

## 受胎率向上のための受精卵の凍結・融解方法の検討(第3報)

誌名	鹿児島県肉用牛改良研究所研究報告
ISSN	13419064
著者名	林,史弘 窪田,力 山口,浩 瀬戸口,浩二 溝下,和則
発行元	鹿児島県肉用牛改良研究所
巻/号	10号
掲載ページ	p. 13-16
発行年月	2005年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



受胎率向上のための受精卵の凍結・融解方法の検討 (第3報)  
(受精卵移植普及定着化事業共同試験)

林史弘・窪田力・山口浩・瀬戸口浩二・溝下和則

要約

14 府県による共同試験として野外での凍結胚移植の受胎率向上のため、凍結溶液に加えるタンパク成分を比較するゲル法による移植試験を実施した。耐凍剤を 1.8M エチレングリコール+0.1M シュクロースに統一し、タンパク成分を牛血清アルブミンと子牛血清の 2 区に分け移植試験を実施した結果、両区の受胎率に差は見られなかった。

緒言

胚移植技術が野外で普及定着するためには、簡便で受胎性の高い胚の凍結保存技術が不可欠である。我が国の凍結胚の受胎率は40%程度で頭打ちとなり、受胎率の地域格差も大きい<sup>1)</sup>ため、受胎率の向上と凍結・融解法の汎用化が急務となっている。また、現在では各都道府県や民間において、EGに種々の糖を添加するなどの改良が試みられている。しかし、それらの凍結・融解手法について広域に比較試験が実施されていないため、いずれの手法が優れているか不明で、胚移植の受胎率の地域格差の一因となっているとも考えられる。

そこで、各都府県で行われている主なゲル法について受精卵移植普及定着化事業共同試験の中で耐凍剤、移植条件等について H14 年度から比較試験を実施している。今回は、移植試験<sup>3,4)</sup>の結果により選定した凍結溶液中のタンパク成分を変えて凍結保存した胚を受胎牛に移植し、胚、凍結処理、受胎牛および移植状況等の要因と受胎率の関係を調査したので報告する。

この共同試験は、岩手、栃木、埼玉、山梨、新潟、愛知、愛媛、京都、鳥取、島根、福岡、佐賀、長崎、鹿児島および家畜改良センターにより実施している。

材料と方法

1 供試胚

黒毛和種またはホルスタイン種の供胚牛を定法により過剰排卵処理し、人工授精後 7 日目に回収した A～B ランク胚 (各区約 250 個) を用いた。

2 耐凍剤および基礎溶液

1.8M エチレングリコール (EG) を耐凍剤として 2 区を設け、基礎溶液には、1 区は 0.4%牛血清アルブミン (BSA) 加 PBS を、2 区は 20%子牛血清 (CS) 加 PBS を使用した (表 1)。

表 1 試験区

1 区 : 1.8MEG+0.1M シュクロース+0.4%BSA 加 PBS
2 区 : 1.8MEG+0.1M シュクロース+20%CS 加 PBS

EG : エチレングリコール, CS : 子牛血清, BSA : 牛血清アルブミン

3 凍結処理

供胚牛から回収した胚は、20%CS 加 PBS で 3 回

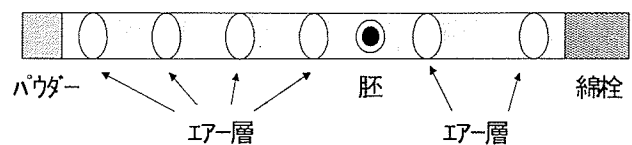


図1 ストローのカラム構成

洗浄後、凍結溶液に移した。凍結用ストローは凍結溶液で3回洗浄した後に胚を図1のように吸引した。胚を凍結溶液に移してから冷却を開始するまでの平衡時間は15～20分とした。凍結にはプログラムフリーザを用い、-7℃の冷却槽にストローをセットし、2分後に植氷を行い、10分間保持し、その後毎分-0.3℃で-30℃まで冷却し、-30℃で直ちに液体窒素に投入して凍結を完了した(図2)。

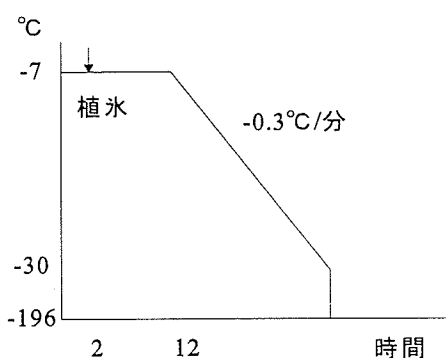


図2 冷却曲線

#### 4 融解と移植

移植試験は、共同試験参加の14府県で実施した。液体窒素からストローを取り出し空気中で正確に6秒間保持し、30℃の微温湯に20秒間浸漬し、氷晶が完全に融解したのを確認した後、受胎牛1頭に1個の胚を移植した。移植者は、各府県の2～3人に限定し、移植は各府県とも各区それぞれ約20頭行った。

