

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450388

研究課題名(和文) 異常卵割から発生した胚は子牛になりうるか

研究課題名(英文) Can embryos derived from abnormal cleavage become calves?

研究代表者

的場 理子(的場理子)(MATOBA, SATOKO)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門・家畜育種繁殖研究領域・上級研究員

研究者番号：60592574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：受精後の細胞分裂(卵割)が異常な卵子の特徴の解明と異常卵割由来胚の子牛への発生能を検討した。異常卵割の発生は胚の生産方法により異なり、第1卵割異常卵子は正常卵割卵子に比べて胚盤胞期への発生能が低いとその半数は胚盤胞期へ発生することを見出した。個別割球は解析可能な遺伝子数が少ないことから個別割球のcDNA増幅法を開発し、2細胞期胚を分離した個別割球の遺伝子発現はその発生能と正の関係にあることを明らかにした。見出した卵割の正常性の4指標のうち、卵割の異常が1種類のみであっても正常卵割に比較して胚移植後の受胎率が低下し、2種類の異常ではさらに低率であるが受胎し、子牛への発生能を有することを解明した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the characteristics of abnormal cleavage patterns after fertilization and the competence of abnormally cleaved embryos to develop to calves. The appearance of abnormal cleavage depended on the embryo production method. Embryos with abnormal first cleavage had a significantly lower competence to develop to the blastocyst stage than normal embryos; however, half of them still reached the blastocyst stage. We developed a method for gene expression analysis from cDNA amplified from single blastomeres in 2-cell embryos. The results revealed a positive association between gene expression and the developmental potential of the embryo. Possessing each one of the four types abnormalities of the first embryonic cleavage was associated with a decreased conception rate compared with embryos showing normal cleavage. However, even when embryos had two parameters of abnormalities and thus low conception rates, conceived embryos had the potential to develop to calves.

研究分野：農学

キーワード：異常卵割 ウシ 繁殖 体外受精 卵子 発生能 遺伝子発現 受胎

## 1. 研究開始当初の背景

牛の受胎率はこの 20 年間で毎年 1% ずつ低下しており、生産子牛の販売時期や牛乳生産時期が遅れるなど畜産農家の経営に深刻な影響を及ぼしている。特に経産乳牛の不受胎の約 65% は授精後 7 日目までに起こることが報告されていることから、7 日目胚を子宮に移植する胚移植技術により、この損耗を回避することが可能となる。

移植胚の品質は、一般的に受精後 7 日目に顕微鏡下で形態学的に評価されるが、形態学的に高品質と評価された胚盤胞においても、受精後に細胞分裂が正常に進まないこと(卵割の異常)に由来する胚が存在する。そこで、異常卵割から発生した胚盤胞がどの程度子牛になりうるか、その発生過程や原因についての十分な検討が必要である。農家にとって、育種改良された優秀牛の胚生産やその子孫は貴重であり、これら高付加価値の優秀なドナー(供胚雌牛)の血統は一度失われると復活が困難である。子牛へ発育する可能性のある異常卵割から発生した胚が選別できれば、優秀な後代牛資源を廃棄せずすみ、胚の有効活用が可能となる。

## 2. 研究の目的

牛の生産効率を阻害している受胎率低下の原因の一つに、受精後に胚が異常な卵割を示し、発育を停止するという事象が考えられる。しかし、異常卵割を経た胚の発生について、その特徴および産子になりうるかという解析は十分ではない。異常卵割から発生した胚の子牛への発育能が明らかになれば、牛の受胎率低下問題を卵子側から解決する基盤となる成果として活用できる。

本研究は、異常卵割由来胚が子牛になりうるかを解明することを目的とした。

具体的には、(1) 異常卵割した胚の特徴とその発生原因の解明、(2) 異常卵割パターンを有する胚から発生した胚盤胞が子牛になりうるかについて検証した。

## 3. 研究の方法

### (1) 異常卵割したウシ胚の特徴とその発生原因の解明

異常卵割する卵子の卵割速度とそのパターンの発現頻度の解析

これまでの実験結果をもとに、受精後約 28 時間までに第一卵割を終了した胚において、細胞断片や細胞突出部を含む卵割パターンを記録し、異常卵割の発生頻度を解析する。さらに、異常卵割から発生する胚盤胞の割合を明らかにする。これらにおいて、食肉処理場由来卵巣から採取した卵子と生体から経腔で採取(OPU)した卵子を比較する。

