

ホルスタイン種未経産牛における性選別精液を用いた採胚技術の検討

中川 浩, 安野僚太郎, 福留信司, 佐藤義政, 大矢俊行
新潟県農業総合研究所畜産研究センター

The study of embryo recovery by using sexed semen in Holstein heifers

Hiroshi NAKAGAWA, Ryotaro YASUNO, Shinji FUKUDOME, Yoshimasa SATO and Toshiyuki OHYA
Niigata Agricultural Research Institute Livestock Research Center

要約 ホルスタイン種未経産牛から効率的に雌胚を作出するため、性選別精液を用いて採胚試験を行った。対照区として採胚用の人工授精時に非選別精液を通常の精液注入器で注入する区を設けた。試験区として性選別精液を通常の注入器で注入する区（試験区1）と、性選別精液を子宮角内深部注入が容易にできるディスプレイ移植器を用いる区（試験区2）の二区を設定した。回収胚数、正常胚数、A, B, Cランク胚数のいずれも有意な差は見られなかった。試験区1で回収された雌胚と推定される正常胚数は、対照区で回収された胚を性判別して得られた雌胚数よりも多い傾向にはあったが、有意な差は見られなかった。未経産牛からの雌胚確保のためには、性選別精液を用いた採胚は、非選別精液から得られた胚をバイオプシーによって性判別するよりも効率的である傾向は見られたが、有意な差は無かった。

我々は未経産牛からの採胚成績が経産牛からの採胚に比べて良好な成績を収めることができると報告した（中川ら 2011）。一方、最近になって性選別された精液が一般に人工授精に使用されるようになってきている。性選別精液を用いることで、約90%の確率で希望の性の産子を産ませることができると、非常に有効な繁殖技術ではあるが、非選別精液と比較してストロー内の精子数は少なく、活力も弱い状態であるため非選別精液と比較して受胎率が低下することが知られている。しかしこれらの問題を克服することができるなら、採胚成績が経産牛よりも良好な未経産牛に性選別精液を用いて採胚をすることにより、非選別精液で回収された受精卵を性判別するよりも、効率的に雌受精卵を確保出来るようになると思われる。そこで、性選別精液を用いて未経産牛から多くの雌受精卵を確保するために採胚試験を実施したので、その結果を報告する。

材料および方法

1. 供試牛及び試験期間

供試牛はホルスタイン種未経産牛14頭を用い、延べ27回の採胚を実施した。処置開始時の月齢は12ヵ月か

ら20ヵ月齢であった。なお、試験に用いたウシは全て新潟県農業総合研究所畜産研究センター動物実験等実施規程に従って取り扱った。

2. 多排卵処理方法

発情確認後、9から12日目に卵胞刺激ホルモン（FSH。アントリンR・10。共立製薬。東京）約20AUを3日間朝夕2回、計6回の漸減投与を行い、FSH投与3日目の朝、合成プロスタグランジンF2 α （PGダルマジン。共立製薬。東京）2mlを1回投与し、発情を誘起した。

3. 人工授精方法

PG投与2日後の夕方に人工授精を実施した。人工授精には非選別精液または性選別精液を用い、注入器には通常の精液注入器（富士平工業。東京）または子宮角内深部注入可能なディスプレイ移植器（動物用受精卵注入カテーテルモ4号。ミサワ医科工業。茨城）で行った。

対照区：通常の精液注入器で子宮体部に非選別精液1本を注入した。

試験区1：通常の精液注入器で採胚用性選別精液を1本または人工授精用性選別精液2本を子宮体部に注入し

た。

試験区2：ディスプレイブル受精卵移植器2本を用いて左右子宮角深部に人工授精用性選別精液を各1本ずつ注入した。

4. 採胚方法

人工授精の7日後に採胚を実施した。採胚には多穴式バルーンカテーテル16Fr(富士平工業、東京)を用いた。灌流液にはハルゼンV注射液(日本全葉工業、東京)1000mlにウシ血清(Calf Serum, GIBCO, 米国)10mlおよび抗生物質(ベンジルペニシリン100IU/mlとストレプトマイシン100mg/ml)を加えたものを使用した。採胚終了後、回収液を実験室内に搬入し、メッシュ付シャーレ(セルコレクター, ニプロ医工, 東京)を用いて灌流液で洗浄を行い、鏡検により胚を回収した。採胚は1頭を除いて各個体とも2回実施した。

