

総 説

異分野技術を活用した肉用牛の生産性向上に関する研究

横尾 正樹*

秋田県立大学 生物資源科学部 アグリビジネス学科

秋田県南秋田郡大潟村字南 2-2 〒010-0444

Masaki YOKOO

Department of Agribusiness, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University

2-2 Aza Minami Ogata village, Minamiakita-gun Akita 010-0444 Japan

Keywords : bovine embryo transfer, carbon nanotube, near-infrared laser, pedometer

2019 年 5 月 9 日受付, 2019 年 5 月 10 日受理

1. はじめに

肉用牛経営においては、飼料や素畜の価格高騰に対処するために、繁殖効率の向上や子牛生産コストの低減等を通じた生産性の向上が求められている。このような状況を解決する切り札の1つとして、肉質の良い和牛を効率的かつ低コストで生産できる体外受精卵移植を活用した子牛生産技術が注目されている。しかし、低コスト生産が期待できる一方で、この技術による子牛生産頭数は年間4,000頭程と、子牛生産現場における体外受精卵移植の普及は進んでいない。こうした現状を打開するためには、移植可能な体外受精卵の高品質化ならびに受精卵を移植する雌ウシの受胎性向上に向けた研究開発が必要であると考えられる。

2. 体外受精卵移植技術

体外受精卵移植技術とは、体外で作出（未成熟卵子の体外成熟・体外受精・体外発生培養）した受精卵を子宮内へ移植して産子を得る技術であり、ウシでは1985年に

産子が誕生した（花田ら, 1985）。人工授精と同様に大がかりな外科手術は必要とせず、非外科的（経腔的）に受精卵を移植することが一般的な手法となっている。また、体外受精に用いる卵子は、屠畜場で廃棄される卵巣から採取したものを利用できるため、移植する受精卵を安価に、大量に生産できるというメリットがある。また、枝肉の成績を評価してから利用することが可能であることから、優良肉用牛の選択的増殖技術としても期待される。最近では、超音波診断装置を利用して、生体卵巣から非外科的（経腔的）に卵子を採取して、体外受精に利用する方法（経腔採卵法；OPU）も普及しつつある（今井ら, 2014）。人工授精技術が雄側の優良形質を有効活用する技術であるのに対して、体外受精卵移植技術は雌側の優秀な遺伝形質も効率的に利用することができることから、家畜改良の促進や、優良雌ウシの産子を増産する技術などとしても期待されている。しかし、体外受精卵の培養技術は完成されているとはいえず、ウシの場合、移植可能な胚盤胞まで発生するのは、体外受精卵の30%程度でしかない。また、移植後の受胎率も40%程度に留まっており、今後、体外培養のさらなる改善による発生率の向上、体外受精卵の品質改善が課題となっている。

受精卵を移植する雌ウシのことを受卵牛と呼ぶ。体外受精卵を産子まで発育させるためには、受卵牛への移植が不可欠であり、体外受精卵移植を利用して効率的に子牛生産を行うためには、移植する受精卵のみならず、受

* 連絡者：横尾 正樹（よこお まさき）
（秋田県立大学 生物資源科学部 アグリビジネス学科）
〒010-0444 秋田県南秋田郡大潟村字南 2-2
TEL & FAX: 0185-45-3911
E-mail: myokoo@akita-pu.ac.jp

卵牛の準備・管理も重要となる。現在、受精卵は、移植する受精卵と発情周期と同調させるために、移植に先立ち、ホルモン製剤を利用して発情周期を人為的に制御することが一般的となっている。しかし、将来的に、ウシ体外受精卵移植技術による子牛生産を広めるためには、人工授精のように、自然発情周期で移植する方法を検討すべきであり、そのためには、受精卵となる雌ウシの発情を省力的に管理し、なおかつ、妊孕性の高い牛の選別方法の検討が課題である。

本総説では、我々がこれらの課題解決のために実施してきた研究の中から、異分野技術（物理化学、材料化学および情報通信）を活用した研究成果をいくつか紹介したい。

3. 異分野技術を活用した研究成果

(1) 物理化学技術を活用した体外受精卵の高品質化

ウシの受精卵移植技術で移植される受精卵は、通常1個であることから、移植する受精卵の品質は極めて重要となる。受精卵の品質はミトコンドリア活性によって左右されることが報告されている（Abe ら, 2002; Lopes

