



Title	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
Author(s)	堂地, 修; Dochi, Osamu
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	乙第5328号
Issue Date	1998-03-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3137291
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51520
Type	doctoral thesis
File Information	000000322481.pdf



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—

堂 地 修

①

目次

ウシ凍結胚の直接移植法におけるエチレングリコールの凍結防止剤の役割

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—

エチレングリコールを用いて凍結したウシ胚の凍害防止剤に関する

研究の概要

1 4

1 5

1 8

2 2

2 6

エチレングリコールを用いて凍結したウシ胚の凍害防止剤の役割

2 7

2 7

2 8

2 8

2 8

堂 地 修

目次

緒論	1
第1章 ウシ凍結胚の直接移植法におけるエチレングリコールの有効性の検討	
緒言	4
材料および方法	4
結果	7
考察	10
要約	13
第2章 エチレングリコールを用いて凍結したウシ胚の直接移植法に関する 野外試験	
緒言	14
材料および方法	15
結果	19
考察	22
要約	26
第3章 エチレングリコールを用いて凍結したウシ胚の一段階希釈法の検討	
緒言	27
材料および方法	27
結果	30
考察	34
要約	36

第4章 顕微操作により透明帯と一部の細胞を除去したウシ胚の凍結保存と直接移植の検討

緒言 37
材料および方法 37
結果 40
考察 46
要約 48

第5章 総括 49

謝辞 52

英文要約 54

参考文献 58

緒 論

ウシの胚移植における最初の成功はWillett *et al.* によって1951年に報告され、1970年代には胚移植技術は実用化へと進展した（金川ら、1988）。今日、胚移植はウシの育種改良手法として重要な技術となり、胚移植技術を活用した育種プログラム（田中ら、1982; Smith, 1988）が実際に応用されている。このような中で、胚の凍結保存技術は、胚の効率的利用、能力検定用試験牛や種畜の生産に重要な役割を担っている。国際胚移植学会の調査によれば、1995年には世界中で約400,000個の胚が移植され、そのうち凍結胚が約48%（192,000個）を占め、多数の凍結保存胚が世界各国間で輸出入されている（Thibier, 1996）。

ウシ胚の凍結に関する研究は、1973年、Willmut and Rowsonが凍結・融解胚から子牛の生産に初めて成功したことに始まる。当初、凍害防止剤を段階的に添加して凍結し、融解後は段階的に希釈・除去する方法が一般的であった。1982年、Leibo *et al.* およびRenard *et al.* によってシヨ糖を用いてストロー内でグリセリンを希釈・除去する方法が報告された。次いで、Leibo(1983, 1984)は、ストロー内でグリセリンを希釈する“one-stepTM”法の大規模な野外試験を実施し、その実用性を明らかにしている。これらの研究成果により、凍結・融解胚からの凍害防止剤の希釈・除去は飛躍的に簡易化され、国内でもLeiboの報告に準じた方法の開発が行われた（鈴木ら、1986; 高倉ら、1987）。シヨ糖を用いてストロー内でグリセリンを希釈・除去する方法は、国内ではワンステップ・ストロー法と呼ばれ、野外での普及が期待された。しかしながら、ストロー内への胚および溶液の吸引、融解後の凍害防止剤の希釈・除去操作が煩雑で、操作上の人為的ミス招きやすいため、段階的に凍害防止剤を希釈・除去する従来の方法に比べて受胎率の低いことが問題とされてきた（笠井、1990）。そのため、融解後、凍害防止剤の希釈・除去を必要としない新しい凍結胚の移植技術の開発が必要となった。

凍害防止剤を希釈・除去せずウシ凍結・融解胚を移植する直接移植法は、1978年にWilladsen *et al.* がジメチルスルホキシド（DMSO）を用いて凍結した胚を融解後にDMSOを希釈・除去せず受胎牛に移植したのが最初の報告で

ある。しかし、受胎した牛は20頭中1頭だけであった。その後、ベルギーのMassipのグループ (Massip and Van Der Zwalmen, 1984; Massip *et al.*, 1987) は、グリセリンとショ糖の混合液を凍害防止剤として用いてウシ胚を凍結し、融解後、凍害防止剤を希釈・除去せず受胎牛に直接移植して良好な受胎率 (50.0~51.8%) を報告した。このMassipらの方法が、実質的に野外で利用可能なウシ凍結胚の直接移植法に関する最初の報告である。Suzuki *et al.* (1990) は、プロピレングリコール (PG) を凍害防止剤として、ストロー内にPGとショ糖の2つの溶液層を作り、ウシ胚を凍結・融解後、受胎牛に直接移植する方法で高い受胎率 (60.6%) を報告している。また、堂地ら (1991) およびVoelkel and Hu (1992a, 1992b) は、エチレングリコール (EG) を用いて良好な受胎率 (69.0 および50.0%) を報告している。これらの直接移植法は、特別な実験施設および器具を必要とせず、ワンステップ・ストロー法で問題となった人為的な操作ミス を最小限に防止できることから、野外における実用性の高い方法である。しかし、これまでの報告では、直接移植法における凍害防止剤の種類および濃度が受胎率に及ぼす影響や、野外における直接移植法の受胎率に影響を及ぼす要因については十分な検討が行われておらず、今後直接移植法を野外に普及する上でこれらの検討は重要な課題である。

凍結・融解胚を等張液に直接浸漬して凍害防止剤を一段階希釈できれば、胚の生存性を確認した上で受胎牛に移植する場合や、多数の凍結胚を各種実験に用いる場合にも、凍害防止剤の希釈・除去を省力的に行うことが可能である。さらに、直接移植後の受胎成績を予測することも可能になると考えられる。ウシ胚ではEGおよびPGを用いて凍結した胚を等張液に直接浸漬して一段階希釈しても生存性が失われないことが報告 (Suzuki *et al.*, 1990; Voelkel and Hu, 1992a, 1992b) されている。しかし、等張液を用いた一段階希釈法については十分な希釈条件の検討が行われておらず、最適な希釈条件を明らかにする必要がある。

最近、Polymerase chain reaction (PCR) 法によるウシ胚の性判別技術が開発された (Miller and Koopman, 1990; Herr and Reed, 1991; Itagaki *et al.*, 1993)。PCR法により性判別を行うためには、顕微操作によって胚細胞の一部

を採取しなければならない。胚細胞の採取は、マイクロブレードを用いて透明帯および胚を切断する切断法とマイクロピペットを用いて胚細胞を吸引する吸引法の2つの方法 (Thibier and Nibart, 1995) がある。吸引法はマイクロピペットの作製などが煩雑であるが、切断法は市販の金属マイクロブレードを用いることができるため実用的に利用されている (Herr and Reed, 1991; Itagaki *et al.*, 1993)。しかし、切断胚の凍結・融解後の生存率が低いことが問題となっている (Schmidt *et al.*, 1992; Thibier and Nibart, 1995)。したがって、性判別のために顕微操作により透明帯と一部の細胞を除去したウシ胚の凍結保存技術および直接移植法の確立も必要となってきた。

本研究では、ウシの育種改良への凍結胚の利用を促進する目的で、ウシ凍結・融解胚の直接移植法、凍害防止剤の一段階希釈法および性判別のために顕微操作を加えた胚の凍結保存法について検討した。

第1章 ウシ凍結胚の直接移植法におけるエチレングリコールの有効性の検討

緒言

凍害防止剤を希釈・除去せず融解胚を受胎牛に移植する直接移植法で重要なことは、子宮内に移植された胚が浸透圧障害により生存性を損なわない凍結条件を見出すことである。子宮内に移植された凍結・融解胚が受ける浸透圧障害は、凍害防止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易い。そのため、直接移植法に用いる凍害防止剤は、細胞膜透過性の高い薬剤を用いるか、Massipのグループ (Massip and Van Der Zwalmen, 1984; Massip *et al.*, 1987) のようにシヨ糖 (SUC) などの細胞膜非透過物質を浸透圧緩衝剤 (Leibo and Mazur, 1978) として加えた凍害防止剤を用いる必要がある。そこで、本章ではウシ胚に対する細胞膜透過性がグリセリン (GLY) より高いエチレングリコール (EG, Széll *et al.*, 1989) の凍害防止剤としての有効性およびEGの濃度が受胎率に及ぼす影響について検討した。

材料および方法

実験1

供試胚

ホルスタイン種未経産牛に卵胞刺激ホルモン (FSH、アントリン、デンカ製薬) または妊馬血清性性腺刺激ホルモン (eCG、セロトロピン、帝国臓器) を注射して過剰排卵処置を行った。FSHは、合計34mgを1日2回6日間計11回 (5/5, 4/4, 3/3, 2/2, 2/2および2mg) に分けて漸減的に筋肉内注射し、FSH注射開始後72時間目にプロスタグランジン $F_{2\alpha}$ (PGF $_{2\alpha}$) 類縁体 (エスト

ラメイト、住友製薬) 500 μ g を筋肉内注射し発情を誘起した。eCGは、2500IUまたは3000IUを筋肉内注射し、48時間後にPGF₂ α 類縁体500 μ gを筋肉内注射し発情を誘起した。eCGを用いた場合のみ、Takahashi and Kanagawa (1984)の報告に準じて、PGF₂ α 類縁体注射後約52時間から1.5~2.0時間間隔で黄体形成ホルモン放出ホルモン類縁体(コンセラル、武田薬品)を合計400または600 μ g筋肉内注射した。人工授精は、一頭の黒毛和種牛の凍結精液を用いて発情が発現した日の午後と翌朝の計2回行った。胚回収は、発情後6~8日目(発情発現日を0日)にバルーンカテーテルを用い非手術的に行った。回収した胚は、倒立顕微鏡下で形態観察を行い、既報(Lindner and Wright, 1983)に準じて発育ステージおよび品質を調べた。品質が優、良および可と判定された桑実胚~拡張胚盤胞を実験に用いた。供試胚は、新生子牛血清を20%の割合で添加した修正ダルベッコリン酸緩衝液(PBS-NCS、グルコース1g/l、ピルビン酸ナトリウム0.036g/lおよび0.4%ウシ血清アルブミン含有)で数回洗浄し、凍結処理まで室温あるいは37°Cで保存した。

胚の凍結および融解

凍結媒液は、PBS-NCSを基本液とし1.8M EG、1.8M EG+0.25M SUC (EG+SUC) および対照区として1.4M GLY+0.25M SUC (Massip and Van Der Zwalmen, 1984)を添加して作成した。胚はPBS-CSから直接それぞれの凍結媒液に移し、直ちに0.25mlのプラスチックストロー(IMV, L'Aigle, フランス)に1個ずつ収納し、室温下で13~93分間保持した。胚を収納したストローは、-7°C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分後に予め液体窒素に漬けて冷やした鉗子でストローの綿栓側の液層を摘んで植氷したのち、さらに同温度で8分間保持した。次いで-7°Cから-25°Cまたは-30°Cまで0.3°C/分の速度で冷却したのち液体窒素に投入し凍結した。液体窒素への投入は、EGとEG+SUCが-25°Cまたは-30°C、GLY+SUCは-25°Cで行った。凍結した胚は、20°Cあるいは37°Cの水に氷晶が消えるまで漬けて融解した。

胚の移植および妊娠診断

融解胚は、凍害防止剤の希釈・除去を行わず、発情後6～8日目の受胚牛の黄体側子宮角に1個ずつ子宮頸管経由法により直接移植した。胚移植は融解後2～30分以内に行った。受胚牛には交雑種の未経産牛を用いた。

移植後17～57日目に超音波断層装置を用いて第1回目の妊娠診断を行い、さらに移植後49～194日目に直腸検査法により2回目の妊娠診断を実施して受胎の有無を判定した。

実験2

供試胚

供試胚は、過剰排卵処置を施した黒毛和種または交雑種雌牛から発情後7～8日目にバルーンカテーテルを用いて非手術的に回収した。FSH合計28mgを1日2回4日間計8回(5/5、4/4、3/3、2/2mg)に分けて筋肉内注射して過剰排卵誘起処置を行った。PGF₂α類縁体750μgをFSH注射開始後48時間目に筋肉内注射し発情を誘起した。人工授精は、黒毛和種牛の凍結精液を用いて発情発現日の午後と翌朝の計2回行った。回収した胚は、実験1に従って品質および発育ステージを調べた。実験には、品質が優、良および可と判定された後期桑実胚～胚盤胞を実験に用いた。これらの胚は、20%子牛血清加修正ダルベッコリン酸緩衝液(PBS-CSS)で数回洗浄したのち、凍結処理までPBS-CSS中で室温(25-30°C)または36°Cの加温板上で保存した。

胚の凍結および融解

凍結媒液は、PBS-CSSを基本液とし1.5および1.8M EGを添加して作成した。胚の凍結は、液体窒素への投入を-30°Cで行った以外は実験1に従った。融解は、液体窒素から取り出したストローを20～30°Cの水に氷晶が消えるまで浸漬して行った。

胚の移植および妊娠診断

融解胚は、自然発情およびPGF₂α（プロナルゴンF、武田薬品）20mgまたはPGF₂α類縁体500あるいは750μgを投与して発情を同期化したホルスタイン種未経産牛および交雑種経産牛に実験1と同じ方法で直接移植した。妊娠診断も実験1と同様に行った。

統計処理

データの分析は χ^2 検定を用いて行った。

結 果

実験1

移植後の受胎成績は表1に示した。3種類の凍害防止剤間の受胎率に有意差は認められなかった。また、凍害防止剤の種類および発育ステージが受胎率に及ぼす影響も認められなかった。さらに、EGおよびEG+SUCを用いて凍結した胚の受胎率は、液体窒素への投入温度による影響を認めなかった。

分娩成績は表2に示した。EGおよびEG+SUCを用いて凍結した胚に流産がそれぞれ1例ずつ移植後210日および31日目に認められた。また、GLY+SUCでは3例の流産が、移植後52、53および106日目に認められた。流産した5頭を除く43頭の受胎牛は健康な子牛を分娩した。GLY+SUCで凍結した胚を移植して受胎した2頭の受胎牛は双子を分娩した。

実験2

1.5および1.8MEGの受胎率はそれぞれ45.0%（9/20）および52.9%（9/17）で、両者に有意な差は認められなかった。1.5と1.8MEGに各1例ずつ流産が、移植後63および233日目に認められたが、残りの受胎牛16頭は健康な子牛を分娩した。

表1. 凍害防止剤を希釈・除去せず直接移植したウシ凍結・融解胚の受胎成績

項 目	凍害防止剤 ^a		
	EG	EG+SUC	GLY+SUC
液体窒素への投入温度			
-25°C	71.4(5/ 7) ^b	50.0(7/14)	60.0(15/25)
-30°C	68.2(15/22)	54.5(6/11)	—
胚の発育ステージ			
桑実胚	60.0(9/15)	63.6(7/11)	41.7(5/12)
胚盤胞	78.6(11/14)	42.9(6/14)	76.9(10/13)
受胎率	69.0(20/29)	52.0(13/25)	60.0(15/25)

^a EG : 1.8M エチレングリコール, EG+SUC : 1.8M エチレングリコール + 0.25M ショ糖, GLY+SUC : 1.4M グリセリン + 0.25M ショ糖.

