

ホルスタイン種泌乳牛からの雌胚作出方法の比較

中川 浩¹・中川邦昭^{1,a}・瀬田剛史^{1,b}・長井 誠^{2,c}・早川裕二²・
秋山 清^{3,d}・稲葉泰志^{4,e}・今井 敬^{5,f}・下司雅也^{4,g}

¹新潟県農業総合研究所畜産研究センター, 新潟県三条市 955-0143

²石川県農林総合研究センター畜産試験場, 石川県羽咋郡宝達志水町 929-1325

³神奈川県畜産技術センター, 神奈川県海老名市 243-0417

⁴独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所, 茨城県つくば市 305-0901

⁵独立行政法人家畜改良センター, 福島県西白河郡西郷村 961-8511

(2019. 1. 29 受付, 2019. 4. 12 受理)

要約 性選別精液または通常精液を用いた採胚を泌乳中のホルスタイン種で行い, 通常精液で得られた胚は LAMP 法で雌雄判別を実施した. 性選別精液で回収された雌胚数は 1.0 個, 通常精液で回収後, 雌と判別された胚数は 0.8 個となり有意差は認められなかった. また, FSH などによる卵胞刺激処理後に OPU し, 性選別精液を用いて体外受精を行う卵胞発育同調区 (FGT 区) と任意の発情周期に OPU し, 性選別精液で体外受精する対照区を設定し, 泌乳中ホルスタイン種で試験を実施した. OPU1 回あたりの雌胚発生数は FGT 区で 2.4 個となり, 対照区の 1.3 個よりも有意に多かった ($P < 0.05$). 通常精液で採胚, 胚回収後性判別する方法を対照とし, その他 3 つの雌胚作出方法について比較したところ, FGT 後 OPU により採取した卵子を性選別精液により体外受精する方法で有意に多くの雌胚が得られることが明らかとなった.

日本畜産学会報 90 (3), 213-218, 2019

キーワード: 採胚, 性選別精液, 生体内卵子吸引 (OPU), 体外受精 (IVF), FGT

これまでウシ胚をバイオブシーして PCR などにより遺伝子を検索することでウシ産子の雌雄産み分けを行ってきたが, 近年ウシ性選別精液を用いた人工授精技術が開発され, 約 90% の確率で望む性の産子が得られるようになってきており, 特に酪農家において産子の性を制御できる雌雄産み分け技術として期待され (湊 2008; 木村 2009) 利用が進んできている. しかし, 性選別精液は精液ストロー中の精子数が通常精液と比較して少ないことなどから, 特に経産牛において人工授精時の受胎率が低いという大きな問題が生じている (Andersson ら 2006; DeJarnette ら 2008; 早川 2012). このため, 多排卵処置を施した雌ウシに性選別精液を人工授精することで性判別胚の生産が試行されているものの, 移植可能胚の採取効率が低く (Hayakawa ら 2009; Peippo ら 2009; Larson ら 2010), 改善が望まれている. またホルスタイン種の採胚成績は一

般に泌乳牛よりも乾乳牛で良好であるが, 実際に酪農家で飼養されているホルスタイン種から採胚する場合の対象牛は泌乳中であることが多いため泌乳牛での採卵成績改善が望まれている. 一方, 超音波画像診断装置を用いて生体卵巣から卵子を採取する生体内吸引 (Ovum Pick-up; OPU) とそれに伴う体外受精 (*In Vitro* Fertilization; IVF) の技術が開発され, 従来までの子宮灌流法に代わる胚作出方法として開発が進められてきた (坂口ら 1995; 今井と田川 2006). さらに IVF を行うときに性選別精液を使用することで雌胚の作出効率向上が見込まれる. また, Imai ら (2007) はホルスタイン種乾乳牛において OPU によって卵胞波を調節し, FSH 投与による卵胞刺激を組み合わせた卵胞発育同調 (follicle growth treatment, 以下, FGT) を施した後に再度 OPU を行うことで卵子の品質及び胚発生成績が向上すると報告しているが, 泌乳中

