

通し番号	3938
------	------

分類番号	14-57-22-10
------	-------------

(成果情報名) 牛性判別胚の凍結保存及び移植方法の検討	
<p>[要約]</p> <p>ガラス化法により凍結保存した牛性判別胚の融解後の生存性及び受胎性について検討した。融解後の生存率は、ガラス化ステップワイズ法で97.2%、ガラス化ワンステップ法で95.2%、ゲル-デイングチップ法で100%であり、いずれの方法も高い生存率であった。移植後の受胎率は、ガラス化ステップワイズ法で33.3%、ガラス化ワンステップ法で42.9%、ガラス化直接移植法で41.7%、ゲル-デイングチップ法で50.0%であり、ゲル-デイングチップ法が最も高く、無処置胚と同程度の受胎率が得られた。また、凍結融解後の胚を性判別のために切断し、生存性を観察したところ切断24時間後の生存率は44.4%であった。</p>	
(実施機関・部名) 神奈川県畜産研究所 畜産工学部	連絡先 046-238-4056

[背景・ねらい]

近年、PCR法を用いた牛の雌雄産み分けが可能となっているが、技術普及のためには、凍結胚での安定した受胎成績を確保することが必要である。そこで、性判別胚の凍結法が生存性や受胎性に及ぼす影響を検討した。また、凍結保存された胚が、融解後に性判別が可能かについても検討した。

[成果の内容・特徴]

- 1 性判別胚の凍結融解後の生存率は、ガラス化ステップワイズ法で97.2%、ガラス化ワンステップ法で95.2%、ゲル-デイングチップ法で100%であり、いずれの方法も高い生存率であった。(表1、表2)
- 2 性判別胚の受胎率は、ガラス化ステップワイズ法で33.3%、ガラス化ワンステップ法で42.9%、ガラス化直接移植法で41.7%、ゲル-デイングチップ法で50.0%であり、ゲル-デイングチップ法が最も高く、性判別していない胚と同程度の受胎率が得られた。(表3)
- 3 ダイレクト法で凍結保存された低ランク胚(B'ランク)を、融解後3時間培養し、性判別した。検査用細胞切断後、3時間の生存率は88.9%、24時間の生存率は44.4%であり、低率ではあるが移植可能な胚を得ることができた。(表4、図1)

[成果の活用面・留意点]

- 1 ゲル-デイングチップ法の凍結及び融解操作は極めて精密であり、熟練した胚操作技術が必要である。

[ 具体的データ ]

表 1 凍結手法

凍結手法	耐凍剤	凍結容器	希釈法	希釈液	移植手順
A法 <sup>1</sup>	VSED液 <sup>5</sup>	ストロー	段階希釈	GLS液 <sup>7</sup>	生存性確認後移植
B法 <sup>2</sup>	VSED液	ストロー	ストロー内1段階希釈	EGS液	生存性確認後移植
C法 <sup>3</sup>	VSED液	ストロー	ストロー内1段階希釈	EGS液 <sup>8</sup>	直接移植
D法 <sup>4</sup>	EDS液 <sup>6</sup>	ゲルローディングチップ <sup>9</sup>	段階希釈	Suc液 <sup>9</sup>	生存性確認後移植

1 A法: ガラス化ステップワイズ法

2 B法: ガラス化ワンステップ法

3 C法: ガラス化直接移植法

4 D法: ゲルローディングチップ法

5 VSED液; 25% ethylene glycol + 25%DMSO / 0.4%BSA加D-PBS

6 EDS液; 20% ethylene glycol + 20%DMSO + 0.6MSucrose / 20%CS加TCM199

7 GLS液; 6%・4%・2%・0% glycerol / 0.3%BSA・0.3MSucrose加D-PBS

8 EGS液; 5% ethylene glycol + 0.15MSucrose / 10%CS加D-PBS

9 Suc液; 0.25M・0.125M Sucrose / CS加TCM199

表 2 性判別胚の融解後の生存性

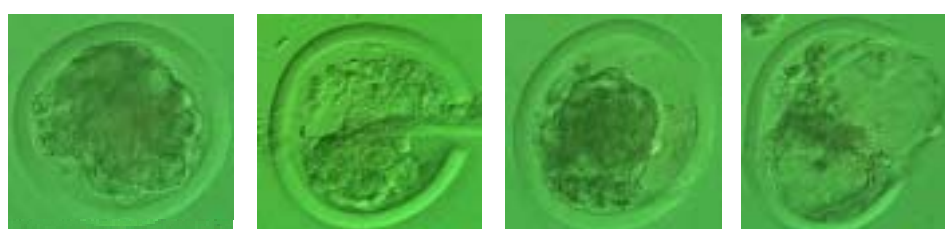
凍結法	供試胚数	生存胚数	生存胚率
A法	36	35	97.2%
B法	21	20	95.2%
D法	10	10	100.0%

表 3 性判別胚の移植後の受胎成績

凍結法	移植頭数	受胎頭数	受胎率
A法	30	10	33.3%
B法	14	6	42.9%
C法	12	5	41.7%
D法	10	5	50.0%

表 4 凍結保存胚の切断後の生存性

融解胚数	融解後 死滅胚数	生存率	切断胚数	3時間培養後		24時間培養後	
				生存胚数	生存胚率	生存胚数	生存胚率
				A	B/A	C	C/A
12	3	75.0%	9	8	88.9%	4	44.4%



融解後 3 時間

切断

修復培養 3 時目

修復培養 24 時目

図 1 凍結保存胚の切断後の形態

[ 資料名 ] 平成 14 年度試験研究成績書 ( 繁殖工学・乳牛・肉牛・飼料作物 )

[ 研究課題名 ] 性判別受精卵の凍結保存及び移植方法の検討

[ 研究期間 ] 平成 10 ~ 16 年度

[ 研究者担当名 ] 橋村慎二・坂上信忠・仲澤慶紀・岸井誠男