

1. 背景とねらい

牛の胚移植技術は、野外での普及・実用段階に入り、胚移植に至る一連の操作（胚回収、凍結処理、融解、移植）が県内各地域で行われつつある。胚の凍結保存には、従来グリセロールを耐凍剤とした3段階法が広く用いられている。しかし、3段階法では、移植の際に実験室内でのストロー融解・耐凍剤除去・胚の検査が必要であり、このことが普及上の制約となっていた。

そこで、グリセロールとシュクロースを耐凍剤とした凍結法（Gly + Su法）について検討し、平成2年度指導上の参考事項として報告した。この方法は人工授精と同じように、現地で融解・移植が可能な点で優れているが、凍結時の液の調製や胚の移し換えが多く、操作が煩雑であり問題となっていた。

今回、エチレングリコールを耐凍剤とした簡易な凍結法（EG法）について検討し、従来法と変わらない受胎率が得られることを確認したので普及奨励事項に供する。

2. 技術内容

1) 耐凍剤平衡およびストロー封入

胚を20%子牛血清加修正PBSで洗浄した後、10%エチレングリコール液に移し換え、室温で20分間保持。ストローに吸引・封入する。

<10%エチレングリコール液の調製>

20%子牛血清加修正PBSを基礎媒液とし、エチレングリコール（試薬特級）を10%加える。十分に混和（30回以上ピペティング）し、濾過滅菌する。

2) 凍結の手順

ストローを、予め-7℃に設定したプログラムフリーザーに浸漬し、2分後に植氷、8分間保持する。次いで、-0.3℃/分で-30℃まで冷却し、液体窒素に投入する。

3) 融解・移植

融解は移植直前に行う。ストローを液体窒素ボンベから取り出し、空気中で10秒間保持後、30～38℃の温湯に10秒間浸漬する。酒精綿で清拭、熱シール端を切除し、移植器にセットして移植する。

3. 指導上の留意事項

EG法に用いる胚は、A・Bランクのものとする。

4. 試験成績概要

表1 従来法との比較

		EG法	Gly + Su法	3段階法
凍結時	耐凍剤平衡			
	調製する液の種類	1	4	3
	胚の移し換え回数	1	4	3
	耐凍剤平衡に要する時間(分)	20	30	30
	ストローへの吸引・封入			
	ストロー中の液層の数	3	5	3
凍結時	ストロー中の液の種類	1	3	1
	凍結(7°カラムリザー)に要する時間(分)	86	80	116
	融解場所	移植現地	移植現地	実験室
移植時	耐凍剤除去	不要	不要	3段階で除去、 胚検査、サマ-詰

表2 受胎成績

	EG法	Gly + Su法	3段階法
移植頭数	51	102	80
受胎頭数	24	37	35
受胎率(%)	47.1	36.3	43.8

(岩手畜試(1990~93))

	EG法	3段階法
移植頭数	73	157
受胎頭数	35	77
受胎率(%)	47.9	49.0

(盛岡家保、受精卵供給センター整備事業(1993))

	EG法	Gly + Su法
移植頭数	29	25
受胎頭数	20	13
受胎率(%)	69.0	52.0

(農水省家畜改良センター 堂地ら、第86回日畜学会(1992))