

## 牛低ランク胚有効利用技術実用化の検討

井上直弘・大山真二・佐藤友治・岩崎英昭

(宮崎県優良家畜受精卵総合センター)

Naohiro INOUE, Sinji OYAMA, Tomoharu SATOH and Hideaki IWASAKI :

Utilization of Low Grade Bovine Embryo

胚移植技術が向上し高度化されるに伴い、牛の改良増殖技術としての活用がますます増大し、良質胚の増産が期待されている。当センターでは、優良供胚牛から生産された胚を県内に供給しており、黒毛和種およびホルスタイン種の年間採胚数は約1,500個である。そのうち、胚の供給に使用できない低ランク胚(変性部が30~50%を占めるB'およびCランク胚)が約15%を占めている。そこで、この供給に使用されない低ランク胚を有効活用するために、凍結前に短時間培養したものを凍結し、凍結胚の融解後の生存性に及ぼす影響を検討するとともに、13名の人工授精師による移植試験を試みた。

## 1. 材料および方法

供試胚: 黒毛和種およびホルスタイン種牛体内低ランク胚 (B'~Cランク胚) (写真1)。

胚の培養条件: 培養液として100  $\mu$  M  $\beta$ -メルカプトエタノール加10%FCS加TCM-199を使用し、38.5°C、2.5%CO<sub>2</sub>の気相条件下で、20~24時間培養した。

培養胚の品質評価: 培養後、内細胞塊が明瞭な胚をFair、不明瞭な胚をPoorとランク付けした(写真2)。

胚の凍結方法および融解方法: 凍結方法として宮崎シンプル法(1996年11月特許取得、0.3%BSA加m-PBSを基礎溶液とし、10%グリセリンを耐凍剤に使用)で凍結。耐凍剤の添加は一段階で行い、15分間平衡後、-4.6°Cのプログラムフリーザーに投入し、2分後に植氷、13分間保持後、-0.5°C/分で-30°Cまで冷却し、10分間保持後液体窒素中に投入、保存した。

融解方法: LN<sub>2</sub>から取り出し、5秒間空气中に保持後、30°Cの微温湯中に横置きにし、5分経過後、移植器に装着し移植に供試した。

## 2. 結果および考察

低ランク胚の凍結-融解後の生存性は、培養区が無培養区に比べ、融解後48時間の生存胚率(培養区:89.9%、無培養区:58.3%)および脱出胚盤胞率(培養区:60.6%、無培養区:25.0%)とともに高い成績となり、低ランク胚を短時間培養をすることによって、融解後の生存性を向上することが出来た(第1表)。この結果を踏まえて、移植試験には、培養胚のみを使用した。

培養後の品質がFairの胚が、Poorの胚より新鮮胚、凍結胚とも高い受胎率(新鮮胚:Fair胚:40.0%、Poor胚:0%、凍結胚:Fair胚:49.1%、Poor胚:8.3%)を得ることが出来た。以上のように、低ランク胚は、短時間培養することで凍結-融解後の生存性を高めることができ、また、培養後の形態を確認することで、新鮮胚、

凍結胚とも高い受胎率が得られ、宮崎シンプル法での凍結移植も十分可能であることが示された。

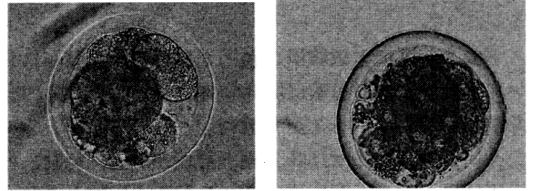


写真1 培養前 (Cランク) 培養前 (B'ランク)

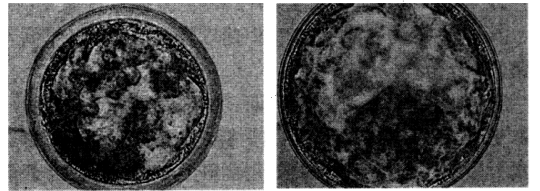


写真2 培養後 (Poor) 培養後 (Fair)

第1表 低ランク胚の凍結-融解後の生存性

試験区	供試胚数	生存胚数		
		24時間 (%)	48時間 (%)	脱出胚盤胞 (%)
無培養区	24	17 (70.8) <sup>a</sup>	14 (58.3) <sup>a</sup>	6 (25.0) <sup>a</sup>
培養区	33	31 (93.9) <sup>b</sup>	29 (89.9) <sup>b</sup>	20 (60.6) <sup>a</sup>

注) a-b間に有意差あり (p<0.05)  
c-d間に有意差あり (p<0.01)

第2表 低ランク胚 (培養後) の移植成績

胚区分	品質	移植頭数	受胎頭数	不明頭数	受胎率 (%)
新鮮胚	Poor	3	0	0	0.0
	Fair	11	4	1	40.0
	計	14	4	1	30.8
凍結胚	Poor	12	1	0	8.3 <sup>a</sup>
	Fair	55	26	2	49.1 <sup>b</sup>
	計	67	27	2	41.5
合計	Poor	15	1	0	6.7 <sup>a</sup>
	Fair	66	30	3	47.6 <sup>b</sup>
合計		81	31	3	39.7

注) a-b間に有意差あり 品質: 培養後の品質