^b 受胎率(受胎頭数 / 移植頭数).

表2. 凍害防止剤を希釈・除去せずウシ凍結・融解胚を直接移植した受胎牛の分娩成績

項目	凍害防止剤 ^a		
	EG	EG+SUC	GLY+SUC
受胎頭数	20	13	15
流産頭数	1	1	3
子牛頭数	19	12	14 ^b

^a EG : 1.8M エチレングリコール, EG+SUC : 1.8M エチレングリコール+0.25M ショ糖, GLY+SUC : 1.4M グリセリン+0.25M ショ糖.

^b 2組の双子を含む.

考 察

GLYを凍害防止剤として用い、ウシ胚を凍結・融解後、GLYを希釈・除去せず等張液に直接浸漬したり受胚牛に移植したりする場合の生存率は低いことが明らかにされている（高橋と高倉, 1983; Suzuki *et al.*, 1990）。しかし、GLYに0.2~0.35MのSUCを加えることにより良好な受胎率が得られている（Massip and Van Der Zwalmen, 1984; Massip *et al.*, 1987; 鈴木ら, 1989）。本実験でも、GLY+SUCで凍結した胚を受胚牛に移植して60.0%の受胎率が得られ、SUCの添加がGLYを用いた直接移植法において効果的であることが確認された。

EGの凍害防止剤としての有効性については、マウス、ラット（Miyamoto and Ishibashi, 1977, 1978）およびヒツジ胚（Tervit and Goold, 1984; Cocero *et al.*, 1982）で報告されている。一般に、凍結・融解胚を等張液に直接浸漬した場合、凍害防止剤が胚細胞外に流出するより早く胚細胞内への水の流入が起るため、胚細胞は一過性に膨化し生存性が損なわれる。GLYのように細胞膜透過性の低い凍害防止剤を用いて凍結・融解した胚を等張液に直接浸漬した場合、胚細胞は過度に膨化して浸透圧障害を受ける。

EGは、GLYに比べてウシおよびヒツジ胚の細胞膜透過性が高い（Széll *et al.*, 1989; Songsasen *et al.*, 1995）。Voelkel and Hu (1992a, 1992b)は、融解胚をPBSに直接浸漬し凍害防止剤を希釈・除去したのちの体外培養における胚の生存率は、1.4M GLY、1.5Mジメチルスルフォキシドあるいは1.5Mプロピレングリコール（PG）に比べて1.5M EGが高いことを報告している。さらに、彼らはEGで凍結した胚を希釈・除去せず受胚牛に直接移植して高い受胎率の得られたことを報告している。本実験においても、良好な受胎率と健康な子牛がEGで凍結した胚から得られた。本実験の結果は、細胞膜透過性の高いEGを用いてウシ胚を凍結すれば、融解胚を等張液や子宮内に直接移しても、EGは容易に胚細胞から流出するため胚細胞の過度の膨化を防げることを示している。

凍結時の胚の液体窒素への投入温度（-25°Cと-30°C）が、EGまたはEG+S

UCを用いた場合の受胎率に及ぼす影響はみられなかった。Massip *et al.* (1987) は、液体窒素への投入を -25°C で行った場合、GLYを単独で用いた場合よりGLY+SUCを用いた場合の受胎率が有意に高いことを報告している。この報告と本実験の結果から、胚の液体窒素への最適投入温度は凍害防止剤によって異なると考えられる。

Takagi *et al.* (1993) は、PG、EGおよびメチルセルソルブを用いて凍結・融解した体外受精由来胚の体外培養後の孵化胚盤胞への発育率は、平衡時間(10~120分)によって影響を受けなかったと報告している。本実験1のEG+SUCにおける成績では、14~30分間の平衡で53.8%、46~93分間の平衡で66.7%の受胎率が得られた。この結果はTakagi *et al.* (1993) の報告を支持し、平衡時間が受胎率に及ぼす影響は少ないと考えられた。

EGの濃度が受胎率に及ぼす影響を1.5および1.8Mを用いて凍結した胚を受胎牛に直接移植して比較した結果、濃度の違いによる受胎率の差は認められなかった。Voelkel and Hu (1992a, 1992b) は、1.5M EGを用いて凍結した胚を受胎牛に直接移植した場合の受胎率は、GLYを用いて凍結した胚を段階的希釈した胚の受胎率と同等であったと報告している。実験2の結果およびVoelkel and Hu (1992a, 1992b) の報告から、1.5~1.8Mが適切なEGの濃度であることが示された。

大谷ら(1989)は、GLY+SUCを用いて凍結した場合、融解胚を凍結媒液に長時間曝すと胚の生存性を損なう恐れがあり、融解後5分以内に移植を終える必要があるとしている。実験1および2では、ほとんどの胚は融解後5~15分以内に移植され、融解から移植終了までの時間による受胎率の差はみられなかった。この結果は、融解後15分以内に移植を終えれば胚の生存性が損なわれる危険の少ないことを示している。

本実験では、GLY+SUCで凍結した胚を1個ずつ移植した2頭の受胎牛が双子を分娩した。著者は、これまで1個の胚を移植したにも拘わらず、双子が生まれた経験を有している。関沢ら(1989)は、1個の新鮮胚またはGLYで凍結・融解した胚を移植して5組の双子が生まれ、血液型検査によりすべて一卵性

双子であることが確認されたと報告している。1個の胚を移植したにも拘わらず双子が生まれた理由は、胚の操作および凍結・融解過程で偶発的に胚が二分離されたためと推察されるが、明らかな原因は不明である。

以上の結果から、GLY+SUC、EGおよびEG+SUCを用いて凍結した胚は、融解後、凍害防止剤を希釈・除去することなく受胎牛に直接移植しても健康な子牛を生産できることが分かった。また、EGの適切な濃度は1.5~1.8Mで、EGはSUCを加えなくても単独でウシ胚の凍結および直接移植法の凍害防止剤として有効であることが明らかになった。

要 約

ウシ凍結胚の直接移植法の凍害防止剤としてのエチレングリコール (EG) の有効性を検討した。供試胚は、過剰排卵処置によって得られた桑実胚～拡張胚盤胞である。凍害防止剤の種類が受胎率に及ぼす影響を比較するため、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を凍害防止剤として用いた。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。胚は室温下でそれぞれの凍結媒液中で13～93分間平衡した。胚を収納したストローは、室温から-7°Cに設定したプログラムフリーザーのエチルアルコール槽に直接浸漬し、2分後に植氷を行い8分間保持した。次いで-25°Cまたは-30°Cまで0.3°C/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。凍害防止剤別の受胎率は、1.8M EG、1.8M EG+0.25M SUCおよび1.4M GLY+0.25M SUCがそれぞれ69.0% (20/29)、52.0% (13/25) および60.0% (15/25) で、凍害防止剤間に差は認められなかった。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) で差はなかった。受胎した受胎牛 (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。以上の結果より、EGはSUCを添加せず単独で凍害防止剤として使用しても直接移植法に有効であることが明らかになった。

第2章 エチレングリコールを用いて凍結したウシ胚の直接移植法に関する野外試験

緒言

第1章において、エチレングリコール（EG）を用いて凍結したウシ胚は、融解後、EGを希釈・除去せず受胎牛に直接移植しても高い受胎率が得られることを明らかにした。EGを用いて凍結したウシ胚の直接移植では、1.5M EG (Voelkel and Hu, 1992a, 1992b) および1.8M EG (Dochi *et al.*, 1995) で良好な受胎率が報告されている。EGの濃度が受胎率に及ぼす影響について、1.5と1.8M EGで凍結した胚の直接移植後の受胎率を比較し、濃度の違いによる受胎率の差がないことも第1章で明らかにした。ウシ凍結胚の直接移植に有効な凍害防止剤としてプロピレングリコール（PG）も報告 (Suzuki *et al.*, 1990) されている。これまで、ウシ凍結胚の直接移植法における凍害防止剤の有効性についてEGとPGを比較した大規模な野外試験の報告はみられない。また、従来最も普及しているグリセリン（GLY）を用いた段階的希釈法あるいはワンステップ・ストロー法の受胎率と直接移植法の受胎率について、大規模な野外試験を行い比較検討した報告もみられない。直接移植法を野外に普及するためには、GLYを凍害防止剤に用いた従来法の受胎率と同等の受胎率が直接移植法でも得られるかどうか、野外試験を実施し明らかにする必要がある。また、野外で直接移植法により凍結胚を移植する場合、様々な要因が受胎率に影響すると考えられる。そのため、受胎率に影響する要因の解明も、直接移植法を普及する上で重要である。

そこで、本章ではGLYを用いた従来法の受胎率と直接移植法の受胎率の比較を目的に、EGとPGを直接移植法の凍害防止剤として用いて野外実用化移植試験を実施し、直接移植法の実用性について検討を加えると同時に、受胎率に影響する要因についても分析した。

材料および方法

供試胚

実験には過剰排卵処置を施した黒毛和種牛から、発情後7～8日目（発情発現日を0日）に得られた胚を用いた。卵胞刺激ホルモン（FSH、アントリン、デシカ製薬）24～28mgを1日2回、3～4日間にわたり6または8回に分けて漸減的に筋肉内注射して過剰排卵処置を行った。FSH注射開始後3日目にプロスタグランジン $F_2\alpha$ （PGF $_{2\alpha}$ ）25～30mg（プロナルゴンF、武田製薬）またはPGF $_{2\alpha}$ 類縁体（エストラメイト、住友製薬）750 μ gを筋肉内注射して発情を誘起した。人工授精は、PGF $_{2\alpha}$ またはPGF $_{2\alpha}$ 類縁体注射後2日目の午後と3日目の午前の2回、または2日目の午前に1回、黒毛和種牛の凍結精液を用いて実施した。供胚牛より回収した胚は、既報（Lindner and Wright, 1983）に準じて発育ステージおよび品質を調べた。凍結には、品質が優および良と判定された後期桑実胚～拡張胚盤胞を用いた。供試胚は、20%子牛血清加修正ダルベッコリン酸緩衝液（PBS-CSS、Gibco Laboratories、アメリカ、Cat. No. 14287）を用いて数回洗浄し、凍結処理まで室温下でPBS-CSS中に保存した。

凍結および融解

凍害防止剤には、1.8M EGおよび1.6M PGを用い、対照区には10% GLYを用いた。これらの凍害防止剤は、PBS-CSSに溶解し凍結媒液を作成した。

胚は、PBS-CSSから凍結媒液に直接移し、直ちにストローに収納した（図1）。胚をPBS-CSSから凍結媒液に移してから冷却を開始するまでの凍害防止剤への平衡は、EGでは5～45分間、PGでは2～29分間行った。平衡後、胚を収納したストローは、 -7°C 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移した。ストローを -7°C に移してから2分後に植氷を行い、さらに同温度で8分間保持した。 -7°C から -30°C まで 0.3°C あるいは $0.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で冷却し液体窒素に投入した。液体窒素から取り出したストローは、空気中で5～10秒間保持した後、 30°C の水に氷晶が消えるまで浸漬して融解した。対照区の胚は、常法

(Bouyssou and Chupin, 1982) に準じて凍結した。すなわち、胚を収納したストローは室温 (20~25°C) から -5~-5.5°C まで 1°C/分 で冷却、または室温から -5°C のプログラムフリーザーのメチルアルコール槽に直接移した。植氷後 10 分間保持し、-30~-31°C まで 0.3°C/分 で冷却して液体窒素に投入した。

胚の移植および妊娠診断

EG および PG を用いて凍結した胚は、融解後、凍害防止剤の希釈・除去を行わず直ちに子宮頸管経由法により受胚牛の黄体側子宮角に 1 個ずつ直接移植した。対照区の胚は、ストローから取り出して GLY を段階的希釈・除去 (GLY-I, 6% GLY+0.3M ショ糖 (SUC)、3% GLY+0.3M SUC, 0.3M SUC、または 7% GLY、3% GLY、0.2M SUC) または 0.3M SUC を用いてストロー内で希釈・除去 (GLY-II、鈴木ら、1986) したのち、EG および PG と同様に 1 頭の受胚牛に 1 個ずつ移植した。受胚牛には、ホルスタイン種 (1,138 頭)、黒毛和種 (35 頭)、褐毛和種 (4 頭)、日本短角種 (25 頭)、交雑種 (55 頭) およびジャージ種 (16 頭) を用いた。受胚牛のほとんどは自然発情であったが、一部は PGF₂α または PGF₂α 類縁体を注射して発情の同期化処置を行い、発情後 5~9 日目に移植を行った。受胚牛のうち 6 頭は供胚牛との発情日差が ±2 日であったが、残り 1,267 頭の受胚牛の供胚牛との発情日差は ±1 日であった。妊娠診断は、原則として発情後 60 日目以降に直腸検査法により行った。

