

牛受精卵凍結技術の簡易安定化

誌名	埼玉県畜産試験場研究報告 = Bulletin of the Saitama Prefectural Livestock Experiment Station
ISSN	02899442
著者	吉羽, 宣明 山田, 均
巻/号	30号
掲載ページ	p. 38-41
発行年月	1993年1月

牛受精卵凍結技術の簡易安定化

—エチレングリコールおよびプロピレングリコール
を用いて凍結保存した牛受精卵の直接移植—

吉羽 宣明 山 田 均

Simplifier and Stabilization of Freezing Technique of Bovine Embryos

—Direct Transfer of Bovine Embryos Frozen
in Ethylene Glycol and Propylene Glycol —

Nobuaki YOSHIBA and Hitoshi YAMADA

牛受精卵移植の普及を推進するためには、受精卵の凍結保存が不可欠である。受精卵の凍結には耐凍剤を細胞に浸透させることが必要であるが、移植前にこれを除去しなければならないと考えられていた。

耐凍剤除去方法にはStep wise 法^{1, 11)} (段階除去法) およびOne step法^{3, 5, 6)} (1段階除去法) などがある。Step wise 法は、受精卵凍結の研究開始当初から行われていた方法であるが、融解後凍結容器から受精卵を回収し、段階的に耐凍剤濃度の低い溶液に移しかえる必要がある。このため融解する場所が制限され、農家の受卵牛には利用しにくい。一方、One step法は、凍結用のストロー内で耐凍剤の除去ができるため、農家の受卵牛に対する利用性が高い。しかし、ストロー内耐凍剤除去の方法が煩雑であったり、受精卵の位置を確認するのに時間がかかる場合があるため、そこに人為的ミスが入りやすいことが指摘されている。

近年、グリセロール+シュエクロース⁷⁾、プロピレングリコール⁸⁾ およびエチレングリコール^{2, 10)} を耐凍剤として受精卵を凍結した場合、融解後に耐凍剤の除去をせず直ちに受卵牛に移植 (直接移植: Direct法) しても、受胎例が得られることが報告されている。この方法は、農家の受卵牛に対する利用性が高く、融解後の人為的ミスも軽減できるものと期待されている。しかし、これらの耐凍剤のうちどれが直接移植に適しているか検討した報告は見当たらない。そこで、エチレ

ングリコール、プロピレングリコールおよび One step法で凍結した受精卵を農家の受卵牛に移植し、受胎性を比較検討した。

材料および方法

1. 供試受精卵

当場で飼養している黒毛和種に、FSH (アントリン、デンカ製薬) 24~28AUまたはPMSG (ピーメックス、三共) 4,000IUとPGF_{2α} (プロナルゴンF、武田薬品) 15mg×2で過排卵処置をした。発情発現後、適期と思われる時期に、凍結精液を用いて人工授精した。

受精卵の採取は、発情発現日を0日目として7~8日目に2wayバルーンカテーテル(富士平工業)を用いて実施した。灌流液には、牛血清アルブミン (SIGMA) 3g/ℓを添加した Dulbecco's PBS (日水製薬) を用いた。採取した受精卵のうち、形態がAおよびA' ランクで、発育ステージが後期桑実期~拡張胚盤胞期のを20%子牛血清加PBS (GIBCO, 以下mPBSと略す) で3回洗浄後に供試した。

2. 受精卵の凍結

1) 耐凍剤の種類と濃度

試験区では耐凍剤としてエチレングリコール (和光純薬、以下EG) およびプロピレングリコール (和光純薬、以下PG)、対照区ではグリセロール (和光純薬、以下GLY) を使用した。こ

これらの耐凍剤をmPBSに 1.8M (EG)、1.6M (PG) および 1.4M (GLY) の濃度となるように調製し、凍結媒液とした。

2) 耐凍剤の平衡

試験区では、mPBSで洗浄した受精卵を直接それぞれの凍結媒液に移した。2～3分経過後、プラスチックストロー (Z A 1 7 6、1MV) 内に受精卵を封入し始めた。平衡時間 (凍結媒液に入れてから凍結開始までの時間) は、10～13分であった。

対照区では、受精卵を 0.5MGLY および 0.9MGLY に順次5分間隔で移しかえたのち凍結媒液に入れた。そして、5～6分後に封入を始めた。平衡時間は、10～20分であった。

なお、平衡は室温 (23～25℃) で行った。

3) 受精卵のストロー内封入方法

受精卵のストローへの封入方法は図1に示したとおりである。

試験区のEG区では、全ての液層を 1.5MEG とし、ストローのほぼ中央の液層に受精卵を封入した。PG区では受精卵を含む 1.6MPGの液層のほかに、0.2Mシュークロースも封入した。

対照区は当场で従来から行っているOne step法の封入方法で、受精卵を含む 1.4MGLYの液層、受精卵を含まない 1.1MGLYの液層および 0.3Mシュークロースの液層を封入した。なお、0.2Mおよび 0.3Mシュークロースは、mPBSに溶解したものである。