5. 非選別精液を使用した胚の性判別方法

形態良好な胚について、マイクロマニピュレーター(LEITZ DM IRB, ライカ, 東京)にセットしたマイクロフェザーブレードK-715(フェザー安全剃刀, 大阪)により栄養膜細胞の約10%を切断し、LAMP(Loop-mediated Isothermal Amplification)法(牛胚性判別試薬キット, 栄研化学, 東京)にて雌雄を判定した(陰山と平山2003)。

結 果

採胚成績を表1に示した。対照区では4頭に延べ8回の採胚を実施した。回収胚数は7.4±5.8個、正常胚数お

よび正常胚率は3.5±2.9個, 47.5%であった。正常胚のうち各ランクの胚数および胚率はAランクで1.8±1.5個, 23.7%, Bランクで0.9±1.0個, 11.9%, Cランクで0.9±1.1個, 11.9%であった。

試験区1では3頭に延べ5回の採胚を実施した。回収胚数は14.8±6.3個、正常胚数および正常胚率は4.8±3.6個, 32.4%であった。正常胚のうち各ランクの胚数及び胚率はAランク胚で1.8±1.9個, 12.2%, Bランク胚で1.4±1.7個, 9.5%, Cランク胚で1.6±1.1個, 10.8%であった。

試験区2では7頭延べ14回の採胚を実施した。回収胚数は7.6±8.4個、正常胚数及び正常胚率は2.8±3.4個, 36.4%であった。そのうち各ランクの胚数及び胚率はAランク胚で0.9±1.6個, 11.2%, Bランク胚で1.1±1.6個, 15.0%, Cランク胚で0.8±1.4個, 10.3%であった。

採胚および雌雄判別によって作出した雌胚の数を表2に示した。対照区で雌判定された正常胚数および正常胚率は0.5±1.1個, 6.8%であった。また、移植に適すると思われるA, Bランク胚も同数であった。性選別精液を使用した場合、回収された胚のうち約90%が雌と推定できることから、試験区では正常胚、A, Bランク胚をそれぞれ0.9倍し、推定される雌胚数として求めたところ、試験区1の正常胚数および正常胚率は4.3±3.2個, 29.2%, A, Bランク胚数および胚率は2.9±2.5個, 19.5%であった。試験区2の正常胚数および正常胚率は2.5±3.1個, 32.8%, A, Bランク胚数および胚率は1.8±2.7, 23.6%となった。対照区、試験区1, 2の雌胚数の結果について分散分析を行ったところ、正常胚数において差のある傾向がみられた(P=0.057)。

表1 精液の種類と注入器別採胚成績

試験区	精液	注入器	回収胚数	正常胚数 (%)	正常胚の内訳		
					Aランク(%)	Bランク(%)	Cランク(%)
対照 n=8	非選別精液	通常	7.4±5.8	3.5±2.9 (47.5)	1.8±1.5 (23.7)	0.9±1.0 (11.9)	0.9±1.1 (11.9)
試験区1 n=5	選別精液	通常	14.8±6.3	4.8±3.6 (32.4)	1.8±1.9 (12.2)	1.4±1.7 (9.5)	1.6±1.1 (10.8)
試験区2 n=14	選別精液	ディスプレイ	7.6±8.4	2.8±3.4 (36.4)	0.9±1.6 (11.2)	1.1±1.6 (15.0)	0.8±1.4 (10.3)

平均±標準偏差

表2 作出された雌胚および推定雌胚の成績

試験区	雌判定または推定雌胚数(%)	
	正常胚数	A,Bランク胚数
対照 n=8	0.5±1.1 (6.8)	0.5±1.1 (6.8)
試験区1 n=5	4.3±3.2 (29.2)	2.9±2.5 (19.5)
試験区2 n=14	2.5±3.1 (32.8)	1.8±2.7 (23.6)
平均±標準偏差		

