東北農業研究（Tohoku Agric. Res.）43, 177－178（1990）

牛受精卵の短期保存法に関する試験

相沢健一・嵯峨久光・斉藤昌昭*・与斉俊雄

（秋田県畜産試験場・*大曲農業改良普及所）

A Short-term Preservation of Bovine Embryos at 4℃

Kenichi AIZAWA, Hisamitsu Saga, *Masaaki SAITO and Toshio YOSAI

(Akita Prefectural Experiment Station of Animal Industry・*Oomagari Agricultural Extension Service Station)

1 はじめに

牛受精卵の凍結保存技術は，各場所で研究が進められ，その技術は年々向上してきているが，凍結・融解時の卵細胞への傷害などによってその生存性が損なわれる場合があり，新鮮卵移植と同等の受胎率を期待することが難しい現状にある。特に，低ランク卵ほどこの傾向が顕著に現れるためその有効利用法が各研究機関で問題となっている。

そこで，受胎率の向上と受精卵の効率的利用を図るため低温（4℃）による短期保存法について検討した。

2 試験方法

(1) 試験期間

1987年3月から1990年3月

(2) 供試卵

当場繋養の黒毛和種雌牛16頭に過剰排卵処置をし，人工授精後，7～7.5日目に採取した後期桑実胚（Compact morula）から胚盤胞（Blastocyst）までのA～Cランクの牛受精卵28個を表1に示すとおり供試した。

表1 供試卵の内訳

発育ステージ	ランク	供試卵数
後期桑実胚（CM）	A	6
	B	6
	C	7
初期胚盤胞（EB）	A	3
	B	2
	C	−
胚盤胞（B）	A	4
	B	−
	C	−
小計	A	13
	B	8
	C	7
計		28

(3) 受精卵の保存方法及び保存日数

D－PBSに10%FCSと0.3%BSA及び抗生物質を加えた保存液の牛受精卵を，図1のとおり0.25mℓストローに吸引した後，図2に示したように0.5mℓストローに詰めて2重ストローとした。次に，図3に示すように850mℓ容のポリ容器に700mℓの水を入れ，冷蔵庫で4℃に予め冷やした後，2重ストローを浸漬して1～2日間低温（4℃）保存した。

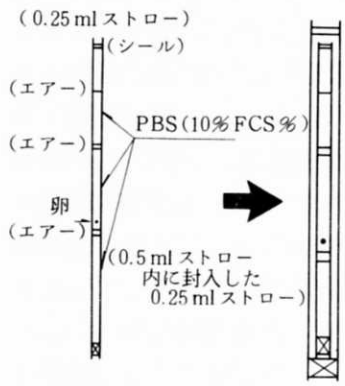

図1 受精卵封入方法

図2 二重ストロー

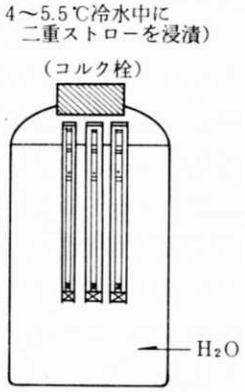

図3 保存方法

(4) 受卵牛及び移植

秋田県内の農家繋養自然発情雌牛22頭を受卵牛とし，1～2日間低温保存した28個の牛受精卵を移植した。

(5) 保存液の温度変化の測定

2重ストロー（保存液：室温），0.25mℓストロー（保存液：室温）及び10mℓ試験管（保存液：4℃）を4℃の水（本法），クラッシュアイス[2]及び水（室温）[3]に浸漬した後，冷蔵庫内で自動温度記録計を用い各々の温度変化を測定した。

3 試験結果及び考察

(1) 受精卵の4℃保存日数と生存率

受精卵の4℃保存日数と生存率を表2に示した。1日及び2日低温保存した卵数は，21及び7個であり，低温保存後の生存率はともに100%であった。

表2 受精卵の4℃保存日数と生存率

保存期間（日）	保存卵数（個）	生存卵数（個）	生存率（%）
1	21	21	100
2	7	7	100
計	28	28	100

しかし，2日低温保存した7個中2個は卵細胞実質が収縮した状態で観察された。

なお，生存，変性退行等の判定は，金川[1]の判定基準に準じ形態学的に行なった。

(2) 発育ステージ別移植成績

発育ステージ別移植成績を表3に示した。桑実胚（CM）は，15頭中10頭が受胎（受胎率66.7%），胚盤胞（EB～B）では，7頭中4頭が受胎（受胎率57.1%）し，前者の受胎率が若干高い傾向にあった。

(3) 保存日数別移植成績

保存日数別移植成績を表4に示した。1日及び2日低温保存後の受胎率は，75.0%（12／16）及び33.3%（2／6）で，2日低温保存の受胎率が低下する傾向にあった。

