牛の凍結保存卵による受胎成功例について

鈴木達行* 高橋芳幸* 下平乙夫* 桶谷良至*

(昭和 57 年 1 月 29 日受理)

Transplantation of Frozen Bovine Embryos
TATSUYUKI SUZUKI et al. (Hidaka National Livestock Breeding Station)

SUMMARY

A total of 64 bovine embryos were frozen in plastic straw (0.25 ml). The storage medium used was Dulbecco's PBS with addition. Embryos were held at room temperature for 30 minutes and cooled at 1.0°C/min to -4.5°C. The storage medium was seeded at -4.5°C by clamping the outside of each ampoule with forceps which had been precooled in liquid N₂. After seeding, the straw was cooled to -35°C at 0.3°C/min, followed by 10 minutes' cooling at 0.1°C/min to -3.6°C, and then plunged directly into liquid N₂. Of 55 freeze-thawed embryos, 28 (50.9%) were survived.

要 約

12頭のホルスタイン種、未經産雌牛（12～16 カ月齢）から回収された 75 卵の受精卵子のうち、64 卵を 11～38 日間、-196°C の液体窒素中に凍結保存した。凍結は、1 mol のグリセロールを用い、-35°C までを 0.3°C/分、-35°C から -36°C までを 0.1°C/分 で冷却し、液体窒素中に保存した。融解は、受精卵子の入ったプラスチックストローを液体窒素容器から取り出し、直接 20°C の水に投入して行った。

融解後 64 卵中、9 卵が回収できず、回収された 55 卵中 20 卵を移植に供したところ 6 例が妊娠した。また、残りの受精卵子では、8 卵が培養により発育した。したがって、融解後の受精卵子の生存性は、回収された 55 卵中 28 卵（50.9%）となった。

牛の凍結保存卵による受胎成功例が 1973 年に WILMUT and Rowson¹⁹⁾ によって報告されて以来、家畜受精卵の凍結保存に関する研究が活発になり^{1,2,5,6,14,20)}、凍結保存された牛の受精卵によって多数の産子が得られるようになった。

国内では、1979 年に杉江ら^{11,12)} により 2 例の受胎成功例が報告されている。

これまでの牛受精卵子の凍結保存による受胎成功例は、BILTON ら²⁾ の報告を除くと、主として DMSO が耐凍剤として使用され、凍結融解法も緩慢法が主体を占めていたが、最近、グリセロールを用いた急速凍結融解法で良好な成績が報告され⁴⁾、グリセロールの保護効果の有効性が示唆されている。

著者らは、これらの報告を参考に、グリセロールを用いて凍結した牛受精卵子の 20 個を 20 頭の受卵牛に移植した試験で、6 例（30%）の受胎例を得たので、現在までの試験の概要を報告する。

1. 材料および方法

1) 受精卵の採取

供卵牛は、日高種畜牧場けい養の 12～17 カ月齢、未經産のホルスタイン種 12 頭で、前報¹⁷⁾ 同様妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG) および Prostaglandin F_{2α} で処理し、発情開始後 7～8 日目に非手術的に卵子を回収した。各子宮角を Tissue Culture Medium 199 (TCM-199) で灌流し、回収した受精卵は BMOC-3 液に浮遊したのち、凍結までの 6 時間以内を室温に保持した。

2) 凍結方法

保存液は、修正燐酸緩衝液 (PBS)²¹⁾ に、20% の割合で牛胎児血清 (FCS) を加えたものであり、これに 1.0 mol のグリセロールを添加して用いた。グリセロールの濃度は、0.18, 0.33, 0.57, 0.88, 1.0 mol の 5 段階で、各段階を 5 分間隔で添加し、最終添加後 30 分間保持したのち冷却した。

グリセロールの添加は室温（20～25°C）で行った。卵子の 2～8 個を約 0.4 ml の保存液を含む 0.5 ml 容量の精液用プラスチック製ストローに入れ、-4.5°C までを毎分 1°C で冷却し、液体窒素中に浸した紐子でストロ

* 農林水産省日高種畜牧場（北海道浦河郡浦河町西舎）

牛の凍結保存卵による受胎成功例について

図1 冷却と融解手順

ーの外側を挟んで植氷させた。ついで -35°C までを毎分 0.3°C 、 -35°C から -36°C までを毎分 0.1°C の速度で冷却し、 -100°C で 10 分間保持したのち液体窒素中に保存した。冷却は、プログラミングフリーザー（大阪酸素製）を用いて制御した。

移植を目的に、 -196°C に 11~38 日間保存した受精卵子を液体窒素素容器から取り出し、 20°C の温水中に直接振盪して融解させ、室温でグリセロールを添加過程と逆の方法で除去した。この場合、各段階の間隔を 10 分間とした。ついで BMOC-3 液で 2 回洗浄したのち、同液で前報¹⁶⁾の方法と同様に培養し、生存性を判定した。

