

## 豚胚の凍結保存技術に関する試験

野沢久夫<sup>1</sup>、中村真弓、阿部泰男<sup>2</sup>、大久保彰夫、中島芳郎<sup>1</sup>

<sup>1</sup>栃木県県央家畜保健衛生所

<sup>2</sup>栃木県農務部畜産振興課

**要約** 豚の胚移植関連技術は、繁殖生理の特異性により未確立の部分が多く存在し、特に凍結保存技術は著しく遅れている。そこで、凍結方法の基礎的技術の確立と豚繁殖生理の解明を目的として、超急速凍結法（ガラス化凍結法）による保存技術について検討した。

試験 1 では、凍結媒液中のエチレングリコール（EG）濃度について試験を実施した。融解手法については、凍結媒液と DPBS を基礎液とした耐凍剤除去液をストロー中で混合する方法において、胚の生存性が比較的向上した。EG 濃度については、6M 以上の濃度において、ストローのガラス化状態が形成された。また、6M 以下の濃度において、融解培養後に回復する胚が認められた。

試験 2 では、凍結媒液は試験 1 の結果を踏まえて EG 濃度を 6M とし、耐凍剤除去液中のガラクトース（GAL）濃度について検討した。胚の融解培養後における生存性及び状態については、GAL 濃度との関連性は認められず、いずれの GAL 濃度においても発育率が低い結果となった。

以上のことから、凍結媒液の EG 濃度は、常法である 8M 以下の 6M であってもガラス化状態が完全に形成され、融解後における胚の損傷も減少できることが示唆された。しかし、GAL 濃度については、さらに検討する必要があると思われる。

### 緒言

豚胚の凍結保存技術は、豚胚の脂肪酸組成比や脂肪顆粒の存在等その特異性により、13℃以下の低温に極めて弱く、一部の研究機関で成功例があるものの、依然として技術確立が遅れている状況にある。

現時点では豚胚の凍結保存法には、緩速凍結法及び超急速に凍結するガラス化凍結法がある。ガラス化凍結法は、高濃度の耐凍剤を用いて直接液体窒素中で凍結するが、高濃度の耐凍剤は豚胚への毒性が大きく、変性や崩壊等の要因となっている。

そこで、凍結方法の基礎的技術の確立と豚繁殖生理の解明を目的として、ガラス化凍結時の凍結媒液や融解液等について検討した。

試験 1 では凍結媒液のエチレングリコール（EG）濃度、試験 2 では耐凍剤除去剤であるガラクトース（GAL）濃度について比較検討した。

### 材料及び方法

#### 試験 1（EG 濃度の検討）

##### 1 試験期間

平成 9 年 4 月～平成 10 年 3 月

##### 2 供試豚

当场繁養のランドレース種系統豚「トチギ L」若齢雌（200 日齢前後）を用いた

##### 3 供試豚の飼養管理

当场慣行法とした

##### 4 胚の採取

###### (1) 発情誘起及び人工授精

発情誘起及び人工授精は下記のとおり実施した

ア eCG1,500IU を筋肉内投与

イ 72 時間後に hCG500IU を筋肉内投与

ウ 24 時間後に人工授精（1 回目）

エ 24 時間後に人工授精（2 回目）

オ 5 日後に胚の採取

###### (2) 胚の採取

胚の採取は、「豚の胚移植マニュアル」<sup>1)</sup>に基づき、下記のとおり開腹手術または殺子宮摘出により行った。

ア 塩酸ケタミン（1.25g）及びアザペロン（0.4g）を筋肉内投与後、ハロセンにより吸入麻酔

イ 術野の洗浄、消毒及び手術準備

ウ 開腹、子宮灌流及び閉腹

灌流には、10%FBS 加 DPBS にペニシリン G カリウム及び硫酸ストレプトマイシンを添加した溶液を用いた。また、両抗生物質は、凍結媒液等他の溶液にも添加した。

