



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	20℃, 0℃および-196℃に冷却した馬胚の生存性
Author(s)	山本, 裕介; 小栗, 紀彦; 八戸, 芳夫
Citation	北海道大学農学部附属牧場研究報告, 10, 1-13
Issue Date	1981-09-01
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/48902
Type	departmental bulletin paper
File Information	10_1-13.pdf



20℃, 0℃および-196℃に冷却 した馬胚の生存性

山本 裕介・小栗 紀彦・八戸 芳夫

(北海道大学農学部)

緒 論

哺乳動物における胚移植の最初の成功は、家兎で達成され(Heape, 1890), その後, 現在までの約 90 年間に牛, 馬, 緬羊, 山羊の家畜およびラット, マウス, ハムスター, モルモット, フェレット, ミンク, イヌ, ネコ, サルなど, 多くの哺乳動物で胚移植の成功例が報告されている。胚移植の技術を畜産に応用した場合, 特定の雌畜の産子を多数生産することが可能となり, 遺伝的および経済的効果が期待できるほか, 需要が急激に増加した特定の品種や絶滅に瀕している品種の増産, あるいは卵管閉塞, 子宮内膜炎等が原因の不妊雌畜からの子畜生産, さらに胚を輸送することによって望む家畜の経済的移動が可能となり, 防疫効果も期待できる。

胚移植は過排卵の誘起, 胚の採取, 胚の保存, donor と recipient との排卵同期化, 胚の移植の諸技術から成り立っており, それぞれの技術改善は, 移植後の受胎成績の向上に影響する。特に確実な胚の保存技術が開発されれば, 雌畜の有効利用を中心に胚移植の実用的意義がさらに増大し, 遺伝子の半永久的保存が可能となり, その効果は計り知れない。

Whittingham (1971) が凍結保護剤として PVP (polyvinylpyrrolidone) を用いて, マウス胚を -79℃ で 30 分間保存し, 凍結胚よりの最初の産子生産を発表し, 続いて Whittingham ら(1972) および Wilmut (1972 a) が, DMSO (dimethylsulfoxide) を凍結保護剤として凍結保存したマウス胚から極めて高い生存率を得るまでは, 凍結融解後の家兎胚より発育した胎児に関する報告が見られるにすぎなかった(Ferdows ら, 1958)。一方, 0℃ ~ 20℃ の温度域における哺乳動物の胚の保存に関する研究は多数報告されており, その最初の報告は, Chang (1947) によるもので, 家兎胚を 5℃ ~ 10℃ の同種血清中で 80 時間 ~ 101 時間保存し, 移植により正常産子を得ている。その後, マウス (Whittingham and Wales, 1969) で 5℃, ラット (菅原・竹内, 1962) で 5℃ ~ 10℃, 家兎 (Chang, 1948; Hafez, 1965) で 10℃, 緬羊 (Averill and Rowson, 1959; Kardymowicz ら, 1963; Kardymowicz ら, 1964; Kardymowicz ら, 1966b; Moore and Bilton, 1973; Renard ら, 1976) で 5℃ ~ 10℃, 牛 (Wilmut ら, 1975; Trounson ら, 1976a; Trounson ら, 1976b; Willadsen ら, 1978; Kanagawa, 1980) で 0℃ および室温 (18 ~ 25℃) で, 比較的良好な胚の保存が報告されており, 14 日間生存した家兎胚の報告例もある (Hafez, 1965) が, 一般に, この温度域では長期間の保存は期待できない。

Wittingham ら (1972) および Wilmot (1972a) のマウス胚の凍結保存の成功に続いて、その報告と同様の手順が他の動物でも採用され、牛 (Wilmot and Rowson, 1973), 家兎 (Bank and Maurer, 1974), ラット (内海・湯原, 1974), 緬羊 (Willadsen ら, 1974), 山羊 (Bilton and Moor, 1976), ハムスター (角田ら, 1979) の胚で凍結保存が可能であることが示された。しかし、馬における凍結保存に関する報告は見当たらず、胚移植前に 30℃ で短時間保存した胚から発育した子馬 (Oguri and Tsutsumi, 1974) ならびに受胎例 (Allen and Rowson, 1975), および結紮した家兎卵管内に保存し、英国からポーランドまで輸送した胚からの受胎例 (Allen ら, 1976) が報告されているにすぎない。

本研究では、現在までに成功している哺乳動物胚の凍結保存の方法に準じて、馬胚の凍結保存を試み、融解した胚を recipient に移植したが、受胎例を得るには至らなかった。一般に胚の凍結融解過程で考えられる胚の生存性低下の主要な原因としては、胚の発育程度、最終到達温度、凍結保護剤の添加および除去、冷却速度および加温速度、氷晶形成などの影響が考えられるので、馬胚の凍結保存失敗の原因を段階を追って検討するために、20℃ および 0℃ に冷却した馬胚を recipient へ移植して、その生存性を調べるとともに、20℃ および 0℃ における馬胚の保存も試みた。

材 料 と 方 法

北海道大学農学部附属牧場 (静内町) および石川どさんこ牧場 (洞爺村) で繋養する 2.5 歳から 23 歳までの北海道和種の牝馬を用いて、1979 年、1980 年の繁殖季節に実験を行なった。供試馬における排卵の確認は直腸検査によって行ない、donor に予定した牝馬は発情期に排卵が確認されるまで 1 日おきに 1 回～3 回交配した。