現所属: ^a中川動物病院, 新潟県佐渡市 952-1209

^b個人開業動物病院, 千葉県流山市 270-2252

^c麻布大学獣医学部, 神奈川県相模原市 252-5201

^d神奈川県庁, 神奈川県横浜市 231-0021

^e独立行政法人家畜改良センター鳥取牧場, 鳥取県東伯郡琴浦町 689-2511

^f酪農学園大学農食環境学群, 北海道江別市 069-8501

^g国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門, 茨城県つくば市 305-0901

連絡者: 中川 浩 (fax: 0256-46-4865, e-mail: hnakagaw@ari.pref.niigata.jp)

のホルスタイン種にこの方法を取り入れた報告や、またこの方法で得られた卵子を性選別精液でIVF、胚生産を行った報告はほとんど無い。また性選別精液を用いた採卵とFGT後にOPU、性選別精液を用いてIVFを行った場合での胚生産効率を比較した報告はない。そこで我々は泌乳中のホルスタイン種について子宮灌流による雌胚作出方法2種と、特別な処置をせずにOPU、あるいはFGT処理後にOPUを行い、採取した卵子と性選別精液でIVFする方法を試み、実用性に優れた性判別胚生産法を開発することを目的にこれらの雌胚生産効率について比較検討した。

材料および方法

1. 供試牛

試験1においては、新潟県内の一酪農家飼養のホルスタイン種泌乳牛10頭および神奈川県畜産技術センター飼養のホルスタイン種泌乳牛4頭の計14頭を供試した。また、試験2においては、新潟県農業総合研究所畜産研究センター、石川県農林総合研究センター畜産試験場、神奈川県畜産技術センター、国立研究開発法人農研機構畜産草地研究所で飼養するホルスタイン種泌乳牛計41頭を供試した。

なお、本研究におけるすべての実験動物は各機関における動物実験実施に関する規程に基づき実施した。

2. 試験1 性選別精液を用いた採卵と、通常精液での採卵後に胚を性判別する方法の比較

性選別精液を用いた採卵と通常精液を用いた採卵を30日以上の間隔で反転して実施した。多排卵処置は任意の発情周期に腔内留置型黄体ホルモン製剤（以下、CIDR、シダー1900；ゾエティス・ジャパン、東京）を挿入（Day0）し、Day1で安息香酸エストラジオール（以下EB、動物用オバホルモン注；あすかアニマルヘルス、東京）を2mg筋肉内投与、Day5から卵胞刺激ホルモン（以下、FSH、follicle stimulating hormone、アントリンR・10；共立製薬、東京）計36AUを1日2回、4日間かけて筋肉内

に漸減投与、Day7の午前中にプロスタグランジンF_{2α}（以下、PGF_{2α}；ダルマジン、共立製薬）0.225mgを筋肉内投与して、CIDRを抜去した。Day9の夕方に性選別精液（採卵1本）または通常精液1本にて1回人工授精を実施してDay16で胚を回収した。性選別精液で採卵を行った区を試験区、通常精液で採卵を行った区を対照区とした。通常精液で採卵、回収した胚はバイオブシーし、牛胚性判別試薬キット（栄研化学、栃木）を用いてLAMP（Loop-mediated Isothermal Amplification）法により雌雄判別を行った（図1）。

3. 試験2 FGT処理（主席卵胞除去、卵胞刺激）後にOPU、性選別精液でIVFを実施する方法と、従来法のOPU後に性選別精液でIVFを実施する方法の比較

それぞれの供試牛には以下に示す処理を反復して実施した。試験区（FGT区）においては、OPUを実施する前にFGTを行うこととした。FGTは今井ら（2014）の方法により行った。すなわち、任意の発情周期に直径3mm以上の全卵胞を吸引（0日目）し、5日目で直径8mm以上の全卵胞を除去してCIDRを挿入、7日目から4日間かけてFSH（朝夕8回、合計30AU）を漸減投与、9日目の午前中にPGF_{2α} 0.225mgを投与、11日目の朝にCIDR抜去し、直径5mm以上の全卵胞についてOPUを実施した（図2）。

