

受胎率向上のための受精卵の凍結・融解方法の検討(2)

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	9号
掲載ページ	p. 21-25
発行年月	2004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2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

野外での凍結胚移植の受胎率向上のため、ガイレク法による3種類の凍結液を用い移植試験を実施した。その結果、1.8M エチレングリコール(EG) +0.1M シュクロース+20%子牛血清(CS)加 PBS の区が 1.8MEG+0.4%牛血清アルブミン(BSA)加 PBS および 1.8MEG+20%CS 加 PBS の区より受胎率が高い傾向であった。

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。特に、我が国の農家は飼養規模が小さく、一度に多数の受胎牛を準備できないため、必要に応じて現場で簡易に融解・移植できる凍結保存法の確立が望まれている。このような背景から、受精卵移植等実用化確立事業において、全国的に胚の凍結融解法の簡便化に関する共同試験が実施された(H3～5年度)。その結果、耐凍剤に1.8Mエチレングリコール(EG)を用いることにより、直接移植が可能となった。さらに従来のグリセロールを耐凍剤としたステップワイズ法やワンステップ法と同等の受胎率が得られることが証明された。本法はガイレク法として広く普及した^{1, 2, 3)}。

一方、我が国の凍結胚の受胎率は欧米に比べ10%程度低く、受胎率の地域格差も大きい⁴⁾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。さらに、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ことも考えられる。

そこで、各都道府県で行われている主なガイレク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、試験1(第1報)⁵⁾の結果により選定した3種類の凍結溶液で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。

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試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:

1.8MEGを耐凍剤として3区を設け、基礎溶液には、1,3区は20%CS加PBSを、2区は0.4%BSA加PBSを使用した(表-1)。

表1 試験区

1区	: 1.8MEG+20%CS 加 PBS+0.1M シュクロース
2区	: 1.8MEG+0.4%BSA 加 PBS
3区	: 1.8MEG+20%CS 加 PBS (コントロール)

EG: エチレングリコール、CS: 子牛血清、BSA: 牛血清アルブミン

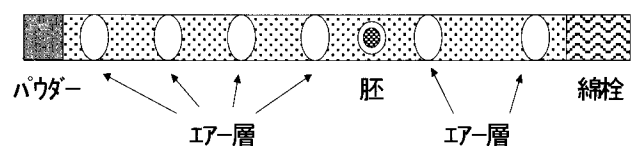


図1 ストローのカラム構成

3) 凍結処理:

供胚牛から回収した胚は、20%CS加PBSで3回洗浄後、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クーラーを用い、-7℃の冷却槽にストローをセットし、2分

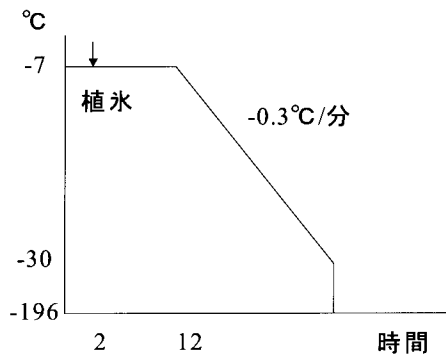


図2 冷却曲線

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)。

4) 融解と移植:

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、受胚牛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、移植は各県とも各区それぞれ約20頭行った。移植試験は、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、鹿児島島の14府県で実施した。

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
受胚牛移植時	品種、年齢、産歴、同期化の有無・方法、発情周期、黄体の状況 麻酔使用の有無、移植時間、移植部位、出血の有無、外気温

7) 統計学的評価

各調査項目について、JSTATを使用し、 χ^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が、2, 3区に比べて1区が高い受胎率であった。

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	271	132	48.7
2区	248	103	41.5
3区	262	114	43.5
合計	781	349	44.7

2) 移植成績(要因別)

(1) 胚の要因(表4-7)

