

# 1. ウシ胚の性判別技術の確立（第4報）

ダイレクト法による凍結時のバイオブシー胚の平衡時間と受胎成績

酪農科：中里 敏・井上哲郎<sup>1)</sup>  
谷山 敦・清松邦章<sup>2)</sup>

(<sup>1)</sup>現畜産課，<sup>2)</sup>現県北家畜保健衛生所)

## 要 約

黒毛和種より回収したAランクの後期桑実胚～初期胚盤胞をバイオブシーし、1胚当たり100 $\mu$ lのドロップ（20%子牛血清（CS）加TCM199）中で3～6時間培養（38.6 $^{\circ}$ C，5%CO<sub>2</sub>，95%空気）後に凍結処理を行い、以下の結果を得た。

- 1) バイオブシー胚をエチレングリコールを耐凍剤としたダイレクト法で凍結する場合、培養液のドロップと対応する位置に凍結液のドロップを作製し、一旦そこへ1胚ずつ移すことにより、すべての胚の平衡時間をほぼ均一にすることができる。
- 2) 凍結液の添加からすべての胚のストローへの吸引が終了しプログラムフリーザーへ投入するまでの平衡時間別に受胎率を比較したところ、平衡時間が3分～5分未満及び5分～10分未満の区が10分～15分未満の区より受胎率は高い。したがって、平衡時間を10分以内とすることで、より安定した受胎率が期待できる。

## 目 的

PCR法を用いたウシ胚の性判別技術は、判別率の高さ、判定の正確さ及び新鮮胚移植の受胎率等から実用化に最も近い技術といわれているが、胚の一部をバイオブシーするため、とくに凍結胚移植では受胎率が低下し、普及の障害となっていた。

しかし、既報<sup>1)</sup>のとおり、Aランク胚をバイオブシーし、その胚を短時間培養後に凍結処理することで、ダイレクト法でもIntact胚と同等の受胎率が得られることが明らかとなった。

一方、エチレングリコールを用いてバイオブシー胚をダイレクト法で凍結する場合、平衡時間については15分以内であれば受胎率に影響を及ぼさないとされていたが、15分以内の平衡時間であっても各ロットごとに比較すると、凍結したバイオブシー胚の受胎率には差があり、一度に処理する胚の数が多いうロットで受胎率が低い傾向がみられた。

そこで、凍結バイオブシー胚の受胎率をより安定したものとするため、平衡時間の違いが受胎率に及ぼす影響について調査した。

## 方 法

### 1. 供試胚

平成10～11年度に黒毛和種より回収したAランクの後期桑実胚～初期胚盤胞を用いた。

### 2. PCR用サンプルの採取

マイクロマニピュレーターに刃先角度が15度のマイクロブレードを取り付け、圧切法により胚の細胞を採取した。

### 3. PCRによる解析

ウシ胚性判別キット「XYセレクター」（伊藤ハム）を使用し、PCRはThermal Cycler Model TP480（TaKaRa）で実施した。なお、PCRプログラムはキットの定法に従った。

### 4. 性判定

PCR産物と色素液の混合液をアガロースゲルにのせ、電気泳動及びエチジウムブロマイド染色を行い、トランスイルミネーター上でバンドの観察を行った。そして、雄特異的PCR産物と雌雄共通PCR産物の2本のバンドが得られた場合には雄と判定し、雌雄共通PCR産物1本のバンドのみが得られた場合には雌と判定した。

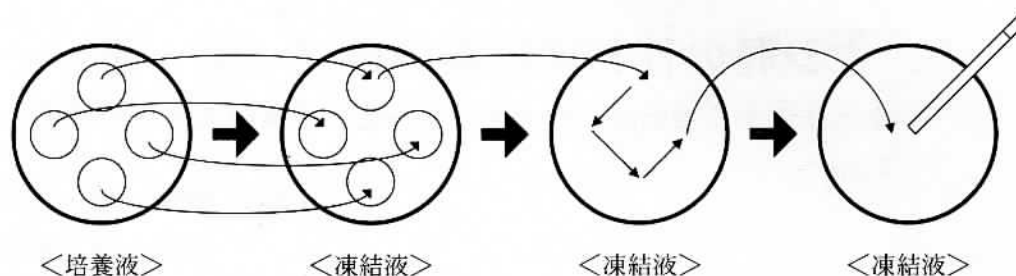


図1 凍結液の添加及びストローへの吸引方法

注) 1. 供試胚: Aランクの後期桑実胚～初期胚盤胞

培 養: バイオプシー後, 3～6時間培養 (38.6℃, 5%CO<sub>2</sub>, 95%空気)

1胚当たり100μlのドロップ (20%CS加TCM199)

2. 培養液のドロップと対応する位置に凍結液 (1.8M EG + 0.1M Suc + 4 mg/ml LAA) のドロップを作製し, 培養液のドロップから凍結液のドロップへ1胚ずつ移し替える。

