

일본에 있어서 최근 소 수정란이식 관련 정보와 수태율 향상 대책에 관하여

Aoyagi Yoshito 박사
JA 全農 ET 센터 소장

일본에 있어서 최근 소 수정란이식 관련 정보와 수태율 향상 대책에 관하여

Aoyagi Yoshito 박사
JA 全農 ET 센터 소장

1. 서 론

일본에 있어서 최근의 소수정란이식 기술과 관련된 현황과 수정란이식에 의한 수태율 향상 대책에 관하여 소개하고자 한다.

2. 일본에 있어서 소 수정란이식 관련 정보

1) 흑모화우 번식기반의 감소 부분에 대한 보완 · 생산자의 수익의 증가를 목적으로 육우 특히 흑모화우 수정란의 이용은 일본에서 확대하는 경향을 보이고 있다(2002년 : 일본내에서 약 63,000두 실시: 체내수정란 55,000개, 체외수정란 8,000개). 본 센터의 흑모화우를 중심으로 수정란 공급 실적은 1999년도 1,784개, 2000년도 3,649개, 2001년도 4,750개, 2002년도 5,480개, 2003년도 6,280개, 2004년도 7,250개, 2005년도 8,450개, 2006년도 10,000개의 계획과 생산자의 니즈의 확대와 함께 증가 경향을 나타내고 있다. 본 센터 내에서 ET 실시두수도 2004년도는 2,070두에서 그 수태율은 임신일령 60일에서 70.0%이었다. 또 ET를 활용한 화우 육성우 생산사업이 각지의 JA에서 결성되었다.

2) 젖소 수정란은 유럽에서는 보급되고 있으나, 일본에서 판매망은 극히 작게 나타나고 있다. 그럼에도 불구하고 일본에서도 2003년 8월에 인터불(iInter bull, 국제유우유전평가기관)로부터 유우의 국제간 비교 가능한 유전적 평가가 공표되었으며, 이 후 유우 수정란도 국제유통이 활발하게 될 것으로 예상되었다. 이에 따라 기술개발이 필수적이거나 국내의 낙농농가로부터 암소 판별 후 유우 동결수정란 및 그 임신우의 공급에 대하여 희망농가가 많아지게 되었다.

3) 핵이식에 의한 복제기술 개발에 있어서 북미 · EU의 벤처기업을 중심으로 특허개발 경쟁이 이루어지고 있다. 장래에 우량한 종축의 증식기술로서 또 더욱 유전자공학과 연동하여 축산에 있어서 유용한 유전자 기능을 증명하기 위한 개발과 의학분야와 연계한 연구가 진행중이다.

3. 일본에 있어서 소 수정란이식과 관련 연구의 현황

1) 수정란이식 관련 가격이 낮아지기 때문에 현장에서 수태율의 향상과 안정되게 기여할 수 있는 기술개발, 또 소 과배란에 있어서 정상수정란의 생산성을 높이는 기술개발이 중요하다.

(1) 수정란이식에 의한 수태율 향상에 관한 과제

① 수란우의 황체기능 증강 방법의 확립

수정란 이식시 hCG와 GnRH 제재를 이용하여 제1파의 지배난포의 배란, 황체화시켜 주황체와 함께 황체기능을 충실하게 할 수 있게 되었으나, 보다 수태율 향상에 연결하여 효과적인 투여방법의 검토가 비유우에 있어서 더욱 필요하다.

② 수란우의 효율적인 발정동기화 방법의 확립

특히 유우 경산우의 발정징후는 불명료한 것이 많아, 발정동기화하여 수정란이식이 효율적으로 실시할 수 있는 방법의 개발이 필요하며, 질내 유치형 황체호르몬 제재(CIDR나 PRID)와 PG 제재를 병용하여 동기화하면, 인공수정(노화한 난자가 배란될 가능성도 있음)보다도 수정란이식(노화한 난자가 배란하더라도 충실한 황체형성이 되면 수정란이식이 가능함)으로 보다 유효한 결과도 얻을 수 있어, 앞으로 널리 검토가 필요하다.

③ 수란우의 사료급여 면에 있어서 개선되어야 할 사항

에너지 부족으로부터 단백질 과잉급여, 특히 위내에 있어서 용해성 단백질과 암모니아의 과잉상태는 수정란이식의 수태율을 대폭적으로 저하시킬 가능성이 본 센터의 결과에서도 시사되었으며, 암모니아가 수정란에 미치는 독성에 관하여 검토 또는 BUN(혈중 요소태 질소)와 MUN(유중 요소태 질소)와 자궁내 암모니아 농도 등에 대한 관련성에 대하여 더불어 검토가 금후에 필요하며, 최종적으로 수태율 향상을 위해서는 현장에서 사양관리 개선책과 연관지어 생각하지 않으면 안된다.

