

二分割胚による黒毛和種牛の一卵性双子作出技術の改善

誌名	鹿児島県農業開発総合センター研究報告
ISSN	18818609
著者名	白井,彰人 新原,慎一 池畑,義久 磯部,知弘 川嶋,啓介 溝下,和則
発行元	鹿児島県農業開発総合センター
巻/号	11号
巻号補足	
掲載ページ	p. 111-117
発行年月	2017年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター

Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



二分割胚による黒毛和種牛の一卵性双子作出技術の改善

白井彰人*1・新原慎一*2・池畑義久*2・磯部知弘*3・川嶋啓介・溝下和則

要 約

候補種雄牛の早期産肉能力推定に活用するため、二分割胚による一卵性双子の効率的な作出技術の検討を行った。(1)過剰排卵処置開始前に、腔内留置型黄体ホルモン製剤とエストロジェン製剤で処置することにより、超音波診断装置を用いて主席卵胞を吸引除去することなく、良質胚の多数作出が可能であった。(2)分割胚の修復培養液にセリシンを0.5%添加することで、胚盤胞発生率が向上した。(3)0.5%セリシン添加修復培養液を用いた新鮮二分割胚移植で8組の一卵性双子を作出した。(4)双子産子の生時体重は、二分割胚をそれぞれ別の個体に移植することで、同一個体に2胚移植するよりも、雄産子の体重が有意に増加した($P<0.01$)。(5)収縮桑実胚および初期胚盤胞を二分割にすることで、一卵性双子を作出しやすいことが示唆された。

これらのことから、胚移植関連技術を改善することで、効率的な双子生産が可能になることが示唆された。

キーワード：卵胞ウェーブ セリシン 修復培養 二分割胚 一卵性双子

緒 言

近年、畜産分野における産地間ブランド競争が激しくなっており、ブランド価値向上のために家畜改良進度の迅速化が求められている。肉用牛の改良は、種雄牛の果たす役割が大きく、候補種雄牛の産肉能力を早期に推定することが重要である。

候補種雄牛の産肉能力の推定方法としては、その後代の枝肉成績から推定する後代検定法が一般的であるが、能力推定までには、後代取得のための交配、妊娠、出生・育成、肥育等の過程を経るため、生後約5年もの長い期間を要する。

この能力推定期間を短縮する一手法として、胚を金属刃などで二分割にした後に胚移植を行い、人為的に一卵性双子を作出する方法がある⁹⁾。候補種雄牛と遺伝的に同一な一卵性双子1頭の産肉成績は、後代検定牛7頭分の成績に相当する⁹⁾ことから、作出した一卵性双子の片方の産子を候補種雄牛として育成し、一方の産子を肥育して産肉能力検定を実施すること(分割双子検定)で、候補種雄牛の産肉能力推定を約30カ月間、短縮することができる。

しかしながら、胚の二分割操作は胚細胞を損傷させるため、胚の発育性や受胎性および胎子への発生能を損うこ

とが危惧される。そのため、分割操作に用いる胚は、切断の損傷に耐えうる良質な胚であるとともに、切断後は、切断面の損傷を早期に修復し、二分割胚の品質向上並びに受胎率の改善を図ることが重要である。

そこで、試験1では、良質胚を多数作出することを目的に、過剰排卵誘起処置(SOV)開始前の卵胞ウェーブ調節法の検討を行った。試験2では、細胞増殖促進作用・細胞死抑制作用を有する¹⁷⁾蚕の繭由来のタンパク質セリシン(和光純薬工業株式会社、大阪)を二分割胚の修復培養液へ添加し、その効果を検討した。試験3では、新鮮二分割胚の移植試験を行い、一卵性双子の作出に有効な移植方法等の検討を試みたので、併せて報告する。

材料および方法

1 試験1；SOV開始前の卵胞ウェーブ調節法の検討

(1) 供試牛

所内で飼養する黒毛和種繁殖雌牛2～14歳の20頭を用い、延べ34頭で実施した。

(2) 方法

発情後7～16日目の黄体期に腔内留置型プロジェステロン(P)製剤(サージミヤワキ株式会社、東京)の挿入と同時にエストロジェン製剤(E2;エストラジオール、共立製薬株式会社、東京)2mgを投与し、その4日後からSOVを開始した(E2投与法)。対照として、既報³⁾に基づき、超音波診断装置による主席卵胞の吸引除去を行い、