###### (3) 胚の選定

胚の選定は、下記の手順で実施した

ア 洗浄液（10%FBS 加 DPBS）で洗浄

イ 正常胚と変性胚に分別

ウ 発育が遅れている正常胚は、培養液(10%FBS加0.2%BSA加M199)で、CO<sub>2</sub>インキュベーター(37°C、5%CO<sub>2</sub>、湿度100%)を用いて培養  
 エ 拡張胚盤胞及び脱出胚盤胞を供試胚として使用

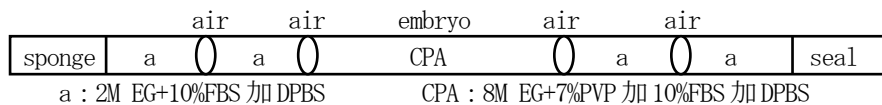
5 調査項目

- (1) 胚の採取成績:黄体数、採取胚数、正常胚数、正常胚率等  
 (2) 凍結融解後における胚の生存性  
 ア 各融解手法における胚の生存性  
 凍結ストローの融解時に、表1のとおりCPAと耐凍剤除去液の混合方法を設定し、培養後における胚の生存性について調査した。融解及び培養方法は、下記のとおりである。  
 (ア) 表1による各試験区での処理  
 (イ) 洗浄液(10%FBS加DPBS)で洗浄  
 (ウ) 培養液(10%FBS加0.2%BSA加M199)で、CO<sub>2</sub>インキュベーター(37°C、5%CO<sub>2</sub>、湿度100%)を用いて培養  
 (エ) 24時間後に胚の状態を調査  
 なお、胚の凍結は、下記のとおり超急速凍結法(ガラス化凍結法)により実施した。  
 (ア) 2M EG+10%FBS加DPBSに5分間浸漬(平衡)

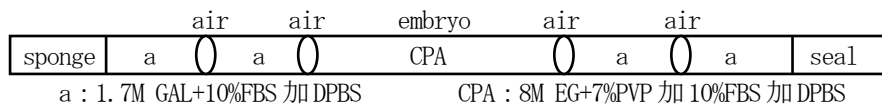
- (イ) 8M EG+7%PVP加10%FBS加DPBSに浸漬  
 (ウ) 浸漬後40秒以内に0.25mlストローへの封入及び液体窒素中での凍結  
 (オ) ストロー中の内容液については、図1のとおり3パターン製造した  
 イ 各EG濃度におけるストロー凍結時のガラス化状態  
 EG濃度を4M、5M、6M、7M、8Mと5段階に設定し、図2のとおり胚は封入せずCPAのみストローに注入し、液体窒素への投入時における、各濃度でのガラス化状態の有無を調査した。  
 ウ 各EG濃度における胚の発育状況  
 上記イと同様にCPA中のEG濃度を4M、5M、6M、7M、8Mと設定し、下記の手順により培養後における胚の生存性について調査した。  
 (ア) 2M EG+10%FBS加DPBSに5分間浸漬(平衡)  
 (イ) 各濃度EG+7%PVP加10%FBS加DPBSに浸漬  
 (ウ) 1.7M GAL+10%FBS加DPBSに浸漬  
 (エ) 洗浄液(10%FBS加DPBS)で洗浄  
 (オ) 培養液(10%FBS加0.2%BSA加M199)で、CO<sub>2</sub>インキュベーター(37°C、5%CO<sub>2</sub>、湿度100%)を用いて培養  
 (カ) 24時間後に胚の状態を調査

表1 試験区

試験区	融解手法
A区	ストロー外のシャーレ中で耐凍剤除去液と混合
B区	ストロー中で耐凍剤除去液と混合
C区	耐凍剤除去液の基礎液をM199に代えてストロー中で混合