胚 の 採 取

Rowson and Dowling (1949) が牛用に開発した 3 way 式の胚採取器を馬用に改造した器具を用いて、排卵後 6 日目 (144 時間～168 時間) および 8 日目 (192 時間～216 時間) に子宮洗滌を行ない、初期胚盤胞または胚盤胞を採取した。すなわち、梓場に保定した donor に鎮静のために体重 100 kg 当り 1 ml のプロピオニール・プロマジン剤 (Combelen, Bayer) を筋注した後、胚採取器の先端を陰經由で子宮頸管に挿入し、その先端部に装着してあるゴム風船が子宮内口を通過する位置まで進め、ゴム風船に空気を封入して膨らませる。ついで 35℃ に加温してある生理的食塩水 (含 2%ゼラチン) を約 1 m の落差で、内管を通して子宮内に注入し、子宮を膨満させた後、注入を中止して直腸内の手で子宮をマッサージしながら洗滌液を、35℃ に保温した三角フラスコに、内管と外管の間隙を通して回収する。1 回の胚採取には 1500 ml の洗滌液を用意し、注入および回収の操作を 2 回～3 回繰り返した。8 日目胚は肉眼で認められる大きさなので洗滌液中より容易に回収できるが、6 日目胚は肉眼では認められない。そこで 6 日目胚の場合は、回収液の入った三角フラスコに分注装置を装着し、室温下で 10 分間～20 分間倒置し

て胚の沈降を待ち、その後回収液を下部から順に約 10 ml ずつシャーレに取り出して実体顕微鏡下で検索した。検出後胚は、その時の回収液と同じ温度の、ペニシリン (100 IU/ml) およびストレプトマイシン (100 μ g 力価/ml) を含む Dulbecco の PBS (phosphate buffered saline; Grand Island Biological Co.) または TCM199 (tissue culture medium 199; 千葉血清研究所) で 3 回洗滌した。

胚の冷却および加温

馬胚の凍結保存は、Whittingham ら (1972) および Wilmut (1972a) が報告したマウス胚での方法に準じて行ない、排卵後 6 日目の胚 7 個と 8 日目胚 9 個を供試した。その手順の概要は、図 1. に示した通りである。6 日目胚と 4 個の 8 日目胚の凍結には保護剤として DMSO を用い、残り 5 個の 8 日目胚ではグリセリンを用いた。35℃ の PBS で 3 回洗滌した胚を 1 ml の PBS が入っている 13×100 mm のネジ蓋付バイレックス試験管 1 本につき 1 個の割で移し、35℃ から 20℃ までを分速 0.2℃~1.7℃ の速度で冷却した。20℃ で、1.5 M の DMSO を含む PBS を段階的に添加し (DMSO 濃度 0.5 M 10 分間; 1.0 M 10 分間; 1.5 M 30 分間)、50 分かけて凍結保護剤の平衡を行なった。グリセリンを凍結保護剤とした場合は、グリセリン濃度 0.5 M 10 分間; 1.0 M 30 分間、合計 40 分の平衡時間を設けた。凍結保護剤の平衡を終えた胚は最終濃度の凍結保護剤を含む PBS 0.2 ml~0.3 ml とともに別の 13×100 mm のネジ蓋付バイレックス試験管に採り、この試験管を低温パスサーキュレーター (NESLAB Instrumenta, Inc.) 中で、植氷温度 -5℃ まで分速 0.5℃~1.0℃ で冷却した。あらかじめ液体窒素中に浸漬しておいたガラス管を試験管の外壁に触れて植氷し、-5℃ に 10 分間保持した。胚の入っている試験管をメタノールバス (図 2.) 中へ移し、-5℃ から -70℃ までを分速 0.17℃~0.22℃ の速度で冷却し、-70℃ で試験管を液体窒素に直接浸漬した。-196℃ で 1~30 日間保存した後、胚を含んだ試験管を 1000 cc ビーカーに採った -70℃ のメタノール (300 ml~500 ml) に浸漬すると同時にこのビーカーを 20℃~60℃ の水槽に入れて、-70℃ から -10℃ までを分速 1.4℃~10.0℃ の速度で加温した。-

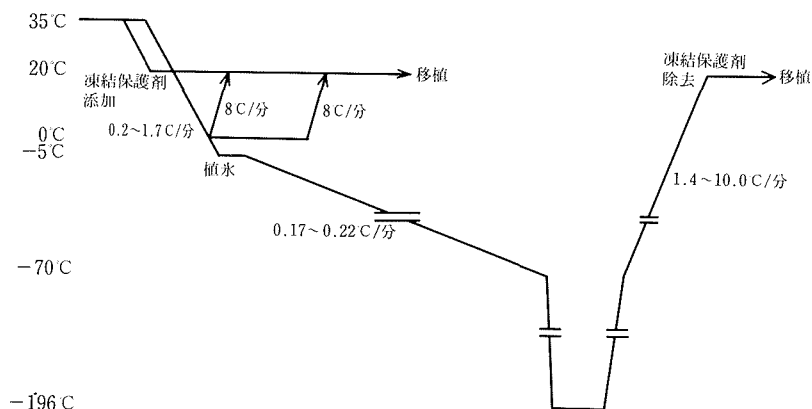


図 1 冷却、加温手順の概要

10℃に達した時点で試験管を20℃の恒温槽に移すことによって、分速約8℃で加温し、融解したmediumにPBSを段階的に加えて(DMSO: 1.25M, 1.00M, 0.75M, 0.50M, 0.25M 各10分間; グリセリン: 0.5M 10分間), 凍結保護剤の濃度を希釈し、その除去を行なった。