(連絡先) 肉用牛改良研究所

*1 南薩家畜保健衛生所

*2 農政部畜産課

*3 畜産試験場

その 1 日後または 2 日後から SOV を開始した (超音波吸引法)。

SOV は、卵胞刺激ホルモン製剤 (FSH ; 共立製薬) 18AU を朝夕 2 回の漸減投与で 1~3 日目まで 4,4,3,3,2,2AU を頸部筋肉内注射で行い、同時に 3 日目にプロスタグランジン F2 α (PG ; クロプロステノール, フジタ製薬株式会社, 東京) 総量 790ug を投与し、同日朝に P 製剤を抜去した。処置開始 5 日目の夕方に性腺刺激ホルモン放出ホルモン製剤 (GnRH ; 酢酸フェルチレリン, 共立製薬) 100ug を投与して、人工授精 (AI) を行った。処置開始 6 日目朝

に 2 回目の AI を行い処置開始 12 日目に定法で採胎した (図 1)。回収胚の品質評価は、国際胚移植学会マニュアル⁸⁾ に準じて行い、excellent と good を A ランク, fair を B ランク, poor を C ランクとした。統計処理は、EZR (自治医科大学埼玉メディカルセンター, 埼玉)⁵⁾ を用い、卵胞ウェーブ調節法間の回収胚数, 正常胚数および凍結可能胚数の比較については Student's t 検定を、正常胚率, 凍結可能胚率および胚の品質割合の比較については, χ^2 検定で行った。

Day	-3	1	2	3	5	6	12
E2 投与法	朝	P 製剤 E2	FSH	FSH	FSH, PG P 製剤抜去	AI	採胎
	夕		FSH	FSH	FSH, PG GnRH, AI		
Day	-1or0	1	2	3	5	6	12
超音波吸引法	朝	卵胞吸引 P 製剤	FSH	FSH	FSH, PG P 製剤抜去	AI	採胎
	夕		FSH	FSH	FSH, PG GnRH, AI		

※朝は 8:30, 夕は 16:30

図 1 採胎スケジュールの比較

2 試験 2 ; セリシン添加修復培養液の検討

(1) 供試胚

既報²⁾ に準じて、所内で飼養されている黒毛和種繁殖雌牛から経腔採卵法で回収した卵子と県内と畜場から得た黒毛和種の卵巣から定法で回収した卵子に対して、体外授精を行って得られた体外胚 (8 細胞期~収縮桑実胚) 271 個を用いた。また、所内および県内で飼養されている黒毛和種繁殖雌牛から定法により採胎を行って得られた体内胚 (桑実胚~収縮桑実胚 ; A-B ランク) 86 個を用いた。

(2) 胚の分割

20%牛胎児血清 (FBS ; フナコシ株式会社, 東京) 添加 Medium199 培地 (サーモフィッシュサイエンティフィック株式会社, 神奈川) 50ul に供試胚を移し、倒立型顕微鏡 (オリンパス光学工業株式会社, 東京) と金属刀 (フェザー安全剃刀株式会社, 大阪) を装着したマイクロマニピュレーター (株式会社ナリシゲ, 東京) を用いて、胚の真上から刃を圧切して、均等な二分割になるように切断した。

(3) 分割胚の培養

二分割胚の修復培養液は、10%FBS 添加 CR1aa 培養液に 0.5% (w/v) セリシンを添加した培養液 (添加区) と無添加の培養液 (無添加区) を用い、鋭利な刃先でシャーレの底面に作製した円錐形の穴に培養液 30ul をドロップして、使用した。二分割した胚は、1 つのドロップに 1 胚ずつを入れ、体外胚は 24~96 時間、体内胚は 24 時間、38.5℃の 5%O₂, 5%CO₂ および 90%N₂ 気相下で培養した。分割した 2 胚がいずれも胚盤胞まで発育した場合に胚盤胞発生とした。統計処理は、EZR を用いて、胚の由来ごとに Fisher の正確検定を行った。

