

ウシ胚における透明帯切開法を用いた性判別方法の検討

中原 仁・小田頼政

Study on the sexing method of Bovine embryos with a partial zone dissection

Hitoshi NAKAHARA, Yorimasa ODA

要 約

ウシ性判別胚の普及をさらに促進するためには、農家の庭先で直接移植できる緩慢凍結法での凍結保存技術の確立が必要である。そこで、胚に与えるダメージの低減が期待できる透明帯切開法による性判別方法を活用するため、胚の切開時期並びに切開器具を検討するとともに緩慢凍結法での受胎性を検討した。

- 1 胚回収日齢別の発育ステージ並びに透明帯切開成功率は、胚回収 6.5 日齢では後期桑実胚が主体で成功率 51.5 % (17/33)、6.75 日齢では初期胚盤胞が主体で 75.0 % (24/32) であり、両者間に有意な差が認められた。
- 2 透明帯切開を行う器具として金属製の片刃 (ブレード法)、両刃のナイフ (マニーナイフ法) 及びガラスの針 (ニードル法) での透明帯切開成功率は、ブレード法が 75.0 % (24/32)、マニーナイフ法が 50.0 % (16/32)、ニードル法が 95.0 % (38/40) であり、ニードル法が他の 2 法に比べて有意に高かった。また、上記器具での性の判別率、切開・性判別後の胚の生存率は 100 % と差がなく高い値が得られた。
- 3 透明帯切開法による性判別胚を緩慢凍結法で保存後ダイレクト移植を行った結果、受胎率は 38.1 % (8/21) であり、性判別を行っていない胚 (無傷胚) を同様の方法で凍結後移植を行った受胎率 37.5 % (15/40) と差がなかった。

以上のことから、透明帯切開法による性判別を行う場合には、6.75 日で胚回収を行って得られた初期胚盤胞を用いてガラスニードルで透明帯切開することで、高い成功率が得られることが明らかとなった。また、透明帯切開法による性判別胚は、緩慢凍結法によるダイレクト移植においても無傷胚との受胎性に差がなかったことから、性判別の手技として透明帯切開法は有効であることが示唆された。

キーワード：ウシ 性判別 透明帯切開 緩慢凍結

緒 言

ウシ胚の性判別技術として胚を切断 2 分割し、一方の細胞の DNA を PCR (Polymerase Chain Reaction) 法^{1) 2)} や LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法³⁾ で診断して性を判別する方法が開発され、酪農家を中心に性判別した雌胚の移植が普及してきている。本県でも平成 8 年度から乳用牛の判別雌胚供給を行い、新鮮胚移植では 60% 以上の受胎率が得られている⁴⁾ が、一般的に Intact の体内胚で用いられている緩慢凍結法では、性判別胚は胚の切断によるダメージを受けており、高い受胎率が得られていない現状にある^{5) 6)}。

近年では、切断分割した胚に対して高濃度の耐

凍剤を利用したガラス化保存法が多く報告^{7) 8) 9)}^{10) 11)} され、安定した受胎性が得られており、性判別胚の保存法として期待されている。しかし、これらの保存法は農家の庭先において直接移植を行うことが困難であり、性判別雌胚のさらなる普及を図る上での問題点となっている。

最近、体外受精胚を用いてウシ胚を切断分割することなく、性判別に必要な細胞を採取する透明帯切開法が報告^{12) 13)} され、農家の庭先での直接移植が行える緩慢凍結法の利用が期待されている。しかし、体内胚を用いる場合の胚の発育ステージ及び切開方法の検討が十分に行われていない現状にある。

そこで、体内回収胚を用いた透明帯切開法の有効性を検討するため、胚の切開時期並びに切開器

具を検討するとともに、判別胚の緩慢凍結法による受胎性を調査した。

方 法

試験1 体内回収胚の透明帯切開時期の検討

当所で繫養する黒毛和種経産牛に常法に従って過剰排卵処理を施し、人工授精後6.5日(6.5日区)及び6.75日(6.75日区)に胚を回収し、品質がAランクと判定されるものを試験に供した。透明帯切開は、各区ごとに胚をシュークロースを添加した分割液中に移しシャーレ底面に接地させ、倒立顕微鏡下で金属製の片刃(フェザー社製: BIO-CUT BLADES 30℃)を装着したマイクロマニ