凍結前の馬胚の耐冷性を検討するために、PBSまたはTCM199中で8個の8日目胚を20℃まで冷却し、8分間～550分間の保存を試み、さらに6個の8日目胚をPBS中で0℃に冷却して、0～20.3時間保存した。なお、20℃に冷却した3個の8日目胚は、20℃の水を入れた精液保存器(富士平K.K.)内に収容して、静内町・洞爺村間220kmを鉄道により輸送した。

DMSOが胚の生存性に及ぼす影響を調べるために、6個の8日目胚および2個の6日目胚では、20℃で、凍結融解過程と同様の方法によりDMSOを添加除去した。

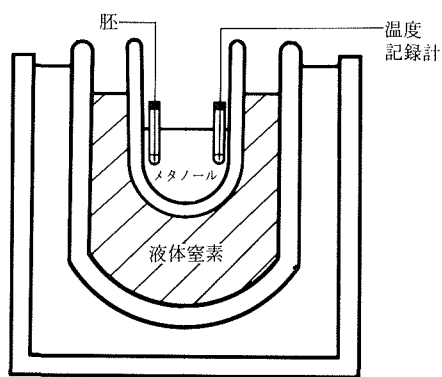
処理胚の生存性の判定

それぞれの処理を終えた胚の生存性は、小栗ら(1975)の頸管経由法により処理胚を移植し、recipientのその後の受胎の成否によって判定した。recipientを梓場に保定し、鎮静剤を投与した後、膣を膣鏡で開口し、あらかじめ0.2mlのmediumとともに胚を吸引してあるプラスチック製のピペット(外径5mm, 長さ40cm)を直接頸管に挿入し、その先端が子宮角中央部にあることを直腸側の手で確認してから他端に装着してあるキャップを圧して、mediumとともに胚を注入した。なお、6日目胚の移植は排卵後4日目～6日目の牝馬、すなわち胚と子宮との同期化の程度が、-2日～0日である牝馬をrecipientとして行ない、また8日目胚は排卵後5日目～9日目、すなわち-3日～+1日のrecipientに移植した。PBS中の6日目胚は器具の壁面に粘着し易いので、これを防止するために、56℃で30分間熱処理した馬血清を20%の濃度でPBSに添加した。

受胎の確認は、排卵後30日を経過したrecipientの直腸検査によって行なった。

結 果

凍結保護剤にDMSOを用いて液体窒素中で保存した7個の6日目胚の内、2個では融解後DMSOを除去した時点で透明帯に小さな損傷が認められたが、他の5個では特に形態的な異常は認められなかった。しかし、大部分の8日目胚ではDMSO除去後に、処理前と比較して栄養膜がやや不透明となり、透明帯および栄養膜が数ヶ所で陥没を示したほか、透明帯が破損して栄養膜が飛散した胚も1例見られた。凍結保護剤にグリセリンを用いた5個の8日目胚でも同



液体窒素中にメタノール（500ml）の入った内径100mm, 外径115mm, 深さ125mmの魔法瓶を浮かした。

図2 凍結装置の模式図

様の変化が見られたが、その程度は僅かであった。

凍結保存した胚の生存性を検討するために、破損した1個を除く7個の6日目胚および8個の8日目胚を recipient へ移植したが、受胎を確認することはできなかった。

20℃に冷却して保存した8日目胚および、輸送した8日目胚の生存性は、表1. に示してある。20℃で9分間〜79分間保存した8日目胚を移植した5頭の recipient の内、2頭が受胎した。20℃に保ち、PBS または TCM 199 で輸送した8日目胚3個の内、medium にPBS を用いた胚1個が移植により正常な産子に発育した(写真1.)。この胚の保存時間は9時間10分であった。移植時における胚と recipient の同期化の程度は受胎した3例とも−2日であった。なお、20℃で保存した胚では特に形態的变化は認められなかった。

0℃に冷却して保存した8日目胚の生存性は表2. に示した通りである。7時間44分および20時間16分保存した胚の移植では、受胎例は得られなかったが、0℃まで冷却し直ちに加温した4個の胚を移植した4頭の recipient の内、2頭が受胎した。これら2頭の受胎した recipient は、

表1. 20℃で保存した馬8日目胚の生存性

Donor	35℃での 保存時間 (分)	冷 却 速 度 (35℃〜20℃) (℃/分)	保 存 お よ び 移植medium	20℃での 保存時間 (分)	Recipient	Recipientの 排 卵 後 日 数	(同期化 の程度)	受 胎
大 桜	60	1.7	PBS	79	葵	9	(+1)	−
雪 桜	8	1.0	PBS	34	坂 吹	6	(−2)	+
母 桜	10	0.6	PBS	11	海 桜	7	(−1)	−
雪 桜	9	0.6	PBS	9	楽 桜	6	(−2)	−
坂 柳	9	0.6	PBS	8	母 鶴	6	(−2)	+
雪 桜	0	0.2	TCM 199	390*	ル ツ	6	(−2)	−
坂 吹	0	0.2	TCM 199	320*	朝 風	7	(−1)	−
大 桜	0	0.2	PBS	550*	竜 梅	6	(−2)	+**

* : 輸送 ** : 出産



写真1 P B S 中 で 20℃ に 保 存 し、 静 内 町 から 洞 爺 村 ま で (220km)
輸 送 し た 8 日 目 胚 か ら 発 育 し た 産 子 と そ の recipient.

