

## 哺乳類の胚操作と畜産への応用と将来(89)

誌名	畜産の研究 = Animal-husbandry
ISSN	00093874
著者	菅原, 七郎
巻/号	63巻2号
掲載ページ	p. 287-292
発行年月	2009年2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



## 哺乳類の胚操作と畜産への応用と将来 (89)

### XXX ウマの ARTs と胚操作

菅原七郎\*

#### G ウマの胚移植と関連技術

##### a) ウマ胚の採取法

ウマでの受精卵子の移植法ではウシと同様、胚はドナー子宮から回収されて通常、非外科的にレシピエントの子宮に移植される。

##### i) 胚の回収法

ウマでは受精卵(胚)は排卵日を0日として6~8日目に子宮を灌流して採取することが多い。

子宮の灌流にはウマ専用のバルーンカテーテルを用い、回収液(採卵液)を流し込んで灌流液と共に回収する。胚の回収は子宮角または全子宮の灌流により採取される。

子宮角の灌流には50~100ml注射筒を用い胚回収液50~60mlを一気に流し込んで吸引して回収する。

一方、全子宮からの胚回収には自然圧力で灌流液が子宮全体に行き渡るように灌流液900~2,000mlの容器を高く(2m)固定しておき流下させる。この回収操作では灌流液は一度に300~800ml(液量は子宮の大きさや状態によって調節)を灌流する。この操作を2度繰り返す。

灌流液の回収操作には直腸から子宮角をマッサージすることによって灌流液を効率よく回収できる。

胚回収液としてPBS, ダルベッコウPBSに不活化した去勢雄血清を数%に加えた液が用いられている。なお、専用の採卵液が商品化されている。

##### ii) 胚の回収率

通常、ドナーは自然排卵させAIしたものであり、移植可能胚の回収率は50%位とされている。

胚回収率はドナーの年齢や精液の品質および排卵数によって著しく影響される。

サラブレッド、純馬種、温血種などは1性周期で2または3個排卵することが多いため、胚の回収率は良く、平均1.7個位採取できる<sup>41)</sup>。

6~8日齢の胚は0.2~2mmの大きさに発生した胚盤胞期であり、拡張期にあたり、6日齢以降、等比級数的に分裂増殖して急激に拡張する。

##### b) 胚移植法

##### i) 非外科的移植法

ウマ胚はウシと同様に0.25~0.5mlのストローに封入して移植器具を用いて非外科的に子宮体に移植される。

##### ii) レシピエントの検査と選別

レシピエントとしてドナーより1日前から3日後までに排卵した個体が用いられる。つまり胚の日齢より1日前か3日後までに排卵して黄体形成が正常な個体であれば十分レシピエントとして役立つことができる。

レシピエントは排卵の4~5日目に超音波法で卵巣の黄体形成が認められ子宮液や内膜上皮の折重なりなどが無いことが確認された個体を供する。

##### iii) 受胎率

胚移植後の受胎率は胚の品質によって著しく影響される<sup>42)</sup>。このことはどの動物種でも同じである。

すなわち、胚品質を3段階に区分してグレード1(優良)の胚を移植すると移植12日目で70~75%が受胎する。移植50日後の検査で65%の受胎率が得られている。産子率は40~45%である。

また、これまでの移植成績としてレシピエント、ドナーの年齢が多いもの程受胎率が低くなり、胚の品質も悪い傾向があり、ウマでの胚移植にとって大きな課題となっている。

#### H ウマ胚の生産法

ET技術ではドナーから一度にいくつもの胚を得ることができるのか否かが胚回収、移植効率や経費などの点で極めて重要なことである。とくに、ウマでは重要課題となっている。

胚移植や胚操作に用いる卵子や胚を生産する手法として*in vivo*と*in vitro*法とがある。

\*Ecos 研究所 (Shichiro Sugawara)

a) *In vivo* 胚生産法

## i) ウマの 外因性ホルモンへの反応性と GTH 分泌

ウマの卵巣は外因性の性腺刺激ホルモン (GTH, FSH, LH) に対してウシや他の動物と比べ感受性は非常に弱く、ほとんど反応しない。それ故、過排卵や多排卵を誘起することは現状ではほとんどできない。前述の如く、多くの品種では一性周期で2または3個が排卵される例が多いが排卵日時が数日間ずれて起っていることが指摘されている。