データの収集

本実験の移植は 3 年間にわたり実施し、下記の項目についてデータを収集した。

- 1) 胚回収日 (発情後の日数)
- 2) 胚の形態学的品質および発育ステージ
- 3) 使用した凍害防止剤の種類
- 4) 凍害防止剤への胚の平衡時間および冷却方法
- 5) 移植を実施した地域 (5 地域)、年次および季節 (春: 3~5 月、夏: 6~8

月、秋：9～11月、冬：12～2月)

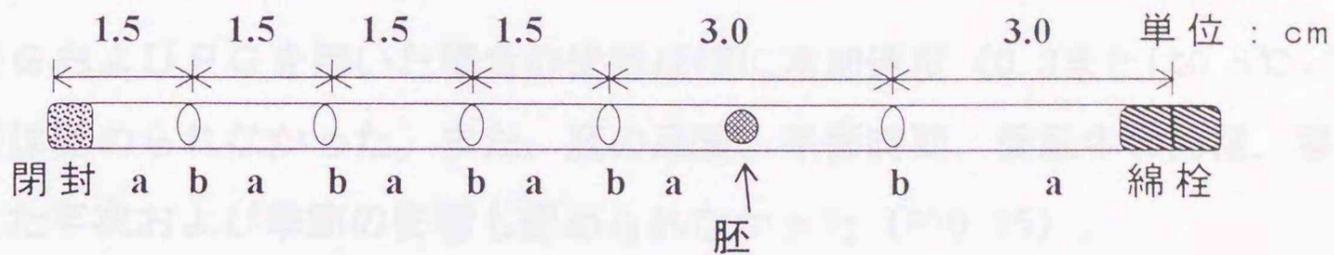
- 6) 受胎牛の品種、産歴および黄体の形態（大きさ、形状、硬さおよび弾力性を基準に4分類、久利生ら、1992)
- 7) 融解から移植終了までに要した時間（EGおよびPGを用いた凍結胚の移植例のみ)
- 8) 流産の発生および分娩結果

統計分析

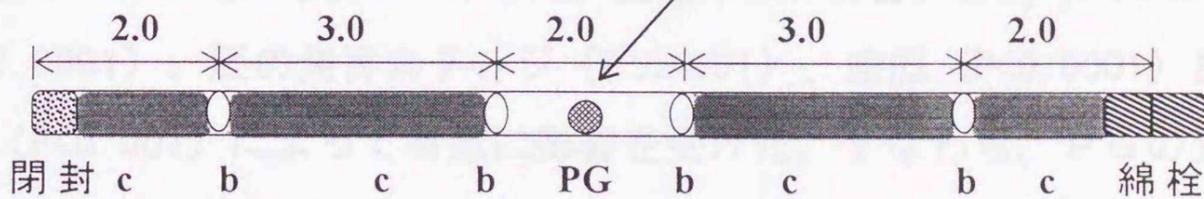
データは、最小自乗分散分析法 (Harvey, 1977) を用いて受胎率に影響を及ぼす要因の検討を行った。移植の結果は、不受胎を0、受胎を100として入力し分析を行った。なお、予備分析の結果、EGおよびPGにおいて冷却速度が受胎率に及ぼす影響は認められなかったため ($P > 0.15$)、冷却速度は本分析から除外した。

本分析では、胚の発育ステージ、胚の品質、凍害防止剤の種類、平衡時間、移植地域、移植年次、移植季節、受胎牛の品種、産歴および黄体の形態が受胎率に及ぼす影響について検討した。2要因間の交互作用も調べた。受胎率に与える影響が有意 ($P > 0.15$) でない要因は、最終分析では削除した。有意差の判定は $P < 0.05$ で行った。

ストロー A



ストロー B



a: 1.8M イノシトール b: 空気層 c: 0.2M ショ糖
 PG: 1.6M フロピレンコール

図 1. 直接移植法に用いたストロー内の構成

ストロー A : 胚およびイノシトール溶液を収納

ストロー B : 胚、フロピレンコール溶液および0.2M ショ糖溶液を収納

結 果

移植は5つの地域（A, B, C, DおよびE）で行い、移植頭数はEGが418頭、PGが400頭、GLY-Iが177頭およびGLY-IIが278頭の合計1,273頭であった。受胎率は、EGが44.7%（187/418）、PGが36.0%（144/400）、GLY-Iが48.5%（86/177）およびGLY-IIが46.0%（128/278）で合計42.8%（545/1,273）であった。

EGおよびPGを用いた場合の受胎成績に冷却速度（0.3または0.5°C/分）の影響は認められなかった。また、胚の品質、平衡時間、受胎牛の品種、移植を実施した年次および季節の影響も認められなかった（ $P>0.15$ ）。

受胎率の分析結果は表3に示した。受胎率は、凍害防止剤（ $P<0.05$ ）、移植地域（ $P<0.0001$ ）、胚の発育ステージ（ $P<0.001$ ）、産歴（ $P<0.0001$ ）および黄体の形態（ $P<0.001$ ）によって有意に影響を受けた。すなわち、PGの受胎率はEGおよびGLY-IIに比べて有意に低かった（ $P<0.05$ ）が、EG、GLY-IおよびGLY-IIの受胎率に差は認められなかった。移植地域BおよびCは全ての凍害防止剤で高い受胎率が得られたが、D地域では全ての凍害防止剤で最も低い受胎率であった。胚盤胞および拡張胚盤胞の受胎率は、後期桑実胚および初期胚盤胞に比べ有意に低かった（ $P<0.05$ ）。未経産牛は、経産牛に比べて高い受胎率を示した（ $P<0.05$ ）。形態が可と判定された黄体を有する受胎牛では優、良および不良と判定された黄体を有する受胎牛に比べて有意に低い受胎率を示した（ $P<0.05$ ）。

EGまたはPGで凍結した胚は、融解後1～45分（平均7分）以内に移植されていた。融解後、移植終了までに11分以上を要した場合の受胎率（EG:38.2%, 13/34, PG:24.5%, 12/49）は、10分以内に終えた場合（EG:45.3%, 174/384, PG:37.6%, 132/351）に比べて低い傾向を示した。

流産および死産の発生状況は表4に示したように4つの群（PG、EG、GLY-IおよびGLY-II）の間で差はみられなかった。また、本実験では、奇形などの異常な子牛の分娩はみられなかった。

表3. プロピレングリコール、エチレングリコールおよびグリセリンを用いて凍結したウシ胚の移植における受胎率 (%) の最小自乗平均値および標準誤差

要因	有意水準	移植頭数 (受胎頭数)	最小自乗 平均値	標準誤差
全体平均		1273(545)	33.3	2.39
凍害防止剤 ^e	P<0.05			
プロピレングリコール		400(144)	27.2 ^b	3.09
エチレングリコール		418(187)	34.5 ^a	3.14
グリセリン-I		177(86)	33.5 ^{ab}	4.52
グリセリン-II		278(128)	37.7 ^a	3.80
地域	P<0.0001			
A		324(137)	34.8 ^{bc}	3.87
B		228(112)	42.8 ^{ab}	4.05
C		298(164)	46.7 ^a	3.89
D		194(50)	10.4 ^d	4.59
E		229(82)	31.6 ^{cd}	4.00
発育ステージ	P<0.001			
後期桑実胚		278(131)	40.8 ^a	3.42
初期胚盤胞		377(187)	38.8 ^a	3.15
胚盤胞		425(160)	28.3 ^b	3.08
拡張胚盤胞		193(67)	25.1 ^b	4.28
産歴	P<0.0001			
未経産		791(355)	46.2 ^a	2.41
初産		207(83)	33.6 ^b	3.72
2産		139(47)	23.8 ^b	4.47
3産以上		136(60)	29.4 ^b	4.60
黄体の形態	P<0.01			
優		477(219)	36.3 ^a	2.73
良		509(222)	36.9 ^a	2.53
可		176(50)	22.8 ^b	4.15
不良		111(54)	36.9 ^a	5.78

a, b, c, d 異符号間で有意差あり (P<0.05).

^e プロピレングリコールおよびエチレングリコールは直接移植, グリセリン-I は段階的希釈・除去, グリセリン-II はストロー内希釈.

表4. プロピレングリコール、エチレングリコールおよびグリセリンを用いて凍結したウシ胚の移植における分娩成績

凍害防止剤 ^a	受胎頭数 (%)	流産頭数 (%) ^b	転売および死亡頭数	死産頭数 (%) ^c	正常子牛頭数 (%) ^d
PG	144	14(9.7)	1	2(1.6)	127(88.8)
EG	187	18(9.6)	3	5(3.0)	161(87.5)
GLY-I	86	11(12.8)	1	2(2.7)	72(84.7)
GLY-I	128	17(13.3)	2	3(2.8)	106(84.1)

^aPG:プロピレングリコール, EG:エチレングリコール, GLY-I:グリセリンの段階的希釈・除去, GLY-II:グリセリンのストロー内希釈.

^b流産頭数/受胎頭数.

^c死産頭数/(受胎頭数-流産頭数-転売および死亡頭数).

^d正常子牛頭数 / (受胎頭数-転売および死亡頭数).

考 察

EGの受胎率はGLYの受胎率と差がなく、PGに比べて有意に高かった ($P < 0.05$) ことから、EGを用いた直接移植法は野外での実用性の高いことが実証された。

全ての凍害防止剤において移植を実施した地域間に受胎率の差がみられた。胚移植では、技術者の経験の違いにより受胎率に差のあることがよく知られており、人工授精および直腸検査の経験が豊富な技術者は初心者に比べて受胎率の高いことが報告されている (Schneider *et al.*, 1980; 高橋, 1983)。また、受胎牛の栄養状態も受胎率に影響を及ぼすことが指摘されている (Broadbent *et al.*, 1991; 田中, 1994)。本実験では、地域Dの受胎率が他の地域に比べて低く、技術者の移植技術および受胎牛の飼養管理の適否が受胎率に影響していると推察された。したがって、野外での胚移植の受胎率を向上させるためには、技術者の再教育および農家への飼養管理に関する技術指導を計画的に行うことが重要と考えられた。

本実験では、移植胚の発育ステージが受胎率に有意な影響を及ぼした。この結果は、GLYを用いたウシ胚に関する報告 (Pettit, 1985; Wright, 1985; Humblot *et al.*, 1987) と異なる結果であった。Massip *et al.* (1984) は、マウスの桑実胚および初期胚盤胞は拡張胚盤胞より耐凍性が高く、内細胞塊と栄養膜細胞の性質の違いおよび胞胚腔内の水分量の違いが耐凍性の差に関係していると考察している。今後、受胎率を安定化させるため、それぞれの発育ステージに適した凍結条件について検討する必要があると考えられる。

胚移植後の受胎率は未経産牛と経産牛の間に差がないとする報告 (Wright, 1981; 田中, 1994) や未経産牛は子宮頸管が小さく移植器の通過が困難であるため、経産牛が受胎牛として適しているとする報告 (Newcomb and Rowson, 1980) がみられる。未経産牛が経産牛に比べて受胎牛として優れている点は、不良な栄養状態の牛が少ないことや繁殖障害の少ないことが上げられる (Broadbent *et al.*, 1991)。本実験では、経産牛に比べて未経産牛で

高い受胎率が得られ、未経産牛が経産牛より受胎牛に適していることが確認された。本実験で用いた受胎牛のほとんどはホルスタイン種であり、経産牛で受胎率の低下した理由は、分娩後の不十分な飼養管理および泌乳に伴うストレスが関係しているのではないかと推察された。

本実験では、直腸検査で調べた受胎牛の黄体の形態が受胎率に及ぼす影響は有意であった。黄体は、大きさ、形状、硬さおよび弾力性により分類した。黄体の形態が受胎率に影響するかどうかについては多くの議論がある。黄体の形態と受胎率には関係がみられないとする報告 (Remsen and Roussel, 1982; Looney *et al.*, 1984; Donaldson, 1985) がある。また、直腸検査による黄体機能の判定は正確性に欠けることも指摘されている (Humblot *et al.*, 1987)。血中プロジェステロン値が、2 ng/ml以下や5 ng/ml以上の受胎牛では受胎率が低く、2~5 ng/mlの受胎牛の受胎率が高いことが報告されている (Remsen and Roussel, 1982)。しかし、黄体の形態と血中プロジェステロン値の間には相関がない (Stubbings and Walton, 1986)、あるいは外科的移植の際に目で見て黄体の形態を判定しても受胎率に差がないこと (Hasler *et al.*, 1987) が報告されている。本実験では、形態が優および良と判定された黄体を有する受胎牛で高い受胎率が得られているが、最も形態不良と判定された黄体を有する受胎牛でも可と判定された受胎牛より高い受胎率が得られている。この矛盾する結果は、直腸検査による黄体の形態判定は客観性に欠け、1回だけの直腸検査による黄体の形態判定では、受胎性を予測することは困難であることを示している。したがって、今後は高い受胎性を有する受胎牛の客観的選択基準の設定が必要である。

