

高能力乳牛の雌雄鑑別卵凍結技術の開発

〔平成 17～21 年度〕

太田久由・西木秀人^a

(畜産技術科)^a 現事業課

【要 約】牛性判別受精卵は超急速ガラス化保存液 GESXP2020 と希釈液 1 を用い、バイオプシー後の修復培養時間を短時間にするこゝで、低温保存後の受精卵品質をダイレクト法より高められる。受胎例も超急速ガラス化法を用いた場合のみ確認される。

【目 的】

酪農経営において牛群全体の血統更新と能力改善のため、後継牛の確保や高能力牛の導入は欠かせない。従来からの人工授精による血統更新と能力改善は雄側からの改良に限られるため、雌側からも改良可能な受精卵移植が行われてきている。受精卵は性判別検査を行うこゝで、酪農に必要な雌子牛をより効率的に生産できる。雌雄鑑別検査は卵細胞の一部を切り取る操作（バイオプシー）を必要とするが、低温保存後の生存率や受胎性に問題点が残されている。そこで、従来よりも卵細胞へのダメージが少なく、移植までの処置がストロー内で行える超急速ガラス化法（F 式ガラス化法）について、その保存液、バイオプシー後の修復培養時間、加温後の希釈液を比較検討することにより、性判別卵の生存率、受胎率向上を図る。

【成果の概要】

1) 保存液の検討

体外受精後 7～8 日目の発生ステージにおいて、形態的に変性部位が 10% 以下である胚盤胞期以降の受精卵を用い、耐凍剤濃度ならびに成分の異なる 3 種の保存液（表 1）を用いて超急速ガラス化保存し、加温（融解）後の生存率および透明帯脱出率を比較する。生存率は、いずれの経過時間においても EDSB1515 が有意に低く、加温後 96 時間では GESXP2020 : 65.0%, GESXP1020 : 52.9%, EDSB1515 : 25.0% であり、有意に GESXP2020 が高い ($P < 0.01$)（図 1）。また透明帯脱出率においては、48 時間以降いずれの経過時間においても有意に GESXP2020 が高く ($P < 0.001$)、加温後 96 時間では GESXP2020 : 56.5%, GESXP1020 : 35.4%, EDSB1515 : 13.7% であり、GESXP2020 を用いることが有効であると考えられる（図 2）。

2) バイオプシー後の修復培養時間の検討

1) で成績の良かった保存液（GESXP2020）を用いて生体由来のバイオプシー卵を超急速ガラス化保存し、細胞採取からガラス化までの修復培養時間の違い（短時間区：4～9 時間、長時間区：18～24 時間）が加温後の生存率に及ぼす影響を調査する。短時間区における加温（融解）後培養 72 時間での生存率（54.2%）は、長時間区（0%）に比べ有意に高く ($P < 0.05$)、修復培養は 4～9 時間が有効であると考えられる（図 3）。

3) ガラス化保存後の希釈液の検討

体外受精後 7 日目と 8 日目の発生ステージにおいて、形態的に変性部位が 10% 以下である胚盤胞期以降の受精卵をバイオプシー後、短時間修復培養処理し、GESXP2020 で

超急速ガラス化保存する。一定期間低温保存後、成分の異なる3種の希釈液（表2）を用いて加温、希釈処理を施し、処理後48時間目の生存率および移植に適したAランク卵率（内部細胞塊が鮮明で、バイオプシー前と同程度以上に拡張している卵）について調査する。生存率は希釈液1が100%（33/33）、希釈液2が94.6%（35/37）、希釈液3が91.2%（31/34）である。Aランク卵率は希釈液1が93.9%（31/33）、希釈液2が86.5%（32/37）希釈液3が91.2%（31/34）である。生存率、Aランク卵率ともに各希釈液間で有意差は認められなかったが、希釈液1がもっとも高くなる傾向にある（図4）。

4) ダイレクト凍結法との比較検討

①体外受精卵での検討

3)と同様の手法で超急速ガラス化保存したバイオプシー卵を加温後、希釈液1を用いて希釈処理を施し、希釈処理後48時間目の生存率およびAランク卵率について、10%濃度のグリセリンを耐凍剤（保存液）としたダイレクト緩慢凍結法と比較する。生存率は超急速ガラス化保存法が96.7%（32/33）、ダイレクト緩慢凍結法が93.5%（29/31）、Aランク卵率は超急速ガラス化保存法が93.9%（31/33）、ダイレクト緩慢凍結法が74.2%（23/31）と、Aランク卵率において超急速ガラス化保存法が有意に（ $P<0.05$ ）高くなる（図5）。

