
[成果情報名] 牛卵子におけるフィルターを利用したガラス化保存法の開発

[要約] 牛卵子のガラス化保存において、メンブレンフィルターに卵子を載せ、上からガラス化液を滴下してガラス化する新たな手法（フィルター法）を開発した。フィルター法では、卵子のガラス化保存に必要な作業を簡略化でき、一度により多くの卵子を処理することが可能となる。

[キーワード] 牛、卵子、ガラス化、フィルター

[担当部署] 家畜部・畜産工学チーム

[連絡先] 092-925-5232

[対象作目] 乳用牛・肉用牛 [専門項目] バイテク [成果分類] 技術改良

[背景・ねらい]

卵子の保存は胚より難しく、保存卵子の体外受精後の胚発生率も非常に低いことから、卵子の保存には急速冷却法によるガラス化保存技術が用いられている。

ガラス化保存法では、卵子をガラス化液に浸し液体窒素へ投入するまでの平衡時間を厳密に守る必要があり、短い平衡時間内に粘性の高いガラス化液中でのピペッティング作業を実施しなければならないことから、従来手法では作業に熟練を要するうえ、一度に処理できる卵子の個数も少ないのが現状である。

そこで、短い平衡時間内に行う作業を簡略化でき、一度により多くの卵子を処理することが可能になる新たなガラス化保存手法の開発を図る。

（ 要望機関名：畜産課（H10））

[成果の内容・特徴]

- 1．ろ紙を敷いたメンブレンフィルター上に前平衡処理まで済ませた卵子を載せ、上からガラス化液を滴下して余分なガラス化液をろ紙に吸着させながら平衡を行い、そのまま卵子の載ったフィルターごと液体窒素へ投入し保存する新たなガラス化保存手法（フィルター法）を開発した（図1）。
- 2．フィルター法では、従来のガラス化保存処理で最も繁雑であったガラス化液中でのピペッティング作業がなく処理が簡略化できることから、一度により多くの卵子を処理することが可能である（図1、2）。
- 3．フィルター法を用いて保存した卵子から、体外受精・体外培養により移植可能な胚が得られ、体外受精後の胚分割率、発生率は、ともに従来手法に比べ改善される傾向にある（表1）。

[成果の活用面・留意点]

- 1．経腔採卵で採取される卵子を保存し、まとめて体外受精を行う際などに活用できる。
- 2．希釈液中で加温する際、すぐにフィルターに付着している卵子を剥がそうとすると卵子を破損する恐れがあるため、5分間はそのままおいて形態の回復を待つ。

[具体的データ]

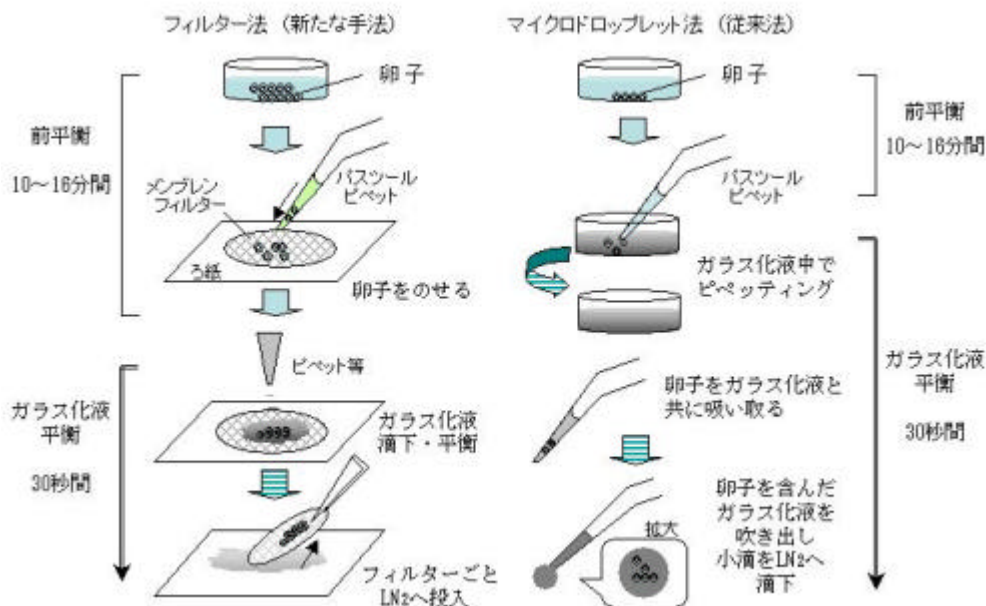


図1 新たな卵子のガラス化保存手法（フィルター法）の開発（平成15年）

- 注) 1.卵子のガラス化手順：前平衡（10分～16分） ガラス化液平衡（30秒） 液体窒素投入
 2.前平衡液：3% エチレングリコール、20% 牛胎子血清添加TCM199溶液
 3.ガラス化液：40% エチレングリコール、0.67M シュクロース、20% 牛胎子血清添加TCM199溶液

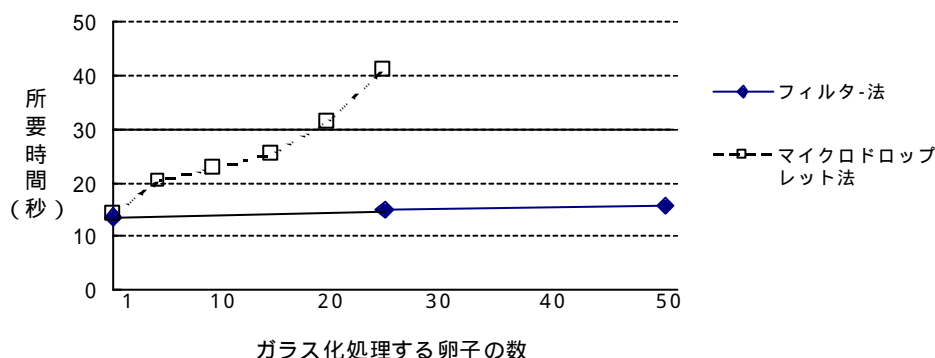


図2 ガラス化液平衡処理の作業にかかる所要時間（平成15年）

表1 保存した卵子の体外受精後の胚発生成績（平成15年）

区	供試卵子数	分割胚数 (%)	発生胚数 (%)
フィルター法	155	67 (42)	19 (12)
マイクロドロプレット法	167	60 (35)	13 (7)

- 注) 1.分割胚数：体外受精後2日目までに2細胞期以上に発育した数
 2.発生胚数：体外受精後8日目までに拡張胚盤胞期に発育した数
 3.参考 新鮮卵子：分割胚率78%、発生胚率33%

[その他]

研究課題名：乳牛胚の大量生産技術の確立
 予算区分：経常
 研究期間：平成15年度（平成12～15年）
 研究担当者：森 美幸、笠 正二郎、上田修二
 発表論文等：平成15年度畜産関係成績書