ら, 2007)。つまり、受精卵のミトコンドリア活性を制御できれば、受精卵の高品質化、ひいては受胎率の向上に繋がると考えられる。我々は、近赤外領域の光が医療分野において生体内のミトコンドリア機能の活性化に利用されていることに着目し、近赤外光を利用した受精卵品質改善技術を開発した（横尾, 2015; Yokoo と Mori, 2017)。マウス受精卵を使用した研究では、胚盤胞に近赤外光 (904 nm) を1分間照射するだけで、発生速度が改善され、ふ化までの所要時間が短縮されることが明らかとなった。興味深いことに、この効果は発生初期の受精卵 (2細胞期胚, 8細胞期胚および桑実胚) では確認できず、胚盤胞で最大となることが示された (図1)。哺乳動物の受精卵では、桑実胚から胚盤胞にかけてミトコンドリアのクリステが発達することが報告されている (Abe ら, 2002; Abe ら, 2008)。つまり、近赤外光はミトコンドリア機能が発達した時期の受精卵に照射することで、より高い効果を発揮することが示唆される。さらに、近赤外光を照射したマウス胚盤胞を仮親の子宮内へ移植試験したところ、受胎成績が向上し、得られた産子の成長にも異常は認められなかった (表1, 図2)。以上のことから、近赤外光を利用した受精卵品質改善技術は、簡便な手法で受精卵の品質を向上させ、産子の正

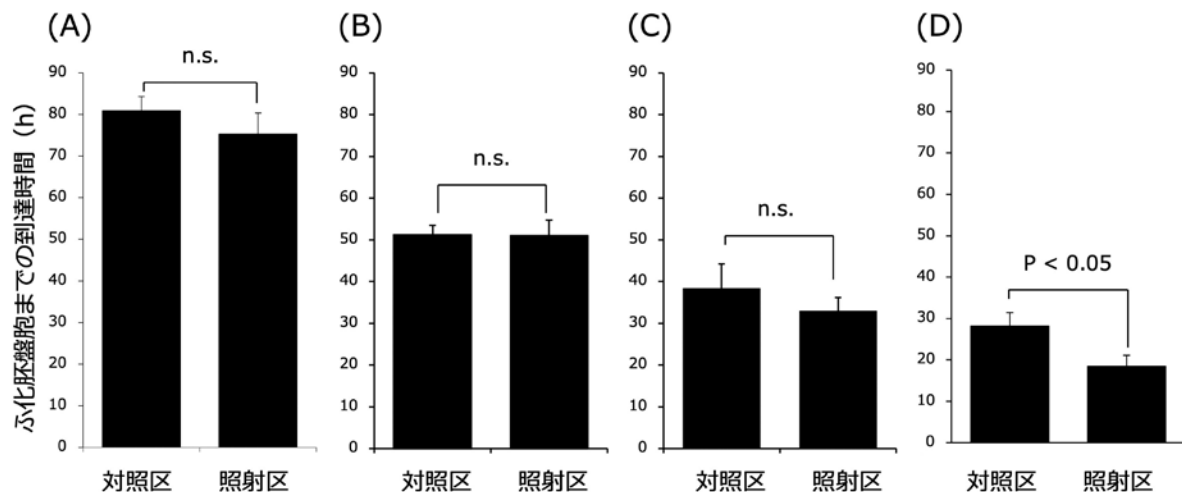


図1. 近赤外光照射がマウス受精卵の発生速度に及ぼす影響

(A) 2細胞期胚, (B) 4細胞期胚, (C) 桑実胚, (D) 胚盤胞 (Yokoo と Mori, 2017 の図を一部改変)

表1. 移植胚盤胞への近赤外光照射が受胎成績に及ぼす影響

	移植マウス (匹)	移植胚数 (個)	妊娠マウス (匹)	妊娠率 (%)	産子数 (匹)	産子率 (%)
対照区	17	182	14	82.4	54	29.7
照射区	18	195	18	100	92	47.2*

(*: p < 0.05)

(Yokoo と Mori, 2017 の表を一部改変)

