

学 位 論 文 題 名

ウシ胚の凍結保存に関する研究

－凍害防止剤エチレングリコールの利用と直接移植について－

学位論文内容の要旨

近年、ウシ胚の凍結保存技術に関する研究は精力的に行われ、野外においても凍結保存胚の利用が日常的に行われるようになった。このような中で、凍結胚からの凍害防止剤の希釈・除去技術の簡易化は、野外における凍結保存胚の普及および広域流通の観点から重要である。特に、凍結・融解胚を凍害防止剤を希釈・除去せず移植できる直接移植法の早期確立が急務とされてきた。このような実情を背景に、本研究ではウシ凍結胚の直接移植法の技術確立および普及を目的として、1) 凍害防止剤としてのエチレングリコール (EG) の有効性、2) EGを用いて凍結したウシ凍結胚の直接移植法の有効性に関する野外試験、3) EGを用いて凍結したウシ胚の融解後のEG一段階希釈法、4) 性判別のため顕微操作により透明帯と一部の細胞を除去した胚の凍結保存法について検討した。

1) 供試胚は、過剰排卵処置によって得られた桑実胚～拡張胚盤胞を用いた。凍害防止剤は、1.8M EG、1.8M EG+0.25M ショ糖 (SUC) および1.4M グリセリン (GLY) +0.25M SUCを用いた。また、EGの濃度が受胎率に及ぼす影響を調べるため、1.5および1.8M EGを用いた。胚を収納したストローは、室温から-7℃に設定したプログラムフリーザーのメチルアルコール槽に直接浸漬し、2分後に植氷を行い、引き続き8分間保持した。次いで-25℃または-30℃まで0.3℃/分で冷却したのち液体窒素に投入して凍結した。融解後、胚は凍害防止剤を希釈・除去せず受胎牛に1個ずつ直接移植した。1.8M EG、1.8M EG+0.25M SUCおよび1.4M GLY+0.25M SUCの受胎率は、それぞれ69.0% (20/29)、52.0% (13/25) および60.0% (15/25) で、凍害防止剤の違いによる受胎率の差はみられなかった。また、1.5および1.8M EGの受胎率は45.0% (9/20) および52.9% (9/17) で、両濃度間に受胎率の差は認めら

れなかった。受胎した受胚牛66頭のうち流産した7頭を除き全て正常な子牛を分娩した。

2) 過剰排卵処置を施した黒毛和種牛から得られた後期桑実胚～拡張胚盤胞を用い、野外5地域で凍結と直接移植の試験を行った。胚を収納したストローは、室温から-7℃に設定したプログラムフリーザーのメチルアルコール槽に直接浸漬し、2分後に植氷を行い引き続き8分間保持した。次いで、-30℃まで0.3℃または0.5℃/分で冷却したのち液体窒素に投入して凍結した。凍結胚は、融解したのち凍害防止剤を希釈・除去することなく直接受胚牛に移植した。対照区では、1.4M G L Yを用いて凍結した胚を段階的(G L Y-I)あるいはストロー内で0.3M SUCを用いて希釈・除去(G L Y-II)したのち受胚牛に移植した。合計1,273頭に対して移植を行い545頭(42.8%)の受胎を得た。凍害防止剤別の受胎率は、E Gが42.6% (373/876)、P Gが38.8% (207/533)、G L Y-Iが48.6% (86/177) およびG L Y-IIが46.0% (128/278)であった。E Gの受胎率は、P Gに比べて有意に高く($P<0.05$)、G L Y-I およびG L Y-IIと同等であった。流産および死産頭数の割合は凍害防止剤間に差はなく、奇形等の異常子牛の分娩はみられなかった。また、移植地域($P<0.0001$)、胚の発育ステージ($P<0.001$)、受胚牛の産歴($P<0.0001$) および受胚牛の黄体の形態($P<0.01$)の違いも受胎率に影響を及ぼすことが明らかになった。

3) 過剰排卵処置牛から得られた後期桑実胚～胚盤胞を1.8M E Gとともにストローに収納し、室温から-7℃に設定したプログラムフリーザーのメチルアルコール槽に直接浸漬した。2分後に植氷を行い、引き続き8分間保持したのち-30℃まで0.3℃/分で冷却して液体窒素に投入した。子牛血清加修正ダルベッコリン酸緩衝液(P B S-C S)に投入してE Gを希釈・除去した後の体外培養における生存率を調べた。E Gで凍結した胚の一段階希釈時の温度(22および38.5℃)が生存率に及ぼす影響を調べた結果、38.5℃(50.0%)の生存率は22℃(26.1%)に比べて有意に高く($P<0.05$)、段階的に希釈した対照区(50.0%)と同等の生存率を示した。E Gで凍結した胚を38.5℃下で一段階でE Gを希釈する場合の希釈倍率(6倍および51倍)による生存率の差はなく段階的希釈法と同等であった。また、冷却速度(0.3および0.5℃/分)は38.5℃下で一段階希釈した場合の生存率に影響しなかった。