3) 生存性の判定

BMOC-3 液内で 37°C 、2~24 時間培養後、生存していると思われる受精卵子を 1 個ずつ 20 頭の受卵牛に移植し、56 日、90 日後の 2 回にわたる直腸検査で受胎を確認した。移植に供さなかった受精卵子の生存卵は、BMOC-3 液で 37°C で 18~24 時間培養し、拡張した胚盤胞、あるいは、透明帯から脱出中の胚盤胞まで发育したものとした。

自然発情後、性周期の 7 日目の未経産雌牛 20 頭のうち、2 時間培養の 18 例は前報¹³⁾の外筒をつけたフランス製人工授精器 (Cassou gun) で、24 時間培養の 2 例には、前報¹⁷⁾に従って非手術的に移植した。

2. 成績

1) 受精卵子の生存性

12 頭の供卵牛からは、75 個の受精卵子が回収されたが、このうち、部分的変性や发育ステージの若い受精卵子を含めて凍結保存卵は 64 卵であった。これらの 64 卵のうち、53 卵が凍結前に正常と判定されたが、融解後には、これが 21 卵に減少し、14 卵が胞胚腔を保った胚盤

胞で、残り 6 卵が収縮した胞胚腔のある胚盤胞、1 卵が後期桑実胚であった。また、凍結により 10% 前後の部分的傷害を受けたと思われる受精卵子は 7 卵で、このうち 6 卵では、収縮した胞胚腔のある胚盤胞、1 卵が後期桑実胚であった。変性卵子は融解後に 27 卵となり、これらの多くは細胞の輪郭が失われたり、細胞が黒ずんで立体感のないものや、中には細胞塊のみられないものもあった。また、回収されなかった 9 卵は、いずれも変性したものとみなされた。以上の受精卵子のうち、融解後正常な形態をとどめた 20 卵について、移植を目的に BMOC-3 液内で 37°C 、2~24 時間培養したところ、2 時間培養の 18 卵は、いずれも正常な形態をとどめ、24 時間培養の 2 卵は、拡張した胚盤胞に发育した。また、残りの受精卵子については、BMOC-3 液内で 37°C 、18~24 時間培養したところ、8 卵が拡張した胚盤胞、あるいは透明帯を脱出中の胚盤胞に发育した。したがって、受精卵子の生存率は、部分的変性卵子を含む 64 卵中、融解後には、回収されなかった 9 卵を除くと、55 卵中 28 卵 (50.9%) であった。

2) 凍結保存卵子の移植と受胎例

融解後、培養により生存の確認された 20 卵を 1 卵ずつ 20 頭の受卵牛へ移植したところ、6 頭が 56 日、90 日後の 2 回の直腸検査で妊娠と診断された。培養別にみると、2 時間培養の 18 卵は 5 例、24 時間培養の 2 卵では 1 例が妊娠した。供卵牛別では、牛番号 582, 872, 370, 352 の 4 頭で妊娠例が得られ、その割合が 1, 3, 1, 1 例となり、牛番号 564, 141 では妊娠例が得られなかった。妊娠例の得られた 4 頭の供卵牛は、いずれも 15~16 カ月齢で、受卵牛との発情日差は、牛番号 352 が -1 であったほかは、いずれも 0 日調整された例であった。また、凍結保存期間は、牛番号 582, 872, 370, 352

表1 凍結融解後の受精卵の形態 (7~8 日齢卵)

区分	发育段階	正常卵	部分的傷害卵	変性卵	回収不能卵	計
凍結前	16~32 cell	0	2			2
	Morulae	2	2			4
	Brastocyst	51	7			58
	計	53	11			64
融解時	16~32 cell	0	0	1	1	2
	Morulae	1	1	1	1	4
	Brastocyst	20	6	25	7	58
	計	21	7	27	9	64

表2 凍結受精卵の生存率と受胎率

凍結卵数	保存日数 (-196°C)	融解卵数	回収不能卵数	生存卵数	生存率	培養	移植頭数	妊娠頭数	受胎率
64	11~38	64	9	28/55	50.9%*	2~24時間	20	6**	30%

注) *: 生存卵数/回収卵数 **: 82 日目に流産した 1 頭を含む

表3 供卵牛別、凍結受精卵による受胎成績

供卵牛番号	供卵牛の 年 齢	卵の発育 段 階	保存日数 (-196℃)	移 植 供用卵数	受卵牛との 発 情 日 差	受胎例/移植例
582	15ヵ月	Brastocyst	38	2	0	1/6
564	16	Brastocyst	38	2	0	0/2
872	16	Brastocyst	22	7	0	3/7
370	15	Brastocyst	22	1	0	1/1
352	15	Brastocyst	23	1	-1	1/1*
141	12	Brastocyst	11	3	0	0/3

