

牛の胚移植技術に関する研究

(第2報) 超低温冷凍庫を用いた1段階ストロー法での牛胚の凍結

余谷行義*・濱口 勇*・山田陽稔*・西 康裕*・林 美佐江セリナ**

Studies on Embryo Transfer Techniques in Cattle

2. Freezing of bovine embryos utilizing one-step straw method in a ultra low temperature freezer

Yukiyoshi YOTANI, Isamu HAMAGUCHI,

Harutoshi YAMADA, Yasuhiro NISHI, Celina Missae HAYASHI

緒言

牛胚の凍結保存技術を確率させることは、供胚牛と受胚牛の発情同期化処理を省くことができるだけでなく、野外普及の上欠くことのできない問題である。

凍結保存胚は融解後に凍害保護物質として加えられた耐凍剤(グリセロール)の除去を行ったのち移植に供される。耐凍剤の除去法としては、融解時の濃度から低濃度へと段階的に希釈して浸透圧衝撃から胚を保護する段階除去法や、胚と同一ストロー内に前もって分離封入した細胞への非透過性物質である蔗糖液を使って、融解後にストロー内から胚を取り出すことなく耐凍剤を除去し、そのまま子宮内へ移植する2段階除去法、および1段階ストロー法などが用いられている。

胚の段階除去法は、融解後の胚の生存性を形態的に確認できるため確実性は高いが、融解後に実験室内での顕微鏡を使った長時間の操作が必要であり、野外での普及には問題がある。これに対して、2段階除去法および1段階ストロー法は、融解後の胚の生存性判定や生存率に問題があるものの、融解後移植までの操作が簡易であり農家の庭先で融解し直接移植できるため、野外での普及技術として研究が進められている。

一方、胚の凍結は、高い性能を有し、自由に冷却速度を設定できるプログラムフリーザーが広く利用されている。しかし、市販のプログラムフリーザーは高価であり簡単には購入できないため、フィールドの技術者は安価でより簡易な凍結方法の開発を望んでいる。

我々は、超低温冷凍庫内でのアルコールを利用した安価で簡易な牛胚の凍結方法を検討してきたが⁹⁾、今回は、この凍結方法による1段階ストロー法で牛胚の凍結保存を行い、凍結条件や融解後の胚の生存性および直接移植による受胎率について検討したので報告する。

材料および方法

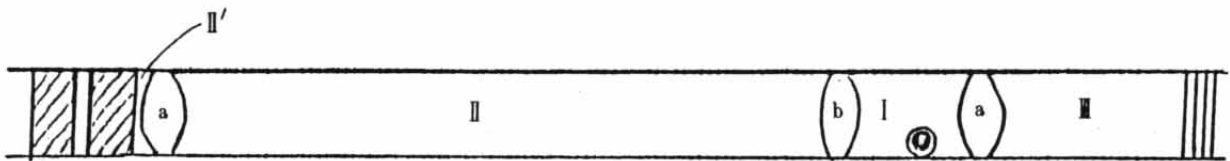
1. 供試胚

供試した牛胚は、過剰排卵処理した9頭の供胚牛(ホルスタイン種5頭、黒毛和種4頭)から採取した桑実胚期から胚盤胞期の正常な形態を有する43個の牛胚(Aランク胚26個、Bランク胚17個)とした。