3 試験 3 ; 新鮮二分割胚の移植試験

(1) 供試胚

試験 2 と同様の方法で胚を回収し、添加区または無添加区で修復培養して作出した、体内胚分割胚 210 個 (分割前の胚として 105 個, 8 細胞期~胚盤胞 ; A-B ランク) を用いた。

(2) 受胎牛

所内および県内で飼養されている黒毛和種, 交雑種, ホルスタイン種の育成牛および経産牛の 133 頭を用いた。

(3) 移植

供試胚 77 個を分割し、正常發育したペア胚を 1 本の 0.25ml のプラスチックストロー（富士平工業株式会社，東京）に封入し、77 頭の受胎牛に凍結することなく移植した（2 胚 1 頭移植）。また、供試胚 28 個は、分割後正常發育したペア胚をそれぞれ 1 胚ずつ封入し、56 頭の受胎牛に凍結することなく移植した（1 胚 1 頭移植）。移植は熟練技術者 3 名が行い、発情から 6～8 日目の黄体が存在する卵巣側の子宮腔へ非外科的に直接移植した。

妊娠鑑定は、発情から 42～60 日目に直腸法にて判断した。統計処理は、EZ R を用いて、移植形態間の一卵性双子の平均生時体重を Student's t 検定で、移植形態間、修

復培養液間および分割時の胚ステージ間の受胎率と双子作出率を χ^2 検定または Fisher の正確検定で行った。

結 果

1 試験 1；SOV 開始前の卵胞ウェーブ調節法の検討

1 頭当たりの回収胚数（正常胚＋変性胚）、正常胚数（凍結可能胚＋低ランク胚）、正常胚率、凍結可能胚数、凍結可能胚率において、有意差は見られないが、E2 投与法は、超音波吸引法より胚数が増加した（表 1）。回収胚の品質において、E2 投与法は A ランク胚の割合が高かったが、有意差は見られなかった（表 2）。

表 1 SOV 開始前の卵胞ウェーブ調節法別の採胚成績

区分	頭数	回収胚数	正常胚数 (%)	凍結可能胚数 (%)
E2 投与法	15	10.1±2.3	5.8±1.6 (57.6)	5.2±1.5 (51.7)
超音波吸引法	19	6.8±1.6	3.7±1.1 (54.3)	2.9±0.9 (43.4)
平均個数±標準誤差/頭				

表 2 回収胚の品質別の割合

区分	A ランク (%)	B ランク (%)	C ランク (%)	変性卵 (%)	未受精卵 (%)
E2 投与法	4.5±1.4 (45.0)	0.7±0.3 (6.6)	0.5±0.2 (5.3)	0.5±0.3 (4.6)	3.9±2.0 (38.4)
超音波吸引法	2.3±0.8 (34.1)	0.6±0.3 (9.3)	0.7±0.4 (10.9)	0.7±0.3 (10.1)	2.4±0.7 (35.7)
平均個数±標準誤差/頭					

2 試験 2；セリシン添加修復培養液の検討

分割した 2 胚とも胚盤胞に発生した率（発生率）は、体外胚のセリシン添加区で 50.8% (66/130)、無添加区で 29.1% (41/141) であり、添加区で有意に増加した ($P<0.01$)。また、体内胚では、添加区で 83.3% (55/66)、無添加区で 80.0% (16/20) で、有意差は見られなかったが、添加区で増加した（表 3）。

表 3 セリシン添加修復培養液による分割胚の胚盤胞発生成績

胚由来	区分	供試胚数	胚盤胞発生数 (%)
体外胚	添加区	130	66 (50.8) ^a
	無添加区	141	41 (29.1) ^b
体内胚	添加区	66	55 (83.3)
	無添加区	20	16 (80.0)
a-b 間で有意差あり ($P<0.01$)			

3 試験 3；新鮮二分割胚の移植試験

(1) 移植成績

分割胚移植の受胎率は 31.5% (42/133) で、移植形態別では 2 胚 1 頭移植 (36.4%；28/77) が 1 胚 1 頭移植 (25.0%；14/56) に比べて高く、修復培養液別ではセリシン添加区がそれぞれの移植形態ともに無添加区に比べて高かったが、有意な差は認められなかった。

