

課 題 名	受精卵移植事業の普及定着化に向けた関連試験 畜産研究所HPへ (1) クライオトップで保存された性判別胚の直接移植法の検討 - 超高能力牛群高度利用システム化事業 - - 肉用牛広域後代検定推進事業 (育種牛群整備事業) -		
予 算 区 分	県 単	担 当	改良技術研究室 繁殖システム研究グループ
研 究 期 間	平成21年 ~	協 力 関 係	県下5家畜保健衛生所 4道県と共同試験
研 究 目 的	性判別のためバイオブシーされた卵は耐凍性が低く、保存にはクライオトップを用いた超急速ガラス化が用いられている。クライオトップ法は、高い受胎性が得られる一方、農家での直接移植が困難であり、普及する上での課題となっている。 最近、クライオトップを改良した直接移植可能な器具が市販された。このため、フィールド普及を推進するため、新しい移植器具の有効性を検証するとともにクライオトップによる直接移植法との利便性を比較検討する。		
全 体 計 画	1 クライオトップ保存された胚の庭先融解に適した融解時間、融解液を検討する。 2 クライオトップによる直接移植方法を検討する。 3 新しい移植器具の有効性を検討する。 4 クライオトップによる直接移植法と新しい移植器具との利便性を検討する。		
研 究 対 象	乳用牛、肉用牛	専 門 部 門	受精卵移植、家畜繁殖
<p>○ 本年度試験のねらい</p> <ul style="list-style-type: none"> 新しく開発された直接移植器具の有効性を検討する。 <p>試験1 新しく開発された直接移植器具の有効性の検討 新しい直接移植可能な保存器具を用いて超急速ガラス化保存した性判別卵の融解後の生存性並びに直接移植による受胎性を検討する。</p> <p>○ 前年度までの成果</p> <ol style="list-style-type: none"> クライオトップで保存した性判別卵の庭先融解に適した融解液を選択するため、融解媒液並びに融解液に添加するシュクロース濃度を検討したところ、融解媒液に空気中でのpH変動の少ないPBS溶液を用い、添加するシュクロース濃度を0.2Mに低くしても生存率、受胎性に影響がなく、庭先融解に利用可能であった。 融解時に用いる希釈液中での保存時間を検討したところ、保存時間が5分(79.3% : 23/29)、15分(89.7% : 26/29)、30分(80.0% : 24/30)のいずれであっても生存率に差はなく、直接移植を行う場合30分以内に移植を完了すれば問題ないことが明らかとなった。 直接移植する場合のストロー内希釈時間を短縮するため融解時間を5分、2分、30秒と短縮して生存性を調査したところ、30秒に短縮しても生存率に差はなかった(5分 : 83.3%、2分 : 86.8%、30秒 : 86.5%)。このことから希釈時間を30秒に短縮し直接移植を実施した結果、58.0%(18/31)の良好な受胎率が得られた。 直接移植法のマニュアルを作成し、研修会を実施後、家保による庭先融解・直接移植を実施したところ、受胎率は33.3%(7/21)と低率であったため、ストロー内家保融解切り替えたところを融解後の生存率が42.8%(6/14)と低かったが、生存卵の移植による受胎率は66.7%(4/6)と高かった。 <p>○ 協力関係・分担</p> <p>共同試験参加県：北海道、新潟県、愛媛県、(山形県) リーダー県：北海道 アドバイザー：(独)家畜改良センター</p>			

○ 前年度までの問題点・課題

- ・実証試験においてストロー内融解による卵の生存性が低く、受胎性の低下につながっている。
- ・実証試験を実施したいが、試験卵の確保、移植が困難状況となっている。

○ 本年度試験設計

試験1 新しい直接移植器具の有効性の検討

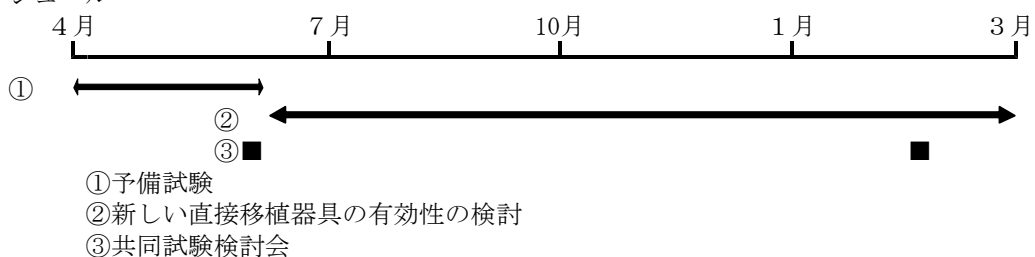
(時期) 平成29年4月～平成30年3月

(試験の内容)