回収後の胚の保存液は20%子牛血清加 Dulbeccos' PBS (以下PBS)を用い、数回洗浄後凍結に供した。

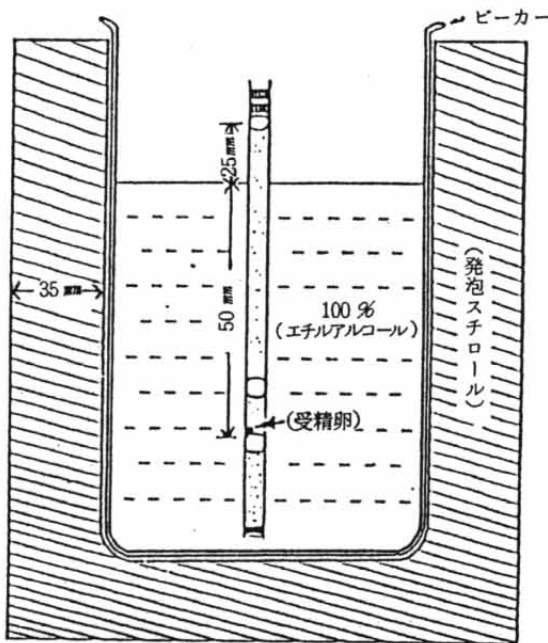
2. 凍結方法

耐凍剤はグリセロールを用い、10%グリセロール加P



I	: 凍結媒液層	10mm
II	: 0.3 M 蔗糖溶液層	60mm, II': 5mm
III	: 0.6 M 蔗糖溶液層	20mm
a	: 空気層	5mm
b	: 空気層	3~5mm

第1図 ストロー内構成



第2図 1段階ストロー法でのアルコールによる凍結方法

BSを凍結媒液とした。グリセロールの添加は室温において1段階で行い、平衡時間は30分間とした。

牛胚は、0.25ml 容凍結精液用プラスチックストローに1個ずつ入れ、ストロー内構成は砂川ら⁷⁾の方法に準じて第1図の構成とした。蔗糖液は、二次蒸留水で溶解して0.3Mおよび0.6Mの濃度に調整し、20%の割合で子牛血清を入れ、更にペニシリン(100IU/ml)を添加したものをを用いた。

凍結は、後藤ら⁸⁾のアルコールと超低温冷凍庫を用いた方法を応用し、第2図のように円筒の発砲スチロール(厚さ35mm)で覆ったビーカーに純エタノールを入れ、この中に牛胚を入れたストローを立て、一定温度に保持した超低温冷凍庫の中に静置し、ストロー内の胚の位置

の温度が -35°C まで低下したときにストローを液体窒素に移し保存した。胚の位置はアルコール液面より50mm下方とし、植水はストロー内液がアルコール液面より25mmほど出ているのを利用し、自然植水とした。

なお、ストローホルダーは第3図に示したように厚さ3mmの亚克力板を用いて独自に作成した。ホルダーの中央には温度センサーを入れた模擬のストローを立てられるようにした。

凍結条件は、ビーカーの容量(500ml, 1,000ml)と超低温冷凍庫の庫内温度設定(-60°C , -70°C , -80°C)の違いによる凍結温度の変化について、あらかじめ模擬のストローを用いてストロー内の胚の位置と、同位置の周囲アルコールの液温を温度センサーにより記録し、各条件ごとの5回以上の反復測定結果により決定した。

3. 凍結胚の融解方法

凍結胚は、 37°C の微温水で融解後、綿栓部を持って2~3回振り下ろし、凍結媒液と2層の蔗糖溶液を一度に混合した。空気層がすべて綿栓部に集まったのを確認した後、綿栓部を真下に向けて微温水中に数分間静置した。その後、シール部分より約2cmの位置でストローを切除して、直接移植または培養に供した。