ュピュレーターで透明帯に刃を押し当てる方法で行った。

切開後の胚は、各区ごとにIVMD-101培地(機能性ペプチド研製)の50ulドロップ内に1個ずつ移し、38.5℃、5%CO₂、95%空気の気相条件下で20～24時間培養した。培養後、切開部分からの胚の露出状況を調査し、露出状況により切開の成否を判定した。成否の判定は、目視により図1に示すとおり露出部分が栄養膜細胞のみで胚全体の15%程度であるものを成功と判定し、内部細胞塊の露出が見られるものあるいは露出部分が胚全体の15%程度以上であるものを不成功を判定した。

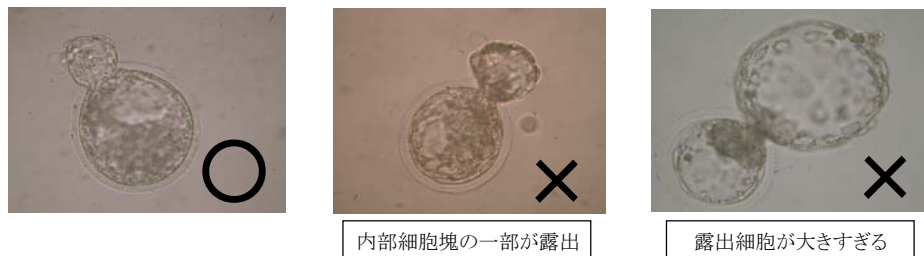


図1 透明帯切開法による成否の判定基準

試験2 透明帯の切開器具の検討

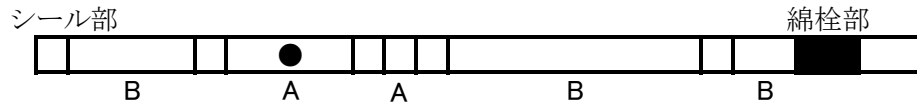
試験1と同様の方法で6.75日で回収したAランク胚を試験に供試した。透明帯切開に用いる器具としてこれまで胚の切断分割に利用している試験1で用いた片刃の金属刃(ブレード区)、微細な切開に適していると言われている両刃の眼科用メス(マニーナイフ区、マニー社: オフサルミックナイフ 25G)並びに核移植胚を作成するときに利用するガラスのニードル針(ニードル区)の3種類を用いた。切開の方法は、ブレード区、マニーナイフ区は試験1と同様の方法で実施し、ニードル区はIVMD-101培地内でマイクロマニピュレーターに取り付けたホールディングピペットで胚を固定し、もう一方のガラスニードルで透明帯を穿刺し切開する方法で行った。透明帯切開後は、試験1と同様の方法で各区ごとに20～22時間培養し、露出状況を調査した。

次に、透明帯切開法による性の判別を行うために切開後露出に成功した胚は、シュークロースを添加した分割液中に移し露出した部分がシャーレ底面に接地しないように固定させ、倒立顕微鏡下で金属製の片刃(フェザー社製: BIO-CUT BLADES 30℃)を装着したマイクロマニピュレーターで透明帯から露出した胚のくびれ部分を押し切る

方法で各区それぞれにおいて性判別に必要な細胞を採取した。性の判別は、従来から当所で実施しているPCR法により行い、性の判別状況を調査した。また、性判別細胞を採取した胚は各区ごとに個別に試験1と同様な方法で3～5時間修復培養を行い、胚の生存性を調査した。