#### 5 調査項目

それぞれの要因毎に表2に示す項目を調査した。

表2. 調査項目

要因	調査項目
胚	供胚牛の品種・年齢、胚の発育ステージ・ランク
凍結処理	胚回収から耐凍剤平衡までの時間、耐凍剤の種類 耐凍剤平衡時間、氷晶形成までの時間
受胎牛	品種、年齢、産歴、同期化の有無・方法、発情周期、黄体の状況
移植時	麻酔使用の有無、移植時間、移植部位、出血の有無、外気温

#### 6 統計学的評価

各調査項目について、JSTATを使用し、 $\chi^2$ 検定により有意差の評価を行った。

#### 結果

##### 1 移植成績(試験区別)

表3に示すように、試験区ごとの受胎率に有意な差は見られなかった。

表3. 各試験区の移植成績

試験区	移植頭数	受胎頭数	受胎率
1区	261	134	51.3
2区	240	129	53.8
合計	501	263	52.5

##### 2 移植成績(要因別)

###### (1) 採胚成績の要因

正常胚数が多くなるにつれ、受胎率が高くなる傾向が見られ、正常胚率が50%以上では50%未満と比べて有意に受胎率が高かった。(表4, 5)

表4. 正常胚数と移植成績

正常胚数	移植頭数	受胎頭数	受胎率
1-9	272	136	50.0
10-19	107	57	53.3
20以上	122	70	57.4

表5. 正常胚率と移植成績

正常胚率(%)	移植頭数	受胎頭数	受胎率
≤50	83	33	39.8
50<	418	230	55.0

###### (2) 胚の要因

胚の発育ステージ別では、胚盤胞(BL)の受胎率が高い傾向が見られた。胚のランクでは、A, A'が高い受胎率であった。(表6-9)

###### (3) 凍結処理の要因

胚回収から耐凍剤平衡までの時間では、1時間以内の受胎率が高い傾向が見られたが、2時間でも受胎率の極端な低下は見られなかった。耐凍剤の平衡時間では例数が少ないが10分以内で受胎率が低い傾向が見られた。(表10-12)

表6. 供胚牛の品種と移植成績

品種	移植頭数	受胎頭数	受胎率
黒毛和種	480	247	51.5
ホルスタイン種	21	16	76.2

表7. 供胚牛の年齢と移植成績

年齢	移植頭数	受胎頭数	受胎率
2-3	117	67	57.3
4-6	126	64	50.8
7-9	104	51	49.0
10≦	36	19	52.8

表8. 胚の発育ステージの移植成績

ステージ	移植頭数	受胎頭数	受胎率
M	0		
CM	261	138	52.9
EB	171	81	47.4
BL	60	39	65.0
ExBL	9	5	55.6

表9. 胚のランクと移植成績

ランク	移植頭数	受胎頭数	受胎率
A	215	116	54.0
A'	179	96	53.6
B	99	47	47.5
C	8	4	50.0

表10. 胚回収から平衡開始までの時間と移植成績

時間(h)	移植頭数	受胎頭数	受胎率
<1	53	30	56.6
1≦, <2	296	150	50.7
2≦	152	83	54.6

表11. 耐凍剤平衡時間と移植成績

時間(min)	移植頭数	受胎頭数	受胎率
<10	7	2	28.6
10-15	430	225	52.3
15-20	49	26	53.1
20≦	15	10	66.7

表12. 氷晶形成までの時間と移植成績

時間	移植頭数	受胎頭数	受胎率
10分前後	469	249	53.1
13-15分	10	7	70.0

#### (4) 受胚牛の要因

黄体ランク(表13)別では、例数が少ないが、ランク4の受胎率が低い傾向であった(表19)。年齢では2歳と4歳、産歴では1産と2産で受胎率が低い傾向であった。(表13-21)

表13. 黄体ランク

ランク1	: 長径20mm以上。丸く、黄体実質が充実
ランク2	: 長径15mm前後。実質の充実は中程度
ランク3	: 軽度の水腫が認められる。大きさ実質充実は中程度以上
ランク4	: 実質が脆弱な囊腫様黄体
ランク5	: 長径10mm前後。実質やや硬い

表14. 受胚牛の品種と移植成績

品種	移植頭数	受胎頭数	受胎率
黒毛和種	119	59	49.6
ホルスタイン種	358	191	53.4
F1	18	11	61.1
その他	6	2	33.3

表15. 受胚牛の年齢と移植成績

年齢	移植頭数	受胎頭数	受胎率
1歳以下	241	134	55.6
2	62	25	40.3
3	40	21	52.5
4	28	12	42.9
5	16	8	50.0
6歳以上	50	29	58.0