この事実はウマ性周期における GTH の分泌パターンと強く関連していると考えられる。

性周期の GTH や卵巣ホルモン (プロジェステロン:  $P_4$  とエストロジェン:  $E_2$ ) の分泌パターンはウシ、他の家畜や動物種と比べ、とくに GTH の分泌パターンが異なっている。

GTH, と  $P_4$ ,  $E_2$  の分泌パターンは図 30-2 に示した<sup>43)</sup>。図から明らかな如く、FSH は性周期の中頃と発情期の 2 双性の分泌パターンを示し、とくに性周期の中期での分泌量が発情期のそれと比べて多い。一方、LH は発情期で排卵後にピークに達する特徴がある。他方、 $P_4$  と  $E_2$  は卵胞の成長と排卵にしたがって分泌する。とくに  $P_4$  は排卵後急激に増加して 12~16 日間高い分泌量で黄体期を示している。

上記のホルモン分泌パターンに対して卵胞は発情開始日には 1cm 以上の卵胞が 8~12 個位存在しており、そのうち通常 1 個だけが 3~5cm まで成長して排卵に至るが、前述の如く、品種によっては 2 個

またはそれ以上が排卵する。

複数個排卵する個体では排卵に至る卵胞の発育は同時進行ではなく数日間ずれて成熟卵胞に至り排卵する。すなわち、発情終期に最初の排卵が起こり、2 個目または 3 個目の排卵は発情休止期の早い時期に起こる<sup>44)</sup>。

## ii) 過排卵・多排卵処理と成果

ウマの多排卵処理に PMSG (eCG), GnRH, インヒビンワクチン, ブタ FSH やウマ脳下垂体前葉抽出物 (EPE) などを用いた報告があるが、いずれも実用的なレベルまで至っていない。

PMSG の多量投与でも卵巣は反応せず排卵もみられない。GnRH は非繁殖期で投与すると卵胞発育をさせるが排卵に至らない。繁殖季節での投与では多排卵させることができない。

他方、ブタ FSH を多量に反復 3~4 日間繰返投与しても 1.2~1.7 個の排卵数であった<sup>45)</sup>。

排卵後 6~8 日から 4~6 日間 EPE を 1 日 1 回、または 2 回注射して排卵数を比較した実験がある。EPE 投与の 48 時間目に  $PGF_2\alpha$  を 1 回投与して EPE 投与を 6 日間反復した結果では 1 日 1 回投与区での排卵数は 2.4 個であったのに対し、2 回投与区では 7.1 個と有意に高い排卵数が得られている。そして採卵数が 1.6 に対して 1 日 2 投与区では 3.5 であった<sup>46)</sup>。

同様の研究で EPE の投与量 50mg を 1 日 1 回、25mg と 12.5mg を 1 日 2 回の注射区に分けて、排卵確認の 5 日後から各 EPE 投与を開始した。 $PGF_{2\alpha}$  は

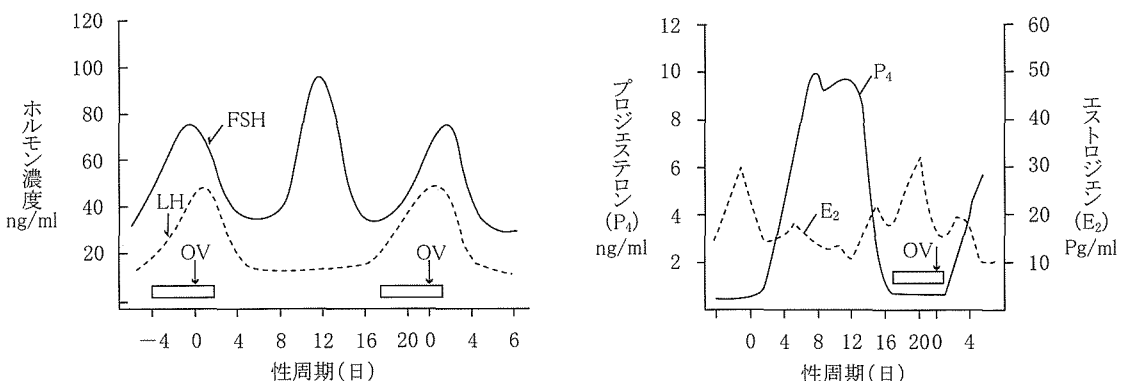


図 30-2 ウマ性周期における GTH (FSH, LH),  $P_4$ ,  $E_2$  の分泌パターン (Evans & Irvine 1975 より)