(2) 공란우의 정상 수정란 회수를 위한 과제

① 공란우의 사양관리면에서 개선하여야 할 사항

상기한 수란우와 같이 같은 형태의 용해성 단백질과 암모니아의 과잉급여는 공란우의 정상 수정란 회수율을 저하시킬 가능성이 있으며, 난소내 소난포액 내에는 높은 농도에서 암모니아가 축적되어 있다고 알려져 있다. 또 조사료에는 곰팡이로부터 생산되는 곰팡이 독소(마이코톡신)과 정

상 수정란과의 관련성에 대해서도 앞으로 중요한 과제라고 생각된다.

② 공란우의 새로운 과배란처리 방법에 관한 검토

현재의 과배란처리 방법은 소 난소내에 있는 FSH에 반응하고 있는 소난포수(2~5 mm) 이상의 난자를 회수할 수는 없다. 즉, FSH에 반응한 정상 소난포를 어느 정도 난소내에 축적될 수 있도록 함으로서 성적 향상이 기대된다. 원시난포로부터 소난포로의 발육에 관여하는 사이토톡신 등의 새로운 물질들에 대하여 체내에서 시험방법을 확립하여야 한다고 생각된다.

③ 공란우의 과배란성적이 개체차에 미치는 요인에 대한 검토

연간 회수한 정상수정란의 수가 0개인 개체에서 100개 이상 회수할 수 있는 공란우가 존재한다. 왜 그 정도의 변이가 있는 것일까? 유전적인 요인이 명백히 있으며, 젖소에 있어도 ET를 활용하여, 충실하게 번성하는 집단과 자손을 증식하는 것이 어려운 집단이 존재한다. 이러한 요인에 관한 해명이 내분비적, 유전적으로 살펴보면, 장래 크게 과배란성적을 개선할 수 있고, 수정란의 가격도 크게 낮출 수 있는 가능성이 있을 것으로 생각된다.

2) 현장에서 얻을 수 있는 새로운 상품개발에 관련하여 과제로서는, 장기 불수태우에 대한 대책으로 싼 수정란의 이용 및 유우의 성판별된 암컷 수정란의 동결기술의 개발이 시급하다.

(1) 장기불수태우(인공수정을 3회 이상 실시하여도 불수태된 것으로, 그 장애의 원인이 불분명한 번식 장애우(repeat breeder)를 포함함)의 처치를 위해서 싼 F1 체외수정란의 실증시험

현장에서 특히 비유우의 발정이 불명료한 것이 많고, 이미 인공수정에 의한 수태율이 낮은 경향을 보이는 것은 세계적인 현상이다. 2005년 1월 덴마크에서 개최된 수정란이식국제학회에서 실천자들의 포럼에서도 덴마크 소는 최후의 수정란(last chance embryo)으로 이름 붙여져, 싼 체외수정란을 이용하여 불임우 대책을 위해 ET가 보급되고 있다고 보고되었다. 본 센터에서도 젖소의 난자에 흑모화우 정액으로 체외수정한 F1의 체외동결 수정란(젖소 및 흑모화우 고유의 유전병은 F1인 송아지에서는 발생되지 않음)을 현장에 실증시험 중에 있으며, 불임우의 약 35~40%가 수태되었다. 또 체외수정란과 동일한 종모우 정액을 인공수정 후 7일째에 다시 이식하는 방법이 동결수정란이식의 경우보다도 양호한 수태율이 얻어지고 있으며, 확대하여 실증시험을 실시중이다.

(2) 성판별된 젖소 암컷 동결수정란과 임신우의 실용화 시험

일본에서 LAMP법에 의해 수정란의 성판별 기술이 보급되고 특히 젖소수정란의 성판별이 조금씩 보급되고 있다. 신선 수정란의 성판별 후 본 센터내의 수태율은 70%를 넘어서서 안정되어 있다. 더욱이 성판별 후의 동결에 있어서는 일반적인 동결용해기술로 세계적으로 안정적인 수태

율을 얻을 수 없음이 현재의 상황이다. 현재 다른 기관과의 공동연구에 의해 새로운 동결기를 제작하여 보다 세포에 충격이 적은 동결방법(특허출원중)으로 성관별된 암컷 동결 수정란의 수태시험을 실시중에 있다. 이렇게 수태된 임신우에 있어서도 낙농경영에 있어서 암컷이 태어날 수 있다는 장점을 생산자에 주기 위해 실증판매를 시작하였고, 분만된 생산자로부터 호평을 받고 있다.

3) 장래의 우량증축 증식을 위해 핵이식기술 관련의 연구에 대해서는 보다 안정적인 생산방법의 기초적인 개발이 시급하다.