表16. 受胚牛の産歴と移植成績

産歴	移植頭数	受胎頭数	受胎率
未経産	261	138	52.9
1産	53	24	45.3
2産	37	16	43.2
3産	28	15	53.6
4産以上	39	25	64.1

表17. 受胚牛のスタンディング確認と移植成績

確認	移植頭数	受胎頭数	受胎率
有	279	149	53.4
無	194	100	51.5

表18. 受胚牛の排卵確認と移植成績

産歴	確認	移植頭数	受胎頭数	受胎率
未経産	有	94	42	44.7
	無	164	95	57.9
経産	有	55	27	49.1
	無	79	41	51.9

表19. 受胚牛の黄体ランクと移植成績

黄体ランク	移植頭数	受胎頭数	受胎率
ランク1	230	121	52.6
ランク2	178	92	51.7
ランク3	46	26	56.5
ランク4	8	2	25.0
ランク5	9	5	55.6

表20. 受胚牛の発情同期化の有無と移植成績

同期化	移植頭数	受胎頭数	受胎率
有	100	46	46.0
無	371	200	53.9

表21. 受胚牛の発情同期化の方法と移植成績

同期化の方法	移植頭数	受胎頭数	受胎率
PG	26	8	30.8
CIDR	47	27	57.4
その他	27	12	44.4

#### (5) 移植時の要因

移植部位では、11~19cmで低い傾向であった。移植時の出血の有無では、移植時に出血があると有意に低下した。移植所要時間では、例数は少ないが11分以上で受胎率が低い傾向であった。(表22-26)

表22. 移植時の麻酔の有無と移植成績

麻酔	移植頭数	受胎頭数	受胎率
有	210	117	55.7
無	265	133	50.2

表23. 移植部位と移植成績

部位	移植頭数	受胎頭数	受胎率
≤5	223	117	52.5
6-10	143	80	55.9
11-19	20	5	25.0
20≤	60	31	51.7
≤10	366	197	53.8
11≤	80	36	45.0

表24. 移植時の出血の有無と移植成績

出血	移植頭数	受胎頭数	受胎率
無	430	231	53.7
有	42	18	42.9

表25. 移植時の外気温と移植成績

気温(°C)	移植頭数	受胎頭数	受胎率
-3~10	208	114	54.8
11~19	169	83	49.1
20~27	50	25	50.0

表26. ET所要時間と移植成績

時間(分)	移植頭数	受胎頭数	受胎率
1~5	391	208	53.2
6~10	69	34	49.3
11以上	11	4	36.4

考察

14 府県の共同試験として胚の培養試験<sup>2)</sup>、3 種類の凍結液の移植試験<sup>3, 4)</sup>の結果を受けて、今回タンパク成分 (BSA と CS) 比較のための移植試験を広域的に実施し受胎率について検討した。

本試験は、501 頭に移植を実施し、受胎率は全体で 52.5% であった。移植試験 1 (44.7%)<sup>3)</sup> と比較して 7.8 ポイントの受胎率の向上が図られた。これは、本試験ではすべての区に Suc を添加したこと、供試胚の A, A' の割合が高かったことが考えられた。

基礎溶液に含まれるタンパク成分の種類 (BSA と CS) による受胎率への影響は見られず、胚の培養試験<sup>2)</sup> および移植試験<sup>3, 4)</sup> と同様の結果が得られた。このことにより、CS をより安定した製品である BSA に代替できると考えられた。また、移植試験<sup>3, 4)</sup> では、BSA のみを基礎溶液に添加した場合、B ランク胚および胚回収から平衡開始までの時間が 1 時間以上で、受胎率が有意に低下した。本試験では、B ランク胚でやや受胎率が低下したものの平

衡開始までの時間による受胎率の低下は見られず糖添加の有用性が本試験においても示された。

今後、本試験の結果を受けて、1 種類の凍結溶液 (1.8M EG+0.1M Suc +0.4% BSA 加 PBS) を使用して移植試験を実施し、融解方法の検討を行う予定である。

この研究については、共同試験の岩手県 (副幹事県) が第 20 回東日本受精卵移植技術研究大会で発表している<sup>5)</sup>。

参考文献

- 1) 農水省報告：移植成績速報値およびチャレンジ 50
- 2) 林ら 鹿児島県肉用牛改良研究所研究報告第 8 号(2003)；受胎率向上のための受精卵の凍結・融解方法の検討 (第 1 報)
- 3) 林ら 鹿児島県肉用牛改良研究所研究報告第 9 号(2004)；受胎率向上のための受精卵の凍結・融解方法の検討 (第 2 報)
- 4) 吉羽ら 第 103 回日本畜産学会講演要旨；凍結媒液に添加するショ糖及びタンパク成分がウシ凍結・融解胚直接移植の受胎率に及ぼす影響
- 5) 福成ら 第 20 回東日本受精卵移植技術研究大会講演要旨；エチングリコールとショクロスをを用いて凍結した牛胚の受胎率に影響する要因