

# 牛凍結胚のダイレクト法による 移植技術の現状

どうち おさむ  
堂地 修

酪農学園大学酪農学部酪農学科 家畜繁殖学研究室

(〒069-8501 北海道江別市文京台緑町582)

(E-mail : dochi@rakuno.ac.jp)

わが国の胚移植技術の開発・普及の歴史において、1967年から1970年に農林水産省畜産試験場、福島・岩手種畜牧場および栃木県酪農試験場の共同で実施された農林水産技術会議の特別研究「牛の人工妊娠の技術化に関する研究」と1976年に紹介された「カナダ・アメリカにおける牛の胚移植実用化の実際」(金川)は重要な役割を果たした。1982年以降、農林水産省や都道府県による多くの普及事業の中で、技術研修会や施設・整備が計画的に行われ、団体や民間も取り込んだ普及活動も積極的に行われた。そして、わが国の胚移植技術実用化の取り組みは約25年以上が経過した。

今日、胚移植技術の利用は、酪農・畜産を取り巻く激しい状況変化の渦中であって、新たな展開を求められている。例えば、牛乳消費の減少に伴い酪農経営の強化が必要になっている。その対策として、乳用牛に黒毛和種の胚を移植する農家が増えている。また、乳用経産牛の受胎率低下の打開策の一つとして、リピートブリーダー牛(厳密にはリピートブリーダーではない牛も多数含まれている可能性がある)への胚移植による受胎率向上である。このような胚移植の利用を成功させるためには、安定的に良質胚を生産し供給することと受胎率(特に凍結胚)

を高めることが必要である。凍結胚の移植においては、耐凍剤(凍害防止剤あるいは凍結保護物質)の希釈を必要とせず、簡易に移植できるダイレクト法の一層の普及とダイレクト法の受胎率の向上と安定化が大切である。

本稿では、牛凍結胚のダイレクト法による移植について、これまでの諸氏の報告と著者らのデータを引用しながら、受胎率に影響する要因について考える。

## 牛胚の凍結方法

牛胚の凍結技術が開発されて30年以上が経過し、良好な受胎率が得られるようになった<sup>5, 18, 21)</sup>。胚の凍結保存技術は、今日の胚移植において必要不可欠になっている。牛胚の凍結保存技術の開発の歴史は1973年に始まる。当初、ジメチルスルホキシド(DMSO)が耐凍剤として用いられていた。その後、牛胚では主としてグリセリンが使用されてきた。グリセリンは、2%、4%、6%、8%、10%(あるいは3%、6%、10%)のように浸透圧障害を避けるために低い濃度から段階的に10%まで添加し、融解後は最終濃度から0%まで段階的に希釈する方法

が用いられた。これを一般にステップワイズ法と呼んでいる。

野外における凍結胚の利用が増えるにしたがい、より簡易な耐凍剤の除去方法が求められるようになった。ステップワイズ法で耐凍剤を希釈するためには、融解後、ストローから胚を取り出し、グリセリンを希釈しなければならない。そのため、耐凍剤の希釈操作は移植に先立って実験室で行う必要がある。また、受胎牛候補牛の検査も移植に先立って行う必要があり、グリセリンを用いた凍結胚の移植は煩雑な作業をいくつか必要とし、普及上の課題が残っていた。しかし、1982年～1984年に欧州や米国の研究者がシヨ糖溶液を用いてグリセリンを一段階で希釈する方法を相次いで報告した<sup>9, 19, 22)</sup>。米国のLeibo<sup>9)</sup>が報告したグリセリン溶液と胚の入った液層とシヨ糖溶液の入った液層を空気で隔てたワンステップ法は画期的な方法として注目され、わが国でもその実用化に努力が払われた。わが国ではLeibo<sup>9)</sup>の方法にシヨ糖濃度やストロー構成に変更を加えたワンステップ・ストロー法として普及が試みられた。当初、農林水産省福島・日高種畜牧場や都道府県の研究機関で行われた試験移植では良好な受胎率が得られた。著者ら<sup>26)</sup>が行った移植試験においても60% (37/61)の受胎率が得られ、野外での普及が急速に進むものと期待された。しかし、期待に反して移植現場におけるワンステップ・ストロー法の受胎率はなかなか向上しなかった。その原因として、ストローの作成や融解後のグリセリンの希釈操作が煩雑であるため、ストロー操作が適切に実施されなかった可能性が指摘された。すなわち、0.25 mLストローの中にグリセリン液層、空気層、シヨ糖液層を作らなければならないことや融解後ストローを指先で弾くか強振してグリセリン液層とシヨ糖液層を混ぜなければならないため、術者によってストロー操作に大きな差が生じたことが、結果的に受胎率低迷につながったと考えられた。