市販の直接移植可能な保存器具 (YGF60) を用いて超急速ガラス化保存した性判別卵の融解後の生存性が低率であったため、手技の問題点を調査するため、YGF60での保存手順中にポイントなる3カ所で融解試験を行い生存性低下の原因をを調査する。

- (1) 試験胚 ホルスタイン種性判別雄卵 100個
- (2) 方法 新しい器具 (YGF60) を用いて超急速ガラス化保存し、融解後の生存性を凍結手順段階ごとに行い、YGF60での生存性低下の原因を調査する。
- (3) 調査項目 ガラス化保存直後、融解ストロー封入後、直接融解直後における生存性を調査

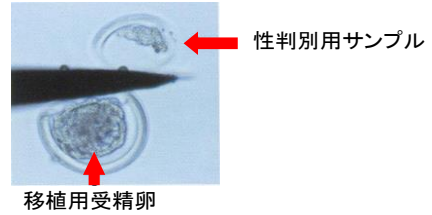
年度スケジュール



クライオトップで保存された性判別胚の直接移植法の検討

背景および目的

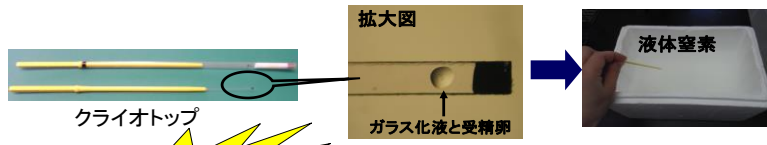
- 性判別のため分割された受精卵は耐凍性がDown ↓
 - 従来の凍結法では、性判別受精卵の凍結は困難!!
- (ストローに受精卵を充填して凍らせる方法)



- 性判別胚の凍結には、超急速ガラス化法が有効!! (下の道具を用いてガラス化液(不凍液)中に受精卵を包埋して保存する方法で移植用のストローを用いない)
- 超急速ガラス化法の利用で性判別受精卵の受胎率向上!!

超急速ガラス化法の特徴

- 冷却スピードが速いため、細胞へのダメージが少ない → 融解後の生存性が高い
- × 移植用ストローを用いない凍結方法であるため、実験室で融解後、受精卵をストローに詰め直す必要がある → 農家の庭先で利用できない



さらなる課題が...

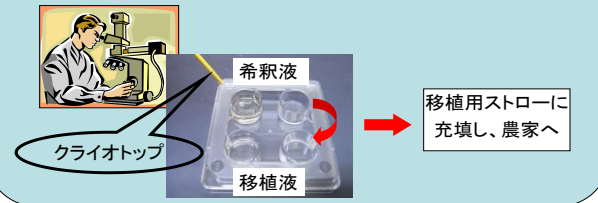
- 農家の庭先で人工授精を行うように直接移植できない
- フィールドから利便性の向上ができないの？ (農家の庭先で人工授精を行うように液体窒素から取り出して融解し、そのまま移植できる方法の開発)

実施内容

- 1) 農家の庭先融解に適した融解液、融解時間の検討
- 2) ストロー内での融解手技の検討
- 3) 農家の庭先融解による受胎性の検討と実証試験

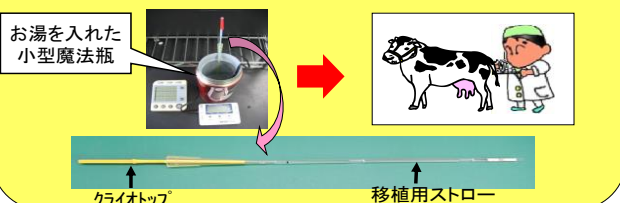
従来の融解方法

実験室内で融解後、移植用ストローに詰め直して農家へ



新しい融解方法

農家の庭先で移植用ストローを用いて融解後、直接移植



成果の活用

- 融解方法の工夫で直接移植が可能
- ⇒ 利便性UP !!
- ⇒ 普及の拡大 !!