対照区は発情期を除く任意の発情周期に直径3mm以上の全卵胞についてOPUを実施した。OPUは今井と田川（2006）の方法に準じて行った。すなわち、供試牛に2%塩酸プロカイン溶液（キシロカイン注射液「2%」、アストラゼネカ、大阪）で尾椎硬膜外麻酔を行った後、超音波画像診断装置（SSD1000V；アロカ、東京）に装着したプローブを外陰部から腔内に挿入し、卵巣中の卵胞を採卵針（COVA Needle；ミサワ医科工業、東京）で穿刺し、卵胞卵採取用吸引器（FV-4；富士平工業、東京）を用いて100~120mmHgの吸引圧で50mL遠沈管に卵胞液を吸引採取した。遠沈管は卵胞卵採取用恒温器（FV-5；

日	9:00	16:50
0	CIDR挿入	
1	EB 2mg	
5	FSH 6AU	FSH 6AU
6	FSH 5AU	FSH 5AU
7	FSH 4AU, PGF _{2α} 0.225mg, CIDR抜去	FSH 4AU
8	FSH 3AU	FSH 3AU
9		AI（通常精液または性選別精液）
16	採卵	

図1 採卵時のホルモン等処置
 CIDR：腔内留置型黄体ホルモン製剤
 EB：安息香酸エストラジオール製剤
 FSH：卵胞刺激ホルモン製剤
 PGF_{2α}：プロスタグランジンF_{2α}製剤

雌胚作出方法の比較

富士平工業, 東京) で 38.5℃ に保温した. 吸引溶液は 1% 新生子ウシ血清 (new born calf serum, 以下 NBCS ; biowest, Nuaille, France) と 10IU/mL ヘパリン (ヘパリンナトリウム注; 味の素製薬, 東京) を添加した乳酸加リンゲル液 (ハルゼン-V 注射液; 日本全薬, 東京) を用いた. OPU 終了後, 回収液を実験室内に搬入し, メッシュ付きシャーレ (セルコレクター; 富士平工業, 東京) 内で洗浄, 濾過を行い, 38.5℃ 加温下で鏡検により卵子を回収した. 卵子は, Gordon (2003) の方法を参考に A ランク: 卵丘細胞 3 層以上, B ランク: 卵丘細胞 3 層未満または透明体周囲に 1/3 以上付着している卵子, C ランク: 完全な裸化卵子または B より卵丘細胞の付着が少ない卵子, D ランク: 卵丘細胞が膨化しているか蜘蛛の巣状に変性しているもの, E ランク: 直径が明らかに小さい卵子, F: 変性卵子または透明体のみとした.

回収した卵子は 0.02 AU/ml FSH および 5% NBCS 添加 TCM199 (Medium 199 ; Thermo Fisher Scientific K.K., MA, USA) を成熟培地に用い, 38.5℃, 5% CO₂, 95% 空気, 湿度飽和の気相条件で 22 時間成熟培養を行った.

体外受精 (IVF) は Matoba ら (2014) の方法に従って行った. すなわち, 精子処理として凍結保存されたホルスタイン種の性選別精液 (ジェネティクス北海道, 北海道) を融解後, 45% および 60% のパーコール (Percoll ; SIGMA-ALDRICH, st. Louis, MO, USA) 密度勾配液に重層して遠心分離 (740×g, 10 分間) し, 上澄みを除去した後, 媒精液 (牛体外受精用媒精液 IVF100 ; 機能性ペプチド研究所, 山形) を加えて再度遠心分離 (540×g, 5 分間) した. その後, 最終精子濃度を 5×10⁶/mL に調整し, 媒精液精子ドロップを作成した. 成熟培養を終えた卵子は媒精液で洗浄後, 精子ドロップに導入し, 38.5℃, 5% CO₂, 95% 空気, 湿度飽和の条件で 6 時間媒精した. 媒精終了後にピペティングにより卵子を裸化し, 5% NBCS, 0.25 mg/mL リノール酸アルブミン (Linoleic Acid-Albumin from bovine serum albumin, SIGMA-ALDRICH) 添加 CR1aa (Imai ら 2002) を用い, 38.5℃,