こうした経験から、ワンステップ・ストロー法より簡易な胚の凍結方法が求められるようになった。

表1 ダイレクト法による牛凍結胚の移植に関する報告

凍害防止剤	受胎頭数/移植頭数(%)	報告者
1.5M DMSO	1/20 (5)	Willadosen <i>et al.</i> (1978)
1.0M GLY	0/10 (0)	高倉と高橋 (1983)
1.4M GLY	2/15 (13)	Suzuki <i>et al.</i> (1990)
1.4MGLY+0.25MSUC	5/10 (50) 14/24 (52)	Massip and Zwalmen (1984) Massip <i>et al.</i> (1987)
1.6MPG(0.25MSUC)	20/33 (61)	Suzuki <i>et al.</i> (1990)
1.8M EG	20/29 (69)	堂地ら(1991)
1.5M EG	12/24 (50)	Voelkel and Hu (1992)

DMSO;ジメチルスルホキシド GLY;グリセロール SUC;シヨ糖 PG;プロピレングリコール EG;エチレングリコール

ワンステップ・ストロー法より簡易な方法とは、凍結精液と全く同じように融解後耐凍剤の希釈操作を一切行わず移植できる方法であった。それが今日ダイレクト法と呼ばれる方法である。

## ダイレクト法の技術開発の歩み

耐凍剤を希釈せず凍結胚を受胎牛に移植する直接移植の試みは、牛胚の凍結に初めて成功した1970年代から既に試みられていた(表1)。Willadsenら<sup>29)</sup>は、DMSOで凍結した胚を融解後DMSOの希釈を行わず移植する試験を行っているが、20頭中1頭の受胎に終わっている。わが国では高橋と高倉<sup>25)</sup>がグリセリンで凍結した胚を同様に移植しても受胎が得られなかったことを報告している。一方、わが国がワンステップ・ストロー法の実用試験に努力を払っていた1980年代中ごろに、既にベルギーのMassip and Zwalmen<sup>11)</sup>は実用的なダイレクト法を発表している。彼らは、10%グリセリンに0.25 Mシヨ糖を加えた凍結媒液を用いて凍結した胚を耐凍剤の希釈をすることなく受胎牛に移植して良好な受胎率を得たことを報告している。その後、Massipら<sup>13)</sup>は1987年の国際胚移植学会においてグリセリンとシヨ糖を用いたダイレクト法の移植試験の結果を詳しく報告した。余談ではあるが、この時彼らは牛胚のガラス化法についても発表しており、Massipらのグループは牛胚の

超低温保存技術の開発に重要な功績を残している。

わが国ではこのMassipとZwalmen<sup>11)</sup>の方法を岐阜県肉用牛試験場グループが最初に追試して報告している。岐阜県肉用牛試験場グループ(大谷ら<sup>20)</sup>)の結果は、融解後耐凍剤を希釈せずに凍結胚を移植して良好な受胎率が得られることを示し、ダイレクト法(当時は無希釈移植法と名づけている)という技術の実用化の可能性も示している。その後、山口大学のSuzukiら<sup>23)</sup>は1,2-プロパンジオールを用いた新しいダイレクト法を報告した。ついで、著者ら(1991)がエチレングリコールを用いた方法を発表(第84回日本畜産学会大会)した。この他にも、家畜改良事業団家畜バイテクセンターや全農ETセンターのグループが改良したダイレクト法を報告している。このように、わが国はダイレクト法の開発においては、他の国に先駆けて取り組みを開始し、今日の普及に至っている。

