

牛の受精卵移植

(5) 牛凍結胚のダイレクト法による移植

野中克治 宮里賢治 渡久地政康

I 要 約

牛受精卵移植技術の簡易化を図るため、耐凍剤として1.8molエチレングリコールを用いた牛凍結胚のダイレクト法による移植試験を行った。その結果、21頭の受胎が確認され、受胎率は57%であった。同方法はこれまで現場で行ってきたステップワイズ法（受胎率50%）¹⁾、ワンステップ法（受胎率50%）²⁾、に比べて技術的に簡易であり、移植に要する時間も短縮できた。また、凍結胚の融解後における培養試験においても、6個中5個が発育してこと等から生存性も高く、同方法は牛受精卵移植を普及するうえでも有効な技術と思われた。

II 緒 言

既報²⁾では胚移植における耐凍剤除去の簡易化を行うため、現場で耐凍剤の除去のできるワンステップ法の移植試験を行い50%の受胎率を得た。しかし、同方法は凍結胚の融解後から移植の終了までを短時間で行わなければならない、また、融解の操作で2液層を混合するさいに熟練を要するため、技術者により受胎率に大きな差があり（受胎率33.3%~52.0%）³⁾、更に簡易な移植方法に取り組む必要があった。近年、Massip⁴⁾らは0.25molシュークロス加PBSに1.4molグリセリンを混合した凍結胚を融解後ストロー内の液層を操作することなく直接受胎牛に移植することで、51.8%の受胎率を報告している。更に、国内では1990年に鈴木⁵⁾らが耐凍剤として1.6molプロピレングリコールのみを用いて（受胎率65%）、また、堂地⁶⁾らが1.8molエチレングリコールのみを用いて（受胎率69%）人工授精の方法と同様に融解後、直接受胎牛に移植をすることで高い受胎率を報告している。これらダイレクト法は操作が簡単なうえに移植時間も短縮でき、また、ストローの作成に技術差が殆どないと思われるため、沖縄県においても受精卵移植の実用化を図るためにその技術を確立しておく必要がある。そこで今回は、牛回収胚のダイレクト法による移植方法の中でも最も高い受胎率が報告されている1.8molエチレングリコールを使用したダイレクト法による移植試験を実施したのでその結果を報告する。

III 材料及び方法

1. 試験期間

1991年9月~1992年3月

2. 供試胚

過排卵誘起処置した黒毛和種6頭から受精後7日目に得られた初期胚盤胞と胚盤胞のAランク胚を用い、移植試験には21個、生存試験には6個を使用した。

3. 受胎牛

受胎牛は農家飼養の発情後7日目のホルスタイン種及び黒毛和種を用いた。

4. 凍結方法

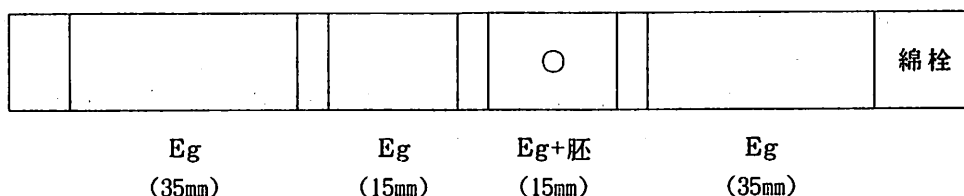
1) 凍結保存液

20%子牛血清を含む修正PBIに牛アルブミンを0.4%に調整したものを凍結基礎媒液とし、保存液は凍結基礎媒液に1.8molエチレングリコール(アミノ酸分析用)を添加した。

2) ストローへの封入

0.25mlのストローを使用し、各区とも綿栓部より35、15、15、35mmの割合で封入し、綿栓部より2層目に胚をいれた。

図-1 ストローの封入方法



注) Eg:20%子牛血清+0.4%牛アルブミン+1.8molエチレングリコール+調整PBI

3) 耐凍剤の平衡

回収した胚を凍結基礎媒液で3回洗浄し、保存液で更に3回移し換えた後、すぐにストローに吸引して、液層タイプのプログラミングフリーザーに投入した。耐凍剤の平衡時間は保存液に移し換えてから植水開始までの20分以内とした。

4) 凍結曲線

-7°Cに設定したプログラミングフリーザーに投入して2分後に植水を行い、植水終了後-0.3°C/minで-30°Cまで冷却し、10分間保持後、液体窒素に投入した。

5. 移植方法

液体窒素からとりだした凍結胚を空気中で5秒間保持後、37°Cの温水に20秒間浸漬、融解後ただちに受胚牛に移植した。

6. 調査項目

1) 受胎率

受胎牛の種類、移植農家、供胚牛、移植所要時間別に受胎率を調べた。

2) 平衡時の胚の形態

凍結基礎媒液から保存液に胚を投入した後ただちに胚の形態を調べた。

3) 融解後の胚の生存

移植方法と同様に融解した後、ストロー内容液全部をシャーレに取り出し、凍結前と比較して胚の形態に異常のない場合を生存と判定した。

4) 耐凍剤(1.8molエチレングリコール)の胚に及ぼす毒性

融解した胚をそれぞれ30、60、90、120、150分間室温で保存液に浸漬した状態で放置した後、5%子牛血清加TCM199倍地で洗浄して、同倍地の0.1mlのドロップの中に入れ、CO₂5%、空気95%、温度38.5°Cのインキュベーター内で融解胚を培養し、15時間後の発育を調べた。