常性を変化させることなく受胎成績を改善させることが示された。現在、我々はウシ体外受精卵に対する近赤外光照射の効果についても検証を重ねており、これまでに、胚盤胞のミトコンドリア活性の上昇、胚盤胞のふ化率の向上、ふ化までの所要時間の短縮など、マウス受精卵の研究で得られた結果と同様の効果を確認している（横尾ら、2015）。さらに、ガラス化凍結保存したウシ胚盤胞に照射すると、融解後の胚盤胞の生存性を改善する効果は認められないものの、生存胚盤胞の細胞数やふ化率を有意に改善する効果を確認している（立原ら、2018）。今後、胚盤胞に及ぼす近赤外光の作用機序の詳細を解明するとともに、近赤外光を照射したウシ体外受精卵の移植試験で、受胎性や産子の正常性が確認できれば、ウシ体外受精卵の品質改善技術として期待されると考えている。

（2）材料化学技術を活用した体外受精卵の高品質化

体外受精卵の高品質化に関する研究の多くは、使用する培養液の組成に焦点を当てており、培養で使用するデバイスに目を向けた研究は少ない。そこで我々は、受精卵の培養に用いるデバイスの改良による体外受精卵の品質改善をめざし、材料化学分野の研究者と共同で新規細胞培養シートを開発した（伊藤と横尾、2012）。この培養シートは母材であるシリコン樹脂（poly-dimethylsiloxane, PDMS）の表面にカーボンナノチューブ（CNT）が網目状に塗布された複合材（CNT 複合材）でできており、既存の培養ディッシュにコートすることで CNT 複合材培養ディッシュを自作することができる（図3）。正常ヒト臍帯静脈内皮細胞を使用した培養試験では、