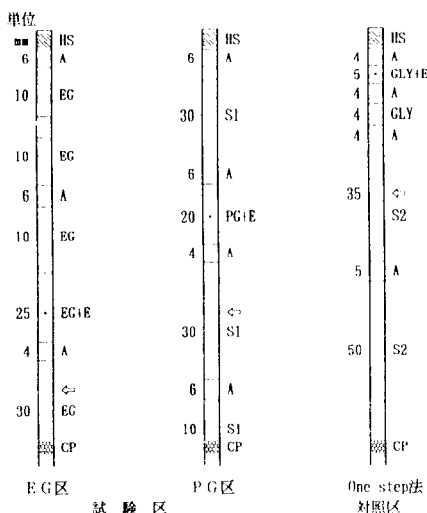


図1 受精卵のストロー内封入方法および植氷部位

HS: 熱シール A: 空気層 E: 受精卵 CP: 綿栓
S1: 0.2Mシュークロース S2: 0.3Mシュークロース △: 植氷部位

4) 受精卵の凍結

試験区では、アルコールバス式のプロプログラムフリーザー (ET-1、富士平工業) を使用して受精卵の凍結を行った。ストローに封入し、耐凍剤で平衡した受精卵を、アルコールバスを-7℃に保持したプロプログラムフリーザーに入れ、2分後に液体窒素で冷却したピンセットを用いて植氷した。植氷後8分経過してから-30℃まで毎分 0.3℃で冷却し、液体窒素に投入した。

対照区では、従来から使用している液体窒素式のプロプログラムフリーザー (FFP-190、大阪酸素工業) にストローをセットして凍結した。冷却速度は、室温から-5℃まで毎分 1℃、-5℃で自動植氷し10分間保持し、-5℃から-30℃まで毎分 0.3℃、-30℃から-31℃まで毎分 0.1℃、その後-160℃までは最大冷却速度で冷却するように設定した。-160℃に達した時点でストローを液体窒素に投入した。それぞれの凍結方法における植氷部位は、図1に示したとおりである。

3. 凍結・融解卵の移植

1) 移植技術者および受卵牛

受卵牛の選定および移植は、県内の獣医師および受精卵移植の資格を持つ人工受精師が実施した。受卵牛は、農家で飼養されているホルスタイン種 (系) の未経産または経産牛で、性周期が受精卵の日齢と±1日以内のものを選定した。

2) 凍結卵の融解

ストローを液体窒素中から取り出し、空気中に約5～10秒間保持した後、30℃の温湯に約10秒浸漬して融解した。

試験区では、融解後直ちにストローをアルコール綿花で消毒し、先端を切除し移植器に装着した。

対照区では、融解後ストローの綿栓部を持ち体温計のように振って各液層を混和し、綿栓部を下にして15～20分間静置し受精卵の希釈液層に移した。その後ストローの消毒、先端切除を行い移植器に装着した。

3) 凍結・融解卵の移植

移植器には、Z A 0 3 5 およびそのサヤとして Z A 1 3 2 (いずれも 1MV 社製) を用いた。また、膈内の細菌を子宮内に持ち込まないようにするため、キャップ付きシース管カバー (F A 7 9 3-3 富士平工業) も使用した。

移植は、頸管経由法で黄体存在側の子宮角内に1卵を移植することを原則としたが、2卵を移植する場合は両側の子宮角内に1個ずつ移植することとした。

移植に際しては、移植に要した時間、受卵牛の状態等を記録した。また、妊娠鑑定は胎齢60日以降に行った。

得られた数値については、 χ^2 検定で有意差の検定をした。

成績および考察

各種耐凍剤により凍結した受精卵の移植成績を表1に示した。受胎率は、1.8MEG、1.6MPG区および1.4MGLY区でそれぞれ46.7%、60.0%および60.0%であり、1.8MEG区が他の2区よりやや低い傾向であったが、有意差はなかった。

表1 各種耐凍剤により凍結した受精卵の移植成績

	耐凍剤	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)	流産頭数
試験区	1.8M EG	15	7	46.7	0
	1.6M PG	15	9	60.0	0
対照区	1.4M GLY	15*	9*	60.0	1

注) 試験区: Direct法 対照区: One step法

*: 2卵移植した1頭を含む

った。しかし、Voelkelら¹⁰⁾は、1.5MEGおよび1.5MPGで凍結融解した受精卵の生存性を培養により調べたところ、明らかに1.5MEGよりも1.5MPGの方が生存率が低かったと報告している。これは、本試験およびSuzukiらの試験とVoelkelらの試験では、冷却速度および液体空素への投入温度が異なることによるためと思われた。

移植に要した時間が受胎率におよぼす影響については表2のとおりである。

田中ら⁹⁾は10%グリセロール+0.25Mシュークロースを耐凍剤として凍結した牛体外受精卵をダイレクト移植した。その結果、移植所要時間が0~5、6~10、11分以上と長くなるに従い、受胎率が77%、29%、0%と低下したと報告している。