一卵性双子は、2 胚 1 頭移植で 8 組、1 胚 1 頭移植で 2 組が受胎したが、2 胚 1 頭移植で受胎した 2 組は双子産子の片方が死産または産後直死し、双子組作出数は 2 胚 1 頭移植で 6 組、1 胚 1 頭移植で 2 組の計 8 組であった。

分割前の供試胚 1 個から一卵性双子を作出した割合（双子組作出率；双子組作出数/供試胚数）は、2 胚 1 頭移植で 7.8% (6/77)、1 胚 1 頭移植で 7.1% (2/28) で、受胎率と同様に、移植方法間および修復培養液間で有意な差は認められなかったが、添加区のみで一卵性双子を作出した（表 4）。

分割時の胚ステージ別による受胎率は、収縮桑実胚が 36.6% と最も高く、次いで初期胚盤胞が 30.8% であった（表 5）。

移植形態別の双子産子の平均生時体重は、雄産子にお

いて、1 胚 1 頭移植産子が $32.3 \pm 0.3\text{kg}$ であり、2 胚 1 頭移植産子の $23.0 \pm 1.0\text{kg}$ に比較して有意に大きかった。雌産子では、有意な差は認められなかった (表 6)。

表 4 二分割胚移植成績

移植形態	修復培養液	供試胚数	移植頭数	受胎頭数 (%)	流産	分娩頭数	死産等	双子組作出数 (%)
2 胚 1 頭	添加区	61	61	23 (37.7)	2	21	2	6 (9.8)
	無添加区	16	16	5 (31.2)	1	4	0	0 (0.0)
	小計	77	77	28 (36.4)	3	25	2	6 (7.8)
1 胚 1 頭	添加区	25	50	13 (26.0)	2	11	0	2 (8.0)
	無添加区	3	6	1 (16.7)	0	1	0	0 (0.0)
	小計	28	56	14 (25.0)	2	12	0	2 (7.1)
合計		105	133	42 (31.5)	5	37	2	8 (7.6)

修復培養液の添加区；セリシンを 0.5% 添加 死産等；死産および産後直死
受胎率；受胎頭数/移植頭数 双子組作出率；双子組作出数/供試胚数 (分割前の胚数)

表 5 分割時の胚ステージ別移植成績

胚ステージ	供試胚数	移植頭数	受胎頭数 (%)	双子組作出数 (%)
8-32 細胞期	3	3	0 (0.0)	0 (0.0)
収縮桑実胚	59	71	26 (36.6)	5 (8.5)
初期胚盤胞	29	39	12 (30.8)	2 (6.9)
胚盤胞	14	20	4 (20.0)	1 (7.1)
合計	105	133	42 (31.5)	8 (7.6)

表 6 一卵性双子の平均生時体重

移植形態	頭数		平均体重 ± 標準誤差 (kg)	
	雄	雌	雄	雌
2 胚 1 頭	8	4	23.0 ± 1.0^a	26.2 ± 1.4
1 胚 1 頭	2	2	32.3 ± 0.3^b	25.5 ± 1.4
a-b 間に有意差あり (P<0.01)				

考 察

試験 1；SOV 開始前の卵胞ウェーブ調節法の検討

ウシの 1 発情期には、2~3 個の主席卵胞が順次発育退行する卵胞ウェーブが存在し、その中で主席卵胞は他の卵胞の発育を抑制している⁶⁾ため、SOV 開始時に存在する主席卵胞は採胚成績に悪影響を及ぼすと報告されている¹⁶⁾。また、Nasser ら¹³⁾は SOV 開始日が卵胞ウェーブの出現日から 1 日ずれると採胚成績は低下すると報告している。従って、良好な採胚成績を得るためには、SOV 開始時に主席卵胞が存在せず、且つ卵胞ウェーブ出現日に SOV を開始することが重要である。

