

平成27年度 岩手県農業研究センター試験研究成果書

区分	指導	題名	パーコール濃度15%のPBS溶液による胚の品質評価		
[要約] 牛凍結胚移植において、発育ステージが収縮桑実胚から初期胚盤胞のCode 1胚は、パーコール溶液で選別を行い、パーコール分画15%以上と評価した胚を凍結保存することで高い受胎率が得られる。					
キーワード	胚の品質判定	パーコール	生存率	畜産研究所 家畜育種研究室	

1 背景とねらい

牛体内胚移植（凍結1胚）による受胎率（平成21年度）は、全国46%、岩手県52%となっている。牛の胚移植において良好な受胎率を得るための主要因は、①胚の品質、②受胎牛の状態、③移植技術の高低がある。中でも①胚の品質は重要であり、受胎率を高めるために品質の高い胚（Excellentとgood）を凍結に用いているが、それらについても、形態学的には微妙な違いを有している。

そこで、胚を形態や比重によって分別し、凍結融解後の生存率および移植による受胎率を調査することによって、新たな牛胚の形態評価法の開発ならびに胚移植による受胎率向上を図る。

2 成果の内容

- (1) パーコール濃度15%のリン酸緩衝液（PBS）溶液を用い、比重を測定して品質を評価することで、凍結融解後の生存性が高い胚を選別することができる。

胚の評価方法

- ア パーコール濃度15%のPBS溶液を3ml小シャーレ（FALCON[35]1008）に入れる。
 イ 発育ステージが後期桑実胚から初期胚盤胞のCode 1胚を溶液表面に静置する。
 ウ 3分以内にシャーレ底面まで沈降したものをパーコール分画15%以上と判定する。
 エ 判定後の胚はPBS等の保存液で洗浄後、凍結に供する。

- (2) Code 1胚のパーコール分画割合は、発育ステージの進展に伴い、高い分画から低い分画に選別される割合が多くなる（表1）。
- (3) 収縮桑実胚から初期胚盤胞のCode 1胚の凍結融解後の生存率は、パーコール分画15%以上が78.5%と高い（表2）。
- (4) 収縮桑実胚から初期胚盤胞のCode 1胚の受胎率は、パーコール分画15%以上が88.9%と高い（表3）。

3 成果活用上の留意事項

- (1) パーコール濃度15%のPBS溶液は、パーコール（GEヘルスケア・ジャパン）を生理食塩水で90%(v/v)に希釈した溶液とPBSにヘパリン（0.5単位/ml）と牛血清アルブミン（3mg/ml）を添加し濾過滅菌した溶液を1:5の割合で混合し、十分に転倒混合して作成する。
- (2) 凍結方法は1.8Mエチレングリコールと0.1Mシュウクロスを耐凍剤としたダイレクト法とした。融解方法は液体窒素から取り出したストローを8秒間エアソーイング後、30℃の微温湯に20秒浸漬して行う。

4 成果の活用方法等

- (1) 適用地帯又は対象者等
獣医師および家畜体内受精卵移植業務を行う家畜人工授精師
- (2) 期待する活用効果
牛胚の受胎率向上

5 当該事項に係る試験研究課題

(H26-4) 受胎性を高める新たな牛胚形態評価法の開発 [H26~27/県単]

6 研究担当者

児玉英樹

7 参考資料・文献

- (1) 四ツ島賢二、「パーコールを含む選別液によるウシ受精卵の品質評価」富山県農林水産総合技術センター畜産研究所研究報告第1号、14-18 (2011)
- (2) 福成和博、「直接移植のためのウシ胚の凍結・融解方法」、平成16年度岩手県農業研究センター試験研究成果書 (H16-指-42)

8 試験成績の概要（具体的なデータ）

表1 Code 1 胚の発育ステージとパーコール分画割合

	n	≤11%	12%	13%	14%	15%≤
収縮 桑実胚	15			2 (13.3%)	5 (33.3%)	8 (53.3%)
初期 胚盤胞	8			1 (12.5%)	1 (12.5%)	6 (75%)
胚盤胞	10		3 (30%)	5 (50%)	1 (10%)	1 (10%)
拡張 胚盤胞	4	2 (50%)	2 (50%)			
計	37	2 (5.4%)	5 (13.5%)	8 (21.6%)	7 (18.9%)	15 (40.5%)

表2 Code 1 胚のパーコール分画別生存率

	≤11%	12%	13%	14%	15%≤	合計
収縮桑実胚～ 初期胚盤胞			2/3 (66.7)	4/6 (66.7)	11/14 (78.5)	17/23 (73.9)
胚盤胞～ 拡張胚盤胞	2/2 (100)	5/5 (100)	4/5 (80)	0/1 (0)	1/1 (100)	12/14 (85.7)
計	2/2 (100)	5/5 (100)	6/8 (75)	4/7 (57.1)	12/15 (80)	29/37 (78.4)

上段：生存胚数/供試胚数 下段：生存率 (%)

表3 凍結胚移植成績

発育ステージ パーコール分画	収縮桑実胚～初期胚盤胞			胚盤胞～拡張胚盤胞		
	移植頭数	受胎頭数	受胎率	移植頭数	受胎頭数	受胎率
15%≤	9	8	88.9 a	0	0	0
<15%	11	1	9.1 b	10	4	40.0
合計	20	9	45.0	10	4	40.0

*a, b 異符号間に有意差あり (P<0.05)