3. すべての胚を移し終えたら, 胚を1個ずつピペットに吸引し, 別のシャーレで数回洗浄後, もう1枚のシャーレへ移す。

4. ストローに吸引する (3. と4. を繰り返す)。

5. すべての胚のストローへの吸引が終了したら, 直ちにプログラムフリーザー (-7℃) に入れ, プログラムをスタートする。

## 5. 移植用サンプルの培養

20%CS加TCM199培地を用い, 38.6℃, 5%CO<sub>2</sub>, 95%空気の条件下で, 3～6時間培養し凍結処理を行った。

## 6. 胚の凍結 (ダイレクト法)

胚の凍結には, 20%CS加m-PBS液を基礎媒液とし,

1.8Mエチレングリコール+0.1Mシュウクロース+4 mg/ml リノール酸アルブミンを加えた凍結液を用いた。

まず, 図1に示したとおり, 培養液のドロップと対応する位置に凍結液のドロップを作製し, 一旦そこへ1胚ずつ移し替えた。次に, 胚を1個ずつピペットに吸引し, 別のシャーレで数回洗浄後, もう1枚のシャーレへ移し, 0.25mlストローへ吸引するという操作を繰り返した。そして, すべての胚のストローへの吸引が終了したら直ちに-7℃に温度設定したプログラムフリーザーに投入した。植氷は90秒後に行い, そのまま8分間保持し, -7～-30℃間を毎分0.3℃で冷却後, 液体窒素中に投入し凍結保存した。

なお, 本試験では, 凍結液の添加からプログラムフリーザーへ投入するまでの平衡時間を測定し, その移植成績を比較検討した。

## 7. 融解及び移植

液体窒素ボンベからストローを取り出し, 空気中

で6秒間保持後, 30℃の微温湯に10～20秒間浸けて融解し移植した。

なお, 移植は, 県内の各家畜保健衛生所 (支所) を通じて民間の受精卵移植師8名に依頼し, 凍結胚を99頭に移植した。

## 結果及び考察

エチレングリコールを用いてダイレクト法で胚を凍結する場合, 平衡時間については, 従来15分以内であれば受胎率に影響を及ぼさないといわれていた。しかし, 当場のこれまでの成績では, 15分以内の平衡時間であっても各ロットごとに比較すると凍結したバイオプシー胚の受胎率には差があり, とくに一度に処理する胚の数が多いロットで受胎率が低い傾向がみられた。

当场では, 供試胚はAランクで, かつ後期桑実胚～初期胚盤胞までとランク・ステージともに限定した条件で凍結処理を行っており, さらに移植に関しても各地域で実績のある受精卵移植師に依頼していることから, この受胎率の差は凍結時の平衡時間に起因しているのではないかと考えた。

そこで, 凍結液の添加からプログラムフリーザーへ投入するまでの平衡時間の違いが受胎率に及ぼす影響について比較検討するため, 図1に示した手法で凍結胚を作製した。

すなわち、培養液のドロップと対応する位置に凍結液のドロップを作製し、一旦そのドロップへバイオブシー胚を1胚ずつ移し替え、次に胚を1個ずつピペットに吸引し、別のシャーレで数回洗浄後、もう1枚のシャーレへ移し、0.25ml ストローへ吸引するという操作を繰り返した。この操作により、同一ロットであればすべての胚の平衡時間をほぼ均一にすることができたと考える。

このようにして、凍結液の添加からすべての胚のストローへの吸引が終了しプログラムフリーザーへ投入するまでの平衡時間別に受胎率を比較したところ、平衡時間が3分～5分未満及び5分～10分未満の区が10分～15分未満の区より受胎率は高い傾向にあった。性別胚はバイオブシーにより透明帯を除去されており、胚の細胞が直接耐凍剤にさらされるため、従来いわれていた平衡時間では、エチレングリコールの耐凍剤としての効果よりもむしろ障害がでてくるのではないかと推察された。

表1 平衡時間別移植成績

平衡時間	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
3分～5分未満	24	16	66.7
5分～10分未満	44	29	65.9
10分～15分未満	31	15	48.4
計	99	60	60.6

ただし、本技術を用いる場合の留意点として、平衡時間を短縮するためにはスピーディーな胚操作技術が必要であり、また複数のスタッフで作業（ストロー吸引と封入・ラベル貼り）を分担して行うこと。さらに、バイオブシー胚の個数が多く、10分以内に処理できない場合は、2回に分けて凍結処理を行うなどの工夫も必要である。

以上の結果から、ダイレクト法による凍結を前提として性別を行う場合、既報<sup>1)</sup>でも述べたとおり、Aランクの後期桑実胚～初期胚盤胞をバイオブシーし、その胚を3～6時間培養後に凍結処理する。そして、その際、平衡時間については10分以内とすることで、ダイレクト法でもIntact胚と同等の受胎率が得られることが明らかとなった。

今後、本技術を用いることにより、これまでダイレクト法による凍結バイオブシー胚の低受胎率が普

及面で課題となっていた胚生産機関においても受胎率の向上が期待できることから、フィールドにおける性別技術の適用範囲がより一層拡大し、酪農及び肉用牛農家において経営の効率化を図ることが期待できる。

## 謝 辞

本研究の実施に当たり、移植にご協力いただいた県内各地の受精卵移植師の皆様に感謝いたします。

## 参 考 文 献

- 1) 中里 敏・井上哲郎・園田裕司・吉田豊昭：ウシ胚の性別技術の確立（第3報），長崎県畜産試験場研究報告，9，1～3（2000）