

バージンフラッシュと胚の性判別技術を活用した優良乳用牛ドナーの効率的増殖

生物工学部 飛田府宣、佐藤克彦、佐田竜一、川野辺章夫¹⁾、加藤和彦²⁾、岸善明

¹⁾現 県農業大学校 ³⁾現 県北家畜保健衛生所

要 約

高い遺伝的能力を持つ乳用牛の迅速かつ効率的な増殖を目的とし、未経産牛からの採胚(バージンフラッシュ)及び胚の性判別技術を用いて後継牛の生産を実施した。

- 1 バージンフラッシュにより、のべ9回の採胚で50個の正常胚が得られた。
- 2 50個の胚を性判別することにより、雄と判定された24個の胚の移植は不要となり、後継牛の生産に必要なレシピエント牛の頭数を半減させることができた。
- 3 性判別胚をガラス化保存後に移植し、69.2%(9/13)の受胎率が得られた。
- 4 雌と判定された7個の胚から生産された子牛の性別は、判定結果とすべて一致していた。

以上のことより、バージンフラッシュと胚の性判別技術は、迅速かつ効率的な後継牛の増殖に有効であると考えられた。

目 的

栃木県酪農試験場(以下、試験場)では、県内乳用牛の改良を進めるために、高い遺伝的能力を持つ牛(スーパーカウ)の胚を酪農家に配付している。胚移植による改良の速度を上げるためには、供胚牛(ドナー牛)の世代間隔の短縮と、胚の生産個数を増やすことが必要である。したがって、スーパーカウが若齢(未経産)のうちに胚を採取(バージンフラッシュ)し、早急に後継ドナー牛を増殖させることは重要と考えられる。一方、胚移植により後継牛を効率的に生産するためには、状態の良い受胚牛(レシピエント牛)を多数用意することが条件であるが、試験場内で利用できる頭数には限りがある。ここで、性判別した胚を用いれば、用意するレシピエント牛の頭数は約半分済み、問題の解決につながる。今回、迅速かつ効率的なスーパーカウ後継牛の増殖を目的とし、バージンフラッシュによる回収胚の性判別と、判別胚のレシピエント牛への移植による後継牛の生産を実施したので報告する。

材料と方法

ドナー牛は、平成13年度と14年度にカナダから輸入したホルスタイン種未経産牛9頭を用いた。採胚時のドナー牛の月齢は13~18ヶ月で、平均16.4ヶ月であった。過剰排卵処置及び胚の採取は、常法により各ドナー牛1回ずつ実施した。卵胞刺激ホルモンの総量は1頭あたり20mgとした。性判別に供する胚は、発情日を0日として7~8日に採取されたA、B及びCランクを用いた。胚の発育ステージは後期桑実胚、初期胚盤胞及び胚盤胞であった。バイオブシーは、胚の一部を金属刃(マイクロブレード)で切断する方法を用い、性別の判定は、PCR反応による雄特異的バンドの検出により行った。移植胚は、100µMβ-メルカプトエタノール含有20%牛胎児血清加199培地(TCM199)を用いて、5%CO₂、38.5℃の条件下で1~5時間培養した。培養後、胚を新鮮移植またはガラス化保存後に移植した。ガラス化保存は、25%エチレングリコール(EG)+25%ジメチルスルフォキシド(DMSO)を保存液とし、胚をプラスチックストローに封入するIshimoriら¹⁾の方法の変法²⁾

(VSED 法)、または 20% EG + 20% DMSO + 0.6M シュークローズ(Suc)を保存液とし、ゲル・ローディング・チップ(GL-Tip)を用いた Tominaga ら³⁾の方法(GL-Tip 法)により実施した。ガラス化保存の手順、保存容器への胚の吸引方法及びガラス化保存胚の加温・希釈方法は図1、2及び3に示した。移植者は試験場職員2名とし、レシピエント牛は新鮮移植胚については試験場本場のホルスタイン種経産牛、ガラス化保存胚については試験場本場または南那須育成牧場のホルスタイン種未経産牛を用いた。移植後の妊娠診断は50日前後に直腸検査により実施した。