日	9 : 00	16 : 50
0	全卵胞吸引	
5	主席卵胞除去, CIDR 挿入	
7	FSH 6 AU	FSH 6 AU
8	FSH 4 AU	FSH 4 AU
9	FSH 3 AU, PGF _{2α} 0.225 mg	FSH 3 AU
10	FSH 2 AU	FSH 2 AU
11	CIDR 抜去, OPU	

図 2 FGT 区のホルモン等処理
CIDR : 腔内留置型黄体ホルモン製剤
FSH : 卵胞刺激ホルモン製剤
PGF_{2α} : プロスタグランジン F_{2α} 製剤

5%CO₂, 5%O₂, 90%N₂, 湿度飽和の条件で 9 日間培養を行った. 培養開始 48 時間後に卵割の状況, 7~9 日目に胚盤胞期胚への発生状況を確認した. 胚盤胞期胚の品質は家畜人工授精講習会テキスト (家畜受精卵移植編) (社団法人家畜人工授精師協会 1996) に準じて評価した.

4. 統計処理

データはすべて平均値±標準誤差で示した. 採胚成績については Wilcoxon の順位和検定または t 検定を行った. 試験 1 および 2 の胚作出方法の比較には Dunnett の方法により多重検定を実施した. なお, 正常胚率などは予め角変換を行った後に検定を行った. 危険率 5% 未満 (P < 0.05) を有意差ありとした.

結 果

1. 試験 1

採胚時の推定黄体数, 回収卵数, 正常胚数, 未受精卵数, 変性卵数, 雌胚数を表 1 に示す. 性選別精液または通常精液を用いて採胚した結果, 回収卵数はそれぞれ 6.2 個, 9.4 個, 正常胚数はそれぞれ 1.1 個, 3.3 個となりいずれも有意な差は認められなかった. 回収卵数に占める正常胚数の割合は通常精液で 27.7% であったが, 性選別精液を用いた試験区では 17.2% であった. 未受精卵数, 変性卵数については割合とも試験区, 対照区で有意な差は認められなかった. 最終的に性選別精液で得られた雌胚数は 1.0 個, 通常精液を用いて採胚後, LAMP 法により雌と判別された対照区の雌胚数は 0.8 個となり有意な差は認められなかったが, 回収された正常胚に占める割合はそれぞれ 87.8%, 34.8% となり, 性選別精液を用いた場合で有意に高い値 (P < 0.05) となった (表 1). なお, 性選別精液で得られた正常胚数のうち 90% を雌胚数とし, 試験 2 も同様に扱った.

表 1 性選別精液または通常精液を用いた採胚成績の比較

試験区	性選別精液区	通常精液区
頭数	頭	14
推定黄体数 A	個	14
回収卵数 B	個	8.1 ± 1.4
(B/A%)	%	10.9 ± 2.1
正常胚数 C	個	6.2 ± 1.6
(C/B%)	%	9.4 ± 2.6
未受精卵数 D	個	68.8 ± 8.4
(D/B%)	%	69.6 ± 10.5
変性卵数 E	個	1.1 ± 0.6†
(E/B%)	%	3.3 ± 1.1†
雌胚数 F	個	17.2 ± 7.7
(F/B%)	%	27.7 ± 9.4
	個	3.6 ± 1.2
	%	3.9 ± 1.3
	%	60.2 ± 10.4
	%	54.4 ± 11.7
	個	1.5 ± 0.6
	%	2.2 ± 1.5
	%	22.6 ± 9.1
	%	17.8 ± 8.1
	個	1.0 ± 0.5
	%	0.8 ± 0.3
	%	14.8 ± 6.6
	%	9.1 ± 4.4
	%	87.8 ± 1.3a
	%	34.8 ± 9.1b

