

エチレングリコールを使用した牛凍結胚の 直接移植技術の開発研究とその普及による 胚移植の利用拡大

家畜改良センター胚移植研究グループ (代表：堂地 修)

堂地 修¹・今井 敬²・的場理子³・後藤裕司³・高倉宏輔⁴・下平乙夫⁵・
小島敏之⁶・斉藤則夫³

現所属先：¹酪農学園大学・²農業生物資源研究所・³家畜改良センター・

⁴日本食肉生産技術開発センター・⁵農林水産省生産局・

⁶株式会社合金鋳工所

1 技術開発の背景

わが国においては、安全・安心を含めた畜産物の高品質化が消費者の大きな関心事であるが、これに応えるには、その元となる家畜の遺伝的能力の向上と優良家畜の増殖が重要である。牛の胚移植技術は雄側のみならず雌側からの改良増殖を可能にする技術であるが、これを生産現場に広く普及・定着させるためには、移植が簡易な胚の凍結保存技術の確立が不可欠であった。

従来、牛胚の凍結保存には主として1.4モルグリセロールが凍結保護物質として広く用いられてきた。具体的手法としては、グリセロールを低濃度から最終的に1.4モルの濃度まで段階的に添加した後にプログラムフリーザーで冷却して凍結する。その後の研究により、グリセロールを段階的に添加するのではなく、一段階で最終濃度である1.4モルのグリセロールを添加しても胚の生存性に影響しないことが明らかとなり、凍結に際してのグリセロール添加の簡易化が図られた。

しかしながら、移植する段階では、グリセロールを用いて凍結・融解した胚を等張液中や子宮内に直接移すとほとんどの胚は浸透圧障害により生存性が損なわれることから、融解後、胚からグリセロールを段階的に希釈・除去しなければ移植に供することができない。このため、凍結・融解胚からのグリセロールの希釈・除去操作は、実験室において顕微鏡などの機械・器具や各種溶液を準備した上で、一旦ストローから胚を取り出して行わざるを得ず、凍結保存胚を広く生産現場で利用するためには、より簡易に移植を実施できるような凍結方法の確立が必要であった。

このような中で、簡易な移植方法として、1980年代にショ糖を用いてストロー内でグリ

セロールを希釈・除去する、いわゆるワンステップ・ストロー法が開発され、わが国においても積極的に移植試験が試みられたが、希釈・除去操作が煩雑で熟練を要することから期待した受胎率を得ることができず、生産現場に広く普及するには至らなかった。このため、より簡易な凍結方法の開発が求められることとなったが、その方法とは、凍結精液と同様に農家の庭先で融解し凍結保護物質を希釈・除去せず、受胎牛に直接移植できる凍結方法である。

2 技術開発の概要

本研究グループは、最初に旧日高種畜牧場において、凍結・融解後に凍結保護物質を希釈・除去しなくても受胎牛に直接移植できる牛胚の凍結方法の検討を行った。凍結保護物質をストロー内から取り出して希釈・除去することなく融解胚を受胎牛に移植する直接移植法において重要なことは、子宮内に移植された胚の生存性が浸透圧障害により損なわれることのないような条件で胚を凍結することである。子宮内に移植された凍結・融解胚が受ける浸透圧障害は、凍結保護物質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ものと考えられる。このような浸透圧障害は、細胞膜透過性の低い凍結保護物質を用いて胚を凍結した場合に起こりやすく、細胞膜透過性の低いグリセロールを用いて凍結した胚を移植した場合の受胎率は極めて低いことが確認されている。そのため、凍結保護物質の希釈・除去を行わずに凍結胚を直接移植する場合、細胞膜透過性の高い凍結保護物質を用いて凍結する必要があると考えられた。

エチレングリコールの哺乳動物胚の凍結保護物質としての有効性は1977年に京都大学グループによって初めて明らかにされている。また、エチレングリコールのマウス、ヒツジ及び牛胚への細胞膜透過性はグリセロールより高いことが報告されていた。本研究グループは、エチレングリコールの牛胚への細胞膜透過性の高いことに注目して、直接移植法におけるエチレングリコールの凍結保護物質としての有効性について検討を始めた。

1) 牛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

まず最初に、1990年3月、1.8モルエチレングリコールを凍結保護物質に用いて供胚牛より回収した胚を凍結・融解したのち、エチレングリコールを希釈・除去せずに受胎牛に移植する試験を行った。その結果、受胎牛23頭に移植して16頭（69.6%）の受胎を得ることに成功した。同年11月にはエチレングリコールを用いた直接移植法による最初の産子生産に成功し、エチレングリコールが直接移植法の凍結保護物質として有効であることを確認した。