(1) 우량증축 증식을 위해 핵이식기술의 기초적인 개발

체세포의 핵이식에 있어서 중요한 포인트는 사용한 체세포의 세포주기의 동기화가 중요하다. 체세포는 세포분열 직후의 G1 초기세포를 이용하면 안정적인 수정란 생산 및 수태가 기대할 수 있다(특허출원중). 다시 말하면, 핵이식 유래 수정란을 수태한 소의 분만시의 분만징후가 미약하거나, 거대산자가 일부 태어나게 되면, 전체적으로 해결되지는 못한 것이다. 핵이식 유래 수정란의 초기 발육성과 유전자 발현 등이 통상의 체내 수정란과 비교하여 어느 정도 다를까는 현재 여러 가지 시점에서 연구가 진행되고 있다.

(2) 축산에 있어서 유용한 유전자 기능 증명을 위한 소 유전자 제어에 관한 기초적인 연구

본 센터와 타기관(기능성 펩티드연구소, 獨協의대, 京大바이러스연구소)과의 공동연구에 의해 특유전자의 호모 knock-out 소를 생산하는데 성공하였다. 앞으로 육우의 지방교잡 등에 관여하고 있을 가능성이 높은 유전자의 knock-out 송아지를 만들어 그 유전자의 기능 증명을 하여 장래에는 육종가와 관련된 기능이 증명된 수정란을 공급할 수 있지 않을까 생각한다.

4. 소 수정란이식에 있어서 수태율 향상 대책

1) 서론

수정란이식은 수태율이 높게 안정적이면, 확실하게 수익성이 높아진다. 수정란이식의 수태율과 생산율이 낮은 경우는 가격면에서 보면, 사업으로서 계속하기가 어려워진다. 수태율의 향상과 유지가 현장에서 중요한 과제가 되었으며, 이번에는 특히 수란우의 사양관리 및 발정관찰을 중심으로 최근의 결과에 대한 개요를 설명하고자 한다.

2) 수태율에 영향을 미치는 요인

(1) 수태율의 결정 요인

수태율의 결정요인은 수정란의 품질(동결기술을 포함) × 수란우의 관리(발정관찰을 포함) × 이식기술(수란우의 선발을 포함)의 3가지가 주요한 요인이다. 이것 중에서 하나라도 지켜지지 않으면 수태율은 크게 저하하게 된다.

(2) 수정란의 품질

동결방법은 단계별 동결법과 직접이식법이 있으며, 기본은 회수에서부터 식빙까지의 시간을 3시간 이내에 수행하는 것과 동결할 수정란의 등급(국제기준)을 엄수하는 것이 중요하다. ET센터에서는 이 품질관리에 있어서 철저하게 엄수하고 있다. 센터의 동결방법은 전농(全農)직접이식법(국제특허취득)을 사용하고 있으며, 상당히 안정적인 수태율이 얻어지고 있다. 또 신선수정란에 있어서도 C등급(국제기준 3)은 특히 주의가 필요하며, 수태율은 Lot에 따라 변이가 심하다. 본 센터에서는 C 등급(국제기준 3)를 전부 파기하고 B등급(국제기준 2)를 신선수정란이식에 사용함으로써 수태율이 안정화되었다.

(3) 수란우의 사양관리

에너지와 단백질의 밸런스가 상당히 지켜지지 않을 경우, 마찬가지로 수태율은 떨어진다. 특히 단백질과잉상태에서 주의가 필요하다. 특히 흑한기 등의 에너지 밸런스가 무너지는 시기는 사료 급여 계산 등 신중하게 할 필요가 있다.

단백 과잉 상태(특히 용해성 단백질의 상승은 수태율을 저하시킨다)로부터 혈중 BUN 및 암모니아 농도가 상승하고, 자궁내에 있어서 암모니아가 수정란에 대하여 독성을 나타낼 가능성이 시사되고 있다. 또 사일리지(조사료)의 품질도 중요하다. 저급의 사일리지를 많이 먹으면 간단하게 수태율이 저하된다. 이와 같은 경우는 양질 조사료와 혼합하여 급여하면 어느 정도 복구할 수 있다. 또 최근에 조사료의 곰팡이독소인 마이코톡신(아플라톡신, 제아레논 등)이 수태율 저하에 영향을 미치는 것이 보고되었으며, 곰팡이가 다량 생기는 조사료를 파기하거나 곰팡이 독의 흡착제 등의 이용도 하나의 대책이라 할 수 있다. 흑서기는 열 스트레스에 의해 뇌하수체 등으로부터 호르몬 밸런스가 무너져 번식이 어렵게 된다. 우사의 환기 및 습도 관리가 중요하다. 또 다른 스트레스를 많이 받으면 cortisol이 증가하고, 번식기능이 저하된다. 사지의 통증을 동반한 질환도 번식에 악영향을 미친다. 조기치료와 정기적인 삭제의 실시가 중요하다. 또 발열을 동반한 전염성 질환등이 만연하면 번식력이 회복하기까지 상당한 시간이 필요하다. 초보단계에서부터 방역관리도 주요한 한 가지의 항목이다.

