

## PCR法により雌雄判別した牛胚の凍結に関する試験

岩尾 健・森本一隆・栗原昭宏・岡田綾子

### 要 約

性判別のためバイオプシーした牛の体内由来胚を凍結した後移植し、凍結前の培養時間、凍結媒液の糖添加が受胎率に与える影響について検討した。

- 1 牛胚69個の性判定を実施し、性判定率91.3%であった。
- 2 性判別のためバイオプシーした後、新鮮胚で移植した場合の受胎率は、凍結後移植した場合に比較して有意に高かった。
- 3 バイオプシーした胚を凍結する前の培養時間は、短時間（3～5時間）培養区が長時間（20～24時間）培養区に比較して受胎率が高い傾向にあった。
- 4 凍結媒液に糖（シュクロース）を添加しない区では受胎例がなかったが、糖を添加することにより5頭（21頭中）の受胎が確認された。

### 緒 言

希望する性の牛を生産することが可能であれば、優秀な後継雌牛を効率よく作出でき、また、肥育効率が高く、市場価値の高い雄牛を生産することが可能となり、酪農、肉牛農家の経営上のメリットは極めて大きい。

性を特定する場合、精子の段階で分別できれば最も波及効果が大きく、利用価値の高い技術となる。しかし、現時点では、フローサイト・セルソータにより精子頭部のDNA含量を判定して、X-精子とY-精子の分離が可能ではあるが、分離能率が低い上、分別精子の生存性が極めて低いことから、人工授精用の凍結精液としては不適であり、実用段階に至っていない。

一方、既に受精した牛胚の雌雄判別は、胚の発生速度（発育の早い胚は雄胚が多い）、品質（高品質胚は雄胚が多い）により、ある程度可能であると報告されている<sup>1)</sup>が、確率論の域を越えることはない。

その点、牛Y染色体の特異的塩基配列をプライマーとして雄性DNAを増幅し、検出する胚の性判別法は、若干の時間、経費がかかるにしても、判定精度、簡便さから既に実用化されており、判定用の試薬も市販されている。

しかし、このPCR法による牛胚の性判別は、性を判定するための検体を、胚の一部を切断（バイオプシー）して得るため胚は少なからずダメージを受け、凍結した場合の生存性の低下が指摘されている<sup>2),3)</sup>。

雌雄判別胚移植の更なる普及のためには、判別胚の凍

結技術の確立が不可欠であり、今回、凍結前の培養時間と凍結媒液について検討した。

### 材料および方法

#### 1 試験区の設定

胚をバイオプシーした後の培養時間と、凍結媒液に糖を添加するか否かにより、表1の3区に設定した。また対照として、胚をバイオプシー後2～3時間培養して、直ちに移植する新鮮胚移植区を設定した。各試験区は10頭（3区は11頭）、対照区は15頭の移植を実施した。

表1 試験区の設定

区 分		培養時間	糖の添加
凍 結 胚	試験1区	20～24	無添加
	試験2区	3～5	0.1M Suc
	試験3区	20～24	0.1M Suc
新鮮胚・対照区		2～3	—

#### 2 供試胚

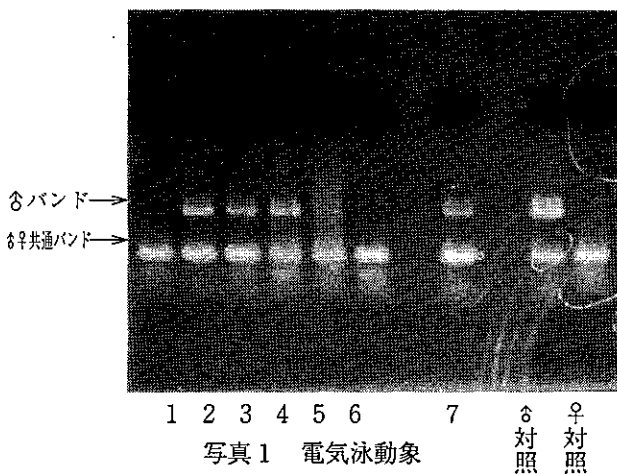
発情後9～14日目の供胚牛に、卵胞刺激ホルモン20 Auの減量投与とPGF2 $\alpha$ 投与による過剰排卵処置を行い、処理5日目に人工授精した。人工授精後7日目に10%子牛血清加工エンブリオテックで子宮を灌流し採取した胚のうち、後期桑実期～胚盤胞期のAランク胚を供試した。