排卵確認後 7 日目、つまり、EPE 投与開始後 48 時間に 1 回投与する。その結果、25mg EPE の投与区の胚数は 4.7 個、12.5mg EPE 区では 2.1 個であった。一方、50mg EPE 区では投与期間中、成熟卵胞 (>35mm) の出現率が非常に多く、そのような個体では EPE の投与をやめ、代わりに hCG を投与排卵させた。また、EPE の漸減投与方法では 3.3 個の排卵数で回収卵子数は 2.3 個であったのに対し、対照区では 1.2 個の排卵数で、回収胚は 0.6 個であった<sup>47)</sup>。

上記のように、ウマでの多排卵はウシなどと比べ明らかにむずかしいが、将来的にはドナー当たり、少なくとも 3 個以上の移植可能胚が得られる多排卵法の開発が必要と考えられる。

### b) *In vitro* 胚生産法

ウシやその他の家畜さらにヒトでは生体外での胚生産 (IVEP: *In vitro* embryos production) が広く利用されているがウマではこの技術が十分利用されるまでに至っていない。

IVEP を成功させるためには、まず i) 卵巣からの採卵、ii) 採取卵子の成熟、iii) 媒精、iv) 発生培養の各段階での手法が確立されていることが基本であるが少なくとも利用できる技術的な裏付けが必須である。

#### i) 採卵とその課題

ウマの場合、屠場や屠殺数も他の家畜と比べ少ないことから、ウマでは IVEP に供するための卵子を確保することがウシと比べて非常にむずかしい上に卵巣からの採卵数や率も少ない。さらに、ウマ繁殖育種家や協会の関心も低いことである。

採卵の技術的なことではウシと異なり、卵胞を切開して、卵胞細胞ごと卵子 (COCs: cumulus-oocytes-complexes) を取り出すために卵胞壁をサジ状のものでひっかいて採取しなければならない。

採卵時での上記採卵操作は意外と時間を要し採卵率にも影響する。

実際、採卵について、品種、採卵者などによって採卵所要時間や採卵率が著しく異なり、時には 10 倍もの差がでることが指摘されている。

たとえば 100 個の卵子を採取するのに 4 人で行なうと 3~4 時間を要する。一方ウシでは 2 人で 30~40 分間で採卵できるとされている。

採卵に長時間要することはそれに続く、成熟培養

(IVM)、媒精 (IVF)、発生培養 (IVC) などの各処理段階での卵子の生存能や発生能に悪い影響を及ぼすことになるので十分に考慮することが大切である。

#### ii) ウマ卵胞内卵子 (COCs) の特性

ウマでは卵胞から採取した COCs のうち約 1/3 は膨潤した卵胞細胞に取り囲まれた卵子である。ウシでは上記の COCs は退行卵子が多いことから選別され IVM にかげられず捨てられてしまうがウマではそのような卵子は退行していなく正常であり、発生能をもっている。

また、ウマの採取された卵胞内卵子は放射冠細胞だけが着いている卵子や多量の顆粒層細胞に囲まれた卵子は採取されることはほとんどない。この点もウシの採取卵胞卵子とは明確に異なる点である。ウマ採取卵胞卵子の特性は採取時のひっかけや洗浄などによって起こっていることも考えられるが卵子と卵胞細胞との結合や構成の違いによることがその要因といえる。

なお、30mm 以上に发育した卵胞内卵子のうち約 70% が核成熟を完了しており、他のものは退行していることも報告されている。

さらに、ウマ卵子の成熟能はリスザルの卵胞卵子と同じように排卵時の大きさに達していても卵細胞質の成熟が完了していないと核の成熟 (M-II) に至らないとされている<sup>49)</sup>。