本試験の1.8MEG区では、ストロー内の全ての液層を1.8MEGとした。Voelkelら¹⁰⁾は、1.5MEGで受精卵を凍結するときに、液層を全部1.5MEGとした場合は移植後の受胎率が39%であり、1.5MEGの両脇の液層をmPBSとした場合は受胎率が50%になったと報告した。そして、この受胎率の向上はmPBSによりEGの希釈が促進されたこと、および子宮内に注入されるEGの量が減ったためと推定している。しかし、一方で堂地ら²⁾は、本試験と同様に1.8MEGを耐凍剤とし、mPBSの液層を設けなくても69%という高い受胎率を得ている。このように、ストロー内の液層の構成については報告により差があり、検討の余地が残されている。

1.6MPG区の移植後の受胎率は60.0%で、対照区と差がなかった。また、1.6MPGを用いたSuzukiら⁸⁾の成績(受胎率60.6%)とも差がなか

これは、10%グリセロール+0.25Mシュークロースの、受精卵に対する毒性が強いことを示唆するものであろう。

表2 移植に要した時間が受胎率におよぼす影響

移植に要した時間	1.8M EG 受胎率	1.6M PG 受胎率	合計 受胎率
3~5分	0.0(0/2)	25.0(1/4)	16.7(1/6)
6~9分	44.4(4/9)	75.0(6/8)	58.8(10/17)
10~11分	75.0(3/4)	66.7(2/3)	71.4(5/7)

文 献

- 1) Bilton, R. J. : 9th Int. Congr. Anim. Reprod. A. I., Madrid, 2, 245~253, 1980.
- 2) 堂地修、今井敬、高倉宏輔 : 第84回日本畜産学会大会発表要旨、61、1991.
- 3) Leibo, S. P. : Theriogenology, 19, 139, 1983. (Abstr.)
- 4) Massip, A., P. Van Der Zwalmen and F. Ectors : Theriogenology, 27, 69~79, 1987.
- 5) Renard, J. P., Y. Heyman, P. Leymonie and J. C. Plat : Theriogenology, 19, 145, 1983. (Abstr.)
- 6) 鈴木達行、下平乙夫、藤山雅照 : 家畜繁殖誌、29, 162~163, 1983.
- 7) Suzuki, T., T. Ishida and Y. Sakai : Jpn. J. Anim. Reprod., 35, 125~129, 1989.
- 8) Suzuki, T., M. Yamamoto, M. Ooe, A. Sakata, M. Matsuoka, Y. Nishikata and K. Okamoto : Theriogenology, 34, 1051~1057, 1990.
- 9) 田中芳実、桑山正成、佐藤将勝、浜野晴三、牛島仁、津島良秀、江藤哲雄、長岡正二 : 第7回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会講演要旨、67、1992.
- 10) Voelkel, S. A. and Y. X. Hu : Theriogenology, 37, 687~697, 1992.
- 11) Wilmut, I. and L. E. A. Rowson : Vet. Rec., 92, 686~690, 1973.

本試験のダイレクト移植では、所要時間が3~11分であった。移植所要時間を3~5分、6~9分、10~11分に区分すると、受胎率は1.8MEG区でそれぞれ0%、44.4%、75.0%、であり、1.6MPG区ではそれぞれ25.0%、75.0%、66.7%であった。移植所有時間が10~11分かかった例数は少ないものの、受胎率は良好(両区の合計で71.4%)であり、この程度の所要時間であれば凍結・融解卵の生存性は低下しないことがうかがえた。なお、移植所要時間により受胎率が低下するようであれば、移植技術者は心理的な圧迫を受け、移植操作が雑になる可能性もあり、その結果としては、受胎率の低下につながると考えられる。

表3に受卵牛の産歴が受胎率におよぼす影響について示した。いずれの区においても、経産牛(1~5産)よりも未経産牛の方が受胎率が高い傾向であったが、有意な差ではなかった。

表3 受卵牛の産歴が受胎率におよぼす影響

産 歴	1.8M EG 受胎率	1.6M PG 受胎率	1.4M GLY 受胎率	合 計 受胎率
未経産	50.0(4/8)	66.7(4/6)	80.6(5/6)	65.0(13/20)
経 産	42.9(3/7)	55.6(5/9)	44.6(4/9)	48.0(12/25)

以上のように、1.8MEGおよび1.6MPGを耐凍剤として受精卵を凍結した場合、融解後受卵牛に直接移植しても比較的高い受胎率が得られることが確認された。1.8MEG区と1.6MPG区では、1.6MPG区の方がやや受胎率が高かったが、有意な差ではないため更に移植例数を増やして検討したい。また、今回は例数不足のため検討できなかったが、受精卵の発育ステージと受胎率、耐凍剤の平衡時間と受胎率などについても検討する必要があると思われた。

終わりに、受卵牛の選定ならびに受精卵の移植を実施して頂いた移植技術者の皆様に、深謝の意を表します。