(4) 수란우의 발정관찰

현재 발정관찰이 문제가 되고 있다. 젖소의 인공수정 · 수정란이식에 있어서 수태율 향상을 위

해 정확한 발정 발견이 기본이다. 현재 생산자가 다두 사육화 등에 의한 노력 부족이 발정 발견을 저하하는 경향이 있으며, 더욱이 비유우의 발정이 보이기 어렵다는 의견을 많은 생산자들로 부터 듣고 있다.

더불어 다음에는 스탠딩 행동의 빈도를 계측할 수 있는 발정 발견 시스템을 응용하여 홀스타인 미경산우에 있어서 스탠딩 행동의 회수와 지속시간을 조사하여 수정란이식 후의 수태와 관련 지어 검토한 내용과 위스콘신주립대학과 미국농무성의 그룹이 보고한 홀스타인 비유우의 발정 발견 시스템을 이용한 발정행동의 데이터의 일부를 소개한다.

① 수정란이식에 있어서 발정관찰의 중요성 : 왜, 수정란이식의 수태율 향상에는 발정발견이 중요한가?

15일령 전후의 소 수정란의 영양막세포(장래 태아의 태반을 형성하는 세포)로부터는 충분한 양의 인터페론 τ (타우)가 생산되어지면서 자궁에 있어서 PGF의 생산을 억제하는 것이 알려졌다. 일반적으로 수정란이식은 수란우가 발정징후를 나타내는 일자를 0일로 하고 7일째의 공란우로부터 채취된 7일령의 수정란이 이식된다. 이 이유는 수란우의 발정후의 일수가 5일째에는 수정란을 발육시키는 자궁환경이 아직 충분하지 않을 가능성이 있고, 9일째에는 수정란의 발육이 지연되어 15일째 전후에 충분한 양의 인터페론 τ 가 생산되지 않으므로 자궁으로부터 PGF가 생산되어, 수란우의 황체가 퇴행하고 성주기에서 발정이 회귀하게 된다. 그러나 15일령의 수정란은 크기는 실제로 차이가 크다는 것이 알려져 있고, 앞으로 더욱더 연구가 필요하다고 생각된다.

② 홀스타인 미경산우의 발정징후 : 홀스타인 미경산우의 발정징후는 약하지만은 않다.

소의 미근부에 발신기를 붙여서 발정발견 시스템에 의한 발정시의 스탠딩 행동의 평균지속시간은 16시간 4분, 그 폭은 2시간 10분으로부터 48시간 26분이었다. 또 스탠딩 행동의 평균회수는 59.9회, 그 폭은 3회에서부터 181회이었다(미경산우 100두 · 100발정 데이터). 거기에 사람의 육안(아침 저녁 약 30분의 관찰)으로 관찰이 되지 않은 것은 100두중 1두뿐이었고, 미경산우의 발정은 미약한 것은 적었으며, 관찰이 용이한 것으로 시사되었다. 또 스탠딩 행동의 지속시간 및 회수와 수정란이식후의 수태율과는 명확한 관련이 없다는 것이 데이터에서 나타났다. 즉 발정발현에서 스탠딩 행동을 눈으로 관찰할 수 있으며, 그 7일후에 기능성 황체가 확인할 수 있으면 수정란이식을 실시할 수밖에 없을 것으로 생각된다.

③ 홀스타인 경산우의 발정징후 : 홀스타인 경산우의 발정징후가 미약한 것이 많은가?

현재의 문제는 비유우의 발정관찰이라고 생각된다. Lopez 등의 보고에 의하면, 유량이 39.5 kg 이상/일조량의 우군의 평균발정지속시간은 7시간으로 그 폭은 0.4세에서 23.1시간이었다. 또 스탠딩 행동의 평균회수는 6.5회 정도로서 그 폭은 2회로부터 16회이었다. 이번에 보고와 상기의 미경

산우와 단순하게 비교해 보면, 비유우의 스탠딩 행동의 관찰은 용이한 것은 아니고, 상당히 미세하게 발정관찰이 필요하다는 것을 시사해준다. 발정관찰은 사료급여 또는 착유작업과 동등하게 중요한 경영상의 일로서 비유우는 상당히 수고를 줄일 수 있어, 신중한 발정관찰을 할 수밖에 없다. 틀림없이 번식성적은 향상될 것이다.