## ダイレクト法の基本条件

耐凍剤を希釈せず融解胚を受胎牛に移植するダイレクト法で重要なことは、子宮内に移植された胚が浸透圧障害によって生存性を損なわない条件で凍結することである。子宮内に移植された凍結・融解胚が受ける浸透圧障害は、耐凍剤が胚細胞から流出するより早く水が胚細胞内に流入して、胚細胞が過度に膨張するために起こる。このような浸透圧障害は、細胞膜透過性の低い凍害防止剤を用いて胚を凍結した場合に起こりやすい。そのため、ダイレクト法には細胞膜透過性の高い耐凍剤を用いるか、Massipのグループ<sup>11, 12)</sup>のようにシヨ糖などの細胞膜非透過物質を浸透圧緩衝剤<sup>8)</sup>として耐凍剤に加える必要がある。エチレングリコールは牛胚に対する細胞膜透過性が高く、グリセリンの細胞膜透過性は低い<sup>24)</sup>。したがって、エチレングリコールはダイレクト法の耐凍剤として適しているが、グリセリンは単独でダイレクト法の耐凍剤として用いることができない。しかし、シヨ糖を加えれば、グリセリンもダイレクト

法の耐凍剤として使用できる。

## グリセリンとシヨ糖を用いたダイレクト法

先に述べたMassip and Zwalmen<sup>11)</sup>は、グリセリンとシヨ糖を用いたダイレクト法を1984年にVeterinary Record誌に初めて発表している。このときの移植頭数はわずかに10頭であったが、Massipら<sup>13)</sup>は1987年に移植頭数を増やした結果を報告している。この中で、彼らは10%グリセリンと0.25 Mシヨ糖を用いる場合、 $-7^{\circ}\text{C}$ で植氷し10分間保持後、 $-25^{\circ}\text{C}$ まで $0.3^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で冷却すべきであると述べている。液体窒素投入は $-25^{\circ}\text{C}$ が適切で良好な受胎率(51.8%)が得られるが、それ以下の温度では低下(18.2%)すると述べている。液体窒素投入を $-25^{\circ}\text{C}$ で行えば、グリセリンを用いたステップワイズ法と同等の受胎率が得られることも明らかにしている。また、Massip<sup>12)</sup>は、国際胚移植学会の機関誌であるEmbryo Transfer Newsletter上で、10%グリセリンと0.25 Mシヨ糖を用いる場合の植氷温度について、 $-7.5^{\circ}\text{C}$ の方が確実に氷晶形成を誘起できるとして、植氷温度の修正を呼びかけている。

著者が知る限り、Massipらの方法の追試は、大谷ら<sup>20)</sup>や著者ら<sup>1)</sup>の報告意外にほとんど見当たらない。なぜか諸外国では利用されず、特に、北米では注目を集めなかったようである。このことは今でも不思議である。しかし、わが国では大谷ら<sup>20)</sup>の報告以後、家畜改良事業団家畜バイテクセンターの体外受精胚は、Massipらのダイレクト法で凍結されて全国に流通している。著者らが行った家畜バイテクセンターの凍結体外受精胚の移植後の受胎率は良好であったし、家畜バイテクセンターと共同で行った種々の融解培養試験でも良好な生存率が確認されている。結果的にMassipらのダイレクト法の有効性は、わが国において確認されたといえる。