表 2. 0℃まで冷却した馬 8 日目胚の生存性

Donor	35℃での 保存時間 (分)	冷 却 速 度 (35℃～0℃) (℃/分)	0℃での 保存時間 (時間)	Recipient	Recipientの 排卵 後 日 数	(同期化) (の程度)	受 胎
大 桜	0	0.54	7.7	白 山	8	(0)	—
竜 梅	22	0.50	20.3	雪 桜	5	(- 3)	—
坂 柳	19	0.66	0	楽 桜	5	(- 3)	+
母 葵	11	0.54	0	葵	8	(0)	—
雪 桜	19	0.51	0	優 葵	6	(- 2)	+
大 里	0	1.0*	0	雪 桜	7	(- 1)	—

保存および移植mediumはPBSである。 *：20℃からの冷却速度

表 3. DMSO 添加除去後の馬胚の生存性

Donor	胚の日齢	冷 却 速 度 (35℃～20℃) (℃/分)	Recipient	Recipientの 排卵 後 日 数	(同期化) (の程度)	受 胎
母 葵	8	0.58	葵	6	(- 2)	—
母 桜	8	0.56	草 山	6	(- 2)	—
母 桜	8	0.45	大 極	8	(0)	—
柳 翠	8	0.2	大 桜	8	(0)	—
大 里	8	0.2	坂 柳	6	(- 2)	—
優 葵	8	0.2	海 草	6	(- 2)	—
母 桜	6	0.2	葵	4	(- 2)	+
大 桜	6	0.2	雪 桜	6	(0)	—

移植時、排卵後 5 日および 6 日目であり、胚との同期化の程度は、-3 日および -2 日であった。20 時間 16 分保存した胚の栄養膜は透明度がやや低下していたが、他の胚では形態的变化は特に見られなかった。

DMSO で処理した 8 日目および 6 日目胚の生存性は表 3. に示してある。20℃で、最終濃度 1.5 M DMSO-PBS で平衡した後、DMSO を除去した 8 日目胚からは、生存例が得られなかったが、2 個の 6 日目胚で同じ処理を行なったところ、2 個の内、1 個で移植後に生存が確認された。DMSO を添加すると胚の栄養膜は、0.5 M の時に収縮し始め、1.0 M で収縮が最大となり、最終濃度 1.5 M では、逆に復元し始めた。DMSO の希釈過程では、胚の栄養膜の形態は復元し続け、0.5 M ではほぼ添加前の状態に戻った。

考 察

マウス (Rafferty, 1970), ラット (Dickmann, 1971), 家兎 (Chang, 1948; Hafez, 1971), 緬羊 (Kardymowicz ら, 1966a; Dziuk, 1971), 豚 (Dziuk, 1971), 牛 (Trounson ら, 1976a) においては、1 時間程度の室温保存は、胚の生存性にはほとんど影響を与えないことが知られている。Oguri and Tsutsumi (1974) は馬胚の移植に際し、6 日目胚を 2%ゼラチンを含む生理的

食塩水および馬血清とリンゲル氏液の等量混合液中に 30℃で合計 55 分間～110 分間保っており、Allen and Rowson (1975) も、30℃で TCM199 中に馬胚を 18 分間～55 分間保存した。馬胚を移植時に、室温に放置した報告は見られないが、我々は PBS 中で 20℃に 9 分間および 34 分間保った馬 8 日目胚を移植し、体外で 30℃に保った Oguri and Tsutsumi (1974) とほぼ同様の成績を得た。従って馬胚においても、他の動物と同様に通常の移植に要する時間、室温に保っても、影響を受けないのではないかと考えられる。家畜の胚移植は設備の整っていない場所や野外で行なう機会が多く、胚を体外で保温する手順省ければ、胚移植の操作は簡便化され、胚移植技術にとって非常に有利である。

