

牛受精卵の簡易凍結融解法（ダイレクト法）

（畜試 肉牛部・外山分場）

1. 背景とねらい

受精卵移植技術が野外での普及段階に入っているが、現在は移植時に顕微鏡を備えた施設での凍結卵の融解・耐凍剤除去・検査操作が必要で、移植頭数の増加を鈍化する一因となっている。

そこで融解・移植時に特別の装置・技術を必要としないダイレクト法について検討し、卵の融解後の発育等を確認したので参考に供する。

2. 技術の内容

供卵牛から回収された正常卵を従来の3段階法によりグリセロール平衡（3%→6%→10%、各10分間）を行った後、4℃に冷した0.2モルシュクロースを含んだ10%グリセロール保存液に受精卵を移し換え、直ちにストローに吸引、封入。受精卵を含んだ層の両側は0.2モルシュクロースを含んだm-PBSの層とし、凍結は0℃～-6℃まで-1℃/分で冷却、植氷して10分間保持後、-0.3℃/分で冷却し、-25℃に達した時点で液体窒素に投入した。融解は空気中で5～10秒間保持後、30～38℃の温湯で実施。酒精綿で清拭し、熱シール端を切除し移植器にセットして直ちに移植を行う。

1) 現行法との主な相違点

- ストローへの吸引（胚は耐凍剤で平衡後、耐凍剤を含む0.2Mシュクロース添加液に投入）
- 凍結プログラム
- 融解後の処理

2) 従来法との比較

比較項目	3段階法	1段階法	ダイレクト法
(1)耐凍剤平衡時間	30分	同左	同左
(2)凍結時間	160分	//	80分
(3)融解～移植まで	40分	11分	1分
(4)融解に要するもの	実体顕微鏡 倒立顕微鏡 脱グリセロール液 保存液 滅菌器具	液層の混和 (熟練を要す) 接眼レンズ	特に無し

(5)受精卵の生存性

	供試卵	融解時		発育卵 (率)
		透明帯破損	胚の変性	
3段階法	9	0	2	7 (77.8)
1段階法(ストロ-内)	7	3	1	6 (85.7)
〃 (シャーレ内)	6	6	3	3 (50.0)
0段階法	8	0	0	8 (100.0)

3. 指導上の留意点

- 1) 融解後に受精卵が耐凍剤の入った液層から早く子宮内環境に置かれるよう融解から移植終了まで10分以内に終了するよう移植時の準備を受精卵移植マニュアル通りに正しく整えた上で融解に入ること

4. 関連試験課題名

「牛の双子生産における産子の能力発現技術の開発」

5. 参考資料

- 種畜牧場調査実験成績報告書 3 (1990)
- 岩手県畜産試験場成績概要書 (1989)
- 第7回家畜繁殖学会講演要旨 (1988)
- 第107回獣医学会講演要旨 (1988)
- 岩手県畜産試験場成績概要書 (1989)