

ウシ初期胚の発育ステージおよび採取部位別の性判定率と凍結条件の違いによる受胎率

上田修二・森 美幸・笠正二郎
(畜産研究所)

黒毛和種およびホルスタイン種から過排卵処理によって採取した体内受精胚の10~20%の部分を切断採取後、XYセクターを用いたPCR法によって性判定し、切断後残ったバイオプシー胚を3~4時間あるいは20~24時間培養した。後期桑実胚から胚盤胞期胚までの発育ステージにおいて、性判定率は85.5~94.4%、発育率は97.8~100%であり発育ステージの違いによる差はなかった。胚の採取部位別の判定率は、正常細胞の92.6%に対して、変性細胞は91.7%と差はなく、培養後の発育率も各々95.1%、95.8%と差がなかった。凍結液のエチレングリコール濃度において、1.5Mの受胎率(6.7%)は1.8M(25.0%)と差がなかったが、新鮮胚の受胎率(50.0%)に対して有意に低率であった。また、凍結前の培養時間において、20~24時間の受胎率(21.4%)は3~4時間(34.6%)と差がなかったが、新鮮胚(48.5%)に比べて有意に低率であった。PCR法による胚の性判定および移植実証実験として、延べ14頭の高能力乳牛から採取した胚を性判定した結果、性判定率は94.7%、新鮮胚移植による受胎率は54.5%と良好であった。

[キーワード: PCR, 性判定, 胚, 牛, 受胎率]

Effects of Bovine Embryo Stages and Biopsied Parts on the Judgment Rate of Sex Determination and Effect of Freezing Conditions on the Pregnancy Rates after Transfer. UEDA Shuji, Miyuki MORI and Shojiro KASA (Fukuoka Agricultural Research Center, Chikushino, Fukuoka 818 - 8549, Japan) *Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent.* 21 : 49 - 52 (2002)

Day 7 embryos collected from superovulated donors were biopsied using a microblade with a micromanipulator. To determine the sex of embryos, sample(10-20%) of embryos were diagnosed using the PCR (Polymerase Chain Reaction) method. The biopsied embryos were cultured for 3-4 or 20-24 hour. The judgement rates of sex determination among late morulae and blastocysts was 85.5-94.4% and the survival rates after culture were 97.8-100%. For the both rates, the stage of embryos showed no significant effects. The judgement rate using a few normal cells and abnormal cells from an embryo were 92.6% and 91.7%, respectively, with no significant difference between embryos stages. The pregnancy rates of biopsied embryo frozen in 1.5M EG and 1.8M EG after culture for 20-24 hour were 6.7% and 25.0%, respectively. The former was lower than the pregnancy rate (50.0%) of fresh biopsied embryos ($p < 0.05$). The survival rates of biopsied embryos cultured for 3-4 hours and 20-24 hours before freezing in 1.8M EG were 34.6% and 21.4%, respectively. The latter was lower than the pregnancy rate (48.5%) of fresh biopsied embryos ($p < 0.05$).

The sex of embryos collected from superovulated high-producing dairy cows were determined, and then 33 biopsied embryos were transferred recipients for fresh embryos. The success rate of sex determination was 94.7% (72/76); the pregnancy rate was 54.5% (18/33).

[Key words : PCR, sex diagnosis, embryo, bovine, pregnancy rate]

緒 言

雌雄産み分け技術により、目的とする性の産子を得ることが可能となり、特に乳牛においては、牛群内の高能力牛から採取した胚を性別別して移植することによって、牛群の効率的な改良が期待できるため早急な確立が望まれている。近年、Polymerase Chain Reaction (PCR) 法による雄特異的な塩基配列の検出による胚の性判定法³⁾が報告されて以来、多くの研究機関でバイオプシーの方法や切断後の胚(バイオプシー胚)の保存技術について研究がなされている。

PCR法による性判定技術は、人工授精後約7日目の胚の一部をサンプリングし、PCR法で一部の塩基配列を増幅させ、雄特異的な塩基配列の有無によって胚の性を判定するものである。通常、人工授精後7日目には、後期桑実胚から胚盤胞までの発育ステージの異なる胚が採