哺乳動物胚を室温で保存して、さらに保存期間を延長する試みは、いくつか行なわれており、Hafez (1965) は、家兎 2 細胞胚を生理的食塩水と家兎血清の等量混合液中に 20℃で 48 時間保存し、29%の生存率をその後の胚移植で証明した。緬羊の 4 細胞胚～12 細胞胚の室温での生存性は比較的悪く、同種血清中で 24 時間(7 個)、48 時間(14 個)、保存された胚からの移植による産子はそれぞれ 2 頭および 1 頭であった (Buttle and Hancock, 1964)。7℃～10℃で 24 時間前後保存された山羊 4 細胞胚～16 細胞胚での妊娠率は 53.8%である(大概ら, 1960)。また、豚 4 細胞胚は、24 時間の室温保存で 43%が胎児に発育した (Polge, 1977)。牛桑実胚においては、Trounson ら (1976a) が、修正 PBS (Whittingham, 1971) 中に、18℃～21℃で 1.5 時間～7.5 時間保存したものから 87.5%におよぶ家兎卵管内発生率を報告している。また同じく修正 PBS 中に 20℃で 3 時間～12 時間、24 時間、48 時間保った牛の後期桑実胚および胚盤胞は培養により、それぞれ 77.5%, 100%, 64%の発生率を示した (Willadsen ら, 1978)。実際の移植による妊娠例は、牛桑実胚を 20℃～25℃で BMOC-3 中で 1 日保存して 4 頭中 3 頭の妊娠を確認した Kanagawa (1980) の報告に見られる。我々は 20℃の PBS 中に 9 時間 10 分保存した 8 日目の馬胚をその保存中に静内町から洞爺村まで輸送して recipient に移植した結果、正常な産子を得ることに成功した。結紮した家兎卵管内で 40 時間～49 時間保存・輸送して得られた受胎例は既に報告されている (Allen ら, 1976) が、低温に保って輸送した胚からの子馬の生産は世界で初めてである。他の動物におけるように 24 時間～48 時間保存した場合、馬胚の生存性は不明であるが、少なくとも 9 時間余りの保存は可能であることが証明され、今後の試みに期待が持たれる。哺乳動物胚が 20℃前後で保存できることは、温度管理を行なう特別の処置を施す必要がない点で短期間の保存では実用的な意義がある。また、凍結保存のように半永久的に保存できなくても、近距離の胚輸送や donor と recipient の同期化の範囲を胚の側から拡大できる点で充分利用価値のある方法と言える。

0℃で家兎血清中に 78 時間～102 時間保存した家兎 2 細胞胚の移植による正常産子率は 21%であり (Chang, 1948)、修正 PBS (Whittingham, 1971) を用いて 0℃に 3 時間、24 時間、48 時間保たれたマウス 2 細胞胚の培養での発生率は、それぞれ 54%, 17%, 4%であった (Whittingham and Wales, 1969)。しかし緬羊の 2～8 細胞胚は同種血清中で 0℃～4℃の温度では、24 時間の

保存に全く耐えられない(Averill and Rowson, 1959)。牛胚盤胞の 0℃での保存成績は良好で、修正 PBS (Whittingham, 1971)と牛胎児血清の混合液中で 48 時間保存した胚盤胞は、移植により 40%の胎児発生率を示した(Trounsonら, 1976b)。これに対し、PBS 中に 0℃で 7.7 時間および 20.3 時間保存した馬 8 日目胚は、移植後受胎しなかった。家兎 (Chang, 1947), 緬羊 (Averill and Rowson, 1959; Kardymowicz ら, 1963) では、0℃～6℃での胚の保存性の時間経過による低下が早いことが報告されている。

胚の凍結保存を成功させるには、medium が凍結する前、つまり液相の温度域で胚が生存していることが不可欠である。0℃まで冷却し短時間保存した後直ちに加温した緬羊桑実胚(Willadsen ら, 1976), 牛の後期桑実胚および胚盤胞(Wilmur ら, 1975; Trounson ら, 1976b)の生存性はほとんど損なわれないことが報告されている。しかし豚胚は低温に対する抵抗性が極めて低いとされており、8 細胞胚から胚盤胞までの胚は、15℃より低い温度に冷却された場合、全く生存しない (Wilmur, 1972b; Polge ら, 1974)。馬胚を 0℃に冷却した試みは報告されていないが、馬胚の 20℃までの冷却は、その生存性にほとんど影響ないことが判明したので、さらに低い温度への冷却に馬胚が耐えるか否かを 8 日目胚を用いて検討した。すなわち、0℃まで冷却して直ちに加温した 4 個の 8 日目胚を recipient へ移植した結果、2 頭の recipient が受胎した。少数例ではあるが、この成績は 8 日目胚を頸管経由法で移植した場合の受胎率約 50% (小栗ら, 1975)と同等であるので、緬羊および牛胚と同様に 0℃までの冷却は馬胚の生存性にほとんど影響を与えないと考えられる。

Chang (1948) は家兎 2 細胞胚を急冷 (>10℃/分) または緩冷 (<0.1℃/分) して、急冷した胚の 0℃および 5℃における保存性の低下を示しており、Hafez (1969) は家兎胚の低温保存を行なう場合、分速 0.01℃の冷却速度を推奨した。しかし、家兎の 8～16 細胞胚を 10℃で保存した場合、冷却速度は胚の生存性に影響を与えず (Mauer, 1962), マウス 2 細胞胚の 5℃における保存でも、冷却速度 4.5℃/分と 0.1℃/分との間に生存性の差は見られなかった (Whittingham and Wales, 1969)。牛胚では、胚の発育程度により 0℃までの冷却速度に対する胚の感受性が異なり、4 細胞胚から桑実胚までの胚では、分速 0.2℃以下の冷却速度が適するが後期桑実胚より発育の進んだ胚では、分速 10℃以上の冷却速度でも高い生存率を示している (Sreenan ら, 1970; Wilmur ら, 1975; Trounson ら, 1976a, 1976b)。比較的緩慢な冷却速度 (0.2℃/分～1.0℃/分) を用いた馬の 8 日目胚から、受胎例が得られているので、分速 1.0℃以下の緩慢冷却の影響はほとんどないと考えられる。