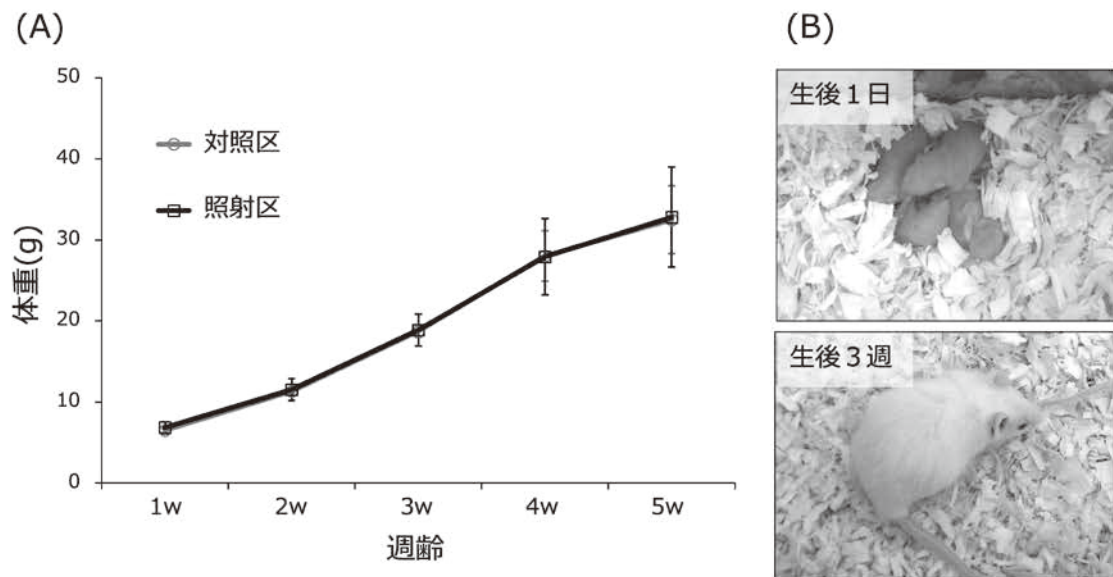


図2. 移植胚盤胞への近赤外光照射が産子の発育に及ぼす影響

(A) 産子の体重の推移（～生後5週）、(B) 近赤外光照射胚盤胞由来の産子（Yokoo と Mori, 2017 の図を一部改変）

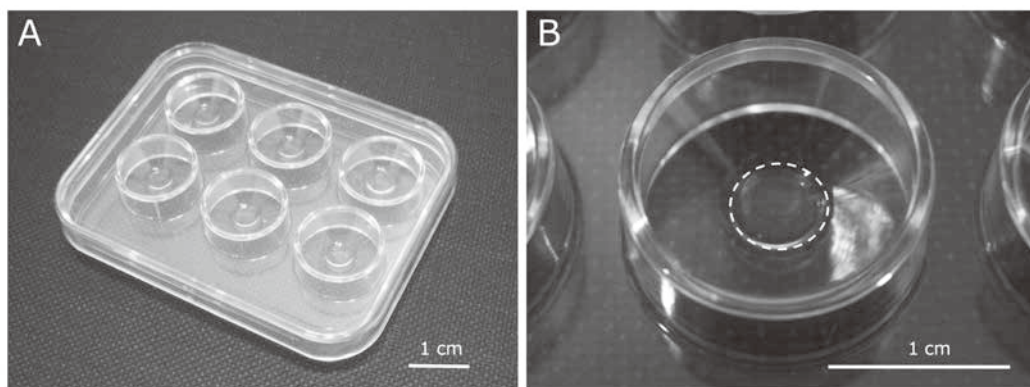


図3. 本研究で作製した CNT 複合材培養ディッシュ

(A) CNT 複合材培養ディッシュ全体像、
(B) 培養ウェル拡大（破線内に CNT 複合材がコートされている）（横尾ら、2015 の図を一部改変）

CNT 複合材は $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンを介さない特徴的な細胞接着様式を示すことを明らかにしている（伊藤と横尾, 2016）。また, CHO 細胞を用いた培養試験では, 一般的な基質剤であるコラーゲンよりも細胞の接着特性に優れ, その後の細胞増殖も良好という特徴を有していることを明らかにしている（図 4；横尾ら, 2018）。このような CNT 複合材の特色を活かすために, 単層培養した卵丘細胞とウシ体外受精卵の共培養に利用したところ, コラーゲンコートディッシュによる共培養と比較して, 無血清培養系においてもウシ体外受精卵の胚盤胞への発生率が有意に改善されることが確認された（表 2）。一般的な受精卵の培養では, 5% 程度のウシ胎子血清を添加して行う。しかし, 血清を使用した培養法では, 受精卵の品質が低く, 得られた受精卵を移植しても, 妊娠中の流産や死産が多い, 過大児のリスクが高いといった問題が指摘されており, 近年, そのようなリスクを回避できる無血清培養系による受精卵培養が注目されている（Abe と Hoshi, 2003；Fernández-Gonzalez ら, 2004）。本研究の結果は, 我々が開発した CNT 複合材培養ディッシュが無血清培養系においてもウシ体外受精卵の品質改善に効果的であることを示しており, 将来的に, ウシ体外受精卵移植の受胎率を改善させる新しいツールとして活用できると考えている。

（3）情報通信技術を活用した受卵牛の繁殖管理

受精卵移植では, 移植する受精卵と受卵牛の発情周期を同調させる必要があるため, 人工授精と同様に雌ウシ

の発情を管理することが重要かつ不可欠である。近年では, パソコンや発信機などの情報通信技術を活用して, 雌ウシの行動量から発情を省力的に検出するシステムが開発されており, その実用性や信頼性についての研究も多く報告されている（Firk ら, 2002；López-Gatius ら, 2005；Roelofs ら, 2005；Sakaguchi ら, 2007）。我々は, 雌ウシの歩数計測によって発情を検出するシステム（牛歩；^株コムテック）を活用する中で, 同一の個体であっても, 発情毎に行動量に違いがあることに着目し, 黒毛和種繁殖牛の発情時の行動量と人工授精後の受胎成績との関係を調査した（横尾ら, 2013）。その結果, 人工授精後に受胎が確認された発情と, 人工授精は行ったものの不受胎だった発情を比較すると, 受胎が確認された発情では, 発情期間の行動量（累積歩数）が有意に大きいことを見出した（図 5）。さらに, 妊娠維持に関連のある血中プロゲステロン濃度を調査したところ, 発

表 2. 卵丘細胞との共培養によるウシ体外受精卵の発生成績（無血清培養）

	培養卵数	培養 9 日目	
		胚盤胞数 (%)	心化胚盤胞数 (%)
対照区 (コラーゲン)	77	5 (6.5)	1 (1.3)
試験区 (CNT 複合材)	78	19 (24.4*)	9 (11.5*)

(*: $p < 0.05$)

(横尾ら, 2015 の表を一部改変)

