

ダイレクト移植法におけるウシ性判別胚の保存法の検討

誌名	宮崎県畜産試験場試験研究報告 = Bulletin of the Miyazaki Livestock Experiment Station
ISSN	09187278
巻/号	28
掲載ページ	p. 30-32
発行年月	2016年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



ダイレクト移植法におけるウシ性判別胚の保存法の検討

小仲 瑠偉・亀樋 成美¹⁾・鍋西 久²⁾・黒木 幹也・岩下 修³⁾

¹⁾宮崎県東臼杵南部普及センター、²⁾北里大学獣医学部、³⁾宮崎県日向食肉衛生検査所

Examination of the preservation method of bovine sexed-embryo in direct transfer

Rui KONAKA, Narimi KAMEBI, Hisashi NAABENISHI, Mikiya KUROKI, Osamu IWASHITA

<要約>平成21年度から26年度までの6年間、10県の試験関係機関と共同で性判別受精卵のダイレクト移植方法について、受胎率向上のための凍結保存法に関する試験を実施した。性判別受精卵の緩慢凍結法（ダイレクト法）において耐凍剤の検討を行ったところ、1.36M グリセリン(10%) + 0.25M シュークロースおよび0.68M グリセリン(5%) + 0.2M シュークロースの凍結溶媒を用いた凍結方法において、インタクト胚(無処置胚)と同等の受胎率を有する可能性が示唆された。

ウシの雌雄産み分けは、近年、従来行われてきた性判別胚の移植に加えて、性選別凍結精液が市販されるようになり、後継牛生産への活用が期待されている(Hayakawaら2009; 木村2009)。しかし、性選別精液を利用した雌雄産み分けは極めて高い普及性があるものの、ストロー1本あたりに充填された精子数が通常精液に比べて少ないことなどから、経産牛では人工授精受胎率が低いこと(Andersonら2006)、また現時点では選別率が90%であることや、特定の種雄牛に限定されることなどの問題点も含んでいる。

一方、胚の性判別においては、交配種雄牛とドナー雌牛を自由選択できること、ほぼ100%の性判定精度が得られること、ガラス化保存後でも移植受胎率が40~50%で推移することから、性選別精液の“弱点”を補完しうる技術であると考えられる。しかし、性判別胚の利用については、正常胚を安定的に採取する必要があることや1胚あたりでは高い生産コストがかかるという難点がある。さらに普及性という観点からは、超低温保存した性判別胚がフィールドで比較的簡易に融解可能、かつ経営に有益なレベルの移植受胎率・生産率が得られるような手法を提案する必要がある。

そこで、フィールドでの利便性の高い性判別胚の超低温保存法の確立と普及を目的として、グリセリ

ンを用いた性判別胚のダイレクト直接移植法について検討した。

試験方法

(1) 供試胚

供試胚は、当場で採胚牛として使用しているホルスタイン種または黒毛和種のうち、過剰排卵処理を施した供胚牛から人工授精7~8日目に非外科的に採取したIETSコードの1~2ランクの良質胚とした。試験区は胚細胞塊の10~20%程度をマイクロブレードで部分切除したbiopsy胚、対照区は無処置のintact胚とした。受卵牛(レシピエント)には、黄体日齢7日前後で、機能性黄体を有すると判定された雌牛を使用した。

(2) 性判別方法

性判別は栄研化学株式会社の牛胚性判別試薬キットを使用した。

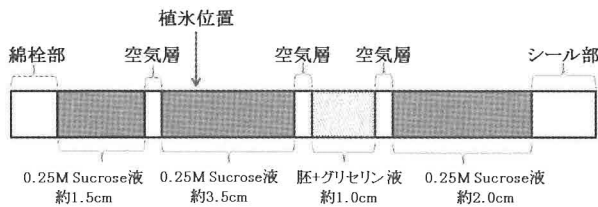
(3) 培養方法

試験区のbiopsy胚は、TCM199+20%FCS+100 μ M-2メルカプトエタノール(β -ME)の培養液を用い、38.5 $^{\circ}$ C、5%CO₂、95%airの培養条件で3~5時間培養した。また、対照区のintact胚も同様の条件下でプレ培養を行った。

(4)凍結方法

凍結方法は、20%CS in m-TCM199 を基調液とした下記試験区のグリセリン液を耐凍剤として用い、プレ培養を行った biopsy 胚および intact 胚をグリセリン液に 10 分間浸漬した後、15 分以内にストローへ装填した(図 1)。あらかじめ各試験区の植氷温度にキープしたプログラムフリーザー(ET1:FHK 社製)のアルコールバスにストローをセットし、1 分経過後に植氷を行った。植氷温度で 10 分間保持後、毎分-0.33℃で-25℃まで冷却し液体窒素に投入した。

図 1 ストローへの充填



(5)胚の融解・移植方法

ストローを液体窒素ボンベから取り出し、空気中で 6~10 秒間保持後、30℃の微温湯に 10~20 秒間水平に保持した。ストローを微温湯から取り出し、移植器に装着して、頸管経由法により非外科的に黄体が確認された卵巣と同側の子宮角の基部から中央部の部位に一胚移植した。

