

牛の体外受精技術確立試験

(2) 体外受精胚のダイレクト移植法における各種凍結保護剤の検討

野中克治 山城 存 渡久地政康*

I 要 約

牛体外受精胚のダイレクト移植法を確立するため、各種凍結保護剤を用いた牛胚の凍結・融解後におけるIn Vitroでの生存性について検討した。

その結果は次の通りであった。

1. エチレングリコール（以下EG）濃度が10%と9%とでは凍結融解後の胚の生存胚率及び脱出胚率には大きな差はなかった。
2. EGとプロピレングリコール（以下PG）の混合液を使用した場合の生存胚率及び脱出胚率はEG単一に比べて高い傾向にあった。
3. EGとグリセリン（以下GL）の混合液を使用した場合の生存胚率及び脱出胚率はEG単一及びEGとPGの混合液に比べて低かった。
4. 9%EGに0.2Mシュクロース（以下SU）を混合することで生存胚率の向上が認められたものの、脱出胚率は低下が認められた。
5. 5%EGと4%PGの混合液にさらに0.2MSUを混合することで生存胚率及び脱出胚率向上が認められた。

これらのことから、体外受精胚のダイレクト移植法に使用する凍結保護剤は、EGとPG及びSUの混合液が最も適していると考えられた。

II 緒 言

近年、屠殺された牛の卵巣から採取した未受精卵子を体外で成熟、受精及び培養することで一度に多数の胚が得られるようになった。これらの胚を利用するためには移植現場での融解方法が簡易であり、さらに、融解後の生存率が高い胚の凍結保存技術の開発が必要である。そこで体外受精胚のダイレクト移植法に適する各種凍結保護剤の検討を行った。

III 材料及び方法

1. 試験期間及び場所

1994年4月から1996年3月まで沖縄県畜産試験場で実施した。

2. 試験方法

1) 材 料

屠殺牛の卵子を成熟、媒精及び発生培養の過程を経て作製した胚盤胞（胚齢7～9日目）を用いた。

2) 培養方法

卵子の成熟、媒精及び発生培養は前報¹⁾と同様の方法で行った。

3) 凍結方法

(1) 凍結媒液：20%子牛血清＋4%牛アルブミン＋修正PBS＋凍結保護剤

(2) 凍結保護剤：EG、PG、GL及びSUを単一または混合して使用した。

(3) ストローへの封入：培養液から取り出した胚はそれぞれの凍結媒液で3回洗浄した後ストローに封入し、0℃に設定したプログラムフリーザーに投入した。ストローに封入するまでの行程は室温で20分以内に行った。

* 現沖縄県北部家畜保健衛生所

(4) 凍結曲線：0℃から植氷温度（-6.0℃、-6.5℃及び-7.0℃）までは-1℃/min、植氷温度から-30℃までは-0.3℃/minの速度で下げ、-30℃で10分間保持した後、液体窒素に投入した。

4) 融解方法

凍結胚の入ったストローを液体窒素から取り出し、空气中で5秒間保持した後、35℃の温湯に20秒間浸漬して行った。

5) 凍結保護剤の除去と培養方法

ストローから取り出した受精胚はただちに2%子牛血清加TCM199培地で3回洗浄して凍結保護剤を除去した後、同培地の卵丘細胞単層上で培養した。

6) 受精胚の凍結融解後の生存胚と脱出胚の判定

培養24時間以内に明瞭な胞胚腔形成が確認できた場合を生存胚とした。また、48時間以内に透明帯から胚実質が半分以上脱出した場合を脱出胚とした。

IV 結果及び考察

1. 各種凍結保護剤を使用した場合の凍結・融解後の生存状況は表-1に示した。

EG単一を凍結保護剤とした場合の凍結融解後の生存胚率は10%EG（70.0%）及び9%EG・-6.5℃植氷（66.7%）であった。また、脱出胚率は10%EG（50.0%）及び9%EG・-6.5℃植氷（53.3%）といずれの濃度でも大きな差はなかった。

下平²⁾は体外受精胚のダイレクト移植法にEGを使用した場合、1.5M（9.3%）と1.8M（11.1%）とでは耐凍性に差はないと報告しており、今回の試験においてもほぼ同様の結果が得られた。