本実験期間中を通じて、融解から移植終了までの時間をPGとEGについて調査した。その結果、今回の直接移植法では融解から1~45分、平均7分間で移植が終了していた。この結果は、段階的希釈法やワンステップ・ストロー法に比べて、直接移植法は短時間に移植を終了することができ、野外における実用性が高いことを示している。しかし、移植に11分以上を要した場

合の受胎率は、10分以内に終了した場合に比べて低くなる傾向を示した。直接移植法では、融解から移植終了までの時間が受胎率に影響することが指摘されている（大谷ら、1989；田中、1994）。その理由として、融解胚が凍結媒液中に長く曝されるため生存率が低下すると考えられる。また、移植に要する時間は移植技術の良否とも深く関係している。したがって、11分以上を要した移植例で受胎率の低くなった理由は、この2つの要因が複合的に影響したと推察される。

胚移植後の流産の発生率について、King *et al.* (1985) は新鮮胚移植後の流産を調査した結果、妊娠2～7ヶ月の間に約5%の流産が発生したことを報告している。堂地ら (1989) は、種畜牧場で飼養されていたホルスタイン種未経産牛を受胎牛とした場合、移植後約7カ月までの流産の発生率は、新鮮胚で4.5% (8/176) および凍結胚で5.1% (19/373) であり、人工授精の流産率4.6% (67/1446) と比較して差がなかったことを報告している。関沢ら (1996) は、GLYで凍結した胚を農家で飼養されている牛に移植した場合8.1% (15/186) の流産が発生したことを報告している。一般農家に飼養されている牛を主として受胎牛に供試した本実験の流産率は、King *et al.* (1985) および堂地ら (1989) の報告に比べて高かったが、一般農家の牛を対象とした関沢ら (1996) の報告と類似した値であった。種畜牧場の受胎牛は常に一定した飼養管理が行われているのに対して、一般農家では飼養管理状況が農家間で異なり不適切な飼養管理が行われている受胎牛も含まれている可能性があり、飼養管理失宜による流産の発生も考えられた。したがって、試験研究機関のように適切な飼養管理が行われている所で胚移植を行う場合に比べて一般農家で胚移植を行った場合、流産の発生率が高くなると予想される。

また、凍害防止剤の違いにより流産率に差は認められず、先天性奇形などの異常な子牛の分娩例もなかった。この結果から、直接移植法は胎子の発育に悪影響を与えていないと推察された。

以上の結果から、EGを用いた直接移植法が実用的な方法であることが実証された。また、移植地域によって受胎率に差異の認められたことから、今

要 約

5つの地域で、エチレングリコール（EG）とプロピレングリコール（PG）を用いて凍結した胚を直接移植法により移植し、受胎率に影響を及ぼす要因の分析および直接移植法の野外における実用性について検討した。実験には、過剰排卵処置を施した黒毛和種牛から発情後7～8日目に回収した後期桑実胚～拡張胚盤胞を用いた。これらの胚は、1.8M EGまたは1.6M PGを用いて凍結した。融解胚は、凍害防止剤を希釈・除去することなく直ちに受胎牛に直接移植した。対照として、1.4Mグリセリン（GLY）で凍結した胚を段階的（GLY-I）あるいはストロー内でショ糖を用いて希釈・除去（GLY-II）したのち受胎牛に移植し、直接移植法の受胎成績と比較した。合計1,273頭の受胎牛に移植を行い、545頭（42.8%）の受胎牛を得た。凍害防止剤別の受胎率は、EGが42.6%（373/876）、PGが38.8%（207/533）、GLY-Iが48.6%（86/177）およびGLY-IIが46.0%（128/278）であった。EGの受胎率はPGに比べ有意に高く（ $P<0.05$ ）、GLYと同等の成績が得られた。また、移植地域（ $P<0.0001$ ）、胚の発育ステージ（ $P<0.001$ ）、受胎牛の産歴（ $P<0.0001$ ）および受胎牛の黄体の形態（ $P<0.01$ ）も受胎率に影響することが明らかになった。

以上の結果より、EGは直接移植法の凍害防止剤として有効であり、直接移植法は野外においても実用性の高いことが実証された。

第3章 エチレングリコールを用いて凍結したウシ胚の一段階希釈法の検討

緒言

本研究の第1および2章では、エチレングリコール（EG）がウシ胚の凍結および直接移植法の凍害防止剤として有効であることを明らかにするとともに（Dochi *et al.*, 1995）、EGを用いて凍結したウシ胚の直接移植法が実用性の高い技術であることを野外試験で実証した（Dochi *et al.*, 1998）。

EGを用いて凍結したウシ胚の直接移植後の受胎率を体外培養により予測するためには、融解胚を等張液に直接浸漬してEGを一段階希釈する必要がある。EGを用いて凍結・融解したウシ胚を等張液に直接浸漬してEGを一段階希釈しても生存性が失われないことが報告されている（Voelkel and Hu, 1992a, 1992b）。しかし、野外において等張液を用いて凍害防止剤を一段階希釈する場合、希釈時の温度や希釈に用いる等張液の量などの希釈条件が一定しない可能性がある。条件によっては胚の生存性が損なわれることも予想される。そこで、本章ではEGを用いて凍結・融解したウシ胚の一段階希釈法における希釈温度、希釈倍率が生存率に及ぼす影響を調べ、最適な一段階希釈条件を検討するとともに、一段階希釈法によりEGを希釈・除去した胚を体外培養することにより直接移植後の受胎成績を予測することが可能かどうかについても検討した。

材料および方法

供試胚

供試胚は、過剰排卵処置を施した黒毛和種または交雑種雌牛から発情後7～8日目（発情発現日を0日）にバルーンカテーテルを用いて非手術的に回

収した。卵胞刺激ホルモン（FSH、アトリン、デンカ製薬）合計28mgを1日2回4日間計8回（5/5、4/4、3/3、2/2mg）に分けて筋肉内注射して過剰排卵処置を行った。プロスタグランディンF₂α類縁体750μg（エストラメイト、住友製薬）をFSH注射開始後48時間目に筋肉内注射し発情を誘起した。人工授精は、黒毛和種牛の凍結精液を用いて発情発現日の午後と翌朝の計2回行った。回収した胚は、倒立顕微鏡下で品質および発育ステージを既報（Linder and Wright, 1983）に準じて判定した。実験には、品質が優、良および可と判定された後期桑実胚～胚盤胞を用いた。これらの胚は、20%子牛血清加修正ダルベッコリン酸緩衝液（PBS-CSS、Gibco Laboratories、アメリカ、Cat. No. 14287）で数回洗浄したのち、凍結処理までPBS-CSS中で室温（25-30°C）または36°Cの加温板上で保存した。

胚の凍結および融解方法

凍結媒液は、PBS-CSSを基本液として1.8M EGを添加して作成した。凍結方法は第1章に従った。すなわち、胚をPBS-CSSから1.8M EG溶液に移し、直ちに0.25mlのプラスチックストロー（IMV, L'Aigle, フランス）に収納して室温下で10～33分間保持した。胚を収納したストローは-7°C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、同温度でさらに8分間保持した。その後、-30°Cまで0.3°C/分で冷却したのち液体窒素に投入して凍結した。融解は、液体窒素から取り出したストローを20～30°Cの水に氷晶が消えるまで浸漬して行った。

実験1

凍結・融解した胚をPBS-CSSに直接浸漬してEGを一段階希釈する際の温度が、胚の生存性に及ぼす影響について検討した。融解後、ストローから胚を取り出し、0.1mlの凍結媒液と共に22°Cまたは38.5°CのPBS-CSS（5ml）に直接浸漬した。38.5°C区は同温度の培養器内で、22°C区は同温度に

温度制御された実験室内で10~30分保持した。対照区は22°Cで6%EG、3%EGおよびPBS-CSSで各10分間保持する3段階希釈法を用いた。EGを希釈・除去した胚は、PBS-CSSおよび10%子牛血清加TCM199 (TCM-CSS) で数回洗浄したのち100 μ lのTCM-CSSを用い、38.5°C、5%CO₂および95%空気の湿度飽和気相で48時間培養して胚の生存性を調べた。生存性の判定は、凍結前の発育ステージが後期桑実胚の場合は胚盤胞以上、胚盤胞の場合は拡張胚盤胞以上に発育した胚を生存胚と判定した。

実験2

EGを一段階希釈する場合のPBS-CSS量が凍結・融解胚の生存性に及ぼす影響について検討した。融解胚は、以下の3法によりEGの希釈・除去を行った。A区：胚を0.1mlの凍結媒液と共に5mlのPBS-CSSに移し10分間保持、B区：胚を0.1mlの凍結媒液と共に0.5mlのPBS-CSSに移し10分間保持、対照区：6%EG、3%EGおよびPBS-CSSで各10分間保持する3段階希釈法を用いた。A区とB区で用いたPBS-CSSは予め38.5°Cに加熱し、胚を移したPBS-CSSは38.5°Cの培養器内で保持した。対照区の操作は室温下(25°C)で行った。凍害防止剤を希釈・除去した胚は実験1と同様に体外培養を行い、生存性を調べた。

実験3

胚凍結時の冷却速度がEGを一段階希釈した後の胚の生存性に及ぼす影響を調べた。胚は、1.8M EGを含む凍結媒液を用いて2種類(0.3および0.5°C/分)の冷却速度で冷却した。冷却速度以外は他の実験と同じ条件で凍結・融解を行った。EGの希釈・除去、体外培養および生存性の判定は実験2に従った。

統計分析

受胎率および生存率はFisherの直接確率法および χ^2 検定を用いて検討した。

結 果

実験 1

EGの一段階希釈温度別の培養成績は表5に示した。体外培養後の生存率は、22°C区が38.5°C区および対照区に比べて有意 ($P < 0.05$) に低かった。

実験 2

EGの希釈・除去方法別の培養成績は表6に示した。A区とB区の生存率に差はなく、希釈に用いたPBS-C5量の影響は認められなかった。また、両区の生存率は対照区の生存率と同等であった。

実験 3

2種類の冷却速度で凍結した胚の一段階希釈後の生存率は表7に示した。冷却速度の違いによって生存率に差は認められなかった。

表5. 1.8Mエチレングリコールで凍結したウシ胚の一段階希釈における希釈温度が生存率に及ぼす影響

希釈・除去 方法	温 度 (°C)	胚 の 品 質		合 計
		優および良	可	
一段階希釈	22	7/27(25.9) ^{ab}	5/19(26.3)	12/46(26.1) ^b
	38.5	14/21(66.7) ^c	8/23(34.8)	22/44(50.0) ^c
3段階希釈	22	17/29(58.6) ^c	5/15(33.3)	22/44(50.0) ^c

^a 生存胚数/凍結胚数 (%) .

^{bc} 異符号間に有意差有り (P<0.05).

表6. 1.8Mエチレングリコールで凍結したウシ胚の生存率に及ぼす
希釈・除去方法の影響

実験区 ^a	胚の品質		合計
	優および良	可	
A	11/16(68.8) ^b	6/14(42.9)	17/30(56.7)
B	11/16(68.8)	7/14(50.0)	18/30(60.0)
3段階希釈	12/17(70.6)	5/13(38.5)	17/30(56.7)

^a凍結・融解胚は0.1 mlの凍結媒液と共に38.5°C下で5 ml (A)または0.5 ml (B) の20%子牛血清加ダルベッコリン酸緩衝液に直接投入して希釈・除去した。希釈・除去した胚は10%子牛血清加TCM199を用いて、5% CO₂, 38.5°C, 95%空気, 湿度飽和気相の条件下で48時間体外培養した。

^b生存胚数/凍結胚数 (%)。

表7. 1.8Mエチレングリコールで凍結したウシ胚の一段階希釈後の生存率
に及ぼす冷却速度の影響

冷却速度 (°C/分)	胚の品質		合計
	優および良	可	
0.3	17/34(50.0) ^a	2/11(18.2)	19/45(42.2)
0.5	29/62(46.8)	4/19(21.1)	33/81(40.7)

^a生存胚数/凍結胚数 (%) .

