

ウシ胚移植における受胎率向上のための凍結・融解方法の検討

大下雄三 妻由道明 池本千恵美* 米村功

*西部家畜保健衛生所

要 約

本県では、平成 14 年度から 16 年度までの 3 年間、14 府県の試験関係機関と共同で受胎率向上のためのダイレクト移植方法によるウシ胚の凍結・融解方法に関する試験を実施した。

1 培養成績試験において、耐凍剤として用いられるシュクロースとトレハロースを比較した試験では、本県及び全国成績で生存率に差は認められなかった。また、基礎溶液についても、牛血清アルブミン (BSA) と子牛血清 (CS) では差は認められなかった。

糖添加区と糖無添加区を比較した場合、生存率に差は認められなかったが hatch 率では糖を添加したほうが有意に高い傾向にあった。

2 3 種類の凍結溶液で移植試験を行った結果、全国成績では糖類 (シュクロース) を添加区が有意に受胎率が高かった。

3 1.8 M イソングリコール+0.1M シュクロースを耐凍剤と定め、基礎溶液に BSA と CS を加えた移植試験では両区に差は認められなかった。

4 エアーソーイング時間の 6 秒区と 10 秒区では受胎率に差は認められなかったことから、従来から推奨されている 6 ~ 10 秒で問題ないことがわかった。

緒 言

胚移植技術の普及定着をおこなう上で、凍結胚による受胎率の向上は重要な要素である。しかしながら、我が国で主流のイソングリコールを耐凍剤としたダイレクト法では、平成 2 年度以降 40 % 台¹⁾を推移しているため、受胎率の向上が急務となっている。

また、農家又は各都道府県においても受胎率に大きな差があり、凍結・融解方法が耐凍剤の種類や濃度によって様々で、どの手法が優れているか不明な点が多いのが現状である。

そこで、平成 14 年度は、試験 1 で移植試験に採用する耐凍剤および基礎溶液を決定するために、各耐凍剤および基礎溶液で胚を凍結保存し、融解後の生存性を培養試験により調査した。

試験 2 では、試験 1 で良好な結果が得られた 2 種類の

耐凍剤および基礎溶液の組合せと 1.8 M イソングリコール (20 % CS) を用いて胚を凍結し、移植試験を行い最も優れた耐凍剤・基礎溶液を決定した。

平成 15 年度は、試験 3 として前年度の試験 2 において受胎率の最も高かった耐凍剤 1.8 M イソングリコール + 0.1 M シュクロースをもとに、基礎溶液に CS または BSA を加えた場合で、どちらが最適な凍結液であるか比較検討した。

平成 16 年度は、試験 4 として、これまでの試験で絞ってきた最適な耐凍剤および基礎溶液を統一し、融解条件としてエアースーイング時間について検討した。

材 料 及 び 方 法

1 供試胚

生体から 7 日目に回収した胚で A、A' および B ラン

クのものを供した。

2 凍結及び移植方法

ア．凍結前処理

室温（20～25℃）で10～15分をめぐりに耐凍剤の平衡を行い、ストローに封入した。

イ．凍結

-7℃の冷却槽にストローを入れ2分後に植氷して10分間保持し、-30℃まで毎分0.3℃で冷却した。-30℃に達した後液体窒素に投入した。

ウ．融解方法

液体窒素からストローを取り出し空気中に6秒保持後、30℃の微温湯で20秒間融解した。

エ．移植方法

受胎牛1頭に1個の凍結・融解受精卵を直接移植する。技術者は各都道府県の平均レベル以上の2、3名に限定する

3 各試験

試験1（平成14年度）

移植試験に採用する耐凍剤および基礎溶液を決定するために、各耐凍剤および基礎溶液で胚を凍結保存し、融解後の生存性を培養試験により調査した。

1) 試験区

1区：1.8M Iフングリコール + 0.1M シュクロース（20% CS in PBS）

2区：1.8M Iフングリコール + 0.1M トリハロース（20% CS in PBS）

3区：1.8M Iフングリコール（0.4% BSA in PBS）

4区：1.8M Iフングリコール（20% CS in PBS）

BSA：牛血清アルブミン CS：子牛血清

1、2及び4区は20%CS加PBSを、3区は0.4%BSA加PBSを基礎溶液とした。

2) 生存性の調査方法

融解後がル外移植を想定した方法で耐凍剤の希釈を行い、TCM199 + 20% FCS + MEで培養し、回収時、培養開始時、24、48および72時間後に形態を観察した。

