

2008.6.2

牛の繁殖技術 人工授精から体細胞クローンまで

国立大学法人鹿児島大学農学部獣医学科
臨床獣医学講座 獣医繁殖学分野

教授 小島敏之

牛繁殖技術の研究開発の最大の目標

- 優良な遺伝形質を有する個体あるいは系統を効率的に増殖させる技術を開発し、動物性蛋白質供給の安定化を果たすことにある

生命の根元を見極めようとする
生命倫理に立脚した
敬虔な研究姿勢

牛繁殖技術の研究開発の流れ

- 人工授精（←種雄牛の選抜）
- 精液の凍結保存（⇒広域化による普及促進）
- 受精卵移植関連技術（←優良雌の選定）
- 受精卵の凍結保存（⇒広域化による普及促進）

- 体外受精関連技術（⇒体外培養技術の進展）
 - 生体卵子吸引とのドッキング
- 受精卵の顕微操作技術（⇒顕微操作技術の進展）
 - ⇒一卵性双子、性判別(バイオプシー、PCR)、
顕微授精、受精卵クローン
- 体細胞クローン技術

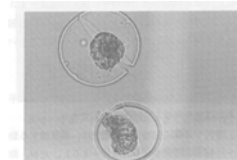
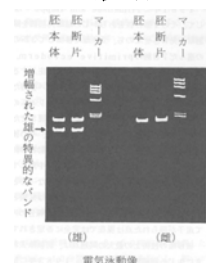


図8-8 切断後空の透明帯へ注入した胚



技術開発と法的整備の連携

- 人工授精実用化開始(1950年)
 - 家畜改良増殖法制定
- 凍結精液の実用化(1961年)
 - 家畜改良増殖法改正
- 受精卵移植の普及(1983年)
 - 家畜改良増殖法改正
- 体外受精卵の実用化(1992年)
 - 家畜改良増殖法改正

牛の繁殖技術の代表例

1. 人工授精技術

2. 受精卵移植技術

(体内受精卵移植と体外受精卵移植)

3. クローン技術

(受精卵クローンと体細胞クローン)

1. 人工授精技術

- 発情を示す健康な雌牛に、優良な雄牛の精液を人為的に雌牛の生殖道内に注入することによって子牛を生産する技術
- 背景;精液の凍結保存技術の確立
- 現在の飼養雌牛のほぼ100%が凍結精液による受精



凍結精液
が保管され
ている液体
窒素タンク

➤特徴

- ✓ 農家における雄牛の繋養経費の節減、技術としては非常に単純
- ✓ 生まれる子の性別は予知不能、優良さも雌の要因が50%関与するので未知数 → 精子の性判別技術が実用化に近い
- ✓ 現在、ホルスタイン雌牛に黒毛和種の凍結精液を人工授精する割合が30%を超える

2. 受精卵移植技術

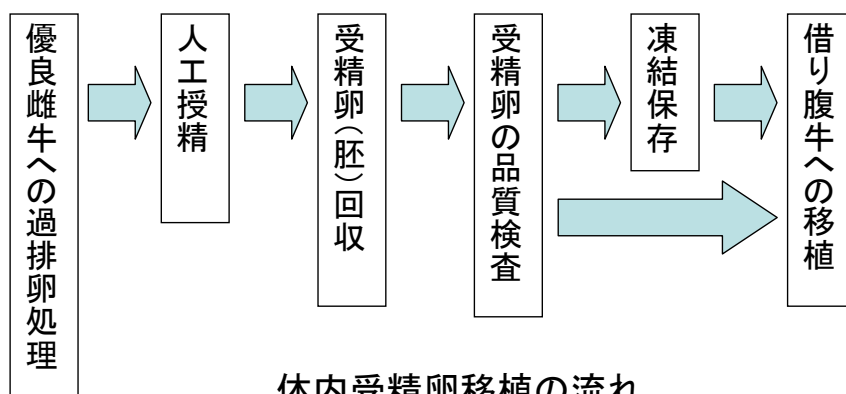
●受精卵(胚)を人為的に別の雌牛の生殖道内に注入することによって子牛を生産する技術、胚移植(Embryo Transfer)ともいわれる