注) *: BMOC-3 液内で 37℃, 24 時間培養後の受胎例

別に、それぞれ 38, 22, 22, 23 日間であった。

3. 考 察

牛受精卵子の凍結保存について、グリセロールが DMSO と同等の保護効果をもつことはすでに報告されている³⁾が、本試験は、これを確認するために実施した。

BILTON ら⁴⁾は、牛受精卵子をグリセロールを用いて、-36℃ まで急速冷却後急速融解を行った場合に、44 個の凍結卵中 21 例が妊娠し、48% の高い生存率を得た。また、LEHN-JENSEN ら⁷⁾も、グリセロールを用いた急速凍結融解法で、12 卵中 10 卵が生存し、このうち 7 卵を移植したところ 5 例 (71%) が妊娠したと報告している。これらの報告に比べると、グリセロールを用いた本試験では、凍結融解後の生存卵は、回収不能卵を除く 55 卵中 28 卵 (50.9%) で、このうち移植した 20 卵では 6 例 (30%) の妊娠にとどまり、生存率の劣る成績であった。とくに、融解後の受精卵子の性状は、正常卵 21、部分的傷害卵 7、変性卵 27 卵となり、BILTON⁴⁾ の 32, 12, 4 卵の割合に比べて変性卵子の占める割合が高かった。これは BILTON⁴⁾ がグリセロールの添加を 35℃ で 6 段階の濃度で行い、回収した受精卵子を凍結の前後を通じて 25% 牛胎児血清加 PBS で保存、培養したのに対し、本試験では、グリセロールの添加を室温において 5 段階の濃度で行い、20% 牛胎児血清加 PBS 内で凍結保存したが、融解後、BMOC-3 液にもどして培養した。このように、グリセリンの添加時における処理温度や添加段階で細かな配慮が欠けていた点、ならびに保存液の変更が、受精卵子に対する浸透圧の変動を来し、生存性に悪影響を与えたものと示唆される。とくに、本試験のように PBS のようなリン酸系の保存液を使用した例では、凍結融解した卵子を重炭酸系の BMOC-3 液にもどして培養する必要があるかどうかなどの検討が必要と思われる。耐凍剤の存在下で、凍結卵の生存性に対する最適融解速度は、その時の冷却速度によって変わることを、および卵の発生段階によって最適の冷却、融解速度の異なることがいわれている⁴⁾。本試験のように、グリセロールの存在下において、卵を毎分 0.3℃ の速度で -30℃、あるいは -36℃ まで冷却したのち液体窒素へ移した場合に

は、急速融解した場合にのみ生存卵が得られている⁴⁾。

本試験では、液体窒素から取り出した受精卵子を直接 20℃ の温水中に投入して融解したが、融解時の温度が 25℃, 37℃ などさまざまに試みられており^{4,7)}、今後、どの温度域が最適であるのか検討する必要があると考える。

WILLADSEN ら²⁰⁾は、牛受精卵子を 1.5 mol-DMSO で -60℃ まで緩慢冷却し、融解も緩慢に行うことにより、12 個の受精卵子のうち 8 例の高い受胎例を得ている。しかし、牛受精卵を -42℃ から液体窒素中に移す中間型の冷却法を用いた場合に、グリセロールでは、緩慢融解、急速融解ともに生存卵が得られたが、DMSO では、緩慢融解で生存卵が得られず、部分的傷害卵での妊娠例は、グリセロールを用いたもののみみられたと報告されている⁴⁾。本試験でも透明帯が破れるなど、一部分に傷害のみられた受精卵子でも受胎例が得られており、この報告と一致した。したがって本法は、いまだ納得のいく結果は得られていないが、緩慢法に比べて時間が短縮でき、融解も簡単にできること、部分的傷害卵でも受胎の可能性などから、現在までのところもっとも実用化に近い方法と考えられる。

受精卵子の発育段階と凍結融解後の生存性とは密接な関係があり、牛受精卵子の発育段階の若いものでは、0℃ の冷却で生存しなかったが、後期桑実胚、胚盤胞では生存性の失われないことが報告されている^{9,15,22)}。角田ら¹⁸⁾は、牛受精卵子において 8~16 および 16~32 細胞卵を凍結した場合、融解後にすべての受精卵子が変性しており、形態的に正常な受精卵子が全く観察されなかったとし、桑実胚および胚盤胞を凍結した場合は、融解後 70% 前後の受精卵子が正常な形態を保有していたと述べている。本試験での受胎例も、すべてが胚盤胞であったことから考えると、牛受精卵子の凍結保存には発育段階の進んだものが適しているものと思われる。いっぽう、マウス、ラットにおける成熟雌から得られた受精卵子は、未成熟雌から得られた受精卵子に比べて凍結融解後の生存性の高いこと¹⁰⁾や、ウサギの桑実胚では、凍結に対する感受性が供卵雌ごとに異なることがいわれている⁹⁾。本試験での供卵牛は、種付前の 12~16 カ月齢のもので、

