

ウシ性判別におけるバイオプシー前後のガラス化が胚の生存性に及ぼす影響

大下雄三・米村功・妻由道明

要 約

当場では、全国の27道府県の試験研究機関と共同してウシの雌雄判別済み胚の凍結保存技術について検討している。

平成15年度は、バイオプシー前にガラス化保存し融解後に性判別・移植を行う区（ガラス化後判別区）と、バイオプシー後にガラス化保存し融解・移植する区（判別後ガラス化区）で、どちらの手法が生存性及び受胎率が高いか比較検討した。なお、ガラス化はVSED法で行った。

判別後ガラス化区：**雌雄判別（バイオプシー）** 培養 **ガラス化** 融解・加温 移植
ガラス化後判別区：**ガラス化** 融解・加温 **雌雄判別（バイオプシー）** 培養 移植

- 1 ガラス化、融解・加温後の生存率（インタクト胚とバイオプシー胚の比較）は、両区共に81.3%と差は認められなかったが、移植可能胚数はインタクト胚で高かった。
- 2 バイオプシー後の生存性（ガラス化胚と新鮮胚の比較）は、判別後ガラス化区（新鮮胚）で100%でガラス化後判別区（ガラス化胚）で76.9%であった。
- 3 移植可能胚数は両区共に62.5%であった。移植に対する受胎率は、判別後ガラス化区で30%、ガラス化後判別区で10%と判別後にガラス化保存した方が受胎率が高い成績であった。

結 言

近年、PCR法による雌雄判別法が定着化し各試験研究機関で基礎研究及び普及に向けての実証試験が行われている。

PCR法による性判別法では、性判定するため検体を胚の一部を切断（バイオプシー）し採材するため、胚は切断による損傷や細胞数の減少といったダメージを受けるため、従来の緩慢冷却保存法（ダイレクトトランスファー法）では、凍結・融解後の生存性や受胎率が新鮮胚移植に比べて低く¹⁾²⁾ 実用的ではないことが知られ

ている。

そこで、低ランク胚や損傷胚の凍結に有効な保存法としてガラス化保存法³⁾⁴⁾が提唱されるようになり、当試験場においても平成12年度に栗原らがダイレクトトランスファー法とガラス化保存における受胎率の比較試験を実施している。試験ではガラス化保存法で若干受胎率が上回ったもののその優位性までは認められなかった⁵⁾としているが、最近の研究でガラス化保存の方が受胎率が高い⁶⁾⁷⁾ことが判明した。その後、ガラス化でより受胎率の高い保存技術を確立するために、県単位又は全国規模の共同試験において判別胚の種々のガラス化保存方法が検討されている。

また、凍結保存胚やガラス化保存胚を融解または加温

後にバイオプシーし性判別を行ってから移植した場合でも、受胎し産子が得られることが確認されている。

そこで、本試験では、バイオプシー胚をガラス化保存した場合と、ガラス化保存胚をバイオプシーした場合の生存性及び移植後の受胎性を比較検討した。

材料及び方法

1 供試胚

発情後9～14日の供胚牛（黒毛和種及びホルスタイン種）に、卵胞刺激ホルモン（FSH）の20AU減量投与による過剰排卵処理を行い、処理開始から3日目の午前中にプロスタグランジン製剤（PGF₂）にて発情を誘起した。5日目の午後と6日目の朝に人工授精を実施し受精後7日目に回収した。また、A～Bランクの生体由来胚を試験に供した。

2 試験区の設定

供試胚は無作為に、回収後直ちにバイオプシーを実施した区（判別後ガラス化区）と回収後直ちにガラス化保存した区（ガラス化後判別区）とに分類した。

3 性判別用切断胚（バイオプシー胚）の採材と判別方法

供胚のバイオプシーは、金属刃（バイオカットブレード：フェザー社製）を用いて胚の一部を8：2の割合で切断分離してPCR用の材料とした。性判別は、伊藤ハム社製牛雌雄判別キット「XYセレクター」のマニュアル8）に従い、雄特異的DNAバンドをPCR装置により増幅し電気泳動、紫外線照射にて雄特異的バンドの検出の有無により判定を行った。

4 保存方法

移植に供する側の胚は、雌雄産み分け技術利用促進事業（性判別型）の共同マニュアル4）に準じてVSED法で保存加温を実施した。

判別後ガラス化区は従来通り性判別後にガラス化保存しガラス化後判別区は、性判別を行う前にガラス化保存

した。

5 移植用切断胚の培養

バイオプシー後及び加温後の胚は、0.1mM メルカプトエタノール+20%牛胎子血清添加TCM199培地に移し、38.5℃、5%CO₂、95%空気の気相条件下で短時間培養をおこなった。

6 移植

性判別後ガラス化区は、バイオプシー・培養・ガラス化・加温・培養後に、ガラス化後判別区は、ガラス化・加温・培養・バイオプシー・培養後にそれぞれ生存胚を確認し移植した。