・試験区分B区で使用



・試験区分C区で使用

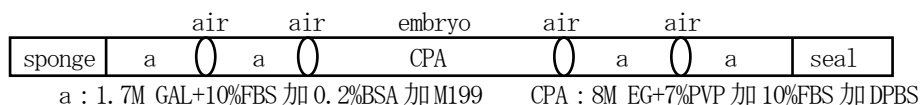


図1 各融解手法における胚の生存性調査で製造したストロー封入状態模式図

・試験区分A区で使用



外の処理を行い、培養後発育状況を調査した。6M以下の濃度では、5時間後においては収縮していたが24時間後においては回復する胚が認められ

た。7M及び8Mの濃度では、5時間後においては収縮しているものの生存している胚が、24時間後においては死滅や著しい変性となった。

表2 採取日別による胚の採取成績

No.	採取方法	頭数	黄体数	採取胚	正常胚	変性胚	凍結胚	正常胚率
1	と殺	2頭	28個	16個	10個	6個	10個	62.5%
2	外科	1	14	11	11	0	11	100
3	と殺	2	24	24	9	15	9	37.5
4	外科	1	9	8	8	0	0	100
5	と殺	1	15	12	10	2	10	83.3
6	と殺	3	66	54	37	17	35	68.5
7	外科	1	12	12	11	1	0	91.7
計		11	168	137	96	41	75	
平均			15.3	12.5	8.7	3.7	6.8	70.1

表3 各融解手法による胚の生存性

試験区分	1時間後	24時間後		
	生存数	維持	一部崩壊	全体崩壊
A区	5/22	7	8	7
B区	9/24	8	5	11
C区	4/12	1	3	8

表4 ストロウのガラス化状態

	4M	5M	6M	7M	8M
状態	白色	半透明	透明	透明	透明
備考	結晶化	一部結晶	ガラス化	ガラス化	ガラス化

表5 EG濃度による胚の発育状況

No.	濃度	5時間後	24時間後
1	8M	6割の収縮、胞胚腔あり	9割、突起あり
2	〃	同上	完全に変性
3	7M	7割の収縮、胞胚腔あり	変性がひどい
4	〃	同上	変性、崩壊
5	6M	9割の収縮、胞胚腔あり	6割、周囲変性、胞胚腔あり
6	〃	完全に収縮、胞胚腔あり	6割、変性部位が多い
7	5M	8割の収縮、胞胚腔あり	完全に回復
8	〃	生存、変性部位2カ所	変性部位2カ所死滅
9	4M	8割の収縮、胞胚腔あり	完全に回復
10	〃	6割の収縮、変性部位付着	9割まで回復

## 試験2 (GAL濃度の検討)

### 1 胚の採取成績

表6に胚の採取成績を示した。17頭を供胚豚として準備したが、No.9、No.14及びNo.16の3頭が子宮内膜炎のため採取不能であった。14頭からの採取結果については、黄体数は268個、採取胚数は189

個となり、回収率は70.5%であった。また、189個中正常胚数99個、変性胚数90個で、正常胚率は52.4%であった。

### 2 GAL濃度の違いによる凍結融解後における胚の生存性

表7に各GAL濃度における胚の発育状況を示した。GAL濃度1.7Mで融解した胚(1.7M区)においては、

脱出胚盤胞 2 個の胚、0.8M 区及び 0.4M 区では 1.7M 区と同様に脱出胚盤胞が 1 個ずつ発育した。しかし、

各区とも発育率が極めて低く、死滅した胚の状態についても各区間に一定の傾向は認められなかった。

表 6 採取日別による胚の採取成績

No.	採取年月日	頭数	黄体数	採取胚	正常胚	変性胚	凍結胚	正常胚率
1	H11. 1. 21	1	33 個	0 個	0 個	0 個	0 個	0%
2	H11. 1. 22	1	18	15	10	5	10	66.7
3	H11. 2. 25	1	10	8	8	0	7	100
4	H11. 3. 9	1	17	11	0	11	0	0
5	H11. 8. 11	1	27	15	10	5	10	66.7
6	H11. 8. 12	1	18	18	14	4	9	77.8
7	H11. 8. 26	1	13	11	1	10	1	9.1
8	H11. 9. 3	1	17	12	0	12	0	0
9	H11. 9. 9	1	-	-	-	-	-	-
10	H11. 9. 21	1	18	17	7	10	5	41.2
11	H11. 10. 14	1	26	25	5	20	5	20.0
12	H11. 12. 21	1	26	25	21	4	21	84.0
13	H12. 1. 11	1	13	8	6	2	6	75.0
14	H12. 1. 13	1	-	-	-	-	-	-
15	H12. 1. 14	1	16	15	11	4	11	73.3
16	H12. 1. 27	1	-	-	-	-	-	-
17	H12. 1. 28	1	16	9	6	3	6	66.7
計		17	268	189	99	90	91	
平均*			19.1	13.5	7.1	6.4	6.5	52.4