考 察

1.8M EGを用いて凍結したウシ胚を等張液に直接浸漬し、38.5°CでEGの一段階希釈を行った場合の生存率は22°Cに比べて有意に高く ($P < 0.05$)、一段階希釈時のPBS-CSS温度が融解胚の生存率に影響することが明らかになった。凍害防止剤の胚細胞への細胞膜透過性は温度依存性が高く、環境温度を上げれば凍害防止剤の細胞膜透過性は高まる (Leibo, 1977)。ジメチルスルフォキシドを用いて凍結したマウス (Whittingham, 1974) およびウサギ胚 (Tsunoda and Sugie, 1977; Whittingham and Adams, 1976) にPBSを段階的に添加して凍害防止剤を希釈・除去する場合、37°Cで行った方が0または20°Cに比べて生存率の高いことが報告されている。これらの報告は、凍害防止剤の希釈・除去の温度が胚の生存性に影響していることを明確に証明している。22°CのPBS-CSSに浸漬した胚では、EGの細胞膜透過性が低く胚細胞内への急激な水の流入による浸透圧障害が生じたため生存率が低下したと考えられる。一方、38.5°CのPBS-CSSに浸漬した胚では、EGの細胞膜透過性が高く、胚細胞内からのEGの流出と胚細胞内への水の流入が均等に起こり、22°C区で起きた浸透圧障害が起きなかったため生存率が改善されたと推察される。

EGがどのようにして受胎牛の子宮内に移植された胚から希釈・除去されるか詳細は不明であるが、少量の子宮液によって希釈されていると推測される。そこで、実験2では一段階希釈時のPBS-CSS量 (希釈倍率) が生存率に及ぼす影響について検討した。融解胚は、38.5°C下で0.1mlの凍結媒液と共に0.5ml (6倍希釈) または5ml (51倍希釈) のPBS-CSSに直接投入したが、両者の生存率に差はなく、3段階希釈法と同等の生存率が得られた。この結果から、一段階希釈時のPBS-CSS量は希釈倍率6~51倍の範囲であれば胚の生存率に影響しないことが明らかになった。

Voelkel and Hu (1992a, 1992b) は、本実験で用いた1.8Mに近い1.75M EG

で凍結した胚を、PBSに移し20~24°Cの室温で5分間保持したのち培養液に移して高い生存率が得られたことを報告しており、本実験の22°C区の結果とは異なるものであった。彼らは、PBS中に5分間保持した後、39°Cの培養液に移している。一方、本実験では22°Cで10~30分間PBS-CS中に融解胚を保持しており、保持時間の違いが生存率の差に影響していると考えられる。また、Voelkel and Hu (1992a, 1992b) は、植氷後-35°Cまで0.5°C/分の速度で冷却しているが、実験1では、-30°Cまで0.3°C/分で冷却しており、冷却速度の違いも22°Cでの一段階希釈後の生存率の差に影響している可能性がある。そこで、実験3では、0.3と0.5°C/分の2つの冷却速度を用い、冷却速度が一段階希釈後の生存率に及ぼす影響を調べたが差はなかった。Hochi *et al.* (1996) は、1.5M EGを用いて0.3~1.5°C/分の冷却速度で体外受精由来胚盤胞を凍結・融解したのち一段階希釈した結果、0.3~0.9°C/分で高い生存率が得られたことを報告している。本実験で用いた冷却速度は、一段階希釈後の胚の生存性に大きな影響を及ぼさないことが明らかになり、Hochi *et al.* (1996) の結果とも一致した。

以上の結果より、1.8M EGで凍結した胚を等張液に直接浸漬してEGを希釈・除去する場合、希釈倍率および冷却速度は生存率に影響せず、希釈温度によって生存率は左右されることが明らかになった。さらに、EGを用いて凍結した胚は、融解後38.5°Cの等張液(PBS-CS)に直接浸漬してEGを希釈・除去したのち体外培養を行えば、凍結胚の直接移植後の受胎成績を予測できることが示唆された。

要 約

等張液を用いた一段階希釈がエチレングリコール（EG）で凍結したウシ胚の生存率に及ぼす影響を検討した。過剰排卵処置を施した供胚牛から発情後7および8日目に回収した胚を実験に用いた。胚を収納したストローは室温から -7°C に設定したプログラムフリーザーのアルコール液槽に直接浸漬し、2分後に植氷を行い、引き続き8分間保持した。次いで、 -30°C まで $0.3^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で冷却したのち液体窒素に投入した。

実験1では、融解した胚を20%子牛血清加修正ダルベッコリン酸緩衝液に直接浸漬してEGを希釈・除去する一段階希釈時の温度（22および 38.5°C ）が生存率に及ぼす影響を調べた。その結果、 38.5°C （50.0%）の生存率は 22°C （26.1%）に比べて有意に高く（ $P<0.05$ ）、3段階希釈法（50.0%）と同等の生存率を示した。実験2では、凍結した胚を 38.5°C 下で一段階希釈する場合の希釈倍率（6および51倍）を検討した。両区の生存率（56.7および60.0%）に差はなく3段階希釈法（56.7%）と同等であった。実験3では、冷却速度（0.3および $0.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ ）が 38.5°C 下での一段階希釈後の生存率に及ぼす影響を検討した。しかし、生存率（42.2および40.7%）に差は認められなかった。以上の結果より、1.8M EGで凍結した胚を融解後に等張液に浸漬して一段階でEGを希釈・除去する場合、希釈時の温度が胚の生存率に影響し、 38.5°C で希釈・除去すると高い生存率の得られることが明らかになった。さらに、一段階希釈法を用いて直接移植後の受胎成績を予測できることが示唆された。

第4章 顕微操作により透明帯と一部の細胞を除去したウシ胚の凍結保存と直接移植の検討

緒言

最近、Polymerase chain reaction (PCR) 法によるウシ胚の性判別法が開発 (Miller and Koopman, 1990; Herr and Reed, 1991; Itagaki *et al.*, 1993) され、実用化段階にある。ウシの育種改良に胚の性判別技術を効率的に活用するためには、性判別胚の凍結保存技術の確立が必要不可欠である。PCR法による胚の性判別を行う場合、一部の細胞を性判別用の試料として採取しなければならない。金属マイクロブレードを用いて透明帯と一部の細胞を除去した切断胚を凍害防止剤としてグリセリンを用いて凍結し、受胎牛に移植した場合の受胎率の低いことが問題となっている (Thibier and Nibart, 1995)。切断胚は、無処置胚に比べて透明帯が除去されることと切断に伴う胚の損傷の大きいことが、凍結・融解後の受胎率の低い原因と考えられている (Thibier and Nibart, 1995)。したがって、切断法を用いて透明帯と一部の細胞を除去したウシ胚の凍結・融解後の生存率を改善するためには、凍結条件の検討、特に凍害防止剤について検討する必要があると推察される。そこで、本章では、透明帯と一部の細胞を除去したウシ切断胚の凍結保存におけるエチレングリコール (EG) の有効性およびEGを用いて凍結した切断胚の直接移植の可能性について検討した。

材料および方法

供試胚

実験には、ホルスタイン種および黒毛和種雌牛に過剰排卵処置を施し、発情後7～8日目 (発情発現日を0日) に回収された胚を用いた。卵胞刺激ホ

ルモン (FSH、アトリン、デンカ製薬) 24mgを1日2回3日間計6回 (5/5, 4/4, 3/3mg) またはFSH36mgを1日2回4日間計8回 (6/6, 5/5, 4/4, 3/3mg) に分けて漸減的に筋肉内注射して過剰排卵処置を行った。FSH注射開始後48時間目にプロスタグランジン $F_2\alpha$ (PGF $_2\alpha$ 、プロナルゴンF、アップジョン) 35mgまたはPGF $_2\alpha$ 類縁体 (エストラメト、住友製薬) 500~750 μ gを筋肉内注射して発情を誘起した。人工授精は、ホルスタイン種牛および黒毛和種牛の凍結精液を用いて発情の発現した日の午後と翌日の午前の計2回実施した。胚の採取は、バルーンカテーテルを用いて非手術的に行った。回収した胚は、修正ダルベッコリン酸緩衝液 (PBS、Gibco Laboratories、アメリカ、Cat. NO. 14287) に20%ウマ血清を加えた溶液 (PBS-HS) で数回洗浄した後、既報 (Lindner and Wright, 1983) に準じて倒立顕微鏡下で品質および発育ステージを調べた。実験には、品質が優および良と判定された後期桑実胚~拡張胚盤胞を用いた。

実験1

性判別用試料の採取に用いる切断溶液が切断後の胚の生存性に及ぼす影響を調べるとともに、切断により採取した性判別用試料の細胞数も検査した。胚の切断に用いた溶液は、PBS、PBS+3mg/mlポリビニールピロリドン (PVP-40T、Sigma Chemical、アメリカ) およびPBS+0.2M ショ糖 (SUC) の3種類である。これらの溶液には、胚以外からの標的DNAの混入を防止するため、ウシ由来の血清やアルブミンなどの蛋白質は加えなかった。

胚の切断は以下の要領で行った。直径90mmのプラスチックシャーレに200~300 μ lのドロップを数個作り、このドロップに胚を1個ずつ入れた。金属ブレード (15°、フェザー) をマイクロマニピュレータに接続して、後期桑実胚では胚の直径に対して約20%、初期胚盤胞~拡張胚盤胞では内細胞塊を避けて胚の直径に対して栄養膜細胞側を約20%切断した。切断胚は、20%子牛血清 (CS) 加PBS (PBS-CS) で数回洗浄し、3~6時間100 μ lの

10%CS加Ham's F10のドロップ中で個別に体外培養(38.5°C、5%CO₂、95%空気の湿度飽和気相)して生存性を調べた。後期桑実胚では形態を回復し発育したもの、初期胚盤胞～拡張胚盤胞では胞胚腔が再拡張したものを生存胚と判定した。

PBS+SUC中で切断して採取した性別用試料の細胞数はPursel *et al.*, (1985)の方法に準じてヘキスト33342染色を実施し細胞数を計測した。すなわち、採取試料はスライドガラス上のヘキスト(10μg/ml)溶液に移し、カバーガラスを適当に圧して蛍光顕微鏡下で細胞数を計測した。

実験2

胚の切断はPBS+SUCを用いて実験1と同様に行い、凍害防止剤として1.8M EGあるいは1.8M EG+0.1M トレハロース(EG+TRE)を用いてTREの添加効果を検討した。凍結媒液は、凍害防止剤をPBS-CSに添加して作成した。一段階で凍結媒液に移した胚は、直ちに0.25mlのプラスチックストロー(IMV, L'Aigle, フランス)に収納し、冷却を開始するまで10~30分間室温(24~27°C)に保持した。冷却および融解は、植氷温度での保持時間を15分とした以外は第1章に準じて行った。すなわち、胚を収納したストローは室温から-7°C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、同温度でさらに13分間保持した。その後、-30°Cまで毎分0.3°Cで冷却したのち液体窒素に投入して凍結した。また、PBS+SUCを用いて胚細胞を傷つけないように透明帯を切開し、ピペティングにより透明帯を除去した胚も1.8M EGを用いて切断胚と同じ方法で凍結した。液体窒素から取り出したストローは20~30°Cの水に氷晶が消えるまで浸漬して融解した。

凍害防止剤の希釈・除去は、第3章で開発した一段階希釈法を用いた。すなわち、38.5°CのPBS-CSに融解胚を直接浸漬して行った。凍害防止剤を希釈・除去した胚はPBS-CSで数回洗浄したのち、実験1と同様に

48時間体外培養して生存率を調べた。凍結前の発育ステージが後期桑実胚の場合は胚盤胞に発育した胚を、また凍結前の発育ステージが胚盤胞の場合は胞胚腔が再拡張し凍結前より発育した胚を、それぞれ生存胚と判定した。

実験3

切断胚の受胚牛への移植は、EG+TREで凍結・融解した胚および新鮮胚を用いて行った。移植実験には、ホルスタイン種牛から採取された胚を用いた。胚の切断は、PBS+SUCを用い実験1と同じ要領で行った。新鮮胚(32個)は、実験1と同じ方法で4~6時間体外培養後、PBS-CSで洗浄し透明帯に還納せず裸化のまま移植に用いた。凍結・融解胚(5個)は、直接移植法により移植した。受胚牛には、ホルスタイン種未経産牛および経産牛計37頭を用いた。受胚牛の一部はPGF₂α類縁体500~750μgを注射して発情の同期化処置を行った。胚移植は、発情後6~8日目に受胚牛の黄体側子宮角に1個ずつ子宮頸管経由法により行った。妊娠診断は、移植後26~70日目に超音波断層装置および直腸検査により実施した。

統計分析

胚の生存率は χ^2 検定およびFisherの直接確率法を、性判別用試料の細胞数は t 検定を、それぞれ用いて比較検討した。

結果

実験1

3種類の切断溶液を用いて切断した胚の培養3~6時間後の生存率は表8に示した。3種類の溶液間に生存率の差はなく、ほとんどの胚が正常な形態に回復した。切断の操作性は、シャーレ底面への胚の接着・固定の容易なPBS+SUCが優れていた。

切断・採取した性判別用試料の細胞数の測定結果は表9に示した。採取細

胞数は、供試胚の発育ステージによって有意な差異は認められず、平均12.3個で、4個以上の細胞を採取した割合は94.8% (55/58) であったが、1~27個のばらつきがみられた。

実験2

切断胚および透明体除去胚の凍結・融解後の生存率は表10に示した。EGを用いて凍結した切断胚の生存率は、EG+TREを用いて凍結した切断胚およびEGを用いて凍結した透明帯除去胚の生存率に比べて有意に低い値を示した ($P<0.01$)。一方、1.8M EG+TREで凍結した切断胚とEGで凍結した透明体除去胚の生存率に差は認められなかった。

実験3

新鮮胚および凍結・融解胚の受胎率は、それぞれ59.4% (19/32) および40% (2/5) であった。受胎確認後、新鮮胚を移植した2頭の受胎牛は事故死し、1頭は早産 (発情後252日、27kg、子牛は正常) したが、残り16頭および凍結胚を移植した2頭の受胎牛は全て健康な子牛を分娩した。これら18頭の平均在胎日数 (発情後の日数) は279.3日で、平均生時体重は42.5kg (雄41.5kg、雌42.6kg) であった。

表 8. ウシ胚の切断操作に用いる溶液が切断胚の生存性に及ぼす影響

溶 液 ^a	供試胚数	培養後の生存胚数 (%)	
		0 時間	3 ~ 6 時間
PBS	15	15(100.0)	15(100.0)
PBS + PVP	22	21(95.5)	21(95.5)
PBS + SUC	150	150(100.0)	146(97.3)

^a PBS : 蛋白質を含まない修正ダルベッコリン酸緩衝液.

PBS + PVP : 3mg/ml ポリビニールピロリドン添加PBS.

PBS + SUC : 0.2M ショ糖添加PBS.

