

1. 牛胚の性別別技術の確立（第2報）

PCR用サンプルの採取方法並びにバイオブシー後の胚の培養時間の検討

酪農科：中里 敏・井上哲郎
園田裕司・吉田豊昭

要 約

PCR法を用いた性別別技術において、PCR用サンプルの採取方法並びにバイオブシー後の移植用サンプルの培養時間について検討を行った。

PCR用サンプルとして、胚の変性部分のみをバイオブシーしても性別別は十分可能であり、正常胚の10%程度をバイオブシーする従来の押し切り法と同程度の判別率が得られた。また、この場合、とくにAランク胚を用いると、従来法より凍結胚の受胎率は向上する傾向が認められた。

一方、バイオブシー後の移植用サンプルの培養時間は、20~24時間の長時間培養より3~6時間の短時間培養が良好な受胎率が得られた。

以上のことから、Aランク胚の変性部分のみをバイオブシーし、移植用サンプルを短時間培養後に凍結処理することで、従来法より受胎率が向上する可能性があることが示唆された。

目 的

PCR法を用いた性別別技術は、判別率の高さ、判定の正確度及び新鮮胚移植の受胎率等から実用化に最も近い技術であるが、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る。

このため、凍結胚の受胎率向上を目的に、PCR用サンプルの採取方法並びにバイオブシー後の移植用サンプルの培養時間について検討を行い、併せて移植成績を比較した。

方 法

1. 供試胚

過排卵処理した黒毛和種より回収した7日齢のA~Bランクの後期桑実期胚~胚盤胞期胚を用いた。

2. PCR用サンプルの採取

胚のバイオブシーは、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、押し切り法により採取した。

<試験1>

①試験区（A~Bランク胚）：マイクロブレードを用いた押し切り法により、変性細胞を採取。

※試験区(A)：Aランク胚の変性部分を採取。

※試験区(B)：Bランク胚の変性部分を採取。

②対照区（Aランク胚）：正常胚の10%程度を採取。

3. PCRによる解析

ウシ胚性別別キット「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. 性別判定

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

100 μ M β -メルカプトエタノール含有20%子牛血清（CS）加TCM199培地を用い、38.8 $^{\circ}$ C、5% CO₂、95%空気の条件下で、3~24時間培養し、移植または凍結処理を行った。

<試験2>

①長時間培養区：20~24時間培養後、凍結処理

②短時間培養区：3~6時間培養後、凍結処理

6. 胚の凍結（ダイレクト法）及び融解

胚の凍結は、0.4%ウシ血清アルブミン（flaction

V) 含有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シュークロース+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。90秒後に植氷を行い、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。

胚の融解は、液体窒素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。

7. 移植試験

移植は、県内各地の受精卵移植師(民間)に依頼し、平成9年度は新鮮胚を5頭、凍結胚を95頭に移植した。また、10年度は12月末現在、新鮮胚を2頭、凍結胚を11頭に移植した。

結果及び考察

<試験1>

PCR法による判別率は表1に示したとおり、変性部分のみをバイオブシーした試験区で90.5%、正常胚の10%程度をバイオブシーした対照区で96.2%であり、試験区の判別率が対照区よりやや低い傾向にあったが、有意差は認められなかった。

また、判定不明のケースはすべて電気泳動・染色後の雌雄共通バンドが確認されなかったもので、PCR用サンプルがチューブに取り込めなかったサンプリングミスによるものと考えられる。この点、とくにAランク胚の変性部分を採取する試験区(A)においては、サンプル量がきわめて少量であり、チューブ内に正確にサンプリングできたか確認できないものもあったが、今後、技術の習熟により判別率を高めることは十分可能であると思われる。

表1 PCR法による判別率

区分	供試胚	雄	雌	不明	判別率(%)
試験区	105	44	51	10	90.5
対照区	53	30	21	2	96.2
計・平均	158	74	72	12	92.4

※平成10年12月末現在

凍結胚の受胎率は表2に示したとおり、Aランク胚の変性部分をバイオブシーした試験区(A)で36.1%と最も高く、次いで正常胚の10%程度をバイオブシーした対照区の27.1%であり、Bランク胚の変性部分をバイオブシーした試験区(B)については18.2%であった。

試験区(A)の受胎率が対照区を上回ったことから、できるだけ胚の正常部分を傷つけないことが凍結胚の受胎率向上のための重要な要因であることが示唆された。

一方、Bランク胚は、変性部分のみを切断したにもかかわらず、受胎率向上につながらなかったことから、Bランク胚を性判別に用いる場合は、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。

表2 凍結胚の移植成績

区分	移植頭数	受胎頭数	不明頭数	受胎率(%)
試験区(A)	42	13	6	36.1
試験区(B)	22	4	0	18.2
対照区	48	13	0	27.1
計・平均	112	30	6	28.3

※平成10年12月末現在

<試験2>

バイオブシー後の移植用サンプルの培養時間については表3に示したが、3~6時間の短時間培養区の受胎率は29.8%、20~24時間の長時間培養区は22.7%であり、岩尾ら¹⁾、菅原ら²⁾、小林ら³⁾の報告と同様に短時間培養区が良好な傾向を示した。

長時間培養すると、胚は拡張~脱出胚盤胞期まで発育が進むため耐凍性が低下したものと思われる。

表3 移植成績

区分	移植頭数	受胎頭数	不明頭数	受胎率(%)
長時間培養区	22	5	0	22.7
短時間培養区	90	25	6	29.8
新鮮胚移植区	7	4	0	57.1
計・平均	119	34	6	30.1

※平成10年12月末現在

以上のことから、胚の品質鑑定を正確に行い、ランクの高い胚の変性部分のみをバイオブシーすること、さらに移植用サンプルを短時間培養後に凍結処理することで、従来の方法に比べ受胎率が向上する可能性があることが示唆された。

今後は、PCR用サンプルの採取方法について試験を継続するとともに、凍結方法（ガラス化法等）、移植用サンプルの培養方法について、検討していきたい。

謝 辞

本研究の実施に当たり、性別別胚の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へ感謝いたします。

参考文献

- 1) 岩尾健・森本一隆・栗原昭宏・岡田綾子：PCR法により雌雄判別した牛胚の凍結に関する試験，鳥取県畜産試験場研究報告，27, 5～7(1998)
- 2) 菅原徹・影山恭子・太田土美・鈴木和明：PCR法による性別別技術の確立（第1報），茨城県畜産試験場研究報告，26, 57～58(1998)
- 3) 小林政樹・西宮弘・千田惣浩・柿野淳・河西直樹：PCR法を用いた牛胚の雌雄産み分け技術，秋田県畜産試験場研究報告，13, 49～51(1998)

中里 井上 著

中里 井上 著

中里 井上 著

中里 井上 著

中里 井上 著

中里 井上 著

中里 井上 著

中里 井上 著

中里 井上 著