異符号間に有意差有り a, b (P < 0.05) † (P < 0.1) 平均値 ± 標準誤差

2. 試験2

OPU時の卵胞数を表2に示す。FGT区において直径8mm以上の卵胞数は18.2個、対照区では2.0個となり、FGT区で有意に多く存在していた ($P < 0.01$)。一方、直径5mm未満の小卵胞数はFGT区で少なく、対照区で有意に多かった ($P < 0.01$)。卵胞の総数を比較したところ、FGT区が対照区に比べて有意に多かった ($P < 0.05$)。

OPUによって採取された卵子数も表2に示す。採取した卵子のうち、正常卵子と判断されるA、Bランク卵子数は、FGT区でそれぞれ7.5個、3.6個であったが、対照区では3.3個、3.5個であり、Aランク卵子数はFGT区で有意に多かった ($P < 0.01$)。しかし、採取された卵子の合計数はFGT区で13.2個、対照区で10.7個となり、有意な差は認められなかった。

体外受精卵の培養結果を表3に示す。FGT区において回収された卵子のうち成熟培養に供した卵子の割合は90.5%となり、対照区の77.0%よりも有意に高い値であった ($P < 0.01$)。FGT区で作出された胚はAランク胚数が1.2個、Bランク胚が0.7個となり、Cランク胚と合わせて発生した合計胚数は2.7個となり、対照区の1.4個よりも有意に多かった ($P < 0.05$)。また、発生率も有意に高かった ($P < 0.05$)。さらに、FGT区で作出された雌胚2.4個は対照区の1.3個よりも有意に多く ($P < 0.05$)、また発生率もFGT区で有意に高かった ($P < 0.05$)。

試験1および試験2の結果から得られた雌胚数を比較したところ、表4のようになった。試験1の試験区は1.0個、対照区は0.8個となったが、試験2の試験区では2.4個、対照区では1.3個作出することができた。これら4種

表3 体外受精卵の培養結果

試験区	FGT区	対照区
頭数	頭 33	37
培養卵子	個 12.2 ± 1.7	8.1 ± 1.0
培養卵子	% $90.5 \pm 2.6A$	$77.0 \pm 3.7B$
IVF 48時間後の分割	個 8.5 ± 1.3	5.8 ± 0.8
IVF 48時間後の分割	% 67.0 ± 5.2	60.2 ± 6.1
ランク別作出胚数		
Aランク	個 1.2 ± 0.3	0.6 ± 0.2
Bランク	個 0.7 ± 0.2	0.3 ± 0.1
Cランク	個 0.8 ± 0.2	0.5 ± 0.1
合計	個 $2.7 \pm 0.5a$	$1.4 \pm 0.3b$
合計	% $25.8 \pm 4.6a$	$13.4 \pm 2.7b$
推定雌胚	個 $2.4 \pm 0.4a$	$1.3 \pm 0.3b$
推定雌胚	% $23.3 \pm 4.2a$	$12.1 \pm 2.4b$
移植可能胚	個 1.9 ± 0.4	0.9 ± 0.2
移植可能胚	% 17.2 ± 3.7	8.6 ± 2.1

異符号間に有意差有り A, B ($P < 0.01$), a, b ($P < 0.05$)
 平均値 ± 標準誤差

作出胚のランク

Aランク：正常な発育ステージで、輪郭が明瞭、色調も正常で、ほとんど変性部位の無いもの。ただしほぼ正常な形態を示すが、一部に突出した細胞あるいは不均整が見られるもの。変性部位が10%以下のものを含む。
 Bランク：正常な発育ステージで、突出した細胞あるいは不均整がやや目立つもの。変性部位は10~30%
 Cランク：胚の細胞に不均整なものや変性細胞が目立つもの。変性部位は30~50%。また、発育がやや遅れているものも含める。