培養後のhatch率（hatching以上にまで発育した率）、生存率を調査した。

3) 本県割当試験区と実施頭数

1区（1.8M Iフングリコール + 0.1M シュクロース）：15頭

2区（1.8M Iフングリコール + 0.1M トリハロース）：15頭

試験2（平成14年度）

試験1で良好な結果が得られた2種類の耐凍剤および基礎溶液の組合せと1.8MIフングリコール（20%CS in PBS）を用いて胚を凍結し、移植試験を行い最も優れた耐凍剤・基礎溶液を決定する。

1) 試験区

試験1の結果をもとに協議して2種類の耐凍剤を決定した。

1区：1.8M Iフングリコール + 0.1M シュクロース（20% CS in PBS）

3区：1.8M Iフングリコール（0.4% BSA in PBS）

対照区：1.8M Iフングリコール（20% CS in PBS）

2) 調査項目

移植成績：受胎率

試験3（平成15年度）

試験3として、前年度の試験2において受胎率の最も高かった耐凍剤1.8MIフングリコール + 0.1M シュクロースをもとに、基礎溶液にCSまたはBSAを加えた場合で、どちらが最適な凍結液であるか比較検討した。

1) 耐凍剤および基礎溶液

1区：1.8M Iフングリコール + 0.1M シュクロース（0.4% BSA in PBS）

2区：1.8M Iフングリコール + 0.1M シュクロース（20% CS in PBS）

2) 調査項目

移植成績：受胎率

4 試験4（平成16年度）

これまでの試験で最適な耐凍剤および基礎溶液を統一し、融解条件としてエアソーイング時間について検討した。

1) 耐凍剤および基礎溶液

1.8M Iフングリコール + 0.1M シュクロース（0.4% BSA in PBS）

2) 融解方法

液体窒素からストローを取り出し空気中に保持する時間(エアソーイング時間)によって試験区を設定した。

6 秒区: エアソーイング時間 6 秒

10 秒区: エアソーイング時間 10 秒

エアソーイング後 30 秒の微温湯で 20 秒間融解した。

3) 調査項目

エアソーイング時間と受胎率の関係

結果及び考察

試験 1

表1 融解・培養成績

試験区	培養72時間目(鳥取県)			培養72時間目(全国)		
	hatch率	生存率	n	hatch率	生存率	n
1区 1.8MIフレンジリコール+0.1Mシュウケウス(20%CS in PBS)	47.0	60.0	15	62.7	75.5	102
2区 1.8MIフレンジリコール+0.1Mトリアミン(20%CS in PBS)	53.0	67.0	15	65.3	76.5	98
3区 1.8MIフレンジリコール(0.4%BSA in PBS)	-	-	-	55.1	70.4	98
4区 1.8MIフレンジリコール(20%CS in PBS)	-	-	-	51.0	76.0	100
生存率: Cランク以上の胚の割合						398
hatch率: hatching以上の胚の割合						

試験1で、耐凍剤及び基礎溶液による融解及び培養後の生存性について調査した。

耐凍剤として用いられる糖の種類について、本県の72時間目の培養成績では hatch 率(hatching 以上にまで発育した率)及び生存率において2区(トリアミン区)が1区(シュウケウス区)を若干上回ったが有意差は認められなかった。また、全国成績においても差は認められなかった。このことから、糖の種類による差は殆ど無いと考えられた。

基礎溶液については、3区(牛血清アルブミン区)と4区(子牛血清区)で比較を行った。

本県の割当がないため当県のデータは存在しないが、全国成績では、生存率では4区の方が若干高く、hatch 率では3区の方が若干高い成績であった。このことから、基礎溶液として牛血清アルブミンでも子牛血清でも問題ないと考えられた。

また、糖添加(1区、2区)と糖無添加(3区、4区)を比較した場合、生存率に差は認められなかったが hatch 率では糖を添加したほうが有意に高い傾向にあった。このことから、糖が細胞膜の保護し凍結融解時の障害を緩和している²⁾と考えられた。

試験 2

試験1により決定した、上記3種類の凍結溶液で凍結保存し移植試験を行った。また、データにはマイナスとなる要因(氷晶形成時間20分以上、胚発育ステージM、ランクC)を除いた成績を示した。

本県の成績では各区間に有意差は認められなかったが、全国成績では1区54.2%、3区44.0%、4区46.2%と1区(シュウケウス区)が高く、1区、3区間で有意差(p>0.05%)が認められた。

