

# 牛受精卵の凍結保存技術

緒方喜代子\*・後藤孝一\*・平山忠一\*・中嶋達彦\*

木場俊太郎\*・山下秀憲\*\*・大倉昭信\*\*・高橋繁一郎\*\*

坂本徹郎\*\*・佐藤敬明\*\*・松岡清孝\*\*\*・荒木武紀\*\*\*\*

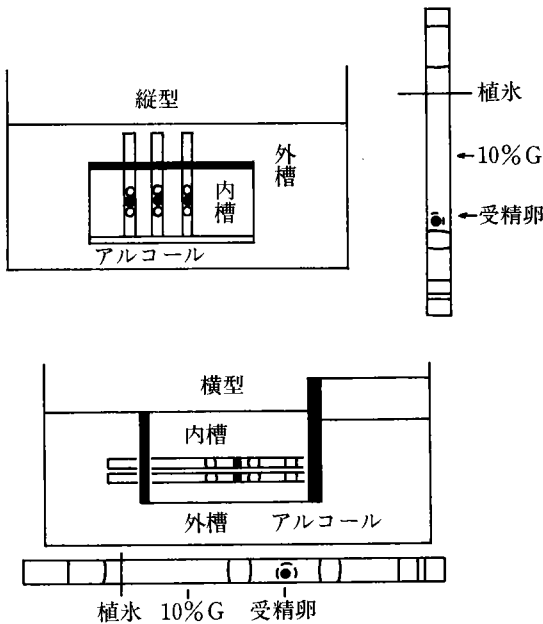
## 緒 言

牛の受精卵移植技術を広く普及・実用化させるためには凍結保存技術の確立が不可欠である。全国でも種々の方法が行われているが、耐凍剤の添加法、融解後の除去操作が複雑で、民間のETセンターで利用できる一連の技術の確立には至っていない。この技術の確立を図るため、昭和61年度より数種の凍結融解法を検討してきた<sup>1,2,3)</sup>。その中で操作性、融解後の生存性、受胎率の面

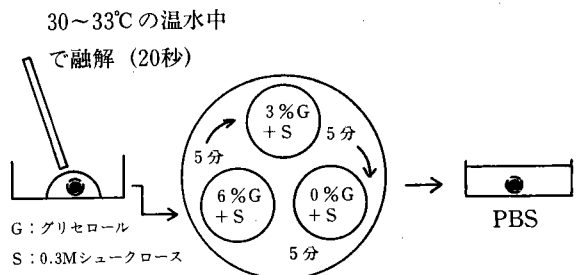
から普及、実用化上4ステップ法が有効と考えられた<sup>4)</sup>。前報<sup>5)</sup>に続き、本研究ではより良質な受精卵を供給するため、凍結時のストロー設置の方法が受精卵の品質に及ぼす影響を及ぼすかを検討した。また、民間のETセンター2カ所で4ステップ法で凍結融解および移植を一貫して行い、本方法のフィールドでの受胎率を検討し、実用性について考察した。

## 材料および方法

供試卵は過剰排卵処置を行い、人工受精後7~8日目に回収した桑実期から胚盤胞期の受精卵を使用した。耐凍剤の添加は5%、10%の2段階で行った。凍結はアルコールを冷媒とした同一機種で、ストロー設置の方法を縦置きおよび横置きの2タイプにして、他は常法に従って凍結した(第1図)。融解は30~33°Cの微温湯中で20秒間行った。耐凍剤の除去は修正PBSを基本培液とし、0.3Mシュクロスを添加した6%、3%、0%グリセリンを含む各液に5分間、修正PBSの順に4段階で行った(第2図)。



第1図 受精卵の凍結時のストローへの充填及び凍結機への設置



第2図 耐凍剤の除去

\*畜産研究所・\*\*城南、城北、阿蘇、中央、天草家畜保健衛生所、\*\*\*熊本県畜産開発公社、\*\*\*\*開業

実験1：凍結時にストローを縦置きおよび横置きに設置して、融解後の受精卵のランクの変化を調べた。

実験2：熊本県農業研究センター（以下センター）と民間のETセンター2カ所で各自に4ステップ法による受精卵の凍結融解および移植を行い、フィールドでの操作性と受胎率を調べた。

## 結 果

実験1：ストロー設置方法別の受精卵の凍結融解後のランクの変化を第1表に示した。

縦置きで凍結した場合、Aランクの受精卵が融解後もAランクでほとんど損傷を受けていなかった割合は33.6%、1ランク以上損傷を受けB、C、Dランクになった割合はそれぞれ42.2%、14.1%、10.2%であり、

半数以上にランクの低下がみられた。一方横置きの凍結では、Aランクの受精卵が融解後もAランクであった割合は70.3%、融解後B、C、Dになった割合はそれぞれ19.5%、5.9%、4.2%であり、融解後の受精卵の質的低下が縦置きで凍結した場合よりも少なかった（ $P < 0.05$ ）。