これらの研究成果に基づき、1991年の第84回日本畜産学会大会において、エチレングリコールが直接移植法の凍結保護物質として有効であることを世界に先駆けて発表した（表1）。

また、エチレングリコール濃度が直接移植後の受胎率に及ぼす影響について、1.0、1.5、1.8及び2.0モルのエチレングリコールを用いて移植試験を行い、さらに検討を重ねた。その結果、牛の体内受精胚の凍結におけるエチレングリコールの至適濃度は1.5～1.8モルの間にあることを確認した。

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℃	71.4(5/7) ^b	50.0(7/14)	60.0(15/25)
-30℃	68.2(15/22)	54.5(6/11)	-
受胎率 ^b	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グリセロール＋0.25Mショ糖

b：受胎率（受胎頭数/移植頭数）

2) エチレングリコールで凍結した牛胚の等張液を用いた一段階希釈法の検討

生産現場において凍結胚を直接移植する場合、胚の生死を確認せずに移植するため、受胎率の低下が懸念された。エチレングリコールを用いて凍結した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（保存液）に直接浸漬してエチレングリコールを一段階希釈する必要があるが、実験室レベルではエチレングリコールを用いて凍結・融解した胚を等張液に直接浸漬して一段階希釈する方法が多用されるようになっていた。しかしながら、生産現場で保存液を用いてエチレングリコールを一段階希釈する場合、希釈時の温度や希釈に用いる保存液の量などの条件が一定しない可能性があり、その条件によっては生存性が損なわれる危険性があった。

そこで、本研究グループは1.8モルエチレングリコールを用いて凍結した胚の一段階希釈法の条件について検討した結果、希釈に用いる保存液（20%子牛血清を添加した修正ダルベッコリン酸緩衝液）の温度が高い場合（38.5℃）の生存率は、温度が低い場合（22℃）に比べて有意に高く、希釈時の保存液の温度が生存率に影響することを明らかにした（表2）。また、希釈時の保存液の量（希釈倍率、6～51倍）は、生存率に影響しないことも明らかにした（表3）。これらの結果から、1.8モルエチレングリコールで凍結した胚を38.5℃に加温した保存液に直接浸漬してエチレングリコールを希釈・除去した後に体外培養を行えば、直接移植後の受胎率を予測できることが示された。

表2 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

b, c : 異符号間に有意差あり (P<0.05)

表3 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一段階希釈の希釈倍率の影響

希釈・除去 方法	胚の品質		合計
	優及び良	可	
一段階希釈			
51倍希釈	11/16 (68.8) ^a	6/14 (42.9)	17/30 (56.7)
6倍希釈	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 : 生存胚数/凍結胚数 (%)

3) 体外受精由来胚の直接移植が可能な凍結方法の検討

体外受精由来胚は体内受精由来胚に比べて耐凍性が低く、凍結・融解した体外受精由来胚の受胎率は体内受精由来胚に比べ低い。したがって、体外受精胚の凍結・融解後の生存率向上には、培養液の組成及び凍結条件の検討が必要であるが、本研究グループは、リノール酸アルブミンを添加した培養液を用いて発育させた体外受精由来胚は凍結・融解後の生存率が高いことを明らかにした。

さらに、体外受精由来胚に直接移植法を応用するため、1.5及び1.8モルエチレングリコールに0.1モルショ糖を添加してその効果を検討した。これらの凍結保護物質を用いて凍結・融解した胚を保存液に直接浸漬して、凍結保護物質の希釈・除去を行った上で体外培養し、その生存性を比較した。

その結果、0.1モルショ糖を添加した1.5及び1.8モルエチレングリコールを用いて凍結・融解した胚の生存率は、エチレングリコール単独の場合に比べて有意に高かった。また、0.1モルショ糖を添加した1.5及び1.8モルの生存率の間に差は認められなかった(表4)。さらに、0.1モルショ糖を添加した1.5モルエチレングリコールを用いて凍結した体外受精由来胚を受胎牛に直接移植した結果、58.8% (10/17) の受胎率が得られ、新鮮胚(1または2個)の受胎成績60.9% (14/23) と同等であった。これらの結果より、体外受精由来胚を凍結し直接移植する場合の凍結保護物質として0.1モルショ糖を添加した1.5~1.8モルのエチレングリコールが有効であることを確認した。