正常・異常卵割の分類別の胚の発育停止時期の解析

胚盤胞期に達する前のどの時期に死滅するのかという発育停止状況の特徴を明

らかにするため、リアルタイム細胞観察培養装置により、経時的に卵割の様子を観察・スクリーニングし、異常卵割した胚の発育停止時期の特定を試みる。

各細胞周期における個別胚、各割球の遺伝子発現による異常卵割発生の原因解明

子牛へ発育する能力の高い胚の遺伝子発現が卵割の特徴によって異なるのか、第 1 ~ 2 細胞周期および胚盤胞期に個別に胚や割球の一部を採取し、遺伝子発現量を比較する。個別のサンプルでは解析可能な遺伝子数が限られる(特に割球 1 個ではマーカー遺伝子は約 5 個)ため、マーカー遺伝子の候補を絞るとともに、cDNA 量の増幅方法についても検討する。

### (2) 異常卵割パターンを有する胚から発生した胚盤胞が子牛になりうるかの検証

異常卵割パターンを有する胚盤胞が子牛になるか、受胎牛に胚移植を実施し、受胎の成功性と産子への発生能を調査する。

## 4. 研究成果

### (1) 異常卵割したウシ胚の特徴とその発生原因の解明

異常卵割する卵子の卵割速度とそのパターンの発現頻度の解析

異常卵割したウシ胚の特徴として、胚盤胞期への発生能は正常卵割した胚に比べて低いが、卵割後に半数は胚盤胞期に発生することを明らかにした。さらに、胚の生産手法により、異常卵割の発生頻度が異なることが明らかとなった。生体の卵巣から経腔で採取した卵子では異常卵割が胚盤胞への発生能に影響していないことを見出した。そこで、当初計画していなかったが、供卵牛や体外受精に用いた凍結精液の種雄牛の卵割パターンについて調査し、供卵牛ごとや種雄牛ごとに卵割パターンに特徴のあることが新たな知見として見出された。

正常・異常卵割の分類別の胚の発育停止時期の解析

個別に卵子の卵割過程を経時的に観察・スクリーニングした結果、胚盤胞期に達する前に発生を停止して変性した胚は、第 3 卵割終了後が第 3 卵割終了前の時期に比べて死滅率に有意差のあることが判明した。

各細胞周期における個別胚、各割球の遺伝子発現による異常卵割発生の原因解明

細胞周期における個別胚・割球の遺伝子解析では、まず個別胚と個別胚から分離した個別の割球で解析可能な遺伝子数を決定する必要があった。個別の胚盤胞期胚では全能性、細胞周期や分裂、エネルギー代謝や輸送、細胞運動等の候補遺伝子の解析を実施し、卵割の正常性において 1 種類の遺伝子発現に違いが認められた。一方、卵

割速度においては遺伝子発現量に有意差が認められなかった。個別の割球では初期の実験で6種類の候補遺伝子の解析が可能であったが、卵割の正常性における影響は見出せなかった。そこで、個別割球のcDNA増幅法を検討し、今までの約3倍となる19種類の候補遺伝子の解析を可能とする有効な遺伝子増幅法を開発した。

この新たなcDNA増幅法を用いることにより、食肉処理場由来卵巣から採取したウシ卵子の第1卵割終了時の個別胚の各割球について、正常性の指標ごとに見ると、正常卵割となる卵割終了時間の閾値(体外受精後28時間目)までに卵割が終了したかどうかでは12個、卵割割球の均等性の有無では14個、細胞断片等の存在の有無では13個の全能性、エネルギー代謝、細胞周期や分裂胎子成長等に関する遺伝子発現量の違いが見出された。第1卵割における異常と正常卵割胚の個別割球の間の遺伝子発現が異なることを明らかとし、第1卵割終了後の2細胞期胚を分離した個別割球における胚盤胞期への発生能は卵割の正常性によって異なり、遺伝子発現はその発生能と正の関係にあることを明らかにした。第2卵割以降の胚の割球においては、十分な遺伝子解析を行える品質ではない割球が含まれることが示唆されたため、現在も遺伝子増幅法の改良を実施中である。

