

[成果情報名]アシストハッチング(AHA)処理等による低ランク卵の受胎率向上技術

[要約]受精卵を凍結する前に胞胚腔収縮処理と透明帯切開処理を施すことで、低ランク卵の受胎率を向上させることができる。

[担当]酪農試・乳肉用牛科・神藤 学

[分類]技術・普及

[課題の要請元]

畜産課・部門別農業代表者

[背景・ねらい]

牛から受精卵を採取すると、発育不良や細胞の一部が変性遊離した受精卵（以下、低ランク卵）が3～4割程度採取される。この低ランク卵は凍結保存後の受胎率が低いいため活用が限られてきた。そこで、低ランク卵の有効活用を図るため、透明帯の切開等により受精卵の孵化・着床を補助するアシストハッチング（以下、AHA）処理の関連技術について検討する。

[成果の内容・特徴]

1. 胞胚腔収縮（以下、AS）処理およびAHA処理は、発育ステージが胚盤胞～拡張胚盤胞に進んだ受精卵を、1.8M エチレングリコールおよび0.1M シュークローズを耐凍剤に用いた緩慢凍結法で凍結を行う前に、マイクロマニピュレーター操作により実施する（図1）。
2. AHA処理にAS処理を加えることで、細胞の凍結損傷の原因とされる胞胚腔内の水分を除去できるため、AHA処理した受精卵の耐凍性が向上し、凍結保存後の生存率および孵化率を向上させることができる（表1）。
3. ASおよびAHA処理後の受精卵は、時間経過とともに収縮した胞胚腔が回復し、除去した水分が再貯留してくる（図2）。水分貯留により凍結保存後の生存率や孵化率が低下することから、凍結はASおよびAHA処理後30分以内に実施する（表2）。
4. 野外移植試験の成績では、対照区の受胎率はAランク卵で41.5%(156/376)、Bランク卵で34.2%(27/79)、Cランク卵で21.1%(4/19)となり、受精卵のランクがB・Cに低下すると受胎率も低下する。試験区の受胎率は、Bランク卵で50.0%(13/26)、Cランク卵で36.8%(7/19)となり、ASおよびAHA処理を施すことで対照区のB・Cランク卵と比べて良好な成績が得られる（表2）。

[成果の活用上の留意点]

ASおよびAHA処理等の実施には、マイクロマニピュレーターや体外培養等の器具機材が整った施設が必要である。

[期待される効果]

1. 一般的な緩慢凍結-ダイレクト移植法では受胎率が低いいため、凍結利用が難しかった低ランク卵の活用を図ることができる。
2. 凍結利用可能な受精卵数が増えることで、受精卵産子の増産が期待される。

[具体的データ]

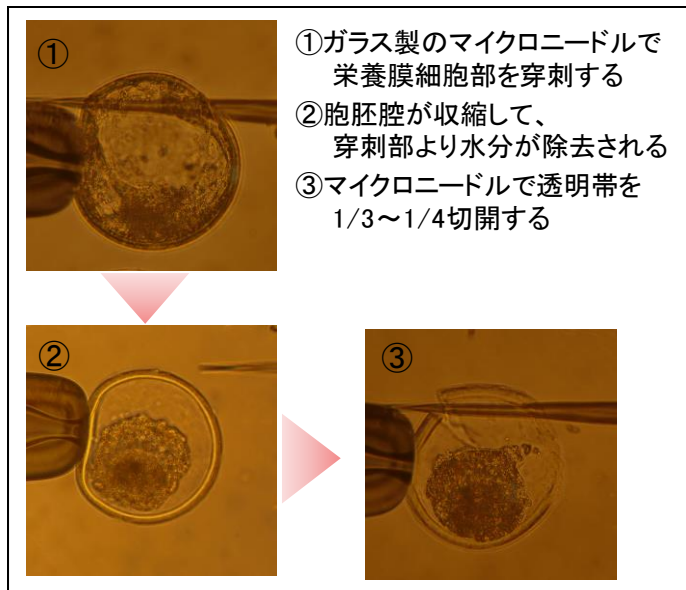


図1. マイクロマニピュレーターを用いたASおよびAHA処理方法

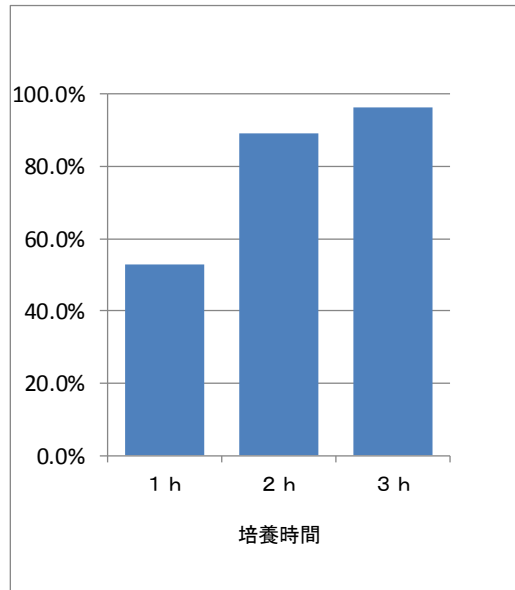


図2. AS+AHA処理後の培養時間と胞胚腔が回復した受精卵の割合

表1. AS処理の有無による凍結体外受精卵の生存性の比較

処理区分	供試卵数	生存卵数	生存率 (%)	孵化胚数	孵化率 (%)
AHAのみ ¹⁾	56	32	57.1 A ²⁾	23	41.1 A
AS+AHA	57	51	89.5 B	45	78.9 B

1) 0.2Mシュウ酸溶液内で圍卵腔を広げたのち透明帯を切開
 2) 異符号間に有意差あり(A-B:P<0.001・カイニ乗検定)

表2. AS+AHA処理後の培養時間による凍結体外受精卵の生存性の比較

培養時間	供試胚数	生存胚数	生存率 (%)	孵化胚数	孵化率 (%)
30分以内	55	54	98.2 A*	48	87.3 A
3時間以上	55	44	80.0 B	36	65.5 B

* 異符号間に有意差あり(A-B:P<0.01・カイニ乗検定)

表3. AS+AHA処理を施した低ランク卵の野外移植試験成績

受精卵のランク ¹⁾	体外培養	AS+AHA	移植実施期間	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
対照区						
Aランク	なし	なし	H20年4月～	376	156	41.5
Bランク	0～25時間	なし	H26年9月	79	27	34.2
Cランク	20～25時間	なし		19	4	21.1
試験区 ²⁾						
Bランク	20～25時間	あり	H25年9月～	26	13	50.0
Cランク	20～25時間	あり	H26年9月	19	7	36.8

1) 受精卵のランク : 変性部割合 0%≤Aランク<10%、10%≤Bランク<30%、30%≤Cランク<50%

2) B・Cランク卵を20～25時間体外培養し、胚盤胞～拡張胚盤胞まで発育が進んだものをAS+AHA処理

[その他]

研究課題名：牛受精卵の生産効率の改善と低品質卵の活用技術の確立

予算区分：県単（重点化）

研究期間：2012～2014 年度

研究担当者：神藤 学、内田雄祐、土橋宏司、鈴木希伊