

## ウシ胚の凍結におけるダイレクト法の改良の検討

大谷徳寿・谷原礼論・山下洋治・上村圭一

### The improvement of the direct transfer of frozen-thawed bovine embryos.

Noritoshi OTANI, Ayatsugu TANIHARA, Youji YAMASHITA, Keiichi UEMURA

#### 要 約

ウシ胚の凍結におけるダイレクト法の改良を検討するため、凍結保存液は、従来型の 20%CS・1.8M エチレングリコール加 PBS から 20%FCS・0.2M トレハロース・1.8M エチレングリコール加 PBS に変更した。カラムの構成は、Voelkel&Hu の方法を参考とし、凍結保存液は胚が浸漬するカラムのみとし、その他のカラムは 20%FCS 加 PBS とした。平成 18～21 年度の受胎成績は従来型 21.1%、改良型 48.4%、その他 39.6%と改良型の受胎率が最も高かった。供胚牛別では 87.5%(7/8)の高受胎率を得るものもあり、子宮内での胚発育性は非常に高く、今後、受胎牛の選定を含めた胚移植師の技術が向上することにより、さらに成績の向上が期待できるものと思われた。

#### 緒 言

これまで本県の胚の凍結方法は、技術者が融解後の胚の状態を確認できるという観点からステップワイズ法が主流であった。しかし、平成 10～21 年度までの受胎率は 22.5～43.7%を推移し、満足する成績を得られなかった。一方、ダイレクト法の受胎率は 0%～58.6%と成績差が激しく、近年ではあまり利用されていなかった。そこで、従来のダイレクト法に改良を加えとともに、その成績を検討した。

#### 材料及び方法

##### 1. 供試胚

平成 18～21 年度、農家繋養の黒毛和種供試胚牛に農業共済組連合会家畜診療所獣医師が過剰排卵処理を行い、発情後 7 日目に非外科的に採取した桑実胚～胚盤胞のうち A～B ランク胚を用いて改良型凍結処理を行った。

##### 2. 胚の凍結

従来型は、平成 17 年度までに当場で凍結され保管されていたものであり、ストロー充填法は、図 1 に示したとおりである。凍結保存液は 20%子ウシ血清(CS:GIBCO)・1.8M エチレングリコール(WACO)加 PBS(D-PBS:GIBCO)とし、カラム全ての溶液に用いていた。改良型のストロー充填法は、図 2 に示したとおりである。Voelkel&Hu の方法<sup>1), 2)</sup>を参考とし、胚が浸漬するカラム(1.5～2cm)以外を 20%ウシ胎児血清(FCS:ICN)加 PBS にした。また、凍結保存液のエチレングリコール濃度は 1.8M と同じであるが、凍結保護物質として 0.2M トレハロース(D-(+)トトレハロース:ナカライテスク)を添加し、従来から使用していた CS を胚に影響が少ない FCS に変更した。胚は、凍結保存液に移動・洗浄し、蒸散による耐凍剤濃度の上昇を防止するため、直ちにストローに吸引後、封入してから、室温で 10～20 分平衡を行った。その後、プログラムフリーザー(E T 1:富士平工業)の -7℃のアルコールバスに浸漬し、2 分間保持後、植氷を行った。カラム全体が凍結したことを確認後、-7℃で 10 分間保持した後、-0.3℃/分の冷却速度で -30℃まで冷却、液体窒素内に保存した。凍結プログラムは従来型と同じとした。

##### 3. 胚の融解

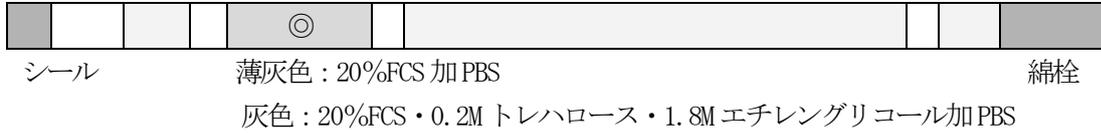
凍結処理したストローは、胚移植師の凍結保存器に移し、夫々が現場で融解・移植を行った。融解は、空気中に 10 秒間放置後、30℃の微温湯に 10 秒間浸漬した。