➤特徴

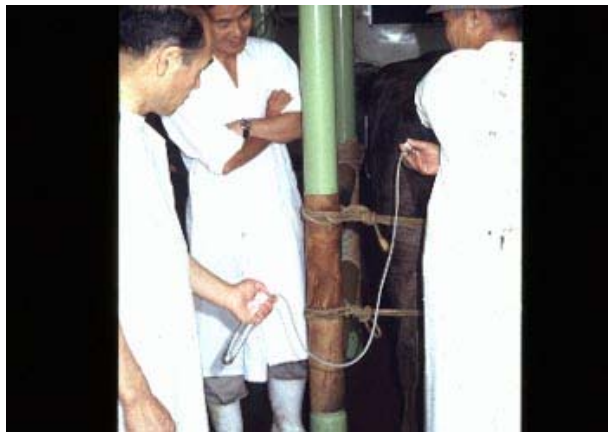
- ✓ 受精卵移植技術は雌雄両方からの改良が可能となる。しかし、過剰排卵処理を施された雌牛から採取される受精卵の数は1回当たり平均6個に過ぎないので、1回の採精当たり200頭の雌牛への授精分が取れる人工授精に比べて、改良効率は比べものにならないほど低い
- ✓ 受精卵の性別は制御不可。受精卵の性判別は可能であるが、手間がかかり効率も悪い
- ✓ 雄牛の能力は後代検定(間接検定)で証明済みだが、雌牛の能力は過剰排卵に対する反応のよいものが選ばれる傾向で、必ずしも遺伝率は高くない
- ✓ 受精卵の洗浄を行えば、伝染病に罹患している動物からの受精卵から健康な子畜を生産することができる
- ✓ 現在、ホルスタイン雌牛に黒毛和種の受精卵を移植して子畜を生産する方式が酪農家の副収入源となっている

2-1 体内受精卵移植

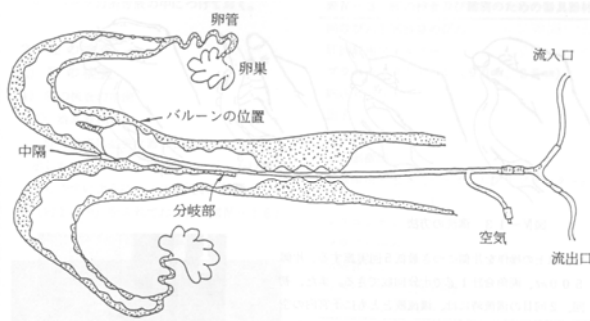
- 過剰排卵処理を施した雌牛に人工授精した後、受精卵(胚)を採取し、別の雌牛の生殖道内に注入することによって子牛を生産する技術
- わが国では、現在の全産出子牛数の約1%がこれに由来する
- 背景: 非外科的な受精卵の回収・移植技術、受精卵の超低温保存技術の確立



受精卵の採取



子宮洗浄(灌流)により受精卵を採取している



図N-11 牛受精卵採取の方法(模式図)

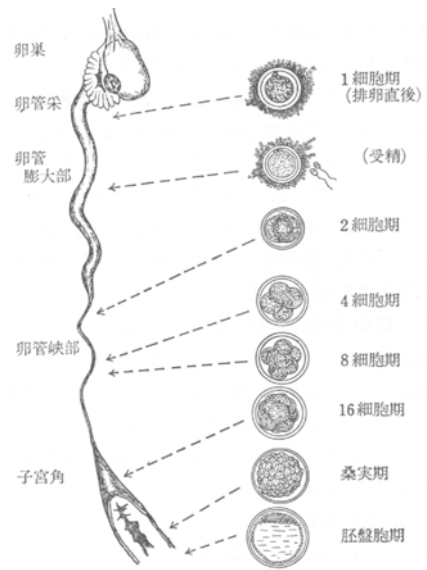


図 3.3 卵子の卵管下降

牛受精卵の发育経過と存在部位

牛受精卵の移植方法(技術の変遷)