表2 卵子採取成績

試験区	FGT区	対照区
頭数	33	37
OPU時の卵胞数		
直径8mm以上	$18.2 \pm 2.4A$	$2.0 \pm 0.2B$
直径5mm以上-8mm未満	4.2 ± 0.7	2.6 ± 0.4
直径5mm未満	$2.6 \pm 0.5B$	$12.6 \pm 1.6A$
合計	$24.9 \pm 2.6a$	$17.2 \pm 1.7b$
吸引卵胞	$22.4 \pm 2.5A$	$4.6 \pm 0.5B$
吸引した卵子数 (ランク別)		
A：卵丘細胞が3層以上付着	$7.5 \pm 1.2A$	$3.3 \pm 0.5B$
B：卵丘細胞が3層未満または透明体周囲に1/3以上付着	3.6 ± 0.7	3.5 ± 0.6
C：裸化卵子またはBより卵丘細胞が少ない卵子	1.0 ± 0.3	1.3 ± 0.3
D：膨化した卵丘細胞付着	0.3 ± 0.1	0.8 ± 0.2
E：直径が明らかに小さい卵子	0.2 ± 0.1	0.4 ± 0.2
F：変性卵子または透明体のみ	$0.5 \pm 0.1B$	$1.4 \pm 0.3A$
合計	13.2 ± 1.8	10.7 ± 1.3
採取率 (%)	53.0 ± 4.0	62.2 ± 4.9

異符号間に有意差有り A, B ($P < 0.01$), a, b ($P < 0.05$)
 平均値 ± 標準誤差

雌胚作出方法の比較

表 4 雌胚作出効率の比較

試験区	試験 1 (採胚)		試験 2 (OPU)	
	性選別精液 (試験) 区	通常精液 (対照) 区	FGT (試験) 区	無処理 (対照) 区
頭数	14	14	33	37
雌胚数	1.0 ± 0.5	0.8 ± 0.3b	2.4 ± 0.4a	1.3 ± 0.3

ab : $P < 0.05$

平均値 ± 標準誤差

の方法から作出される雌胚数について分散分析を行ったところ、有意な差のあることが判明し ($P < 0.05$)、通常精液を用いて採胚、性判別した場合を対照として Dunnett の多重検定を行ったところ FGT-OPU によって最も多くの雌胚を作出できることが明らかとなった ($P < 0.05$)。

考 察

雌性選別精液を用いた採胚の場合、回収出来た胚の 90% が雌となるが、正常胚率が低いために雌胚の採胚効率は思うように向上しない。堀川ら (2012)、Peippo ら (2009)、Mikkola と Taponen (2017) も性選別精液を用いることで正常胚率が低下するとしている。これらの報告によれば通常精液の採胚で正常胚率は 63~100%、選別精液で 33~48% と性選別精液の採胚で得られる正常胚率は通常精液の場合の約半分である。本実験では通常精液の採胚で正常胚率は約 28% だったが、性選別精液の場合は約 17% とかなり低い値であった。性選別精液はフローサイトメーターによる性選別の時点でダメージを受けるため、運動性が劣るとされており (Blondin ら 2009)、また採胚前の人工授精時、通常精液と比較して注入精子数がしばしば少ないことから、回収される胚の正常胚率が低下すると考えられる。また、前述の研究者らはいずれも採胚前の人工授精を 2 回以上の複数回実施していたが、我々の場合は 1 回のみであった。Hayakawa ら (2009) は人工授精回数を 1 回から 2 回に変更することで移植可能胚の割合が 8.5% から 40% 以上に向上すると報告していることから、今回の試験で人工授精を複数回行っていけば性選別精液であっても 40% 以上の正常胚を獲得することができた可能性がある。