②生体由来卵での検討

定法により採取した発情8日目のホルスタイン種受精卵を体外受精卵と同様に調査する。生存率は超急速ガラス化保存法が90.9%（10/11）、ダイレクト緩慢凍結法が83.3%（10/12）、Aランク卵率は超急速ガラス化保存法が81.8%（9/11）、ダイレクト緩慢凍結法が58.3%（7/12）と、Aランク卵率において超急速ガラス化保存法が高くなる傾向にある（図6）。

5) 移植による受胎率の検討

定法により採取した発情7～8日目の形態的に変性部位が50%以下である胚盤胞期以降の受精卵をバイオプシー後短時間培養し、超急速ガラス化法またはダイレクト緩慢凍結法で保存する。ダイレクト緩慢凍結法は定法により融解、超急速ガラス化保存は加温後、保存ストロー内で希釈液1により希釈し、それぞれ発情後7～8日目の受精卵1頭に、いずれかの1卵を非外科的に保存後の生存性を確認せず移植する。

ガラス化保存胚は移植した5頭中2頭の受胎例が得られる。一方、ダイレクト緩慢凍結法による移植は受胎例が得られない（表3）。

【成果の活用・留意点】

- 1) バイオプシーの際、採取する卵細胞は全体の10%程度とする。
- 2) 超急速ガラス化保存法は保存液への浸漬時間を厳守し、速やかな処置を行う必要がある。また受精卵の紛失に注意し、確実に専用ストロー内に封入する。
- 3) 超急速ガラス化保存胚の保存ストローを液体窒素中から取り出す際は、封入部位を温める必要があるため、火傷、破裂等に十分注意する。
- 4) 超急速ガラス化保存法はストロー内の磁石器具を取り出す必要があるため、庭先融解・移植する際は、受精卵の紛失に注意する。

表 1 保存液（耐凍剤）組成

GESXP2020：	20%グリセリン	20%エチレングリコール	3%ホリエチレングリコール
GESXP1020：	10%グリセリン	20%エチレングリコール	3%ホリエチレングリコール
EDSP1515：	15%エチレングリコール	15%DMSO	BSA0.4%