対照区は雌判定胚数、試験区1、2は推定雌胚数（実数の0.9倍）

考 察

対照区8回の採胚で21個のA, Bランク胚を採取し、性別に供するまで短時間の培養を行った。このとき発育状況不良と判断された胚はこの後のバイオプシーのダメージに耐えられないと判断して性別処理は中止した。そのため、性別に供することのできた胚は9個、最終的に雌と判定された胚は4個となり、性別に供した胚のうち移植可能な雌胚の割合は44.4% (4/9) となった。Peippoら(2009)は非選別精液を用いて採胚、性別を行った場合、性別供試胚中の移植可能な雌胚の作出率は未経産牛で41.1%、経産牛で39.8%と報告しており、同様な結果となった。しかし、回収された21個のA, Bランク胚のうち、半分以上が性別処理にいたらなかったため、回収胚数の割に獲得できた移植可能雌胚数は少なかった。性別のために胚を切断する事は胚に大きなダメージを与える。品質の高い胚でなければ切断のダメージに耐えることができないため、雌雄判定する前に胚の選択を行う。さらに雄と判定した胚は利用されないため、多くの胚を回収したとしても、最終的に移植に供することのできる雌胚の数は思ったほど多くない場合がしばしばあり(中川ら, 2011)、非選別精液を用いた場合の大きなデメリットである。一方、対照区の正常胚率およびAランク胚率が、試験区1, 2を上回る傾向を示したのは、対照区で用いた非選別精液の濃度および活力が、試験区1, 2で用いた性選別精液を上回っているため、供胚牛の体内での受精率が高くなったことによると推察される。

また、回収胚数を見ると、試験区1, 2では対照区よりも多いか、または同程度回収されていたものの、正常胚率は試験区1, 2共に対照区よりも劣る傾向にあった。Sartoriら(2004)は性選別精液を使って未経産牛の採胚を行ったところ、回収した生存胚の割合は非選別精液を使った場合よりも有意に低い(p<0.05)と報告しており、我々と同様な結果を示している。

しかし、試験区1, 2は採胚後の胚のバイオプシー、雌雄判定の操作が必要ないことから最終的に移植に適すると思われるA, Bランク推定雌胚は約2~3個となり、推定雌胚の割合も高く約20%前後となっている。いずれも有意な差は生じていないが、性選別精液を用いた採胚の方が最終的な雌胚数確保といった点では優れている傾向がみられた。Hayakawaら(2008)は性選別精液を用いて採胚した方が、非選別精液で採胚した場合よりも移植可能雌胚作出比率が高くなると報告しており、今回の我々の試験結果はそれを支持する結果となった。

以上のことから、試験区1, 2は共に有意ではないものの、移植可能な雌胚が対照区を上回っており、性選別精液を使った未経産牛の採胚は雌胚を確保する上で有効な方法である傾向が示された。しかし、性選別精液を注入する注入器の違いによる結果は明瞭では無かったことから、今後さらなる検討を行いたい。

引用文献

- Hayakawa H, Hirai T, Takimoto A, Ideta A, Aoyagi Y. Superovulation and embryo transfer in Holstein cattle using sexed sperm. *Theriogenology* Vol.71, Issue1, 68-73.
- 陰山聡一, 平山博樹. 2003. 新しい遺伝子増幅法(LAMP法)による牛胚の性別別. *日本胚移植学雑誌* 23(3), 136-140.
- 中川邦昭, 瀬田剛史, 篠川 温, 中川 浩, 田村祐一. 2011. ホルスタイン種未経産牛における反復採胚技術の検討. *新潟県農総研畜産研究センター研究報告* 17, 54-57.
- Peippo J, Vartiab K, Kananen-Anttila K, Rättyä M, Korhonen K, Hurmed T, Myllymäkie H, Sairanen A, Mäki-Tanilaa A. 2009. Embryo production from superovulated Holstein-Friesian dairy heifers and cows

中川・安野・福留・佐藤・大矢：ホルスタイン種未経産牛における性選別精液を用いた採胎技術の検討

after insemination with frozen-thawed sex-sorted X spermatozoa or unsorted semen. *Animal Reproduction Science* Volume111, Issue1, 80-92.

Sartori R, Souza A.H, Guenther J.N, Caraviello D.Z, Geiger L.N, Schenk J.L, Wiltbank M.C. 2004. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. *Animal Reproduction* vol.1, n.1, 86-90.