哺乳動物胚の凍結保存には、凍結保護剤として DMSO が最も一般的に使用されており、マウス (Wilmur, 1972a), 家兎 (Whittingham and Adams, 1976), 緬羊 (Willadsen ら, 1976; Willadsen, 1977), 牛 (Wilmur and Rowson, 1973)では、室温および 0℃における DMSO の存在は、胚の生存性を損なわないことが報告されている。しかし、馬胚の凍結保存の試みが不成功に終わっているため、馬においても凍結前の DMSO の存在が胚に影響を与えないことを確認

しておく必要がある。そこで 20℃ における馬の 6 日目および 8 日目胚の DMSO 処理後の生存性を検討したところ、6 日目胚で生存例が得られ、DMSO が馬 6 日目胚に対して必ずしも致死的な害を与えないことが証明された。しかし、8 日目馬胚からは生存例が得られておらず、この傾向は、より発育程度が進んだ胚でより高い生存性が報告されている、DMSO 処理後の緬羊胚 (Willadsen ら, 1976)、ならびに通常の胚移植における馬 (Allen and Rowson, 1975)、牛 (Newcomb and Rowson, 1975)、緬羊 (Moore and Shelton, 1964) の胚に認められる傾向とは異なっている。

Whittingham and Anderson (1976) および Whittingham (1977) は凍結融解したマウス胚を移植前に培養した場合と培養しない場合とを比較して、培養した胚の産子発生率の方が高いことを示し、凍結融解したマウス胚のその後の発生が遅れることを提言した。冷却した馬胚の移植における胚の発育程度と recipient の同期化の程度は、6 日目胚で -2 日 ~ 0 日、8 日目胚では -3 日 ~ +1 日であったが、受胎は全て、-2 日および -3 日、すなわち、胚の発育程度が recipient の子宮の状態より進んでいる場合に成立しており、マウス (Whittingham and Anderson, 1976; Whittingham, 1977) における凍結融解した胚の発生は遅延するという傾向と類似した傾向が馬でも存在することを暗示している。従って冷却した胚を移植する場合、胚の発育程度と recipient における子宮内膜の排卵後の経時的变化との関係については、さらに検討してみる必要があろう。

凍結保護剤に DMSO およびグリセリンを使用した液体窒素による馬胚の凍結保存を試みたが、移植による生存例を確認することはできなかった。しかし、0℃ まで冷却した馬胚の生存が証明され、また 20℃ で DMSO 処理した胚が生存し、特に 6 日目胚の凍結融解後の形態が良好なことから馬胚の凍結保存の可能性は充分期待できる。

要 約

20℃, 0℃ および -196℃ に冷却、保存した馬胚の生存性の有無を明らかにし、馬胚の凍結保存の可能性を検討した。

凍結保護剤に DMSO またはグリセリンを用いて、7 個の 6 日目胚、9 個の 8 日目胚を -196℃ に凍結保存したが移植による生存例は確認できなかった。PBS 中に 20℃ で 9 分 ~ 79 分保存した 8 日目胚の移植 5 例の内 2 例が受胎し、PBS 中に 20℃ で保たれ 9 時間 10 分経て 220 km 輸送した 8 日目胚から正常な産子を得ることに成功した。これにより馬胚の室温での短期間保存の可能性が示された。PBS 中で 0℃ に 7.7 および 20.3 時間保存した 8 日目胚からは生存例を得ることは出来なかったが、0℃ に冷却して直ちに加温した 8 日目胚 4 個中 2 個が移植後生存し、0℃ への冷却が馬胚の生存性に必ずしも影響を与えないことが初めて確認された。20℃ および 0℃ に冷却した胚の受胎例では、移植時の胚と recipient の同期化の程度が -3 日および -2 日であり、低温処理後の馬胚の発生の遅延が暗示された。20℃ で DMSO を段階的に添加、除去した 6 日目

胚2個の内1個の胚で妊娠が成立し、DMSOが必ずしも馬胚に致死的な害を与えないことが判明した。

馬胚の凍結融解過程において medium が液相である温度域での生存性および DMSO 処理後の生存性が証明されたので、今後の馬胚の凍結保存の可能性が期待される。

謝 辞

本研究を実施するに際し援助を寄せられた北海道大学農学部附属牧場高木亮司助手ならびに職員各位、快く実験馬を提供して下さった石川松利氏、直腸検査、採卵、移植に当り手を煩わした矢田明氏、吉田真氏、水島洋子氏、榊直子氏、暖かく激励して下さいました堤義雄助教授、清水弘助手、上田純治助手はじめ家畜育種学講座の皆様に対し、ここにつつしんで感謝の意を表する。