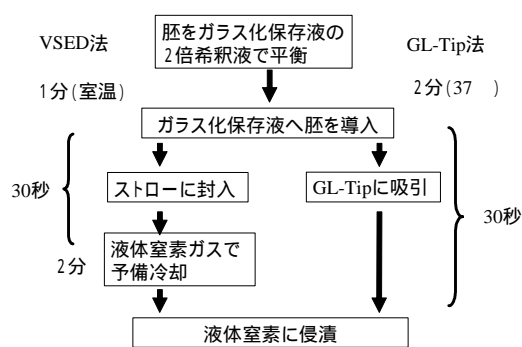


図1 ガラス化保存の手順

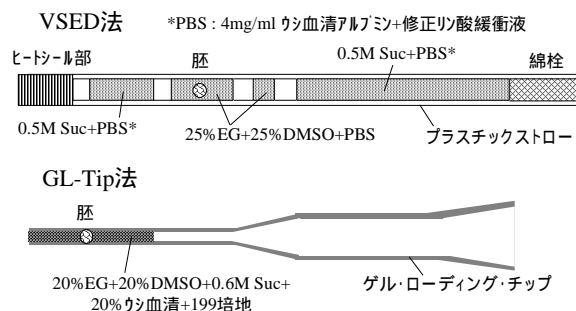


図2 保存容器への胚の吸引方法

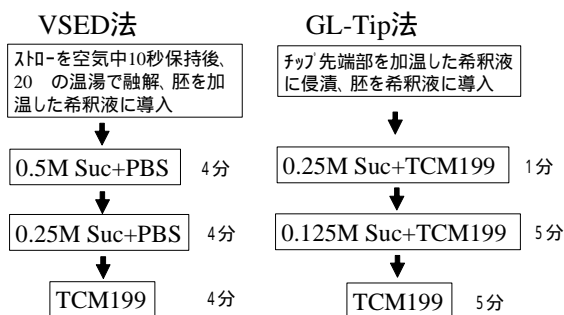


図3 ガラス化保存胚の加温・希釈方法

結果

バージンフラッシュの成績は、9回の採胚で50個の正常胚が回収され、正常胚率は67.6%であった(表1)。採胚1回あたりの平均正常胚数は5.6個であった。これらの胚の性判別結果は、雌胚22個、雄胚24個及び判定不能4個で、判定率は92.0%であった(表2)。性判別胚の受胎率は、新鮮移植で0%(0/2)、ガラス化保存後の移植はVSED法とGL-Tip法でそれぞれ77.8%(7/9)と50.0%(2/4)であった(表3)。また、バイオプシー前の胚の品質別の移植成績は、AランクとBランクで差は認められなかったが、Cランク胚の移植では受胎例が得られなかった(表4)。受胎した9個の移植胚から生産された子牛は、雌8頭と雄1頭であった。これらのうち、雌と判定された胚から生産された子牛の性別は、判定結果とすべて一致していた(表5)。

表1 バージンフラッシュの成績

ドナー	採胚総数	正常胚数	正常胚率(%)*
1	13	6	46.2
2	3	3	100
3	2	2	100
4	13	10	76.9
5	0	0	-
6	5	4	80.0
7	6	3	50.0
8	25	18	72.0
9	7	4	57.1
計	74	50	67.6

*正常胚数/採胚総数 × 100

表2 胚の性判別結果

ドナー	PCR実施胚数	胚の性別			判定率(%)*
		不明	不明	不明	
1	6	3	1	2	66.7
2	3	0	3	0	100
3	2	0	1	1	50.0
4	10	4	5	1	90.0
5	0	0	0	0	-
6	4	2	2	0	100
7	3	1	2	0	100
8	18	10	8	0	100
9	4	2	2	0	100
計	50	22	24	4	92.0

*(実施胚数 - 判定不明胚数) / 実施胚数 × 100

表3 性判別胚の移植成績

移植胚	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)*
新鮮	2	0	0
ガラス化保存 (VSED法)	9	7	77.8
ガラス化保存 (GL-Tip法)	4	2	50.0
計	15	9	60.0

*受胎頭数/移植頭数×100

表4 ハイオプシ-前の胚の品質と移植成績

移植胚	ハイオプシ-前の胚のランク		
	A	B	C
新鮮	0%(0/2)*		
ガラス化保存 (VSED法)	66.7%(4/6)	100%(3/3)	
ガラス化保存 (GL-Tip法)	100%(1/1)	50.0%(1/2)	0%(0/1)

*受胎率%(受胎頭数/移植頭数)