試験3 透明帯切開による凍結性判別胚の受胎性

試験2のニードル法と同様の手技で性判別を行い、試験に供試した(試験区)。性判別胚は、修復培養後に生存を確認した胚を凍結保存した。凍結溶液には、0.4%ウシ血清アルブミン加修正リン酸緩衝液に1.5M Ethylene Glycol(和光純薬)、0.1M Trehalose(林原生物化学研究所)及び20%ウシ胎児血清(Gibco)を添加した液を用い、ダイレクト移植可能な緩慢凍結法で行った。すなわち、凍結溶液で15分間平衡後、図2に示すとおりストローに封入、直ちに-7℃に冷却しておいた凍結機に投入し、2分後に植氷を行い、8分間保持、その後-0.3℃/分で-30℃まで冷却し、液体窒素に投入する方法で行った。なお、対照区として試験2の方法で採取したAランク胚を2～5時間培養後に性判別を実施することなく、同様の方法で緩慢凍結を行った。



- ：胚
- A：凍結溶液(1.5M Ethylene Glycol + 0.1M Trehalose)
- B：基礎溶液(20%ウシ胎児血清添加ダルベッコ修正リン酸緩衝液)

図2 ストロー内の胚および溶液の封入方法

融解は、両区ともに液体窒素から取り出したストローを空气中で10秒間保持後、30℃の微温中に約10秒間浸漬して行い、その後直ちに移植器にセットして常法に従って受胎牛に対して1胚移植を行った。妊娠診断は、胎齢40日経過後に直腸検査により行った。

すべての試験における統計処理は、 χ^2 検定により行った。

結果および考察

試験1の結果を表1に示した。胚の回収日齢別の透明帯切開成功率は、6.5日区が51.5% (17/33) に対して6.75日区が75.0% (24/32) と高く、有意な差 ($p < 0.05$) が認められた。

表1 胚の回収日齢別の透明帯切開成績

区分	供試胚数	正常露出	成功率(%)
6.75日	32	24	75.0 ^a
6.5日	40	17	51.5 ^b

a-b: 異符号間に有意差あり ($p < 0.05$)

一般に胚回収が行われている6.5日では、得られる胚の発育ステージが後期桑実胚であり、透明帯切開を行う時期には栄養膜細胞を内部細胞塊との区分ができておらず切開部位を栄養膜細胞に近い場所に行うことが困難であり、成功率低下の原因と考えられる。一方、6.5日胚回収よりも6時間遅らせた6.75日区では、回収された胚の発育ステージは、大半が初期胚盤胞に進んでおり、栄養膜細胞と内部細胞塊の区分が明瞭となっているため切開部分の特定が行いやすく、成功率の高さにつながったものと考えられる。管ら¹³⁾は体外胚を用いた場合において胚盤胞に進んだ胚を利用しており、今回の結果と一致しており、透明帯切開を行う胚の回収日齢は6.75日が適していると考えられた。また、胚の回収日齢を7.0日で行う場合については、著者らの報告¹⁴⁾から7.0日で行うと発育がさらに進んだ拡張胚盤胞が主体で回収されることがわかっており、透明帯と胚細胞の間に全く隙間がなくなっており、透明帯切開を行うと金属刃により胚細胞を損傷する可能性が極めて高いと考えられたため今回は検討を行わなかった。

透明帯切開を行う器具別の成績を表2に示した。器具別の成功率は、ブレード区が75.0% (24/32)、マニーナイフ区が50.0% (16/32)、ニードル区が95.0% (38/40) とニードル区が他の2法に比べ有意に高い ($p < 0.05$) 成功率が得られた。マニーナイフは、両刃のメスであり、片刃のブレードよりも微細な切開に適していると考え検討してみたが、胚を切開するには刃先が大きく、胚細胞を傷つけるケースが多く認められ、透明帯切開に利用する場合には、刃先を加工するなどの工夫が必要であると考えられた。

今回、試験に供試した胚は発育の若い初期胚盤胞であったため透明帯が厚く、ブレードで透明帯を貫通して切開した場合には切開長が大きくなり、ニードル区に比べ切開部分の調整が行いにくかったことが成功率の差になったものと思われる。