(5) 이식기술

이식시의 수란우의 선발은 충실한 기능성 황체의 확인의 정도가 상당히 중요하다. 난포의 공존이 발정 후 7일째에 있으면, 10~15 mm 전후에 주석난포가 발육하고 있는 것은 생리적으로도 정상이며 아무런 문제가 없다. 단지 황체의 충실도에 있어서, 직장검사시 걱정스러운 경우에는 hCG (1,500~3,000 단위) 등의 LH 유사제제를 이용하면, 상기 주석난포의 약 85%가 배란하고, 부황체를 형성하며, Day 15일의 황체기능을 증강시켜 수태율을 향상시킬 수 있다는 가능성이 보고되었다. 또 기본적인 일이라고 생각되나, 이식조작은 특히 자궁내에서는 신중하게 할 필요가 있다. 잘못하여 자궁내막에 상처를 입히면, 그 부위에서는 조직 회복을 위하여 염증이 발생되며, 면역반응에서 수정란(모체에 있어서 수정란은 이물질이므로 특히 부화한 단계의 수정란)이 침윤된 백혈구 등에 의해 공격을 받을 가능성이 있다. 이식시 자궁내에서 신중한 조작이 수태율 향상을 위해서 중요하다. 또 참고적으로 동기화 처치와 이식과의 관련된 것으로, 자궁의 문제가 없다는 것을 전제로 하고, 질내에 삽입된 PRID 등의 황체호르몬제제를 이용하고 발정유기시 그 후 충실한 기능성 황체가 확인되면, 적극적으로 ET를 실시하여도 자연발정의 수태율과 비교하여 보면, 전혀 손색이 없는 성적을 얻을 수 있다. 이식업무의 효율을 높이기 위해 유효한 방법이라고 생각된다.

3) 결론

수정란이식에 있어서 현장에서 수태율의 향상은 본 기술을 이용하기 위해 보급하는데 있어서 중요한 과제이다. 수정란의 생산시 동결시의 적절한 관리와 기술, 수란우의 적절한 사양관리와 발정관찰, 이식시의 수란우의 적절한 선발과 신중한 이식조작까지 확실하게 연계하여 일이 진행되기 시작하였을 때 높은 수태율을 기대할 수 있다. 또 수정란이식으로부터 1주일간 임신황체로 이행될까 하는 중요한 제1관문이다. 이 후로 일주일간의 생리변화에 관하여 많이 검토하고 확실한 소신을 가지고 수정란이식을 실시함으로써 수태율 향상·안정으로 연결될 수 있을 것으로 생각된다.

日本における最近のウシET関連情報と 受胎率向上対策について

JA 全農 ET センター
所長 青柳 敬人

1. はじめに

日本における最近の牛胚移植技術を取り巻く現状と胚移植による受胎率向上対策についてここに私見を紹介いたします。

2. 日本における牛胚移植を取り巻く情勢認識

1) 黒毛和種繁殖基盤の減少部分の補完・生産者の収益の増加を目的に肉牛、特に 黒毛和種胚の利用は国内で拡大傾向にある（平成 14 年度：国内では約 6 万 3 千頭に実施：体内胚 5 万 5 千、体外胚 8 千）。当センターの黒毛和種を中心とした胚供給実績は平成 11 年度：1,784 個、12 年度：3,649 個、13 年度：4,750 個、14 年度：5,480 個、15 年度 6,280 個、16 年度 7,250 個、17 年度 8,450 個、18 年度は 10,000 個計画と生産者のニーズの拡大とともに増加傾向を示している。当センター内 ET 実施頭数も 16 年度は 2,070 頭で、その受胎率は妊娠日齢 60 日で 70.0%であった。また ET を活用した和牛素牛生産事業が各地の JA で取り組まれている。

2) 乳牛胚は欧米では普及しているが、国内のマーケットは極めて小さいのが現状である。しかしながら、わが国も平成 15 年 8 月にはインターブル（国際乳牛遺伝評価機関）から乳牛の国際間比較可能な遺伝的評価が公表された。今後、乳牛胚も国際流通が活発になることが予想される。また、さらなる技術開発が必須となるが、国内の酪農家からは雌性判別済み乳牛凍結胚ならびにその妊娠牛の供給に対し、要望が高まっている。

3) 核移植によるクローン技術開発では北米・EU のベンチャー会社を中心に特許開発 競争が行われてきた。将来の優良な種畜の増殖技術として、また、さらには遺伝子工学と連動して、畜産にとって有用な遺伝子機能の証明に関する開発や医学分野と連携した研究が進行中である。

3. 日本におけるウシ胚移植関連研究の現状

1) 胚移植関連コストの低減のためには、現場における受胎率の向上と安定に寄与する技術開発、ならびにウシ過剰排卵における正常胚の生産性を高める技術開発が重要となる。

(1) 胚移植による受胎率向上に関する課題

① 受胎牛の黄体機能増強方法の確立

胚移植時にhCGやGnRH製剤を用いて第1波の主席卵胞を排卵、黄体化させ、主黄体とともに黄体機能を充実させることが可能となっているが、より受胎率向上に結びつく、効果的な投与方法の検討が特に泌乳牛において必要である。

