

ガラス化保存した豚胚の移植成績

塚原敬典・家入誠二・酒見武典 (熊本県農業研究センター)

Keisuke TSUKAHARA, Seiji IEIRI and Takenori SAKAMI :
Transfer of Vitrified Porcine Embryos

豚胚は低温に対する感受性が非常に高いため、凍結胚の移植については困難を極めているのが現状である。ところが近年、愛知県総合農業試験場において、世界で初めてガラス化法により凍結された胚から産子を得ることに成功した²⁾。当所においても昨年度よりガラス化法による凍結移植試験を実施したところ、愛知県、群馬県に続き3例目の受胎例を得ることに成功したのでその概要について報告する。

1. 材料および方法

1) 供試豚

当場繁殖のランドレース種の生後6～8カ月齢未経産豚および1産後の経産豚を供した。

2) 子宮灌流液、培養 (移植) 液

子宮灌流液は HEPES-CZB を用い、培養、移植には HEPES-CZB に牛胎児血清を 10% 添加した。

3) 凍結溶液および耐凍剤除去液

いずれも基礎液として 0.5% BSA 加 PBS (mPBS) を用いる。耐凍剤 (CPA) は 7% にポリビニルピロリドン (PVP) を mPBS に溶解した液でエチレングリコール (EG) を 8mol に調整したものである。また、前処理用溶液として 2molEG 液を用意する。耐凍剤除去液としては 1.7mol ガラクトース液、1mol および 0.5molEG 液を用意する。

4) 発情誘起および過排卵処置

経産豚については離乳時に eCG1,500 単位を投与し 72 時間後に hCG750 単位を投与した。未経産豚については投与量を eCG1,000 単位、hCG500 単位とした。

5) 採胚豚の交配

原則的に hCG 投与後 30 時間、48 時間の 2 回行った。

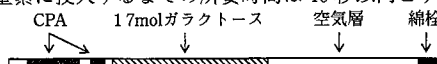
6) 採胚および移植

hCG 投与の翌日、雄許容開始日を第 0 日とし、第 6 日目に外科的に採胚した。移植は第 5 日目にて同じく外科的に行った。外科手術の詳細は豚の胚移植マニュアル¹⁾ に準じて行った。

7) 凍結保存

採取した胚は培養液中で数回洗浄後 2molEG 液で 5 分間平衡する。2molEG 液の微小ドロップに移した胚に、細く加工したパストールピペットで CPA をかけながら吸収し、第 1 図のように液を吸収したストロー内の CPA に素早く移す。次に空気層を挟んで 1.7mol ガラクトース液を吸いシーラーで封印する。封印した側を下にしてガラクトース層を液体窒素中に浸ける。次に CPA 液部分までをさっと浸し、そしてゆっくりとストロー内の

CPA 全体を投入する。ピペットで胚を吸引してから液体窒素に投入するまでの所要時間は 40 秒以内とする。



第 1 図 胚導入前のストローの準備

8) 融解および耐凍剤除去

ストローを液体窒素から取り出し、空气中に 5 秒間保持してから 25℃ の水槽に 10 秒間浸して融解する。封印した側を持ちストローを強く振って中の液を混和後、胚をディッシュに排出する。その後 1molEG 液に 2 分間、0.5molEG 液に 2 分間静置し、培養液で 4～5 回洗浄してから 38℃ で移植まで保持する。

2. 結果および考察

拡張胚盤胞期胚を中心に 1 頭平均 23.7 個を 6 頭に移植し、うち 1 頭が受胎した。不受胎の 5 頭についても、うち 2 頭が 1 サイクル以上発情が再帰しなかった (第 1 表)。受胎した 1 頭は分娩予定日より 11 日遅れ分娩誘起処置により雌 1 頭が分娩したが死産であった。死産子は体重 1.45kg で外見的に異常は認められなかった。豚は本来胎子数が 1 頭では妊娠を維持しにくいといわれているため、今回の例では妊娠中期頃までは複数の胎子が着床していた可能性も考えられる。また、1 サイクル以上発情が再帰しなかったものが 3 頭いるが、早期に流産等も考えられるため、今後は超音波診断装置等による早期妊娠診断を行う必要がある。また、凍結技術を再度見直し技術の向上を図るとともに、耐凍剤の組成の違いにより胚の生存性を比較するなど、基礎的なデータを蓄積し凍結方法を検討する。

引用文献

- 1) 亀山賢次, 柏崎直巳, 小島敏之, 鳥生厚夫. 豚の胚移植マニュアル, 豚新技術開発研究会編, 1996
- 2) KOBAYASHI S, TAKEI M, KANO M, TOMITA M, LEIBO S P, CRYOBIOLOGY36 : 20-31, 1998

第 1 表 移植成績

個体番号	産時	移植胚数	黄体数	移植胚ステージ		妊否	産子数	発情再帰日数 ^{a)}	
				B	Ex H				
260	1産	21	13	21		否	—	59	
220	1産	24	32	23	1	否	—	41	
1249	未経産	24	6	1	19	4	否	—	21
1145	未経産	21	9	2	9	10	妊	1 ^{b)}	—
479	1産	22	17	9	12	否	—	22	
1194	未経産	30	7	30		否	—	不明	
合計		141	84	3	111	27			

注) a) 移植後の日数 (胚日齢含む) b) 死産