管ら¹³⁾は、ブレードの刃先に特殊な加工を行ったブレードを用いてニードル法と同等の成功率が得られることを報告している。しかし、本試験で

は透明帯切開法の器具としてホールディングピペットとガラスニードルが適していると考えられた。

表2 透明帯切開手技別の成績

区分	供試胚数	正常露出	成功率(%)
ブレード区	32	24	75.0 ^a
マニーナイフ区	32	16	50.0 ^b
ニードル区	40	38	95.0 ^c

a-b-c: 異符号間に有意差あり (p<0.05)

次に、器具別の性判別成績並びに性判別サンプル採取後の胚の生存性を図3に示した。透明帯切開に成功した胚は、どの器具を用いても性判別に成功しており、判別率はいずれも100%であった。青柳ら¹⁵⁾、沼辺ら¹⁶⁾は切断分割する方法での性判別成功率は90%程度であり、サンプリング細胞の接着やサンプリング時のピペッティングによる細胞数の減少などが判定ミスの原因として考えられると報告している。透明帯切開法で得られる性判別用サンプル細胞は、透明帯より脱出した部分をカットするため球状の形態であることから接着

や細胞数の減少などがなく、細心の注意が必要なサンプリングを容易に行うことができた。このことがサンプリングミスの減少につながり、どの器具においても100%の判別率が得られたものと考えられた。また、サンプル採取後修復培養を実施した結果においても胚の生存率は100%で、管ら¹³⁾の報告と一致しており、透明帯切開法は、性判別を行う手技として有効な方法であると考えられた。

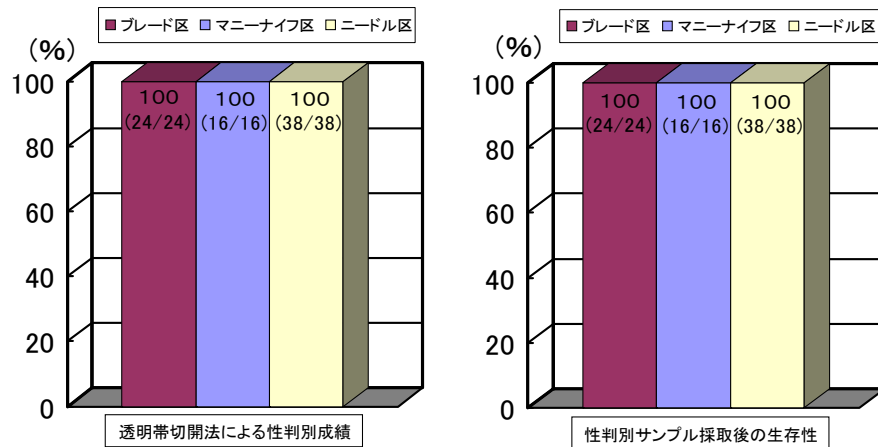


図3 手技別の性判別成績並びに性判別サンプル採取後の胚の生存性

試験3の移植成績を表3に示した。受胎率は、試験区が38.1% (8/21)、対照区が37.5% (15/40)で両者間に有意な差は認められなかった。全体的な受胎率が低いものの性判別を実施していない対照区と遜色のない受胎性が得られたことは透明帯切開法は胚への損傷を低減しているものと考えられる。著者らは、以前に切断分割法による性判別胚を同様の方法で緩慢凍結しダイレクト移植を行ったところ、受胎率は29.6%であるこ

とを報告している。また、中島ら¹⁷⁾、青柳ら¹⁵⁾も同様に凍結液は異なるものの受胎率は28.6%、25.0%であったことを報告している。一概に比較することはできないが、透明帯切開法は、透明帯を温存しており、胚の切断面積を小さくしていることから切断分割法に比べ胚へのダメージを低減できているものと考えられ、緩慢凍結法による凍結方法の確立が期待できる。また、両区において流産、異常分娩の発生も見られなかったことか

らも透明帯切開法は胚へのダメージの低減や損傷を最小限に抑えられる手技であると考えられる。しかし、著者らが報告¹⁸⁾したガラス化保存法による受胎率 44.0～46.2%よりも低率であり、今

