

---

[ 成果情報名 ] 超急速ガラス化した牛胚のストロー内融解とガラス化液希釈による生存性の向上

[ 要約 ] 超急速ガラス化した牛体外受精胚をストロー内で融解し、ガラス化液を希釈すると、従来の緩慢冷却による凍結保存法と比べ、生存性が高く維持され、発育性が向上するため、移植による受胎率向上が期待できる。

[ キーワード ] ガラス化、牛、胚、融解、希釈、生存性

[ 担当部署 ] 家畜部・畜産工学チーム

[ 連絡先 ] 092-925-5232

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

---

[ 背景・ねらい ]

従来の緩慢冷却法で牛体外受精胚を凍結すると、融解後の生存性の下降が見られる。そのため、現場で融解して移植できる生存性の高い牛胚保存法が望まれていた。

そこで、現場では牛胚を生存性の高い超急速ガラス化保存できる用具および手法（特願2004-054966）を開発した。今回、この用具を利用して現場で簡易に融解・希釈できる移植法（FSD法：Fukuoka Straw Dilution Method）を考案し、この方法と従来の緩慢冷却法とで体外受精胚の生存性を比較検討する。

（要望機関名：畜産課(H10)）

[ 成果の内容・特徴 ]

- 1．牛体外受精胚を FSD 法により 0.25ml プラスチックストロー内で保存後、融解・希釈すると、従来の緩慢冷却凍結法と比較して、生存率が有意に向上する（図1、表1）。
- 2．牛体外受精胚を FSD 法で超急速ガラス化すると、融解後の透明帯脱出率が従来の緩慢冷却凍結法と比較して有意に高く、また、透明帯脱出胚盤胞の良質率も従来法と比べて有意に高い（84% vs 32%）。これらのことから、FSD 法は現場で融解可能な胚保存法として、極めて有効性が高い（写真1、表2）。

[ 成果の活用面・留意点 ]

- 1．牛産子を簡易に高率に増産する移植法として、胚生産および移植機関で利用できる。

[ 具体的データ ]

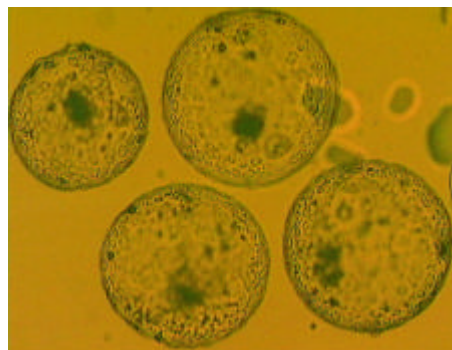


図1 超急速ガラス化用具(上)と超急速ガラス化胚のストロー封入(下)

写真1 FSD法でストロー内融解希釈後、培養した超急速ガラス化牛胚(72時間後)

表1 保存体外受精胚の生存率(平成15年)

試験区 <sup>1</sup>	供試胚 <sup>2</sup>	培養胚(残率 <sup>3</sup> )	融解後生存(%) <sup>4</sup>		
			24 h	48 h	72 h
FSD法	72	70 (97)	67 (96) <sup>A</sup>	67 (96) <sup>A</sup>	66 (94) <sup>A</sup>
従来法	69	68 (99)	47 (69) <sup>B</sup>	47 (69) <sup>B</sup>	45 (66) <sup>B</sup>

注) 1.FSD法: 前平衡(5分×2) ガラス化(30秒)

前平衡液: 10%グリセロール、0.1M シュクロース、0.1M キシロース、1%ポリエチレングリコール添加ダルベッコリン酸緩衝液(ステップ1)、10%グリセロール、10%エチレングリコール、0.2M シュクロース、0.2M キシロース、2%ポリエチレングリコール添加ダルベッコリン酸緩衝液(ステップ2)

ガラス化液: 20%グリセロール、20%エチレングリコール、0.3M シュクロース、0.3M キシロース、3%ポリエチレングリコール添加ダルベッコリン酸緩衝液

希釈液: 0.5M シュクロース、20%子牛血清添加ダルベッコリン酸緩衝液

従来法: 胚を緩慢冷却法(凍結液10ES)で凍結

10ES(15分平衡): 10%エチレングリコール、0.1M シュクロース、20%子牛血清添加ダルベッコリン酸緩衝液

2.供試胚: 媒精7または8日の形態的に良質な拡張胚盤胞期体外受精胚

3.培養胚(残率): 培養開始時に透明帯損傷および紛失せずに存在した胚

4.融解後生存は培養胚に対する割合

5.同系列異符号間で有意差あり(A-B;p < 0.00005)

表2 保存体外受精胚の透明帯脱出率(平成15年)

試験区	培養胚	融解後透明帯脱出(%) <sup>1</sup>			培養72hの良質脱出胚盤胞(%)
		24 h	48 h	72 h	
FSD法	70	5 (7)	47 (67) <sup>A</sup>	62 (89) <sup>A</sup>	59 (84) <sup>A</sup>
従来法	68	4 (6)	20 (29) <sup>B</sup>	35 (51) <sup>B</sup>	22 (32) <sup>B</sup>

注) 1.透明帯脱出: 透明帯から完全に脱出した状態

2.良質脱出胚盤胞: 内部細胞塊および栄養膜細胞がともに形態的に良好に発育した透明帯脱出完了胚

3.同系列異符号間で有意差あり(A-B;p < 0.00001)

[ その他 ]

研究課題名: 高能力乳牛の作出技術

予算区分: 経常

研究期間: 平成15年度(平成13~16年)

研究担当者: 笠正二郎、森美幸、上田修二

発表論文等: 日本畜産学会第104大会、平成15年度畜産関係試験成績書

特願 2004-341007