② 受胎牛の効率的な発情同期化方法の確立

特に乳牛の経産牛の発情徴候は不明瞭なものが多く、発情同期化して胚移植が効率的に実施できる手法の開発が必要であり、臍内留置型黄体ホルモン製剤(CIDRやPRID)とPG製剤を併用した同期化では、人工授精(老化した卵子が排卵する可能性もある)よりも胚移植(老化した卵子が排卵しても充実した黄体形成がなされれば胚移植可能)でより有効なデータも得られており、今後、幅広い検討が必要である。

③ 受胎牛の飼料給与面からの改善に関する検討

エネルギー不足からくる蛋白過剰給与、特にルーメン内における溶解性蛋白値やアンモニアの過剰状態は胚移植の受胎率を大幅に低下させる可能性が当センターのデータでも示唆されており、アンモニアが胚に及ぼす毒性に関する検討ならびにBUN(血中尿素態窒素)やMUN(乳中尿素態窒素)と子宮内アンモニア濃度との関連性などについて、さらなる検討が今後なされる必要があり、最終的には受胎率向上のための、現場における飼養管理改善策に結び付けなければならない。

(2) 供卵牛の正常胚数向上のための課題

① 供胚牛の飼養管理面からの改善に関する検討

上記の受胎牛と同様に溶解性蛋白値やアンモニアの過剰給与は供胚牛の正常胚率を低下させる可能性があり、卵巣内小卵胞液の中には高い濃度でアンモニアが蓄積されていることが知られている。また粗飼料中のカビから産生されるカビ毒(マイコトキシン)と正常胚率との関連についても今後、重要な課題であると考えられる。

② 供胚牛の新しい過剰排卵処置方法に関する検討

現状の過剰排卵処置方法はウシ卵巣内にあるFSHに反応しえる小卵胞数(2-5mm)以上の胚数を回収することはできない。すなわち、FSHに反応しえる正常な小卵胞をいかに卵巣内に蓄積できるかによって、成績向上が期待できる。原始卵胞から小卵胞への発育に関与するサイトカイン等の新たな知見を集積し、体内での試験方法を確立する必要があると考えている。

③ 供胚牛の過剰排卵成績の個体差に及ぼす要因に関する検討

年間回収正常胚数が0個の個体から100個以上回収できる供胚牛が存在する。なぜ、これほどのバリエーションがあるのか？ 遺伝的素因は明らかに存在し、乳牛においてもETを活用して、大きく繁殖するファミリーと子孫を増やすのが難しいファミリーが存在する。これらの要因について解明が内分泌的、遺伝学的に進めば、将来、大きく過剰排卵成績を改善でき、胚の大幅なコスト低減に結びつく可能性があると考えている。

2) 現場から求められている新しい商品開発に関連する課題として、長期不受胎牛対策のための低コスト胚の利用ならびに乳牛の性判別済み雌胚の凍結技術の開発が急務となっている。

(1) 長期不受胎牛(人工授精を3回以上実施しても不受胎で、その障害の原因が不明であるリピートブリーダーを含む)のための低コストF1体外受精胚の実証試験

現場において、特に泌乳牛の発情は不明瞭なものが多く、かつ人工授精による受胎率が低下傾向にあることは世界的な状況にある。2005年1月にデンマークで開催された胚移植国際学会における実践者フォーラムの中でも、オランダではラストチャンスエンブリオと名づけて、安価な体外受精胚を利用した不妊牛対策のためのETが普及しつつあることが報告された。当センターでも乳牛の卵子に黒毛和種精液を体外受精したF1の体外凍結胚(乳牛ならびに黒毛和種固有の遺伝病はF1であるので産子には発生しない)を現場において、実証試験中であり、不妊牛の約35-40%が受胎している。また、体外胚と同一の種雄牛精液を人工授精後7日目に追い移植する方法が凍結1胚移植よりも良好な受胎率が得られており、拡大して実証試験を実施中である。

(2) 性判別済み乳牛雌凍結卵・妊娠牛の実用化試験

国内ではLAMP法による胚の性判別技術が普及し、特に乳牛胚の性判別が僅かながら普及しつつある。新鮮胚の性判別後の当センター内の受胎率は70%を超えて安定している。しかしながら、性判別後の凍結については、常法の凍結融解技術では、世界的にも安定的な受胎率が得られていないのが現状である。現在、他機関との共同研究により新たな凍結器を試作し、より細胞にダメージの少ない凍結手法(特許申請中)で、性判別済み雌凍結胚の受胎試験を実施中である。その受胎した妊娠牛につ