引 用 文 献

- Allen, W. R., Francesca, S., Trounson, A. O., Tishner, M. and Bielański, W. (1976) Viability of horse embryos after storage and long-distance transport in the rabbit. *J. Reprod. Fert.*, **47**; 387-390.
- Allen, W. R. and Rowson, L. E. A. (1975) Surgical and non-surgical egg transfer in horses. *J. Reprod. Fert., Suppl.* **23**; 525-530.
- Averill, R. L. W. and Rowson, L. E. A. (1959) Attempts at storage of sheep ova at low temperatures. *J. Agric. Sci., Camb.* **52**; 392-395.
- Bank, H. and Maurer, R. R. (1974) Survival of frozen rabbit embryos. *Expl. Cell Res.*, **89**, 188-196.
- Bilton, R. J. and Moore, N. W. (1976) In-vitro culture, storage and transfer of goat embryos. *Aust. J. Biol. Sci.*, **29**; 125-129.
- Buttle, H. R. L. and Hancock, J. L. (1964) Birth of lambs after storage of sheep eggs in vitro. *J. Reprod. Fert.*, **7**; 417-418.
- Chang, M. C. (1947) Normal development of fertilized rabbit ova stored at low temperature for several days. *Nature, Lond.* **159**; 602-603.
- Chang, M. C. (1948) The effects of low temperature on fertilized rabbit ova in vitro, and the normal development of ova kept at low temperature for several days. *J. Gen. Physiol.*, **32**; 385-410.
- Dickmann, Z. (1971) Egg transfer. In: *Methods in mammalian embryology*. pp. 133-145. Ed. Daniel, J. C. Jr. W. H. Freeman Company.
- Dziuk, P. J. (1971) Obtaining eggs and embryos from sheep and pigs. In: *Methods in mammalian embryology*. pp. 76-85. Ed. Daniel, J. C. Jr. W. H. Freeman Company.
- Ferdows, M., Moore, C. L. and Dracy, A. E. (1958) Survival of rabbit ova stored -79°C . *J. Dairy Sci.*, **41**, 739. Abstr.
- Hafez, E. S. E. (1965) Storage media for rabbit ova. *J. Appl. Physiol.*, **20**; 731-736.
- Hafez, E. S. E. (1969) Superovulation and preservation of mammalian eggs. *Acta Endocrinologica, Suppl.* **140**; 5-44.
- Hafez, E. S. E. (1971) Egg storage. In: *Methods in mammalian embryology*. pp. 117-132. Ed. Daniel, J. C. Jr. W. H. Freeman Company.
- Heape, W. (1890) Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother. *Proc. Roy. Soc. London*, **48**; 457-458.
- Kanagawa, H. (1980) One to two day preservations of bovine embryos. *Jpn. J. Vet. Res.*, **28**; 1-6.

- Kardymowicz, M., Kardymowicz, O. and Grochowalski, K. (1964) The influence of the storage of sheep ova in various temperatures on their implantation. *Acta Biol. Cracov., Zool.*, **7**; 141-147.
- Kardymowicz, M., Kardymowicz, O. and Grochowalski, K. (1966a) A study on the effect of cooling of sheep ova to 10℃ on their capability of further development. *Acta Biol. Cracov., Zool.*, **9**; 113-116.
- Kardymowicz, M., Kardymowicz, O. and Kremer, M. (1966b) Successful in vitro storage of sheep ova for 5 days. *Acta Biol. Cracov., Zool.*, **9**; 117-119.
- Kardymowicz, M., Kardymowicz, O., Kuhl, W. and Lada, A. (1963) Storage of fertilized sheep ova at low temperature. *Acta Biol. Cracov., Zool.*, **6**; 31-37.
- Mauer, R. E. (1962) Affect of cooling rate on viability of rabbit ova stored at 10℃. *J. Anim. Sci.*, **21**, 1026, Abstr.
- Moore, N. M. and Bilton, R. J. (1973) The storage of fertilized sheep ova at 5℃. *Aust. J. Biol. Sci.*, **26**; 1421-1427.
- Moore, N. M. and Shelton, J. N. (1964) Egg transfer in sheep. Effect of degree of synchronization between donor and recipient, age of eggs, and site of transfer on the survival of transferred eggs. *J. Reprod. Fert.*, **7**; 145-152.
- Newcomb, R. and Rowson, L. E. A. (1975) Conception rate after uterine transfer of cow eggs, in relation to synchronization of oestrus and age of eggs. *J. Reprod. Fert.*, **43**; 539-541.
- Oguri, N. and Tsutsumi, Y. (1974) Non-surgical egg transfer in mares. *J. Reprod. Fert.*, **41**; 313-320.
- 小栗(紀)・堤(義)・高木(亮)・八戸(芳)(1975)馬の受精卵移植に関する研究—特に子宮頸管經由法による卵子移植—。馬の受精卵移植試験調査成績 第2輯 日本馬事協会。
- 大槻(清)・杉江(佶)・大沼(秀)・相馬(正)・堀江(董)(1960)山羊における上向性灌流による採卵と受精卵の移植について。家畜繁殖誌6号1巻31-32。
- Polge, C. (1977) Short-term maintenance and culture of embryos. In: *Embryo transfer in farm animals*. pp. 44. Ed. K. J. Betteridge. Canada Dept. Agric. Monograph, 16.
- Polge, C., Wilmut, I. and Rowson, L. E. A. (1974) The low temperature preservation of cow, sheep and pig embryos. *Cryobiology*, **11**, 560, Abstr.
- Rafferty, K. A., Jr. (1970) In: *Method in experimental embryology of the mouse*. Ed. Rafferty, K. A., Jr. The Johns Hopkins press, Baltimore and London.
- Renard, J. P., Wintenberger-Torres, S. and du Mesnil du Buisson, F. (1976) Storage of ewe and cow eggs at +10℃. In: *Egg transfer in cattle*. pp. 165-174. Ed. Rowson, L. E. A. Commission of the European Communities, Luxembourg.
- Rowson, L. E. A. and Dowling, D. F. (1949) An apparatus for the extraction of fertilized eggs from the living cow. *Vet. Rec.*, **16**, 191.
- Sreenan, J., Scanlon, P. and Gordon, I. (1970) Storage of fertilized cattle ova in vitro. *J. Agric. Sci., Camb.* **74**; 593-594.
- 菅原(七)・竹内(三)(1962)低温保存したラット卵子の呼吸能について。家畜繁殖誌8巻3号65-69。
- Trounson, A. O., Willadsen, S. M. and Rowson, L. E. A. (1976a) The influence of in vitro culture and cooling on the survival and development of cow embryos. *J. Reprod. Fert.*, **47**; 367-370.
- Trounson, A. O., Willadsen, S. M., Rowson, L. E. A. and Newcomb, R. (1976b) The storage of cow eggs at room temperatures. *J. Reprod. Fert.*, **46**; 173-178.
- 角田(幸)・相馬(正)・杉江(佶)・Chang, M. C. (1979) ハムスター受精卵の凍結保存の試み。第20回哺乳動物卵子談話会要旨。15-18。
- 内海(恭)・湯原(正)(1974)ラット受精卵の凍結保存に関する研究。岡山大学農学報(44)24-27。
- Whittingham, D. G. (1971) Survival of mouse embryos after freezing and thawing. *Nature, Lond.* **233**; 125-126.
- Whittingham, D. G. (1977) Some factors affecting embryo storage in laboratory animals. In: *Freez-*