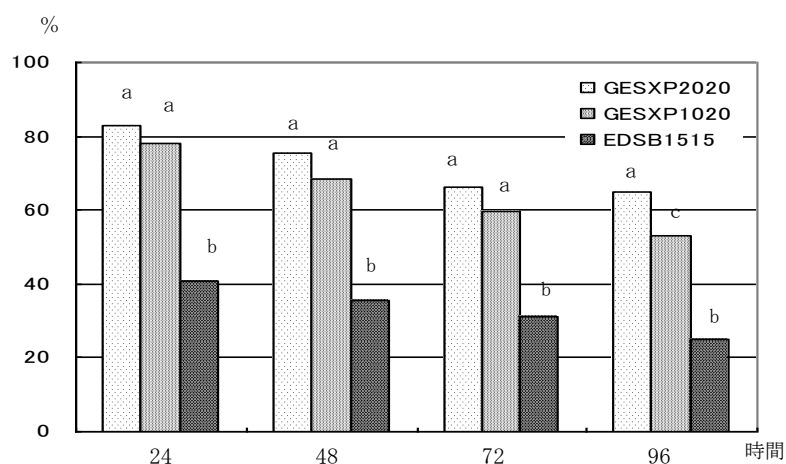


図 1 保存液の種類と生存率

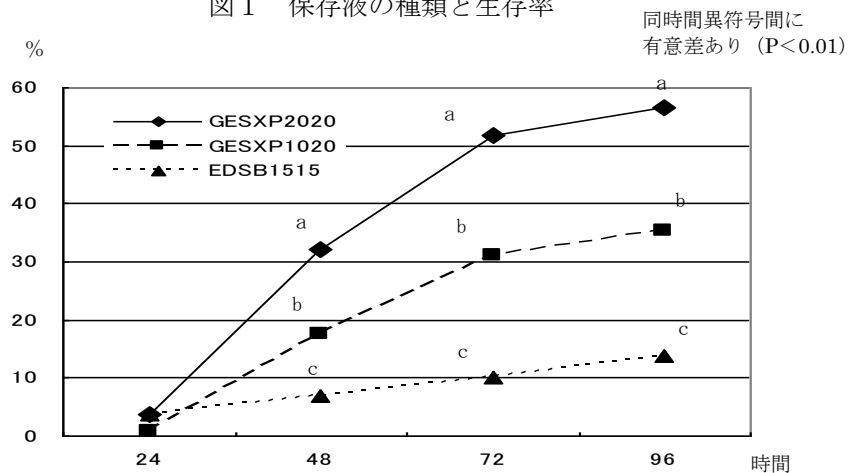


図 2 保存液の種類と透明帯脱出率

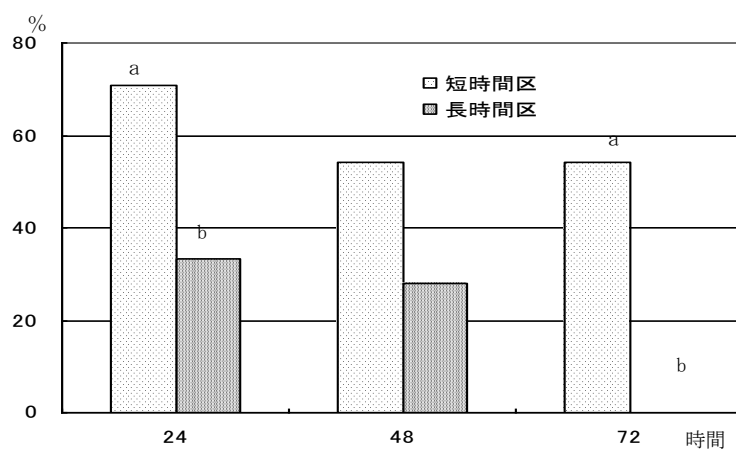


図 3 修復培養時間と生存率

表2 希釈液組成

希釈液 1	0.5Mスクロース	20%新生仔牛血清	ダルベッコPBS	
希釈液 2	0.5Mスクロース	5%エチレングリコール	20%新生仔牛血清	ダルベッコPBS
希釈液 3	0.25Mスクロース	5%エチレングリコール	20%新生仔牛血清	ダルベッコPBS

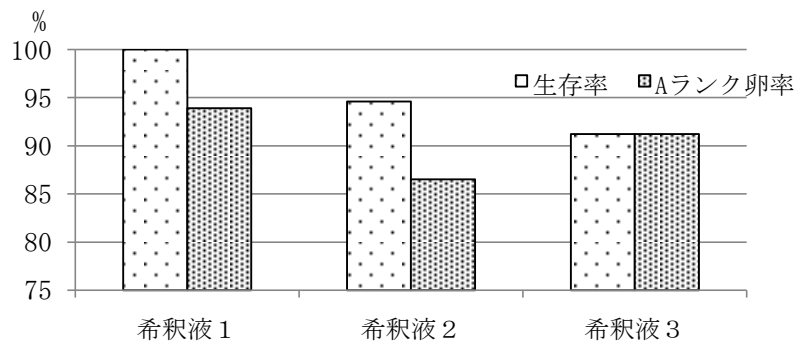


図4 加温希釈後48時間目での生存率およびAランク卵率

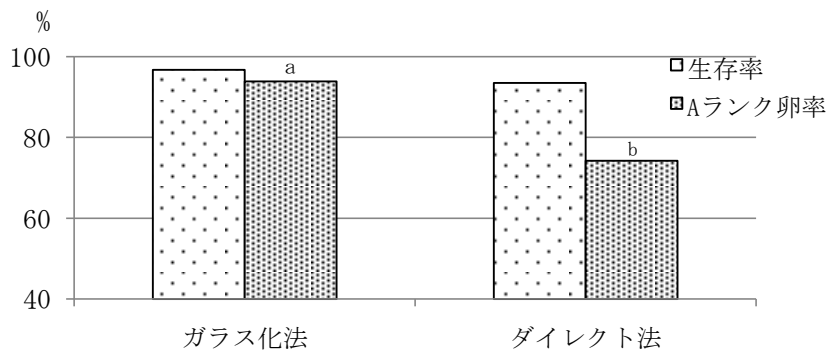


図5 体外受精卵における生存率およびAランク卵率
(加温・希釈後48時間目)

異符号間に
有意差あり
($P < 0.05$)

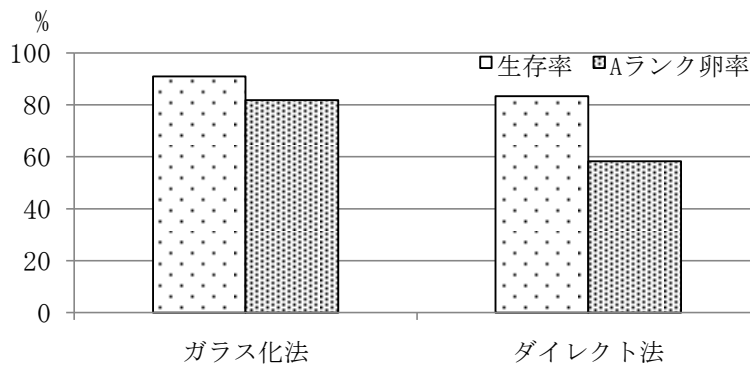


図6 生体卵における生存率およびAランク卵率
(加温・希釈後48時間目)

表3 移植成績

	移植頭数	受胎頭数 (%)
ダイレクト法	3	0 (0.0)
超急速ガラス化法	5	2 (40.0)

【発表資料】

〔口頭発表〕第23回東日本家畜受精卵移植技術研究大会（1都3県共同試験）