いても、酪農において雌が生まれるメリットを生産者に理解してもらうため、実証販売を開始し、分娩させた生産者からは好評を得ている。

3) 将来の優良種畜増殖のための核移植技術関連の研究においては、より安定的な生産手法の基礎的な開発が急務である。

(1) 優良種畜増殖のための核移植技術の基礎的な開発

体細胞の核移植における重要なポイントは使用する体細胞の細胞周期の同期化が重要となる。体細胞は細胞分裂直後の G1 初期細胞を用いると安定的な胚生産ならびに受胎が期待できるようになってきた（特許申請中）。しかしながら、核移植由来胚を受胎したウシの分娩時の分娩徴候が微弱であったり、過大産子が一部で生まれたりと、すべてが解決したわけではない。核移植由来胚の初期発育性や遺伝子発現等が通常の体内胚と比較してどのように異なるのか、現在、いろいろな視点から研究が進められている。

(2) 畜産にとって有用な遺伝子機能証明のための牛遺伝子ノックアウトに関する基礎的な研究

当センターと他機関（機能性ペプチド研究所、独協医大、京大ウイルス研）との共同研究により特定遺伝子のホモノックアウトウシ産子作出に成功した。今後、肉牛の脂肪交雑等に関与している可能性の高い遺伝子のノックアウト胎子を作成し、その遺伝子の機能証明を行い、将来は育種価と連動した機能の証明された胚が供給できるようにしていければと考えている。

4. ウシ胚移植における受胎率向上対策

1) はじめに

胚移植は受胎率が高く安定すると、明らかに収益性が高まる。胚移植の受胎率や生産率が低い場合はコスト面からみても事業としての継続が難しくなる。受胎率の向上と維持が現場における重要な課題となり、今回は特に、受卵牛の飼養管理ならびに発情観察を中心に、最近の知見の概要を説明する。

2) 受胎率に影響する要因

(1) 受胎率の決定要因

受胎率の決定要因は胚の品質（凍結技術を含む）× 受胚牛の管理（発情観察を含む）× 移植技術（受卵牛の選抜を含む）の3つの積算で決定する。これらのうち、1つでも大きく崩れると受胎率は大きく低下してしまう。

(2) 胚の品質

凍結方法はステップワイズやダイレクト法があるが、基本は回収から植氷までの時間を3時間以内とすること、さらには凍結品質のグレード（国際基準）を厳守することが重要である。ETセンターではこの品質管理については徹底的に厳守している。センターの凍結手法は全農ダイレクト法（国際特許取得）を用いることで、高位安定的な受胎率が得られている。また、新鮮胚においても、Cランク（国際基準3）は、特に注意が必要で、受胎率はロットによって、バラツキがでる。当センターではCランク（国際基準3）をすべて破棄し、Bランク（国際基準2）を新鮮胚移植に用いることで受胎率が安定化された。

(3) 受卵牛の飼養管理

エネルギーと蛋白給与のバランスが大きく崩れると、間違いなく受胎率は低下する。

特に、蛋白過剰状態には注意が必要である。特に厳寒期等のエネルギーが奪われる時期は飼料給与計算等、慎重に行う必要がある。

蛋白過剰状態（特に溶解性蛋白値の上昇は受胎率を下げる）から血中BUNならびにアンモニア濃度が上昇し、子宮内においてアンモニアが胚に対して毒性を示す可能性が示唆されている。また、サイレージ（粗飼料）の品質も重要である。劣化したサイレージを多給すると簡単に受胎率は低下する。このような場合は良質粗飼料と混合して、給与すると、ある程度はカバーできる。さらに近年、粗飼料のカビ毒であるマイコトキシン（アフラトキシン、ゼアラレノンなど）が受胎率低下に影響することが報告されており、カビが多量に生えている粗飼料を破棄することや、カビ毒の吸着剤等の利用もひとつの対策となるであろう。暑熱期はヒートストレスから脳下垂体等からのホルモンバランスが崩れ、繁殖が難しくなる。牛舎の換気ならびに温度管理が重要となる。また他のストレスを多く受けると、コルチゾールが増加し、繁殖機能が低下する。四肢の痛みを伴う疾患も繁殖に悪影響を及ぼす。早期治療と定期的な削蹄の実施が重要となる。また熱発を伴う伝染性疾患などが蔓延すると、繁殖力が回復するまで、かなりの時間を必要とする。普段からの防疫管理も大切な一項目となる。

(4) 受卵牛の発情観察

現在、この発情観察が問題になっている。乳牛の人工授精・胚移植における受胎率向上には、正確な発情発見が基本となる。現在、生産者の多頭飼育化等による労力不足から発情発見率は低下傾向にあること、さらには泌乳牛の発情が見つけづらくなっているという意見を多くの生産者からよく耳にする。

そこで、今回はスタンディング行動の頻度を計測できる発情発見システムを応用してホルスタイン種未経産牛におけるスタンディング行動の回数と持続時間を調べ、胚移植後の受胎との関連を検討した概要と Wisconsin 州立大学と米国農務省のグループが報告したホルスタイン種泌乳牛の発情