## エチレングリコールを用いたダイレクト法

もう一つのダイレクト法がエチレングリコールを用いた方法である。エチレングリコールが哺乳動物胚の耐凍剤として有効であることを、初めて報告したのは京都大学のMiyamotoとIshibashi<sup>15, 16)</sup>である。彼らは、マウスとラット胚の凍結保存に有効であることを世界で最初に明らかにした。しかし、その後エチレングリコールはウサギ胚の凍結に利用したことが報告されたが、DMSOやグリセリンの影に隠れることになる。また、1982年に牛胚への利用もコロラド州立大学のElsdenら<sup>4)</sup>によって報告されている。Elsdenらの報告でもグリセリンに優る受胎率が得られておらず、その後しばらくエチレングリコールは利用されないまま歳月が過ぎることになる。しかし、1986年北海道大学の浦野ら<sup>27)</sup>は、エチレングリコールがマウス胚の凍結保存に有効であることと、エチレングリコールを希釈することなく融解胚をPBSに直接浸漬しても高い生存性の得られることを明らかにした。この北海道大学グループの報告は、エチレングリコールがダイレクト法の耐凍剤として有効である可能性を示唆したものであった。著者らはこれらの報告を参考にしながら、エチレングリコールを用いた牛胚のダイレクト法の試験を始め、1991年の日本畜産学会で移植成績を公表した。翌1992年、コロラド州デンバーで行われた国際胚移植学会においてアメリカのVoelkel and Hu<sup>28)</sup>が同じくエチレングリコールを用いたダイレクト法を発表した。Voelkel and Hu<sup>28)</sup>は、エチレングリコールの濃度や他の耐凍剤との比較を詳細に行い、エチレングリコールの有効性を世界に伝えた。この後、エチレングリコールを用いたダイレクト法は一気に世界各国に普及した。実はあまり知られていないが、エチレングリコールがダイレクト法の耐凍剤として有効であることをVoelkel and Hu<sup>28)</sup>より一足早く国際的に公表したグループがいた。1991年の第7回欧州胚移植学会

(European Embryo Transfer Association)において、ユーゴスラビアのKocoskiら<sup>7)</sup>が10%エチレングリコールを用いて凍結・融解した胚を培養して、良好な生存率が得られダイレクト移植できること報告している。Kocoskiは、著者が以前勤務していた農林水産省日高種畜牧場で開催していた国際協力事業団の胚移植技術集団研修にユーゴスラビアから参加した研究者である。この研修中にエチレングリコールのダイレクト法を習得して帰国し、直ぐに追試を行いその結果を欧州胚移植学会で発表したのである。おそらく、これが国際学会の場で最初にダイレクト法の耐凍剤としてエチレングリコールが有効であること明らかにした発表であると思われる。

## エチレングリコールを用いたダイレクト法の受胎率

エチレングリコールを用いたダイレクト法の受胎率は、グリセリンを用いたステップワイズ法と差のないことが多く報告されている。著者ら<sup>3)</sup>が行った大規模な野外移植試験においても同様の結果が得られ、欧州でも同様の結果が報告されている<sup>17)</sup>。北米については、1998年のアメリカ胚移植学会の年次大会において、LeiboとMapletoft<sup>10)</sup>が「北米における牛凍結胚のダイレクト法による移植」と題する調査結果を報告している。この調査は1997年にアメリカ38機関、カナダ37機関において実施された移植成績である。約41,000個の胚が移植され、そのうち26,809個がエチレングリコールを用いたダイレクト法により移植され59%の受胎率が得られている。アメリカではグリセリンとエチレングリコールで凍結された胚の数はほぼ同数であるが(表2)、カナダではエチレングリコールで凍結された胚の数がグリセリンの約7倍で、圧倒的にエチレングリコールを用いたダイレクト法が利用されていることが示されている(表3)。両国の調査結果とも、供胚牛の品種に関係なくグリセリンと同等の受胎率がエチレングリコールでも得られている。

表2 1997年のグリセリンまたはエチレングリコールを用いて凍結した牛胚の受胎率の比較 (アメリカ胚移植学会調べ)

品種	グリセリン		エチレングリコール*	
	凍結胚数	受胎率(%)	凍結胚数	受胎率(%)
乳牛	3,337	59.3	5,516	60.3
肉牛	5,868	54.2	3,158	54.5
交雑種	3,206	59.2	6,759	59.0
合計	12,411	56.9	15,433	58.5

\*エチレングリコールはダイレクト法 (Leibo and Mapletoft, 1998)

表3 1997年のグリセリンまたはエチレングリコールを用いて凍結した牛胚の受胎率の比較 (カナダ胚移植学会調べ)