表2 移植試験成績

試験区	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
1区 1.8MIフレンジリコール+0.1Mシュウケウス(20%CS in PBS)	12 (212)	4 (115)	33.3 (54.2)
3区 1.8MIフレンジリコール(0.4%BSA in PBS)	10 (191)	5 (84)	50.0 (44.0)
4区 1.8MIフレンジリコール(20%CS in PBS)	13 (208)	6 (97)	46.2 (46.6)
合計	35 (611)	15 (296)	42.9 (48.4)

移植試験においても、耐凍剤に糖類を添加することにより胚への凍結融解時のダメージを緩和することが可能であると考えられ、試験1での糖添加した方が hatch 率が高い傾向にあったことを裏付ける結果となった。また最近では、糖を添加することにより胚の発育段階に係らず受胎率が安定する報告³⁾がされている。

試験 3

試験3では、試験2において受胎率の最も高かった耐凍剤1.8MIフレンジリコール+0.1Mシュウケウスを基に、基礎溶液にBSAまたはCSを加えた場合では、どちらが受胎率が高く最適な凍結液であるか比較検討した。

表3 移植試験成績

試験区	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
1区 1.8MIフレンジリコール+0.1Mシュウケウス(20%CS in PBS)	10 (268)	3 (137)	30.0 (51.1)
2区 1.8MIフレンジリコール+0.1Mシュウケウス(0.4%BSA in PBS)	12 (250)	4 (132)	33.3 (52.8)
合計	22 (518)	7 (269)	31.8 (51.9)

本県及び全国成績において両区間に有意差は認められなかった結果、基礎溶液はCSまたはBSAのどちらを使用しても受胎率に大きな差は認められないが、製品の安定性を考えた場合、BSAの方が有効であると考えられた。

試験 4

試験 4 では、耐凍剤および基礎溶液を統一し、融解条件としてエアソーイング時間を 6 秒と 10 秒に設定し、どちらが受胎率が高いか比較検討した。

表4 移植試験成績

試験区	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
1区(6秒)	14 (252)	5 (127)	35.7 (50.4)
2区(10秒)	16 (260)	11 (138)	68.8 (53.1)
合計	30 (512)	16 (265)	31.8 (51.8)

本県の成績では 2 区(10 秒区)で受胎率が高い結果が得られた。また、全国の成績においても 2 区で若干高い結果となったが、有意差は認められなかった。その結果、エアソーイング時間は、従来通り 6 秒から 10 秒の間であれば受胎率に大きな影響を及ぼすことはないと考えられた。

今回試験 1 ~ 3 を通じて、耐凍剤に糖類を添加することで良好な成績が得られることが認められた。また、基礎溶液は、従来から使用されている子牛血清を品質の安定した製品である牛血清アルブミンに代替できる⁴⁾と考えられた。エアソーイング時間については従来どおり 6 ~ 10 秒の間であれば受胎率に殆ど影響しないことが判明した。

移植試験においては、全国平均で 50 %の受胎率を超えることができたのは共同試験の大きな成果であるが、問題点として同じ凍結溶液で平均レベル以上の技術者が移植を行ったにもかかわらず、県によって受胎率に大きなバラツキが認められた。また、本県では農家によっても受胎する農家と受胎しない農家が認められたことことから、移植技術などに加え環境や牛側の要因もあるのではないかと考えられた。牛側の要因として、とりわけ飼料給与と子宮内環境の関係⁵⁾によるところが大きいと言われている。

今後の結果として、牛側の要因と受胎率に関する報告は非常に少ないことから受胎率を高めるための飼養管理技術、受胎牛としての目安となる基準の確立が必要だと考えられた。

参 考 文 献

- 1) 農林水産省「牛受精卵実施状況」,平成 15 年度家畜受精卵移植に関する全国会議,資料 1 (2004)
- 2) 堂地 修,「ダイレクト法における受胎率向上」,シンポジウム 牛胚移植の新たな展開と受胎率向上 20-38(2003)
- 3) 吉羽宣明他,第103回日本畜産学会大会講演要旨107 (2004)
- 4) 福成和博ら,第 20 回東日本家畜受精卵移植技術研究大会講演要旨 36-37(2005)
- 5) 笹木教隆,「受胎率向上のための受胎牛の繁殖管理飼料給与からのアプローチ」肉牛ジャーナル 11 月号 26-32 (2003)