※14 頭の平均値

表 7 GAL 濃度による胚の発育状況

GAL 濃度	胚ステージ	N	24 時間培養後における胚の状態					
			生存 (発育)	死滅				
				維持	収縮	変性	崩壊	死滅計
1.7M	拡張胚盤胞	13	0	0	6	5	2	13
	脱出胚盤胞	11	2	0	1	2	6	9
0.8M	拡張胚盤胞	9	0	0	5	3	1	9
	脱出胚盤胞	10	1	0	5	2	2	9
0.4M	拡張胚盤胞	10	0	0	6	3	1	10
	脱出胚盤胞	9	1	0	3	2	3	8

## 考 察

豚における胚の採取技術は、開腹手術ではその手法はほぼ確立されている。また、採取効率を向上させるため、ホルモン投与による過排卵誘起試験も以前から実施され、eCG1000IU+hCG500IUが現在一般的な方法とされている<sup>1)</sup>。本試験では、eCG1500IU投与後 72 時間後にhCG500IUを投与し、24 時間後に人工授精を行うことにより効率的な胚の採取ができる<sup>2)</sup>ことから、同法により過排卵処理を実施した。試験 1 及び試験 2 の平均黄体数はそれぞれ 15.3、19.1 と

なり、今吉ら<sup>3)</sup>の報告とほぼ同様の数値となったが、明確な効果は認められなかった。また、正常胚率が 70.1%及び 52.4%であり、特に試験 2 では、子宮内膜炎により 3 頭が採取不能だったことから、既報<sup>1,4)</sup>のとおり eCG の投与単位数増加に伴う弊害が発生したものと考えられる。

ガラス化凍結でのストロー充填法は、小林ら<sup>5)</sup>が、耐凍剤除去液として非常に有効な GAL を CPA の両側に挟み込む形で充填し、温湯中で融解後ストローを振って両液を混合し、耐凍剤を除去する方法を採用して以来、各研究機関では同様の方法を用いている。

本来ストロー内混合は、牛胚において庭先融解及び移植を実用化するために開発された<sup>6)</sup>が、豚胚においても耐凍剤浸漬時間の短縮化や融解作業の簡素化が図れるなど有効な方法である。本試験では、ストロー外のシャーレ中で混合する手法との比較を行ったが、有意ではないものの、ストロー中で混合する手法において生存性が向上する傾向が認められ、同方法の有用性が実証された。また、本試験ではストローに充填する耐凍剤除去液の基礎液を、DPBSからM199に代えて胚の生存性を比較した。両液ともほぼ同様の結果を示すものと推測して試験を実施したが、M199を用いた除去液では、培養後に胚の形態が崩壊する胚が多数見受けられた。これは、DPBSとM199における組成成分の差によるものと考えられるが、短時間しか浸漬しない耐凍剤除去液がどの程度まで胚に影響を与えるのか今後さらに検討する必要がある。

CPA中の耐凍剤であるEGについては、小林ら<sup>5)</sup>により、他の実験動物や牛における手法を参考に試験が開始されたが、本試験では、まずEG濃度におけるガラス化の形成状態を確認した。LEIBOら<sup>7)</sup>は、EG濃度が6M以上でガラス化されることを報告しているが、本試験においても同様の結果が示されており、ガラス化の最低濃度は6Mであることが実証された。

