	99.0±14.2	116.8±5.8

平均±標準誤差 *1:N=2 *2:N=11

※ : P<0.05

2 双子妊娠診断における ISG15 の検討

超音波検査,あるいは直腸検査より双子妊娠牛 2 頭, 単子妊娠牛 1 頭, 非妊娠牛 18 頭であった。図 1 に ISG15 mRNA 発現量の個体別比較を示した。双子妊娠牛では 1 頭のみが高い値を示し, 非妊娠牛においても発現のある個体が存在した。

また, 小林ら (2014) の報告をもとに受胎・不受胎の基準値を 1 に設定した。双子判定の基準値を 10 に設定した。基準値を基にした ISG15 mRNA 発現量の比較を表 3 に示した。受胎牛診断率は 33.3% (非妊娠診断頭数/非妊娠頭数:1/3), 不受胎牛診断率は 83.3% (非妊娠診断頭数/非妊娠頭数:15/18), 双子妊娠牛診断率は 50.0% (双子妊娠診断頭数/双子妊娠頭数:1/2) となった。

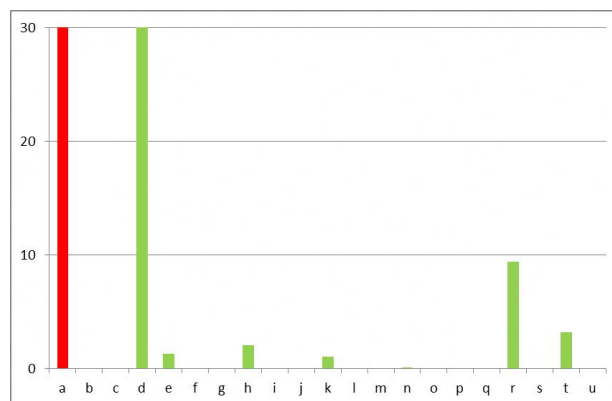


図 1 ISG15 mRNA 発現量の個体別比較

a-b:双子妊娠牛, c:単子妊娠牛, d-u:非妊娠牛

表 3 基準値を基にした ISG15 mRNA 発現量の比較

ISG15 発現量	妊娠牛 (N=3)		非妊娠牛 (N=18)
	単子(N=1)	双子(N=2)	
1<	1	1	15
1~10	0	0	2
10<	0	1	1

考 察

過去にホルスタイン種のリピートブリーダーに対して追い移植を実施した場合, ET 受胎率が経産牛 20%, 未経産牛 30%に対して追い移植受胎率が経産牛 42%, 未経産牛 49%と受胎率の向上が報告されている(堂地, 2011)。長期不受胎牛への AI 受胎率 27%に比べて追い移植受胎率が 62%と受胎率の向上が報告されている(平山ら, 2012)。今回, 追い移植の受胎率は 36.0% (9 頭/25 頭) と過去の報告よりも低いものの, 雌精液を用いた AI の 25.9% (7 頭/27 頭) や ET の 30.4% (95 頭/313 頭) に比べて受胎率は高い傾向であった。そのため, 雌精液を用いた追い移植においても無選別精液を用いた追い移植より効果は低いものの, リピートブリーダー牛の受胎率が向上する可能性が示唆された。

多胎妊娠牛は単胎妊娠牛に比べて分娩事故率が上昇することが報告されている(三宅ら, 2010)。また, 過去に追い移植の双子妊娠率 17%とともに死産率 19%と人工授精の 5%および 10%に比べて上昇(平山ら, 2012)が報告されており, 今回の結果は 22.2%(2 頭/9 頭)と同等以上であったため双子妊娠によるリスクは同様に増加すると推察された。

これら報告より雌精液の受胎率が低い農家において, 後継牛確保として雌精液と雌受精卵を用いた追い移植は有効ではないかと考えられた。しかし, 双子妊娠による分娩リスクも増加すると考えられ, 実施にあたっては注意が必要である。

コレステロールは栄養状態や肝機能障害の指標(木田, 2002)で摂取エネルギーと強い正の相関があり(猪熊ら, 2014), 繁殖成績(生田ら, 1996)や分娩後発情回帰(竹内ら, 2009)への影響が報告されている。今回, ET 時血液検査において T-Chol が不受胎牛に比べて受胎牛が高かった。そのため, 追い移植牛を実施しても不受胎であった牛は栄養状態の悪化, 特にエ

