

エチレングリコールとトレハロースを用いて凍結した牛胚の直接移植

須崎哲也・永田建一¹⁾・溝辺敬美・赤塚裕人

(宮崎県畜産試験場¹⁾・宮崎県農政水産部)

Tetuya SUZAKI, Kenichi NAGATA, Takami MIZOBE and Hiroto AKATUKA :
Direct Transfer of Frozen Cow Embryos in Ethylene Glycol-Trehalose

近年、牛における胚移植の実用化に伴い、より取り扱いが簡易で受胎率の安定した移植方法の確立が望まれている。直接移植法は従来のステップ・ワイズ法に比べ、融解時に段階的に凍結保護物質の除去などの煩雑な操作を必要としないため、より実用的な方法である。エチレングリコール (以下 EG) を凍結保護物質として用いた牛胚の直接移植については、堂地¹⁾によりその有効性が報告されている。しかし、フィールドでの普及を考えると、より有効な凍結保護物質の検討が必要である。そこで、本研究では、当场において体外受精胚の发育試験で良好な成績の得られた、EG と低温下において細胞膜の保護作用があるトレハロース (以下 Tr) を組み合わせた方法で牛胚を凍結し、融解後直接移植してその受胎成績について検討した。

1. 材料および方法

1) 体外受精胚の培養試験：供試胚は食肉センターで畜された黒毛和種卵巣から得られた卵子を用い、媒精日を0日として7, 8日目のA~A'ランクの胚盤胞を用いた。凍結法は20%CS加修正TCM-199を基本液としたA法1.5MEG+0.1MTr, B法1.5MEG+0.2MTr, C法1.5MEG, D法1.5MEG+0.3MTrとした。融解・培養は30-33℃の温湯中で融解した胚を38.5℃の10%FCS加TCM199に直接投入し、同液で作成した100μlドロップに移しかえ、2%CO₂, 98%空気, 38.5℃の条件下で卵丘細胞層と72時間共培養した。

2) 体内受精胚の培養試験：供試胚は当场繁殖の黒毛和種に過剰排卵処理, AI後7日目に回収したB~B'ランクの後期桑実胚から胚盤胞を用いた。凍結法は体外受精胚の培養試験と同様A法1.5MEG+0.1MTr, B法1.5MEG+0.2MTr, C法1.5MEGとし、融解培養も同様な方法で行った。

3) 体内受精胚の移植試験：供試胚は当场繁殖の黒毛和種に過剰排卵処理, AI後7日目に回収したA~A'ランクの後期桑実胚から胚盤胞を用いた。凍結法は体内受精胚の培養試験と同様である。受卵牛はホルスタイン種66頭, 交雑種6頭, 黒毛和種22頭の計94頭で黄体状況はfair以上のものに移植した。融解・移植は液体窒素からストローを取り出し空気中で6秒間保持し, 30~33℃の温湯中に30秒間浸漬融解後, 直ちに移植器にセットして黄体側の子宮角に1胚移植した。なお, 移植については宮崎・都城・延岡の3家畜保健衛生所と人工授精師で実施した。

2. 結果および考察

1) 体外受精胚の培養試験：第1表には体外受精胚の融解・培養後の生存性を示した。24時間後, 48時間後の生存率ではA, B, C法はD法より有意に高かった (P<0.05)。また72時間後の脱出胚ではA, B, C法はD法より高い傾向が見られた。

2) 体内受精胚の培養試験：第2表には体内受精胚の融解・培養後の生存性を示した。24時間後の生存率では変わらないが, 48時間後ではA, BはC法より低い傾向が見られた。また72時間後の脱出胚ではB法はC法と同様な成績であるが, A法はC法より低い傾向が見られた。

3) 体内受精胚の移植試験：第3表には異なる凍結法による受胎成績を示した。受胎率はA, B, Cそれぞれ39.4%, 58.8%, 40.7%でB法がA, C法より高い傾向が見られた。

これらの結果から、黒毛和種の胚の直接移植において、1.5MEG+0.2MTrで凍結することは有効であることが示された。

引用文献

- 1) 堂地 修・今井 敬・高倉宏輔 (1991) 第84回日本畜産学会大会発表要旨, p.61.

第1表 体外受精胚の融解・培養後の生存性

試験区	供試胚	生存胚数 (%)		
		24時間後	48時間後	脱出胚
A 法	48	45(93.8)*	40(83.3)*	34(70.8)
B 法	44	41(93.2)*	38(86.4)*	32(72.7)
C 法	38	35(92.1)*	33(86.8)*	25(65.8)
D 法	40	30(75.0) ^b	25(62.5) ^a	19(47.5)

注) *異符号間に有意差あり (p<0.05)

第2表 体内受精胚の融解・培養後の生存性

試験区	供試胚	生存胚数 (%)		
		24時間後	48時間後	脱出胚
A 法	13	11(84.6)	9(69.2)	4(30.8)
B 法	15	12(80.0)	9(60.0)	6(40.0)
C 法	10	8(80.0)	8(80.0)	4(40.0)

第3表 異なる凍結法による受胎成績

試験区	移植頭数	受胎頭数	受胎率 (%)
A 法	33	13	39.4
B 法	34	20	58.8
C 法	27	11	40.7