

1. ウシ胚の性判別技術の確立（第3報）

性判別技術におけるサンプリング手法とダイレクト法による凍結胚の受胎性

酪農科：中里 敏 ・井上哲郎
園田裕司* ・吉田豊昭
（*現 大村農業改良普及センター）

要 約

ウシ胚の性判別技術において、PCR用サンプルとしてAランク胚の変性様細胞をバイオブシーし、さらに移植用サンプルについては短時間培養後に凍結処理し、ダイレクト移植を行った。

- 1) PCR用サンプルの採取にあたり、独自に加工したパスツールピペットを使用することで、変性様細胞のように極微量のサンプルでも比較的容易に採取することができ、安定した判別率が得られた。
- 2) 変性様細胞をバイオブシーした移植用サンプルは、短時間培養後に凍結処理することで、ダイレクト移植でも Intact 胚と同程度の受胎率が得られた。

目 的

PCR法を用いたウシ胚の性判別技術は、新鮮胚移植では実用化レベルに達しているものの凍結胚移植では受胎率が低迷し普及の障害となっている。

このため、凍結胚の受胎率向上を目的に、胚の変性様細胞をPCR用サンプルとして採取し、短時間培養後に凍結処理した胚の移植成績について調査した。

方 法

1. 供試胚

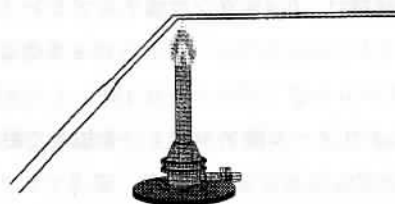
平成10年度に採卵した黒毛和種の後期桑実胚～初期胚盤胞（すべて変性様細胞のあるAランク胚）を用いた。

2. PCR用サンプルの採取

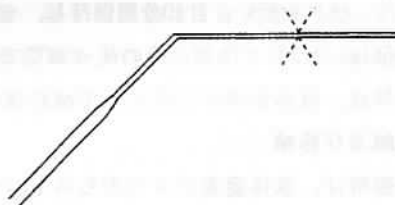
マイクロマニピュレーター（成茂）に刃先角度が15度のマイクロブレード（フェザー）を取り付け、圧切法によりAランク胚の変性様細胞を採取した。

なお、PCR用サンプルの採取にあたっては、図1に示したとおりパスツールピペットを胚の直径の1/2程度に細く引き伸ばし、かつ先端部を熱して丸め、ホールディングピペットのように加工したものを使用した。

①パスツールピペットをバーナーで細く引き伸ばす。



②胚の直径の1/2程度の部分をアンプルカッター等で切断する。



③ホールディングピペットのようにピペットの先端部を熱して丸める。

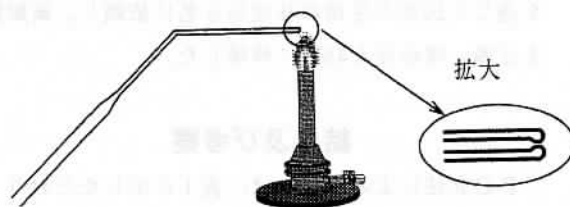


図1 サンプル採取用ピペットの作製方法

3. PCRによる解析

ウシ胚性判別キット「XYセクター」(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(フナコシ)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。

5. 移植用サンプルの培養

20%子牛血清(CS)加TCM199培地を用い、38.6℃、5%CO₂、95%空気の条件下で、3時間培養し、移植または凍結処理を行った。

6. 胚の凍結(ダイレクト法)

胚の凍結は、0.4%ウシ血清アルブミン(fraction V)を含む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シュエクロース+4mg/mlリノール酸アルブミンを加えた耐凍剤を用いて行った。

培養後の胚を0.25mlストローに吸引し、室温で5~10分間平衡を行い、あらかじめ-7℃に温度設定したプログラムフリーザー(FHK)に移した。そして90秒後に植水を行い、計10分間保持し、-7~-30℃間を毎分-0.3℃で冷却、その後-30℃でさらに10分間保持後、液体窒素中に投入して凍結保存した。

7. 融解及び移植

胚の融解は、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、アルコール綿花でよく拭いた後、移植器にセットし移植した。

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9名に依頼し、新鮮胚を2頭、凍結胚を48頭に移植した。

結果及び考察

PCR法による判別率は、表1に示したとおり、変性様細胞を採取しても91.7%(55/60)であり、過去の判別率とほぼ同等の成績が得られた。これは、PCR用サンプルの採取にあたり、図1のように加

表1 PCR法による判別率

供試胚	雄	雌	不明	判別率(%)
60	29	26	5	91.7

工したパスツールピペットを用いたことにより、変性様細胞のように極微量のサンプルでも比較的容易にチューブに取り込むことができたためと思われる。これまで、我々はサンプルを採取する際、細く引き伸ばしただけのパスツールピペットを使用していたが、ピペットの先端部に微細なキズがあるとその部分にサンプルの細胞が付着し、チューブに取り込めないことを経験した。しかし、先端部をホールディングピペットのように軽く丸めることで、細胞の付着といった問題がなくなり、判別率の安定につながったものと考えられる。

