



令和3年7月27日

報道関係者各位

国立大学法人帯広畜産大学

**世界で初めてレーザー穿孔装置を使用して凍結した馬受精卵の移植に成功  
～ピエゾとレーザー技術による大型馬受精卵のガラス化凍結法～**

**【リリース概要】**

帯広畜産大学 グローバルアグロメディシン研究センター教授 南保泰雄らの研究グループは、世界で初めてレーザー穿孔装置を用いた馬受精卵の凍結保存法の技術を利用した馬受精卵の移植に成功し、正常に馬の妊娠を成功させ得ることを示しました。レーザー穿孔装置を利用した凍結保存法により大型馬受精卵の生存率を上げることで、特に北海道和種馬などの絶滅が危惧される日本在来馬の効率的な生産を可能にし、それらの馬が障がい者や初心者にとって、安全に騎乗できる乗用馬として活用されることが期待されます。本研究による妊娠が確認された馬から、本年8月中旬に2頭の子馬が無事に出生することを祈っています。

**【研究の概要】**

これまで世界でレーザー穿孔装置を利用した馬受精卵を凍結保存した後に移植され誕生した子馬の報告はありませんでした。また馬において大型受精卵（直径 $>300\mu\text{m}$ ）の凍結保存が難しいことが報告されています。本研究は、従来のピエゾドリルと新しいレーザー穿孔技術を利用した馬の受精卵凍結保存法を評価する目的のために行われました。ピエゾドリルとレーザー技術を利用して凍結保存した6個の受精卵を加温した後、代理母馬に移植が行われました。初回の妊娠鑑定は受精卵移植から5日後に行いました。移植された6個の受精卵のうち、2つの受胎が確認され、その後妊娠が維持されました。このうちの1頭は、レーザー穿孔装置を利用して馬受精卵の周囲に穴をあけたのちにガラス化凍結保存し、加温後に非外科的手法で受精卵移植を行って受胎に至りました。この研究成果により、レーザー穿孔技術の利用は、凍結した大型馬受精卵の生存率を上げる可能性が示唆されました。これらの技術を確立するため、さらにレーザー穿孔技術による馬受精卵の凍結に関する研究が必要であると考えられます。

本研究は、セラピーホースや日本在来馬など希少な馬を受精卵として保存し、必要な際に移植させることにより、馬介在活動の発展的利用などの社会貢献が期待されます。

#### 【詳細な説明】

##### ～背景～

受精卵の凍結保存は絶滅が危惧される馬の効率的な生産を可能にする方法であると考えられています。馬の受精卵の凍結保存を成功させる要因は、受精卵のサイズ、卵割腔の体積、および受精卵の損傷に関係します。過去の研究では直径 300  $\mu\text{m}$  未満の受精卵は卵割腔に穴を開けることなく凍結保存され、妊娠率は 50～65%で、300  $\mu\text{m}$  を超える馬の受精卵は、収縮能力が低下すると報告されていました。一方、ヒト、マウスなどの哺乳動物の生殖補助医療において、レーザー技術が現在活用されています。本研究は、ピエゾドリルとレーザー技術により 300  $\mu\text{m}$  を超える馬の受精卵を穿孔することで、受精卵の腔液の除去と耐凍剤の透過性を増加させることを目的としておこないました。

##### ～方法～

2020 年の夏に、北海道和種馬であるドナーの馬の主席卵胞の大きさが 35 mm程度で子宮の浮腫グレードが 2 または 3 (0～5) である時点で 2000IU の hCG (ヒト絨毛性ゴナドトロピン) または 0.75 mg の GnRH 製剤 (デスロレリン) によって排卵を誘起しました。人工授精は、凍結精液を用いて排卵が予期される側の子宮角深部へ、排卵誘発剤投与後の 32 時間を目安に行いました。排卵の 7、8 日後に非外科的手法による受精卵回収を行い、回収された受精卵はピエゾとレーザー技術を利用して凍結保存をしました。凍結受精卵を加温溶液に入れ、培養 3 時間後受精卵の透明帯と栄養膜のサイズによるグレード (Table1) を分けて評価しました。2020 年 9 月、発情周期を同期化された北海道和種およびその交雑種をレシピエント (代理母) として、加温した凍結受精卵を子宮内に非外科的に移植しました。経直腸超音波検査により、妊娠鑑定は受精卵移植から 5 日後、すなわち Day12 または 13 に行いました。

##### ～結果～

受精卵移植は計 6 回行われ、移植された 6 個の受精卵のうち、2 つが受胎し、妊娠に至りました (Fig1)。現時点 (2021.7.20) で 2 頭の妊娠馬はおおよそ 310 日に達し、心拍数などの指標から無事に成長していると推測されています (Fig2)。受精卵 3 (598 $\mu\text{m}$ ) はレーザー穿孔により凍結保存し、受精卵移植されて成功した例です。私たちの知識では、レーザー穿孔技術を使用し、凍結受精卵を作製した後、移植により妊娠に至るという報告は世界初となります。以上の結果により、レーザー穿孔技術を使用する受精卵の凍結保存技術は馬の大きな受精卵 ( $\geq 300\mu\text{m}$ ) の凍結保存の生存率低い問題点を改善できると考えられます。本研究の成果は、セラピーホースや日本在来馬など希少な馬を受精卵として保存し、いつでも移植させる技術を確立することにより、地域や社会に貢献することが期待されます。

Case number	Group	Embryo diameter after collection ( $\mu\text{m}$ )	Diameter ( $\mu\text{m}$ ) after thawing		Diameter ( $\mu\text{m}$ ) after culture		Embryo grade after culture	Method of puncture	Result of pregnancy
			Trophoblast	Capsule	Trophoblast	Capsule			
1	A	233	186	241	242	258	1	PMAP	+
2	B	684	476	691	453	727	4	PMAP	-
3	B	598	414	546	468	548	1	LAP	+
4	B	571	431	530	547	558	1	LAP*2, PMAP	-
5	C	1235	953	1112	807	1103	3	PMAP*2	-
6	C	1360	1153	1244	752	1223	4	LAP, PMAP	-

\*2: two times.