杉江博士が世界で初めて非外科的移植で子牛を産ませたときに採用した方法

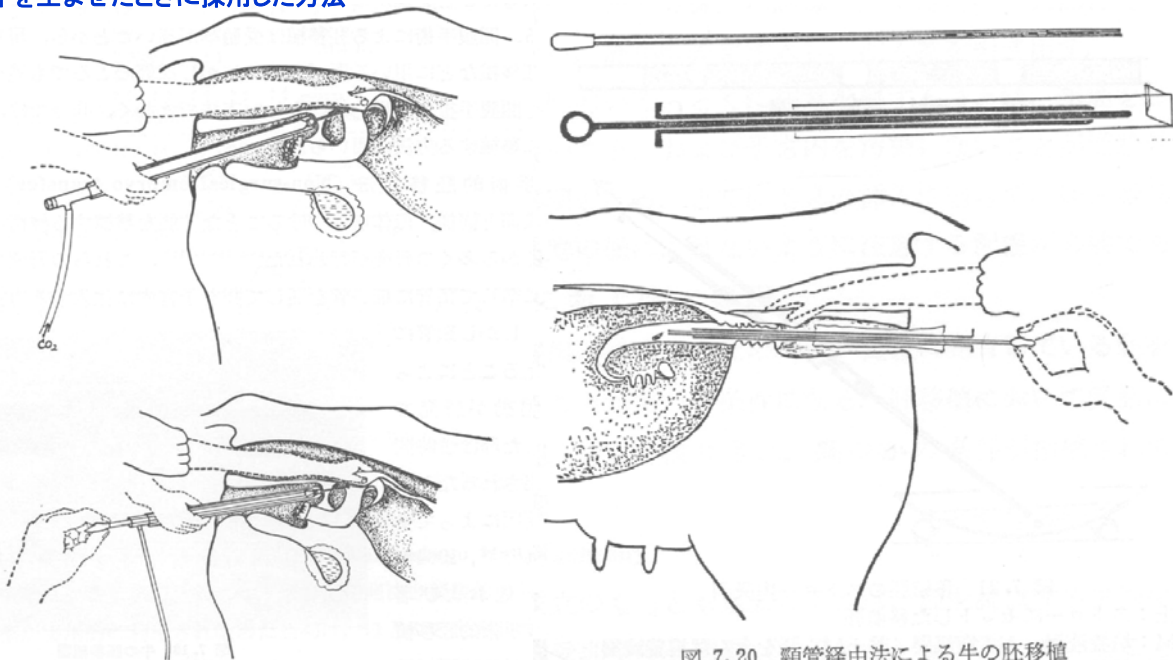
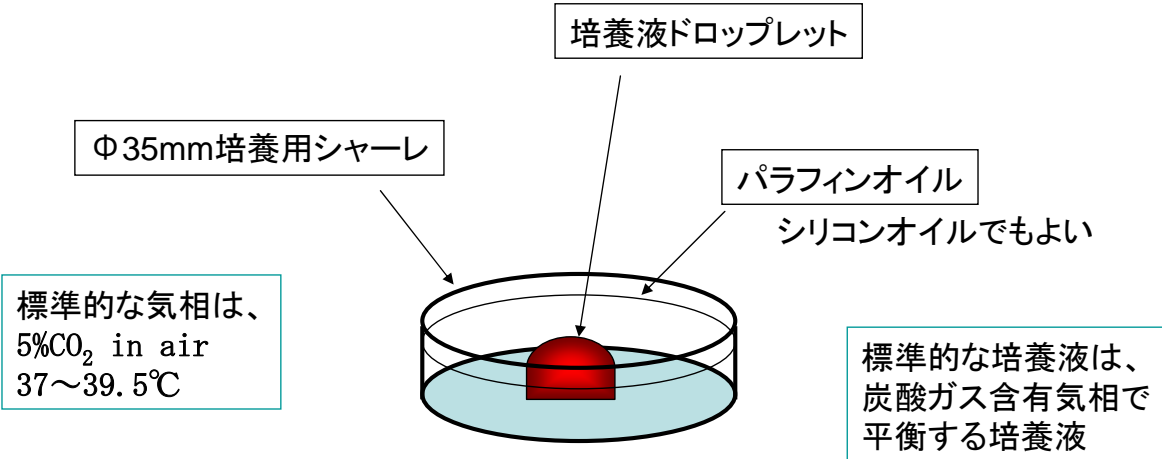


