

超急速ガラス化保存したウシ性判別胚の移植試験

瀬尾哲則・米村功

要 約

ウシの雌雄産み分け技術の普及を図るため、ホルスタイン種未経産牛に対しガラス化性判別胚の移植試験を実施した。ウシ胚のガラス化保存について超急速ガラス化法のうち最小容量冷却法を検討し、実用的な受胎率（53 %、受胎 8 頭/移植 15 頭）を得ることができ、有効な技術と思われた。一方、今回の方法は、移植前の胚の融解に顕微鏡などの装置が必要であり、移植先が限定されるため、移植現場で簡易に胚を融解する技術の検討が必要であると思われた。

緒 言

ウシの雌雄産み分け技術は、酪農家、繁殖和牛農家から実用化の要望が強く、そのうち任意の機会に移植することができる性判別胚の凍結保存技術が期待されている。

近年、ウシの低ランク胚や性判別胚に超急速ガラス化法¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾が利用されるようになり、今回、その方法のうち最小容量冷却法についてウシ性判別胚の移植試験を行い、その有用性を検討した。

材 料 及 び 方 法

1 試験期間

平成 18 年 4 月～ 19 年 3 月

2 供試胚

供胚牛は、黒毛和種成雌牛を用い、過剰排卵処理には、FSH20AU（アントリンR・10、川崎三鷹製薬）及び合成PGF₂ 類縁体クロプロステノール0.750mg（エストラメイト、シェリング・プラウアニマルヘルス）を使用し、FSHは3日間の減量投与方法とした。子宮角灌流法により回収した7日目生体由来胚を供試した。

3 性判別方法

回収した胚のうち B ランク以上のものを顕微鏡下でマイクロフェザーブレード K-715（フェザー安全剃刀）を用いて性判別用試料を採取した。この試料について、Loopamp牛胚性判別試薬キット（栄研化学）及びLoopampエンドポイント濁度測定装置LA-100（テラメックス）を用い、LAMP（Loop-mediated Isothermal Amplification）法により性判別を行った。

4 切断した胚の培養

性判別用試料を採取後の胚は、38.5 °C、5 % CO₂ 存在下で 3～5 時間の修復培養を行った後、ガラス化保存した。胚の修復時の培養液は、20 %（v/v）子ウシ血清添加 TCM199 を使用した。

5 胚のガラス化及び保存

胚のガラス化処理は齋藤ら⁵⁾や Chian ら⁶⁾の方法に準じて行った。まず、平衡処理として、7.5 %（v/v）エチレングリコール（EG）及び 7.5 %（v/v）ジメチルスルホキシド（DMSO）を含む 20 %（v/v）子ウシ血清添加 TCM199 中に胚を置き、平衡時間は 4 分とした。次に、ガラス化処理として、それぞれ 15 %（v/v）の濃度の EG 及び DMSO を含み、さらに 0.5M スクロース（Suc）を含む 20 %（v/v）子ウシ血清添加 TCM199 中に胚を浸漬後、最小容量のガラス化液とともに胚をクライオトップ

(北里サプライ)の先端に置き、液体窒素中に投入した(ガラス化処理時間 1 分)。クライオトップの先端は、液体窒素中でキャップを装着した状態で保存した。

平衡液及びガラス化処理液は室温とした。

6 胚の融解方法及び培養

胚の融解は段階希釈とした。まず、0.5M Suc を含む 20 % (v/v) 子ウシ血清添加 TCM199 中にクライオトップから遊離させた胚を 3 分置いた。次に 0.25M Suc を含む 20 % (v/v) 子ウシ血清添加 TCM199 中に胚を移し、3 分経過後、胚を 20 % (v/v) 子ウシ血清添加 TCM199 に 3 分浸漬した。段階希釈における融解液の温度はそれぞれ 37 とした。

融解後の胚は、別途用意した 20 % (v/v) 子ウシ血清添加 TCM199 中に移動し、1 時間培養(5 % CO₂ 存在下、38.5) した後、移植試験に供した。