我々は、超音波吸引法で卵胞ウェーブを調節し、処置後 1~2 日後に SOV を開始することで無処置群に比べて採胚

成績が向上することを報告した³⁾。しかし、超音波吸引法は、使用する機器が大型で携帯性に乏しく、個々の生産農場での使用には労力がかかるという欠点がある。

そこで、より簡易な卵胞ウェーブ調節法として、E2 投与法を検討した。その結果、E2 投与法は、胚の個数、品質ともに超音波吸引法よりも良好な成績が得られた。

E2 投与方法は、P 製剤下の E2 投与による負のフィードバック作用で FSH 分泌を抑制し、卵胞を開鎖退行させることで、新たな卵胞ウェーブを出現させている⁶⁾。Bo ら¹¹⁾と Moreno ら¹²⁾は、卵胞ウェーブの出現は E2 投与後約 4 日と報告しており、今回の試験でも SOV 開始日を E2 投与後 4 日目と設定したところ、良好な成績が得られた。

また、採胚成績は、供胚牛の年齢や総採胚回数などの

個体の影響を受ける¹⁴⁾とされているが、本試験に供試した牛は、当所のこれまでの採胚で平均的な正常胚数を回収できることを確認しており、今回の成績は、供試牛個体間の影響を受けていないと思われる。

以上のことから、E2 投与法による卵胞ウェーブ調節は、特殊な機器を必要とせずに作業の省力化を図るとともに、良質胚を多数作出することが可能であることが確認された。

2 試験 2 ; セリシン添加修復培養液の検討

セリシンは、蚕の繭を構成するタンパク質の一つであり、抗酸化能力⁷⁾や紫外線傷害保護効果²¹⁾を有しており、化粧品や生物学的製剤などへの応用が進んでいる。

我々は、セリシンのウシ胚への応用を検討し、これまでにセリシンを活用した無血清凍結保存液を開発し⁴⁾、0.5% (w/v) セリシン添加体外胚培養液で発生率と品質が向上することを確認している^{3) 4)}。

今回の試験において、体内胚分割胚の発生率は、無添加区で 80.0%、添加区で 83.3%であり、有意な差は認められなかったが、発生率が向上した。

体外胚分割胚の発生率は、無添加区で 29.1%と低く、体内胚よりも二分割操作による発生能への影響が大きいと推測されたが、添加区での発生率は、50.8%と有意に向上した。

寺田ら¹⁸⁻²⁰⁾はセリシンを添加した細胞培養液を用いて、検討した全ての動物細胞で増殖効果を確認し、さらにアポトーシス抑制遺伝子の発現を増大させると報告している。また、我々はセリシンのウシ胚に対する抗酸化能力を確認⁴⁾しており、セリシン添加が分割胚の発生率向上に寄与したと考えられた。

3 試験 3 ; 新鮮二分割胚の移植試験

小西ら⁹⁾は、2 胚 1 頭移植の受胎率は 1 胚 1 頭移植よりも高かったと報告しているが、今回の試験でも、この報告と同様に 2 胚 1 頭移植の受胎率が高かった。

分割胚は、通常の胚に比べ、胚と母胎間の妊娠認識や黄体退化阻止により妊娠維持に関与しているインターフェロンの分泌量が少ない可能性が指摘されており¹⁵⁾、1 胚 1 頭移植は 2 胚 1 頭移植よりも子宮内でのインターフェロンが不足している可能性が高く、受胎率が低くなっていると考えられた。

一方、本来、単胎動物であるウシにとって、双子妊娠は過剰な生理的負担になる危険性が高い。双子妊娠牛の流死産率や分娩事故率、分娩後の廃用率は、単子妊娠牛よりも有意に高く、双子妊娠の生産効率は低いと報告さ

れており^{10) 11)}、小西ら⁹⁾も 2 胚 1 頭移植で得られた双子の 30%以上が分娩事故で死亡したと報告している。本試験においても、死産・産後直死は、2 胚 1 頭移植の双子妊娠牛のみで発生した。

また、生時体重について大田ら¹⁴⁾は、双子産子の生時体重は標準体重の 80~90%だったと報告しているが、本試験においても、2 胚 1 頭移植の雄産子は、単子として生まれてくる 1 胚 1 頭移植の雄産子より有意に小さかったことから、種雄牛候補牛と産肉能力検定牛となる発育良好な双子産子を出すためには、分割胚の 2 胚 1 頭移植よりも 1 胚 1 頭移植が望ましいと思われた。

