

海外共同研究演習 報告書

2014年 10月 31日提出

氏名	永井 克尚
所属	診断治療学講座 繁殖学教室
学年	博士課程 3年
出張先	フィリピン カラバオ・センター
出張期間	2014年 9月 17日～10月 18日
目的	水牛への適用を目的とした牛の人工繁殖技術の普及活動

活動内容（2,000字程度、活動内容が判る様な写真や図表を加えて下さい）

センターの繁殖工学部門の主任である **Eufrocina Atabay** 氏は私が所属する教室の卒業生であり、以前から共同で研究課題に取り組むことを打診されていた。特に、と体卵巢に数多く存在する初期胞状卵胞中の卵子を体外で発育培養させ、体外胚生産に供する牛の体外卵胞発育培養法（**in vitro growth culture : IVG**）や体外培養時に共培養する受精卵の数を減少させる個別培養など、近年、本研究室が取り組んでいる研究に興味を持たれ、技術普及および実際に水牛に対する適用を行うことになった。また、ジーン・プールの名を冠した 500 頭規模の水牛を飼養する農場を保有するにも関わらず繁殖管理に秀でた技術者が不足していることから、過剰排卵処置した水牛からの胚回収そして胚移植（**multiple ovulation & embryo transfer : MOET**）および超音波診断装置を用いた経膣採卵法（**ovum pick up : OPU**）の実践を通じて生体内でのホルモン動態など繁殖生理に関する知見を共有した。

センターの主たる研究の対象となる動物は水牛であり、フィリピン国内では乳、肉および役牛として広く飼養される家畜である。滞在時はちょうど米の収穫時期であり、荷車を引く水牛の姿を多く目にした。肉資源としては山羊およびブラーマン種の牛がいたる所で繫留され草を食んでいた。また、フィリピン国内での乳生産の自給率の向上を目的とし、水牛に限らず南米など同様の気候帯において生産性の高いとされる品種（ギロランド種）がセンター内に導入されていた。水牛は牛に近縁であり、牛において広く用いられている人工繁殖技術の多くが適用されているが、牛に比べて卵胞数が少ないなど相違も多く、過剰排卵処置への反応や人工授精後の胚回収成績および OPU による卵子回収数も少ないのが現状である。滞在時には、IVG、OPU および MOET のい



れにおいても水牛と牛の 2 種を使用することができ、種間の違いを確認しながら作業を行うことができた。

【IVG】 と場からの採材の回数を平時よりも増やしてもらい、期間中に水牛で 13 回、牛で 4 回の培養実験を行うことができた。水牛の卵巢は非常に小さく表面に確認できる卵胞数も 10 個程度で牛の約 1/3 と少な



かった。牛においては、現地においても当実験室での結果同様に 12 日間の培養を経て受精能を持つ卵子へと発育させることができたが、と殺からの経過時間や輸送条件などの違いから現地での 4 回の実験で安定した結果は得られなかった。水牛においては、培養の初期段階で卵子から卵丘細胞が容易に分離してしまい、受精能を持つ卵子へと発育させることはできなかった。蛍光染色により卵子・卵丘細胞ともに 12 日間の培養を経ても生存していることは確認できており、両者の複合体としての密接な関係性を維持する機構および因子を解明するとともに水牛に適した培養液組成を考慮する必要がある。

【OPU】 牛 2 頭、水牛 3 頭を使用し、3 日あるいは 4 日間隔での採卵を 3 回（延べ 15 回）行った。1 回目の採卵は動物に過剰排卵処置を施した後に行い、後の 2 回は吸引後に新規に立ち上がった卵胞ウェーブから採卵を行った。牛においては、アスピレーターの



吸引圧を 100 mmHg（流速 16.5 mL/分）に設定して行っていたが、水牛の卵子周囲の卵丘細胞層は牛に比べて薄く採卵に際して剥離してしまう事象が多く認められたため、吸引圧を 50 mmHg に設定して行った。回収率はこれまでの牛で行った自身の成績に比べて低く、要因として水牛の体高の低さ、腸管運動を抑制する硬膜外への麻酔薬注入の有無、ディスプレイではなく再生品の利用による採卵針先端の鈍化などが考えられる。回収した卵丘細胞卵子複合体は体外成熟、体外受精および体外発生培養を行い、牛に関しては後述する MOET に使用するため受胎牛の準備ができなかったが、水牛に関しては桑実胚 2 つを 1 頭の受胎牛に移植した。

