

1. 凍結液への糖添加によるウシ凍結受精卵の受胎率向上

廣川 順太・谷山 敦・小笠原俊介・松尾 信明¹
(大家畜科・¹中央家畜保健衛生所)

要 約

凍結胚の受胎率向上を目的に3種類の凍結液を用い、それぞれ凍結保存したA~Bランク胚の現地移植試験による受胎率を比較した。その結果、凍結液1.8Mエチレングリコールに0.1Mシュクロースを加えた区の受胎率が68.4%と最も高く、また、Bランク胚でも安定した受胎率が得られた。

キーワード：胚，受胎率，エチレングリコール，シュクロース，Bランク

緒 言

胚移植技術の普及定着には、胚の凍結保存技術が不可欠である。特に我が国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。現在、主にエチレングリコール(EG)を耐凍剤としたダイレクト法が広く普及しているが、受胎率はアメリカ、カナダ等と比べ10%程度低く¹⁾、地域差も大きいため、受胎率の向上が急務となっている。

そこで組成の異なる3種類の凍結液について移植試験を実施し、受胎率の比較により最適な凍結液組成を検討した。

材料および方法

胚の凍結に適した耐凍剤を選定するために、黒毛和種雌牛11頭から採卵した胚を3種の凍結液で凍結保存し、現地移植試験を実施した。

1) 供試胚

過排卵処置・人工授精²⁾した供胚牛から7日目(発情日=0日目)に回収した intact 胚をA, A'およびBにランク分け³⁾したものを供試した(表1)。

表1 胚のランク³⁾

ランク	
A	殆ど変性部位無し
A'	変性部位10%以下
B	変性部位10~30%

2) 耐凍剤および基礎溶液

1区：1.8M EG + 0.1M Suc in 20% CS-PBS

2区：1.8M EG in 0.4%BSA-PBS

3区：1.8M EG in 20%CS-PBS

注)EG：エチレングリコール，Suc：シュクロース，M：mol/l，CS：子牛血清，PBS：リン酸緩衝液，BSA：ウシ血清アルブミン

3) 凍結処理

供胚牛より回収した胚は20%CS-PBSで3回洗浄後、凍結液に移し、事前に凍結液で洗浄した凍結用ストローに胚を図1のように吸引した。なお、胚を凍結液に移してから冷却を開始するまでの平衡時間は10~15分とした。その後、-7℃に冷却したプログラムフリーザーに投入し2分後に植氷を実施した。植氷後、氷晶形成のため10分間保持した後、毎分-0.3℃で-30℃まで冷却し、直ちに液体窒素に投入した。

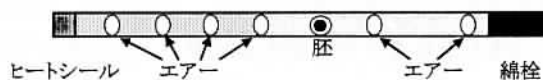


図1 凍結用ストローのカラム構成

4) 移植試験

3種類の凍結液でそれぞれ凍結保存した57個の胚を、前年度実績で受胎率が50%を超える3名の移植師に均等に振分けた。1区19頭、2区20頭、3区18頭の受胎牛へ1胚移植を実施し、受胎率を比較した。なお、移植時の胚の融解は、ストローを液体窒素から取り出し空気中に6秒間保持後、30℃の

微温湯に20秒間浸漬して実施した。

結 果

1) 移植成績

受胎率は1区68.4%, 2区55.0%, 3区55.6%で, Sucを添加した1区が他の区よりも約13%高い受胎率を示した(表2)。

各区をA, A', Bの3ランクに分けて受胎率を比較すると, 1区, 2区でAおよびA'ランク胚が50%を超える受胎率であった。しかし, Bランク胚では, 受胎率が50%を超えた区は1区のみであった(表3)。

考 察

凍結融解処理による胚へのダメージは, 胚の生存性およびその後の受胎率へ大きな影響を与える。このため胚の凍結融解時におけるダメージ軽減を目指した取組みが行われ, Sucやトレハロースの添加により胚の生存性が向上する可能性があることについても報告されている^{9)~10)}。糖添加により胚の生存性が向上するのは, 糖が細胞膜の保護的役割を行うためだと考えられており, 今回の試験でも1区のすべてのランクで50%を超える安定した受胎率が得られた要因として, Sucの細胞膜保護機能が作用し, 特にBランク胚については, 凍結融解時のダメージを軽減したため受胎率の低下を防止できたものと推察された。

また今回の試験で使用した3種類の凍結液のうち, SucとBSAを同時に利用した凍結液で, 植氷後の氷晶形成時間が特に長くなる傾向が見られた。これは, 溶液の凝固点が純溶媒の凝固点よりも低くなる¹¹⁾という性質から, SucやBSA添加により凍結液の凝固点が下がったためだと考えられた。このため, 凍結時には氷晶形成を十分確認する必要があると思われる。

表2 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	19	13	68.4
2区	20	11	55.0
3区	18	10	55.6
合計	57	34	59.6

注) 有意差なし

表3 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	7	5	71.4
	A'	3	2	66.7
	B	9	6	66.7
2区	A	6	3	50.0
	A'	4	4	100.0 ^a
	B	10	4	40.0 ^b
3区	A	8	6	75.0
	A'	3	1	33.3
	B	7	3	42.9
合計		57	34	

注) 同列異符号間に有意差(p<0.05)

謝 辞

本研究の実施にあたり, 移植にご協力いただいた県内各地の受精卵移植師および農家の皆様に深謝いたします。

引用文献

- 1) (社)家畜改良事業団. 受精卵移植に関する実態調査報告書—アメリカ・カナダ—: 30. 1999.
- 2) 藤山雅照・山口雅之・奥透・山下達夫. 低単位卵胞刺激ホルモン投与による過剰排卵処理. 長崎県畜産試験場研究報告, 2: 4-5. 1992.
- 3) 日本家畜人工授精師協会. 家畜人工授精講習会テキスト(家畜受精卵移植編): 172-176. 1996.
- 4) 鈴木達行・下平乙夫・藤山雅照. ウシ凍結受精卵の1段階ストロー法による移植. 家畜繁殖学会誌, 29(3): 162-163. 1983.
- 5) 鈴木達行・石田隆志・酒井豊. グリセロール(1.4M)加蔗糖液を用いたウシ胚の凍結と移植試験. 家畜繁殖学会誌, 35(3): 125-129. 1989.
- 6) 吉村格・大久範幸・高田直和・石川勇志・本好茂一. ウシ体外受精胚の凍結融解後の生存性に及ぼす1, 2-プロパンジオールへのトレハロースの添加および冷却速度の影響. 日本畜産学会報, 64(2): 179-182. 1993.
- 7) 奥透・山口雅之・藤山雅照. 牛の体外受精に関する試験(2)—体外受精胚の凍結保存—. 長崎県畜産試験場研究報告, 2: 1-3. 1992.
- 8) 齋藤美英・永田浩章・佐野文彦・三宅晃次. シュークローズおよびトレハロースの添加がウシ体外受精胚およびウシ未受精卵子の凍結融解後の生存性

- に与える影響, 静岡県畜産試験場研究報告, 22 :
60-63, 1996.
- 9) 齋藤美英・野田準一・佐野文彦・三宅晃次, 牛胚凍結保存液に用いる添加剤の細胞膜保護効果の推定, 静岡県畜産試験場研究報告, 24 : 5-8, 1998.
- 10) 吉羽宣明・高田新一郎・山本信義, 牛分割受精卵の凍結保存技術, 埼玉県畜産センター研究報告, 1 : 1-6, 1997.
- 11) ポーリング, 一般化学(上), 303-304, 関 集三, 千原秀昭, 桐山良一訳, 岩波書店, 東京, 1970.