また，試験期間中に行なった新鮮卵移植（受胎率72.5%，29／40）と1日低温保存卵移植との間に差はなく，1日低温保存卵は高い受胎性を保持したまま保存されることが認められた。

表3　発育ステージ別移植成績

発育ステージ	移植頭数 (A)	受胎頭数 (B)	受胎率 (B)/(A)×100 (%)
桑実胚（CM）	15（4）	10（4）	66.7（100）
胚盤胞（EB～B）	7（2）	4（1）	57.1（50.0）
計	22（6）	14（5）	63.6（83.3）

注．（　）内数値は，2卵移植成績で内数

表4　保存日数別移植成績

保存日数	移植頭数 (A)	受胎頭数 (B)	受胎率 (B)/(A)×100 (%)
新鮮卵移植	40（14）	29（11）	72.5（78.6）
1日	16（5）	12（5）	75.0（100）
2日	6（1）	2（0）	33.3（0）
計	22（6）	14（5）	63.6（83.3）

注．（　）内の数値は，2卵移植成績で内数

(4) 保存液の温度変化

保存液の温度変化が牛受精卵に及ぼす影響について若干の検討を行なった。

Lindner&Ellis[3]は，447個の牛受精卵を予め4℃に冷やした10%NBCS（新生子牛血清）加PBS 2 mℓを試験管に入れ，200mℓの水（室温）に浸漬し，4℃で0，1，2，3日間保存後，移植を行ないそれぞれ，47%，45%，41%，44%の生存率であったと述べている。また，Leibo & Winninger[2]は，324個の牛受精卵を0.25mℓストローに充填し，これを魔法瓶に入れ周囲にクラッシュアイスを詰めて，12～24時間以内に移植を行なったところ57.7%の受胎率であったと報告している。

図4にLindner & Ellisの方法，Leibo & Winningerの方法及び本法における保存液の温度変化を示した。

Lindner&Wllisの方法は110分以上，Leibo&Winningerの方法は約45秒，本法は約90秒で冷却曲線が安定した。

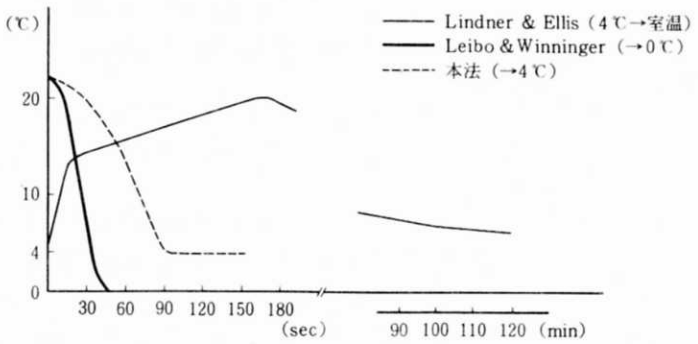

図4　保存液の温度変化

このことから，Lindner&Wellisの方法は緩徐に，また逆にLeibo&Winningerの方法及び本法は急速に温度が降下することが認められた。各方法における1日低温保存後の受胎率（Lindner&Wellis；45%，Leibo&Winninger；57.7%，本法；75.0%）は，それぞれ安定した成績である。

また，本法における1日低温保存後の生存率が100%であることから，少なくとも1日低温保存では，保存開始温度及び冷却速度は，牛受精卵の受胎性にほとんど影響を及ぼさないものと推察された。

今後，低温保存2日目に観察された卵細胞実質の収縮の原因を早急に解明することを含め至適な低温保存条件を確立することが急務であると思われる。

4　ま　と　め

(1) 受精卵の4℃保存日数と生存率

牛受精卵を4℃で1日（21個）及び2日（7個）保存したところ，生存率はともに100%であった。

(2) 発育ステージ別移植成績

桑実胚は15頭中10頭が受胎（受胎率66.7%），胚盤胞7頭中4頭が受胎（受胎率57.7%）し，前者の受胎率が若干高い傾向にあった。

(3) 保存日数別移植成績

1日及び2日低温保存後の受胎率は，75.0%（12／16）及び33.3%（2／6）であった。また，試験期間中に行なった新鮮卵移植（受胎率72.5%，29／40）と前者との間に差はみられなかった。

引　用　文　献

1) 金川弘司．1988．牛の受精卵（胚）移植＜第2版＞．近代出版．p. 60－69，101－102.

2) Leibo. S. P, ; Winninger. D, 1986. Production of bovine pregnancies from transported at 0 ℃ by air. Theriogenology 25 : 165.

3) Lindner. G. M, ; Ellis. D. E, 1985. Refrigeration of bovine embryos. Theriogenology 23 : 202.

4) 嵯峨久光，相沢健一，斉藤昌昭，与斉俊雄．1989．牛受精卵の短期保存法に関する試験．秋田畜試研報　4：29－32.