供胚牛品種	グリセリン		エチレングリコール*	
	凍結胚数	受胎率(%)	凍結胚数	受胎率(%)
乳牛	437	54.2	8,190	59.8
肉牛	657	59.2	1,663	59.7
交雑種	515	59.8	1,523	55.2
合計	1,609	58.0	11,376	59.2

\*エチレングリコールはダイレクト法 (Leibo and Mapletoft, 1998)

## エチレングリコール濃度とシヨ糖の添加

現在、エチレングリコールを用いたダイレクト法は8.3% (1.5 M) が主として用いられている。著者らは、当初10% (1.8 M) のエチレングリコールを用いて良好な受胎率を得ていた。その後、濃度の比較を行い、8.3%でも同等の受胎率が得られることを確認したことから、現在は主として8.3%を用いている。

前出のLeiboとMapletoft<sup>10)</sup>の北米の調査結果には、エチレングリコールにシヨ糖を添加した場合の受胎率も示されている。それによるとシヨ糖の添加効果は認められていない(表4)。また、Haslerら<sup>6)</sup>も、1.5 Mエチレングリコールに0.25 Mシヨ糖を加えても生存率は向上しないと報告している。しかし、著者らは表5に示すとおり、0.1 Mシヨ糖を添加する

表4 シヨ糖添加の有無がエチレングリコールを用いたダイレクト法の受胎率に及ぼす影響

凍結媒液	移植胚数	機関数(クリニック数)	受胎率(%)±SD
アメリカ			
EG	5,56	24	55.6±8.9
EG+シヨ糖	10,377	14	55.2±7.1
カナダ			
EG	7,273	24	59.0±7.2
EG+シヨ糖	4,653	13	58.8±6.3

(Leibo and Mapletoft, 1998)

表5 エチレングリコールおよびシヨ糖を用いて凍結・融解した牛体外受精由来胚の生存率

凍害防止剤	凍結胚数	生存胚数(%)	脱出胚盤胞(%)
1.5M EG	59	43 (72.9) <sup>b</sup>	32 (54.2) <sup>d</sup>
1.5M EG+0.1M SUC	51	47 (92.2) <sup>a</sup>	39 (76.5) <sup>c</sup>
1.8M EG	50	33 (66.0) <sup>b</sup>	24 (48.0) <sup>d</sup>
1.8M EG+0.1M SUC	50	44 (88.0) <sup>a</sup>	43 (86.0) <sup>c</sup>

EG:エチレングリコール,SUC:シヨ糖  
a,b,c,d:P<0.05

(堂地と今井,1999)

ことにより融解後の生存率向上を認めている<sup>2)</sup>。胚盤胞や拡張胚盤胞のようにステージの進んだ胚は、後期桑実胚や初期胚盤胞より凍結・融解後の生存率が低い<sup>3)</sup>。その理由として、胚盤胞や拡張胚盤胞は胞胚腔を形成するため、凍結・融解過程で浸透圧障害を受けやすい。そのためシヨ糖を添加することにより凍結前の胚から効果的に脱水し、融解過程では急激な復水を和らげると考えられる。したがって、現在、著者らは8.3%エチレングリコールに0.1 Mシヨ糖を加えることを推奨している。

## 平衡時間が受胎率に及ぼす影響

大谷ら<sup>20)</sup>は、Massipらの方法で凍結した胚を移植する場合、凍結前の凍結媒液への浸漬(平衡)時間が10分以内だと生存率が高いと述べている。しかし、著者らは凍結媒液への平衡時間を30分にしても受胎

表6 耐凍剤溶液への浸漬時間が牛体外受精胚の生存率に及ぼす影響

耐凍剤	浸漬時間(分)	供試胚数	生存胚数(%)	
			24時間	72時間
1.4Mグリセリン	10	167	161(96.4)	152(91.0)
	40	171	160(93.6)	146(85.4)
1.5Mエチレングリコール	10	172	164(95.3)	156(90.7)
	40	180	171(95.0)	168(93.3) <sup>a</sup>
対照区	40	173	161(93.1)	149(86.1) <sup>b</sup>