この試験で得られた一卵性双子は、全てセリシン添加修復培養液で培養した二分割胚から作出されたことから、セリシンは二分割胚の胚盤胞発生率を向上させるだけでなく、二分割胚を良好に発育させて、受胎率を向上させている可能性が示唆された。ただし、今回は作出頭数が少なく、無添加区との有意な差が認められていないことから、効果の有無について、さらに例数を増やして詳細に検討する必要がある。

二分割に供する胚のステージについて大田ら¹⁴⁾は、収縮桑実胚分割胚の受胎率が 83.3%と高く、収縮桑実胚～胚盤胞の分割胚からのみ双子産子を得られたと報告しており、本試験でも同様の結果が得られた。

胚の二分割操作は、内部細胞塊と栄養膜細胞を均等に切断できていない場合は受胎率が低下する⁹⁾ことから、均等切断が重要である。胚は、胚盤胞以降のステージに進むと内部細胞塊と栄養膜細胞の区別が明瞭となってくるが、それゆえに両細胞を均等に二分割することへの難易度が高くなると予想される。そのため、両細胞の分化があまり進んでいない段階で二分割する方が均等に切断しやすく、その後の細胞の正常な発育につながりやすいと考えられた。

以上のことから、良質胚の多数確保については、卵胞ウェーブ調節法として E2 投与法が簡便で効率的である。また、二分割胚の移植については、分割には収縮桑実胚や初期胚盤胞が適しており、分割後の細胞修復培養にはセリシン添加が有効である。さらに、二分割胚をそれぞれ一胚ずつ移植することにより、産子の体重が大きくなるとともに分娩事故を低減することができる可能性が示唆された。