【MOET】 指導教員（永野昌志准教授）の渡航に合わせて現地で胚回収および胚移

植を行うため、動物の発情周期を見定めた後に供胚動物（水牛4頭、牛2頭）および受胚動物（水牛4頭、牛2頭）を選定しプロトコルを作成した。プロトコルに使用する薬剤の効果、動物の反応を適宜確認および説明しながら処置を行い、人工授精を現地スタッフに任せて帰国した。同様の気候帯から導入されたギロランド種であるが、餌を含めて飼養管理が十分とは言えず栄養不足からかプロトコル通りに排卵しない牛が多く大変難儀であった。また、フィリピンにおいては日本で一般的に使用されるエストラジオール製剤の使用が禁止されており GnRH 製剤で代用したがこの投与量が回収成績に影響しているかもしれない。上記の理由から牛では移植可能胚は回収できず、水牛では2個の移植可能胚が回収でき準備した受胚動物に移植を行い、妊娠そして出産に至れば我々の名前を付けてくださるとのことである。水牛の卵巣が非常に小さいことは既に述べたが、1ヶ月のフィールドワークで直腸検査による卵巣構造物の確認ができるまで上達し自身の扱える動物種が増えたのは大きな財産となった。水牛においては、牛に比べて受精卵の発生は早いものの子宮への下降が円滑でないなどの報告があり、過剰排卵処置への反応性以外にも排卵数と回収胚数の差異を減じる対策を講じる必要があると考える。

【感想】 上述した研究以外にも、島根大学を定年退職された後にセンターにアドバイザーとして常駐されている藤原勉先生夫妻が行われている活動に同行する機会があった。フィリピンでは市民の経済的格差が非常に大きく、多数の子供を抱える貧困家庭では子供を学校に通わせるゆとりを持ち合わせていない。これに起因する教育的格差が将来の安定した職に就く機会を喪失させる悪循環が問題視されているとのことであった。夫妻は、近隣の貧困家族に山羊を貸し出し生活レベルの向上に助力するとともに、タガログ語しか知らない現地の子供達に英語を指導するなどの活動を行っており、現地住民に親身に接する姿に感銘を受けた。

また、唯一の休日には太平洋側の海辺に連れて行って頂き、日本国内では体験することの出来ない南国のリゾート気分を満喫することができた。

出発前には、1ヶ月の滞在期間は非常に長く感じ不安な気持ちばかりであったが、現地スタッフの皆が非常に親切に接して下さり、あっという間に時間が過ぎた。今回の滞在で得られた結果を研究室内で検討し、改善および解決策を見出すことができたなら、是非また現地を訪問して同一の課題に取り組み、より良い結果そしてセンターおよび現地住民に貢献できるような仕事がしたいと考えています。

(海外実践疫学演習・海外共同研究演習) 指導教員評

指導教員所属・職・氏名	繁殖学教室 准教授 永野 昌志	印
実施内容について講評を記述して下さい		
10月24日～31日まで、私もカラバオ・センターを訪問したが、現地スタッフからの評価は非常に高く、毎日一番遅くまで実験を行っている姿は他の研究者の刺激になっていたとの評をいただいた。フィリピンでの経験を糧にもっと努力して欲しい。		

- ※1 電子媒体を e-mail で国際連携支援室・リーディング大学院担当に提出するとともに、指導教員が押印した原本を国際連携支援室・リーディング大学院担当に提出して下さい。
- ※2 本報告書はリーディングプログラム運営委員会で内容を確認します。その後、教務委員会で単位認定を受けることになります。

提出先：国際連携推進室・リーディング大学院担当

内線：9545 e-mail: leading@vetmed.hokudai.ac.jp