表4 エチレングリコール及びショ糖を用いて凍結・融解した体外受精由来胚の生存率

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

EG：エチレングリコール，SUC：ショ糖
a,b;c,d：P<0.05

3 開発技術の普及活動

エチレングリコールを用いた直接移植法は、本研究グループが指導的役割を果たして実施された農林水産省畜産局（現畜産部）の受精卵移植等実用化確立事業「凍結・融解技術の簡易化・安定化共同試験」の中で11道府県（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、熊本県及び鹿児島県）の野外試験における大規模な移植試験によって有効性が確認された。

この移植試験の中では、1.8モルエチレングリコール及び1.6モルプロピレングリコールを用いた直接移植法と1.4モルグリセロールを用いた段階的希釈法及びショ糖を用いたストロー内希釈法（ワンステップ・ストロー法）の受胎率及び受胎率に影響を及ぼす要因について検討し、合計1,273頭の移植試験を行い545頭（42.8%）の受胎例を得た。方法別の受胎率は、エチレングリコールが42.6%（373/876）、プロピレングリコールが38.8%（207/533）、グリセロールの段階的希釈法が48.6%（86/177）及びグリセロールのストロー内希釈法が46.0%（128/278）であった。1.8モルエチレングリコールを用いた直接移植法の受胎率は、グリセロールを用いた段階的希釈法及びショ糖を用いたストロー内希釈法と差がなく、プロピレングリコールより高いことが示された（表5）。また、流産率及び死産率に方法間の差はなく、奇形などの異常な子牛の分娩は見られなかった（表6）。これらの結果から、エチレングリコールを用いた直接移植法の受胎率はグリセロールを用いた従来法の受胎率と差がなく、野外における実用性が高いことが明らかになった。

表5 プロピレングリコール、エチレングリコール及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 (%) の最小自乗平均値及び標準誤差

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}	3.78
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		425(160)	25.1 ^b	4.28
産歴	P<0.0001			
未経産		791(355)	46.2 ^a	2.14
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及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6 プロピレングリコール、エチレングリコール及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

凍結保護物質	受胎頭数 (%)	流産頭数 (%) ^b	転売 及び 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-II	128	17(13.3)	2	3(2.8)	106(84.1)

a : PG: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－転売及び死亡頭数)

d : 正常子牛頭数/ (受胎頭数－転売及び死亡頭数)

4 開発技術の学術的評価

本研究グループの研究は、それまで牛胚の凍結保護物質としてほとんど利用されていなかったエチレングリコールに着目し、エチレングリコールを用いて牛胚を凍結・融解後、受胎牛に直接移植しても良好な受胎率が得られることを明らかにした点に大きな意義がある。これらの研究成果は、Animal Reproduction Scienceはじめ国内外の学術雑誌、学会に公表されており、学術的に高い評価を受けている。

5 開発技術の産業への貢献

本研究グループは、それまで融解後、凍結保護物質の希釈・除去などの熟練技術と煩雑な操作を必要としていた凍結胚移植を人工授精と同様に農家の庭先で簡易に移植できる技術として確立・実証した。この開発された直接移植法は、凍結胚の融解に必要な専用施設、機械・器具、試薬を必要としないことから、その整備・準備にかかるコスト及び人件費の大幅な低減を可能にした。また、本研究グループの指導・普及活動により、受胎牛の頭数が少なく凍結胚の占める割合が大きくならざるを得ないわが国において、エチレングリコールを用いた凍結胚の直接移植法は広く普及し、生産現場における胚移植技術の利用拡大に大きく寄与した。

この間、受精卵移植師数も本技術が開発される前年（1989年）の810名から10年後には3,442名へと急増し、民間での胚移植実施機関数も130ヵ所から500ヵ所近くに増加した。その意味では、雇用機会と産業の創出の面でも大きく貢献しているといえる。

6 技術開発に関する発表論文等

学術雑誌等への発表

- 1) 堂地 修・今井 敬・高倉宏輔.ウシ凍結胚のDirect Transfer法による移植.北海道牛受精卵移植研究会報10:45-49(1991).
- 2) Dochi, O., Imai, K. and Takakura, H. Birth of calves after direct transfer of thawed bovine embryos stored frozen in ethylene glycol. Anim. Reprod. Sci. 38:179-185(1995).
- 3) 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. 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 49:1051-1058(1998).
- 4) 堂地 修・今井 敬.ウシ凍結胚の直接移植法.日本胚移植学雑誌21:28-34(1999).
- 5) Dochi,O., Imai,K., Goto,Y., Shimohira,I. Effect of one-step dilution procedures on the viability of bovine embryos frozen-thawed in ethylene glycol. Rakuno Gakuen Univ., 25:53-58(2000).
- 6) 堂地 修・今井 敬.リノール酸アルブミンがウシ体外受精由来切断分離胚の凍結・融解後の生存性に及ぼす影響. Rakuno Gakuen Univ., 26:51-56(2001).

