

学 位 論 文 の 要 旨

論文題目 生殖工学技術によるウシの効率的生産に関する研究

広島大学大学院生物圏科学研究科

生物資源科学専攻

学生番号 D074507

氏 名 尾 形 康 弘

ウシはヒトと同じ単胎動物であり、280～285 日の妊娠期間で 1 頭の子牛を生産する。そのため短期間での増頭や育種改良の実現は困難である。広島県の畜産業が現在置かれている、生産農家数、飼養頭数ともに減少した状況の中で、遺伝的多様性を維持しながら育種改良を行い、ブランド化を図るためには、新たな技術を導入するとともに、育種改良のために必要な期間の短縮と確実な遺伝的改良を行う必要がある。これまでの黒毛和種からの産子生産に加えて、受精胚移植技術を活用してホルスタイン種を借り腹とした、新たな繁殖システムの構築が欠かせない。そのためには、ホルスタイン種の安定的後継牛確保が必要となる。つまり、借り腹となるホルスタイン種の雌ウシの効率的な生産が重要なポイントとなる。そのために利用する技術が、経膈採卵技術と体外受精技術および体外胚操作技術を活用した性判別（遺伝子診断）である。通常、ホルスタイン種から受精胚を得るためには、体内受精胚生産技術を用いることが多い。しかしながら、この方法を泌乳中のウシに実施しようとするれば、採卵のために空胎期間が長くなることや、泌乳期間の短縮による泌乳量の減少が避けられない。酪農家は生乳生産による収入が大部分を占めること、また、自分の経営条件に適合した能力、血統の後継牛を計画的に確保しようとしているため、このようなウシの利用方法は現実的ではない。そこで、人工授精等の繁殖計画を休止している分娩後の生理的空胎期間（分娩後 40～80 日）を利用して受精胚生産が実施できれば、酪農経営に悪影響を与えることなく、酪農家の望むウシからの受精胚の確保が可能となる。この技術が構築されれば、乳生産を休むことなく後継牛が生産可能となり、経営の中で黒毛和種の受精胚移植用の借り腹ウシの確保ができる。その借り腹ウシに、黒毛和種の受精胚移植を行うことで酪農家から黒毛和種の素牛生産ができるため、高齢化等によって戸数が減少した和牛繁殖農家の生産能力を代替することが可能となる。ホルスタイン種を借り腹とした新たな酪農経営を実現することで、酪農経営の基盤安定化と同時に広島牛（黒毛和種）の短期間での育種改良を進め、新たなブランド化に向けた育種戦略を計画することができると考えられる（第 1 章、緒論）。

第 2 章では、性腺刺激ホルモン放出ホルモン（Gonadotropin Releasing Hormone; GnRH）の卵泡波新生作用を利用し、ウシ経膈採卵時に数多くの卵を採取することを目的として研究を実施した。これまで研究が行われている優勢卵泡の人為的除去や卵泡刺激ホルモン（Follicle Stimulating Hormone; FSH）等の処置とは異なる新たな簡易法で実施可能な GnRH による卵泡波の新生を試みた。発情周期に関係なく任意の時期に卵泡波の新生を誘起させるため、酢酸フェルチレリン等の GnRH アナログ製剤を投与して、卵巢内卵泡数の推移、卵採取数や品質の検討を行った。GnRH 投与直後の 0 時間から 24 時間間隔で 72 時間目まで、卵巢内の卵泡動態の観察を超音波画像診断装置を用いて行った。また、モニター上で観察できる卵泡数が最も多くなる、GnRH 投与後 48 時間目に経膈採卵を実施し、採取される卵丘細胞卵子複合体（Cumulus-Oocyte Complexes; COCs）やその品質についても検査を行った。また、2 種類の GnRH 製剤であるブセレリンとフェルチレリンを用いて経膈採卵に利用する場合の有効性について比較検討を行った。その結果、GnRH 投与時期については、GnRH 投与後 48 時間での経膈採卵の実

施が最も効果的であること、フェルチレリンおよびブセレリン製剤ともに、卵巣内の卵胞径が無処置のものより高い値を示すこと、両製剤間での大きな効果差は見受けられず、どちらも有効性が高いことが明らかにされた。

第3章では、マイクロマニピュレーター等の機器を使用せず、ウシ受精卵から性判別（遺伝子診断）用の試料をサンプリングする方法の開発を行った。本研究において新規に開発した細胞剥離法は、実体顕微鏡と細く伸ばしたガラス管で桑実期胚から遺伝子診断用サンプル細胞を採取するもので、これまで有効性が高いと考えられている割球吸引法と同様に、細胞への物理的障害を最小限にすることが可能である。本研究では、細胞剥離法と従来のブレード切断法でサンプリング後の胚の生存性、受胎性などの比較を行い、その有効性について検討を行った。その結果、細胞剥離法では、受精卵からのサンプル細胞採取は2個程度と少ない数で採取個数を調節することが可能なこと、細胞剥離によって受精卵の生存性は低下は見られないこと、修復培養48時間後の胚盤胞期胚の総細胞数は、細胞剥離法がブレード切断法よりも高い数値を示すこと、受胎性（受精卵移植比較試験）についても無処置胚と同程度の能力を有することが明らかにされた。

第4章では、年間に生産可能な子牛数を増加させるため、生理的空胎期間を利用して経膈採卵・体外受精卵生産が可能かどうかを検討するために、分娩後40～80日までの泌乳最盛期のホルスタイン種に、第2章で有効性が明らかにされたGnRHを経膈採卵48時間前に投与し、採取した卵を用いて体外受精卵生産を試みた。GnRH投与によって経膈採卵・体外受精で胚盤胞期胚の作出を行い、その胚の受胎性に問題がないかどうかの確認を行った。また、複数回の経膈採卵実施後に、人工授精を実施して、その後の繁殖性（受胎性）に及ぼす影響についても検討した。その結果、分娩後40～80日の生理的空胎期間での経膈採卵は、GnRH投与を行うことで経膈採卵が可能な卵胞数、採取される卵数およびその品質も高くなり、体外受精により作出される胚盤胞期胚数も無処置より1.7倍以上高くなることが確認され、生理的空胎期間であっても、GnRH投与によって、効率的な受精卵の生産が行えることが明らかにされた。また、GnRH投与によって作出された胚盤胞期胚の受胎率も無処置で作出した受精卵と同様に受胎性には問題がないことが確認された。また、経膈採卵後の人工授精についても通常の人工授精のみのウシと比較した場合、受胎に要する日数、受胎性ともに差は見られず、経膈採卵によって、その後の繁殖性に与える影響は見られないことが明らかにされた。

本研究のように、生殖工学的技術を組み合わせて実際の畜産経営に導入できる様に技術構築した例は、これまでほとんどない。本研究で構築した技術によって、生乳生産のためにホルスタイン種を繁殖する酪農経営において、雌ウシ後継牛生産が計画的に実施可能となり、余剰に生産された後継牛に黒毛和種の受精卵を移植することで、黒毛和種の生産を組み込んで、新たな酪農経営へと発展させることができると考えられる。本研究で明らかにした技術は、酪農経営の経営基盤の安定と、短期間での黒毛和種生産基盤の確保と育種改良の進展に対して、大きな足がかりになると考えられる。これら開発した技術を広島県で展開することにより、日本で初めての新たな畜産経営方式が確立できると考えられる（第5章、総合考察）。