(6)試験区および調査項目

(一社)家畜改良事業団の手法をもとに、試験 1 区を設定した。さらに、グリセリン濃度を低くし、浸透圧を下げることで融解・移植時の浸透圧障害を緩和できると考え、試験 2 区を設定した。

また、各試験区には、biopsy 胚および intact 胚を用いた。

試験 1 (平成 21~23 年度)

①試験区

1 区: 1.36M グリセリン + 0.25M シュクロース (20% CS in m-TCM199)

2 区: 0.68M グリセリン + 0.1M シュクロース (20% CS in m-TCM199)

植氷条件は、1 区: -6℃、1 + 9min、

2 区: -4℃、1 + 9min とした。

②調査項目

凍結融解後の胚の生存性を確認するため、融解後 35mm ディッシュ内にストロー内容液を取り出し、3 分間室温で静置した後、TCM199 + 20%FCS + 100μM-β-ME の培養液に移し、形態観察を行った。その後 1~5 時間培養した後、再び形態観察により生存性判定を行った。生存性を確認した胚は、移植を行い、受胎率について調査した。

試験 2 (平成 24~26 年度)

試験 1 の結果から、試験 2 区のシュクロース濃度を 0.2M に変更した試験 3 区を設定し、移植試験を行った。

①試験区

2 区: 0.68M グリセリン + 0.1M シュクロース (20% CS in m-TCM199)

3 区: 0.68M グリセリン + 0.2M シュクロース (20% CS in m-TCM199)

植氷条件は 2 区、3 区ともに -4℃、1 + 9min とした。

②調査項目

移植後の受胎率について調査した。

(7)統計処理

データは X²検定による有意差検定を行った。

結果および考察

試験 1 で、2 種類の凍結溶媒濃度について凍結融解後の生存性を判定した(表 1)。

1.36M グリセリン + 0.25M シュクロースを用いた試験 1 区と、0.68M グリセリン + 0.1M シュクロースを用いた試験 2 区では、生存率に有意な差は認められなかった。対照区では 2 区の生存率が高い結果となったが、供試胚数が少ないことから、有意な差は認められなかった。このことから、性判別胚のダイレクト移植において、0.68M のグリセリン濃度でも intact 胚と同等の生存性が得られることが示唆された。一方で移植成績については、有意な差は認められなかったものの、試験 2 区で試験 1 区を下回る結果となった(表 2)。

次に、試験 2 において、0.68M グリセリンを用いてさら

なる受胎率の向上を図るため、シュークロース濃度を0.2Mに変更して移植試験を行ったところ、試験3区の受胎率は試験1区と同等の結果となった(表2)。また、対照区については、1区が2区、3区を若干上回ったものの、有意差は認められなかった(表3)。

本試験において、試験1区および試験3区において対照区と同等の受胎率を得た。しかしながら、対照区における全体の受胎率も38.4%にとどまり、最も受胎率の高い対照1区でも50%を超えなかった。これは、各県間で試験結果にバラツキがあったことや、レシピエント牛の状態・移植師の技術など、受精卵以外の要因が影響した可能性も考えられる。

表1 融解後培養成績

試験区分	供試胚数	生存	死滅	生存率(%)
試験1区	72	42	30	58.3
試験2区	87	51	36	58.6
対照1区	35	20	15	57.1
対照2区	32	25	7	78.1

表2 試験区ごとの受胎率

試験区分	移植頭数	受胎	不受胎	受胎率(%)
試験1区	112	40	72	35.7
試験2区	74	19	55	25.7
試験3区	90	33	57	36.7
計	276	92	184	33.3

表3 対照区ごとの受胎率

試験区分	移植頭数	受胎	不受胎	受胎率(%)
対照1区	129	54	75	41.9
対照2区	146	52	94	35.6
対照3区	69	26	43	37.7
計	344	132	212	38.4

今回、3種類の凍結媒液の濃度によって、性判別胚のダイレクト移植受胎率を比較したところ、低濃度(0.68M)グリセリンを用いた2つの試験区のうち、シュークロース濃度が高い3区(0.2M)において、対照区と同程度の受胎率を示した。このことから、耐凍剤に低濃度グリセリンを用いた凍結方法(0.68Mグリセリン+0.2Mシュークロース)においても、高濃度グリセリンを用いた凍結方法(1.36Mグリセリン+0.25Mシュークロース)と同程度の受胎性を有する可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Hayakawa ら (2009), *Theriogenology*, 77:68-73
- 2) 木村 (2009), *家畜人工授精* 251, 1-16
- 3) Andersson *et al.*, (2006), *Reproduction Domestic Animal* 41, 95-97
- 4) Herr, CM. *et al.*, (1990), *Theriogenology*, 33:245-247.
- 5) 佐伯ら (2001), *畜産技術*, 11:5-8.
- 6) Hirayama *et al.*, (2004), *Theriogenology*, 62:887-896.
- 7) Takada *et al.*, (2007), *Reprod. Fertil. Dev.*, 19(1):184-185, abstract.
- 8) 小出ら (2008), 第23回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会講演要旨, 54-55.
- 9) 稲葉ら (2011), 第27回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会講演要旨, 54-55.
- 10) Tominaga *et al.*, (2007), *J Reprod Dev.*, 53:443-447.