72時間:脱出胚盤胞数  
a,b:P<0.05

Haslerら(1997)を一部改編

率低下を認めおらず、大谷らと異なる結果を得ている。また、エチレングリコールを用いたダイレクト法では、エチレングリコールの毒性がしばしば議論されるが、著者らはエチレングリコールの明らかな毒性を認めたことがない。Haslerら<sup>6)</sup>は、体外受精胚を1.5 M(8.3%)エチレングリコールに10分と40分間浸漬したのちに凍結・融解し生存率を比較し、浸漬時間の違いによる生存率の差はなかったと報告している(表6)。このことから、ダイレクト法に用いる凍結媒液であるグリセリンとショ糖の混合液およびエチレングリコールともに胚に対する毒性は低く、一般的に利用されている平衡時間(10~30分)を用いても生存率が低下する心配はないと思われる。そのため、平衡時間は凍結処理する胚の個数によって多少変動すると思われるが、胚の生存性と凍結処理作業の効率の観点から10~20分間の平衡時間が適当であると考えられる。

## 融解後の経過時間が受胎率に及ぼす影響

大谷ら<sup>20)</sup>は融解後5分以内に移植を行うと受胎率が高いと述べている。同様に多くの技術者がダイレクト法で凍結胚を移植する場合、融解後できるだけ早く移植すべきであると考えている。その理由として、融解した胚を凍結媒液の中に長時間保持すると、おそらく浸透圧と化学毒性の高い環境下に曝される

ため生存性が損なわれると理解されている。しかし、農家で移植を行う場合、必ずしも移植しやすい環境が整っていない。そのため、融解後5分以内に移植できない場合も多々ある。そこで、著者らは家畜バイテクセンターと共同で、Massipら<sup>11, 13)</sup>の方法で凍結保存した体外受精胚1,620個を用いて、融解後の経過時間(0~45分)と環境温度(-15~35℃)が生存率に及ぼす影響を調べた。この実験では54グループ(各30個の胚を使用)を配置して実験を行った。

その結果、いずれのグループ間にも生存率(70~100%)の有意な差は認められなかった。すなわち、融解後の経過時間が短いほど生存率が高くなり、長くなるほど生存率が低下するというような傾向も認められなかった。同様に温度の影響も認められなかった。

エチレングリコールを用いた場合の融解後の経過時間と生存率の関係について、Matoba<sup>14)</sup>ら(2004)は、1.5 Mエチレングリコールと0.1 Mショ糖を用いて凍結した体外受精胚を融解後、26℃と38.5℃の温度下に0, 10, 20, 30および60分間放置して、融解後の経過時間と環境温度が生存率に及ぼす影響について検討している。その結果、26℃下では30分まで、38.5℃下では20分まで、有意な生存率の低下は認められていない。

これらの結果から、10%グリセリンと0.25 Mショ糖も8.3%エチレングリコールと0.1 Mショ糖のいずれのダイレクト法においても、融解後、おおよそ15~20分を目処に移植を終えれば、気温が低い時でも高い時でも、融解後の経過時間が受胎率に影響することはないと考えられる。

しかし、融解後の経過時間と受胎率の関係を調べた国内の報告を見ると、やはり経過時間が長くなるほど受胎率が低下する傾向が多く示されている。これには、移植技術が強く影響している可能性がある。通常、熟練した技術者は移植器を腔内に挿入してから5分以内に移植操作を終えることができる。移植に10分以上を要する場合は、子宮頸管の通過や子宮内深部への挿入に手間取ることが多いし、子宮内を

損傷させる可能性も高い。そのため、融解後の経過時間が長くなれば受胎率が低下すると理解されることもあり得ると思われる。したがって、このような調査を行う場合は、しっかりした実験計画を立て、実験管理を正確に行って確かめる必要がある。