### 3 胚のバイオプシー

供試胚をM-PBSのドロップ中に静置し、マイクロマニピュレーター(ナリシゲ製)を用いて、マイクロブレード(BIO-CUT BLADES No715 FEATHER社製)により一部切断した。特に胚盤胞期胚については栄養外胚葉部分を意識的に切断した。

### 4 バイオプシーサンプルによる性判定

バイオプシーサンプルに牛性判別キット XYセクター(伊藤ハム株式会社)を加え、PCR装置(岩城硝子社製)を用いて雄に特異的なDNAを増幅した。増幅したDNAを電気泳動し、紫外線照射下で雄特異的バンドがあるか否かで雌雄の判定を行った。(写真1……サンプル1、6を雌と判定、2~5、7を雄と判定)



### 5 バイオプシー胚の培養

移植に供する側のバイオプシー胚は、切断後直ちに、TCM199に20%牛胎児血清(FCS)と100 $\mu$ Mの $\beta$ -メルカプトエタノール( $\beta$ -ME)を添加した後で2回洗浄し、100 $\mu$ Lの同溶液のドロップに移し、5%CO<sub>2</sub>、38.5 $^{\circ}$ Cの条件下で3~5もしくは20~24時間培養した。新鮮胚移植の場合も同一条件で培養し、性判定終了後(2~3時間)移植に供した。

### 6 バイオプシー胚の凍結

培養後、形状整復あるいは胚腔形成などにより、生存性を確認できた胚を10%エチレングリコール(EG)+20%子牛血清(CS)あるいはこれに0.1Mのシュクロース(Suc)を添加した凍結媒液で約10分間平衡した後プログラムフリーザー(ET-U3 フジヤ矢野科学)を用いて凍結した。

### 7 移植及び受胎確認

受卵牛の発情日を0日目として、7日目に移植した。新鮮胚での移植はもちろんであるが、凍結胚の移植も一時期に実施するために受卵牛の発情同期化処理を行った。同期化にはイージーブリードを用いた。

移植後35日前後に超音波診断装置(スーパーアイSSD-210 DX富士平工業)で妊娠鑑定を実施した。

### 8 試験期間

平成8~9年度

## 結果および考察

#### 1 雌雄判別成績

判別成績は表2に示すとおりである。

69個の胚を判別し、雄胚が25個、雌胚が38個、不明胚が6個で、判定率91.3%であった。判定できなかったものは、電気泳動像の雄または雌雄共通バンドが極めて薄い場合や、泳動域全体が白く抜けてしまいバンドが確認できない場合であった。これらはサンプリングした細胞数が少なすぎたり、異物の混入などで生じたものと思われる。

表2 性判別成績

				(個)
実施胚数	雄胚(%)	雌胚(%)	不明胚(%)	判定率(%)
69	25(36.2)	38(55.1)	6(8.7)	91.3

#### 2 移植成績

雌雄判別胚の移植成績は表3に示すとおりである。

バイオプシー後2~3時間培養して移植(判別新鮮胚移植)した場合の受胎率は66.7%(受胎頭数10頭/移植頭数15頭)であった。この成績は、本試験期間中、本場で実施した一般の新鮮胚移植の受胎率(53.9%)を上回るものであり、性判別するためにバイオプシーすることによって、胚の生存性はそれほど影響を受けていないことを示している。