OPU を実施する場合、卵子を採取する卵胞の大きさが IVF 後の胚発生に影響すること (Loneragan ら 1994)、また、OPU 前に FSH を投与し、卵胞に刺激を与えることで回収された卵子の発生能を向上させるとの報告 (Blondin ら 2002) から、今井らは主席卵胞除去と卵胞刺激を組み合わせる前処理 (FGT) した後、OPU を実施する方法を開発した (Imai ら 2007; 今井ら 2014)。その方法に準じて今回の試験を実施したところ、FGT 区では対照区に比べて平均 16 個も多くの大卵胞が形成されたことから、OPU による卵子の吸引は容易となり、A ランク卵子数は有意に増加した。また、回収された卵子のうち成熟培養が

可能な卵子の割合は FGT 区で有意に高く、体外受精後の卵割率も FGT 区で高い傾向にあり、我々の試験結果は今井らの報告を支持するものとなった。しかし、最終的な胚盤胞期への発生率は Imai ら (2007) によると FGT 区で 68.1% (対照区 24.2%) という非常に高い値を示していたものの、我々の試験結果では FGT 区で 22.2% (対照区 13.4%) と比較的低率にとどまった。

今井ら (2014) は FGT 区と対照区の胚盤胞への発生率の違いを解明するため、受精状況と初期卵割の時間を検討したところ、FGT 区では単精子侵入率が高いこと、第一卵割で正常な 2 細胞期に分裂する卵の割合が高いこと、および第 3 卵割を終了するまでの時間が短いことが明らかになったとしている。我々の試験ではこのような詳細なデータを取ってはいなかったため、詳しい考察はできないものの、通常精液よりも活力の低下している性選別精液を用いていたこと、また試験に供したのは泌乳中のホルスタイン種であり、泌乳によってエネルギーバランスが負の状態になりやすく、採取された卵子のうち良好な品質のものが少なかったため、FGT 法であるにもかかわらず胚盤胞への発生率は大きく改善されるまでには至らなかったものと推察される。しかし、泌乳中のホルスタイン種に対し、何ら特別なホルモン処置などを実施していない従来の OPU と性選別精液を用いた IVF で雌胚を作出する場合と比較して、FGT 区では有意に多くの雌胚を作出することが可能であることが確認された。また我々がホルスタイン種泌乳牛に対して行った 4 種の雌胚作出法、すなわち通常精液を用いて子宮灌流法により採取した胚を性判別する方法、性選別精液を用いて子宮灌流法により雌胚を採取する方法、任意の発情周期に OPU を行い、性選別精液を用いて体外受精する方法、FGT 処置を施したのちに OPU を行い、性選別精液を用いて体外受精する方法について比較したところ、FGT 処理後に OPU を行う方法が最も効果的であることが確認された。このことから今後の酪農場においてこの方法が泌乳中のホルスタイン種からの後継牛生産に活用できるものと推察する。

謝 辞

本研究の実施にあたり、各研究機関の職員諸氏、採胚試験に協力いただいた酪農家の方々また、性選別精液の使用に当たってご協力いただいた一般社団法人ジェネティ

クス北海道に対し深く感謝いたします。なお、本研究の一部は、「新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業(22016)」の助成により実施した。