4. 生存性の判定

1) 培養試験

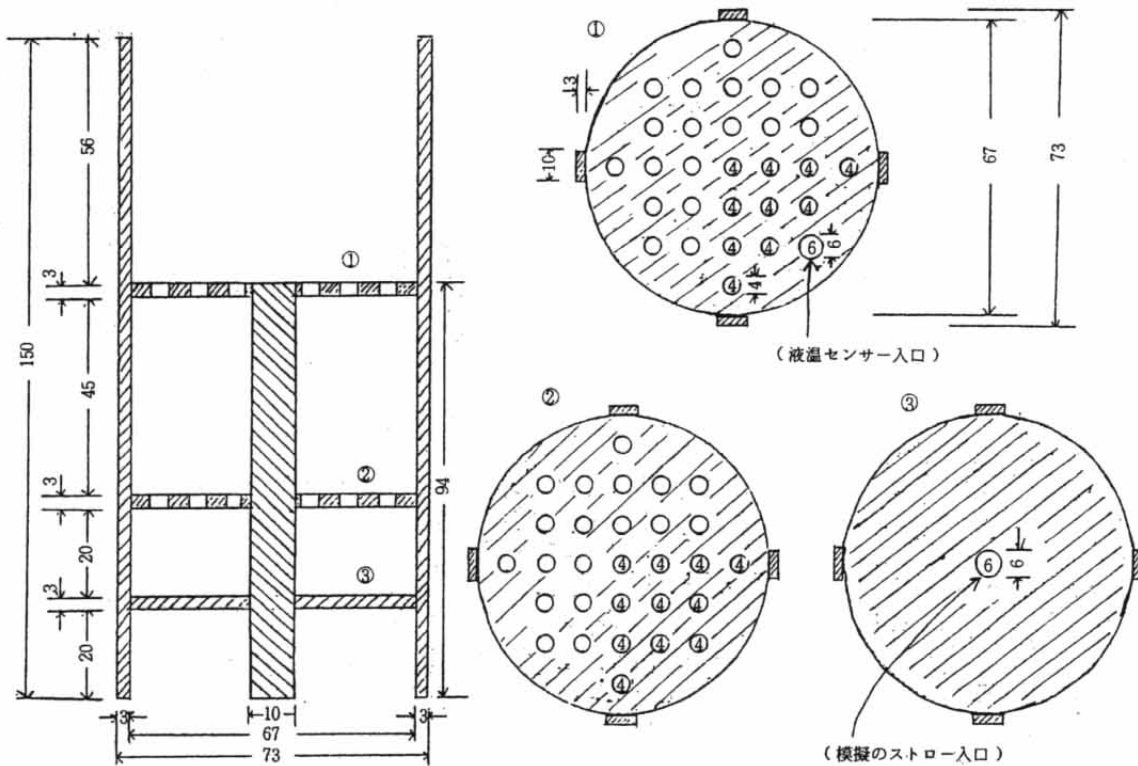
凍結融解後の胚をPBSに移し替え、 37°C で12時間以上培養し、正常な発育を示したものを生存胚とした。

2) 移植試験

凍結融解後、頸管経由法で自然発情牛22頭に各1個ずつ黄体側子宮角に直接移植し、受胎の有無を調べた。

成 績

模擬のストローを用いた凍結温度の変化を第1表に示した。容量1,000mlのビーカーを用いた場合、室温から -35°C までの冷却速度は超低温冷凍庫の庫内設定温度の



第3図 ストローホルダー

低下にともない速くなり、 -60°C で240分、 -70°C で190分、 -80°C で160分であった。各温度域における冷却速度は、室温から 0°C までが庫内設定温度 -60°C で $0.3^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 、 -70°C で $0.4^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 、 -80°C で $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 、 0°C から -10°C までが $0.2^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 、 $0.3^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 、 $0.3^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 、 -10°C から -20°C までが $0.2^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 、 $0.2^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 、 $0.3^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 、 -20°C から -30°C までが $0.1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 、 $0.2^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 、 $0.2^{\circ}\text{C}/\text{分}$ となり、 -80°C の庫内温度設定で最も良好な冷却速度が得られた。また、過冷却点から凍結点

に至る潜熱の発生は、庫内設定温度 -60°C で 1.0°C 、 -70°C で 2.6°C 、 -80°C で 0.5°C の平均温度上昇となり、 -80°C の庫内温度のときが最も小さい潜熱の発生であった。しかし、冷却曲線を見ると、ストロー内の胚の位置では滑らかな曲線が得られるものの、同位置の周囲アルコールの液温では $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ のぶれが見られ波状の曲線となった。