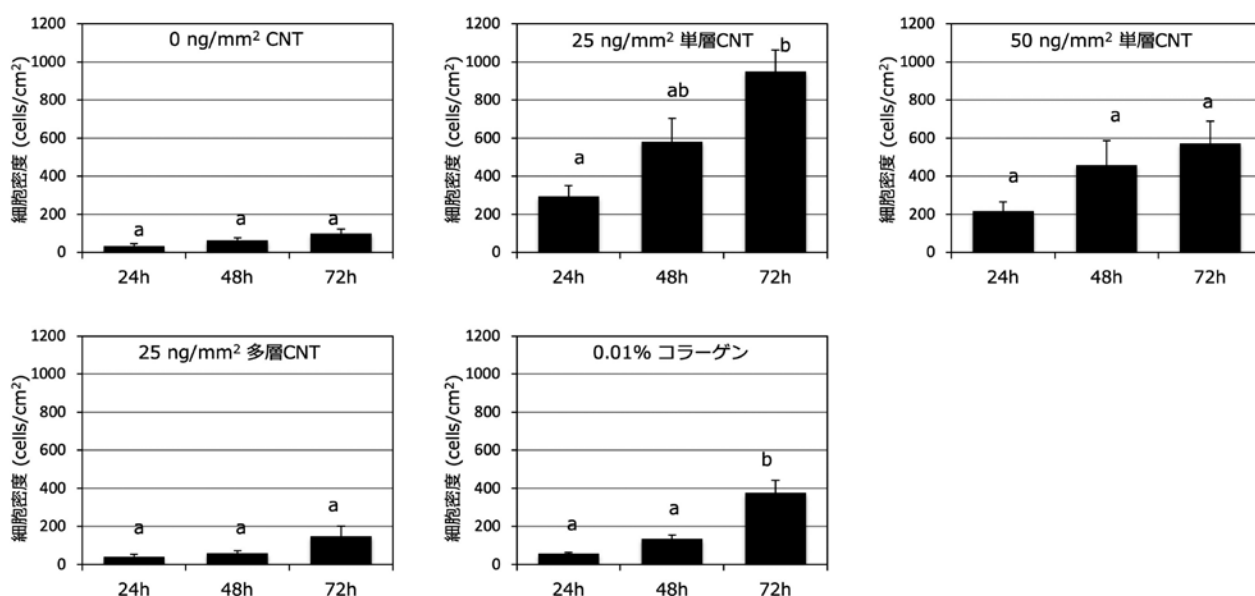


図 4. CNT 複合材の違いが CHO 細胞の接着および細胞増殖に及ぼす影響
異符号間に有意差 ($P < 0.05$) (横尾ら, 2018 の図を一部改変)

情期間の行動量が大きかった発情（高歩数区：累積歩数 6500 歩以上）では、行動量が小さかった発情（低歩数区：累積歩数 6500 歩以下）と比較して、発情後の血中プロゲステロン濃度が高く推移することが確認された（図 6）。発情期に見られる活動量の増加は、卵胞から分泌されるエストラジオールによって誘起されることが知られており、顕著な発情行動が観察された個体では、排卵卵胞が大きく、血中エストラジオール濃度も高いことが報告されている（Lopes ら, 2007; Perry ら, 2007）。また、妊娠の成立や維持には、黄体から分泌されるプロゲステロンが重要な役割を果たしているが、排卵卵胞が大ききほど、排卵後に形成される黄体直径が大きく、黄体から分泌されるプロゲステロン濃度も高いことが報告されている（Vasconcelos ら, 2001）。逆に、排卵卵胞のサイズが小さい場合、排卵後に形成される黄体も小さくなり、排卵後の血中プロゲステロン濃度の上昇が緩

慢になることが報告されており、その結果、初期胚の死滅につながることも示唆されている（Moore ら, 2005; Perry ら, 2005）。本研究では、卵巢動態に関する検討は行っていないが、累積歩数の多い発情では、卵巢内に大きな排卵卵胞や機能的な黄体が形成されていた可能性が高く、その結果として、血中プロゲステロン濃度の上昇につながったと考えられる。つまり、これらの知見は、情報通信技術を活用した発情管理システムが、単に雌ウシの発情を省力的に管理できるだけではなく、その雌ウシの妊孕性を予測することにも応用できることを示唆している。体外受精卵移植においても、妊孕性の高い受卵牛を事前に選抜できれば、受胎率を改善させるための有効な手段となり得ると考えられるため、今後、情報通信技術を活用した発情管理システムは、受卵牛の選抜技術としても期待できると考えている。