## (2) 異常卵割パターンを有する胚から発生した胚盤胞が子牛になりうるかの検証

OPU卵子において、第1および第2卵割の正常性が胚移植後の受胎率に及ぼす影響の検討では、第1卵割および第2卵割終了時に、卵割終了時間や卵割パターンについて見出した卵割の正常性の4種類の指標において、異常となる項目のどれか1つを有する異常卵割胚とその同じ1項目の異常がない胚と比較した場合、受胎率に有意な差は認められなかった。しかし、卵割の異常が1種類であっても異常な場合は同指標がすべて正常である場合と比較し、胚移植後の受胎率が有意に低下することが判明した。しかしながら、2種類の異常な卵割指標を経た胚盤胞期胚においても、1種類の異常を示した胚の移植に比べて低率ではあるが受胎し、子牛への発生能を有することを解明した。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計4件)

高山茉莉、今井 敬、森好政晴、堂地 修、ウシ体外受精由来胚の卵割形態が胚の発生及び新鮮胚移植の受胎率に及ぼす影響、日本胚移植学雑誌、査読有、印刷中。  
今井 敬、経腔採卵による胚生産技術の

概要、臨床獣医、査読無、Vol.34、No.9、2016、pp.12-17  
的場理子、世界の胚生産・移植の状況と第41回国際胚移植学会大会の概要、日本胚移植学雑誌、査読有、Vol.37、No.2、2015、pp.47-55。  
[https://kenkyuukai.m3.com/journal/journal\\_contents.asp?j\\_type=0&id=1873&co\\_id=33667&s\\_id=405&file=1](https://kenkyuukai.m3.com/journal/journal_contents.asp?j_type=0&id=1873&co_id=33667&s_id=405&file=1)  
高山茉莉、片桐成二、森好政晴、堂地 修、今井 敬、個別管理培養ディッシュを用いた牛体外受精胚の培養個数が胚の発生率に与える影響、繁殖技術、査読無、Vol.35、No.3、2015、pp.59-61。

### 〔学会発表〕(計21件)

的場理子、第43回国際胚技術学会(IETS, International Embryo Technology Society)大会の概要、平成28年度受精卵移植関連新技術全国会議(第21回)招待講演、2017年2月23日、文部科学省研究交流センター国際会議場(茨城県・つくば市)。

Matoba S, Kaneda M, Somfai T, Imai K, Geshi M. The relationship between the normality of first cleavage, the gene expression in blastomeres and the ability to develop to the blastocyst stage in IVF-derived bovine 2-cell stage embryos. 43rd annual conference of International Embryo Technology Society, 2017年1月15日~17日, Austin (USA).

Takayama M, Moriyoshi M, Dochi O, Imai K. Impact of selection system by kinetics on the early embryonic development in bovine ovum pick-up embryos. 43rd annual conference of International Embryo Technology Society, 2017年1月15日~17日, Austin (USA).

的場理子、ウシにおける経腔採卵の利用とその普及、平成28年度研究人材活性化事業研究推進支援研修(神奈川県畜産技術センター)(招待講演)、2016年11月24日、神奈川県畜産技術センター(神奈川県・海老名市)。

的場理子、牛における生殖工学の進展、産業動物獣医師診療への理解醸成のための講習会「畜種別講習会」(家畜衛生対策推進協議会)(招待講演)、2016年10月25日、北里大学獣医学部(青森県・十和田市)。

今井 敬、ウシ超音波誘導経腔採卵技術、第109回日本繁殖生物学会大会シンポジウム3(招待講演)、2016年9月15日、麻布大学(神奈川県・相模原市)。

的場理子、金田正弘、下司雅也、2細胞に卵割したウシ体外受精胚における第1

卵割の正常性と各割球の遺伝子発現の関係、第109回日本繁殖生物学会大会、2016年9月12日～15日、麻布大学（神奈川県・相模原市）。

金田正弘、建石幸子、的場理子、cDNA増殖法を用いたウシ受精卵単一割球からの遺伝子解析法、第109回日本繁殖生物学会大会、2016年9月12日～15日、麻布大学（神奈川県・相模原市）。

