

完了試験研究成績（2006年2月作成）

関東東海北陸 > 畜産草地 > 家畜育種・繁殖 > 牛共通 > 福井畜試

課題 I D :

研究課題：ウシ胚の性判別技術の確立

担当部署：福井畜試・技術開発部・バイテク研究グループ

担当者名：田中健

協力分担：

予算区分：県単

研究期間：完2004～2005年度

1. 目的

ウシ胚の性判別技術は、新鮮胚において現場での普及がなされているが、凍結胚での利用は耐凍性が低く、普及段階に至っていない。そこで、生存性の高いバイオブシー胚を作出するためサンプリング方法、凍結方法について検討する。

2. 方法

試験 1 胚のバイオブシーを行い性判別を実施。サンプリング方法の違いによる性判別率、操作時間、生存率を比較した。

- 1) 供試胚：1.8 M エチレングリコールにより凍結された胚を融解後 3 時間培養し、生存したものを供試。
- 2) サンプリング方法：バイオブシーは、マイクロピペットにより細胞を吸引する吸引法と胚の一部を金属プレートにより切断する切断法で実施。
- 3) 性判別：LAMP 法により判定。
- 4) 培養：100 μ M β -メルカプトエタノール添加 20% 牛胎児血清加 TCM-199 培地上述の培地を用いてバイオブシー後 3 時間培養。

試験 2 生存を確認したバイオブシー胚を用いて、10% グリセリンによる緩慢凍結法またはガラス化保存法（石森ら VSED 法）により再凍結し、融解 3 時間および 24 時間後の生存率を比較した。

3. 結果の概要

- 1) サンプリングの違いによる性判別率は、吸引法で 88.2% (15/17)、切断法で 100% (13/13) であった（表 1）。
- 2) 1 胚あたりのバイオブシー操作時間は吸引法で 19.4 分、切断法で 7.1 分であった（表 2）。
- 3) バイオブシー後 3 時間培養した生存率は、吸引法で 87.5% (14/16)、切断法で 85.7% (12/14) であった（表 3）。
- 4) バイオブシー胚の再凍結融解 3 時間および 24 時間後の生存率は、吸引法によりサンプリングした胚の緩慢保存法で 12.5% (1/8)、12.5% (1/8)、切断法でサンプリングした胚のガラス化保存法で 84.6% (11/13) 61.5% (8/13) であった（表 4、5）。

[具体的データ]

表1 LAMP法による性判別率 (生存胚/供試胚、%)

サンプリング方法	サンプリング時の胚ステージ					計	判別率
	CM	EB	BL	EXB	HD		
吸引法	4/5	2/2	3/3	6/7		15/17	88.2
切断法		1/1	2/2	2/2	8/8	13/13	100.0

表2 胚のバイオプシー操作時間

サンプリング方法	胚数	操作時間 (分/胚)
吸引法	48	19.4±8.9
切断法	7	7.1±3.7

表3 培養3時間後のバイオプシー胚の生存率 (生存胚/供試胚、%)

サンプリング方法	サンプリング時の胚ステージ					計	生存率
	CM	EB	BL	EXB	HD		
吸引法	3/5	1/1	2/2	8/8		14/16	87.5
切断法	0/1	1/2	3/3	2/2	8/8	12/14	85.7

表4 培養3時間後のバイオプシー胚の再凍結後の生存率 (生存胚/供試胚、%)

サンプリング方法 凍結方法	サンプリング時の胚ステージ					計	生存率
	CM	EB	BL	EXB	HD		
吸引法 緩慢保存	0/1	1/3		0/4		1/8	12.5
切断法 ガラス化保存	0/1	0/1	1/1	2/2	7/8	11/13	84.6

表5 培養24時間後のバイオプシー胚の再凍結後の生存率 (生存胚/供試胚、%)

サンプリング方法 および凍結方法	サンプリング時の胚ステージ					計	生存率
	CM	EB	BL	EXB	HD		
吸引法 緩慢保存	0/1	1/3		0/4		1/8	12.5
切断法 ガラス化保存	0/1	0/1	1/1	2/2	5/8	8/13	61.5

4. 成果の活用面と留意点

5. 残された問題と対応

凍結したバイオプシー胚の移植を現場で行い、受胎率や出生状況等について追跡調査する。