4. おわりに

現在、肉用牛の飼養戸数の減少と 1 戸当たり飼養頭数の増加、さらには高齢化が進み、労働力の質・量の低下が懸念される中、従来の技術に頼るだけでは子牛の生産性向上は期待できないと考えられる。これからは、新しい分野や新しい技術と家畜繁殖技術が、畜産の実態に即した形でドッキングすることが肉用牛の生産性向上に必要であると考えている。今後、異分野技術を融合して得られたこれらの新しい知見を活用した子牛生産体系を構築することで、受精卵移植成功のカギとなる「受精卵」、「受卵牛」、「人（技術・管理）」の 3 要件を整え、ウシ体外受精卵移植技術の普及や肉用牛の生産基盤強化に繋げていきたいと考えている。

謝 辞

本研究の一部は JSPS 科研費 JP26450380, JP17K08049 および秋田県立大学学長プロジェクトの研究支援を受けて実施した。また、本研究における実験データの蓄積に尽力いただいた秋田県立大学生物資源科学部アグリビジネス学科家畜資源利用推進プロジェクト家畜繁殖学研究室の学生諸氏に深謝いたします。

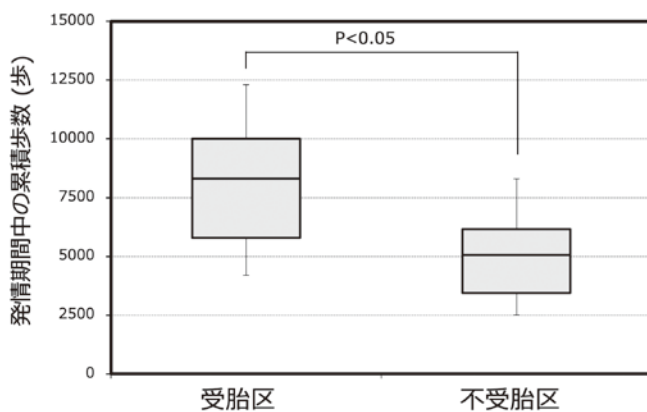


図 5. 発情時の累積歩数と受胎性との関係

箱の下端, 中央, 上端はそれぞれ 25 パーセンタイル, 中央値, 75 パーセンタイルを示す。箱の上下のひげはそれぞれ最大値, 最小値までの範囲を示す。(横尾ら, 2013 の図を一部改変)

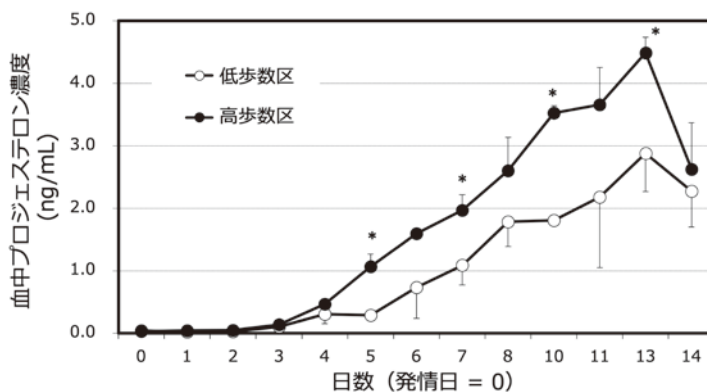


図 6. 発情後の血中プロゲステロン濃度の変化

アスタリスク (*) は、実験区間に有意差 ($P<0.05$) があることを示す。(横尾ら, 2013 の図を一部改変)