これらのことはウマでの性周期における GTH 分泌に関係していると考えられるが、事実関係については更なる研究の成果によって裏付けされる必要がある。

#### c) 卵子の成熟培養

ウマ卵子の体外成熟の成功は 1981 年に報告されたが、受精能や発生能については実施されていない。その後、1989 年、屠場卵巣の卵胞由来卵子を IVM して、それを前もって AI をしたレシピエントの卵管に移植した後、7 日目に子宮灌流で卵を回収したところ胚盤胞が確認されている。(Zhang ら, 1989, 表 30-6 参照)

#### i) 成熟培養液

ウマ卵子の成熟培養として TCM-199, B2 液<sup>50)</sup>, Hams F10<sup>51)</sup> などが用いられてきたが、そのうち TCM199 を基礎培地して血清、ホルモン、成長因子 (EGF)、卵胞液 (eFF) などを添加した液が多く

利用されている。

最近では TCM-199 を基礎培地として 10~20% FCS (FBS) と FSH を添加したのみの培養液が広く用いられている。

表30-7は現在多用されている成熟培養液の組成と培養条件を示したものである。

## ii) 成熟に要する時間

ウマでは >20mm の卵胞内卵子が生存性や成熟率などの点から最も良いとされている。

成熟培養にかけられたウマ卵母細胞は 24~36 時間の培養で核の成熟分裂 (MII) を終了する。

成熟に要する培養時間は培養にかける卵子 (COCs) の状態や卵子を採取した卵胞の大きさに関連して異なる。

COCs で卵胞細胞がコンパクト (Cp) なものと、より膨化した (Ex) COCs を成熟培養して M-II に達する割合を比較したところ、ウマでは Ex の卵子

がより早い時間帯で核の成熟を完了する。

一方、ウシでは膨化した COCs では退行卵が多く成熟培養から除外されている。

最近では 24 時間の培養で成熟分裂 (M-II) をさせている報告が多く、長くても 30 時間内である。

## iii) 卵子の成熟率

上記、成熟培養時間 (24~30hr) での成熟達成率はそれぞれの報告で異なるが 50~85% である。

ウマ卵子で発生能をもった成熟卵子の割合やその成果を評価する手法として、AI をしたレシヒエントの卵管に成熟培養にかけた卵子を移植して、2~3 日後、胚を回収して発生した割合で確認している<sup>52)</sup>。

## d) 媒精 (IVF)

ウマの IVF 卵子から産子を得た最初の成功例では IVF された卵子は GTH 処理後 35 時間目の成熟卵胞から採取して媒精する前 6~12 時間培養してから

表 30-7 ウマ卵子の成熟用培養液の組成と培養条件

	Hinricks <i>et al</i> <sup>1)</sup>	Goudet <i>et al</i> <sup>2)</sup>	Choi <i>et al</i> <sup>3)</sup>
基礎培地	TCM199 (Earle Salts)	TCM199 (Earle Salts)	TCM199 (Earle Salts)
血清	10% FBS	20% FBS	10% FBS
その他	-	2.2g/l Na NHCO <sub>3</sub>	-
ホルモン			
1	5 μ U/m/ FSH	L-glutamine	-
2	or 5 μ g/m/ FSH	9.5 μ g/m/ eFSH	5 μ U/m/ FSH
3	-	15 μ g/m/ eLH	-
4	-	1 μ g/m/ E <sub>2</sub>	-
抗生物質			
1	25 μ g/m/ gentamicine	100IU/m/ penicillin	25 μ g/m/ gentamicine
2	1.25 μ g/m/ Fungizone	100IU/m/ Streptomycine	-
培養条件			
1)COCs 当たり の培養液	>20 μ l	>50 μ l	10 μ l
2)気相			
空気	95%	95%	95%
CO <sub>2</sub>	5%	5%	5%
3)培養温度	38.2°C	38.5°C	38.2°C
4)培養時間	24~40hr	30hr	24hr
成熟率(%)	>70	>37	>80

1) Hinricks, K *et al* (1993) Biol Reprod 48:363~370

2) Goudet, G *et al* (1997) *ibid* 57:232~245

3) Choi, Y H *et al* (2004) Theriogenology 65:808~819

注: 表記以外に成熟用の培養液として TCM-199 を基礎培地として EGF, IGF-1, LH, E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub>などを添加した培地が研究されているが成熟率、その後の発生能 (桑実期、胚盤胞)などは、これらを添加しなくとも全く変わらないことが報告されている<sup>4,5)</sup>。