なお、判定不明の5サンプル(8.3%)はいずれも電気泳動・染色後の雌雄共通バンドが確認されなかったもので、サンプルをチューブに取り込めないサンプリングミスによるものであったが、今後、技術の習熟により、判別率をより高めることは十分可能であると思われる。

次に、移植成績は、表2に示したとおり、新鮮胚移植で50.0%(1/2)、凍結胚移植で56.3%(27/48)であった。新鮮胚移植では、試験開始当初から50%を越える成績が得られており、十分実用化レベルに達していると判断している。

表2 移植成績

区分	移植頭数	受胎頭数	流産頭数	受胎率(%)
凍結胚移植	48	27	2	56.3
新鮮胚移植	2	1	0	50.0
計・平均	50	28	2	56.0

一方、凍結胚移植では、これまで20~25%程度にとどまっていた受胎率が、今回、Intact胚と同等の成績が得られた。この要因として、①供試胚はすべて変性様細胞のあるAランクで、ステージはバイオブシーが比較的容易な後期桑実胚~初期胚盤胞を用いたこと、②胚の変性様細胞をバイオブシーしたこと、③バイオブシー後、切断面が修復される3時間程度の培養直後に凍結処理を行ったこと、④移植は各地区で実績のある受精卵移植師2名以内に限定したことなどが考えられる。

まず、胚については、今回、我々はすべて変性様

細胞のあるAランク胚を供試した。これは既報のとおり¹⁾ Bランク胚では変性様細胞のみをバイオブシーしても受胎率向上に結びつかなかったためであり、Bランク胚を性別別に用いる場合は、新鮮胚移植を積極的に活用する方が望ましいと思われる。なお、変性様細胞のないAランク胚でもバイオブシーする細胞数を極力少なくし胚のダメージを軽減することで凍結保存後の受胎性に影響は少ないと思われるが、この点については今後例数を重ねて検討していきたい。

次に、胚のステージは、後期桑実胚～初期胚盤胞に限定した。これは、通常我々はバイオブシー液としてシュークロースを加えないPBS液を用いているためであり、このようなステージであれば、ホールディングピペットで胚を固定しなくても変性様細胞をバイオブシーすることは比較的容易である。しかし、胚盤胞であれば胚の辺縁部（10%以下の部分）にマイクロブレードをあてると胚が回転するので、少量のサンプルをバイオブシーすることは難しい。したがって、胚盤胞についてはホールディングピペットで固定するかあるいはシュークロースを加えたPBS液を調製し、胚をシュリンクさせた後にバイオブシーするなどの工夫が必要であろう。

また、バイオブシー後の胚の培養については、すべて短時間培養で行った。これは既報のとおり¹⁾ 長時間培養より短時間培養の方が受胎率は良好な傾向にあったため、この点については、菅原²⁾、佐伯³⁾、寛⁴⁾、千葉⁵⁾の成績でも同様の傾向であったと報告されている。

なお、平衡時間については、従来は15分以内で行っていたものを今回は厳密に5～10分以内とした。これは、性別別胚はバイオブシーにより透明帯を除去されているため、中の細胞が直接耐凍剤にさらされることを考慮したためであるが、おそらくこのことも胚の生存性に影響を及ぼしたのではないかと推察される。

最後に、性別別結果と産子の一致率は、表3に示したとおり、92.3%（24/26）であり、生産された産子26頭のうち2頭の性別に誤りがあった。2例とも性別別結果は雌であったが、実際には雄が産まれたケースである。変性様細胞をPCR用サンプルとして利用した場合、雌雄共通バンドは明瞭に確認できても雄特異的バンドの反応が弱く確認しづらいケースも

表3 性別別結果と産子の一致率

判定	産子数	♂産子	♀産子	一致率(%)
♂胚	13	13	0	100.0
♀胚	13	2	11	84.6
計	26	15	11	92.3

あるので、判定の際は注意深くバンドの有無を観察することが必要である。

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家畜人工授精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：ウシ胚の性別別技術の確立（第2報），長崎県畜産試験場研究報告，8，1～3（1999）
- 2) 菅原 徹・太田土美・宇田三男：PCR法による性別別技術の確立（第2報），茨城県畜産試験場研究報告，28，37～39（1999）
- 3) 佐伯拓三・木下政健・沖本 宏：バイオブシー後の培養時間が凍結性別別胚の生存性と受胎性に及ぼす影響，愛媛県畜産試験場研究報告，17，1～5（1999）
- 4) 寛 朋子：牛の性別別技術確立試験（H10～H12），富山県畜産試験場年報，22（1999）
- 5) 千葉 伸・野口龍生：家畜雌雄産み分け技術利用促進事業，岩手県畜産研究所試験成績書，47～48（1999）