—研究ノート—

牛の凍結保存卵移植試験

杉江 信・角田幸生・相馬 正

(農林水産省畜産試験場)

牛の受精卵移植技術の実用化にあたって、受精卵の長期保存技術の確立が現在なお1つの重要課題として残されている。牛で凍結保存卵を移植して子牛の生産に成功した例は、すでに海外において数報告¹⁻⁹⁾発表されているが、国内での子牛の生産例は報告されていない。

著者らは数年来家畜受精卵の凍結保存に関する実験を続けているが、最近、牛で凍結保存した受精卵を移植して受胎例が得られ、正常な子牛が生産されたので、現在までの実験の概要を報告する。

材料及び方法

供試した受精卵は、既報⁷⁾の妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG) 及び胎盤性性腺刺激ホルモン (HCG) 投与に prostaglandin F_{2α} を併用する方法を用いて、多排卵誘起処置を施した donor 牛から排卵後 5~9 日の各期に採取した 8~16 細胞から blastocyst までの各 stage

のもの 58 個で、それぞれ 2~3 個ずつ 1 ml のプラスチックストローに封入して凍結し、-196°C の液体窒素中に 6~130 日間保存した。凍結保存に用いた卵子培養液は修正磷酸緩衝液に 0.4% の割合に牛血清アルブミンを加えたものである。また添加した耐凍剤は 1.2~2.0 M の DMSO, 1.0 M のグリセリンあるいは 1.2 M のエチレングリコールである。凍結時の冷却速度は毎分 0.06~1.4°C であった。これらの凍結保存卵を融解して形態的に回復状態を検査し、形態が正常に回復したと判断される受精卵を、排卵後の経過日数が同調している recipient 牛に移植して受胎の有無を検討した。融解にあたって用いた温度の上昇速度は毎分 1.0~4.0°C で、融解後、添加した耐凍剤を数回に亘って徐々に希釈して取り除いた。

なお採卵及び卵子移植の方法はいずれも既報⁸⁻⁹⁾に従って non-surgical 法で実施した。

表 1 牛受精卵の凍結保存試験 (5~6 日齢卵)

卵子の日齢	発育 stage	耐凍剤	保存日数 (-196°C)	融 解 時 の 形 態			受胎例 移植例
				融解卵数	正常形態	部分的変性	
5 日	8~16 細胞	Gl. 1.0 M	15日	1	0	1	
"	16~32 "	DMSO 1.2	6~7	4	0	4	0/1
"	"	DMSO 2.0	7	3	0	3	0/1
"	"	Gl. 1.0	15	2	0	2	
6	16~32 " *	DMSO 1.5	24	2	0	2	
		Gl. 1.0	"	2	0	2	
		E. gl. 1.2	"	2	0	2	
"	Morula	DMSO 1.2	9	1	0	1	
"	"	Gl. 1.0	7	2	2	0	0/1
"	Blastocyst*	Gl. 1.0	20~49	8	6	2	0/2
計			6~49日	27	8	19	0/5

* 凍結前培養して発育した卵子, Gl. はグリセリン, E. gl. はエチレングリコール。

Storage and transfer of frozen bovine embryos.

SUGIE, Tadashi, Yukio TSUNODA & Tadashi SOMA (National Institute of Animal Industry, Chiba-shi 280)
Japan. J. Anim. Reprod. 25 (4), 1979.

表 2 牛受精卵の凍結保存試験 (7~9 日齢卵)

卵子の日齢	発育 stage	保存日数 (-196°C)	融 解 時 の 形 態			受胎例 移植例
			融解卵数	正常形態	部分的変性	
7 日	Blastocyst	12日	2	2	0	0/2
8	"	19	3	3	0	0/3
"	Zona free blast.	19	2	2	0	0/2
"	Blastocyst	37	2	1	1	0/1
"	"	82	4	4	0	0/3
"	"	91	3	3	0	0/2
"	"	104	1	1	0	1/1
"	Zona free blast.	104	3	2	1	0/3
"	Blastocyst	107	6	4	2	0/5
"	"	130	3	3	0	0/3
9	"	19	1	1	0	0/1
"	Zona free blast.	19	1	1	0	0/1
計		12~130日	31	27	4	1/27

注：耐凍剤は DMSO 1.5 M を使用。

成 績

凍結融解後の受精卵の形態的検査ならびに移植による受胎成績は表 1~2 に示した。すなわち、表 1 に示すように排卵後 5~6 日目に採卵し、8~16 あるいは 16~32 細胞期で凍結した 15 個については、融解後正常な形態に回復したものはみられなかったが、凍結時に molura 期の 3 個中 2 個、および凍結前に培養して早期 blastocyst に発育していた 8 個の胚では 6 個が、それぞれ融解後正常な形態に回復した。しかし、これらの受精卵を移植した 5 頭の recipient 牛では受胎例が得られなかった。

排卵後 7~9 日目に採取した blastocyst または zona free の blastocyst を用いた実験成績は表 2 に示すように、31 個中 27 個の胚が融解後形態的に正常と判定された。これらの胚を 27 頭の recipient 牛に移植した結果 1 頭が受胎した。受胎例は、排卵後 8 日目に採取した blastocyst を 104 日間凍結保存したのち融解して移植した受精卵は図 1 に示すように、形態的にみて融解直後の状態に変性した部分が認められず、ほぼ正常に回復したと思われるものであった。なおこの例は移植後 276 日目に正常な雄の子牛を分娩した (図 2 参照)。

以上牛の受精卵凍結保存試験で現在までに得られた成績の概要を述べたが、凍結融解後、形態的に正常に回復する卵子の割合が著しく増加してきているが、これらの凍結保存卵を移植した結果では、わずか 1 例の受胎が得られただけで、まだ受胎率は著しく低い。現在受胎率の向上を目標に凍結融解の方法を改善するための実験を継

続している。

図 1 移植して受胎した融解直後の凍結保存卵 (-196°C 中 104 日間保存)

右、受胎した blastocyst.