図 7.19 頸管迂回法による牛の胚移植

図 7.20 頸管経由法による牛の胚移植

受精卵の体外培養法

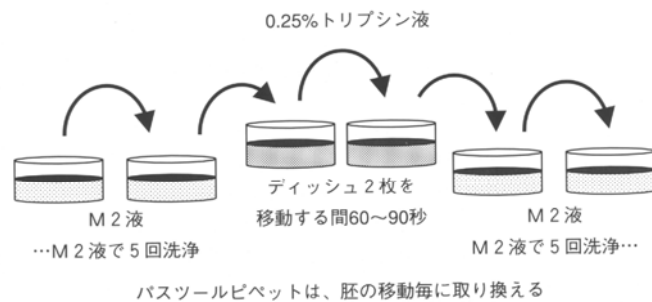


この培養方法の特徴は、

- ・少量の培養液で済む
- ・顕微鏡観察が容易
- ・パラフィンオイル等で表面を覆うので、衛生的な取り扱いが可能

(微量滴培養法)

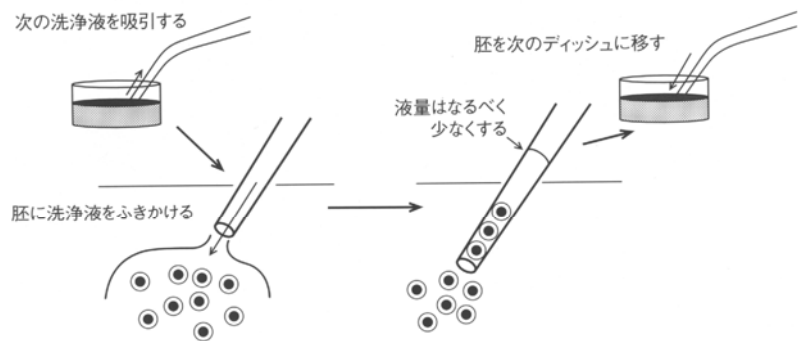
図7. 胚洗浄の手順



胚の洗浄

胚の透明帯に付着しているかも知れない病原体を洗浄することによって、可能な限り数を減らし、産まれてくる子牛はもとより受卵牛にも感染する機会を最小にする。

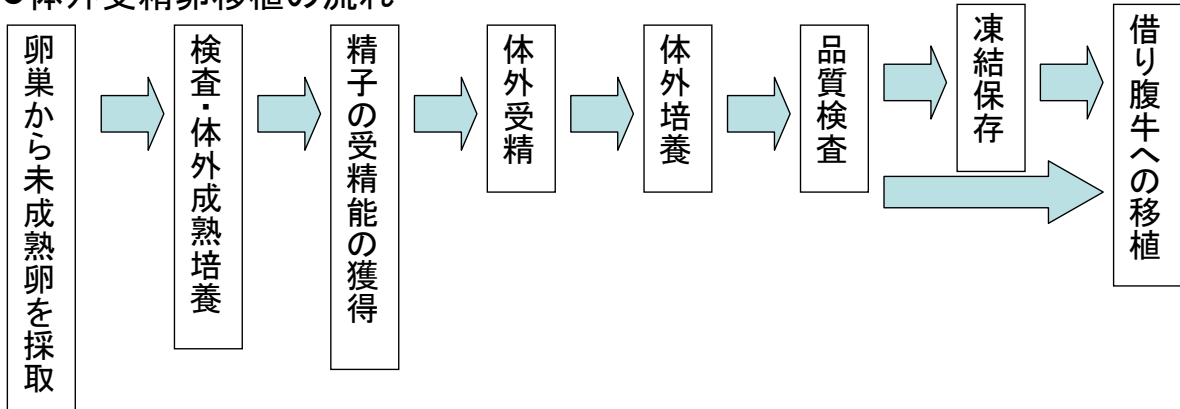
図8. 胚の洗浄



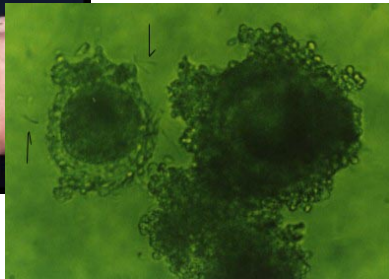
胚が入っているM2液を次のディッシュに持ち込量をできるだけ少なくするために次の洗浄液 (M2またはトリプシン液) で胚の周囲環境を置き換えながら胚を移動させる。