IV 結 果

1. 受胎成績

1) 供胚牛の種類と受胎率

ホルスタイン種5頭、黒毛和種16頭の21頭に移植したところ、ホルスタイン種3頭、黒毛和種9頭の合計12頭に受胎が確認され、受胎率は57%であった。

表-1 種類別受胎率

	移 植 頭 数	受 胎 頭 数	受 胎 率 (%)
ホルスタイン種	5	3	60
黒毛和種	16	9	56
合 計	21	12	57

2) 農家及び供胚牛別受胎成績

5戸の農家に移植を行いその農家別受胎成績はA農家(5/5)、B(1/1)、C(5/10)、D(1/3)、E(0/2)であった。

今回使用した移植胚は6頭の供胚牛から採取したが、供胚牛別受胎成績はNo1牛(3/5)、No2(4/4)、No3(2/4)、No4(1/4)、No5(1/3)、No6(1/1)であり、いずれの供胚牛から採取した凍結胚からも受胎が確認された。

表-2 農家及び供胚牛別受胎成績

		供 胚 牛 番 号						合 計
		1	2	3	4	5	6	
移 植 農 家	A		4/4			1/1		5/5
	B			1/1				1/1
	C	3/3			1/4	0/2	1/1	5/10
	D			1/3				1/3
	E	0/2						0/2
合 計		3/5	4/4	2/4	1/4	1/3	1/1	12/21 (57)

注) 受胎頭数 / 移植頭数

3) 移植所要時間と受胎成績

10分以内に移植が終了した19頭のうち10頭が受胎し、また、12分、40分経過後に移植が終了した2頭はいずれも受胎を確認した。

表-3 移植所要時間と受胎成績

時間	0~5	6~10	11~20	40(min)
受胎頭数 / 移植頭数	8 / 15	2 / 4	1 / 1	1 / 1

2. 平衡時の胚の形態

移植及び生存試験に使用した27個すべてにおいて、1.8molエチレングリコールの保存液に投入した時点での胚の収縮及び膨化はほとんど観察できなかった。

3. 融解後の胚の生存

凍結前にAランクであった6個の胚のうち、融解後に凍結前より形態的にランクが落ちたのは1個(Cランク)で、5個は凍結前とほとんど変わらず生存しているものと判定した。

表-4 凍結胚の融解後の形態

胚番号	1	2	3	4	5	6
凍結前のランク	A	A	A	A	A'	A'
融解後のランク	A	A	A	A	A'	C

注1) 1~2、3~4は同一ロットでいずれも初期胚盤胞

注2) A:形態学的細胞異常0% A':5-10% C:30-50%

4. 耐凍剤の胚に及ぼす毒性

融解後に形態的に異常のなかった5個の胚を30-150分間保存液に室温放置した後、培養した結果、いずれも15時間後に拡張胚盤胞に発育し、これら浸漬時間の範囲内では耐凍剤の毒性は確認されなかった。

表-5 耐凍剤浸漬時間が胚の発育に及ぼす影響

胚番号	1	2	3	4	5	6
耐凍剤浸漬時間(min)	30	60	90	120	150	-
培養後の発育ステージ	EX	EX	EX	EX	EX	-

注) EXは拡張胚盤胞

V 考察

今まで行ってきたワンステップ法移植に比べ、今回行ったエチレングリコールを用いたダイレクト法による移植は、耐凍剤の平衡時間、凍結時間、更には移植に要する時間で合計70分間短縮され、その手技法は比較的簡易であり、また受胎率も57%と堂地⁹⁾らが報告した受胎率には及ばないものの、今後期待できる技術と思われた。

6頭のいずれの供胚牛から採取した供試胚からも受胎が確認されたことは、同方法の手技が簡易で安定性があることによるためと考えられた。

またエチレングリコールはグリセリンに比べて細胞への浸透性が高いとされているが、今回0から1.8molのエチレングリコールの入った保存液に胚を移動したとき、更には、融解後TCM199倍地へ移動したときにも全く細胞の収縮、膨化はみられなかったことから、エチレングリコールはグリセリンに比べて細胞に与える浸透圧ショックは少ないように思えた。小田⁷⁾らは、凍結融解後の生存率はエチレングリコールがグリセリンに比べ高いと報告しており、今回行った試験においても6個中5個が凍結前と胚の形態が変らなかったことから、小田らの成績と同様に、エチレングリコールの細胞にあたる毒性は少ないものと思われ、従来行ってきたシュークロースを利用したワンステップ法による移植のように短時間(10分)で移植を終了する必要はないものと考えられた。しかし、今後は移植例数を更に増やし、各発育ステージと耐凍剤の濃度、冷却速度、凍結温度等についても検討する必要があると思われる。

IV 引用文献

- 1) 渡久地政康外3名、1989、牛受精卵移植、沖畜試研報、27、1~9
- 2) 野中克治、渡久地政康、1990、牛受精卵移植、沖畜試報、28、1~4
- 3) 笠井浩司、1990、牛受精卵凍結技術に関する共同試験の集計結果について、ETニューズレター、8、65~72
- 4) Massip, A 1987、Therigenology、27、69~79
- 5) Suzuki, T外4名、1990、Comparison of one step sucrose dilution and direct transfer of frozen bovine embryos in glycerol and 1,2-propanediol、Therogenology、33、334
- 6) 堂地修外2名、1991、Ethylene glycolを用いて凍結したウシ胚のDirect transfer法による移植、第84回日本畜産学会大会講演要旨
- 7) 小田頼政、野上興志郎、1991、牛凍結胚の耐凍剤別受胎性、西日本胚移植研究会講演趣旨、18

研究補助：小濱健徳