4) Gali, C *et al* (2002) Theriogenology 57:719

5) Choi, Y H *et al* (2003) Zygote 11:77~86

媒精した実験例であった。

その後、GTH 処理後、OPU 法で成熟卵胞から採取した卵子での IVF で産子が得られている。

他方、*In vitro* で成熟させた卵子への IVF では精子の侵入、前核形成までで分裂をして発生を開始した受精卵子は得られていない<sup>53,54)</sup>。

3  $\mu$ M $\sim$ 7.14  $\mu$ mM カルシウムイオノホアで処理した 60 $\sim$ 100 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml の精子を 100  $\mu$ l の TALP 媒精培地 (10 $\sim$ 15 卵子)  $\rightarrow$  12 $\sim$ 18  $\mu$ l (1 $\times$ 10<sup>6</sup> 個の精子) を加え、38.2 $^{\circ}$ C で 24 時間培養し受精させた。そして 12 $\sim$ 21% の受精率が得られている。また、AI したレシピエントの卵管に移植して受精の有無をみた結果では 2 $\sim$ 4 細胞期の卵子が約 20% も得られた報告がある<sup>55)</sup>。この成果は *In vitro* 卵子も受精能力、発生能も有しているが現状の *in vitro* の媒精法では極めて受精率が低い。これは精子の受精能は完全に得られていないことや媒精の至適条件および IVM 卵子の透明帯の物理化学的な変化などに関係していると思われる。それでウマでは通常の IVMF (ウシその他の家畜など) 法を現在適用することができず、IVF (媒精) の代り顕微受精法での IVEP が行なわれて成果が得られている。ICSI については別項で述べる。

#### e) 卵子の発生培養

ウマ卵子を培養して発生させる研究は 1980 年代末から盛んに行なわれるようになった。

1993 年、生体から取り出したポニーの 1, 2 細胞期卵子を子宮上皮細胞とを Ham-F10, or Eareles 修正ダルベッコ液に 5  $\mu$ g インシュリン, 5  $\mu$ g トランスフェリン, 5ng, Na-セレンを添加した培地で共培養して胚盤胞に発生させている<sup>56)</sup>。

#### i) IVF 卵子の培養

前述のように、ウマではウシや他動物などの様に通常の IVF ができないので IVMF 卵子の培養例はないが生体内卵胞由来卵子の IVMF 後培養発生させた報告がある。

妊馬卵巣から卵胞吸引で採取した卵子を成熟培養して、透明帯に穴をあけ媒精した卵子をウシ卵管上皮細胞とマウス卵子と共に TCM-199 に 10%FCS を添加した培養液で共培養して 2 個のウマ胚盤胞が得られている<sup>57)</sup>。

また、IVM した卵子の透明帯を一部分壊わして IVF した卵子を栄養膜細胞で条件付した培養液また

は TCM/DMEM に 10%FBS を添加した培養液で培養して 3 $\sim$ 8% (10 個) の胚盤胞を得た報告がある<sup>58)</sup>。

#### ii) ICSI 卵子の培養

2000 年以降、ウマでは IVF の代わりに ICSI を行なった卵子を培養して、発生させた報告が多くみられる。

体外培養で成熟させた卵子へ ICSI をして IVC によって胚盤胞まで発生させている。

これまでに、ICSI 卵子の IVC にはペロ細胞などを含む他の体細胞<sup>59)</sup>、卵管上皮細胞<sup>60)</sup>、卵胞細胞<sup>61)</sup>、顆粒層細胞<sup>62)</sup>または条件付培地<sup>58)</sup>などでの共培養が行なわれている。

