

完了試験研究成績（2006年2月作成）

関東東海北陸 > 畜産草地 > 家畜育種・繁殖 > 牛共通 > 福井畜試

課題 I D :

研究課題：ウシ超低温保存胚から作出したバイオプシー胚のガラス化保存後の生存性

担当部署：福井畜試・技術開発部・バイテク研究グループ

担当者名：谷村英俊

協力分担：

予算区分：県単

研究期間：完2003～2005年度

1. 目的

ガラス化保存法の開発に伴い、胚の高い保存性が確認されている。そこで、ステップワイズ保存胚（SW胚）とガラス化保存胚（G胚）をバイオプシー後再保存し、生存性の違いを検討する。

2. 方法

供試胚は、fairまたはpoorランクのSW胚49個、G胚30個を用いた。

胚の凍結は3段階でグリセリン平衡を行った10%グリセリン、20%子牛血清、0.4%ウシ血清アルブミン添加D-PBSを耐凍剤としたステップワイズ法（SW区）により行い、ガラス化は10%グリセリン、30%エチレングリコール、0.3Mショ糖、0.3Mキシロース、3%アルブミン添加D-PBSを組成としたガラス化液（斎藤、投稿中；ガラス化区）を用いて行った。

SW区のグリセリンの希釈は3段階で行い、ガラス化液の希釈は同一ストロー内に構成した0.3Mショ糖と胚を含むガラス化液をストロー内で混和して行った。

胚の培養は、10%牛胎子血清、0.1mM β メルカプトエタノールおよび1%ソルコセルル添加TCM199培地50 μ l中で38.5℃、5%CO₂ in airおよび加湿下で行った。

試験1 Intact胚の融解、培養24時間後の生存率を形態学的観察に基づきSW区とガラス化区で比較。

試験2 生存胚のうち形態が良好なものをマイクロブレード(15°フェザ-製)を装着したマイクロマニピュレーターで胚全体の20 - 30%の細胞塊を切除し、培養24時間後の生存率を両区間で比較。

試験3 生存したバイオプシー胚についてSW区由来のものは再度凍結またはガラス化を行い(SW-SW区、SW-ガラス化区)、ガラス化区由来のものは再度ガラス化を行った(ガラス化-ガラス化区)。これらを液体窒素中で保存後に融解し、24時間および48時間培養後の生存率を比較。

3. 結果の概要

1) Intact胚の融解後の生存率は、SW区67.3%(33/49)、ガラス化区86.7%(26/30)でガラス化区がSW区に比べ高い傾向が窺えた(表1)。

2) バイオプシー後の生存率は、SW区由来が65.5%(19/29)、ガラス化区由来が60%(15/25)とほぼ同様の成績であった(表2)。

3) 再凍結または再ガラス化したバイオプシー胚の生存率は、培養24時間ではSW-SW区44.4%(4/9)、SW-ガラス化区55.6%(5/9)、ガラス化-ガラス化区64.3%(9/14)であり、培養48時間では各々22.2%(2/9)、44.4%(4/9)および57.1%(8/14)であった(表3)。

[具体的データ]

表1 ステップワイズ法またはガラス化法で超低温
保存した I n t a c t 胚の生存率

保存方法	供試数	生存数	生存率 (%)
S W 区	49	33	67.3 ^a
ガラス化区	30	26	86.7 ^b

a,b (p < 0.10) χ^2 y

表2 ステップワイズ法またはガラス化法で保存胚から作出
したハイブリッド胚の培養24時間後の生存率

保存方法	供試数	生存数	生存率 (%)
S W 区	29	19	65.5
ガラス化区	25	15	60.0

表3 ステップワイズ法またはガラス化法保存胚に由来する
ハイブリッド胚の再凍結または再ガラス化後の生存率

保存方法		供試数	生存数 (24hr後)	生存率 (%)	生存数 (48hr後)	生存率 (%)
SW	- SW区	9	4	44.4	2	22.2
SW	- ガラス化区	9	5	55.6	4	44.4
	ガラス化-ガラス化区	14	9	64.3	8	57.1

4. 成果の活用面と留意点

ガラス化法で超低温保存後に融解・切断した胚では、性判別の積極的な利用が可能となり、性判別後にガラス化保存することで、野外における実用性はさらに高まると考えられる。

5. 残された問題とその対応

- 1) 胚の培養時間の短縮を図る必要がある。
- 2) 例数の追加および移植による受胎性の確認が必要である。