表5 受胎した性判別胚による子牛生産状況

胚	移植月日	胚の性別	分娩日	産子
1	H14.10.4		H15.7.2	
2	H14.10.4	不明	H15.6.17	
3	H14.11.15		H15.8.13	
4	H15.1.23		H15.10.17	
5	H15.2.12		H15.11.5	
6	H15.2.12		H15.11.12	
7	H15.3.4	不明	H15.12.1	
8	H15.7.9		H16.4.3	
9	H15.10.26		H16.7.16	

考 察

試験場は平成5年度から、県内の乳用牛改良の促進を目的とし、高い遺伝的能力を持つ乳用牛の胚を酪農家に配付する事業を行っている。この事業で用いるドナー牛は、平成5～6年度と平成13～14年度に北米から輸入した牛とその娘牛であり、これらの牛を「スーパーカウ」と呼んでいる。この事業の目的を果たすためには、より多くの胚を、長期間に渡って安定的に生産することが求められ、胚移植によるドナー牛の効率的な増殖は重要な鍵を握っている。

平成13～14年度にカナダから輸入した9頭の牛はすべて未経産牛であり、できるだけ早く、より多くの後継牛を生産するためにバージンフラッシュを実施した。乳用牛の未経産牛からの採胚は、北米では商業的に実施されており、採胚1回あたり平均4～5個の正常胚を採取している機関もある⁴⁾。今回、バージンフラッシュにより、採胚1回あたり平均5.6個の正常胚が得られた。これは、採胚1回あたり3.9個の正常胚が得られたとする伊藤らの報告⁵⁾に劣らない成績であった。また、当試験場が平成6～14年度に実施した「スーパーカウ」の採胚のうち、経産牛をドナーとした成績は、採胚1回あたりの平均正常胚数は4.1個(採胚のべ頭数276頭、総正常胚数1,142個)であった(未発表)。今回、バージンフラッシュの実施にあたっては、ドナー牛の生殖器等の発育が十分であることを確認後に採胚を行ったため、経産牛と同等の採胚成績が得られたと考えられる。ただ、未経産牛の月齢が進むほど後継牛の生産が遅れることになるため、今後はどの程度の発育でバージンフラッシュを実施するのが最も効率が良いか検討する必要がある。

今回、採取された50個の正常胚を性判別したところ、24個が雄と判定された。これらの雄胚はドナー牛の後継牛生産には不要であるため、ガラス化保存・融解後に培養し、生存性の確認(ロットチェック)に用いた。雄胚の移植が不要となったことにより、性判別を実施しなかった場合と比較して、移植に必要なレシピエント牛の数をのべ50頭からのべ26頭に減らすことが可能となった。胚移植で高い受胎率を得るためには、状態の良いレシピエント牛を用意することが不可欠であり⁶⁾、必要なレシピエント頭数を半減させたことは時間と労力の節減に大きな効果があった。一方、性判別した50個のうち、4個の胚について雌雄の判定が不能であり、判定率は92.0%となった。この判定率は既報⁷⁾と同等であった。判定不能の原因としては、サ

ンプリングエラーあるいは細胞変性部分を PCR 反応サンプルとして用いたため等が考えられる。サンプリングエラーは、技術の習熟により減らすことが可能である。また、低ランク胚等、細胞変性部分を多く含む胚のサンプリングについては、正常細胞をあわせて採取する等、今後検討が必要である。

ガラス化保存法は、緩慢凍結法で認められる凍結・融解時における胚の細胞内の氷晶形成を抑えるため、保存後の生存性は緩慢凍結法に比較して高いとされている⁸⁾。今回、2種類のガラス化保存法により保存したバイオプシー胚の受胎率は69.2% (9/13)であった。これは、既報⁷⁾の1.8M EG+0.1M Sucまたは1.8M EG+0.1M トレハロースを用いた緩慢凍結法(ダイレクト法)による受胎率(35.3%)のおよそ2倍であり、性判別胚に対するガラス化保存法の有効性が確認された。また、ガラス化保存法のうち、VSED 法により保存したバイオプシー胚の受胎率は77.8% (7/9)であり、GL-Tip 法により保存したバイオプシー胚の受胎率は50.0% (2/4)であった。バイオプシー胚をVSED 法とGL-Tip 法により保存・融解後に培養・移植した試験では、培養成績は両者に差はなく⁹⁾、受胎率はGL-Tip 法が高かったとする報告¹⁰⁾がある。本試験では、GL-Tip 法により保存した4個の胚のうち1個はバイオプシー前の形態的品質がCランクと判定された胚であり、これが受胎率を低下させた可能性がある。GL-Tip 法は、VSED 法に比べ胚の保存操作が容易であり、今後の移植成績によっては野外応用が可能であると考えられる。また、今回は新鮮移植したバイオプシー胚の受胎例は得られなかった。新鮮移植した性判別胚の受胎率は50%前後の報告¹⁰⁾が多い。本試験は移植例数が少ないため、他の報告と比較することはできないが、新鮮移植は保存胚の移植と異なり、用意したレシピエント牛の状態が最良でなくても移植せざるを得ないケースもあり、受胎率の安定