Table1 : 受精卵のサイズ, 品質と穿孔方法。PMAP: ピエゾ穿孔 LAP: レーザー穿孔  
グレード 1 : excellent 2: good 3: fair 4: poor

A: 受精卵の直径 $\leq 300 \mu\text{m}$  B:  $300 \mu\text{m} <$  受精卵の直径  $< 700 \mu\text{m}$  C: 受精卵の直径  $\geq 700 \mu\text{m}$

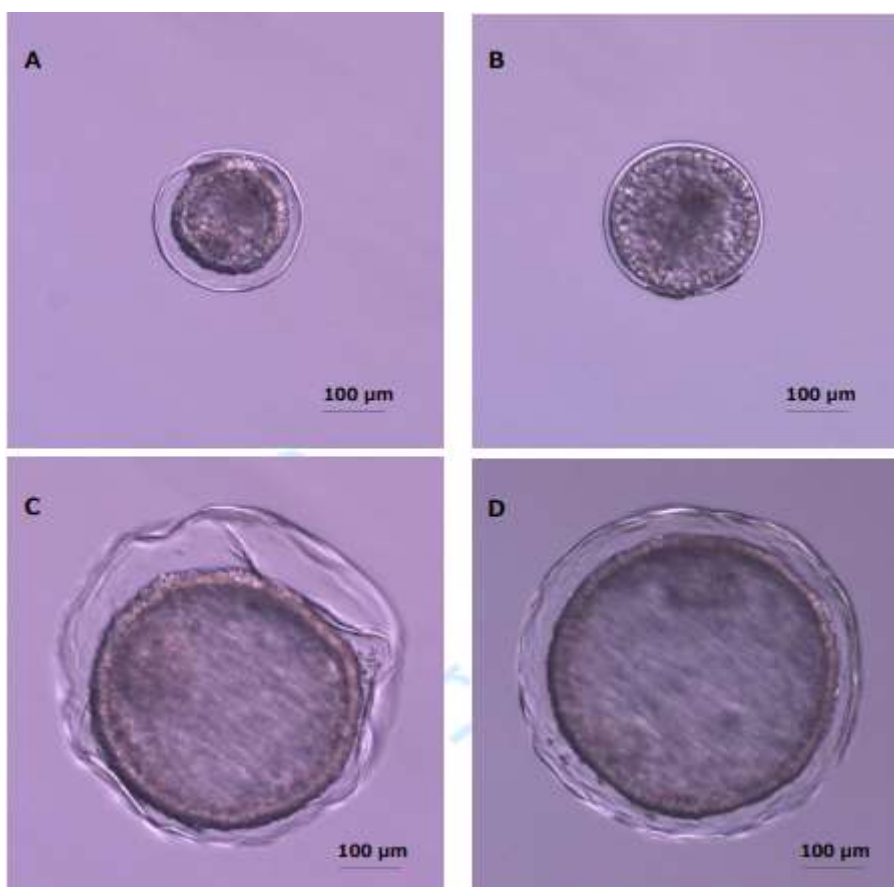


Fig1: 図 A と C, B と D は同じ受精卵を示している。図 A と C は加温直後, 図 B と D は加温 3 時間後を示している。

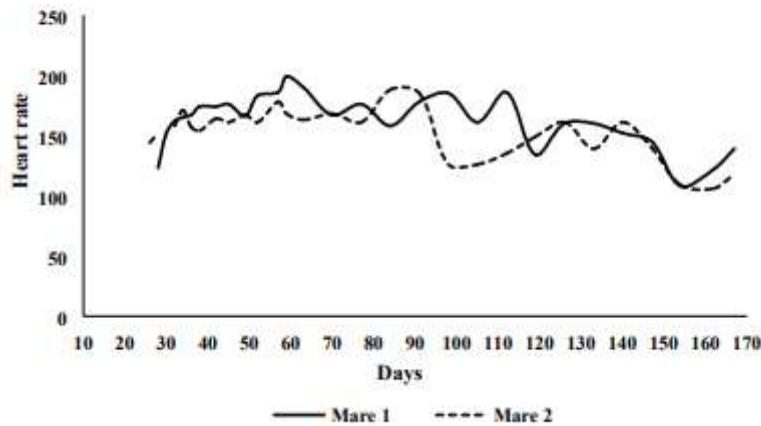


Fig2: 2頭妊娠馬の妊娠時期と胎子の心拍数

【発表雑誌】

発表雑誌名 : Reproduction in Domestic Animals

論文名 : Evaluating the use of piezo manipulator, laser, or their combination for blastocoel cavity puncture to improve cryopreservation outcomes of large equine embryos

著者名 : Reza Rajabi-Toustani, Hiroyuki Watanabe, Munkhtuul Tsogtgerel, Yuanzhi Gao, Li Canbo, Shingo Haneda, Soon Hon Cheong, Yasuo Nambo

DOI: [10.1111/rda.13990](https://doi.org/10.1111/rda.13990)

論文 URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/rda.13990>

【連絡先】

国立大学法人帯広畜産大学

グローバルアグロメディシン研究センター

教授 南保 泰雄

電話 : 0155-49-5394

E-mail : [ynambo@obihiro.ac.jp](mailto:ynambo@obihiro.ac.jp)