しかし、判別胚を凍結した場合の受胎率は16.1%(5頭/31頭)であり、本場の一般の凍結胚移植の受胎率(47.2%)に比較して大きく下回り、一度切断した胚は凍結の過程で大きなダメージを受けていることが推察される。特に、凍結媒液に糖を添加しない試験区1では全く受胎を確認できず、糖を添加することにより浸透圧ショックを和らげる必要があると思われる。

糖を添加した試験区2と試験区3で凍結前の培養時間について検討した。バイオプシー後3~5時間で胚は完全に整復し、小さな腔胞を形成している(写真2)。20~24時間経過すると細胞は切断時の5倍程度まで膨張、分化し、脱出胚盤胞の様相を呈するようになる(写真

表3 性判別胚の移植成績

区分	凍結媒液	培養時間	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
凍結胚	1区	10%EG+20%CS	20-24	10	0
	2区	〃 +0.1M Suc	3-5	10	3
	3区	〃 +0.1M Suc	20-24	11	2
新鮮胚(対照区)		2-3	15	10	66.7

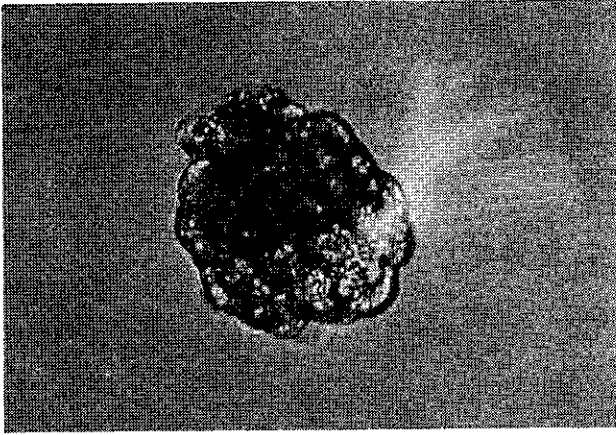


写真2 4時間培養後の切断胚

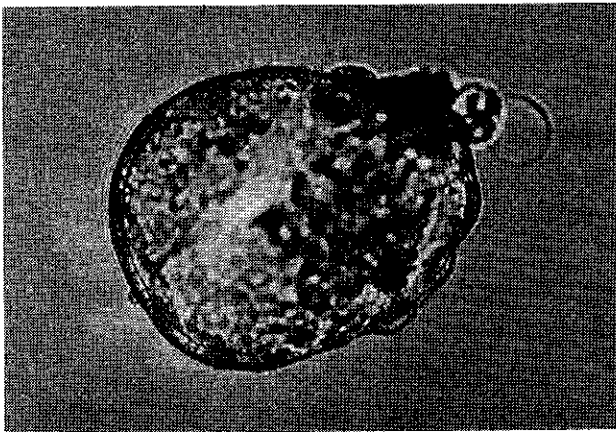


写真3 24時間培養後の切断胚



写真4 雌判定胚の移植で生まれた雌子牛

## 引用文献

- 1) 伊藤盛徳・後藤太一：人工授精研誌。8 95-99 (1986)
- 2) 中嶋達彦・佐藤敬明・守田 智・峰 英征：熊本県農業センター 畜産研究所試験成績所。166-168 (1996)
- 3) 後藤充宏・鴻野文男・近藤正治：徳島県畜産試験場研究報告 35 1-4 (1994)

3)。これらの胚を凍結し移植した結果、試験区2（3～5時間培養）が受胎率30.0%（3頭/10頭）、試験区3（20～24時間培養）が18.2%（2頭/11頭）となり、試験区2が良好な傾向を示したが有意差は認められなかった。

性判別した凍結胚移植を実用化するために、バイオプシー胚の適切な培養時間について継続して試験すると共に、凍結方法、凍結媒液に加える添加剤についてさらに検討する必要があると思われる。