胚の発育ステージ別では、3区とも後期桑実胚(CM)の受胎率が高く、以後ステージが進むにつれ受胎率が下がる傾向が見られた。ただし桑実胚(M)は、すべての区で低い受胎率であった(表6)。胚のランクでは、2区でA'がA, Bより有意に高い受胎率であったが、他の区では有意差は見られなかった。

(2) 凍結処理の要因(表8-10)

胚回収から耐凍剤平衡までの時間では、1時間以上の受胎率が1時間以内より、2区で有意に低く、3区でも低い傾向が見られた(表8)。

(3) 受胚牛の要因(表11-19)

黄体ランク(表16)別では、ランク2の受胎率がランク1, 3より、2区と3区で有意に低く、1区で低い傾向であった(表17)。

表16. 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

（4）移植時の要因（表20-23）

移植部位では、浅部・中部・深部の順に高くなる傾向であった（表21）。移植時に出血があると有意に低下した（表22）。

考察

胚の培養試験⁵⁾の結果を受けて、今回3種類の凍結液について受胎牛への移植試験を広域的に実施し受胎率について検討した。

本試験では、基礎溶液の種類（BSAとCS）、糖添加の有無による受胎率への影響は見られなかったが、糖添加区（1区）が他の区（2, 3区）より高い傾向を示した。我々は胚の培養試験において糖添加の有効性を報告しており今回の移植試験からも同様の結果が得られた。また、BSA（2区）とCS（3区）の比較では、全体としては受胎率に差は見られず（表1）、胚の培養試験における報告⁵⁾と同様の結果が得られた。しかし2区では、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。このことは、BSAのみを基礎溶液に添加した場合、受胎率への影響が考えられるため、今後、糖添加の検討が必要であると考えられた。

胚の要因では、胚の発育ステージが進むにつれて全ての区で受胎率の低下が認められたことから、発育ステージに応じた凍結法を検討する必要があると思われた。

凍結処理の要因では、胚回収から耐凍剤平衡までの時間がかかると2区と3区では受胎率が低下する傾向が見られ、糖添加の有効性が示された。また、氷晶形成までの時間が20分以上掛かると1区、2区では受胎率が低下する傾向にあったが、例数が少ないため、調査を継続し例数の蓄積が必

要と考えられた。

受胎牛の要因では、黄体ランク2の受胎率がランク1, 3より低かったが今回のランク付けは触診によるものであり、実際の黄体との相関性の確認も必要と思われた。また、F1の受胎率がホヌン種より有意に低かったが実施県の偏りが見られた。

最後に、今回の試験でマウス要因と考えられた4つの要因（胚の発育ステージがM、胚のランクがC、氷晶形成までの時間が20分以上、移植時の出血が有り）を除いた場合、受胎率の差がさらに広がる傾向（1区:54.2%, 2区:44.0, 3区:46.6）にあり、糖添加の有用性が示された。

今後、本試験の結果を受けて、糖を添加した2種類の凍結液（1.8M EG+0.1M Suc+20% CS 加 PBS ならびに 1.8M EG+0.1M Suc +0.4% BSA 加 PBS）を使用して移植試験による受胎率の検討を行う予定である。

参考文献

- 1) 堂地ら 第84回日本畜産学会講演要旨(abst.)
- 2) S. A. Voelkel, Y. X. Hu Therio. (1992), 37:963-967
- 3) 窪田ら 鹿児島県肉用牛改良研究所研究報告第2号(1997); 鹿児島県内におけるエレングリコールを使用したウシ胚のダイレクト凍結融解移植法の検討
- 4) 農水省報告: 移植成績速報値およびチャレンジ 50
- 5) 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）

胚の要因

表4. 供胚牛の品種と移植成績

試験区	品種	移植頭数	受胎頭数	受胎率
1区	黒毛和種	253	121	47.8
	ホルスタイン種	18	11	61.1
2区	黒毛和種	242	103	42.6
	ホルスタイン種	6	0	0.0
3区	黒毛和種	239	102	42.7
	ホルスタイン種	23	12	52.2