2-2 体外受精卵移植

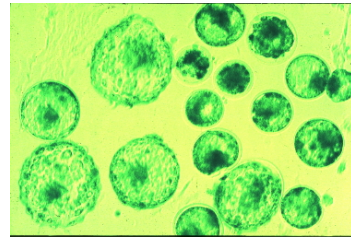
●体外受精卵移植の流れ



卵巣からの卵子吸引



体外受精(矢印は精子)



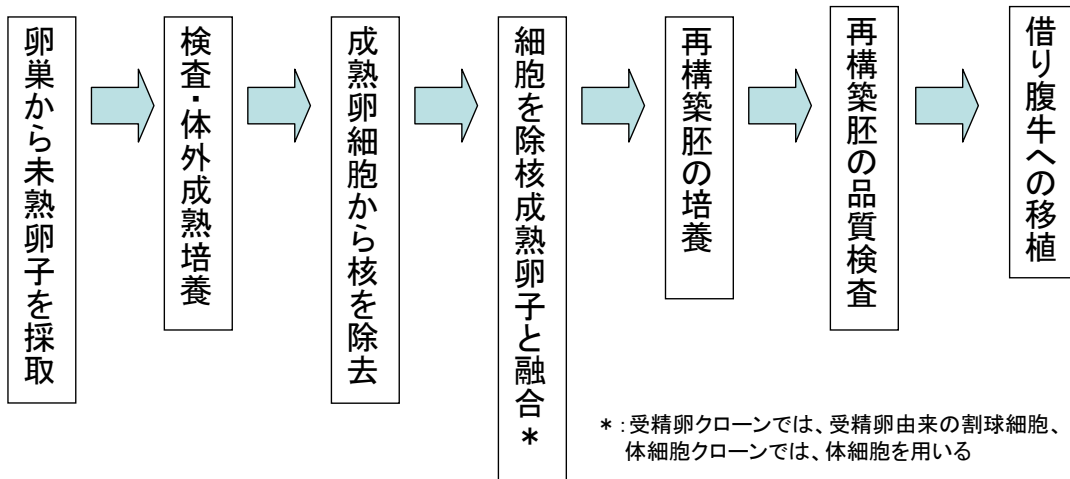
体外培養で発育した牛受精卵



移植

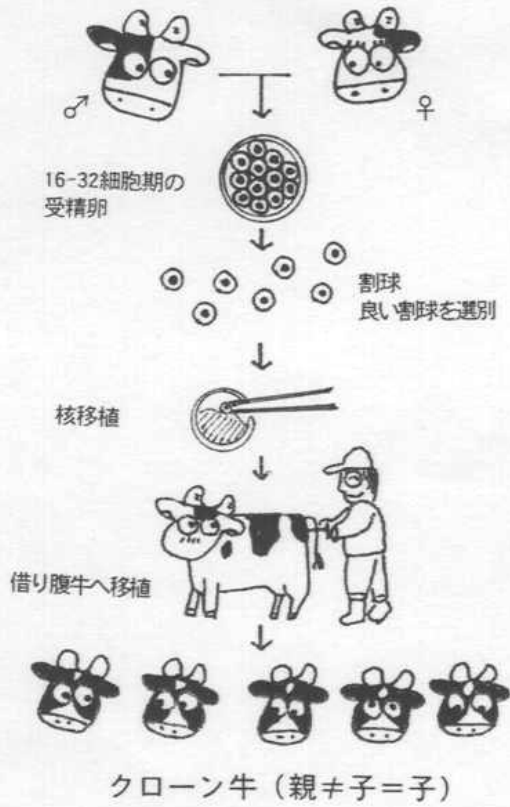
3 クローン技術(核移植技術)

- 細胞を提供する動物と核内遺伝子構成が同一な個体を作出する技術
- 受精卵由来の割球を用いる『**受精卵クローン**』と体細胞(培養した線維芽細胞)を用いる『**体細胞クローン**』がある
- クローン作出の流れ