高山茉莉、森好政晴、堂地 修、今井 敬、OPU-IVFの胚生産成績にホルスタイン種と黒毛和種の品種の違いが与える影響、第35回北海道牛受精卵移植研究会大会、2016年8月2日、北海道大学学術交流会館（北海道・札幌市）。

的場理子、子牛を増産するために卵子と胚生産を最大化する技術の活用（招待講演）2016年6月24日、愛知県畜産総合センター（愛知県・岡崎市）。

Imai K, Embryo selection system using the kinetics of early embryo development in bovine embryos produced in vitro and pregnancy outcome. Workshop: Embryo technologies, 18th International Congress on Animal Reproduction（招待講演）, 2016年6月28日, Le Vinci (France).

Imai K, Cattle ovum pick-up (OPU) and its application. Far-East Asia networking of dairy technology connected with ICAR guidelines for young farmers（招待講演）, 2016年5月25日, Tainan (Taiwan).

今井 敬、高受胎率を可能にしたタイムラプスと胚代謝評価による牛体外受精胚のセレクション、第57回日本卵子学会学術集会ランチョンセミナー1（招待講演）2016年5月14日、朱鷺メッセ（新潟県・新潟市）。

的場理子、家畜の増殖におけるウシの卵子と胚の活用、日本畜産学会第121回大会分野別シンポジウム（形態・生理分野）「豊かな食生活に貢献する家畜の増殖は大丈夫」（招待講演）2016年3月29日、日本獣医生命科学大学（東京都・武蔵野市）。

Matoba S, Kaneda M, Somfai T, Nagai T, Geshi M. Relationship between gene expression in individual blastomeres of 2-cell stage bovine embryos and the normality of first cleavage. 42nd Annual Conference of the International Embryo Transfer Society. 2016年1月25日, Louisville (USA).

Takayama M, Dochi O, Imai K. Effects of kinetics and morphology on early embryonic development in bovine OPU-IVF embryos. 42nd Annual Conference of the International Embryo Transfer Society. 2016年1月25日,

Louisville (USA).

Imai K. Bovine embryo production system using ovum pick-up and in vitro fertilization in donors treated with follicular wave synchronization and superstimulation treatments. The 6th national congress of Turkish Society of Veterinary Gynecology（招待講演）. 2015年10月15日～10月18日, Lykia (Turkey).

高山茉莉、石原功一、片桐成二、森好政晴、堂地 修、今井 敬、OPU-IVFによる牛胚の生産成績および新鮮胚移植における受胎成績、第34回北海道牛受精卵移植研究会定期総会・研究発表会、2015年8月11日、酪農学園大学（北海道・江別市）。

的場理子、2015年第41回国際胚移植学会大会の概要、平成26年度受精卵移植関連新技術全国会議（第19回）（招待講演）2015年2月19日、農林水産業筑波事務所農林ホール（茨城県・つくば市）。

的場理子、ソムファイタマス、永井 卓、下司雅也、種雄牛の違いあるいは精子の性選別の有無が胚盤胞期胚への発生能の予測基準となる初期卵割に及ぼす影響、第30回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会、2015年2月6日、秋田キャッスルホテル（秋田県・秋田市）。

- 21 Matoba S, Somfai T, Nagai T, Geshi M. The effects of bulls and X-sorting of sperm on the accuracy of non-invasive criteria to predict blastocyst formation of in vitro produced bovine embryos. 41th International Embryo Transfer Society Annual Conference. 2015年1月10日, Versailles (France).

〔図書〕（計1件）

今井 敬、デーリィマン社、「乳牛改良で生産性向上」の中の「生体卵子吸引と体外受精によるウシ胚の生産」、2016、pp.149-158.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

的場 理子 (MATOBA, Satoko)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門・家畜育種繁殖研究領域・上級研究員

研究者番号：60592574

### (2) 研究分担者

今井 敬 (IMAI, Kei)

酪農学園大学・農食環境学群・教授

研究者番号：70343994

金田 正弘 (KANEDA, Masahiro)  
東京農工大学・農学研究科・助教  
研究者番号：80469840

(3)連携研究者

平尾 雄二 (HIRAO, Yuji)  
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合  
研究機構畜産研究部門・家畜育種繁殖研究  
領域・ユニット長  
研究者番号：10355349