表5. 供胚牛の年齢と移植成績

試験区	年齢	移植頭数	受胎頭数	受胎率
1区	1-3	54	26	48.1
	4-6	49	23	46.9
	7-9	45	24	53.3
	10-16	28	12	42.9
2区	1-3	45	17	37.8
	4-6	40	19	47.5
	7-9	46	19	41.3
	10-16	30	16	53.3
3区	1-3	58	26	44.8
	4-6	37	20	54.1*
	7-9	45	14	31.1*
	10-16	30	16	53.3

表6. 胚の発育ステージの移植成績

試験区	ステージ	移植頭数	受胎頭数	受胎率
1区	M	4	1	25.0
	CM	132	69	52.3
	初期胚盤胞(EB)	90	42	46.7
	胚盤胞(BL)	35	16	45.7
	拡張期胚盤胞(ExBL)	10	4	40.0
2区	M	4	0	0.0
	CM	132	65	49.2*
	EB	78	27	34.6*
	BL	30	10	33.3
	ExBL	4	1	25.0
3区	M	5	1	20.0
	CM	119	56	47.1
	EB	99	42	42.4
	BL	31	12	38.7
	ExBL	8	3	37.5

表7. 胚のランクと移植成績

試験区	ランク	移植頭数	受胎頭数	受胎率
1区	A	115	61	53.0
	A'	98	45	45.9
	B	55	26	47.3
	C	3	0	0.0
2区	A	100	38	38.0*
	A'	93	49	52.7**
	B	52	15	28.8*
	C	3	1	33.3
3区	A	103	50	48.5
	A'	107	39	36.4
	B	50	25	50.0
	C	2	0	0.0

凍結処理の要因

表8. 胚回収から平衡開始までの時間と移植成績

試験区	時間(h)	移植頭数	受胎頭数	受胎率
1区	<1	33	15	45.5
	1 ≤, <2	173	84	48.6
	2 ≤	65	33	50.8
2区	<1	28	20	71.4**
	1 ≤, <2	156	63	40.4*
	2 ≤	64	20	31.3*
3区	<1	30	16	53.3
	1 ≤, <2	168	74	44.0
	2 ≤	64	24	37.5

表9. 耐凍剤平衡時間と移植成績

試験区	時間(min)	移植頭数	受胎頭数	受胎率
1区	10-15	233	109	46.8
	15-20	30	17	56.7
	20 ≤	4	2	50.0
2区	10-15	209	84	40.2
	15-20	32	15	46.9
	20 ≤	4	2	50.0
3区	10-15	218	96	44.0
	15-20	39	15	38.5
	20 ≤	-	-	-

表10. 氷晶形成までの時間と移植成績

試験区	時間	移植頭数	受胎頭数	受胎率
1区	10分前後	264	131	49.6
	20-34分	7	1	14.3
2区	10分前後	239	101	42.3
	20-34分	9	2	22.2
3区	10分前後	258	112	43.4
	20-34分	4	2	50.0

受胎牛の要因

表11. 受胎牛の品種と移植成績

試験区	品種	移植頭数	受胎頭数	受胎率
1区	黒毛和種	61	28	45.9
	ホルスタイン種	187	94	50.3
	F1	11	5	45.5
	その他	12	5	41.7
2区	黒毛和種	65	22	33.8
	ホルスタイン種	163	76	46.6
	F1	15	2	13.3
3区	その他	5	3	60.0
	黒毛和種	64	30	46.9
	ホルスタイン種	181	80	44.2
	F1	11	2	18.2
	その他	6	2	33.3

表12. 受胎牛の年齢と移植成績

試験区	年齢	移植頭数	受胎頭数	受胎率
1区	1歳以下	93	44	47.3
	2	52	26	50.0
	3	25	13	52.0
	4	15	7	46.7
	5	19	5	26.3
	6歳以上	36	20	55.6
2区	1歳以下	62	30	48.4
	2	37	20	54.1
	3	28	8	28.6
	4	17	6	35.3
	5	23	11	47.8
	6歳以上	43	12	27.9
3区	1歳以下	92	42	45.7
	2	40	19	47.5
	3	33	17	51.5
	4	18	5	27.8
	5	16	6	37.5
	6歳以上	29	11	37.9