*: 受精卵クローンでは、受精卵由来の割球細胞、体細胞クローンでは、体細胞を用いる

受精卵クローン



体細胞クローン



生体卵子吸引

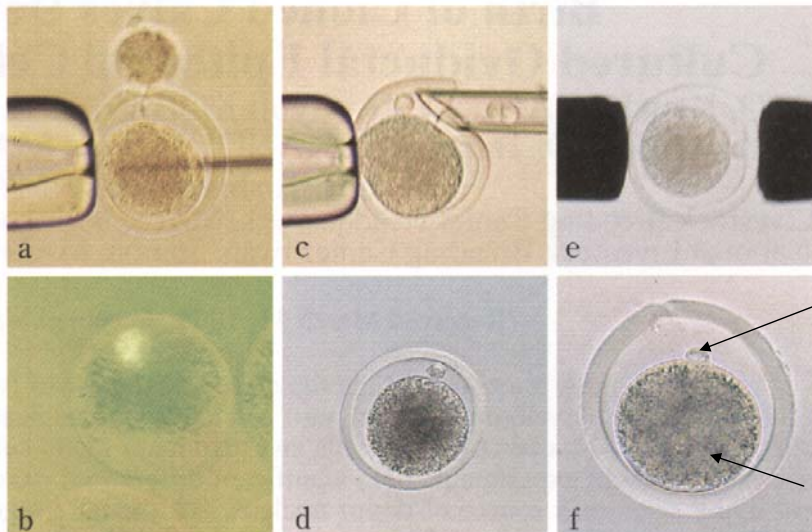


Fig. 1. Bovine oviductal epithelial cells in confluent condition (original magnification: x 200)

卵管上皮細胞を培養してシャーレ全面に発育した状態の線維芽細胞(ドナー核となる)

体細胞クローン技術

牛のクローン技術(核移植)は、ドナー細胞核と除核成熟卵との電気融合による細胞融合法を用いている



ドナー核を含む細胞

除核された成熟卵(未受精)

Fig. 2. Procedures of nuclear transfer using oviductal epithelial cells.

体細胞クローン技術の特徴

長所

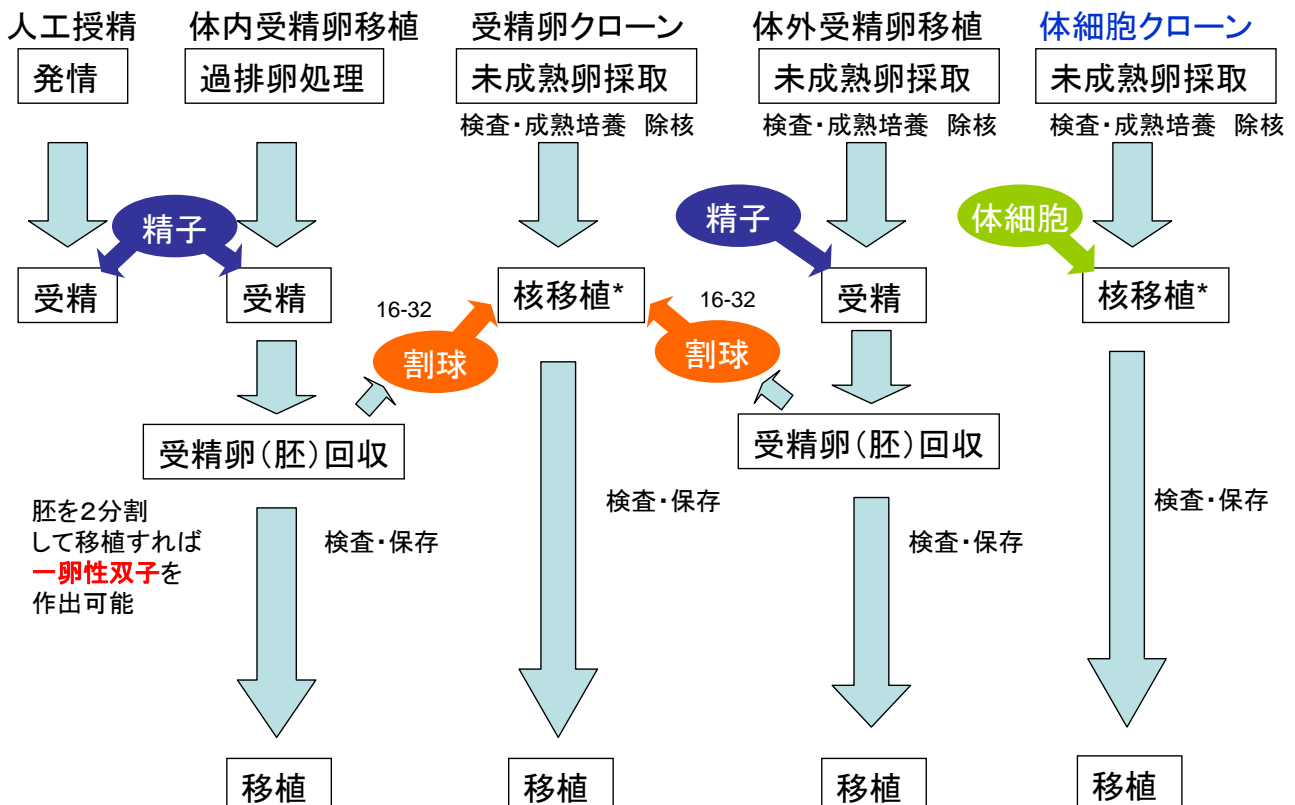
- 生産効率は、ある意味非常に高い(理論上、体細胞クローンでは遺伝子構成が同一な動物を無数に作出することが可能)
- 優良・希少形質保有動物の複製が可能(細胞提供動物の制限)
- 性別が制御できる(細胞提供動物と性は一致する)