表 9. 性判別のために切断によって採取されたウシ胚の細胞数

胚の発育 ステージ	供試胚数	細胞数 (平均値±標準偏差)	範囲
後期桑実胚	17	11.4±6.9	4~25
初期胚盤胞	27	14.1±7.3	1~27
胚盤胞	7	7.4±2.7	2~11
合計	51	12.3±7.3	1~27

図 2. 透明帯と一部の細胞を除去したウシ胚の体外培養における発育

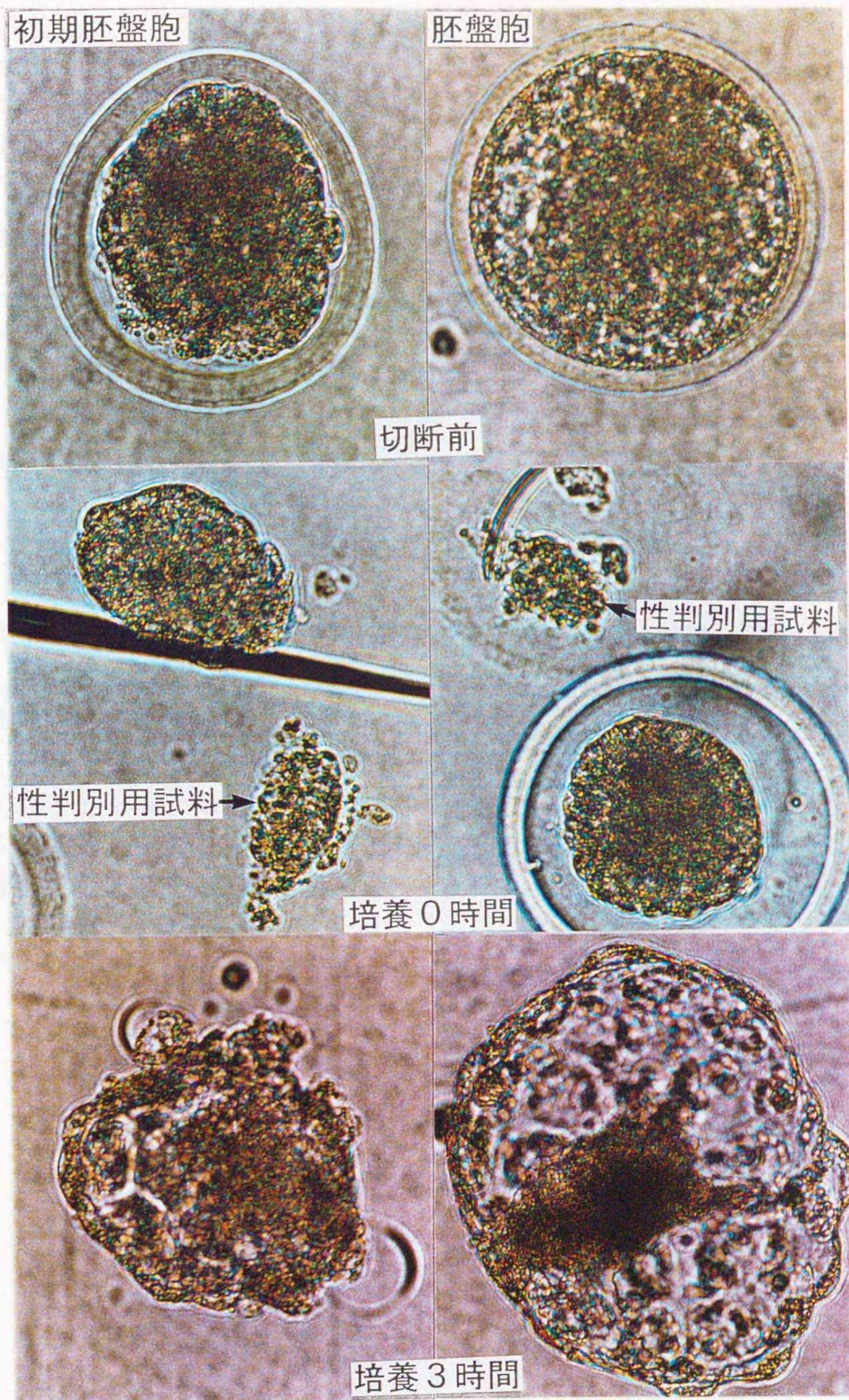


図2. 透明帯と一部の細胞を除去したウシ胚の体外培養における発育

表 10. 凍害防止剤の種類が凍結・融解後のウシ切断胚の生存性に及ぼす影響

胚の処置区分	凍害防止剤 ^b	生存胚数 (%) ^c
透明帯除去胚 ^a	1.8M EG	10/15 (66.7) ^d
切断胚	1.8M EG	1/16 (6.3) ^e
切断胚	1.8M EG+TRE	28/47 (59.6) ^d

^a透明帯除去胚:透明帯を除去した非切断胚.

^bEG:エチレングリコール, EG+TRE:エチレングリコール+0.1Mトレハロース.

^c体外培養:胚は10%子牛血清加Ham's F10で5% CO₂, 38.5°C、95%空気、湿度飽和気相で48時間体外培養.

^{d, e}異符号間に有意差あり (P<0.01).

考 察

PCR法によるウシ胚の性判別 (Miller and Koopman, 1990, Herr and Reed, 1991, Itagaki *et al.*, 1993) で重要なことは、胚以外からのウシ雄特異的DNAの混入を防止することである。通常、ウシ胚を体外で取り扱う場合、血清やアルブミンなどを添加した溶液を用いるが、切断して性判別用試料を採取する際には、ウシ由来の血清やアルブミンを含まない溶液を用いる必要がある。実験1では、ウシ由来の血清やアルブミンを含まない3種類の溶液中で胚を切断して生存率を比較した結果、いずれの溶液においても高い生存率が得られた。PBS+SUCはシャーレの底面に胚が接着し固定できる点で操作し易く、短時間での切断が可能であった。また、PBS+SUC中では胚がやや収縮するため、他の2つの溶液に比較して切断時の圧迫による細胞破裂など胚に与える損傷は少なく (Herr and Reed, 1991)、PBS+SUCは切断溶液として適していると考えられた。

性判別胚を凍結保存して高い生存率を得るためには必要最小限の胚細胞を採取するのが望ましい (Thibier and Nibart, 1995)。切断法は、マイクロピペットを用いた吸引法に比べて採取される細胞数が多いため、胚への損傷が大きく凍結・融解後の受胎率の低いことが指摘されている (Thibier and Nibart, 1995)。本実験 (平均12.3個の細胞を除去した胚) では、1.8M EGに0.1M TREを添加することによって切断胚の融解後の生存率は改善された。TREはSUCと同様に細胞膜非透過性の物質で、浸透圧緩衝剤 (Leibo and Mazur, 1978) としての効果がある。また、グリセリンのように細胞膜透過性の低い凍害防止剤 (Széll *et al.*, 1989) でも、SUCを添加したグリセリンを用いて凍結したウシ胚は凍害防止剤を希釈・除去せず受胎牛に直接移植できる (Dochi *et al.*, 1995)。EGにTREを添加した凍結媒液に胚を浸漬すると胚はやや収縮して細胞内浸透圧は高まり、胚細胞内へのEGの透過はEG単独の場合に比べて抑制されていると考えられる。また、融解胚を等張液に浸漬して凍害防止剤を希釈・除去する際、TREは胚細胞内への水の急激な流入を抑制し

ているとも考えられる。EGにTREを添加したことで切断胚の凍結・融解後の生存率が向上した理由は、胚細胞へのEGの過度の浸透および希釈時の急激な復水がTREによって適度に抑制されたためと推察される。したがって、切断操作を加えなかった透明帯除去胚ではEG単独で良好な生存率が得られたのに対して、切断胚の生存率が低かった原因として、切断胚の細胞膜透過性が変化したためではないかと推察された。今後、TREの添加効果の解明についてはさらに研究が必要である。

切断胚の凍結・融解後の生存率が低い原因の一つとして、切断によって透明帯が除去されるためであると考えられている(Schmidt *et al.*, 1992; Thibier and Nibart, 1995)。しかし、ウシ桑実胚および胚盤胞の凍結・融解後の生存性に透明帯の有無は影響しないことが報告されている(Niemann *et al.*, 1987)。本実験では、すべての胚で透明帯を除去したが、EGにTREを添加した凍結媒液を用いて凍結した胚では高い生存率が得られ、Niemann *et al.* (1987)の結果とも一致した。この結果から、切断胚の凍結において透明帯の有無が融解後の生存率に影響を及ぼす可能性のないことが確認された。

TRE添加1.8M EGで凍結・融解した切断胚を直接移植法により受胎牛に移植し健康な子牛の得られたことから、切断操作は子牛の発育に悪影響を及ぼさないことが示唆された。

以上の結果より、性判別のため透明帯および一部の細胞を切断により除去したウシ胚を凍結する場合、1.8M EGでは生存率が低く、0.1M TREを添加した1.8M EGが効果的であり、直接移植法に応用できることが分かった。

要 約

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。過剰排卵処置を施したウシから回収した後期桑実胚～拡張胚盤胞を実験に用いた。修正ダルベッコリン酸緩衝液 (PBS)、PBS+0.2Mシヨ糖 (SUC) およびPBS+ポリビニールピロリドン中で、金属ブレードを用いて透明帯と一部の細胞を切断し、溶液の種類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、溶液の違いによって生存率に差は認められなかったが、PBS+0.2M SUC中での切断操作が容易であった。PBS+SUCを用いて切断採取した性判別用試料の平均細胞数は12.3個で、4個以上の細胞を採取した胚は94.8% (55/58) であったが、1～27個のばらつきがみられた。1.8M エチレングリコール (EG) を用いて切断胚を凍結した場合、EGに0.1M トレハロース (TRE) を添加すると融解後の生存率は向上し、対照 (透明帯除去) 胚と同等の生存率が得られた。また、EG+TREを用いて凍結・融解した切断胚を受胎牛に直接移植して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、0.1M TREを添加した1.8M EGは切断胚の直接移植法の凍害防止剤として有効であることが示された。

第5章 総括

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°C 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°C または -30°C まで $0.3^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 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。受胎した受胎牛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°C 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°C まで 0.3°C または $0.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 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胎牛に移植した。対照区では、 1.4M GLY を用いて凍結した胚を段階的 (GLY-I) あるいはストロー内で 0.3M SUC を用いて希釈・除去 (GLY-II) したのち受胎牛に移植した。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、EGが42.6% (373/876)、PGが38.8% (207/533)、 GLY-I が48.6% (86/177) および GLY-II が46.0% (128/278) であった。EGの受胎率は、PGに比べて有意に高く ($P<0.05$)、 GLY-I および GLY-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 ($P<0.001$)、受胎牛の産歴 ($P<0.0001$) および受胎牛の黄体の形態 ($P<0.01$) 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 EG とともにストローに収納し、室温から -7°C 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°C まで $0.3^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 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 (PBS-CS) に投入してEGを希釈・除去した後の体外培養における生存率を調べた。EGで凍結した胚の一段階希釈時の温度 (22 および 38.5°C) が生存率に及ぼす影響を調べた結果、 38.5°C (50.0%) の生存率は 22°C (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。EGで凍結した胚を 38.5°C 下で一段階でEG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°C/分)は38.5°C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、性判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°C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。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に終始暖かい御指導と御教示を賜った北海道大学大学院獣医学研究科診断治療学講座繁殖学教室教授 金川弘司博士に深甚なる謝意を表す。また、本論文をまとめるにあたり、絶えず有意義な御指導と適切な御助言を戴いた同大学同研究科動物疾病制御学講座実験動物学教室教授 渡邊智正博士、同大学同研究科比較形態機能学講座解剖学教室教授 岩永敏彦博士および同大学同研究科診断治療学講座繁殖学教室助教授 高橋芳幸博士に深く感謝の意を表す。

本研究を行うにあたり、絶大なる御支援ならびに御協力を戴いた農林水産省家畜改良センター技術部技術第一課および技術第二課職員の方々に謝意を表す。同センター日高牧場（旧日高種畜牧場）において胚移植技術の御指導ならび本研究を始める機会を与えて戴いた現同センター岩手牧場次長 高倉宏輔氏、共同研究者として常に献身的に協力して戴いた同センター技術部技術第一課係長 今井 敬氏に謝意を表す。本研究を行うにあたり御指導と貴重な御助言を戴いた同センター技術部技術第一課長 小島敏之博士ならびに同センター技術部統括生産技術調整官 下平乙夫博士に感謝の意を表す。また、直接移植法の野外実用化試験は、受精卵移植等実用化確立事業の中で「凍結・融解技術の簡易化・安定化」に関する共同試験として行ったものであり、絶大なる御協力を戴いた北海道、秋田県、埼玉県、福井県、富山県、愛知県、京都府、兵庫県、岡山県、熊本県および鹿児島県の各道府県の関係者の方々に謝意を表す。

本研究を取りまとめるにあたり御支援、御協力戴いた農林水産省中国農業試験場畜産部長 萬田富治博士、育種繁殖研究室長 小松正憲博士、竹之内直樹主任研究官、大島一修研究員、有間裕子氏、農林水産省畜産試験場繁殖部上席研究官 高橋政義博士、同飼養技術部飼養システム研究室主任研究官 島田和宏博士の諸氏に謝意を表す。

供試牛の適切な管理および種々便宜をは図って戴いた農林水産省家畜改良センター企画調整室業務管理課ならびに同センター日高牧場（旧日高種畜牧場）種畜課、家畜人工妊娠課職員の方々に謝意を表する。

Chen et al. (1991)

Department of Animal Production, Chugoku National Agricultural Experiment Station

The objective of this study was to develop an applicable direct transfer method for bovine embryos frozen-derived with ethylene glycol (EG). The efficacy of EG as a cryoprotectant for freezing and direct transfer of bovine embryos, and the potentiality of the direct transfer method for bovine embryos frozen-derived with EG under in-vivo conditions were examined. Also, examined were the effects of one-step dilution conditions on the viability of bovine embryos frozen-derived with EG, and the freezing of bovine embryos with EG.