取される。性判定には変性部が少ないAランク⁷⁾の胚を供試することが一般的であるが、採胚した胚の中には、Aランクの胚だけでなく、変性部を有するBおよびCランクの胚も含まれる。このため、BおよびCランクの胚も性判定が可能となれば、胚の有効利用が出来、目的とした性の産子を多数得ることが可能となる。しかし、胚の発育ステージやサンプルの採取部位が性判定率やバイオプシー胚の発育率に及ぼす影響を明らかにした報告は少ない。また、バイオプシー胚の凍結保存後の受胎性は、新鮮胚に比べて低く、バイオプシー胚に有効な凍結保存技術は確立されていない。

そこで、ウシ胚の発育ステージやPCR用サンプルの採取部位が性判定率およびバイオプシー胚の発育率に及ぼす影響を明らかにするとともに、耐凍剤濃度と凍結前の培養時間がバイオプシー胚移植後の受胎率に及ぼす影響を明らかにした。さらに、高能力乳牛から採取した胚

を性判定し、新鮮胚による移植を行い、PCR法の性判定技術の実証試験を実施した。

材料および方法

1 供試胚

過剰排卵処理した黒毛和種およびホルスタイン種の供試胚牛から、発情後7日目に採取した体内受精胚を試験に用いた。採取後、実体顕微鏡および倒立顕微鏡によって、胚の発育ステージおよびランクを検査して供試した。

2 バイオプシー

供試胚は、60mmシャーレにバイオプシー用培地で作成したドロップ(100 μ l)に1胚ずつ移した。バイオプシー用培地は、0.2MシュクロースD-添加PBS(-)(D-PBS(-), GibcoBRL)を用いた。マイクロマニピュレータにマイクロブレード(K-715, フェザー)を装着したブレードホルダーをセットし、ブレードを垂直に降ろすことにより胚の10~20%を切断した。

切断したサンプルは、0.1%ポリビニールアルコール添加PBS(-)で洗浄後、少量の液とともに、滅菌蒸留水8 μ lを予め入れたマイクロチューブ(NT-172, BM機器)に回収し、PCR処理を行うまでの間は-20℃で保存した。

バイオプシー胚は、10%牛胎子血清(FBS)、100 μ M β メルカプトエタノール添加M-199(Medium 199 Earle's, GibcoBRL)で洗浄後、同液で3~4時間あるいは20~24時間、10%O₂、3%CO₂、87%N₂、38.5℃の条件下で培養した。培養後、培養開始前の形態より発育したものを発育胚とした。

3 PCR処理

PCR処理は、XYセクターキット(伊藤ハム)を用いて、そのマニュアルに準じた。サンプルは、融解後、沸騰水中で1分間熱処理し、クーラーボックスで急冷した。酵素混合液を添加後、PCR装置(PerkinElmer, 9600-R)によって、97℃:5秒→50℃:5秒→72℃:5秒を45回繰り返した。

4 PCR産物の解析

色素液(25%グリセロール、0.05%ブロムフェノールブルー、0.05%キシレンシアノール)と混合したPCR産物(10 μ l)を2%アガロースゲル(NuSieve(3:1), FMC Bio Products 50091)にのせ電気泳動を行った。泳動後、ゲルを0.5 μ g/mlエチジウムブロマイド(EtBr solution, 和光純薬 310-90051)で1時間染色し、紫外線照射装置(UVP 3UV Transilluminator NLMS-20E)上で目視した。雌雄共通バンドと雄バンドが認められたものを雄判定胚、雌雄共通バンドのみが認められたものを雌判定胚と判定した。両方のバンドが認められなかったものは判定不明とした。

試験1 胚の発育ステージおよびPCR用サンプルの採取部位が性判定率とバイオプシー胚の発育率に及ぼす影響

胚の発育ステージが性判定に及ぼす影響を検討するために、胚を後期桑実胚、初期胚盤胞、胚盤胞の3ステージに分け、バイオプシー後に性判定を行うとともに培養

し、判定率と発育率を調査した。

また、変性部を有する胚の性判定の可能性を検討するために、家畜人工授精講習会テキスト(家畜受精卵移植編)⁷⁾に基づき分類したAからCランクの胚の正常細胞と変性細胞をサンプリングし、性判定率と発育率を調査した。