短所

- 世代更新ができない
- 体細胞クローン(受精卵クローンも同様)では、核の初期化が必要
- 現在の技術水準では、早期胚死滅、流産、死産、生後直死の発生率が、人工授精、体内受精卵移植、体外受精卵移植、受精卵クローンに比べて有意に高い

牛の繁殖技術の概要

*: 受精卵クローンおよび体細胞クローンでは、ドナー核(細胞)を除核した成熟卵子と融合させるので、核をうまく初期化できるかどうかは鍵となる

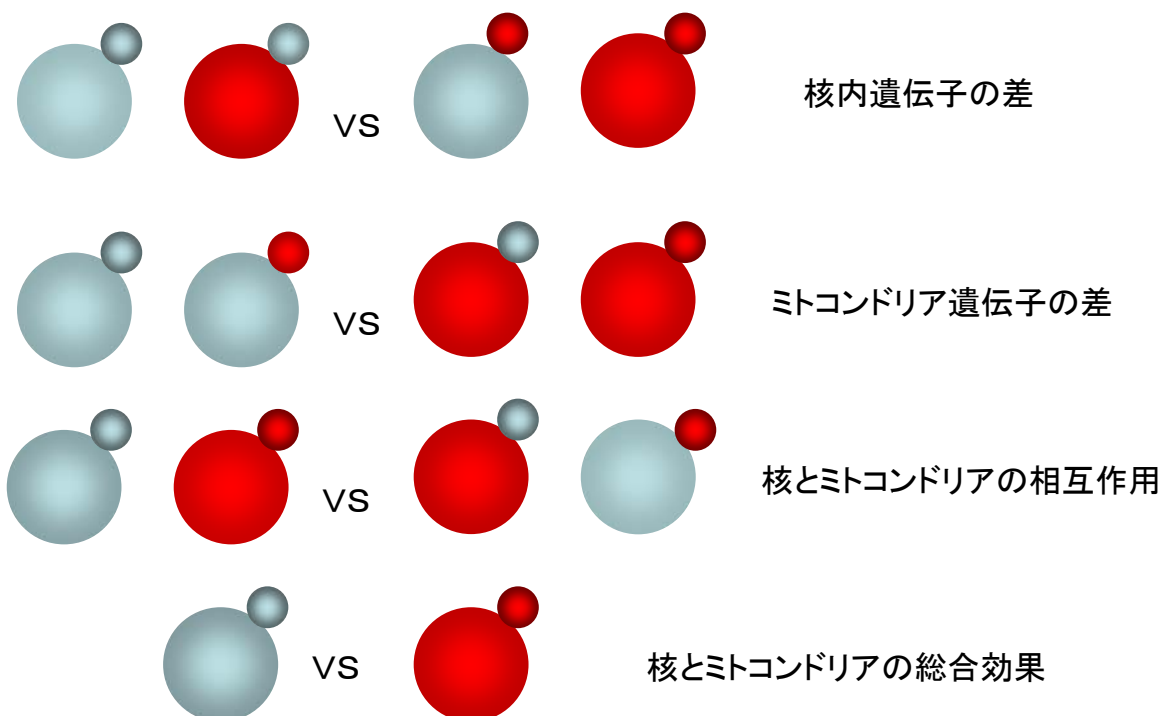


核とミトコンドリアDNAとの関係

	従来の繁殖技術	体細胞クローン技術
細胞核 遺伝子	細胞核の遺伝子は、雌雄の遺伝子が一對を形成する	細胞核の遺伝子は、細胞提供動物の2n遺伝子
ミトコンドリア 遺伝子	雌畜の卵子(受精後の)由来	除核された成熟卵(活性化が必要)由来