4) 過剰排卵処置によって得られた後期桑実胚～拡張胚盤胞は、性別別を

行うため顕微操作により透明帯と細胞の一部を除去した。切断溶液としてPBS、PBS+0.2M SUCおよびPBS+ポリビニールピロリドンを用い、金属ブレードを使用して胚の一部を切断し、溶液が切断胚の生存率に及ぼす影響について比較した。その結果、生存率に差は認められなかったが、PBS+0.2M SUCは切断操作が容易であった。PBS+0.2M SUC中で切断操作を行った結果、1個あたり平均12.3個（1～27個）の細胞が採取された。1.8M EGを用いて切断胚を凍結する場合の0.1M トレハロース(TRE)の添加効果を検討した。融解胚は等張液を用いて一段階希釈した結果、EG+TREで凍結した場合、透明帯を除去した無処置胚と同等の高い生存率が得られた。また、EG+TREで凍結・融解した切断胚を直接移植した結果、5頭中2頭（40%）が受胎し、未凍結の切断胚の受胎率（59.4%、19/32）と差異のないことが示唆された。

以上の結果より、EG（1.8M）がウシ凍結胚の直接移植法に有効な凍害防止剤であることが明らかになり、野外実用化試験によりEGを用いた直接移植法は実用性の高い技術であることが実証された。1.8M EGで凍結した胚を、融解後、等張液に直接浸漬してEGを希釈する場合、希釈時の温度が胚の生存率に影響し、38.5℃に加温することにより高い生存率の得られることが明らかになった。性判別を目的とした胚の切断操作（透明帯と一部の細胞の除去）は、生存性に悪影響を与えないことが実証された。また、EGに0.1M TREを添加して切断胚を凍結すると胚の生存率が高くなることも分かった。

本研究によって、EGを用いたウシ胚の凍結および直接移植法の実用性が立証された。また、EGを用いて凍結した胚は融解後に直接等張液に浸漬することにより希釈・除去を省力的に行え、かつ直接移植後の受胎成績を予測できることが示唆された。さらに、TREを添加したEGは、性判別を目的とした顕微操作（切断）を加えた胚の凍害防止剤として有効で、直接移植法に応用できることが示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 金 川 弘 司
副 査 教 授 渡 邊 智 正
副 査 教 授 岩 永 敏 彦
副 査 助 教 授 高 橋 芳 幸

学 位 論 文 題 名

ウシ胚の凍結保存に関する研究

－凍害防止剤エチレングリコールの利用と直接移植について－

申請者は、ウシ胚の凍結保存、とくに凍害防止剤の希釈・除去を行わずに融解胚を受胎牛に移植する直接移植法の開発と確立を目的として、凍害防止剤エチレングリコールを利用した凍結保存に関する研究を行い、以下の成果を得た。

1) 各種の凍害防止剤を用いてウシ胚を凍結保存し、融解後に直接移植した結果、エチレングリコール (1.5あるいは1.8M) は単独で使用しても高い受胎率の得られることを明らかにした。

2) エチレングリコールを用いて凍結保存したウシ胚の直接移植に関する野外実用化試験を行った結果、従来の凍結保存方法 (グリセリンを用いて凍結保存し、融解後にグリセリンを段階希釈あるいはショ糖溶液を用いて希釈してから移植する方法) と同等の受胎成績の得られることを実証した。

3) 凍結保存したウシ胚を体外培養する場合に必要なエチレングリコールの希釈・除去法について検討した結果、融解胚を希釈液に直接浸漬して希釈・除去する場合は希釈液の温度が胚の生存性に影響し、38.5℃の希釈液の使用により高い生存率の得られることを明らかにした。

4) 性別を判定するため透明帯と一部の胚細胞を除去したウシ胚に対するエチレングリコールを用いた凍結保存法について検討した結果、エチレングリコールにトレハロース (0.1M) を添加して凍結を行うと直接移植ができることを示した。

以上のように、申請者はエチレングリコールを用いてウシ胚を凍結保存して直接移植する方法を開発し、その有効性を実証した。また、凍結・融解した胚を希釈液に直接投入してエチレングリコールを希釈・除去する条件および性別判定のために細胞除去操作を加えた胚の直接移植に適した凍結保存条件も明らかにした。よって、審査員一同は申請者が博士 (獣医学) の学位を受ける資格を有するものと認めた。