## おわりに

ダイレクト法の受胎率は、ここ十数年で向上してきたことは確かだが、少なくともまだ5%以上の向上が必要である。北米では60%近い受胎率が得られており、わが国も受胎率が向上する可能性は十分にあり、これまで凍結条件の検討にも多くの努力が払われてきたが、まだ、検討すべきことが残されている。しかし、胚の凍結に関する研究は年々少なくなっており、研究体制の再構築も重要である。また、移植技術者が正しい知識と手技を身に付け、移植現場で正しい技術を実行できなければならない。参考資料として巻末に著者らが普段使用しているダイレクト法のマニュアルを付けた。移植業務に従事している方々の参考になれば幸いである。

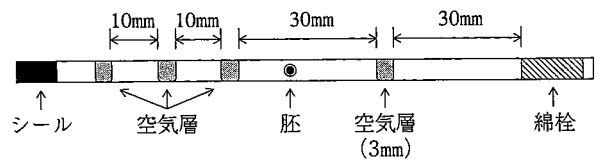
## 引用文献

- 1) DOCHI O, IMAI K, TAKAKURA H : Anim Reprod Sci, 38, 179-185 (1995).
- 2) 堂地 修, 今井 敬 : 日本胚移植学雑誌, 21, 28 - 34 (1999) .
- 3) DOCHI O, YAMAMOTO Y, SAGA H, *et al* : Theriogenology, 49,1051-1058 (1998).
- 4) ELSDEN RP, SEIDEL GE Jr, TAKEDA T, *et al* : Theriogenology, 17, 1-10 (1982).
- 5) FAHNING MI, GARCIA MA: Cryobiology, 29, 1-18 (1992).
- 6) HASLER JF, HURTGEM PJ, JIN ZQ *et al* : Theriogenology, 48, 563-79 (1997).
- 7) KOCOSKI LJ, DOUCHI O, CHAN H *et al*: In, Proc 7th Ann Conv EETE , 1991, Cambridge, England.
- 8) LEIBO SP, MAZUR P : In, Daniel JC Jr (ed), Methods in Mammalian Reproduction, Academic Press, New York, pp 179-201 (1978).
- 9) LEIBO, S.P : Theriogenology 21, 767-790 (1984).
- 10) LEIBO SP, MAPLETOFT RJ : In: Proc 12th Ann Conv AETA, 1998, San Antonio, TX.
- 11) MASSIP A, VAN Der Zwalmen P : Vet Rec, 115, 327-328 (1984).
- 12) MASSIP A : Embryo Transfer Newsletter, 14, (3), 33 (1996) .
- 13) MASSIP A, VAN Der Zwalmen P, ECTORS F: Theriogenology, 27, 69-79 (1987).
- 14) MATOBA S, IMAI K, MIMAKI Y *et al* : Reprod Fert Dev, 204, 16, 175 (2004) .
- 15) MIYAMOTO H, ISHIBASHI T : J Reprod Fert, 50, 373-375 (1977).
- 16) MIYAMOTO H, ISHIBASHI T : J Reprod Fert, 54, 427-432 (1978).
- 17) NIBART M, HUMPLOTT P : Theriogenology, 47, 371 (1997).
- 18) NIEMANN H : Theriogenology, 35, 109-124(1991).
- 19) NIEMANN H, SACHER B, SCHILLING E *et al* : Theriogenology, 17, 102 (1982).
- 20) 大谷健, 向島幸司, 内海恭三ら : 家畜繁殖技術研究会誌, 11, 14-19 (1989).
- 21) PALASZ AT, MAPLETOFT RJ : Biotechnol Adv, 14, 127-149 (1996).
- 22) RENARD JP, HEYMAN Y, OZIM JP : Ann Med Vet, 126, 23-32 (1982).
- 23) SUZUKI T, YAMAMOTO M, OOE M, *et al* : Theriogenology, 34, 1051-1057 (1990).
- 24) SZELL A, SHELTON JN, SZELL K : Cryobiology, 26, 297-301 (1989).
- 25) 高橋芳幸, 高倉宏輔 : 北海道牛受精卵移植研究会報, 2, 28-30 (1983).
- 26) 高倉宏輔, 高橋博人, 堂地 修ら : 北海道牛受精卵移植研究会報, 6, 42-44 (1987).
- 27) 浦野浩司, 高橋芳幸, 金川 弘司ら : 家畜繁

殖誌, 32, 130-133 (1986).