- ing of mammalian embryos. pp. 97-127. Eds. K. Elliott & J. Whelan. Elsevier North Holland, Amsterdam.
- Whittingham, D. G. and Adams, C. E. (1976) Low temprature preservation of rabbit embryos. *J. Reprod. Fert.*, **47**; 269-274.
- Whittingham, D. G. and Anderson, E. (1976) Ultrastructural studies of frozen-thawed mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, **48**; 137-140.
- Whittingham, D. G., Leibo, S. P. and Mazur, P. (1972) Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C . *Science N. Y.*, **178**; 411-414.
- Whittingham, D. G. and Wales, R. G. (1969) Storage of two-cell mouse embryos in vitro. *Aust. J. Biol. Sci.*, **22**; 1065-1068.
- Willadsen, S. M. (1977) Factors affecting the surviral of sheep embryos during deep-freezing and thawing. In: *The freezing of mammalian embryos*. 175-189. Eds. K. Elliott & J. Whelan. Elsevier North Holland, Amsterdam.
- Willadsen, S. M., Polge, C. and Rowson, L. E. A. (1978) In vitro storage of cattle embryos. In: *Control of reproduction in the cow*. pp. 428-436. Ed. J. Sreenan. European Economic Community, Luxembourg.
- Willadsen, S. M., Polge, C., Rowson, L. E. A. and Moore, R. M. (1974) Preservation of sheep embryos in liquid nitrogen. *Cryobiology*, **11**, 560. Abstr.
- Willadsen, S. M., Polge, C., Rowson, L. E. A. and Moore, R. M. (1976) Deep freezing of sheep embryos. *J. Reprod. Fert.*, **46**; 151-154.
- Wilmut, I. (1972a) The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing *Life Sciences* **11**; 1071-1079.
- Wilmut, I. (1972b) The low temperature preservation of mammalian embryos. *J. Reprod. Fert.*, **31**; 513-514.
- Wilmut, I. and Rowson, L. E. A. (1973) Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vet. Rec.* **92**; 686-690.
- Wilmut, I., Polge, C. and Rowson, L. E. A. (1975) The effect on cow embryos of cooling to $20, 0$ and -196°C . *J. Reprod. Fert.*, **45**; 409-411.

Viability of Equine Embryos Cooled to 20°C, 0°C and -196°C

by

Yusuke YAMAMOTO; Norihiko OGURI and Yoshio HACHINOHE
(Faculty of Agriculture, Hokkaido University)

Summary

The survival of equine embryos after cooling and/or storage at 20°C, 0°C and -196°C was examined by transfer to recipient mares. Seven embryos 6 days and nine embryos 8 days after ovulation, stored at -196°C in the presence of 1.5M DMSO or 1.0M glycerol as cryoprotectant, using slow cooling and thawing, did not survive. Three out of eight Day-8 embryos, stored at 20°C in PBS for 9 min to 9.2hr, developed to normal foals. One of the three was transported for 220km before transfer to the recipient mare. Four Day-8 embryos were warmed immediately after cooling to 0°C, and two of them also developed to normal foals. One of two Day-6 embryos treated with 1.5M DMSO at 20°C survived. The results indicate the availability of short term storage of equine embryos at room temperature, the viability of equine embryos cooled to 0°C, and that DMSO at room temperature is not toxic to equine embryos. A synchronization variation of -3 or -2 days was necessary for successful transfer, suggesting a delay of development in cooled embryos.