また、9%EGでは植氷温度を-6.0℃に上げることで脱出胚率の低下が認められた。これは、植氷開始から終了までの時間が-6.5℃（約10分）の場合に比べて延長（約20分）したことによる過脱水の影響があったものと考えられた。

2. EGとPGの混合液を使用した場合の生存胚率（70~90%）及び脱出胚率（50~60%）は、EG単一に比べて高い傾向にあり、特に6%EG+3%PG及び5%EG+4%PGでの生存胚率（90%）が高かった。

3. EGとGLの混合液を使用した場合の生存胚率（30%または50%）、脱出胚率（10~30%）はEG単一及びEGとPGの混合液に比べ、著明な低下が認められた。

4. 9%EGに0.2MSUを混合した場合の生存胚率（83.3%）は混合しない場合に比べて高かったが、脱出胚率（44.4%）は低下が認められた。

5. 5%EGと4%PGの混合液に、さらに0.2MSUを混合した場合の生存胚率（94.4%）及び脱出胚率（66.7%）は混合しない場合に比べて高かった。これは未凍結胚の脱出胚率（70.0%）に近い成績であった。

野上ら³⁾はEGにSUの混合液を使用した場合の高い生存性について報告している。さらに、EGとPGの混合液において加治佐ら⁴⁾はSUを混合したほうが融解後の生存性が高いと報告している。これらSUを混合した場合の凍結・融解後の胚の生存性について、福島⁵⁾はSUが耐凍剤除去時の膜保護に関与しているとしている。今回の試験で、生存胚率ではEG及びEGとPGの混合液にSUを混合することで生存胚率の向上が図られたことで、野上ら³⁾及び加治佐ら⁴⁾の報告と同様な好結果が得られた。しかし、EGにSUを混合した場合の脱出胚率の低下は、見かけ上、胚胞腔を形成していても胚細胞が損傷を受けているのではないかと考えられた。

これらのことから、体外受精胚のダイレクト移植法に使用する凍結保護剤は、EG単一よりPGを加えたほうが凍結融解後の生存性が高く、さらにSUを加えることで一層生存性が向上するものと思われた。

表-1 体外受精胚に各種凍結保護剤を使用した場合の凍結・融解後の生存状況

凍結保護剤	植氷温度 (°C)	供試胚数	生存胚数 (%)	脱出胚数 (%)
10%EG	-7.0	10	7 (70.0)	5 (50.0)
9%EG	-6.5	15	10 (66.7)	8 (53.3)
9%EG	-6.0	12	8 (66.7)	5 (41.7)
8%EG+1%PG	-6.5	10	8 (80.0)	6 (60.0)
7%EG+2%PG	-6.5	10	7 (70.0)	5 (50.0)
6%EG+3%PG	-6.5	10	9 (90.0)	6 (60.0)
5%EG+4%PG	-6.5	10	9 (90.0)	6 (60.0)
8%EG+1%GL	-6.5	10	3 (30.0)	2 (20.0)
7%EG+2%GL	-6.5	10	5 (50.0)	3 (30.0)
6%EG+3%GL	-6.5	10	3 (30.0)	1 (10.0)
5%EG+4%GL	-6.5	10	5 (50.0)	2 (20.0)
9%EG+0.2MSU	-6.5	18	15 (83.3)	8 (44.4)
5%EG+4%PG+0.2MSU	-6.5	18	17 (94.4)	12 (66.7)
凍結保護剤なし・未凍結		10		7 (70.0)

V 引用文献

- 1) 野中克治 外2名、1994、牛体外受精確立試験(1)体外培養方法の検討、沖縄畜試研報、32、1～5
- 2) 下平乙夫、1992、牛体外受精由来胚を使った直接移植法の検討、第86回日本畜産学会大会講演要旨、29
- 3) 野上興志郎 外2名、1992、Ethyene glycolとSucroseで凍結した牛体外受精胚の生存性、第3回西日本胚移植研究会、60
- 4) 加治佐修 外5名、1994、体外受精技術を活用した良質胚多量確保技術の開発、鹿児島県畜産試験場研究報告、27、4
- 5) 福島護之、1994、耐凍剤にエチレングリコールとショ糖を用いた場合の体外受精由来胚盤胞の体積変化と生存性との関係、日本胚移植研究会、32

研究補助：山田義智