表13. 受胎牛の産歴と移植成績

試験区	産歴	移植頭数	受胎頭数	受胎率
1区	未経産	140	65	46.4
	経産	114	57	50.0
2区	未経産	99	46	46.5
	経産	121	43	35.5
3区	未経産	136	59	43.4
	経産	103	44	42.7

表14. 受胎牛のスタンディング確認と移植成績

試験区	確認	移植頭数	受胎頭数	受胎率
1区	有	151	82	54.3
	無	90	38	42.2
2区	有	128	49	38.3
	無	96	46	47.9
3区	有	156	70	44.9
	無	80	34	42.5

表15. 受胎牛の排卵確認と移植成績

試験区	確認	移植頭数	受胎頭数	受胎率
1区	有	104	55	52.9
	無	159	74	46.5
2区	有	101	43	42.6
	無	145	60	41.4
3区	有	117	55	47.0
	無	144	59	41.0

表17. 受胎牛の黄体ランクと移植成績

試験区	黄体ランク	移植頭数	受胎頭数	受胎率
1区	ランク1	107	52	48.6
	ランク2	84	38	45.2
	ランク3	40	21	52.5
	ランク4	3	2	66.7
	ランク5	13	6	46.2
2区	ランク1	106	49	46.2*
	ランク2	83	26	31.3**
	ランク3	28	15	53.6*
	ランク4	3	1	33.3
	ランク5	6	1	16.7
3区	ランク1	93	44	47.3*
	ランク2	100	38	38.0**
	ランク3	32	15	46.9*
	ランク4	5	4	80.0
	ランク5	15	5	33.3

表18. 受胎牛の発情同期化の有無と移植成績

試験区	同期化	移植頭数	受胎頭数	受胎率
1区	有	64	28	43.8
	無	201	101	50.2
2区	有	65	25	38.5
	無	176	78	44.3
3区	有	61	26	42.6
	無	195	85	43.6

表19. 受胎牛の発情同期化の方法と移植成績

試験区	同期化の方法	移植頭数	受胎頭数	受胎率
1区	PG	14	6	42.9
	CIDR	45	20	44.4
	その他	5	2	40.0
2区	PG	13	4	30.8
	CIDR	41	15	36.6
	その他	10	5	50.0
3区	PG	18	10	55.6
	CIDR	38	13	34.2
	その他	5	3	60.0

移植時の要因

表20. 移植時の麻酔の有無と移植成績

試験区	麻酔	移植頭数	受胎頭数	受胎率
1区	有	138	64	46.4
	無	133	68	51.1
2区	有	113	46	40.7
	無	135	57	42.2
3区	有	129	53	41.1
	無	132	61	46.2

表21. 移植部位と移植成績

試験区	部位	移植頭数	受胎頭数	受胎率
1区	浅部	85	39	45.9
	中部	129	64	49.6
	深部	55	28	50.9
2区	浅部	73	30	41.1
	中部	119	51	42.9
	深部	53	20	37.7
3区	浅部	78	32	41.0
	中部	121	50	41.3
	深部	62	32	51.6

表22. 移植時の出血の有無と移植成績

試験区	出血	移植頭数	受胎頭数	受胎率
1区	無	228	118	51.8
	少	28	7	25.0
	中	5	2	40.0
	多	1	0	0.0
2区	無	209	87	41.6
	少	29	13	44.8
	中	6	1	16.7
	多	2	1	50.0
3区	無	229	105	45.9
	少	24	7	29.2
	中	6	2	33.3
	多	1	0	0.0
全体	無	666	310	46.5*
	少	81	27	33.3*
	中	17	5	29.4
	多	4	1	25.0

表23. 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
10>	16	8	50.0
10-19	49	19	38.8
20-24	83	40	48.2
25-29	70	34	48.6
30-32	19	6	31.6