

体細胞クローン牛の精液を用いた受精能力調査

梅木英伸・志村英明・藤田達男・赤峰正雄¹⁾・志賀一穂
(大分県畜産試験場・¹⁾ 玖珠家畜保健衛生所)

Hidenobu UMEKI, Hideaki SIMURA, Tatuo FUJITA, Masao AKAMINE and Kazuho SHIGA :
Investigation of Reproductive Ability on Somatic Cloned Japanese Black Bulls

体細胞ドナー牛と体細胞クローン牛および同一の体細胞より作出されたクローン牛間の繁殖機能を含む生理機能の相同性については解明されていない。

今回、体細胞クローン雄牛の繁殖機能を確認するため、黒毛和種の体細胞核移植により作出された2頭のクローン雄牛およびこれらの体細胞ドナー牛である種雄牛の精液を用い、体外受精ならびに人工授精を行い体細胞クローン雄牛の受精能力を調査した。

1. 材料および方法

供試牛は体細胞を採取した種雄牛の糸福号 (1984年11月18日生)、糸福号の体細胞より作出された体細胞クローン牛夢福号 (1998年11月24日生) および第2夢福号 (1999年4月16日生) の計3頭の精液を用いた。なお、クローン牛作出に用いた体細胞はドナー牛である糸福号が12歳齢時に採取したものである。

1) 体外受精能に関する調査

体外受精における各添加物が精子に及ぼす影響において糸福号精液は、以前の試験で¹⁾ 受精能獲得誘起のために添加されるカフェインに比べ、その異性体のテオフィリンの方が初期・胚盤胞発生率を改善することが示されたことから、クローン牛の夢福号と第2夢福号の精液の体外受精能並びにドナー牛とのテオフィリンへの感受性の相似性について検討した。

1日目に屠場由来の卵巣から未成熟卵子を回収し、5%非働化子牛血清添加TCM199において20~22時間培養 (38.5℃, 5%CO₂, in air)。2日目は精子洗浄・媒精用ヘパリン添加BO液に10mM カフェインまたは10mM テオフィリン添加BO液を用い5時間媒精 (38.5℃, 5% CO₂, in air)。媒精後、機能性ペプチド研究所のIVMD-101にて24時間培養 (38.5℃, 5%CO₂, in air) した。3日目は同研究所のIVD-101にて裸化卵子受精卵低酸素培養 (38.5℃, 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂) を実施、その後3~4日目にIVD-101液を半量交換した。また、媒精日を0日として2日目に初期発生率を、また9日目までの胚盤胞発生率を調査した。

2) 精液精状・凍結能・受精能に関する調査

体細胞クローン雄牛2頭は、生後13ヶ月より週2回精液を採取し、精子生存率・活力・pH・奇形率を調べた。精液の凍結能については凍結融解後の精子生存率と活力を調べた。受精能については夢福号の精液による人工授精を場内黒毛和種雌牛に行い、授精後30日目に後超音波診断装置を使って妊娠鑑定を実施した。

2. 結果および考察

1) 受精能獲得処理にカフェインまたはテオフィリンを用いた体細胞クローン雄牛夢福号と第2夢福号の体外受精後の初期発生率は、それぞれ59.9%vs84.1%および56.7%vs85.2%であった。また胚盤胞発生率はそれぞれ8.0%vs23.4%および8.5%vs28.4%であり、双方とも初期発生率、胚盤胞発生率ともにテオフィリン添加区が有意に高くカフェイン添加に比べ差を認めるとともにクローン牛間の成績はよく相似していた。また、糸福号に

おいて両処理区間に有意差を認めなかったが、夢福号、第2夢福号と相似した傾向を示した (第1表)。

2) 生後14~15ヶ月齢における平均において、精液量は夢福号2.1ml, 第2夢福号2.7ml, 精子数は夢福号78.2×10⁷/ml, 第2夢福号102.9×10⁷/ml, pHは6.4~7.0, 奇形率は5%以下であった (第2表)。精子活力+++を示す精子生存率は、14ヶ月齢以降で採取直後70%以上、凍結融解後で35%以上で推移した (第3表)。

夢福号の精液を用いた受精能は、液状精液で5頭中3頭受胎 (受胎率60%, 内1頭流産)、凍結精液で22頭中9頭の受胎 (受胎率40.9%) を確認した。また、2000年10月19日に夢福号の二世の第1号が誕生した。現在までに雄7頭、雌3頭 (内1頭分娩後死亡) が分娩した。

今回調査した体細胞クローン雄牛の夢福号および第2夢福号の体外受精能、精液性状、受精能に異常が認められなく、夢福号および第2夢福号の繁殖機能は正常であった。このことから体細胞ドナー牛の糸福号と同様に種雄牛として供用が可能であると考えられた。

引用文献

1) 永山興宣・広瀬啓二・志賀一穂：大分県畜産試験場試験成績報告書 23, 31-34, 1994.

第1表 対外受精能に関する調査成績

種雄牛	処理区分	処理回数	供試卵数	初期発生(率)	胚盤胞発生(率)
糸福	カフェイン	3	192	150(78.1)	33(17.2)
	テオフィリン	2	204	168(82.4)	63(30.9)
夢福	カフェイン	3	274	164(59.9) ^b	22(8.0) ^b
	テオフィリン	2	214	180(84.1) ^a	50(23.4) ^a
第2夢福	カフェイン	3	224	127(56.7) ^c	19(8.5) ^c
	テオフィリン	2	183	156(85.2) ^a	52(28.4) ^a

注) 同一枠内の異符号間に有意差有り a-b:(P<0.05), a-c:(P<0.01)

第2表 精液性状成績

調査項目	種雄牛	月 齢					
		13ヶ月	14ヶ月	15ヶ月	16ヶ月	17ヶ月	18ヶ月
精液量 (ml)	糸 福	—	—	—	—	4.2	4.1
	夢 福	2.1	1.9	2.1	2.6	3.0	2.7
	第2夢福	2.3	2.7	2.7	—	—	—
精子数 (×10 ⁷ /ml)	糸 福	—	—	—	—	—	—
	夢 福	128.7	118.5	78.2	124.0	174.5	109.3
	第2夢福	61.8	66.1	102.9	—	—	—
pH	糸 福	—	—	—	—	6.36	6.48
	夢 福	6.50	6.66	6.82	6.47	6.65	6.67
	第2夢福	6.85	6.88	6.76	—	—	—

注) 月平均の値

第3表 精液性状成績 (活力+++の精子生存率)

種雄牛		月 齢					
		13ヶ月	14ヶ月	15ヶ月	16ヶ月	17ヶ月	18ヶ月
糸 福	—	—	—	—	—	61.0	57.5
	—	—	—	—	—	35.0	35.0
夢 福	65.0	71.8	71.7	75.0	70.0	78.3	
	20.0	28.3	35.0	35.0	37.5	40.0	
第2夢福	60.0	65.6	72.9	—	—	—	
	27.5	27.3	35.0	—	—	—	

注) 月平均の値

上段:採取直後

下段:凍結・融解後