

平成16年度試験研究成果書

区分	指導	題名	直接移植のためのウシ胚の凍結・融解方法		
[要約] 1.8Mエチレングリコールと0.1Mシュークロースを組み合わせた耐凍剤は、凍結融解後のウシ胚の生存率が安定し、直接移植による受胎率の向上が期待できることを多数胚の培養試験と大規模な移植試験から実証し、マニュアルを作成した。					
キーワード	ダレ外法	エチレングリコール	シュークロース	畜産研究所 家畜工学研究室	

1 背景とねらい

農家の庭先で融解した胚を受胎牛に移植するダイレクト移植は、簡便な技術であるが、受胎率が低いため、その要因の究明が求められている。今回、最も普及しているエチレングリコールとシュークロースを組み合わせた耐凍剤で処理した多数胚の培養試験と大規模な移植試験から野外で活用できる技術確立を目的に全国14府県の共同研究として実施する。

2 成果の内容

(1)耐凍剤は1.8Mエチレングリコール(EG)に0.1Mシュークロース(Su)を添加したものである。溶液の調整とウシ胚の凍結・融解方法は以下に示す。

ストック液の調整

100mlのメスシリンダーを用意し、PBSを約40ml入れる。
シュークロースを3.423g秤量して に入れ、完全に溶かす。
EGを10ml加え、PBSで80mlまでメスアップし、十分に転倒混和する。
ペニシリン1万単位、ストレプトマイシン10mgを添加する。
試験管に8mlずつ分注し、-20 で凍結保存する。

凍結溶液の調整

使用時にストック溶液を温水(37-38)中で融解し、十分に転倒混和する。
子牛血清を2ml加え、十分に転倒混和する。
0.22µmのフィルターでろ過滅菌し、室温にて使用する。

凍結方法

胚は20%CS + PBS(37-8)中で3回洗浄する。
耐凍剤溶液で3回洗浄した後にストローに吸引し、10～15分平衡する。
-7 に冷却したプログラムフリーザー内にストローをセットする。2分後に植氷して10分間保持する。冷却速度は -0.3 /分で行い、 -30 で液体窒素に投入する。

融解方法

液体窒素から取り出したストローは、6秒間のエアソーイング後、30 の微温湯に20秒保持し融解する。

(2)本法による胚の培養成績は脱出率62.7%、受胎率は52.8%と良好な成績が得られた。(表1)

3 成果活用上の留意事項

- (1)受胎牛の選定と移植術技は基本を遵守する。
- (2)エチレングリコールとシュークロースの濃度比較は実施していないため本法以外の濃度による胚の生存性と受胎成績は明らかでない。
- (3)この耐凍剤を用いても融解胚の細胞の一部は変性シランクの低下がみられるため、凍結前の胚は変性部分が少ないBランク以上のものを用いる。

4 成果の活用方法等

(1)適用地帯又は対象者等

受精卵移植に係わる移植師、獣医師等の技術者。

(2)期待する活用効果

受精卵移植技術の普及拡大と凍結胚移植による受胎率の改善。

平成17年の最終目標は凍結1胚移植受胎率60%。

5 当該事項に係る試験研究課題

(864)受胎率向上のための受精卵の凍結・融解方法の比較検討 [H14～16、その他]

6 参考資料・文献

(1)児玉英樹、「0.1Mトレハロース添加1.8MEGを耐凍剤とした凍結胚の生存性」
平成14年度岩手県試験研究成果書(指)-27-1

(2)吉羽宣明、「凍結溶媒に添加するショ糖及びタンパク成分がウシ凍結・融解胚直接移植の受胎率に及ぼす影響」第103回日本畜産学会大会講演要旨107(2004)

(3)堂地修、「Ethylene glycolを用いて凍結したウシ胚のDirect Transfer法による移植」
第84回日本畜産学会大会講演要旨、65(1991)

(4)須崎哲也、「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」
第11回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会、64(1998)

7 試験成績の概要(具体的なデータ)

(1)培養成績と移植成績

表1 各耐凍溶液の融解後孵化率と受胎率

	脱出胚数(%)	受胎頭数(%)	各府県の受胎率範囲
対象EG	52 / 102 (51.0%)	116 / 264 (43.6%) b	(25～60%)
EG+0.1MSu	61 / 98 (62.7%)	129 / 244 (52.8%) a	(33.3～61.1%)
EG+0.4%BSA	55 / 100 (55.1%)	104 / 253 (41.5%) b	(0～71.4%)

* ab異符号間に有意差あり(p<0.05)