Efficacy of ethylene glycol as a cryoprotectant for freezing and direct transfer of bovine embryos

The use of EG as a cryoprotectant before the direct transfer of frozen-derived bovine embryos was investigated. Embryos ranging from the morula to 16-cell stage were collected on days 6 to 8 (gestation day 0) in Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 20% fetal calf serum and then were placed into 1.8 M EG or 1.8 M EG + 0.25 M sucrose (EG+SUC) and equilibrated for 13 to 21 min at room temperature (20-25°C) or 37°C. Each embryo was then loaded in a 0.15 ml straw, and placed directly in the cooling chamber of a programmable freezer programmed at -7°C. After 2 min at -7°C, the samples were held for a further 3 min at -7°C, and cooled to -25 or -30°C at 0.3°C/min before being plunged into liquid nitrogen. Control embryos were also frozen with 1.4 M glycerol + 0.25 M sucrose (GLY+SUC). Frozen embryos were thawed in a water bath at 37°C (EG or EG+SUC) or 20°C (GLY+SUC). After thawing, the straws, each containing an embryo frozen in EG, EG+SUC or GLY+SUC, directly inserted into incubation transfer gun and transferred to recipients without diluting the cryoprotectant. The pregnancy rates were 55.0% (20/36), 5.0% (1/20), and 60.0% (12/20) for EG, EG+SUC, and the control solution (GLY+SUC),

STUDIES ON FREEZING OF BOVINE EMBRYOS

—USE OF ETHYLENE GLYCOL AS A CRYOPROTECTANT AND DIRECT TRANSFER OF FROZEN-THAWED EMBRYOS TO RECIPIENT ANIMALS—

Osamu DOCHI

Department of Animal Production, Chugoku National Agricultural Experiment Station

The objective of this study was to develop an applicable direct transfer method for bovine embryos frozen-thawed with ethylene glycol (EG). The efficacy of EG as a cryoprotectant for freezing and direct transfer of bovine embryos, and the practicability of the direct transfer method for bovine embryos frozen-thawed with EG under on-farm conditions were examined. Also examined were the effects of one-step dilution conditions on the viability of bovine embryos frozen-thawed with EG, and the freezing of biopsied bovine embryos with EG.

Efficacy of ethylene glycol as a cryoprotectant for freezing and direct transfer of bovine embryos

The use of EG as a cryoprotectant before the direct transfer of frozen-thawed bovine embryos was investigated. Embryos ranging from the morula to blastocyst stages collected on days 6 to 8 (estrus=Day 0) in Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 20% heat-inactivated newborn calf serum were placed into 1.8 M EG or in 1.8 M EG + 0.25 M sucrose (EG+SUC), and equilibrated for 13 to 93 min at room temperature (20-25°C) or 37°C. Each embryo was then loaded in a 0.25 ml straw, and placed directly in the cooling chamber of a programmable freezer precooled at -7°C. After 2 min at -7°C, the samples were seeded, then held for a further 8 min at -7°C, and cooled to -25 or -30°C at 0.3°C/min before being plunged into liquid nitrogen. Control embryos were also frozen with 1.4 M glycerol + 0.25 M sucrose (GLY+SUC). Frozen embryos were thawed in a water bath at 37°C (EG or EG+SUC) or 20°C (GLY+SUC). After thawing, the straws, each containing an embryo frozen in EG, EG+SUC or GLY+SUC, directly mounted into an embryo transfer gun and transferred to recipients without diluting the cryoprotectants. The pregnancy rates were 69.0% (20/29), 52.0% (13/25), and 60.0% (15/25) for EG, EG+SUC, and the control medium (GLY+SUC),

respectively. A comparison was made as the pregnancy rate of embryos frozen-thawed with 1.5 or 1.8M EG after direct transfer to recipients. No significant differences in pregnancy rate were observed between 1.5M EG (45.0%) and 1.8M EG (52.9%). The pregnant recipient animals delivered healthy calves except for 7 which aborted. These results indicated that EG is a suitable cryoprotectant in which to freeze embryos before they are directly thawed and transferred to recipients.

Direct transfer of bovine embryos of frozen-thawed with ethylene glycol under on-farm conditions

The program was conducted to evaluate the practicability of the direct transfer method for bovine embryos frozen-thawed with EG or propylene glycol (PG) under on-farm conditions. Embryos ranging from the compacted morula to expanded blastocyst stages were collected from superovulated donors on days 7 or 8 after estrus and equilibrated in 1.8 M EG or 1.6 M PG in PBS supplemented with 20% heat-inactivated calf serum (CS). Embryos were then loaded individually into 0.25 ml straws, and directly placed in a cooling chamber of a programmable freezer precooled to -7°C . After 2 min, the straws were seeded, maintained at -7°C for 8 min more, and then cooled to -30°C either at $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ or $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ before being plunged into liquid nitrogen. Embryos at the same stages were also frozen with 1.4 M GLY by a conventional method which served as a control. The frozen embryos were thawed by allowing the straws to stand in air for 5 to 10 sec and then immersing them in a 30°C water bath. Embryos frozen-thawed with EG or PG were nonsurgically transferred into the uterine horn without diluting the cryoprotectants. Embryos frozen-thawed with GLY were nonsurgically transferred after removing the GLY either by the stepwise method (GLY-I) or by *in situ* dilution with 0.3 M sucrose solution (GLY-II). A total of 1,273 (PG, 400; EG, 418; GLY-I, 177; GLY-II, 278) frozen-thawed embryos were transferred into recipients, and yielded 545 pregnancies (overall: 42.8%; PG, 36.0%; EG, 44.7%; GLY-I, 48.6%; GLY-II, 46.0%). The pregnancy rate with EG was significantly higher than that with PG ($P < 0.05$), and equivalent to GLY-I or GLY-II. The pregnancy rate was also affected by the region where the embryo transfer program was carried out, the developmental stage of the embryos, the parity of the recipients, and the corpus luteum quality of the recipients. The present study demonstrates that EG can be effectively used as a cryoprotectant for the freezing and

direct transfer of bovine embryos, and that the direct transfer method is applicable under on-farm conditions.

Effect of one-step dilution procedures on the viability of bovine frozen-thawed with ethylene glycol

Several experiments were conducted to examine the effect of the one-step dilution on the viability of bovine embryos frozen-thawed with 1.8 M EG. Embryos were collected from superovulated cows on days 7 or 8 after estrus. Embryos frozen-thawed with 1.8 M EG were diluted directly in PBS supplemented with 20% CS (PBS-CS) by one-step at 22 °C or 38.5°C and by stepwise. The dilution temperature significantly affected the embryos viability (22 °C, 26.1%; 38.5°C, 50.0%; stepwise, 50.0%) ($P<0.05$). Embryos frozen-thawed with 1.8 M EG were diluted in 6 fold or 51 fold of PBS-CS by one-step at 38.5°C and by stepwise. No differences were observed in the embryos viability (6 fold , 56.7%; 51 fold, 60.0%; stepwise, 56.7%). Embryos were frozen with 1.8 M EG using two cooling rates (0.3 or 0.5 °C/min) and were diluted in PBS-CS by one-step at 38.5 °C. The viability of frozen-thawed embryos were not affected by the cooling rates (42.2 and 40.7%). These results demonstrate that dilution temperature is an important factor when bovine embryos frozen-thawed with 1.8 M EG are diluted in isotonic solution by one-step.

Freezing of biopsied bovine embryos with ethylene glycol

The biopsy solution and freezing condition of biopsied embryos for sexing were examined. Embryos ranging from the compacted morula to expanded blastocyst stages were collected from superovulated cows on days 7 or 8 after estrus. Embryos were biopsied using a micro-razor blade in one of three solutions (PBS, PBS+0.2M SUC, or PBS+3mg/ml polyvinylpyrrolidone). Although the viability of biopsied embryos was not affected by the solutions, manipulation in PBS+0.2M SUC was easier than that in other two solutions. The number of biopsied cells was 12.3 after embryos were biopsied in PBS+0.2M SUC. The addition of trehalose (TRE) to the EG solution was also evaluated. The viability of biopsied embryos frozen-thawed in 1.8 M EG+0.1 M TRE was significantly higher than that of those frozen-thawed in 1.8 M EG alone ($P<0.01$), and equivalent to that of frozen-thawed intact embryos without zona pellucida with 1.8M EG.

Two of five (40.0%) recipients became pregnant after the transfer of biopsied embryos frozen-thawed with 1.8 M EG+TRE. This suggests that there is no difference in the pregnancy rate of biopsied embryos frozen-thawed with 1.8 M EG+TRE and non-frozen biopsied embryos (59.4%, 19/32). These results indicate that EG+0.1 M TRE can be effectively used for the freezing and direct transfer of biopsied bovine embryos.

In conclusion, EG can be effectively used as a cryoprotectant for the freezing and direct transfer of bovine embryos, and the direct transfer method is applicable under on-farm conditions. Bovine embryos frozen-thawed with EG can be directly diluted in an isotonic solution by one-step. The EG +0.1 M TRE can be effectively used for the freezing and direct transfer of biopsied embryos.

参考文献

Bouyssou, B. and Chupin, D. (1982) Two-step freezing of cattle blastocysts with dimethylsulfoxide (DMSO) or Glycerol. *Theriogenology* 17: 159-166.

Broadbent, P.J., Stewart, M. and Dolman, D.F. (1991) Recipient management and embryo transfer. *Theriogenology* 35: 125-139.

Cocero, M.J., Procureur, R., De La Fuente J. and Chupin, D. (1988) Glycerol or ethylene glycol for cryoprotection of deep frozen ewe embryos. *Theriogenology* 29: 238 (abst).

堂地 修, 高倉宏輔, 今井 敬, 橋谷田豊 (1989) 胚移植における流産. 北海道牛受精卵移植研究会報 9: 25-28.

堂地 修, 今井 敬, 高倉宏輔 (1991) Ethylene glycolを用いて凍結したウシ胚のDirect transfer法による移植. 第84回日本畜産学会大会講演要旨. 65.

Dochi, O., Imai, K. and Takakura, H. (1995) Birth of calves after direct transfer of thawed bovine embryos stored frozen in ethylene glycol. *Anim. Reprod. Sci.* 38: 179-185.

Dochi, O., Yamamoto, Y., Saga, H., Yoshiba, N., Kano, N., Maeda, J., Miyata, K., Yamauchi, A., Tominaga, K., Oda, Y., Nakashima, T. and Inohae, S. (1998) Direct transfer of bovine embryos frozen-thawed in the presence of propylene glycol or ethylene glycol under on-farm conditions in an integrated embryo transfer program. *Theriogenology*: (in press).

Donaldson, L.E. (1985) Recipients as a source of variation in cattle embryo transfer. *Theriogenology* 23: 188 (abst).

Harvey, W. R. (1977) Mixed model least-squares and maximum likelihood computer program. User's guide for LSMLMW. Ohio State University, Columbus, Ohio.

Hasler, J. F., McCauley, A. D., Lathrop, W. F. and Foote, R. H. (1987) Effect of donor - embryo- recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology* 27: 139-168.

Herr, C.M. and Reed, K.C. (1991) Micromanipulation of bovine embryos for sex determination. *Theriogenology* 35: 45-54.

Hochi, S., Semple, E. and Leibo, S. P. (1996) Effect of cooling and warming rates during cryopreservation on survival of in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology* 46: 837-847.

Humblot, P., Perrin, J., Jeanguyot, N., Nibart, M. and Thibier, M. (1987) Effects of age and quality of thawed embryos, synchronization and corpus luteum function on pregnancy rates of bovine embryo recipients. *Theriogenology* 27: 240 (abst).

Itagaki, Y., Sato, S., Shitanaka, Y., Kudo, T., Yamaguchi, Y. and Suto, S. (1993) Sexing of bovine embryos with male-specific repetitive DNA by polymerase chain reaction: Sexing of bovine embryos and production of calves with predicted sex. *J. Reprod. Dev.* 39: 65-72.

金川弘司, 高橋芳幸, 井上忠恕, 福井 豊 (1988) 受精卵(胚)移植の背景. 牛の受精卵(胚)移植第2版. 金川弘司編著, 近代出版, 東京, 1-24.

笠井浩司 (1990) 牛受精卵凍結技術に関する共同試験の集計結果について. *ETニュースレター* 8: 65-72.

King, K.K., Seidel, G.E.Jr. and Elsdon, R.P. (1985) Bovine embryo transfer pregnancies. I. Abortion rates and characteristics of calves. *J. Anim. Sci.* 61: 747-757.

久利生正邦, 堂地 修, 宮田幸路, 下平乙夫 (1992) 受胎牛の黄体形状と血中プロジェステロン値. *家畜繁殖技術研究会誌* 14: 181-184.

Leibo, S. P. (1977) Fundamental cryobiology of mouse ova and embryos. In: Elliott, K and Whelan, J. (ed), *The freezing of Mammalian Embryos*, Ciba Found. Symp. No 52. Elsevier, Amsterdam, pp. 69-92.

Leibo, S.P. (1983) A one-step in situ dilution method for frozen-thawed bovine embryos. *Cryo-Letters* 4: 387-400.

Leibo, S.P. (1984) A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 21: 767-790.

Leibo, S.P. and Mazur, P. (1978) Methods for the preservation of mammalian embryos by freezing. In: Daniel JC Jr (ed), *Methods in Mammalian Reproduction*, Academic Press, New York, pp. 179-201.

Leibo, S.P., West, A.W., III, Perry, B. and Mills, A.C., III. (1982) A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryo. II Applied Studies. *Cryobiology* 19: 674 (abst).

Lindner, G.M. and Wright, R.W. Jr. (1983) Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* 20: 407-416.