試験2 バイオプシー胚における凍結液のエチレングリコール濃度と凍結前の培養時間が移植後の受胎率に及ぼす影響

(1) 凍結液のエチレングリコール濃度の影響

バイオプシー胚を20~24時間培養後、1.5Mもしくは1.8Mエチレングリコール、0.2Mトレハロース添加PBSに浸漬した。胚を同液とともに移植用ストローに封入し、浸漬開始から15分間平衡後、1℃/分で20℃から-7℃まで冷却し、同温度で15分間保持する間に自動植氷させ、さらに0.3℃/分で-30℃まで冷却した。冷却後、ストローを液体窒素に投入し保存した。

(2) 凍結前の培養時間の影響

バイオプシー胚を、3~4時間ないし20~24時間培養後、1.8Mエチレングリコール、0.2Mトレハロース添加PBSで凍結保存した。

移植は、人工授精師がストローを温水で融解後、酪農家が飼養する発情7日目の受胎牛にダイレクト法で行った。移植後、50~60日目に直腸検査により妊否を確認した。

試験3 高能力乳牛から採取した胚の性判定

酪農家が繁養する年間泌乳量10,000kgを超えるホルスタイン種から発情7日目に採取した胚を当场で性判定後、酪農家の乳牛に雌判定胚および雄判定胚を新鮮胚として移植した。

結果

試験1 胚の発育ステージおよびPCR用サンプルの採取部位が性判定率とバイオプシー胚の発育率に及ぼす影響

発育ステージ別の性判定率は、後期桑実胚の85.5%(59/69)に対して、初期胚盤胞89.1%(82/92)、胚盤胞94.4%(17/18)と発育が進むにつれ高くなる傾向にあったが、有意差はなかった(第1表)。バイオプシー胚の培養成績については、97.8~100%と高い発育率を示し、発育ステージ間に有意差はなかった。

第1表 胚の発育ステージが性判定率および発育率に及ぼす影響

発育ステージ	供試胚数	判定胚数(%)	培養胚数	発育胚数(%)
後期桑実胚	69	59(85.5)	68	68(100)
初期胚盤胞	92	82(89.1)	89	87(97.8)
胚盤胞	18	17(94.4)	18	18(100)

注) サンプリング: 正常細胞(全体の10~20%)

正常細胞をサンプリングして性判定した場合、性判定率は92.6%(116/126)であり、変性細胞をサンプリングした場合の性判定率も91.7%(22/24)と高く、正常細胞による性判定率との間に有意差はなかった(第2表)。また、バイオプシー胚の培養後の発育率について

第2表 サンプル採取部位が性判定率および発育率に及ぼす影響

採取方法	供試胚数	判定胚数 (%)	培養胚数	発育胚数 (%)
正常細胞	126	116 (92.6)	122	116 (95.1)
変性細胞	24	22 (91.7)	24	23 (95.8)

注) 採取部位 正常細胞: A, B ランク胚の正常細胞部分の10~20%、変性細胞: B, C ランク胚の細胞膜が明瞭な変性部

第3表 凍結液のエチレングリコール濃度が移植後の受胎率に及ぼす影響

濃度 (M)	移植頭数	受胎頭数	受胎率 (%)
1.5	15	1	6.7a
1.8	16	4	25.0
新鮮胚	12	6	50.0b

注) 異符号間に有意差あり ($p < 0.05$): χ^2 検定

第4表 凍結前の培養時間が移植後の受胎率に及ぼす影響

培養時間 (h)	移植頭数	受胎頭数	受胎率 (%)
3-4	26	9	34.6
20-24	28	6	21.4a
新鮮胚	33	16	48.5b

注) 異符号間に有意差あり ($p < 0.05$): χ^2 検定

は、正常細胞の採取で95.1% (116/122)、変性細胞の採取で95.8% (23/24)と有意差はなかった。

試験2 凍結液のエチレングリコール濃度と凍結前の培養時間が移植後の受胎率に及ぼす影響

バイオプシー胚をエチレングリコール濃度1.5Mと1.8Mの凍結液で保存後、ダイレクト法で移植した結果、1.5M区の受胎率は6.7% (1/15)と、新鮮胚の50.0% (6/12)に対して有意 ($p < 0.05$)に低率であった(第3表)。一方、1.8M区の受胎率は25.0% (4/16)と新鮮胚に比較して、有意差はなかった。