7 移植試験

融解した胚は、発情後 7 日目のホルスタイン種未経産牛に 1 個ずつ移植した。移植前に黄体の状況を確認し、移植は黄体側の子宮角に行い、その受胎性を調査した。

結 果

1 融解後の胚の利用性

融解後の胚の生存性は良好であり、胚の利用率は 94 %であった(表 1)。

表 1 融解後の胚の状況

融解数	人為的損耗	移植数	利用率
16	1	15	94 %

2 移植成績

雌雄判別用試料採取時の胚のステージは収縮桑実胚～胚盤胞であり、その採材割合が 20 % 以下の場合には各ステージで受胎例を得て、全体での受胎率は 53 % だった(表 2)。

表 2 移植成績

ステージ	ランク	採材割合	移植数	受胎数
収縮桑実胚	A' <=	20% >=	2	2
		20% <	1	0
	B	20% >=	2	1
初期胚盤胞	A' <=	20% >=	7	4
		20% <	1	0
胚 盤 胞	A' <=	20% >=	2	1
(合計)			15	8

考 察

ウシの雌雄産み分け技術には、精子を分離する方法⁷⁾や胚の性別を判定する方法があり、本県の現状では後者が普及可能な技術だと考えている。この場合、胚の一部を採取し、遺伝子を増幅することにより性の判別を行うが、胚に損傷を与えることになるため、その凍結保存には氷晶を形成しないガラス化法が適しているものと考えた。

近年、ウシ胚のガラス化保存は超急速ガラス化法^{1) 2) 3) 4) 5)}が利用され、その移植成績も向上してきている。一方、ウシの性判別胚移植技術の普及のためには、希望する性のウシをどれだけ得ることができるのか、その効率性により経済的な有効性が問われることになる。理論的に正常胚の約 50 % が希望するどちらかの性であり、これに移植による受胎率を乗じたものが、雌雄産み分け技術の確率となる。今回の試験の受胎率 53 % の場合では、得られた正常胚から希望する性のウシを得る確率は約 26 % であった。しかし、性判別及びガラス化処理に係る作業の中で起こり得る人為的損耗あるいは受胎後の流産などの要因により、その数が減ることがあり、特に前者での損耗は、技術の習熟により可能な限り抑制することが重要だと思われた。

今回利用した最小容量冷却法によるウシ生体由来胚のガラス化及び融解手順は、比較的容易であり、一連の作業体系の中で、人為的損耗が起こることが少なく、また、融解後の胚の性状も良好であり、そのほとんどを移植に利用することができた。また、収縮桑実胚～胚盤胞のステージで受胎例を得ることができ、生体由来 7 日目胚の

ガラス化に対応することができ、有用な技術だと思われた。

今回の方法では胚の融解を実験室内で行い、顕微鏡などの装置や段階希釈技術が必要だったことから、一般の移植師がこの一連の作業を行うことは困難であり、技術の普及に制限が生じた。このため、移植現場で簡易に胚を融解することができる技術の開発が必要だと思われた。

参 考 文 献

- 1)藤田達男ら、牛受精卵の性判別実用化試験、大分畜試成績報告、33、1-4 (2004)
- 2)富永敬一郎ら、ゲル・ローディング・チップを用いたウシ体外受精由来初期胚のガラス化保存、J.Reprod. Dev.,47 (5)、267-273(2001)
- 3)木下政健ら、血清添加培地により短期培養した牛生体由来低ランク培養胚の凍結保存技術に関する検討、愛媛畜試研報、18、14-17 (2001)
- 4)米村功ら、ウシ体外受精胚の最小容量冷却法における耐凍剤の影響、鳥取畜試研報、32、9-11 (2003)
- 5)齋藤美英ら、クライオトップ法を用いたウシバイオプシー胚のガラス化保存、静岡畜試研報、30、25-29(2004)
- 6)Chan RC et al.,High survival rate of bovine oocytes matured in vitro following vitrification.,J.Reprod.Dev.,50 (6),685-689(2004)
- 7)浜野光市ら、X,Y 精子の分離によるウシの雌雄産み分け、信州大学農学部紀要、35、2、99-104 (1999)