１１）性判別をした牛の凍結受精卵の受胎率向上技術

（細胞採取法の改善による性判別凍結受精卵の受胎率向上技術）

北海道立畜産試験場　畜産工学部　受精卵移植科　遺伝子工学科

１．試験のねらい

一般の酪農経営においては、後継牛として雌子牛が必要とされ、受精卵の段階で雌雄の判定ができれば、より効率的な経営が可能となる。北海道立畜産試験場では栄研化学と共同で LAMP 法を用いた牛受精卵の性判別キットを開発した。牛受精卵の性判別技術を現場に普及していくには受精卵の凍結保存技術が不可欠である。しかし一般的に実施されている受精卵を金属刀で切断し、ダイレクト法で凍結する方法では凍結保存後の受胎率が 20%～ 30%と低く、実用に耐えない。そこで受胎率の向上を目的に凍結法および細胞採取法を検討した。

２．試験の方法

１）性判別受精卵凍結法の検討

過剰排卵処理した牛から発情後 7.5 日目に回収した品質が良好な受精卵（胚盤胞）を金属刀で切断し（切断法、写真２）、ガラス化法で凍結した。

ガラス化法はカスー式ストローを用いた雪印法で実施した。ガラス化法で凍結した受精卵は融解後の生存率および移植後の受胎率をダイレクト法と比較した。

２）細胞採取法の検討

マイクロピペットを用いて発情後６日目に回収した受精卵（桑実胚）から細胞を採取した（吸引法）（写真１）。細胞採取した受精卵は IVD101（機能性ペプチド研）で 24 時間培養し、胚盤胞にまで発生させてからダイレクト法で凍結した（図１）。

この方法により作成した受精卵の受胎率を従来法（切断法）で作成した受精卵および新鮮受精卵と比較した。

３．試験の結果

１）性判別受精卵凍結法の検討

ガラス化法で凍結した受精卵の生存率は、ダイレクト法と比較して差がみられなかった（表１）。また、受胎率もダイレクト法と比較して改善は見られず、新鮮受精卵と比較して有意に低い成績であった（表２）。

すなわち今回用いたガラス化法では性判別受精卵の受胎率向上は実現できなかった。

２）細胞採取法の検討

吸引法では、受精卵にほとんど損傷を与えることなく必要な数の細胞のみを採取することができた（写真３、４）。また吸引法で細胞採取した受精卵すべてが 24 時間培養後にほぼ完全な透明帯を保持したまま胚盤胞まで発育した（写真５）。

吸引法により細胞採取した受精卵の受胎率は、切断法により細胞採取した受精卵と比較して有意に高く、吸引法で細胞採取した新鮮受精卵や、切断法で細胞採取した新鮮受精卵と比較しても大差のない成績が得られた（表３）。

以上の結果から、発情後６日目に回収し吸引法による細胞採取とそれに続く 24 時間の培養を行うことで、ダイレクト法で凍結しても高い受胎率が得られる性判別受精卵を生産できることが明かとなった。本技術により、受卵牛の発情同期化が不要となるばかりでなく、性判別受精卵の流通が可能となり、性判別技術の利用促進が期待される。

表1. 凍結法が融解後の受精卵の生存性に及ぼす影響

切断の有無	凍結法	融解胚数	生存胚数(%)
切断	ガラス化	39	28(71.8)
	ダイレクト	43	28(65.1)
非切断	ガラス化	4	4(100)
	ダイレクト	9	7(77.8)

表２．凍結法が切断受精卵の受胎率に及ぼす影響

凍結法	移植頭数	受胎頭数(%)
ガラス化	20	3(15.0)a
ダイレクト	47	12(25.5)a
新鮮	47	30(63.8)b

a,b 間に有意差あり(p<0.05)

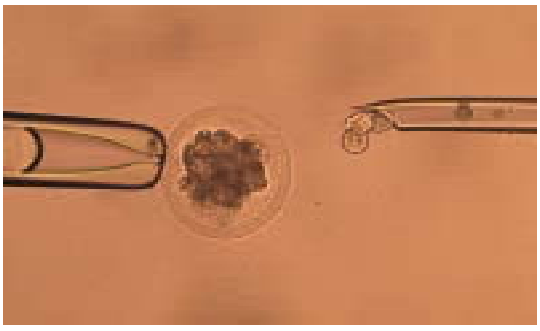

写真１．桑実胚からのマイクロピペットによる細胞の吸引採取（吸引法）

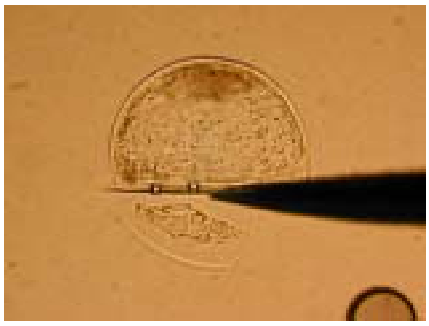

写真２．胚盤胞からの金属刀による細胞の切断採取（切断法）

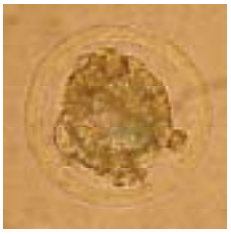

写真３．吸引前の受精卵

写真４．吸引後の受精卵と細胞

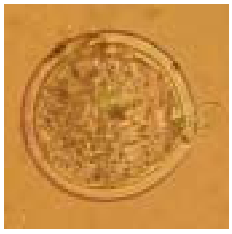

写真５.24 時間培養後の受精卵

表３.細胞採取法が凍結受精卵の受胎率に及ぼす影響

細胞採取法	凍結法	移植頭数	受胎頭数(%)
吸引法	ダイレクト	34	15(44.1)a
吸引法	新鮮胚	20	10(50.0)a
切断法	ダイレクト	73	15(20.5)b
切断法	新鮮胚	80	41(51.3)a

a,b 間に有意差あり(p<0.05)
*供試した受精卵は吸引は桑実胚、切断は胚盤胞