その他、G1, 2<sup>52)</sup>、DMEM-F12 と CZB<sup>63)</sup>、修正 SOF などが IVC に利用されている。

上記、培養系での ICSI 卵子の胚盤胞期までの発生率はそう高くはなく 4 $\sim$ 16% 位の発生割合である。

最近、ICSI 卵子の IVC を混合ガスの気相にすることによって胚盤胞への発生率を高めることに成功している。

屠場卵巣卵胞から採取した Ex-COCs (膨化卵胞細胞に囲まれた卵子) のみを前述 (IVM の項参照) で IVM した後、ICSI した卵子を DMEM/F12 液に 10%FCS+25  $\mu$ g/ml ゲンタマイシンを加えたものを IVC 液として 5%CO<sub>2</sub>, 5%O<sub>2</sub>, 90%N<sub>2</sub> の混合ガス下で 38.2 $^{\circ}$ C, 8 日間培養した。この間、培養 3 日と 5 日に培養液を完全に交替して、培養 7, 8 日目に胚盤胞への発生数と桑実胚の割合を記録している。

この培養条件下で ICSI 卵子は 27 $\sim$ 38% の割合で胚盤胞まで発生している<sup>65 $\sim$ 67)</sup>。

#### iii) IVC 胚の品質

IVC で発生した胚盤胞の品質はまずは形態的に正常であることが基本であるが胚の細胞数すなわち、全細胞数 (栄養膜: Tr と内細胞塊: ICM) と ICM の全細胞数に対する比の計測で評価することができる。

これまで、どの動物種でも IVC 胚の全細胞数と ICM の比率は *In vivo* 発生胚のそれらと比べ相対的に少ないことが確認されている。

ウマ IVC 胚の品質について胚の細胞数を比較した報告がある<sup>68)</sup>。

修正 SOF 液で発生させた 7 日齢の胚と同じ日齢の *In vivo* 胚とで細胞数を測定した結果、IVC 胚の

細胞数は有意に少なく、その細胞数は5日齢の *In vivo* 胚に相当するものであった。

IVC 胚の細胞数の少ない割合は培養条件によって違ってくるが、胚の発生速度が細胞数の少ない割合に応じて遅れていることを示す。

これまでの研究成果から IVC 胚は *in vivo* 胚と比べ発生が 24~48 時間遅れることが常識となっている。しかし、将来的には IVC でも発生卵子の細胞周期が *In vivo* 胚と全く同じか、遅くても 12 時間内になるような培養条件を開発する必要があり、その成果が待たれる。

### 農業畜産情報

#### 家計消費構成比牛肉低下し、豚・鶏肉増加

農水省・食肉鶏卵課がまとめた平成 19 年次の食肉消費構成割合によると、牛肉は家計消費と加工仕向けが前年より 1 ポイント低下し 2 年連続の減少となったのに対して、豚肉と鶏肉は家計消費が 1 ポイ

ント増加し、豚肉は 3 年連続、鶏肉は 4 年連続の増加となるなど、牛肉と豚肉・鶏肉は対象的な展開となった。牛肉は個人消費の冷え込みが家計消費に大きく影響しているものとみられる。

△牛・豚・鶏肉消費の構成割合の推移

(単位:%)

	年次	家計消費	加工向							計	その他(外食等)
			ハム・ソー	ハンバーグ ハンバーガー	食肉缶詰	レトルト	冷凍食品	その他			
牛肉	15	34	1.5	2.4	0.2	0.9	2.7	0.9	9	57	
	16	35	1.6	4.3	0.3	0.8	2.6	0.8	10	55	
	17	36	1.6	4.0	0.3	0.7	2.6	0.7	10	54	
	18	35	1.7	3.7	0.2	0.9	2.4	0.9	10	55	
	19	34	1.6	3.8	0.3	0.9	1.7	0.7	9	57	
豚肉	15	40	25.2	0.4	0	0.1	1.9	1.8	29	31	
	16	40	24.7	0.3	0	0.1	2	2.1	29	31	
	17	41	24.1	0.5	0	0.1	2.2	1.9	29	30	
	18	43	23.7	0.2	0	0.1	1.7	1.5	27	30	
	19	44	22.4	0.2	0	0.1	1.2	1.5	25	31	
鶏肉	15	32	3.2	1.2	0.1	0.4	3.7	1.5	10	58	
	16	33	3.2	1.4	0.1	0.4	3.6	1.7	10	57	
	17	34	3.0	1.0	0.1	0.4	2.3	1.6	8	58	
	18	35	2.9	0.9	0.1	0.4	2	2.1	9	56	
	19	36	2.9	1.2	0.1	0.4	1.7	2.4	9	55	