に影響を及ぼす危険性があると考えられた。いずれにしても、後継牛を安定的に生産するためには、性判別した胚の受胎率を高く保つことが不可欠な条件であり、今後もガラス化保存法の移植例数を増やし、受胎率を安定化させる方法について検討する必要がある。また、今回性判別胚から生産された子牛の性は判定結果とすべて一致していたが、雌と判定した胚の約10%に誤判定が生じた例¹¹⁾もあるため、慎重な判定を心がけることも重要な点である。

本試験により、バージンフラッシュは、生殖器等の発育が十分なドナー牛を用いれば、経産牛からの採胚と同等の正常胚数が得られること、ガラス化保存した性判別胚は高い受胎率が得られることが示された。以上のことから、バージンフラッシュと胚の性判別技術の活用が、優良乳用牛ドナーの迅速かつ効率的増殖に有効であると考えられた。

参考文献

- 1) Ishimori H. et al. (1993) Vitrification of bovine embryos in a mixture of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide : *Theriogenology* 40, 427-433
- 2) 佐藤克彦ら. (2003) ウシ胚のガラス化保存に関する試験 : 栃木酪試研報 126, 3-8
- 3) Tominaga K. et al. (2001) Gel-loading tip as container for vitrification of *in vitro*-produced bovine embryos : *J Reprod Dev* 47, 267-273
- 4) 下平乙夫. (2000) 最近の北米受精卵移植実施機関の取り組み状況について() : 家畜人工授精 198, 87-90
- 5) 伊藤博康ら. (1998) 未経産乳用牛の採胚(バージンフラッシュ) : 山形農研セ畜研報 45, 14
- 6) 橋谷田豊. (1996) 家畜人工授精講習会テキスト(家畜受精卵移植編) 214-231
日本家畜人工授精師協会, 東京
- 7) 飛田府宣ら. (2000) 牛胚の PCR 法による性判別試験(第3報) ダイレクト法により凍結保存したバイオプシー胚の移植試験 : 栃木酪試研報 124, 3-6
- 8) 葛西孫三郎. (1997) 受精卵の凍結保存 - 緩慢法とガラス化法 - : 家畜人工授精 183, 12-21
- 9) 大塚由佳子. (2004) ウシバイオプシー胚の超低温保存法と受胎性:VSED ガラス化法と GL-Tip 超急速ガラス化法の比較 : 畜産技術 591, 24-27
- 10) Tominaga K. (2004) Cryopreservation and sexing of *in vivo*- and *in vitro*-produced bovine embryos for their practical use : *J Reprod Dev.* 50, 29-38
- 11) 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 572, 26-29

Efficient production of excellent donor cows using the technique of virgin flash and sexing of embryos

Summary

The objective of this experiment is production of the dairy cows that have inherited excellent production capacity of lactation. We executed the production of the calves by the technique of virgin flash (collection of embryos from nulliparous heifers) and transfer of sexed embryos.

- 1 50 embryos were obtained by executing the virgin flash of nine times.
- 2 By transferring sexed embryos, the number of recipient cows for which 50 was necessary was able to be decreased to 26.
- 3 After the sexed embryos had been vitrified, the embryos were transferred to the recipient cows and the pregnancy rate of 69.2% (9/13) was obtained as a result.
- 4 The sexes of the calves derived from seven embryos judged female were all females.

In conclusion, the technique of virgin flash and the technology of sexing embryos were effective to the further production of the dairy cows having inherited excellent production capacity.