- ▶ ミトコンドリアDNAの複製とその遺伝子発現は細胞核の制御下にある
- ▶ 核とミトコンドリアDNAの不適合による核内遺伝子の発現異常、細胞死、染色体異常が起こり、流産などの一因となっている可能性あり
- ▶ ミトコンドリアDNAの変異は、受精卵、個体の生存性に影響が及ぶものもある(変異の蓄積には年数が必要; 家畜の平均生涯年齢は短い)
- ▶ **牛のクローン(核移植)では、核とミトコンドリアDNAは同種由来**
- ▶ したがって、流産、出生直後の死産等の原因をミトコンドリアと核との不適合に帰する科学的根拠は乏しい → 核の初期化に原因?

ミトコンドリアDNAの役割を調べる手段



クローン技術の種類

クローンの種類	長所	短所
切断2分離	クローン間の遺伝的相同性が高い、技術的、装置面で取り組みやすい	最高でも2頭、最高の資質を持った胚とは限らない
割球分離	クローン間の遺伝的相同性が高い、3頭以上が期待できる	成功例が少ない、最高の資質を持った胚とは限らない、
胚由来核移植	クローン頭数を増やせる(使用する受精卵の細胞数だけ)、リクローンが可能	最高の資質を持った胚とは限らない、死産・生後直死率が高い、
胚培養系核移植	クローン頭数を無限に増やせる、ドナー核を培養系で維持できる	成功例が少ない、最高の資質を持った胚とは限らない、
胎子細胞培養系核移植	培養系確立が胚培養系より容易、クローン頭数を無限に増やせる	胎子採取が倫理上、技術上で問題あり、最高の資質を持った胎子とは限らない
体細胞核移植	産子の能力を高い確率で予想できる、性が細胞提供動物と同じ、1頭でも価値あり	世代更新ができない、適した細胞種が不明、死産・生後直死率が高い

技術指標となる数字(わが国)

- 繁殖雌牛 約260万頭 vs 雄牛 約2千頭
- 飼養されている雌牛のほぼ100%に凍結精液による人工授精が行われている
- 受精卵移植による産子: 全産子数の約1%に相当
 - 体内受精卵移植産子数 16,155頭(2005年)
 - 体外受精卵移植産子数 2,308頭(2005年)
 因みに、ヒト体外受精児出生数 約1万人(出生数の1%)
- 新生子の死亡: 人工授精 5.3%、体内受精卵移植 4.6%
 体外受精卵移植 7.5%、受精卵クローン; 716頭 15%、
 体細胞クローン; 535頭 31%
 (クローンの場合は、死産と生後直死の合計; 2007年統計)

まとめ

- 牛繁殖技術の進展の歴史から明らかのように、わが国における動物性蛋白質供給量の増大に応えるために、産業的に優良な形質を持つ個体・系統の増殖を可能にする技術として、人工授精、受精卵移植、クローン技術が関連の科学技術の発展と相まって開発されてきた

まとめ

- 人工授精技術は開発から実用化まで約20年
- 牛受精卵移植も開発から普及まで約25年
- 体細胞クローンは開発されてたかだか10年あまり。技術進展の高速化を差し引いても、その技術の複雑さから推定して、その完成までもう少し時間がかかるのではないか

まとめ

- 優良形質の遺伝力の強い雄の子を増やしたい(人工授精)
- 雌雄両方から改良したい(受精卵移植)
- 特定の品種を増産したい(受精卵移植)
- 優良種畜の改良速度と検定精度を上げたい(クローン技術)
- 性の生み分けをしたい(体細胞クローン)
- 能力既知の特定個体(種畜)をより迅速に時間の壁を越えて再生したい(体細胞クローン)

- 限られた資源、限られた土地を活用するわが国畜産にとって、これらの要求を満たす技術開発は必然的なものであった

革新技術を導入することによって、今後の研究によって技術の向上(事故率の低減、生産効率の向上)を図る必要がある