実験2：民間のETセンターとセンターが4ステップ法により受精卵の凍結融解を行い、融解後のランクがB以上のものについて移植を行って得た成績では、縦置き、横置きとも受胎率は48.5%、53.5%で両者間で大きな差はみられなかった。両者の平均受胎率は51.7%となり、これまでに検討してきた方法<sup>1,2,3)</sup>の中でも高率であり、センターおよび民間のETセンター別の移植成績でも受胎率に差はみられず、本研究で用いた4ステップ法は有望な方法の一つと思われる。（第2、3表）。

第1表 凍結時のストロー設置法が受精卵の融解後の品質に及ぼす影響

凍結前のランク		融解後のランク				計
		A*	B	C	D	
縦置き	A	43(33.6%) <sup>a</sup>	54(42.2%)	18(14.1%)	13(10.2%)	128
	B	—	10(52.6%)	7(36.8%)	2(10.5%)	19
	C	—	—	2(33.3%)	4(66.7%)	6
横置き	A	83(70.3%) <sup>b</sup>	23(19.5%)	7(5.9%)	5(4.2%)	118
	B	—	17(65.4%)	7(26.9%)	2(7.7%)	26
	C	—	—	3(37.5%)	5(62.5%)	8

\*  $P < 0.05$  : a VS b

第2表 凍結時のストロー設置法別移植成績

ストロー設置の方法	移植頭数	受胎頭数	不受胎頭数	受胎率(%)
縦置き	134	65	69	48.5
横置き	226	121	105	53.5
計	360	186	174	51.7

第3表 センター及び民間のETセンターでの4ステップ法による移植成績

実施機関	移植頭数	受胎頭数	不受胎頭数	受胎率(%)
センター	118	60	58	50.8
民間ETセンター	242	126	116	52.1

## 考 察

横置きにストローを設置した場合、植水の過程が観察できるため、確実な凍結が行えること、受精卵のストロー中での移動が少なく縦置きによる凍結でしばしばみうけられた空気層との接触、あるいはメディウム層との接触がなくなり、常に安定した条件で凍結が行えるため、受精卵の質的低下が減少したと推察された。また縦置きで凍結する場合、受精卵が盛り上がった空気層とメディウム層の間にはさまれ、凍結時に損傷を受けるとの報告<sup>4)</sup>もあり、このことが横置きにすることによって防止されたことも一因だと推察される。

また、移植試験では受胎率は縦置き、横置きで凍結した受精卵の間で差を示さなかったが、これは融解後AからBランクの受精のみを選択して移植に供したためと考えられる。しかし、受精卵の有効利用を考慮すると質的低下が少なく、そのぶん廃棄率が低い横置きによる凍結法が優れているといえる。

熊本県下では12カ所の民間の機関で受精卵移植の取り組みがなされている。当初は、数カ所を除きセンターで凍結、融解を行っていたが、実施回数が多くなるにつれて各機関で独自に凍結融解を行う必要が生じてきた。センターでは、昭和61年から数種類の凍結融解方法について民間での実用性を検討してきた。その中で、4ステップ法には融解後の操作性がストローから受精卵を一度取り出すためやや複雑であるが、耐凍剤を完全に除去しランクを判定後移植できるという確実性がある。本法は操作性においても民間のETセンターが業務の中で十分行ってゆける方法であり、フィールドでの実用性も高いものと示唆された。

## 摘 要

凍結時にストローを縦置きおよび横置きに設置して4ステップ法で融解したとき、それらが受精卵の品質にいかなる影響を及ぼすかを検討した。さらに民間のETセンターで4ステップ法による凍結、融解、移植を行い、フィールドでの一連の操作性と受胎率についても検討した。

ストロー設置を凍結時に縦置きよりも横置きに設置した方で融解後の受精卵の品質の低下が少なかった。また、民間のETセンターでのデータを含めた4ステップ法による受胎率は51.7%と高い値が得られた。

## 引用文献

- 1) 緒方喜代子、中嶋達彦、後藤孝一、木場俊太郎  
熊本県畜産試験場試験調査成績書、7～9 (1986)
- 2) 緒方喜代子、平山忠一、後藤孝一、木場俊太郎  
熊本県畜産試験場試験調査成績書、7～9 (1987)
- 3) 緒方喜代子、平山忠一、後藤孝一、木場俊太郎  
熊本県畜産試験場試験調査成績書、7～11 (1988)
- 4) Pikett, B. W., T. Takeda, G. D. Frrand, F. B. Kuzan, Seidel, Jr, G. E. and R. P. Elsdon, Techniques for Freezing Mammariann Embryos, 90～91 (1985)
- 5) 緒方喜代子、後藤孝一、平山忠一、木場俊太郎、山下秀憲、中嶋達彦、高橋繁一郎、守永正秀、佐藤敬明  
西日本畜産学会報 31、51～53 (1988)