

牛保存卵巢から採取した卵子における複合活性化処理による核移植					
[要約] 牛保存卵巢から採取した卵子をレシピエント細胞とすると、融合後の発生率が低下するが、媒精5日目の16細胞期胚をドナー胚とし、シクロヘキシミドとサイトカラシンの複合活性化処理を行うことにより、発生率が向上する傾向にある。					
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	研究手法

[背景・ねらい]

受精卵核移植技術は、能力の高い供胚牛から採取した胚をドナー胚とし、その割球を除核した卵子（レシピエント細胞）と融合させることにより、遺伝的に優秀かつ同一の個体を多数生産することが可能である。BSE発生以降、その検査結果が出るまでは、食肉処理場から卵巢を持ち出すことが出来なくなったため、卵巢を約1日保存（20：平成5年度成果情報）して用いる必要性がでてきた。

そこで、保存卵巢由来の卵子と体外受精胚を核移植に用いた場合の影響及び融合条件が核移植成績に及ぼす影響を明らかにする。

（要望機関名：畜産課（H11））

[成果の内容・特徴]

1. 卵巢から採取した卵子の成熟率は低下し、また、除核の成功率も低下する傾向にある（図1）。
2. 保存卵巢から採取し、除核した卵子をレシピエント細胞として、凍結体外胚（媒精6日目：32細胞期胚）の割球をドナー細胞とした場合、融合率、分割率は低下する（図2）。
3. 受精5日目の16細胞期胚の割球をドナー細胞とすることにより、融合率、分割率がやや向上し、桑実胚へ発生する胚が得られる（図3）。
4. 活性化処理をシクロヘキシミドとサイトカラシンで複合処理（Cyclo+CytD）することにより、融合率、分割率、桑実胚以降への発生率が向上する傾向にある（図4）。

[成果の活用面・留意点]

1. 保存した卵巢を用いた核移植を行う際の参考資料として活用できる。

[具体的データ]

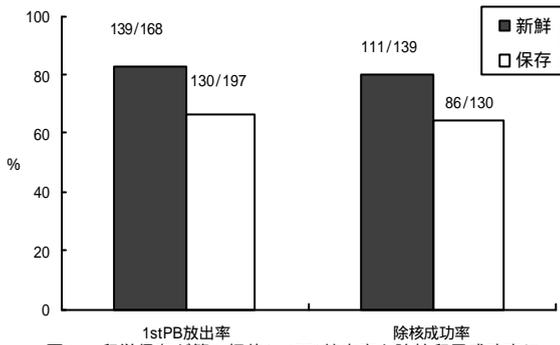


図1 卵巣保存が第1極体(1stPB)放出率と除核卵子成功率に及ぼす影響 (平成13年度)

注) 1.卵巣保存 リンゲル液、20、20? 24時間
 2.第1極体放出 卵子成熟(第 成熟分裂中期)の目安
 3.除核成功率 第1極体放出卵子に対する除核成功卵の割合
 4.除核成功卵子 ガラスニードルで第1極体付近の細胞を押し出し、押し出した細胞に核が含まれていることをHoechst33342で確認出来た卵子

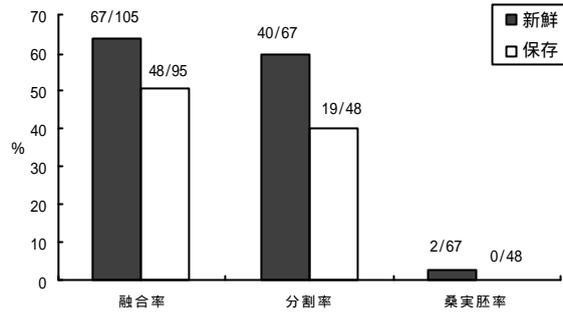


図2 卵巣保存が融合率と発生率に及ぼす影響 (平成13年度)

注) 1.卵巣保存 リンゲル液、20、20? 24時間
 2.ドナー細胞 体外受精由来day6胚(媒精日=0日目)
 3.活性化処理 10μM Ca イオノホア添加199; 5分、10μg/ml シクロヘキシミド添加199; 3時間
 4.融合率 電気融合(700V/cm、50μsec×2)後、30分以内に除核卵子とドナー細胞が融合した割合
 5.培養 10%CS+199; 3%CO₂、10%O₂、87%N₂; 38.5

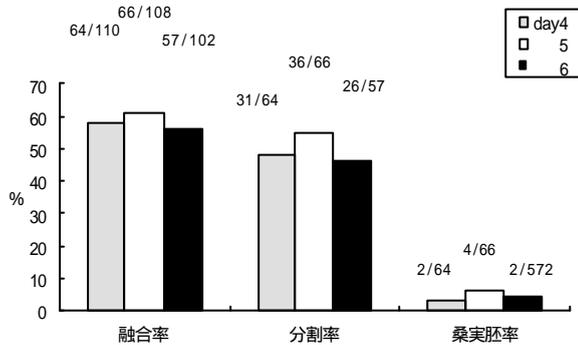


図3 ドナー細胞の日齢が融合率と発生率に及ぼす影響 (平成14年度)

注) 1.ドナー細胞 体外受精胚(媒精日=0日目)16細胞期胚(day4, 5)、32細胞期胚(day6)
 2.活性化処理、融合率および培養 図2と同様

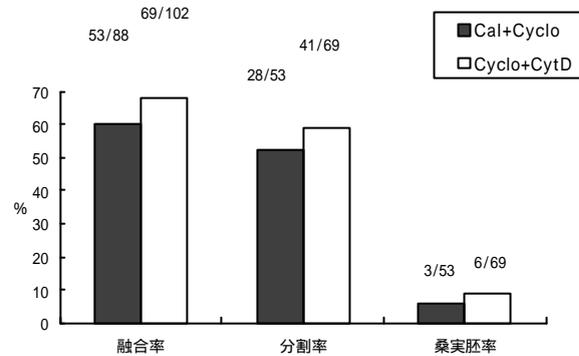


図4 活性化処理が融合率と発生率に及ぼす影響 (平成14年度)

注) 1.ドナー細胞 体外受精day5胚(媒精日=0日目)
 2.活性化処理 Cal+Cyclo: 10μM Ca イオノホア添加199; 5分、10μg/ml シクロヘキシミド添加199; 3時間、Cyclo+CytD: 10μg/ml シクロヘキシミド+2.5μg/ml サイトカラシンD添加199; 3時間
 3.融合率および培養 図2と同様

[その他]

研究課題名: クローン胚の安定生産技術

予算区分: 経常

研究期間: 平成14年度(平成11~14年)

研究担当者: 上田修二、森美幸、笠正二郎

発表論文等: 平成14年度畜産関係試験成績書