一般雑誌への発表

- 1) 堂地 修.牛凍結胚のダイレクトトランスファー法.家畜人工授精53:28-33(1992).
- 2) 堂地 修.ウシ受精卵の凍結（超低温）保存技術（Ⅲ）(社)畜産技術協会、畜産技術 440:19-23(1992).

- 3) 堂地 修・山本裕介・嵯峨久光・吉羽宣明・加納直人・前田淳一・宮田幸路・山内昭・富永敬一郎・小田頼政・中島達彦・猪八重悟.ダイレクト・トランスファー法によるウシ凍結胚の移植試験.(社)畜産技術協会.畜産技術497:2-11(1996).
- 4) 堂地 修.家畜人工授精師講習会テキスト(家畜受精卵移植編).-第V章 2.牛胚の凍結保存-181-202(1996).

学会および研究会発表

- 1) 堂地 修・今井 敬・高倉宏輔.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.P61.1991.
- 2) Kocoski, LJ., Douchi, O., Chan, H., del So, AB., Ali Shah, K., Velasquez, RR., Sapalli, LE., Popovski, K. The effect of different cryopreservation method on the survival in bovine embryos. Proc 7th Sci Meeting Europ Embryo Trasnfer Association. P154.1991.
- 3) 堂地 修・下平乙夫・佐藤淳子・岡田真人・後藤裕司・今井 敬.Ethylene glycolを用いて凍結したウシ胚のP B Sへの直接投入後の生存性.第80回家畜繁殖学会大会.P59.1991.
- 4) 宮田幸路・堂地 修・久生正邦・下平乙夫・岡田真人・後藤裕司・今井 敬・奥地弘明・富澤宗高.Ethylene glycol及びPropanediolを用いたウシ胚凍結における冷却速度の検討.第7回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会.P70-71.1992.
- 5) 堂地 修・古関次夫・渡邊一博・安田幸治・下平乙夫.ウシ胚のDirect Transfer法におけるEthylene glycol濃度の検討.第86回日本畜産学会大会.P40.1992.
- 6) 堂地 修・斉藤政宏・後藤裕司・岡田真人・今井 敬・奥地弘明・富澤宗高・下平乙夫. Ethylene glycolを用いて凍結したウシ胚の希釈除去方法が生存率に及ぼす影響.第82回家畜繁殖学会大会.P52.1992.
- 7) 堂地 修・斉藤政宏・奥地弘明・富沢宗高・今井 敬・後藤裕司・下平乙夫.エチレングリコールを用いて凍結したウシ胚のP B Sへの直接投入時の温度が生存性に及ぼす影響.第84回家畜繁殖学会大会.P60.1993.
- 8) 堂地 修. 牛凍結胚の直接移植法の概要と現状(シンポジウム:牛凍結胚の直接移植法).第9回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会.P8-9.1994.
- 9) 今井 敬・富澤宗高・小林修司・的場理子・後藤裕司・下平乙夫・奥地弘明・堂地 修.リノール酸アルブミン添加がウシ体外受精由来胚盤胞の耐凍性に与える影響.第10回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会.P41-42.1995.
- 10) 今井 敬・富沢宗高・的場理子・小林修司・後藤裕司・奥地弘明・堂地 修・下平乙夫.ウシ体外受精胚の発生及び耐凍性に及ぼす各種添加物質の影響.第36回哺乳動物卵子学会大会.P36.1995.

- 11) 今井 敬・小林修司・後藤裕司・堂地 修・宮澤 彰・高橋博人.培養液及び凍結保存液へのリノール酸アルブミン添加がウシ体外受精胚の凍結融解後の生存性に及ぼす影響.第91回日本畜産学会大会.P237.1996.
- 12) Imai, K., Kobayashi,S.,Goto, Y., Dochi, O. and Shimohira, I. Cryopreservation of bovine embryos obtained by in-vitro culuture of IVM-IVF oocytes in the presence of linoleic acid albumin. (1997 International embryo transfer society annual meeting.) Theriogenology 47, P347. 1997.
- 13) 堂地 修. ウシ凍結胚の直接移植法. 第5回日本胚移植研究会および第17回北海道牛受精卵移植研究会合同大会 (シンポジウム：受精卵移植の現状と将来展望), P13-15.1998