28) VOELKEL SA, HU X : Theriogenology, 37, 23-37 (1992).

29) WILLADSEN S, POLGE C, ROWSON LEA : J Reprod Fertil, 52, 391-393 (1978).



ダイレクト法のストロー構成

## <資料>

ダイレクト法による牛受精卵の凍結方法

1. 10%グリセリン (GLY) と0.25 Mショ糖 (SUC) を用いた方法

1) 凍結媒液の調整

10%GLY+0.25 M SUCを80mL調整する

- ① 100 mLのメスシリンダーを用意する
- ② SUC8.558 gをメスシリンダーに入れる
- ③ 20%血清 (CS) を含まないPBSを30~40 mLまでメスアップする
- ④ グリセリン10 mLを加える
- ⑤ 20%血清を含まないPBSで80 mLまでメスアップする
- ⑥ パラフィルムでシールし転倒混和する
- ⑦ ろ過滅菌して, 8 mLずつ試験管に分注して-20℃に凍結保存する
- ⑧ 使用の際に2 mLのCSを添加しろ過滅菌する

2) 添加および平衡

- ① 供胚牛より回収した胚は血清を添加したPBS等で数回洗浄する
- ② 洗浄した胚を10%GLY+0.25 M SUC溶液に移しストローに吸引する
- ③ 平衡時間は10~20分間を目処にする  
(注意: 胚を別の溶液に移す場合はできるだけ少量の溶液と共に移す)

3) 冷却および凍結方法

- ① 胚を吸引したストローを予め-7℃に温度設定した凍結器のチャンバーに移す
- ② -7℃に移し30~60秒後に強制植氷を行い, 計10~15分間保持する

③ -7℃から-25℃まで毎分0.3℃で冷却する

④ -25℃で液体窒素に投入して凍結を完了する

4) 融解および移植方法

- ① 液体窒素からストローを取り出し空気中で10秒間保持する
- ② 30℃の微温湯に10~30秒間, 氷が完全に融解するまで浸ける
- ③ ストローを微温湯から取り出し, アルコール綿花でよく拭く
- ④ 移植器にセットし, 融解後15分以内を目処に移植を終える

2. 8.3%エチレングリコール (EG) と0.1 Mショ糖 (SUC) を用いた方法

1) 凍結媒液の調整

8.3%EG+0.1M SUCを80mL調整する

- ① 100 mLのメスシリンダーを用意する
- ② SUCを3.423 gをメスシリンダーに入れる
- ③ 20%血清 (CS) を含まないPBSを30~40 mLまでメスアップする
- ④ EGを8.3 mL加える
- ⑤ 20%血清を含まないPBSで80 mLまでメスアップする
- ⑥ パラフィルムでシールし転倒混和する
- ⑦ ろ過滅菌する
- ⑧ 8 mLずつ試験管に分注して-20℃に凍結保存する
- ⑨ 使用する際に2 mLのCSを添加し, ろ過滅菌して用いる

2) 添加および平衡



① 供胚牛より回収した胚はPBSで数回洗浄する

② 洗浄した胚を8.3% EG+0.1 M SUC溶液に移しストローに吸引する

③ 平衡時間は10~20分間

(注意：胚を別の溶液に移す場合はできるだけ少量の溶液と共に移す)

### 3) 冷却および凍結方法

① 胚を吸引したストローを予め-7℃に温度設定した凍結器のチャンバーに移す

② -7℃に移し30~60秒後に強制植氷を行い、計10~15分間保持する

③ -7℃から-30℃間で毎分0.3℃で冷却

する

④ -30℃で液体窒素に投入して凍結を完了する

### 4) 融解および移植方法

① 液体窒素からストローを取り出し空気中で6秒間保持する

② 30℃の微温湯に10~30秒間、氷が完全に融解するまで浸ける

③ ストローを微温湯から取り出し、アルコール綿花でよく拭く

④ 移植器にセットし、融解後15分以内を目処に移植を終える