ネルギーの不足が示唆され, 不受胎牛は飼養管理の見直しが必要と推察された。過去の報告では d-ROMs が高くなるに従い, P4 濃度が低くなる傾向にあり, 人工授精の繁殖成績低下の要因として活性酸素が関与する可能性が示唆されている(小林ら, 2015)。今回 P4 濃度, d-ROMs 濃度ともに受胎牛と不受胎牛に有意な差は見られなかった。しかし, 受胎牛の方が不受胎牛に比べて P4 濃度が高い傾向, かつ, d-ROMs 濃度が低い傾向が見られたため, 雌精液を用いた追い移植においても活性酸素は繁殖成績低下の要因となる可能性が示唆された。

過去には ISG15 mRNA 発現と P4 濃度を組み合わせた受胎牛摘発率は 78.6%, 不受胎牛摘発率 81.3%となり, 11%で後期胚死滅の可能性が報告されている(小林ら, 2014)。今回, 非妊娠牛においても ISG15 mRNA 発現のある個体が 14.3%(妊娠診断頭数/全頭数:3/21)とほぼ同等となり, 今回の試験でも後期胚死滅の可能性が示唆された。また, 受胎牛診断率は 33.3%(1/3)と ISG15 mRNA 発現と P4 濃度を組み合わせた報告より低い結果となった。しかし, 不受胎牛診断率は 83.3%(15/18)となり過去の報告とほぼ同等となった。そのため, ISG15 mRNA 発現量測定のみでは不受胎牛の摘発は可能と推察された。

双子妊娠牛診断率は 50.0%(双子妊娠診断頭数/双子妊娠頭数:1/2)となり, 現時点では超音波診断よりも精度が低く, 双子妊娠診断には適していないと考えられた。

文 献

- C. A. Gifford • K. Racicot • D. S. Clark • K. J. Austin • T. R. Hansen • M. C. Lucy • C. J. Davies • T. L. Ott. Regulation of Interferon-Stimulated Genes in Peripheral Blood Leukocytes in Pregnant and Bred, Nonpregnant Dairy Cows. *J. Dairy Sci.*, 90:274-280, 2007.