一方、容量 500ml のピーカーを用いた場合は、室温から -35°C への到達時間が庫内温度 -60°C で180分、 -70

第1表 超低温冷凍庫による冷結温度変化

ピーカー容量	庫内温度	潜熱の発生		-35°C 到達温度(分)	温度変化($^{\circ}\text{C}/\text{分}$)			
		発生温度	温度上昇		0	-10	-20	-30
1,000 ml	-60°C	-8.2°C	1.0°C	240	0.3	0.2	0.2	0.1
	-70	-8.3	2.6	190	0.4	0.3	0.2	0.2
	-80	-5.3	0.5	160	0.5	0.3	0.3	0.2
500	-60	-5.8	0.7	180	0.4	0.3	0.2	0.2
	-70	-6.9	1.6	150	0.4	0.3	0.3	0.2
	-80	-8.3	0.7	120	0.5	0.4	0.4	0.3

℃で150分、-80℃で120分となり、前者と比べて冷却速度が40~60分短縮された。これを各温度域における冷却速度でみると、室温から0℃までが庫内設定温度-60℃で0.4℃/分、-70℃で0.4℃/分、-80℃で0.5℃/分、0℃から-10℃までが0.3℃/分、0.3℃/分、0.4℃/分、-10℃から-20℃までが0.2℃/分、0.3℃/分、0.4℃/分、-20℃から-30℃までが0.2℃/分、0.2℃/分、0.3℃/分となり、0℃までは前者とあまり差がないものの、0℃から-35℃にかけては冷却速度がそれぞれ約0.1℃/分速くなっていた。また、潜熱の発生は、庫内設定温度-60℃で0.7℃、-70℃で1.6℃、-80℃で0.7℃の平均温度上昇といずれも小さく、冷却曲線も、ストロー内の胚の位置および同位置の周囲アルコールの液温ともに滑らかな曲線が得られた。

この結果より、実際の牛胚の凍結は容量500mlのビーカーを用い、庫内設定温度-80℃で実施した。

上記の方法で凍結した牛胚43個の培養成績および、移植成績を第2表および第3表に示した。

培養試験では、21個の胚のうち融解直後の形態観察で大きな異常を認めたものは少数例であったが、培養により正常な発育をしたのは7個のみで、生存率33%と低率であった。これを凍結前の胚のランク別に比較する

と、Aランク胚は5/13個(38%)、Bランク胚は2/8個(25%)の発育となりAランク胚で生存率が高く、また、ステージ別では、胚の発育ステージが進むほど生存率の高い傾向がみられた。

移植試験は、融解後の直接移植により自然発情牛22頭(ホルスタイン種、発情日差±1日以内)の黄体側子宮角に各1個ずつ移植し、このうち11頭が受胎・分娩し、受胎率は50%であった。また、移植成績を凍結前の胚のランク別に見ると、Aランク胚は9/13頭が受

第3表 胚のランク別の培養・移植成績

胚のランク	供試胚数	培養成績	移植成績
A	26	5/13	9/13
B	17	2/8	2/9
合計	43	7/21	11/22

第2表 超低温冷凍庫による凍結胚の培養および移植成績

牛No	供胚牛品種 ^{*1}	凍結胚		供試胚数	培養成績	移植成績
		ステージ ^{*2}	ランク			
1	H	B1~Ex. B1	A	6	4/5	1/1
2	H	LM~E. B1	A	4	0/4	
		B1	A	4	1/4	
3	H	LM	A	1		1/1
		E. B1	A	4		3/4
4	H	M	B	2		0/2
5	H	B1	B	1		1/1
6	B	LM~E. B1	B	4	1/4	
7	B	B1~Ex. B1	A	4		2/4
8	B	LM~B1	B	7	1/4	1/3
9	B	LM~E. B1	A	3		2/3
		"	B	3		0/3
合計				43	7/21	11/22

*1 H:ホルスタイン種 B:黒毛和種

*2 M: Morula 桑実胚 LM: Late Morula 後期桑実胚

E. B1: Early Blastocyst 初期胚盤胞 B1: Blastocyst 胚盤胞

Ex. B1: Expanded Blastocyst 拡張した胚盤胞

胎し受胎率69%，Bランク胚では2/9頭が受胎し受胎率は22%となり，Aランク胚の移植で高い受胎率が得られた。

考 察

牛胚の実用的な冷却・凍結速度は，植氷温度（-4℃～-7℃付近）までは1.0℃/分，植氷後は0.3℃/分の速度で冷却され，-30℃～-40℃の範囲から液体窒素中へ浸漬した場合に生存性が得られている⁵⁾。