Looney, C.R., Oden, A.J., Massey, J.M., Johnson, C.A. and Godke, R.A. (1984) Pregnancy rates following HCG administration at the time of transfer in embryo-recipient cattle. *Theriogenology* 21: 246 (abst).

Miller, J.R. and Koopman, M. (1990) Isolation and characterization of two male-specific DNA fragments from the bovine gene. *Animal Genetics* 21: 77-82.

Massip, A. and Van Der Zwalmen, P. (1984) Direct transfer of frozen cow embryos in glycerol-sucrose. *Vet. Rec.* 115: 327-328.

Massip, A. Van Der Zwalmen, P. and Ectors, F. (1987) Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. *Theriogenology* 27: 69-79.

Massip, A. Van Der Zwalmen, P. and Leroy, F. (1984) Effect of stage of development on survival of mouse embryos frozen-thawed rapidly. *Cryobiology* 21: 574-577.

Miyamoto, H. and Ishibashi, T. (1977) Survival of frozen-thawed mouse and rat embryos in the presence of ethylene glycol. *J. Reprod. Fertil.* 50: 373-375.

Miyamoto, H. and Ishibashi, T. (1978) The protective action of glycols against freezing damage of mouse and rat embryos. *J. Reprod. Fertil.* 54: 427-432.

Newcomb, R. and Rowson, L.E.A. (1980) Investigation of physiological factors affecting non-surgical transfer. *Theriogenology* 13: 41-49.

Niemann, H., Pryor, J.H. and Bondioli, K.R. (1987) Effects of slitting the zona pellucida and its subsequent sealing on freeze-thaw survival of day 7 bovine embryos. *Theriogenology* 28: 675-681.

大谷 健, 向島幸司, 内海恭三, 入谷 明 (1989) 無希釈移植のためのウシ胚凍結保存と移植法の開発. *家畜繁殖技術研究会誌* 11: 14-19.

Pettit, W.H.Jr. (1985) Commercial freezing of bovine embryos in glass ampules. *Theriogenology* 23: 13-16.

Pursel, V.G., Wall, R.J., Rexroad, C.E. Jr., Hammer, R.E. and Brinster, R.L. (1985) A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. *Theriogenology* 24: 687-691.

Remsen, L.G. and Roussel, J.D. (1982) Pregnancy rates relating to plasma progesterone levels in recipient heifers at day of transfer. *Theriogenology* 18: 365-372.

Renard, J-P., Heyman Y. and Ozil, J-P. (1982) Congelation de l'embryon bovin: une nouvelle methode de dilution pure le transfert cervical des embryons conditionnes une seule fois en paillettes. *Am. Med. Vet.* 126: 23-32.

Schneider, H.J. Jr., Castleberry, R.S. and Griffin, J.L. (1980) Commercial aspects of bovine embryo transfer. *Theriogenology* 13: 73-85.

Schmidt, M., Avery, B., Smith, S.D., Purwantara, B. and Greve, T. (1992) The freezability of biopsied bovine embryos. *Theriogenology* 38: 615-621.

関沢文夫, 斉藤光男, 荒井 徹, 西形勝雄, 鈴木 翼, 新井加三, 斉藤利夫, 鈴木 守, 松永俊明 (1989) 受精卵移植による一卵生双子の誕生. *栃木酪試研報* 113: 23-28.

関沢文夫, 斉藤光男, 久利生正邦, 飛田府宣, 荒井 徹, 中原達夫 (1996) 牛胚移植後の流産発生状況. *家畜繁殖誌* 42: j25-j27.

Smith, C. (1988) Applications of embryos transfer in animal breeding. *Theriogenology* 29: 203-212.

Songsasen, N., Buckrell, B. C., Plante, C. and Leibo, S. P. (1995) In vitro and in vivo survival of cryopreserved sheep embryos. *Cryobiology* 32: 78-91.

Stubbings, R.B. and Walton, J.S. (1986) Relationship between plasma progesterone concentrations and pregnancy rates in cattle receiving either fresh or previously frozen embryos. *Theriogenology* 26: 145-155.

鈴木達行, 下平乙夫, 酒井 豊, 松田修一, 三浦秀夫, 伊藤一伸 (1986) 改良したウシ凍結受精卵の1段階ストロー法による野外での非手術的移植. *家畜繁殖誌* 32: 118-123.

鈴木達行, 石田隆志, 酒井 豊 (1989) グリセロール (1.4M) 加蔗糖液を用いたウシ胚の凍結と移植試験. *家畜繁殖誌* 35: 125-129.

Suzuki, T., Yamamoto, M., Ooe, M., Sakata, A., Matsuoka, M., Nishikata, Y. and Okamoto, K. (1990) Effect of sucrose concentration used for one-step dilution upon in vitro and in vivo survival of bovine embryos refrigerated in glycerol and 1,2-propanediol. *Theriogenology* 34: 1051-1057.

Széll, A., Shelton, J. N. and Széll, K. (1989) Osmotic characteristics of sheep and cattle embryos. *Cryobiology* 26: 297-301.

Takagi, M., Boediono, A., Saha, S. and Suzuki, T. (1993) Survival rate of frozen-thawed bovine IVF embryos in relation to exposure time using various cryoprotectants. *Cryobiology* 30: 306-312.

高橋芳幸 (1983) ウシ受精卵移植における非手術的移植に関する研究. *家畜繁殖誌* 29: 136-139.

Takahashi, Y. and Kanagawa, H. (1984) Effects of LH-RH analogue on the ovulation rate and embryo quality in heifers superovulated with PMSG and PGF₂α. *Jpn. J. Vet. Res.* 32: 183-189.

高橋芳幸, 高倉宏輔 (1983) 牛受精卵の凍結保存における凍結融解法の検討. *北海道牛受精卵移植研究会報* 2: 28-30.

高倉宏輔, 高橋博人, 堂地 修, 有山賢一, 今井 敬 (1987) ストロー内でグリセロール除去した牛凍結胚の移植成績について. *北海道牛受精卵移植研究会報* 6: 42-44.

田中弘敬, 古川 力, 山田行雄 (1982) 受精卵移植を利用した肉用牛育種計画. I. 育種集団における改良効果の予測. *日畜会報* 53: 283-288.

田中芳実 (1994) 牛胚移植における黄体形状と凍結胚の取扱いが受胎に及ぼす影響. *日本胚移植研究会誌* 1: 18-24.

Tervit, H. R. and Goold, P. G. (1984) Deep-freezing sheep embryos. *Theriogenology* 21: 268 (abst).

Thibier, M. (1996) The 1995 statistics on the world embryo transfer industry. *Embryo Transfer Newsletter* 14: 27-30.

Thibier, M. and Nibart, M. (1995) The sexing of bovine embryos in the field. *Theriogenology* 43: 71-80.

Tsunoda, Y. and Sugie, T. (1977) Survival of rabbit eggs preserved in plastic straws in liquid nitrogen. *J. Reprod. Fertil.* 49: 173-171.

Voelkel, S. A. and Hu, Y.X. (1992a) Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 37: 23-37.

Voelkel, S. A. and Hu, Y. X. (1992b) Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing

direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females. *Theriogenology* 37: 687-697.

渡辺伸也, 栗田 崇, 高橋秀彰, 柘田博司, 安江 博 (1992) P C R法によるウシ胚の性判定におけるシグナル検出の信頼度に影響をおよぼす要因の検討. *家畜繁殖技術研究会誌* 14: 34-39.

Whittingham, D.G. (1974) The viability of frozen-thawed mouse blastocysts. *J. Reprod. Fertil.* 37: 159-162.

Whittingham, D.G. and Adams, C.E. (1976) Low temperature preservation of rabbit embryos. *J. Reprod. Fertil.* 49: 269-274.

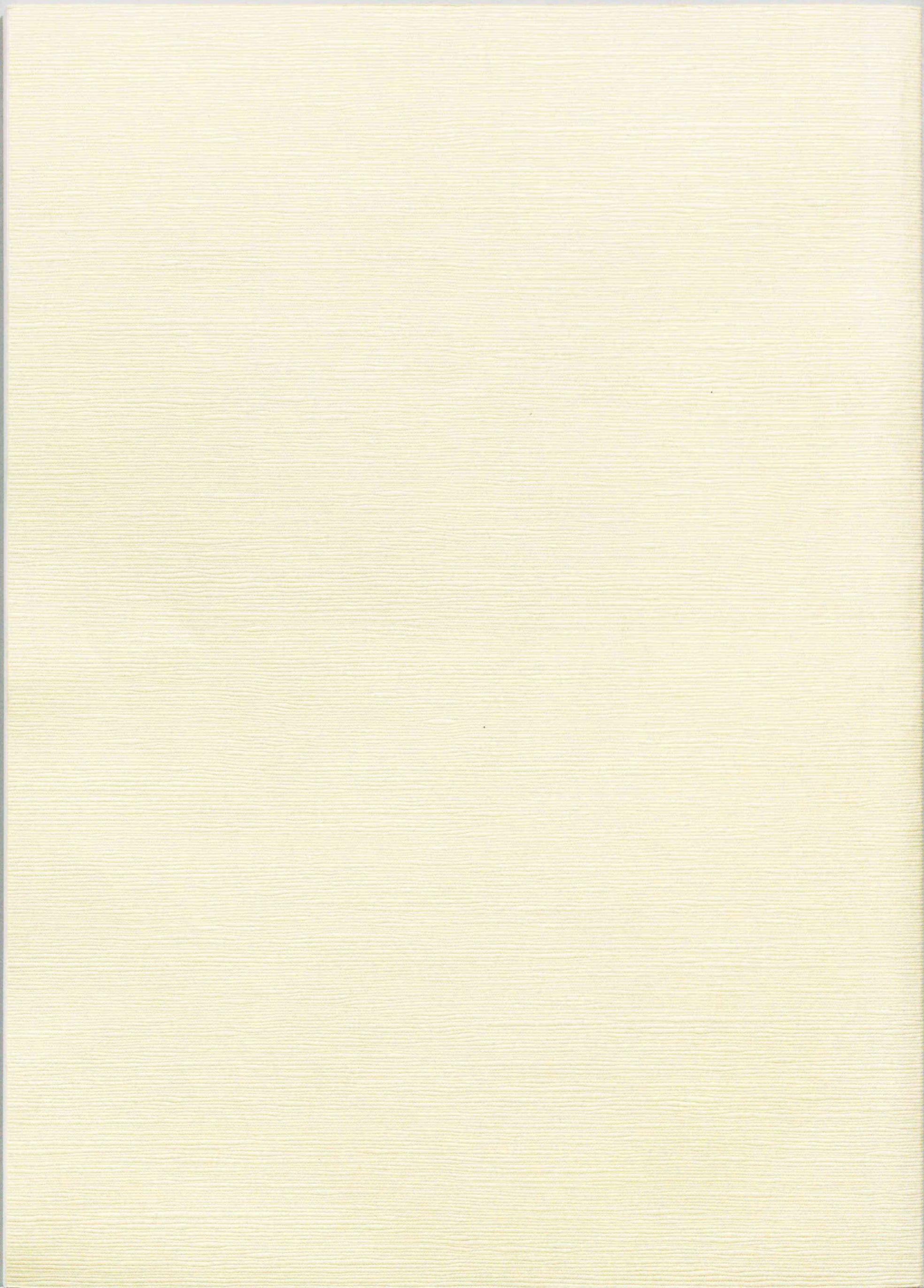
Willadsen, S., Polge, C. and Rowson, L.E.A. (1978) The viability of deep-frozen cow embryos. *J. Reprod. Fertil.* 52: 391-393.

Willett, E.L., Black, W.G., Casida, L.E., Stone, W.H. and Buckner, P.J. (1951) Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. *Science* 113: 247.

Wilmut, I. and Rowson, L. E. A. (1973) Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vet. Rec.* 92: 686-690.

Wright, J.M. (1981) Non-surgical embryos transfer in cattle embryo-recipient interactions. *Theriogenology* 15: 43-56.

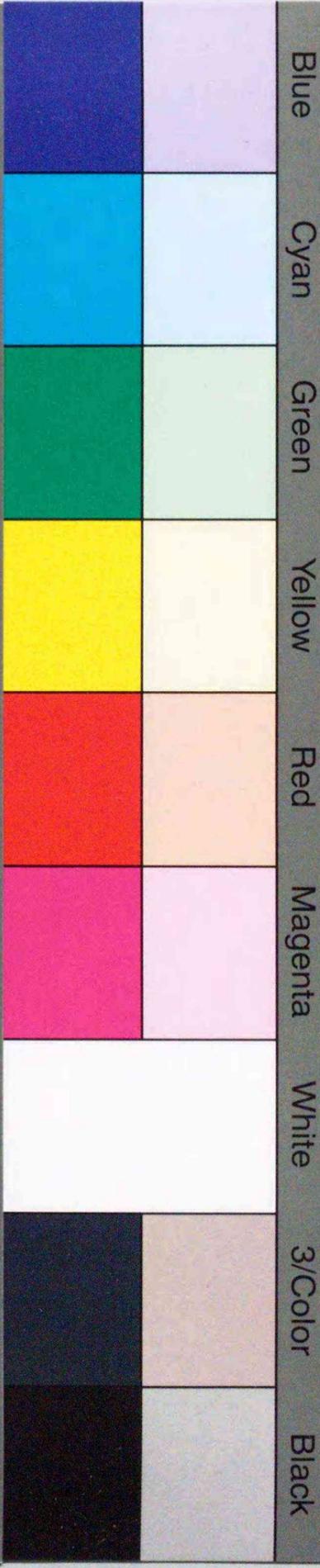
Wright, J.M. (1985) Commercial freezing of bovine embryos in straws. *Theriogenology* 23: 17-29.



inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