ウシ胚の凍結におけるダイレクト法の改良の検討

図1：従来型



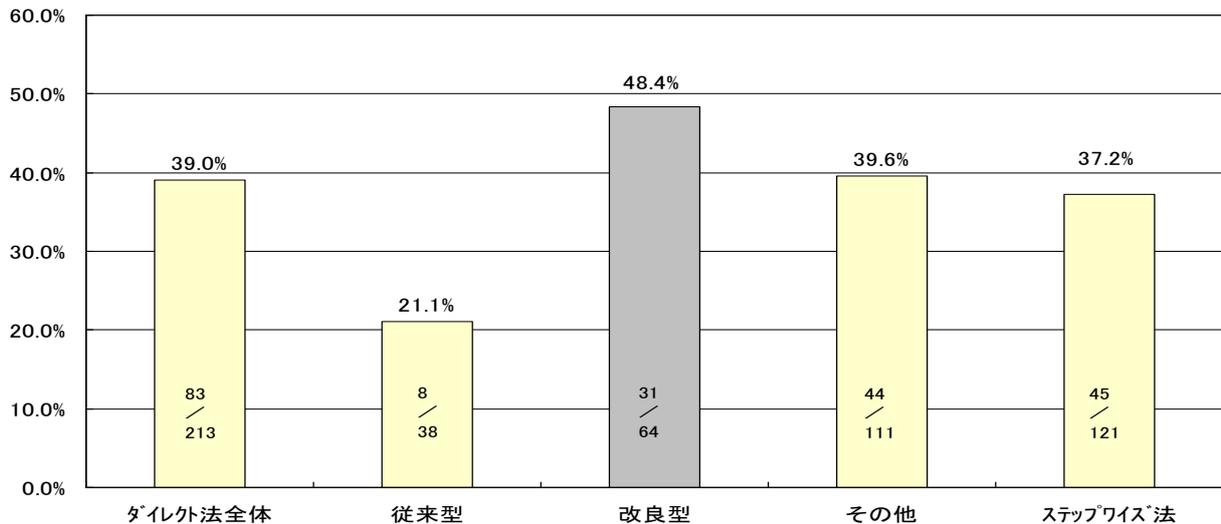
図2：改良型



成績

平成 18～21 年度の凍結法による受胎成績は、ダイレクト法では、従来型、改良型、その他（(社)家畜改良事業団、その他個人購入により入手された構成が不明なダイレクト凍結胚）に分類した。ステップワイズ法の受胎率が 37.2%に対し、ダイレクト法全体は 39.0%であり、差は認められなかった。ダイレクト法の区別では、従来型 21.1%、改良型 48.4%、その他 39.6%と改良型の受胎率が最も高かった。特に従来型のダイレクト法に比べるとその受胎率は2倍以上であった(図3)。

図3：H18～H21年度凍結方法別受胎率



改良型に使用した供胚牛毎の受胎率、移植者の成績をまとめたものである。受胎率では、0%～87.5%と大きな差が認められた。これは、胚移植師の技術の差が考えられるが、供胚牛1号(75.0%)、7号(87.5%)では、非常に高い受胎率を示すものもあり、融解後の胚の発育性は高いものと思われた(表1)。

表1：改良型ダイレクト法の供胚牛別受胎率

供胚牛	移植頭数	受胎頭数	受胎率 (%)	胚移植師
1	12	9	75.0	A
2	2	1	50.0	A
3	1	0	0.0	A
4	8	4	50.0	B7、C1
5	4	1	25.0	B3、D1
6	5	1	20.0	B
7	8	7	87.5	E
8	5	0	0.0	E
9	16	8	50.0	F
10	2	0	0.0	G
11	1	0	0.0	G
合計	64	31	48.4	

## 考 察

本県における胚の凍結保存は、ステップワイズ法が主流であった。これは、初期のダイレクト法の受胎率に不安があったことに加え、畜産試験場、家保で凍結胚を保存し、移植に供する際、当該実験室で融解後の状態を確認することを優先していたためである。しかし、その受胎率は過去 10 年間の成績においても 40%を超えたのが 1 度しかなかった。その原因としては、融解後、実験室から農家まで搬送する間に胚の劣化があったためと思われる。

そこで、平成 18 年度より、野外採胚したものをダイレクト法で凍結し、胚移植師の凍結保存器に保管し、現地融解して、融解後短時間で移植できるシステムの構築を試みた。この際、従来のダイレクト法に加え、高い受胎率の期待できる新たな手法を検討することとし、今回、Voelkel&Hu の方法<sup>1), 2)</sup>を応用した。これは、ストロー内のカラム作成時、凍結保存液は、胚の入っている部分のみとし、その他のカラムは 20%FCS 加 PBS とするものである。Voelkel&Hu は、移植後に PBI により胚への復水が促進されること、子宮内へのエチレングリコールの持ち込み量を少なくし、子宮内膜への局所作用を軽減するためとしている。ただし、冷却速度は Voelkel&Hu が  $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$  としていたのに対し、 $-0.3^{\circ}\text{C}/\text{分}$  を選択した。また、Voelkel&Hu がストローの中央部分に胚を配置したのに対し、当場ではストローの先端寄りに胚のカラムを配置した。これは、ストロー導入がスピーディーに行えることと、胚の押し出しを重視し、胚の後方に多目の 20%FCS 加 PBS 層を設けたためである。また、従来型に比べて凍結保存液層が少ないため、植氷時間が短縮できるという利点も得ることができた。

凍結保護物質として 0.2M トレハロースを添加したが、これは当場にて赤血球を用いた凍結融解試験により、同濃度のシュクロース、アロース、ブシコースと比べて有意に凍結保護作用を認めた<sup>3)</sup>からである。胚保存液、凍結保存液に添加する血清を CS から FCS に変更したのは、当場で体外受精を行う際に FCS のほうが良好な結果を得ていたため、これを応用したものである。

結果は、従来型の受胎率は 21.1%と低く、これまで本県技術者や農家が不安を抱くことを裏付ける結果となった。それに比べて、改良型は、48.4%とまずまずの受胎率を認め、中には 87.5%(7/8)の高受胎率を得るものもあり、子宮内での胚の発育性は非常に高いことが示唆された。今後、受胎牛の選定を含めて胚移植師の技術が向上することにより、さらに成績の向上が見込めるものと思われる。

## 引用文献

- 1) 堂地 修, 牛凍結胚のダイレクトトランスファー法, 家畜人工授精 153:28-33, 1992.
- 2) 中原高士ほか, エチレングリコールを耐凍剤として用いた 4 種類のウシ胚凍結保存法の移植成績について, 宮崎県畜産試験場試験研究報告 8:1-4, 1995.
- 3) 大谷徳寿ほか, 希少糖を用いた牛胚の凍結保存に関する試験, 香川県畜産試験場研究報告 42:31-35, 2007