超低温冷凍庫を利用したアルコールによる1段階ストロー法での簡易凍結を実施するにあたり，上記の冷却速度を得るため，アルコールを入れるビーカー容量（1,000mlと500ml）と，超低温冷凍庫の庫内設定温度（-60℃，-70℃，および-80℃）の違いによる温度変化を模擬のストローを用いて検討したところ，容量1,000mlのビーカーを用いた場合では-80℃の庫内設定温度で最も良好な冷却速度が得られ，潜熱の発生も平均0.5℃と小さかった。しかし，冷却曲線を見ると，ストロー内の胚の位置では滑らかな曲線がえられたものの，同位置の周囲アルコールの液温では±0.2℃のぶれが見られ波状の曲線となった。この液温のぶれは，アルコールの上層部と下層部の温度差によって起こる液の対流が，液量が多いためうまく対流出来ないため起こるものと推察される。

一方，容量500mlのビーカーを用いた場合は，いずれの庫内設定温度でも良好な冷却速度と冷却曲線が得られ，-80℃の庫内設定温度での-35℃到達時間が120分と最短であり，潜熱の発生も平均0.7℃と小さかった。

植氷操作は，-4℃～-7℃に達した時点であらかじめ液体窒素に漬けて冷却した鉗子などでストローを挟み，そのままの温度で5～10分間保持する方法が一般的であるが，今回はストロー内液がアルコール液面より25mmほど出ているのを利用した自然植氷であり，植氷温度での保持時間も取っていない。しかし，潜熱の発生は小さく，冷却曲線も滑らかなことから胚の生存性に及ぼす影響は少ないものと考えられた。

この結果より，実際の牛胚の凍結は容量500mlのビーカーを用い，庫内設定温度-80℃でおこない，凍結融解後の胚の生存性を見るために培養および移植試験を実施した。

凍結融解後の培養および移植成績は，それぞれ，33%（7/21個）の発育率と50%（11/22頭）の受胎率であった。また，凍結前の胚の形態観察において，Aランク胚では培養による発育率38%（5/13個），融解後の直接移植での受胎率69%（9/13頭）に対して，Bランク胚では培養後の発育率25%（2/8個），移植による受胎率22%（2/9頭）といずれも低く，Aランク

胚で良好な成績が得られた。また，胚のステージ別では，入江ら⁴⁾，後藤ら³⁾の成績と同様にステージが進ほど生存率の高い傾向が見られた。なお，培養による発育率が受胎率に比べ低かったことについては，融解直後の形態観察で異常を認めた胚が少数であったことから，培養操作や培養条件に問題があったものと考えられた。

1段階ストロー法による牛胚の凍結は，農家の庭先で融解し直接移植できるため，実用化に向けての最も有効な技術として注目されているが，凍結媒液，蔗糖溶液の濃度およびストロー内構成がいまだに統一されていない。

本試験で用いた1段階ストロー法は，既報⁹⁾で述べたように0.3Mと0.6M蔗糖溶液を1本のストロー内に充填したもので，融解後の操作が非常に簡便である。また，この方法で砂川ら⁷⁾は，プログラムフリーザーでの凍結で63%（5/8頭）の高い受胎率を報告しており，本試験における成績でもAランク胚の移植で69%（9/13頭）と同様に高い受胎率が得られたことから，野外での実用性が証明できたと考えられた。