今後、種雄牛の産肉能力を早期推定する分割双子検定を効率的に進めるためにも、二分割胚による一卵性双子の安定的な生産に向けて、更なる技術の改善等が必要と思われる。

なお、本試験で作出した一卵性双子の雄 2 組 4 頭の産

子を候補種雄牛と産肉能力検定牛として、分割双子検定に供試した。

謝 辞

本稿を終了するにあたり、各試験に多大なご協力をいただいた南九州畜産興業株式会社、鹿児島県末吉食肉衛生検査所並びに県内養牛農家の皆様に深謝いたします。

引用文献

- 1) Bo G.A, Adams G.P, Caccia M, Martinez M, Pierson R. A, Mapletoft R.J 1995.Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle, Anim Reprod Sci 39 : 193-204
- 2) 磯部知弘・轟木淳一・山口浩・林史弘・池田省吾・瀬戸口浩二・溝下和則 2009.繁殖不適雌牛および妊娠牛への経腔採卵 (OPU) 技術の現場応用, 鹿児島県農業開発総合センター研究報告第 3 号 : 79-83
- 3) 磯部知弘・池畑義久・林史弘・瀬戸口浩二・池田省吾・干場浩・鬼塚剛 2012.候補種雄牛生産に向けた遺伝子診断胚の効率的作出法の検討, 鹿児島県農業開発総合センター研究報告第 5 号 : 59-65
- 4) 磯部知弘 2016.絹タンパク質セリシンを用いたウシ胚の個別培養培地と無血清凍結保存液の開発, 鹿児島県農業開発総合センター研究報告第 10 号 : 171-185
- 5) Kanda Y 2013.Investigation of the freely-available easy-to-use software "EZR"(Easy R) for medical statistics, Bone Marrow Transplant 48 : 452-458
- 6) 片桐成二 2005.卵胞発育ウェーブの理解に基づいた胚移植技術の有効活用, 臨床獣医第 23 巻第 10 号 : 17-20
- 7) Kato N, Sato S, Yamanaka A, Yamada H, Fuwa N, Nomura M.Kato 1998.Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity, Biosci Biotechnol Biochem 62 : 145-147
- 8) 小島敏之・斉藤則夫・山内健治・三角浩司・宮澤彰・平田慎一郎・橋谷田豊・白戸綾子共訳, 2001.胚の衛生的取り扱いマニュアル (国際胚移植学会 IETS マニュアル) 第 3 版, 社団法人畜産技術協会, 東京
- 9) 小西一之・橋谷田豊・浅田正嗣・岡田真人・斎藤邦彦・熊谷周一郎 2005.肉用牛における一卵性双子の生産, 日本胚移植学雑誌 27 : 108-117
- 10) 三宅陽一・三好憲一・森谷浩明・松井基純・羽田真悟 2010.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, 産業動物臨床医誌第 1 巻第 1 号 : 5-9
- 11) 望月啓太・渡辺菜美・小比類巻正幸・安藤貴朗・大塚浩通・渡辺大作・及川正明 2008.双子を分娩した乳牛における周産期の体型評価と分娩後の繁殖成績, 家畜臨床誌第 31 巻第 3 号 : 160-164
- 12) Moreno D, Cutaia L, Villata M.L, Ortisi F, Bo G.A 2001.Follicle wave emergence in beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and progesterone, Theriogenology 55 : 408 abstr
- 13) Nasser L.F, Adams G.P, Bo G.A, Mapletoft R.J 1993. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers, Theriogenology 40 : 713-724
- 14) 大田均・田崎道弘・猪八重悟・立山昌一・渡辺洋一郎・加治佐修・窪田力・川畑孟・田原孝二・山田一郎 1991.牛の双子生産における産子の能力発現技術の開発に関する研究, 鹿児島県畜産試験場研究報告第 24 号 : 1-19
- 15) 下司雅也・橋谷田豊・小川増弘 2010.ウシ体外受精胚由来栄養膜小胞と胚との共移植が受胎率に及ぼす影響, 日本農業研究所研究報告『農場研究』第 23 号 : 231-244
- 16) Stock AE, Ellington JE, Fortune JE 1996.A Dominant follicle does not affect follicular recruitment by superovulatory dose of FSH in cattle but can inhibit ovulation, Theriogenology 45 : 1091-1102
- 17) 寺田聡 2002a.絹タンパク質セリシンの動物細胞増殖への有効性, バイオサイエンスとインダストリー第 60 巻第 10 号 : 683
- 18) Terada S, Nishimura T, Sasaki M, Yamada H, Miki M 2002b. Sericin, a Protein Derived from Silkworms, Accelerates the Proliferation of Several Mammalian Cell Lines Including a Hybridoma, Cytotechnology 40 : 3-12
- 19) Terada S, Sasaki M, Yanagihara K, Yamada H 2005.Preparation of Silk Protein Sericin as a Mitogenic Factor for Better Mammalian Cell Culture, J.Biosci.Bioeng. 100(6) : 667-671
- 20) 寺田聡 2008.セリシンを利用した無血清培地の開発とその応用, 生物工学会誌第 86 巻第 8 号 : 387-389
- 21) Zhaorigetu S, Yanaka N, Sasaki M, Watanabe H, Kato N 2003.Inhibitory effects of silk protein, sericin on UVB-induced acute damage and tumor promotion by reducing oxidative stress in the skin of hairless mouse Original Research Article, j.Photochem. Photobiol. B. : 11-17

Improvement of Monozygotic Twins Production Technology using Bisected Embryos in Japanese Black Cattle

Akito Shirai, Shinichi Shinbara, Yoshihisa Ikebata, Tomohiro Isobe, Keisuke Kawashima and Kazunori Mizoshita

Summary

We examined the efficient production technology of monozygotic twins using bisected embryos in order to take advantage early ability estimation of the prospective bulls.

(1) It was possible to obtain a large number of produced good-quality embryos that the superstimulation of donors were treated with progesterone-releasing device (CIDR) and estrogen without transvaginal ultrasound-guided a dominant follicle ablation.

(2) The addition of sericin significantly improved ($P < 0.01$) the blastocyst formation rate of in vitro bisected embryos, when in vivo or vitro bisected embryos using microblade were cultured individually in the culture medium supplemented with 0 (w/v) or 0.5% sericin.

(3) It was produced 8 sets of monozygotic twins, after a fresh bisected embryo was only cultured in the medium containing 0.5% sericin were transferred to recipients. Moreover, all monozygotic twins were derived from a compact morula or an early blastocyst except for one set.

In conclusion, it was suggested that it is possible to improve efficiently monozygotic twins production using the embryo transfer technique.

Keywords : Bisected embryo, Follicular wave, Monozygotic twins, Repairing culture, Sericin