

1. エチレングリコールを用いた凍結牛胚の直接移植

酪農科 藤山雅照・山本和利・奥 透

(*現畜産課)

緒 言

牛胚の凍結は耐凍剤として主にグリセリンが使われてきた。

グリセリンの場合、移植の際にグリセリン除去が不可欠で、3～6段階で段階的に除去する方法が多く用いられている。これらは実験室内操作と除去作業に時間を要するなどからグリセリン除去の簡易化が求められている。その一方法としてストローから牛胚を取り出すことなくストロー内でグリセリンを除去する方法（ワンステップ法）が報告^{1) 2) 3)}され各地で実証試験が行われているが、凍結操作や融解後のストロー操作の煩雑さにより全国的に普及まではいたっていない。

本県では移植する場所が遠隔地に散在しているため、早くからワンステップ法を取り入れ技術の習得を図った結果50%を越える受胎率が確立され定着している。しかし更に簡易な、凍結精液と同じように融解後何の操作も必要としない直接移植出来る方法の開発が強く求められている。

直接移植方法については鈴木⁵⁾らがプロピレングリコールについて、また堂地⁶⁾らはエチレングリコールについて報告している。

今回、堂地らの方法を参考に実証試験を実施し、その有効性を検討した。

試験方法

1. 受精卵

当场黒毛和種供卵牛にF S Hを用いた常法により過剰排卵処理を行い、発情後7日目に採卵した。

牛胚は凍結可能なコンパクトモルラからブラストのA、Bランク胚を用いた。

2. 凍 結

1) 試験区の耐凍剤は20% C S 加m P B Sを基礎

液として、10%エチレングリコールを添加したものを、図1、図2のとおり室温で15分間放置後、-7℃に設定したプログラムフリーザーのアルコール液に投入、2分後に植氷し8分間保持した。その後-0.3℃/分で-30℃迄冷却した。その後10分間保持後液体窒素に投入した。

2) 対照区は当场で従来行って来たワンステップ法⁷⁾で行った。

3. 融解及び移植

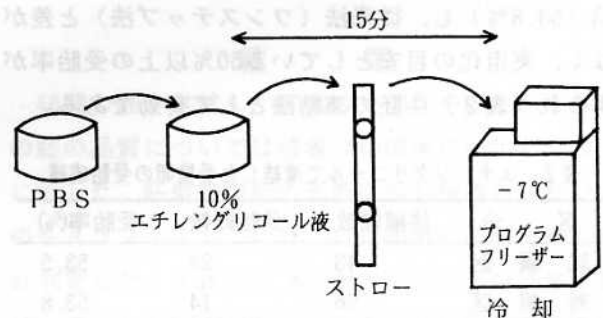
直接移植の融解は凍結胚保管器からストローを取り出し、空气中に5秒間保持した後、30℃の温湯の中に投入し融解後何の処理をすることなく移植器に装着し移植した。

ワンステップ法は、上記と同様に融解した後、グリセリン液とシュークロース液の間の気泡の所を指で弾き、牛胚がシュークロース層に落ちたのを確認して、10分間温湯内に静置した後移植を行った。

4. 培養試験

直接法で凍結した牛胚を融解後20% C S 加m P B S 中で5%炭酸ガス、95%空気、38.5℃条件下で培養し、生存性の有無と、その後の発育状況を観察した。

図1. 直接法における耐凍剤添加と凍結



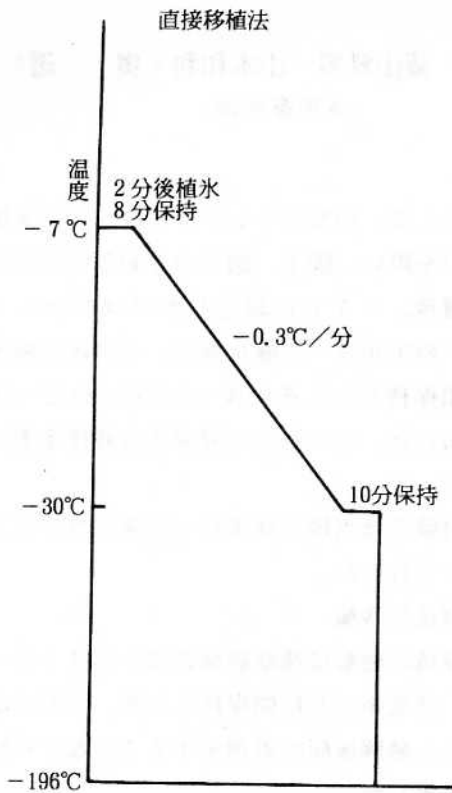
要 約

1. 10%エチレングリコールを耐凍剤として凍結した牛胚が融解後培養の結果生存性が確認された。
2. 融解後耐凍剤を除去することなく直接移植を行った結果53.5%の受胎率が得られ野外での利用が可能と考えられる。

参 考 文 献

- 1) 鈴木達行 下平乙夫 藤山雅照・家畜繁殖雑誌 29:162-163 1983
- 2) 鈴木達行 下平乙夫 藤山雅照・家畜繁殖雑誌 30:211-215 1984
- 3) 鈴木達行 下平乙夫・家畜繁殖雑誌 31:28-29 1985
- 4) 笠井浩司・ETニュースレター 8:65-72 1990
- 5) Suzuki T, Yamamoto M, Ooe M, Sakata A, Matuoka M, Nishikata Y,・Theriogenology 34:1051-1057 1990
- 6) 堂地修 今井敬 高倉宏輔・第84回日本畜産学会講演要旨 1991
- 7) 奥透 藤山雅照 吉田豊昭・長崎畜試試験調査成績 昭59:16-19 1984

図2. 凍結速度



結果及び考察

培養試験では7例中7例の生存が確認され、うち6例で脱殻した胚盤胞迄发育した。(表1)

表1. エチレングリコールで凍結した受精卵の培養成績

ステージ	供試頭数	生存卵数(%)	脱殻卵数(%)
後期桑実胚	7	7 (100.0)	6 (85.7)

移植成績では試験区43頭移植した結果23頭が受胎(53.5%)し、対照区は26頭移植した結果14頭が受胎(53.8%)し、従来法(ワンステップ法)と差がなく、実用化の目安としている50%以上の受胎率が得られ(表2)牛胚の凍結法として有効である。

表2. エチレングリコールで凍結した受精卵の受胎成績

区 分	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
試 験 区	43	23	53.5
対 照 区	26	14	53.8

注) 対照区はグリセリンによるワンステップ法によるもの