

氏名	野口龍生
学位(専攻分野の名称)	博士(農学)
学位記番号	乙第951号
学位授与の日付	令和2年10月20日
学位論文題目	<b>高受胎を得るためのウシ胚移植技術の開発</b>
論文審査委員	主査 教授・農学博士 野村こう 教授・博士(農学) 岩田尚孝 教授・博士(農学) 白砂孔明 博士(農学) 松山秀一*

## 論文内容の要旨

酪農経営において、受胎率の低下が問題となっており、このことは直接酪農家の収益に損害を与えているが、その原因は多岐にわたり明らかになっていない部分が多い。

酪農家の収入源として子牛の販売は重要であり、その生産手法として胚移植が広く用いられている。黒毛和種の肥育素牛価格は高騰しており、黒毛和種子牛の増産が求められている。このため、胚移植技術は乳牛に黒毛和種生産をさせるためには欠かすことのできない技術であり、効率的な胚移植による子牛生産は我が国畜産業の発展に寄与する。

効率的な胚移植には、胚の質、移植技術および受胎牛の状態が重要な要因として挙げることができ。本研究は胚移植に対しこれら3つの要因に対して研究を進め良質な胚に必要な条件、高受胎率を得るための手法の開発そして繁殖雌牛の状態を把握する手法の開発を行った。

まず、胚の質に対する研究として、体内胚と体外胚の遺伝子発現の差について検討した。胚は一般的に体内から採取する体内胚と卵巣内の卵子を体外受精させて作成する体外胚がある。体外胚は長年の培養技術の進展にもかかわらず体内胚に比べて品質に劣る。そこで体内胚を大量に確保し、体外で作成した胚と次世代シーケンサーを用いて比較したところ体外胚で酸化ストレスや増殖因子による影響が観察され、またミトコンドリアに関する遺伝子発現に大きな差が認められた。ミトコンドリアのDNAコピー数をリアルタイムPCRで測定すると体内胚におけるミトコンドリア数が少なく、さらにミトコンドリアの機能の一つであるATP量を比較すると体内胚で低い結果となった。このことは卵子と異なり良質な胚盤胞はミトコンドリア数が少なくATPが少ないという最近の知見と合致していた。これらの結果より、体外胚の作成においては異常なミトコンドリアの増加を防ぎ、酸化ストレスを減らすような培養環境の必要性が明らかとなった。

\*名古屋大学 大学院生命農学研究科 准教授

次に効率的な胚移植技術の確立を目指し、新たな胚移植方法の開発に取り組んだ。胚は妊娠因子の1つであるインターフェロンを分泌することが知られており、子宮内に複数胚が存在する場合、この量も増加する。ただし、ウシは単胎の動物であるため、多胎となった場合様々な事故が生じる。単為発生胚は受胎することがないがインターフェロンの分泌量が通常の胚に比べて多く、体外胚および単為発生胚の培養液上清でも細胞にインターフェロンへの応答産物である ISG15 を確認できる結果を得た。そこで人工授精後に、受胎しない単為発生胚を移植した。単為発生胚単独の移植からは受胎は観察されず、人工授精後に胚を移植した場合は高い受胎結果が得られた。この手法を受胎困難な乳牛のリピートブリーダーに応用したところ受胎が確認できたため単為発生を凍結保存し、人工授精後に移植する手法により低受胎牛の繁殖技術として有用であることが判明した。

3 つめの課題として受胎牛の受胎に影響する生理的な状態の新たな把握方法について検討した。これまで受胎牛は視覚によるボディコンディションスコアを評価の指標としてきたが、今回の研究では細胞外 DNA に着目した。血中には細胞由来する DNA が含まれるがこの量は生理状態と比例すると考えられている。まず最も生理状態が変化する分娩前後を対象に 15 頭のウシから 4 日おきに採血し、血液中のミトコンドリア由来する細胞外 DNA をリアルタイム PCR によって測定した。測定値は分娩後上昇しその後低下した。このデータと血液生化学データを比較するとトリグリセライドと負の、LDH と正の相関がある事が明らかとなった。このことから血液中のミトコンドリア由来細胞外 DNA 量はウシの生理状態で大きく変化することが明らかになった。次に人工授精時に採血を行い受胎結果と比較したところ、受胎牛において高いミトコンドリア由来 DNA 量が確認できた。この結果よりミトコンドリア由来の細胞外 DNA を測定することでその牛群の受胎性の把握に活用することが出来ると考えられた。

胚移植による受胎性は胚、移植技術、受胎牛の把握と選抜という要因によって成立する。胚移植を用いた子牛生産には今後体外胚の活用比率が高まると考えられ、本研究知見は胚作成方法の改善に資すると考える。また乳牛における受胎率向上の有効な対応策として単為発生胚の併用が有効である事が判明し、これは新しい胚移植技術として活用が出来ると考える。最後に様々な牛群において受胎性が大きく異なっているがその分子背景は不明なことが多く、細胞外 DNA の測定は非常に簡単な手法であるため牛群の受胎性把握に活用できると考える。

## 審査報告概要

ウシでは胚移植や人工授精といった生殖補助技術が盛んに用いられている。一方でこの成功率は酪農家の収益に直接影響するため、経営の健全化には非常に大事な要因である。本研

究では胚移植においてその利用数が増えている体外受精胚の質を改善するため、体内から回収した胚と遺伝子発現やミトコンドリアの機能や数を比較することで、体外受精胚の質が低い原因を推測する事ができた。また体内胚の質に関わる卵管因子についても示唆的な知見を得た。次に胚移植や人工授精の成功率を高めるため、妊娠認識にインターフェロンが重要な働きをする事を利用し単為発生胚を追い移植する事の有効性を検証し、低受胎牛に一定の効果があることを示すことができた。さらに、繁殖牛の状態をより詳細に把握するための新規の指標として、血中のミトコンドリアに由来する細胞外 DNA を測定し、これがウシの血液性状と相関することを明らかにした。このためこの細胞外 DNA の測定によりこれまで感知できなかった牛群の状態を把握できる可能性が示された。本研究はウシの胚移植や人工授精の受胎率改善に資する新規性のある知見を多く得たことから、審査員一同は博士（農学）の学位を授与する価値があると判断した。