

完了試験研究成績（2022年1月作成）

近畿中国四国＞畜産草地＞家畜育種・繁殖＞乳牛、肉用牛＞愛媛畜研

課題名：牛受精卵有効活用技術確立試験

担当部署名：愛媛県農林水産研究所 畜産研究センター 研究開発室

担当者名：今岡豊、藤村佳絵

協力分担：なし

予算(期間)：県単（2019年度～2021年度）

1. 目的

現在、本県が作出したブランド牛「愛媛あかね和牛」の増頭及び県内黒毛和種繁殖牛の改良促進を目的とし、採取胚を凍結保存後県内畜産農家へ配布している。しかし、胚の2割は変性細胞の多い低品質胚と判定され、受胎率が低いことから配布胚から除外している。

近年、胚を同時に2胚移植することにより、胚から分泌される妊娠認識物質（IFN- τ （インターフェロンタウ））を増量し、母体-胚間の妊娠認識を強化することで受胎率が向上することが報告されており、低品質胚においても2胚移植によりIFN- τ を補強することで受胎率向上が期待される。しかし、両胚が受胎し異性多胎となった場合、雌産子が高確率で不妊牛となるため繁殖雌牛増頭及び改良促進を目的とした場合、同性2胚移植を行う必要がある。

今回、同性2胚移植による低品質胚有効活用技術の確立を目的とし、性判別技術及び性選別精液を用いた低品質胚有効活用技術の検討を行った。

2. 方法

○性判別技術による低品質胚有効活用技術の検討

① 性判別に供する細胞採取部位の検討

- ・供試胚：黒毛和種生体由来の低品質胚（Code2及び3）
- ・試験方法：低品質胚のバイオプシー部位を変性細胞のみ（試験区1）及び変性部位と正常細胞（試験区2）の2区を設定し、性判定率を調査した。性判別には牛胚性判別試薬キット（栄研化学（株））定法にて行った。

② 性判別低品質胚の凍結・融解後の生存性調査

- ・供試胚：黒毛和種生体由来の低品質胚（Code2）
- ・試験方法：ガラス化凍結保存した性判別低品質胚において、融解液の最終希釈液濃度が胚の生存性に及ぼす影響を調査した。ガラス化凍結保存にはビトラン-7（ミサワ医科工業（株））を用い、定法融解法（最終希釈液 Suc 濃度 0.2M）を1段階希釈区とし、定法融解後、20%FBS 加 D-PBS にて希釈（最終希釈液 Suc 濃度 0.1M）する区を2段階希釈区として、培養後3時間及び24時間後の生存性を調査した。

○性選別精液による低品質胚有効活用技術の検討

- ・供胚牛：黒毛和種経産牛（5頭）
- ・受胚牛：ホルスタイン経産牛、黒毛和種経産牛
- ・供試胚：緩慢凍結保存した低品質胚（Code2及び3）
- ・試験方法：性選別精液により雌胚を採取し、動物用受精卵注入カテーテル（モ4号、ミサワ医科工業（株））を用いて2胚移植を実施した。移植に際しては、受胎率、生産率（双子率）及び性一致率を調査した。

3. 研究期間を通じての成果の概要

○性判別による低品質胚有効活用技術の検討

① 性判別に供する細胞採取部位の検討

11回の採胚で38胚の低品質胚が採取され、その内32胚を試験に供した。変性細胞及び変性細胞と正常細胞を用いた試験区で性判定率は81% (17/21)、82% (9/11) となり、両区で性判定率に差は認められなかった。性内訳は雌胚が14胚、雄胚が12胚、エラーが6胚となり(表1)、11回の採胚の内8ペアの同性胚が得られた。

表1. 細胞採取部位による性判定率及び性内訳

試験区	供試胚数	性判定率 (%)	性内訳		
			雌胚数	雄胚数	エラー胚数
変性細胞	21	81	12	5	4
変性細胞+正常細胞	11	82	2	7	2

② 性判別低品質胚の凍結・融解後の生存性調査

体外培養3時間及び24時間後の生存率は、1段階希釈区で60% (3/5) 及び20% (1/5) であったのに対し、2段階希釈区では100% (5/5) 及び60% (3/5) となり、2段階希釈区で生存性が高い傾向にあった(表2)。ホルスタイン種経産牛1頭へ移植したが不受胎であった。

表2. 体外培養後の生存率

試験区	供試胚数	生存率 (%)	
		3時間	24時間
2段階希釈区	5	100	60
1段階希釈区	5	60	20

○性選別精液による低品質胚有効活用技術の検討

6回の採胚の結果23胚の低品質胚(Code2~3)を採取し、同性低品質胚2胚を封入したストローを10本作成した(表3)。採胚1回あたりのストロー作成本数は1.7本となった。5頭へ移植した結果、不受胎4頭、妊否不明1頭である。

表3. 性選別精液を用いた採胚成績

採取胚数	品質判定			
	Code1	Code2	Code3	Code4 (変性胚・未受精卵数)
86	12	13	10	51

4. 研究期間を通じての成果の要約

性判別による低品質胚活用技術の検討では同性低品質胚2胚を封入したストローを作成した場合、作成本数が1採胚あたり0.7本と低い値となった。そのため、性選別精液を用いて採胚を行ったところ、同性低品質胚2胚のストロー作成本数が1採胚あたり1.7本と上昇した。しかし現段階で受胎は確認されていない。

[キーワード] 黒毛和種牛、低品質胚、ガラス化凍結保存

5. 成果の活用面と留意点

6. 残された問題とその対応

・性判別による低品質胚有効活用技術の検討では1採胚あたりのストロー作成本数が少ないため、配布胚として活用することが困難。

・性選別精液による低品質胚有効活用技術の検討では、生存性の高いガラス化保存に取り組むことで受胎率を上げ、今後、受胎率や性一致率について検討する。