- 堂地 修. リピートブリーダー対策としての胚移植の利用.家畜診療, 58-2:77-84, 2011.
- 浜野晴三. 性判別精液を用いた人工授精技術.LIAJ News, 122:15, 2010.
- 生田健太郎・小嶋睦・山口悦司・香川裕一. 乳牛における代謝プロファイルテストと繁殖状況. 兵庫県農業技術センター研究報告〔斎産編〕, 32:41-48. 1996.
- 平山 博樹・陰山 聡一・森安 悟・南橋 昭・原 仁. 追い移植による乳牛の長期不受胎対策の効果検証.平成 24 年度 成績概要書, 5101-214611, 2012.
- 猪熊 壽・北川 均・内藤 善久.獣医内科学 大動物編. 第 2 版, 362, 文永堂出版株式会社, 東京, 2014.
- 一般社団法人 家畜改良事業団. 平成 26 年受胎調査成績, 5-46, 群馬, 2016.
- 一般社団法人 家畜改良事業団.乳用牛群能力検定成績速報, 平成 28 年度, 乳用牛群検定全国協議会, 2017.
- 木田 克弥.代謝プロファイルテストから見た乳牛の繁殖障害, 牧草と園芸, 50-3:1-5, 雪印種苗株式会社, 北海道, 2002.
- 日下 知加久. 複数獣医師による携帯型超音波診断器を用いた牛の繁殖検診と効率的な稼働方法の取り組み. 家畜診療, 58 巻 5 号, 2011.
- 小林崇之・堀川明彦・近藤守人. 黄体ホルモン製剤を活用した牛受胎率向上技術の確立. 福井県畜産試験場研究報告, 27, 2014.
- 小林崇之・竹内隆泰・近藤守人. ドライタイプ ETフリーザーを用いた胚凍結における エチレングリコールの濃度とシュークロースの添加および 冷却速度の違いが生存率と孵化率に及ぼす影響. 福井県畜産試験場研究報告, 24, 2011.
- 小林崇之・堀川明彦・笹木教隆. ホルスタイン種経産牛における活性酸素代謝産物 (d-ROMs 濃度) および 血中プロゲステロン (P4) 濃度が人工授精の受胎率に及ぼす影響. 福井県畜産試験場研究報告, 28, 2015.
- Keiichiro Kizaki・Ayumi Shichijo-Kizaki・Tadashi Furusawa・Toru Takahashi・Misa Hosoe・Kazuyoshi Hashizume. Differential neutrophil gene expression in early bovine pregnancy. Reproductive Biology and Endocrinology, 11:6, 2013.
- Koumei SHIRASUNA・Haruka MATSUMOTO・Eiji KOBAYASHI・Akane NITTA・Shingo HANEDA・Motozumi MATSUI・Chiho KAWASHIMA・Katsuya KIDA・Takashi SHIMIZU・Akio MIYAMOTO. Upregulation of Interferon-stimulated Genes and Interleukin-10 in Peripheral Blood Immune Cells During Early Pregnancy in Daily Cows. J. Reprod. Dev., 58:84-90, 2012.
- Mehni SB, Shabankareh HK, Kazemi-Bonchenari M, Eghbali M. The Comparison of Treating Holstein Dairy Cows with Progesterone, CIDR and GnRH After Insemination on Serum Progesterone and Pregnancy Rates. Reproduction in domestic animals Feb. 47. 131-134.2012.
- 三宅陽一・三好憲一・森谷浩明・松井基純・羽田真悟. 乳用雌牛における単胎および多胎分娩事故率に関する調査結果. 産業動物臨床医誌, 1:5-9, 2010.
- 中尾 敏彦・津曲 茂久・片桐 成二 編. 獣医繁殖学, 第 4 版, 306-307, 文永堂, 東京, 2012.
- 農林水産省. 平成 26 年 10 月 乳用牛ベストパフォーマンス実現会議資料 資料 4, 2014.
- 農林水産省生産局畜産部, 平成 30 年 3 月 畜産・酪農をめぐる情勢, 2018.
- 社団法人 日本家畜人工授精師協会・社団法人 家畜改良事業団. 家畜人工授精講習会テキスト (家畜体内受精卵・家畜体外受精卵移植編), 3 版, 65-109, 東京, 2010.
- 社団法人 日本家畜人工授精師協会. 家畜人工授精講習会テキスト (家畜受精卵移植編),

3版,158-176, 東京, 2000.

Shuichi Matsuyama・Takatoshi Kojima・Satoru Kato・Koji Kimura. Relationship between quantity of IFNT estimated by IFN-stimulated gene expression in peripheral blood mononuclear cells and bovine embryonic mortality after AI or ET. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10:21, 2012.

竹内隆泰・田中 健・笹木教隆. 乳牛の繁殖機能診断技術の確立－分娩後の発情回帰と性ホルモン・血液性状との関係－. 福井県畜産試験場研究報告, 22:10-14. 2009.

**The efficient production of
Dairy cattle and Wakasagyū (Japanese Black)
using embryo transfer (ET)**

Sonoko MATSUMOTO*1, Takayuki KOBAYASHI*2 and Kiyotaka SASAKI*1

*1:Fukui Prefectural Livestock Experiment Station

*2:Fukui Prefectural livestock hygiene service center

Abstract

We transferred female embryo to the opposite uterine horn of corpus luteum following to artificial insemination using sexed sperm to dairy cattle (ET after AI). The availability of Interferon-stimulated gene protein 15kDa (ISG15) for pregnancy diagnosis for twins was also examined. For the results, the fertility of ET after AI was 36.0%(9/25 cattle) and, was higher than the fertility of AI using sexed sperm (25.9% , 7/27 cattle) and ET(30.4% , 95/313 cattle). The total cholesterol of fertilized cattle was higher than unfertilized; therefore it could be said that the shortage of calorie caused lower the fertility rate. The expression level of ISG15 indicated 50% of twin predictive rate (twin predicted / twin pregnancy: 1/2 cattle), and it might be that this low twin predictive rate showed the determination of ISG15 could not be used for prediction of twin.

Key word : sexed sperm , Female embryo , ET after AI , ISG15 , twin