

牛凍結受精卵の一段階ストロー法による移植成績

奥 透・藤山雅照・吉田豊昭 (長崎県畜産試験場)

Toru OKU, Masateru FUJIYAMA and Toyoaki YOSHIDA : Transfer of Bovine Frozen Embryos by One Step Straw Method

牛受精卵への耐凍剤の添加および除去は、受精卵を耐凍剤の濃度の異なる3～5種の溶液に段階的に移すことにより実施されてきた。

最近、福島種牧で開発された一段階ストロー法は、ストロー内で耐凍剤を除去し、受卵牛に直接移植することができる最も実用化に近い方法であろう。

今回、耐凍剤の一段階添加および、一段階ストロー法による牛受精卵の移植とその受胎性について検討した。

1. 試験方法

供卵牛として黒毛和種2頭、ホルスタイン種2頭を用い、過剰排卵誘起は、FSH 28mgとLH 5.6mgを漸減投与して行った。FSH投与3日目にPGF₂α 45mgを3回に分けて投与し、発情の現れた当日と翌日に2～3回人工授精した。卵の回収は、発情後7日目に修正リン酸緩衝液を用い、非手術的に行った。回収した受精卵への耐凍剤の添加は、受精卵を順次20%牛胎児血清を含む修正リン酸緩衝液にグリセリンを3%、6%添加したものに10分間、10%添加したもの(B液)に30分間保持して行った。また一部は直接B液に30分間保持した。受精卵のストローへの吸入には0.25mlストローを用い、20%牛胎児血清を含む0.3Mシュウクロース液(A)、空気層、受精卵を含むグリセリン液(B)、空気層、0.3Mシュウクロース液(C)の順に吸入した。凍結方法は、プログラムフリーザー(R 204)を用い、室温から-7℃まで-1℃/分で低下させ、-7℃で植氷させ10分間保持した後、-30℃まで-0.3℃/分、-30℃で10分間保持し、液体窒素中に投入し、保存した。融解は35℃の温湯中で行い、耐凍剤の除去は、ストローを振り、A、B、Cの各層を混合後、Cを上にして35℃の温湯中に10分間保持して行った。移植は、ストローを融解後、そのまま、あるいは、一たんストローから取り出し、リン酸緩衝液に移し、カスーガンにより頸管経路で行った。

2. 結果および考察

1) 採卵個数は56個のうち43個を凍結した。40個については、耐凍剤を三段階添加し、3個について一段階添加した。

2) 1～135日間凍結保存した受精卵を受卵牛21頭に1個ずつ移植した。そのうち8頭が受胎し(受胎率38.1%)、うち1頭は耐凍剤一段階添加であった。

3) ストローを融解後、直接移植した8頭中3頭が受胎した(受胎率37.5%)。一たんPBSに移して移植した13頭中5頭が受胎した(受胎率38.5%)。

今回行った一段階ストロー法の移植成績は、受胎率38.

1%で、昨年当場で行った従来の方法の28.8%に比べすぐれた成績であった。また直接移植したものと、一たんPBSに移して移植したものの受胎率の差はみられなかった。一たんPBSに移した受精卵のうち30分以内に移植されたものが8頭中4頭受胎したのに比べ、それ以上時間を経過したものは、5頭中1頭しか受胎しなかったことから、融解後なるべく早く移植した方が好ましいと思われる。また耐凍剤の除去の際、ストローのカットする部分に受精卵の残っていることがしばしばみられ、顕微鏡等により受精卵の位置を確認するか、吸入する位置を検討する必要がある。また、1頭ではあるが、耐凍剤一段階添加により受胎例が得られたことから、今後凍結手順の簡易化の面でさらに検討が必要である。

第1表 移植成績

受卵牛 No.	同期化	日 差	胚 の ステージ	保存期間	妊 否	備 考
1	N	0	B	1日	+	直接
2	N	0	B	3	-	
3	N	0	EB	16	-	直接
4*	N	0	B	17	+	
5	PG	0	B	17	-	
6	PG	0	B	17	-	
7	PG	-1	B	17	-	
8	PG	0	B	24	+	直接
9	PG	0	B	24	-	直接
10	N	0	LM	33	-	
11	N	0	B	35	+	直接
12	N	0	B	35	-	直接
13	N	0	EB	40	+	
14	N	0	B	42	+	
15	N	0	B	84	+	
16	N	0	B	90	-	直接
17	N	-1	B	90	-	直接
18	N	0	EB	94	-	
19	N	-1	EB	118	-	
20	N	0	B	133	-	
21	N	0	B	135	+	

注) LM・後期桑実胚 EB・初期胚盤胞 B・胚盤胞

* 耐凍剤一段階添加

第2表 移植成績

移植方法	融解個数	移植頭数	受胎頭数	受胎率
直接移植	8個	8頭	3頭	37.5%
PBSで移植	18	13	5	38.5