後、緩慢凍結法による技術確立を図るためには凍結溶液並びに冷却方法などを検討し、受胎率の向上を図って行く必要があると考えられた。

表3 性判別胚の緩慢凍結・ダイレクト移植による受胎成績

区分	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)	流死産数	流死産率(%)
対照区	40	15	37.5	0	0
試験区	21	8	38.1	0	0

謝 辞

稿を終えるに当たり、本試験の移植を実施していただきました家畜保健衛生所並びに財団法人中国四国酪農大学校の関係各位に深謝致します。

引用文献

1) Charies. M. Herr, Neil A. Holt, Klaus I. Matthaiei and Ken. C. Reed(1990): Sex progeny from bovine embryos sexed with a rapid Y-chromosome-detection assay. Theriogenology, 33, 247.
 2) 佐伯和弘(2001): PCR 法による胚の性判別とその実用化. 畜産技術, 11, 5-8.
 3) 平山博樹(2005): 新しい遺伝子増幅法(LAMP)の応用と展開. 日本胚移植学雑誌, 27, 21-26.
 4) 中原 仁(2010): 岡山県における ET を活用した乳用牛改良の取り組み. 日本胚移植学雑誌, 32, 41-45.
 5) 有安則夫・小田頼政・中原 仁・坂部吉彦(2000): ガラス化保存法による性判別受精卵の凍結保存技術. 岡山総畜セ研報, 11, 1-3.
 6) 藤田達男(2003): 牛性判別胚のダイレクト法とガラス化保存法の比較ならびに性判別精度. 畜産技術, 2, 26-29.
 7) 堂地 修・高倉宏輔・今井 敬(1990): ガラス化による超低温保存したウシ胚の移植. 家畜繁殖学雑誌, 36, 69-72.
 8) 小淵祐子・川島敬二・須藤慶子・砂川政広(2001): フィールド活用した牛ガラス化胚の移植試験. 日本胚移植学雑誌, 28, 32-35.
 9) 山崎慎一郎・野村康宏・川井昭雄・葛西孫三郎(2000): EFS40 を用いた牛性判別胚のガラス化保存法の検討. 第7回日本胚移植研究会大会 第11回西日本胚移植研究会大会講演要旨, 41.

10) 井上直弘・大山真二・谷之木精悟・佐藤友治(1999): 牛操作胚のガラス化保存及び希釈方法の検討. 第10回西日本胚移植研究会大会講演要旨, 31.
 11) 濱田由佳子・富永敬一郎(2001): ゲル・ローディング・チップを用いたウシ胚のガラス化保存. 家畜人工授精, 205, 8-14.
 12) 中澤昭人・吉澤 緑・朱 叔文・影山修平・今野博章・鈴木宏昌・福井えみ子・松村晋(1996): ウシ初期胚の簡便なバイオプシー法. 第11回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会講演要旨, 70.
 13) 管 和寛・青柳和重(2006): 簡易器具を用いたウシ胚のバイオプシーの試み. 第22回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会講演要旨, 66-67.
 14) 野上與志郎・小田頼政・中原 仁(2000): 卵胞刺激ホルモン剤の夕・朝処理法により7.0日齢に採取された牛胚の品質と発育. 日本胚移植学雑誌, 22, 51-57.
 15) 青柳和重・伊藤博康・今田匡彦・叶内恒雄(1998): 家畜雌雄産み分け技術の確立(完了). 山形農研セ畜研報, 45, 1-2.
 16) 沼辺 孝・高田直和・佐藤秀俊・及川俊徳・木船厚恭・亀山賢次・堀内俊孝(1995): 牛胚の性染色体分析およびPCR法による性判別. 日本胚移植学雑誌, 17, 183-190.
 17) 中嶋達彦・佐藤敬明・守田 智・峯 英征(1996): 受精卵における性判別技術開発試験(第7報). 熊本農研セ研報, 21.
 18) 小田頼政・中原 仁・有安則夫(2009): ウシバイオプシー胚のガラス化保存方法. 岡山総畜セ研報, 18, 20-23.