成熟の域に達していないものが多くを占めた。この未成熟性が、凍結融解後の生存性に関連したかどうかについては、例数が少ないため断定はできないが、受胎成功例が、すべて 15 カ月齢以上の牛由来の受精卵子であり、12 カ月齢の 1 例では受胎しなかったことから考えると、成熟度と個体差とが微妙に影響し合っているように思える。今後、これらの点についても検討を加えていきたい。

稿を終るに当たり、牛受精卵の凍結に関する研修でご指導いただいた畜産試験場の杉江、角田両博士ならびに相馬技官に深謝する。

文 献

- 1) BILTON, R. J., et al.: *J. Reprod. Fert.*, 46, 537 (1976).
- 2) BILTON, R. J., et al.: *J. Reprod. Fert.*, 50, 363 (1977).
- 3) BILTON, R. J., et al.: *Aust. J. Biol. Sci.*, 32, 101~107 (1979).
- 4) BILTON, R. J.: *Proc. 9th Int. Congr. Anim. Reprod. & A. I.*, Madrid, 245~253 (1980).
- 5) 金川弘司: 哺乳動物卵子談話会要旨集, 第 19 回, 東京, p. 13 (1978).
- 6) LEHN-JENSEN, H., et al.: *Theriogenology*, 9, 313 (1978).
- 7) LEHN-JENSEN, H., et al.: *Nord. Vet. Med.*, 32, 523~532 (1980).
- 8) MAVRER, R. R., et al.: *Biol. Reprod.*, 14, 256~263 (1976).
- 9) POLGE, C., et al.: [MAURER, R. R.: *Theriogenology*, 9, 45~68 (1978) より引用] (1974).
- 10) PARKENING, T. A., et al.: *Biol. Reprod.*, 17, 527~531 (1977).
- 11) 杉江 估, ほか: 家畜繁殖誌, 25, 203 (1979).
- 12) 杉江 估, ほか: 畜産試験場年報, 19, 41 (1979).
- 13) 鈴木達行, ほか: 日獣会誌投稿中.
- 14) TROUNSON, A. O., et al.: *J. Anim. Sci.*, 47, 677 (1978).
- 15) TROUNSON, A. O.: [MAURER, R. R.: *Theriogenology*, 9, 45~68 (1978) より引用] (1975).
- 16) 高橋芳幸: 家畜繁殖誌, 27, 40~44 (1981).
- 17) 高橋芳幸, ほか: 日獣会誌, 34, 523~526 (1981).
- 18) 角田幸生, ほか: 家畜繁殖誌, 24, 22~29 (1978).
- 19) WILMUT, I., et al.: *Vet. Rec.*, 92, 686 (1973).
- 20) WILLADSEN, S. M., et al.: *J. Reprod. Fert.*, 52, 391 (1978).
- 21) WHITTINGHAM, D. G.: *Nature (Lond.)* 233, 125~126 (1971).
- 22) WILMUT, I.: [MAURER, R. R.: *Theriogenology*, 9, 45~68 (1978) より引用] (1972).

家畜衛生

毒素原性大腸菌による新生子牛の下痢について

真壁朝光*¹⁾ 松倉文明*¹⁾ 緒方 有*¹⁾ 鎌田 毅*¹⁾ 臼井良一*¹⁾ 岸 善明*¹⁾

長谷川生夫*¹⁾ 中根淑夫*¹⁾ 井上 徹*²⁾ 村松梅太郎*³⁾

(昭和 56 年 12 月 18 日受理)

Diarrhea of Newborn Calves Caused by Toxigenic Colibacilli
TOMOMITSU MAKABE et al. (Livestock Sanitary Laboratory, Prefecture of
Tochigi, Utsunomiya 320, et al.)

SUMMARY

Over a 5-month period beginning with December, 1979, 17 calves were born on two farms to suffer from yellowish watery diarrhea. Of them, fifteen (88.2%) died in 1~3 days. Autopsy revealed no marked changes. Histologically, the small intestine was affected with catarrhal enteritis.

Colibacilli were isolated in a pure form from the brain and other organs. All of them showed a serotype of O101:H-, produced thermostabile enterotoxin, and possessed an immobilized factor, K99 ciliary antigen. Sensitivity was noticed to chloramphenicol, colistin, and oleandomycin. Virological examination gave negative results.

*¹⁾ 栃木県家畜衛生研究所 (宇都宮市戸祭町 2634)

*²⁾ 栃木県西那須野家畜保健衛生所 (栃木県那須郡西那須野町二つ室後)

*³⁾ 栃木県栃木家畜保健衛生所 (栃木市箱森町 22-27)