引用文献

- Abe H, Matsuzaki S, Hoshi H. Ultrastructural differences in bovine morulae classified as high and low qualities by morphological evaluation, *Theriogenology*, 57 : 1273-1283. 2002.
- Abe H, Hoshi H. Evaluation of Bovine Embryos Produced in High Performance Serum-Free Media. *J. Reprod. Dev.*, 49 : 193-202. 2003.
- Abe H, Yokoo M, Itoh-Sasaki T, Nasu M, Goto K, Kumasako Y, Araki Y, Shiku H, Matsue T, Utsunomiya T. Measurement of the respiratory activity of single human embryos by scanning electrochemical microscopy. *Trans. Mat. Res. Soc. Jpn.* 33 : 759e762. 2008.
- Fernández-Gonzalez R, Moreira P, Bilbao A, Jiménez A, Pérez-Crespo M, Ramírez MA, Rodríguez De Fonseca F, Pintado B, Gutiérrez-Adán A. Long-term effect of in vitro culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101 : 5880-5885. 2004.
- Firk R, Stamer E, Junge W, Krieter J. Automation of oestrus detection in dairy cows: a review. *Livest. Prod. Sci.*, 75: 219-232. 2002.
- 花田 章, 塩谷 康生, 鈴木 達行. 体外成熟卵子の体外受精により得られた牛胚の非外科的移植による受胎出産例. 第 78 回日本畜産学会大会講演要旨, 1986.
- 今井 敬, 大竹 正樹, 相川 芳雄, 松田 秀雄, 山之内 忠幸, 稲葉 泰志, 的場 理子, 杉村 智史, 橋谷田 豊. 卵胞波を調節した経膣採卵: 体外受精による効率的な胚生産. *日本胚移植学雑誌*, 36 : 109-114. 2014.
- 伊藤 一志, 横尾 正樹. 細胞培養基材, 培養容器, 及び細胞培養基材の製造方法. 特願 2012-165354, 2012.
- 伊藤 一志, 横尾 正樹. 血管内皮細胞のアクチン骨格に与えるカーボンナノチューブ複合材料の影響. *秋田県立大学ウェブジャーナル B*, 3 : 1-5. 2016.
- Lopes AS, Butler ST, Gilbert RO, Butler WR. Relationship of pre-ovulatory follicle size, estradiol concentrations and season to pregnancy outcome in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.*, 99: 34-43. 2007.
- Lopes AS, Madsen SE, Ramsing NB, Lovendahl P, Greve T, Callesen H. Investigation of respiration of individual bovine embryos produced in vivo and in vitro and correlation with viability following transfer. *Hum. Reprod.*, 22 : 558-566. 2007.
- López-Gatius F, Santolaria P, Mundet I, Yániz JL. Walking activity at estrus and subsequent fertility in dairy cows. *Theriogenology*, 63: 1419-1429. 2005.
- Moore DA, Overton MW, Chebel RC, Truscott ML, BonDurant RH. Evaluation of factors that affect embryonic loss in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 226: 1112-1118. 2005.
- Perry GA, Smith MF, Lucy MC, Green JA, Parks TE, MacNeil MD, Roberts AJ, Geary TW. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 5268-5273. 2005.
- Perry GA, Smith MF, Roberts AJ, MacNeil MD, Geary TW. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *J. Anim. Sci.*, 85: 684-689. 2007.
- Roelofs JB, van Eerdenburg FJ, Soede NM, Kemp B. Pedometer readings for estrous detection and as predictor for time of ovulation in dairy cattle. *Theriogenology*, 64 : 1690-1703. 2005.
- Sakaguchi M, Fujiki R, Yabuuchi K, Takahashi Y, Aoki M. Reliability of estrous detection in Holstein heifers using a radiotelemetric pedometer located on the neck or legs under different rearing conditions. *J. Reprod. Dev.*, 53: 819-828. 2007.
- 立原 昂平, 中岡 麻衣, 嵯峨 くらら, 伊藤 謙, 佐藤 勝祥, 横尾 正樹. 近赤外光照射がウシ凍結融解受精卵の生存性および品質に及ぼす影響. 第 68 回東北畜産学会大会講演要旨, 2018.
- Vasconcelos JL, Sartori R, Oliveira HN, Guenther JG, Wiltbank MC. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology*, 56: 307-314. 2001.
- 横尾 正樹, 田村 有希, 星 正人, 小池 晶琴, 野口 倫子. 黒毛和種繁殖牛における発情時の累積歩数と受胎性との関係. *東畜学会報*, 62 : 91-96. 2013.
- 横尾 正樹. 哺乳動物の胚処理方法及び胚. 特願 2015-024211, 2015.
- 横尾 正樹, 中村 彰太, 佐藤 寿春, 花倉 聡一. ウシ体外受精卵の初期発生能におよぼす近赤外光刺激の影響. 第 108 回日本繁殖生物学会大会講演要旨, 2015.
- 横尾 正樹, 伊藤 一志, 小林 正之. ウシ体外受精卵の共培養系におけるカーボンナノチューブ複合素材の有用性. *秋田県立大学ウェブジャーナル B*, 2 : 1-5. 2015.
- Yokoo M, Mori M. Near-infrared laser irradiation improves the development of mouse pre-implantation embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 487 : 415-418. 2017.
- 横尾 正樹, 伊藤 謙, 佐藤 勝祥, 伊藤 一志. カーボンナノチューブ複合材の細胞培養シートとしての特性評価. *秋田県立大学ウェブジャーナル B*, 5 : 187-192. 2018.