また、ガラス化後判別区では移植予定日の前夜に融解を開始し移植当日の朝に性判別、短時間培養をおこない生存性を確認し移植した。

7 調査項目

バイオプシー、融解・加温後の後の生存性及び受胎率等
加温後の生存率（バイオプシー胚とインタクト胚の生存性比較）

バイオプシー後の生存性（新鮮胚とガラス化胚の生存性比較）

移植可能胚数及び受胎率

結 果

1 加温後の生存率（バイオプシー胚とインタクト胚）の比較

表1 加温後の生存率

区分	供試胚数	生存胚数	生存率 (%)	破棄胚数	破棄理由				移植可能胚数
					死滅	紛失	ランク不良	移植中止	
判別後ガラス化区 (バイオプシー胚)	16	13	81.3	6	3	0	3	(1)	10
ガラス化後判別区 (インタクト胚)	16	13	81.3	3	0	0	3	0	13

()：受胚牛側の要因で移植を中止

表1に加温後の生存率を示した。ガラス化・加温後の生存率は、判別後ガラス化区（バイオプシー胚）で81.3%、ガラス後判別区（インタクト胚）においても81.3%と両区に差は認められなかった。しかし、判別後ガラス

化区（バイオブシー胚）においてはランク不良による破棄が3胚と死滅のため移植できず破棄したものが3胚あった。また、受胚牛の子宮及び卵巣の状態が悪く移植直前になり中止したものが1胚あった。

ガラス化後判別区（インタクト胚）では融解・加温後のランク不良による破棄が3胚認められた。

2 バイオブシー後の生存性（新鮮胚とガラス化胚）の比較

表2 バイオブシー後の生存性

区分	供試胚数	生存胚数	死滅胚数	生存率(%)
判別後ガラス化区(新鮮胚)	16	16	0	100.0
ガラス化後判別区(ガラス化胚)	13	10	3	76.9

表2にバイオブシー後の生存性を示した。生存率は、判別後ガラス化区（新鮮胚）で100%、ガラス化後判別区（ガラス化胚）で76.9%であった。

3 移植可能胚数及び受胎率の比較

表3 移植可能胚数及び受胎率

最終的な移植可能胚率は両区共に62.5%であった。移植に対する受胎率は、判別後ガラス化区で30%、ガラス化後判別区で10%と判別後にガラス化保存した方が受胎率が高い結果となった。両区の平均受胎率は20%であった。

供試胚に対する受胎率は、性別後ガラス化区とガラス

区分	供試胚数	移植可能胚数	移植可能率(%)	受胎頭数	移植に対する受胎率(%)	供試胚数に対する受胎率(%)
判別後ガラス化区	16	10	62.5	3	30.0	18.8
ガラス化後判別区	16	10	62.5	1	10.0	6.3
平均	16.0	10.0	62.5	2.0	20.0	12.5

化後判別区で、それぞれ18.8%vs6.3%であり平均12.5%であった。

考 察

1 加温後の生存率（バイオブシー胚とインタクト胚）の比較について

単にインタクト胚とバイオブシー胚を比較した場合、

移植可能胚は、バイオブシー胚で10胚、インタクト胚で13胚と胚が切断という損傷を受けていないインタクト胚で移植可能な胚の生存性が高かった。

2 バイオブシー後の生存性（新鮮胚とガラス化胚）の比較

ガラス化後判別区ではバイオブシー前にガラス化保存という操作が施してあるために、低温障害や高濃度の耐凍剤による浸透圧障害など外的影響を強く受け、さらにバイオブシーという連続したダメージが加わるため、新鮮胚に比べ、融解・加温後の生存性が低下すると推察された。

3 移植可能胚数及び受胎率の比較

ガラス化後に性判別するより性判別後にガラス化した方が受胎率も高く現実的であると考えられた。

ガラス化後の性判別では、融解・加温 雌雄判別（バイオブシー） 培養など、移植当日に多くの時間を要するため、ガラス化胚の融解を移植前夜に行ったが、翌朝のバイオブシー後の修復培養に1～3時間を要するため、遠方農場での移植は不向きであるとであるとと考えられた。

また、前夜からの融解と翌朝の性判別では、準備した受胚牛の頭数に対して、希望した性の胚数を準備することが困難など種々の問題点があげられた。

引用文献

- 1) 葛西孫三郎：哺乳動物における卵子及び胚のガラス化保存、日本胚移植学会誌、12-17 (2001)
- 2) 岩尾健・森本一隆・岡田綾子・栗原昭広：鳥取畜試研報、第27号、5-7 (1998)
- 3) 新納正之：ウシ胚のガラス化保存法マニュアル、農林水産省家畜改良センター(1998)
- 4) 井上直弘：ガラス化(VSED)保存法マニュアル、宮崎県優良家畜受精卵総合センター(1999)
- 5) 栗原昭広・瀬尾哲則：鳥取畜試研報、第30号、1-2 (2000)
- 6) 菅原徹・太田土美・宇田三男：茨城県畜産試験場研

究報告、PCR法による性判別技術の確立、第30号、
49-50 (2000)

7) 有安則夫・小田頼政ら：岡山県総合畜産センター研究報告、ガラス化保存法による性判別受精卵の凍結保存技術 (2001)

8) 伊藤ハム株式会社、XYセクター使用マニュアル (1995)