現在、豚胚のガラス化凍結に用いられている一般的なEG濃度は8Mである。これは、小林ら<sup>5)</sup>が諸文献を基に8M EG+7%PVPを採用し、凍結融解後における高生存率を証明したことによるものであるが、本試験では、EG濃度6M以上でガラス化状態が形成されること、また、EGはプロピレングリコールやグリセロールと比較して毒性が低いものの、僅かでも低濃度に抑制した場合が豚胚の生存性を向上させるのではないかと予測し、6Mを中心とした各EG濃度での融解培養後における胚の生存性を調査した。その結果、牛胚の超急速凍結においては、6M EGでは低い生存率が示されているものの、豚胚においては6M濃度においても凍結保存が可能であることが示唆された。

CPA除去には従来段階希釈法が用いられていたが、細胞膜不透過性物質である糖類液に胚を浸漬すると、細胞内外の浸透圧差によりCPAが細胞外へ排出される<sup>6)</sup>ことから、シュクロースやトレハロース等が耐凍剤除去剤として使用されるようになった。しかし、小林ら<sup>5)</sup>は、糖類液内での胚の収縮状態や、同濃度における胚への影響は単糖類が優れているとの報告により、単糖類であるGALを採用し、現在では各研究機関とも同様の手法により耐凍剤を除去している。本試験では、試験1によりEG6Mにおいてもガラス化凍結が可能であるとの結果を得たことから、6MのEG濃度に適したGAL濃度を確立するため、試験2においてGAL濃度試験を実施した。しかし、GAL濃度による

明確な傾向は認められず、胚の生存性はいずれの試験区(1.7M、0.8M及び0.4M)においても極めて低い結果となった。その原因として、未熟な技術も考えられるが、今回の試験では、融解の手順として、ストローからGALに浸漬後直ちにDPBSで洗浄し、低濃度のEGで平衡しなかった。そのため生存性を低下させたと考えられる。小林ら<sup>5)</sup>は、段階的な濃度のEGに浸漬したことにより、高い生存率と細胞への損傷が極めて少ない成績を得ており、平衡が非常に重要であることを証明している。

また、本試験では、培養後の生存胚は拡張胚盤胞ではなく脱出胚盤胞であった。拡張胚盤胞の生存率は脱出胚盤胞と比較して高くなるとの報告が多数あり、本試験での成績との相違原因についても検討する必要がある。

以上のことから、CPAのEG濃度は、常法である8M以下の6Mであってもガラス化が完全に形成され、融解後における胚の損傷も軽減できることが示唆された。しかし、GAL濃度についてはさらに検討が必要であると思われた。

## 文 献

- 1) 農林水産省家畜改良センター豚新技術開発研究会. 豚の胚移植マニュアル. 1996.
- 2) 中嶋洋・藤野幸宏・浜口充・物江彊. 拡張胚盤胞の効率的な採取法. 埼玉畜試.
- 3) 今吉豊一郎・丸山信明・釘宮啓紀・吉田孝美. 豚受精卵の採取、移植技術の開発. 大分県農業技術センター畜産部試験研究成績書, 28:146-149. 1999.
- 4) 小林章二・市川明・加藤泰之・石原武. 開腹手術によるブタの胚移植の受胎成績. 愛知農総試研報, 22:353-358. 1990.
- 5) 小林章二・富田政秋・田中義昭. ポリビニールピロリドン加工エチレングリコール液で急速凍結したブタ胚の生存性. 愛知総農試研報, 26:321-326. 1994
- 6) 杉江侑. 家畜胚の移植, 養賢堂. 1989.
- 7) LEIBO. S. P. Oda. K. High survival of mouse zygotes and embryos cooled rapidly or slowly in ethyleneglycol plus polyvinylpyrrolidone. Cryo-Letters, 14:133-144. 1993.
- 8) 小林章二・武井真理・市川あゆみ・岩田久史. ガラス化保存したブタ胚の凍結保護物質除去方法が生存性に及ぼす影響. 愛知総農試, 27:279-284. 1995
- 9) 阿部泰男・野沢久夫・中島芳郎・川野辺章夫・上野昌司. 豚の胚移植に関する研究. 栃木県畜産試験場研究報告, 13:16-23. 1997.