

1. 牛の体外受精に関する試験(2)

—体外受精胚の凍結保存—

酪農科 奥 透・山口雅之・藤山雅照
山下達夫

緒 言

牛の体外受精胚は、体内から回収した胚に比べ耐凍性に劣るとされ^{1, 2)}、種々の凍結方法¹⁻⁴⁾が試みられている。

著者らは体内回収胚に一般的に用いられている1.4Mグリセリンを耐凍剤として凍結し、3段階で耐凍剤を除去する方法で産子を得ているが⁵⁾、生存率は40%程度と低く、実用化レベルに至っていない。

また実用化の面からは野外で簡易に移植可能なワンステップ法あるいは無希釈法が望ましい。

平山ら⁶⁾はマウス胚を用いて無希釈法での凍結について報告しており、今回これらの方法について牛体外受精胚を用いて生存性を検討した。

材料及び方法

供試体外受精胚は既報⁵⁾により作出し、媒精日を0日として7日、8日及び9日目に発生した胚盤胞期胚を用いた。

凍結保護物質は1.4Mグリセリン(Gと略す)、1.4Mグリセリン液と0.2Mシュークロースの混液(G+Sと略す)、1.4Mグリセリンと0.2Mトレハロースの混液(G+Tと略す)、1.6Mプロピレングリコールと0.2Mシュークロースの混液(P+Sと略す)、1.6Mプロピレングリコールと0.2Mトレハロースの混液(P+Tと略す)を用いた。凍結基礎媒液はGで20%子牛血清添加m-PBSを、他は20%子牛血清添加TCM-199を用いた。

耐凍剤の添加法はGでは0.5M、0.9M、1.4Mグリセリンに各10分間保持した。G+S、G+Tでは1.4Mグリセリンに、P+S、P+Tでは1.6Mプロピレングリコールに10分間保持後それぞれの混液中に入れた。

胚は0.25mlのストローに最終の液とともに吸入した。なお耐凍剤添加中に完全に変性したものの以外は胚の選別は行わなかった。

凍結速度はG区で室温から-6℃まで約1℃/分で冷却し-6℃で植氷後、10分間保持し-6℃から-30℃まで0.3℃/分で冷却後、液体窒素中に浸漬した。G+S、G+T、P+S、P+Tでは-6℃に保持したプログラムフリーザーに室温から直接入れ、植氷後、-25℃まで0.3℃/分で冷却し、液体窒素中に浸漬した。

プログラムフリーザーはメタノールを冷媒とした横置き型のET1(富士平工業製)を用いた。

融解は各区すべて35℃の温水に直接ストローを投入して行った。Gでは融解直後に胚をストローから取り出し、0.3Mのシュークロースに10分間感作させた。G+S、G+T、P+S、P+Tではストローを融解後室温に5分間放置した後に胚を取り出した。取り出した全ての胚は、卵丘細胞の発育した発生培地に入れ39℃、5%CO₂下で48時間培養した。培地は5%子牛血清添加TCM199を用いた。

調査項目は透明帯破損胚数、生存胚数及び脱出中胚盤胞胚以上発育数とした。透明帯の損傷は大小にかかわらず破損のみられたものは破損胚とした。生存胚は24時間後に胞胚腔形成が明瞭な胚とした。

統計処理は χ^2 -検定により行った。

結果及び考察

合計で253個の凍結体外受精胚を供試した。表1から表5に各耐凍剤別の凍結胚の融解後の培養成績を示した。

G、G+S、G+Tでは透明帯破損率が7から9日齢の合計で20%前後であるのにたいして、P+S

で35.7%, P+Tで31.0%とプロピレングリコールを用いた区で高い傾向にあった。

生存率を胚の日齢別で見ると, 供試胚数の少ないG+Tと供試例のないP+Sを除く各区で7日齢が60%以上と高かった。また日齢がすすむに従い, 生存率は低下する傾向にあった。耐凍剤別生存率ではP+Tが各日齢ともに最も優れており, 特に7日齢では75%と高かった。

脱出中胚盤胞胚以上発育率も生存率と同様に日齢がすすむに従い, 低下する傾向にあり, 耐凍剤別でもP+Tが最も高かった。

表6には例数の多い8日齢胚を耐凍剤別に比較す

表1 グリセリンによる凍結胚培養成績 (%)

胚の日齢	供試胚数	透明帯の破損数	生存胚数	脱出中胚盤胞胚以上発育数
7日	15	3(20.0)	10(66.7)	5(33.3) ^a
8日	18	2(11.1)	9(50.0)	1(5.6)
9日	25	6(24.0)	9(36.0)	0(0) ^b
計	58	11(19.0)	28(48.3)	6(10.3)

a, b間 (P<0.05)

表2 グリセリン+シュエクロースによる凍結胚培養成績 (%)

胚の日齢	供試胚数	透明帯の破損数	生存胚数	脱出中胚盤胞胚以上発育数
7日	12	1(8.3)	8(66.7) ^a	5(41.7)
8日	36	9(25.0)	20(55.6)	5(13.9)
9日	5	1(20.0)	0(0) ^b	0(0)
計	53	11(20.8)	28(52.8)	6(11.3)

a, b間 (P<0.05)

表3 グリセリン+トレハロースによる凍結胚培養成績 (%)

胚の日齢	供試胚数	透明帯の破損数	生存胚数	脱出中胚盤胞胚以上発育数
7日	3	1(33.3)	1(33.3)	1(33.3)
8日	32	7(21.9)	13(40.6)	0(0) ^b
9日	21	3(14.3)	13(61.9)	5(23.8) ^a
計	56	11(19.6)	27(48.2)	6(10.7)

a, b間 (P<0.05)