発見システムを利用した発情行動のデータの一部を紹介する。

① 胚移植における発情観察の重要性：なぜ、胚移植の受胎率向上には発情発見が重要なのか！

15日令前後の牛胚の栄養膜細胞（将来胎子胎盤を形成する細胞）からは十分な量のインターフェロン α が産生されることで、子宮におけるPGFの産生を抑制していることが知られている。通常の胚移植は受胎牛が発情兆候を示した日を0日として7日目に供胚牛から採取した7日令胚が移植される。発情観察が不明瞭で、この日数が大きくなる程、その受胎率は大幅に低下する。この理由は受胎牛の発情後の日数が5日目では胚を發育させる子宮環境がまだ、十分できていない可能性があること、9日目では胚の發育が遅延し、15日目前後で十分な量のインターフェロン α が産生できないため、子宮からPGFが産生され、受胎牛の黄体は退行し、性周期で発情が回帰することになる。しかし、D15日齢の胚の大きさは実際にはバリエーションが大きいことが解っており、今後さらなる研究が必要と考える。

②ホルスタイン種未経産牛の発情兆候：ホルスタイン種未経産牛の発情兆候は弱まってはいない！

牛の尾根部に発信器を取り付けた、発情発見システムによる発情時のスタンディング行動の平均持続時間は16時間4分、その幅は2時間10分から48時間26分であった。またスタンディング行動の平均回数は59.9回その幅は3回から181回であった（未経産牛100頭・100発情のデータ）。このうち、人の目視（朝・夕約30分の観察）で観察できなかったのは100頭中1頭のみで、未経産牛の発情は微弱なものが少なく、観察が容易であることが示唆された。また、スタンディング行動の持続時間ならびに回数と胚移植後の受胎率とは明確な関連がないことがデータから示されている。すなわち、発情発見でスタンディング行動を目視でき、その7日後に機能性黄体が確認できれば、胚移植を実施すべきと考えられた。

③ホルスタイン種経産牛の発情徴候：ホルスタイン種経産牛の発情兆候は微弱なものが多い！

現状の問題は泌乳牛の発情観察と考えられる。Lopezらの報告によると乳量が39.5Kg以上/日量の牛群の平均発情持続時間は7時間で、その幅は0.4から23.1時間であった。またスタンディング行動の平均回数はなんと6.5回で、その幅は2から16回であった。今回の報告と上記の未経産牛とを単純に比較しても、泌乳牛のスタンディング行動の観察は容易ではなく、かなり細かな発情観察を必要としていることを示唆している。また、コンクリートではない土の運動場では、発情兆候がより明確となる報告もある。発情観察は飼料給与また搾乳作業と同等に重要な経営上の仕事であり、泌乳牛はかなりの手間を割いて、慎重な発情観察を行うべきである。間違いなく、繁殖成績は向上するであろう。

(5) 移植技術

移植時の受胎牛の選抜は充実した機能性黄体の確認の精度が一番重要となる。卵胞の共存は発情後7日目であれば10~15 mm 前後の主席卵胞が発育しているのは生理的にも正常であり、何ら問題はない。ただし、黄体の充実度において、直腸検査で悩むようなケースではhCG (1500~3000 単位) 等のLH様製剤を利用すると、上記主席卵胞の約85%が排卵し、副黄体を形成し、D15の黄体機能を増強させ、受胎率を向上できる可能性が報告されている。また、基本的なことであるが、移植操作は特に子宮内では慎重に行う必要がある。誤って子宮内膜を傷つくと、その部位では組織修復のために炎症がおこり、免疫反応で胚(母体にとって胚は異物であり、特に孵化したステージの胚)が浸潤した白血球等により、攻撃される可能性がある。移植時の子宮内での慎重な操作が受胎率向上のためにも重要である。また、参考までに同期化処置と移植との関連ですが、子宮に問題がないことが前提となるが、臍内に留置するPRIDなどの黄体ホルモン製剤を用いて、発情誘起し、その後充実した機能性黄体が確認できれば、積極的にETを行っても、自然発情の受胎率と比べて、まったく遜色ない成績が得られている。移植業務の効率化には有効な一手段であると考ええる。

3) おわりに

胚移植における現場での受胎率の向上は本技術のさらなる普及において、重要な課題である。胚の生産時、凍結時の適切な管理と技術、受胎牛の適切な飼養管理と発情観察、移植時の受胎牛の適格な選抜と慎重な移植操作まできちっと連携した仕事ができるようになって初めて高い受胎率が期待できる。また胚移植から1週間が妊娠黄体に移行できるかどうかの重要な第一関門となる。これからも、この1週間の生理変化について多くのことを検証し、確かな知見を得て、胚移植によるさらなる受胎率の向上・安定に結びつけていきたいと考えています。