

牛性判定胚の凍結保存技術							
[要約] 牛の性判定胚は、切断後 3-4時間培養し、細胞内保護剤（耐凍剤）として10%エチレングリコール、細胞外保護剤として0.1Mトレハロースを添加した PBSで凍結することにより、ダイレクト移植後の受胎率は新鮮胚並に向上する。							
畜産研究所・大家畜部・畜産工学研究室					連絡先	092-925-5232	
部会名	畜産	専門	繁殖	対象	家畜類	分類	指導

### [背景・ねらい]

高能力牛から後継牛を効率的に確保するうえで、胚の性判定による雌雄産み分け技術が重要な課題である。Bランク以上の胚盤胞期胚を用い、PCR法による性判定後、新鮮胚として受卵牛に移植することにより、1回の採胚で1～2頭の後継牛を確保できる（平成9、10年度成果）。さらに、雌雄産み分け技術の実用性を高めるために、性判定胚の凍結保存技術の確立が望まれている。

そこで、性判定胚の凍結に係わる諸条件を明らかにし、移植後の受胎率の改善を図る。（要望機関名：畜産課(H10)）

### [成果の内容・特徴]

1. 牛の性判定胚は、切断後 3-4時間培養し、10%エチレングリコール、0.1Mトレハロースを添加した PBS（リン酸緩衝液）で凍結後、ダイレクト法により移植すると、受胎率が新鮮胚並に向上する（表4）。
2. エチレングリコール（濃度8%）を細胞内保護剤とした凍結液に細胞外保護剤として添加する糖は、シュクロースよりトレハロースが適している（表1）。さらに、トレハロースを添加した凍結液のエチレングリコール濃度は、8%より10%が適している（表2）。
3. 切断から凍結までの培養時間は、長時間（20-24時間）より短時間（3-4時間）の方が適している（表3）。

### [成果の活用面・留意点]

1. 採胚を実施する機関において性判定胚の凍結保存に活用できる。

[ 具体的データ ]

表1 凍結液に添加する糖の種類と受胎率（平成 8年度）

糖	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
シュガー	9	1	11.1
トハロ	19	8	42.1
新鮮胚	9	5	55.6

注) 1.凍結液 8%Iフング<sup>®</sup> リコ-ル, 0.1M糖, 20%子牛血清(CS)添加PBS  
 2.凍結法 (緩慢凍結) 0 - -1 /分 -6.5 (15分間)  
 - -0.3 /分 -30 液体窒素  
 3.培養時間 20-24時間 (新鮮胚 3-24時間)  
 4.凍結胚の移植はダイレクト移植 (以下同)  
 5.27道府県共同試験移植成績 (平成 8年度)  
 凍結胚24.2%、新鮮胚42.7%

表2 凍結液のIフング<sup>®</sup> リコ-ル濃度と受胎率（平成 9年度）

濃度(%)	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
8	15	1	6.7
10	16	4	25.0
新鮮胚	12	6	50.0

注) 1.凍結液 Iフング<sup>®</sup> リコ-ル, 0.2Mトハロ, 20%CS添加PBS  
 2.凍結法 表1と同  
 3.培養時間 20-24時間  
 4.25道府県共同試験移植成績 (平成 9年度)  
 凍結胚24.2%(8%-19.2%, 10%-27.5%)、新鮮胚40.6%

表3 凍結前の培養時間と受胎率（平成10年度）

培養時間(h)	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
3- 4	14	4	28.6
20-24	12	2	16.7
新鮮胚(20-24)	22	12	54.5

注) 1.凍結液 10%Iフング<sup>®</sup> リコ-ル, 0.1Mトハロ, 20%CS添加PBS  
 2.凍結法 表2と同  
 3.29道府県共同試験移植成績 (平成10年度)  
 凍結胚26.9%(3-4h 28.7%, 20-24h 22.4%)、  
 新鮮胚47.8%(3-4h 48.2%, 20-24h 47.0%)

表4 凍結移植実証の受胎率（平成11年度）

区	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
凍結胚	12	5	41.7
新鮮胚	11	4	36.4

注) 1.凍結液 表3と同、凍結法 表2と同  
 2.培養時間 3-4時間  
 3.29道府県共同試験移植成績 (平成11年度)  
 凍結胚37.7%、新鮮胚43.1%

[ その他 ]

研究課題名：性判別胚の凍結保存

予算区分：国庫

研究期間：平成11年度（平成 7～11年）

研究担当者：上田修二、森美幸、笠正二郎、磯崎良寛

発表論文等：平成 8～11年度畜産関係試験成績書