

ガラス化法による豚胚の凍結・融解技術の検討

崎村武司・家入誠二・塚原敬典¹⁾

(熊本県農業研究センター畜産研究所・¹⁾熊本県天草家畜保健衛生所)

Takeshi SAKIMURA, Seiji IEIRI and Keisuke TSUKAHARA :

Study of Cryopreservation and Liquefaction Technique for Porcine Embryos by Vitrification

豚胚の凍結技術は、優良遺伝子の保存等に有用な手段であり、様々な目的に利用される可能性を含んでいる。しかし豚胚は凍結保存が難しく、また採胚、移植を外科手術に頼らざるを得ない等の問題が胚移植技術実用化への障害となっていた。近年、省力的かつ凍結による胚の損傷を軽減することが期待されるガラス化法による凍結胚移植の成功が報告され、豚胚移植の利用価値を高める技術として期待されている。

そこで、ガラス化法を用いた胚の凍結、移植技術の確立を図るため、培養液、耐凍剤の違いによる胚の発育性、生存性の比較試験を行った。

1. 材料および方法

1) 供試豚：ランドレース種6～8カ月齢未経産豚14頭および1産後の経産豚19頭の計33頭

2) 発情の同期化、交配および採胚：

同期化：経産豚は離乳時に eCG1,500単位、72時間後に hCG750単位を、未経産豚は eCG1,000単位、hCG500単位投与

交配：hCG 投与後30時間、48時間の2回交配

採胚：hCG 投与の翌日、雄許容開始日を第0日とし、第6日に外科的に採胚

3) 凍結保存方法：ガラス化凍結保存

4) 培養液の違いによる新鮮胚の発育性試験：

供試胚：初期～終期拡張胚盤胞

培養液は mCZB と Medium199を用い38℃、5%CO₂、10%O₂環境下で48時間観察

5) 胚のランク、耐凍剤の違いによる生存性試験：

供試胚凍結前の直径 ≤199μm、200～229μm、230μm ≤の拡張胚盤胞および脱出胚盤胞 (4ランクに分類)

耐凍剤は 6 mol エチレングリコール |EG (6 molEG + 1 molGalactose + 7 %PVP)| と 8 molEG (8 molEG + 7 % PVP) を用い供試胚をガラス化凍結。融解後 mCZB にて38℃、5%CO₂、10%O₂環境下で48時間観察

2. 結果および考察

1) 採胚成績

未経産豚14頭、経産豚19頭の計33頭から採胚し、958個の胚を回収した。黄体数に対する回収率は87%であった。回収胚のステージは拡張胚盤胞期胚が最も多く370個、38.6%、次いで脱出胚盤胞期胚353個、36.8%、胚盤胞期胚が142個、14.8%であった (第1表)。回収した拡張胚盤胞期胚の直径は200～229μm のものが196個と最も多く全体の53.0%を占めた (第2表)。

2) 培養液の違いによる新鮮胚の発育性試験

mCZB、Medium199両培養液ともすべての胚が48時間以内に透明帯を脱出し、生存率100%であった (第3表)。

今後供試胚数を増やし、もっと早いステージからの長時間にわたる培養、凍結胚の融解後の培養等についても

第1表 採胚成績 (単位：個、%)

	採胚頭数	黄体数	採胚数	胚ステージ			
				BL	EX	H	その他
合計	33	1102	958	142(14.8)	370(38.6)	353(36.8)	93(9.8)
平均	—	33.4	29.0	4.3	11.2	10.7	2.8

注) BL：胚盤胞、Ex：拡張胚盤胞、H：脱出胚盤胞

第2表 拡張胚盤胞期胚の直径ランク別採胚成績 (単位：個)

直径 (μm)	170～199	200～229	230≤
採胚数 ^{*1}	97 (26.2) ^{*2}	196 (53.0)	77 (20.8)

注) ^{*1}: 拡張胚盤胞採胚数合計370個 ^{*2}: () 内は%

検討する必要があるが、短時間の保持や培養においては市販されている Medium199を用いれば、実験手法の省力化につながるものと思われた。

第3表 培養液の違いによる新鮮胚の生存成績

培養液	供試胚数 (個)	生存率 (%)
mCZB	39	100
Medium199	26	100

3) 胚のランク、耐凍剤の違いによる生存性試験

すべてのランクで耐凍剤は 6 molEG を用いた方が生存性が高くなる傾向がみられた。また、拡張胚盤胞では、直径が199μm より小さくなると生存性が著しく低下した (第4表)。今後は 6 molEG を耐凍剤として用い、200μm 以上の拡張胚盤胞または脱出胚盤胞を中心に凍結し、移植に供していきたい。

第4表 胚のランク別、耐凍剤別生存成績

ステージ	直径 (μm)	耐凍剤	供試胚数(個)	生存率 (%)
EX	≤199	6 molEG	12	50.0
		8 molEG	18	27.8
	200～229	6 molEG	8	87.5
		8 molEG	21	76.2
	230≤	6 molEG	6	83.3
		8 molEG	4	75.0
H	—	6 molEG	13	92.3
	—	8 molEG	7	42.3

注) 培養液はすべて mCZB を使用