左、不受胎に終わった zona free blastocyst.

図 2 凍結保存卵を移植して生産した子牛

文 献

- 1) WILMUT, I. & L. E. A. ROWSON: *Vet. Rec.* **92**, 686, 1973.
- 2) BILTON, R. J. & N. W. MOORE: *J. Reprod. Fert.* **46**, 537, 1976.
- 3) BILTON, R. J. & N. W. MOORE: *J. Reprod. Fert.* **50**, 363, 1977.
- 4) WILLADSEN, S. M., C. POLGE & L. E. A. ROWSON: *J. Reprod. Fert.* **52**, 391, 1978.
- 5) LEHN-JENSEN, H. & T. GREVE: *Theriogenology* **9**, 313, 1978.
- 6) TROUNSON, A. O., B. F. SHEA, G. W. OLLIS & M. E. JACOBSON: *J. Anim. Sci.* **47**, 677, 1978.
- 7) 杉江 (估) 本誌 **24** (5), 36, 1978.
- 8) 杉江 (估)・相馬 (正)・福光 (進)・大槻 (清): 畜試研報 (25), 27, 1972.
- 9) 杉江 (估)・相馬 (正)・福光 (進)・大槻 (清): 畜試研報 (25), 35, 1972.

“吉田 信行 先生を悼む”

大 地 隆 温

(家畜繁殖研究会理事長)

本会名誉会員吉田信行先生は昭和 54 年 11 月 2 日午後 11 時 25 分、心不全のため 77 才の生涯を閉じられました。平素頑健な先生であられただけに、予想だにしない御逝去は信じ難い痛恨事でありました。

生前、直腸に腫瘍があるとのことで開腹手術をうけられ暫

らく入院の後、経過良好ということで退院され、町田市の自宅で御養生されていましたが順調な御様子で、そのまま回復されるものと信じておりましたが肝炎等を併発され再度入院されました。その頃から次第に食事でも進まなくなられ、医師団の懸命の手当や御家族の手厚い看護も空しく、身内の皆々様にみとられながら静かに永い眠りにつかれたのであります。

気力充実し、気概に満ち満ちた御生前であっただけに、幽明境を異にした今日、人の命のはかなさをひとしお強く感じさせられる次第であります。

先生は家畜繁殖研究会設立準備の当時 (昭和 22 年) から参画され、正式発足当初 (昭和 23 年) は本会理事として繁殖研究会の基礎作りと発展に御尽力され、その後、昭和 37 年から 42 年までは監事として会の運営を指導され、その後も絶えず会のために直接、間接に御助言を頂いておりました。これら長年にわたる御尽力、御功績に報いるため昭和 50 年には本会の名誉会員として推薦されました。

先生の繁殖研究会での御功績はいうに及びませんが広くわが国獣医畜産界全般に及ぼした先生の御功績は文字通り絶大なものがござります。先生は昭和 7 年東大獣医

学科を卒業され、2 年ほど大学に残られ遺伝、解剖等の勉強をされた後、東京府及び大阪府において地方庁の技師として昭和 16 年まで第一線の実務を体験され、同年農林省畜産試験場へ転勤されましたが間もなく応召され、昭和 18 年 7 月まで満州方面で従軍後畜産試験場に復帰され、各種の要職を歴任されましたが昭和 26 年、家畜衛生試験場北陸支場創立に伴う初代支場長として転任されその敏腕を遺憾なく発揮されました。この間の先生の研究業績は多岐に亘り、生殖器の病理組織学的研究にはじまり、乳汁並びに乳房炎についての基礎的、臨床的研究、戦後はいち早く外国の文献等を繙かれ、抗生剤についての各種疾病の予防、治療とくに乳房炎や子宮内膜炎等に対する研究に先鞭をつけられ、引き続き北陸支場長時代は場をあげて家畜の栄養障害の研究、ひいてはストレスと副腎皮質機能との関連等に全力を集中され、次々と斬新な方向を打ち出され、繁殖とこれらの関連についても説得力のある華々しい業績をあげられると同時に多くの優秀な研究者を養成されました。また、これらについての研究報告も 100 編以上を数え、学界にも極めて大きい貢献をされたのであります。国でもこれらの成果や方向の重要性を認め、組織的な研究体制を推進することになりました。

一方、研究と併行して、これらの研究結果を土台として、全国の畜産関係技術者を対象に多いときには年間 10 回を越す臨床講習 (栄養、繁殖、寄生虫等) や基礎講習を実施され、その普及に努められました。現在フィールドで指導の立場におられる年代の獣医畜産技術者は直接、間接に先生の警咳に接せられた方が大半といっても過言ではありません。全国津々浦々で活躍中のこれらの方々の指導の広がりをお考えするとき、その成果は誠に計り知れないものがあるのであります。先生亡き今も先生の考え方はしっかりと定着してその遺志は力強く伝承されているのが現状であります。

昭和 35 年、北陸支場から麻布獣医科大学に移られ、昭和 45 年退職され名誉教授となられました。その間大