簡易凍結装置を用いた牛胚の凍結保存方法としては，アルコール槽に入れたストローを液体窒素を利用して凍結する張ら¹⁾や，志村⁶⁾の方法，ヘキサンにいれたストローをドライアイスで冷却したアセトンで凍結する高見沢ら⁸⁾の方法，アルコール槽に入れたストローをドライアイスとメデイカルフリーザーで冷却したアセトンで凍結する福井ら²⁾の方法，およびアルコール槽に入れたストローを超低温冷凍庫内で凍結する後藤ら³⁾の方法などがあり，いずれも融解後高い生存率および受胎率を得ているが，植氷操作や冷却途中にかなりの人為的操作が必要である。この点，本試験に用いた方法は，冷却開始後液体窒素への投入温度（-30℃～-40℃）まで放置しておくため非常に簡便であり，トラブルもなく，冷却速度の再現性も良好であった。

これらのことから，超低温冷凍庫を利用したアルコールによる凍結方法は，1段階ストロー法における簡易凍結法としても応用できることがわかり，凍結時の牛胚のステージ，ランクを十分に考慮すれば高い受胎率を得ることも可能と考えられ，現場に即応した技術として応用していきたい。

要 約

超低温冷凍庫内でのアルコールを利用した簡易凍結による1段階ストロー法での牛胚の凍結保存について，凍結条件や融解後の胚の生存性および直接移植による受胎率を検討し，次の結果を得た。

1) 凍結条件は，超低温冷凍庫の庫内温度を-80℃に設定し，容量500mlのビーカーを用いたときに最も良好

な冷却曲線が得られた。

2) 凍結，融解後の培養では，21個の牛胚のうち7個が正常な発育をただけで，生存率は33%と低率であった。また，凍結前の胚の形態においては，Aランクで胚のステージが進んでいるものほど生存率の高い傾向にあった。

3) 凍結，融解後の直接移植では，11/22頭が受胎，分娩し，受胎率は50%であった。凍結前の胚のランク別では，Aランク胚で9/13頭が受胎し受胎率69%，Bランク胚で2/9頭が受胎し受胎率22%となり，Aランク胚で高い受胎率が得られた。

以上のことから，超低温冷凍庫を利用したアルコールによる凍結方法は，1段階ストロー法においても応用できることがわかり，凍結時の牛胚のステージ，ランクを十分に考慮すれば，高い受胎率を得ることが可能と考えられた。

引用・参考文献

- 1) 超 白鹿ら (1987) : 延辺黄牛の受精卵 (胚) 移植試験，特に簡易装置を用いて凍結した胚の移植例，畜産の研究 41, 61~63.
- 2) 福井佐一ら (1989) : メディカルフリーザーを用いた牛受精卵の簡易凍結保存法，畜産の研究 43, 505~508.
- 3) 後藤太一ら (1984) : 超低温冷凍庫を用いた牛胚の凍結とその成績，哺乳卵研誌 1 (1), 99~101.
- 4) 入江達彦ら (1983) : 牛凍結受精卵の移植に関する研究，日獣会誌 36, 643~647.
- 5) 金川弘司 (1984) : 牛の受精卵移植 近代出版
- 6) 志村 修 (1988) : ブラジルでの簡易凍結装置による牛凍結融解受精卵の生存性，畜産の研究 42, 427.
- 7) 砂川政広ら (1985) : 牛凍結受精卵の1段階ストロー法による直接移植試験，群馬農業研究 C 畜産第2号, 7~11.
- 8) 高見沢稔ら (1987) : 簡易凍結器具による牛受精卵凍結保存試験，畜産の研究 41, 757~758.
- 9) 余谷行義ら (1990) : 牛の受精卵移植に関する研究 1. 過剰排卵処理および凍結方法，三重農技研報 18, 27~37.

SUMMARY

Effects of freezing conditions on bovine embryos survival rate and on the conception rate of cows with embryo transfer were studied using one step straw method with ethylalcohol in a ultra-low temperature freezer(ULTF).

Results were as follows :

Expected freezing curve was obtained from the chamber size with 500 ml at the temperature of -80°C .

The survival ratio of being frozen-thawed bovine embryos was 33% while that of embryos grouped into A rank and of the embryos in an advanced stage tended to be high.

Conception rate was 50%. However, the cows which received A rank embryos showed a high conception rate(69%).