凍結前の培養時間については、3~4時間区の受胎率は34.6% (9/26)と、新鮮胚の48.5% (16/33)に対して、有意差はなかった(第4表)。一方、20~24時間区の受胎率21.4% (6/28)は、新鮮胚に比較して有意 ($p < 0.05$)に低率であった。

試験3 高能力乳牛から採取した胚の性判定

延べ14頭のホルスタイン種から採胚した結果、97個(6.9個/頭)の胚が採取でき、移植可能な胚であるAからCランク胚は76個(5.4個/頭)であった(第5表)。次いで76個の胚を性判定した結果、72個の胚について判定が可能で(判定率94.7%)、雌判定胚37個、雄判定胚35個であった(第6表)。また、バイオプシー後培養した76個の胚すべてが発育した。性判定した雌判定胚27個、雄判定胚6個を新鮮胚として移植した結果、前者が16頭、後者が2頭受胎し、それぞれ分娩した(第7表)。雌判定胚を移植し、分娩した14頭は雌産子であったが、2頭の産子は雄であった。一方、雄判定胚の移植により得た産子の性は、ともに雄であった。

考 察

後期桑実胚から胚盤胞における発育ステージの違いによる判定率には差は認められなかった。また、バイオプ

第5表 高能力乳牛から採胚成績

採取頭数	採取個数 (/頭)	ランク別胚数				D及び未受精卵
		計(/頭)	A	B	C	
14	97(6.9)	76(5.4)	42	25	9	21

第6表 高能力乳牛から採取した胚の性判定率および発育率

供試胚数	判定胚数 (%)	性		培養胚数	発育胚数 (%)
		雌	雄		
76	72(94.7)	37	35	76	76(100)

第7表 性判定胚の移植成績

判定	移植頭数	受胎頭数 (%)	分娩頭数	産子の性	
				雌	雄
雌	27	16(59.3)	16	14	2
雄	6	2(33.3)	2	0	2
計	33	18(54.5)	18	14	4

シー胚の培養後の発育率については、どの発育ステージも高い生存性を示した。松岡ら⁴⁾も、後期桑実胚から拡張胚盤胞までを供試した結果、発育ステージの違いによる性判定率に差は認められなかったと報告している。さらに、発育率についても、96.8%以上の高い発育率を認めるとともに、発育ステージによる差は認めていない。

A, B ランクの胚の正常細胞を採取した場合の判定率とB, C ランクの胚の変性細胞のみを採取した場合の判定率に差はなかった。中里ら⁶⁾も、変性細胞のバイオプシーでは、判定率が低下する傾向にあるが、有意差はなかったと報告している。ただし、本試験で用いた変性細胞は細胞膜が明瞭な細胞をPCR処理したが、別の事例において、細胞膜が崩壊したサンプルにおいては判定が出来ないことがあった(未発表)。これらのことから、細胞膜が明瞭な変性細胞があるB, C ランク胚では、変性細胞を利用した性判定が有効であることが明らかになった。

試験2における、2回の新鮮胚移植(第3, 4表)の受胎率は、各々50.0% (6/12)、48.5% (16/33)であり、松岡ら⁴⁾の52.9% (18/34)と同等の成績であった。凍結胚の受胎率は、エチレングリコール濃度1.5Mと1.8Mは有意差はなかったが、1.5Mの受胎率は、新鮮胚の受胎率に比べて有意に低率であった。エチレングリコールの濃度については、中原ら⁹⁾が体外受精胚を用いて検討しているが、1.5Mと1.8Mの間に融解培養後の脱出率、ダイレクト移植後の受胎率に差を認めていない。一方で、堂地ら¹²⁾は、1.5Mと1.8Mを比較して、1.8Mの方が受胎率が高いことを報告している。これらのことから、バイオプシー胚の凍結には、1.5Mより1.8Mのエチレングリコール濃度が適しているものと推察される。