文 献

- Andersson M, Taponen J, Kommeri M, Dahlbom M. 2006. Pregnancy rates in lactating Holstein-Friesian cows after artificial insemination with sexed sperm. *Reproduction in Domestic Animals* **41**, 95-97.
- Blondin P, Beaulieu M, Fournier V, Morin N, Crawford L, Madan P, King WA. 2009. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. *Theriogenology* **71**, 30-38.
- Blondin P, Bousquet D, Twagiramungu H, Barnes F, Sirard MA. 2002. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biology of Reproduction* **66**, 38-43.
- DeJarnette JM, Nebel RL, Marshall CE, Moreno JF, McCleary CR, Lenz RW. 2008. Effect of sex-sorted sperm dosage on conception rates in Holstein heifers and lactating cows. *Journal of Dairy Science* **91**, 1778-1785.
- Gordon, Ian R. 2003. *Laboratory Production of Cattle Embryos* 2nd edn. pp. 383-386. CABI Publishing, UK.
- 早川宏之. 2012. ウシにおける精子性選別技術の進展. 日本哺乳動物卵子学会誌 **29** (3), 119-123.
- Hayakawa H, Hirai T, Takimoto A, Ideta A, Aoyagi Y. 2009. Superovulation and embryo transfer in Holstein cattle using sexed sperm. *Theriogenology* **71**, 68-73.
- 堀川明彦, 小林崇之, 近藤守人. 2012. 雌雄選別精液の子宮核心部注入が過剰排卵処置したホルスタイン種経産牛の採卵成績に及ぼす影響. 福井県畜産試験場研究報告 **25**, 1-5.
- Imai K, Inaba Y, Yoshioka H, Aikawa Y, Ohtake M, Suzuki M, Kobayashi S. 2007. Effect of follicular wave synchronization and superstimulation on *in vitro* embryo production. *Reproduction, Fertility and Development* **20**, 182-182.
- Imai K, Matoba S, Dochi O, and Shimohira I. 2002. Different factors affect developmental competence and cryotolerance in *in vitro* produced bovine embryo. *Journal of Veterinary Medical Science* **64**, 887-891.
- 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. 2014. 卵胞波を調節した経腔採卵一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.
- 今井 敬, 田川真人. 2006. OPU-IVFによるウシ胚の作出, その効率と汎用性. 日本胚移植学雑誌 **28**, 29-35.
- 木村博久. 2009. 牛XY選別精液の生産とその課題. 家畜人工授精 **251**, 1-16.
- Larson JE, Lamb GC, Funnell BJ, Bird S, Martins A, Rodgers JC. 2010. Embryo production in superovulated Angus cows inseminated four times with sexed-sorted or conventional, frozen-thawed semen. *Theriogenology* **73**, 698-703.
- Loneragan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP, Gordon I. 1994. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development* **37**, 48-53.
- Matoba S, Yoshioka H, Matsuda H, Sugimura S, Aikawa Y, Ohtake M, Hashiyada Y, Seta T, Nakagawa K, Loneragan P, Imai K. 2014. Optimizing production of *in vivo*-matured oocytes from superstimulated Holstein cows for *in vitro* production of embryos using X-sorted sperm. *Journal of Dairy Science* **97**, 743-753.
- Mikkola M, Taponen J. 2017. Quality and developmental rate of embryos produced with sex-sorted and conventional semen from superovulated dairy cattle. *Theriogenology* **87**, 135-140.
- 湊 芳明. 2008. 牛の雌雄産み分け用の選別精液の生産技術とその実用性. 家畜人工授精 **245**, 21-34.
- Peippo J, Vartia K, Kananen-Anttila K, Rätty M, Korhonen K, Hurme T, Myllymäki H, Sairanen A, Mäki-Tanila A. 2009. Embryo production from superovulated Holstein-Friesian dairy heifers and cows after insemination with frozen-thawed sex-sorted X spermatozoa or unsorted semen. *Animal Reproduction Science* **111**, 80-92.
- 坂口慎一, 井口光国, 小林直彦, 藤谷泰裕, 三溝成樹, 内海恭三. 1995. 超音波診断装置を利用した繁殖不適和牛からの連続経腔採卵. 日本胚移植学雑誌 **17**, 94-101.
- 日本家畜人工授精師協会. 1996. 家畜人工授精講習会テキスト(家畜受精卵移植編), pp. 172-173. 社団法人日本家畜人工授精師協会, 東京.