るために掲げた。

また表7にはP+Tで凍結した7日から9日齢の胚を融解時に5秒間空气中にさらした場合の培養成績を示した。

表4 プロピレングリコール+シュエクロースによる凍結胚培養成績 (%)

胚の日齢	供試胚数	透明帯の破損数	生存胚数	脱出中胚盤胞胚以上発育数
7日	-	-	-	-
8日	14	5(35.7)	10(71.4)	2(14.3)
9日	14	5(35.7)	6(42.9)	4(28.6)
計	28	10(35.7)	16(57.1)	6(21.4)

表5 プロピレングリコール+トレハロースによる凍結胚培養成績 (%)

胚の日齢	供試胚数	透明帯の破損数	生存胚数	脱出中胚盤胞胚以上発育数
7日	12	7(58.3) ^a	9(75.0)	6(50.0)
8日	35	9(25.7) ^b	25(71.4)	15(42.9)
9日	11	2(18.2)	5(45.5)	2(18.2)
計	58	18(31.0)	39(67.2)	23(39.7)

a, b間 (P<0.05)

表6 8日胚での凍結方法による比較

方法	供試胚数	透明帯の破損率%	生存率%	脱出中胚盤胞胚以上発育率%
G	18	11.1	50.0	5.6 ^{b,c}
G+S	36	25.0	55.6	13.9 ^{b,c}
G+T	32	21.9	40.6 ^b	0 ^b
P+S	14	35.7	71.4	14.3
P+T	35	29.0	71.4 ^a	42.9 ^a

a, b, c間 (P<0.05)

表7 融解時に空气中に5秒間曝した培養成績 (プロピレングリコール+トレハロースで凍結) (%)

供試胚数	透明帯破損数	生存胚数	脱出中胚盤胞胚以上発育数
14	1(7.1)	10(71.4)	4(28.6)

今回行った5方法ではプロピレングリコールとトレハロースの組合せが最も生存性、脱出中胚盤胞胚以上への発育率が高かった。

透明帯の損傷については急激な温度変化によるものとされ、融解時に空気中に数秒間さらすことにより改善されるとの報告⁷⁻⁹⁾がなされている。今回の試験でも直接35℃の温湯中に入れた場合は高い損傷率であったが、5秒間空気中にさらした成績では透明帯破損率は低かった。プロピレングリコールを用いた区が、透明帯の損傷率が高かったため、見かけ上脱出中胚盤胞胚以上への発育率が高かったとも考えられるのでさらに検討が必要である。

今回の生存率については8日齢胚で最も高いP+S、P+Tの区で71%であった。立川ら¹⁰⁾はプロピレングリコールを用いて凍結後シュークロースで希釈し、74%の生存率を報告している。また桑山ら¹¹⁾はグリセリン、プロピレングリコール、エチレングリコールで凍結後シュークロースで希釈し各区とも80%前後の生存率を得ており、ランクの高い胚を用いることが重要としている。今回の方法では胚の選択を行っていないので、良質の胚を用いることにより生存性の向上が期待できるものと思われる。

なお移植試験については現在実施中である。

要 約

7～9日齢の牛体外受精胚を耐凍剤として①グリセリン②グリセリン+シュークロース③グリセリン+トレハロース④プロピレングリコール+シュークロース⑤プロピレングリコール+トレハロースを用いて凍結し、融解後の生存性を調べ次の結果を得た。

1. 胚の日齢が進むに従い、生存率は低下した。
2. 8日齢胚の比較ではプロピレングリコールを用いた区で生存率は高かった(71.4%)。
3. 8日齢胚の比較では脱出中胚盤胞胚以上発育率はプロピレングリコールとトレハロースの組合せが最も高かった(42.9%)。

参 考 文 献

- 1) 上田修二, 大崎順子, 山下滋貴, 田口清美, 福岡農総試研報, C-9, 19-24 (1989)
- 2) 舟橋弘晃, 武富敏郎, 板倉はつえ, 武田哲夫,

鬼原辰雄, 全農飼料畜産研究所試験研究報告, 17, 381-389 (1989)

- 3) 梶原豊, 米谷尚子, 小山恒太郎, 菱山和洋, 小柴雄治, 小林里美, 白岩憲司, 安積弥一郎, 第74回家畜繁殖学会講演要旨, 29 (1988)
- 4) 西貝正彦, 石田隆志, 酒井豊, 笹木教隆, 鈴木達行, 畜産の研究, 42, 425-426 (1988)
- 5) 奥透, 山口雅之, 大串正明, 野口弥市, 長崎畜試研究報告, 1, 1-3 (1991)
- 6) 平山愛和, 後藤和文, 徳丸元幸, 小川清彦, 第40回西畜学会講演要旨, 27 (1989)
- 7) 後藤裕司, 岡田真人, 中村淳子, 下平乙夫, 東日本家畜受精卵移植技術研究会講演要旨, 73(1991)
- 8) Takeda, T., W. B. Henderson, J. F. Hasler, THERIOGENOLOGY, 27, Abs.(1987)
- 9) Geary, R. T., J. A. Weber, G. L. Wood, THERIOGENOLOGY, 31, 973-978(1989)
- 10) 立川進, 音井威重, 近藤正治, 家畜繁殖技術研究会誌, 13, 131-138 (1991)
- 11) 桑山正成, 浜野晴三, 家畜繁殖技術研究会誌13, 165-171 (1991)