凍結前の培養時間については、従来20~24時間培養するのが一般的であるが、3~4時間と大幅に短縮しても差がなかった。佐伯ら⁷⁾は、3~5時間と20~24時間培養後凍結した胚において、融解・培養後の生存率には差がないが、移植後の受胎率は、20~24時間(14.3%)

より3~5時間(27.8%)の方が受胎率が高いことを報告している。これらのことから、凍結・移植後の受胎率を低下させないためには、バイオブシー後、凍結まで20~24時間培養する必要なく、バイオブシー後の生存が確認できる3~5時間後に凍結することが望ましいと思われる。

年間乳量10,000kg以上の乳牛から採取した97個の胚のうち、AからCランクの胚76個について性判定した結果、95%(72個)の胚を判定することができ、また、76個の胚を培養した結果、全ての胚が発育した。これらの判定率および発育率は本試験(試験1)の成績と同等な成績であった。判定胚33個を20~24時間培養後、新鮮胚のまま33頭の受胎牛に移植した結果、18頭(55%)が受胎した。雌判定胚に限ると、27頭中16頭が受胎し、受胎率は59%であった。これは、本試験(試験1)の48.5%や50.0%に比べて同等か、それ以上の成績であった。

雌判定胚を移植して得た16頭の産子のうち、14頭は判定通り雌であったが、2頭は雄であった。松岡ら⁴⁾も、雌判定胚の移植において17例中2例に不一致を認めている。その理由として、PCRにかけるサンプル量の不足、DNA増幅阻害因子の混入等を推察している。本試験においても、サンプル量の不足等により雄特異的な遺伝子が十分増幅されなかったためと思われる。

これらのことから、性判定に用いる胚の発育ステージが初期胚盤胞から胚盤胞であれば、性判定率やバイオブシー後の発育率に差はなく、サンプルの採取においては、正常細胞だけでなく、変性細胞によっても性判定が可能であることが明らかになった。また、胚はバイオブシー後、3~4時間培養したのち、1.8Mエチレングロールを含む凍結液で凍結保存することによって、融解・移植後の受胎率が改善されることが明らかになった。

引用文献

- 1) 堂地 修・古関次夫・渡邊一博・安田幸治・下平乙夫(1992)ウシ胚のDirect Transfer法におけるEthylene-glycol濃度の検討. 第86回日畜大会講要:40
- 2) 堂地 修・下平乙夫・佐藤淳子・岡田真人・後藤裕司・今井 敬(1991)Ethylene glycolを用いて凍結したウシ胚のPBS直接投入後の生存性. 第80回家畜繁殖学会 講要:a23
- 3) 伊藤ハム株式会社中央研究所(1993)性識別に関するプローブの開発. 平成4年度研究開発報告書:183-199
- 4) 松岡一仁・市野清博・石井俊昭・嶋屋佳子・松崎伸生(1999)性判別胚を用いた和牛の効率の生産技術に関する研究(第2報)-卵丘細胞と共培養した性判別胚の受胎性並びに性判別方法の改善-. 山口畜試研報. 15:25~32
- 5) 中原高士・永多建一・原 好宏・溝辺敬美・立山松男・長友隆典・佐藤友治・赤塚裕人・坂元和樹・遠目塚 敏男・高山博文(1995)エチレングリコールを耐凍剤として用いた4種類のウシ胚凍結保存法の移植成績について. 宮崎畜試研報. 8:1-5
- 6) 中里 敏・井上哲朗・園田裕司・吉田豊昭(1999)牛胚の性判別技術の確立(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. 長崎畜試研報. 8:1~3
- 7) 日本家畜人工授精師協会編(1996)家畜人工授精講習会テキスト(家畜受精卵移植編):172~176
- 8) 佐伯拓三・木下政健・沖本 宏(1999)バイオブシー後の培養時間が凍結性判別胚の生存性と受胎性におよぼす影響. 愛媛畜試研報. 17:1~5