

最少容量での超急速ガラス化法による牛バイオプシー胚の生存性向上					
[要約] <u>牛バイオプシー胚</u> は、平衡液で5分間前処理後ガラス化液GESXに30秒間浸漬し、クライオトップを用いて最少容量で <u>超急速ガラス化</u> することにより、融解後の生存性が向上する。					
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	技術改良

[背景・ねらい]

性判別胚移植による雌雄産み分け技術は、目的とする性の産子を得ることが可能であり、特に酪農業において有効な技術と考えられる。性を判定するために一部の細胞を切断したバイオプシー胚の受胎率は、新鮮胚では通常の胚とほとんど差がないが（平成10年度成果情報）、凍結後移植すると通常の凍結胚に比べて受胎率の低下が大きい。

そこで、最小容量での超急速ガラス化法の有効性を検討し、融解後の生存性が高い性判別胚保存技術の確立を図る。（要望機関名：畜産課（H10））

[成果の内容・特徴]

- 1．2種類のガラス化法を比較した結果、バイオプシー胚のガラス化・融解後の生存性は、GESX法がVSED法より高い傾向にある（図1）。
- 2．ガラス化液GESXに浸漬する時間を、1分から30秒に短縮し、クライオトップを用い最少容量で超急速にガラス化することにより、バイオプシー胚の融解後の生存性が向上する傾向にある（図2）。
- 3．前処理を2段階（VS1：5分 VS2：5分）から1段階（VS1：5分）に簡略しても、性判別胚の融解後の生存性に影響しない（図3、4）。

[成果の活用面・留意点]

- 1．従来の凍結法では融解後の生存性が低い分割胚や細胞操作胚の保存法として活用できる。
- 2．ストローホルダーに装着したクライオトップは、長さ、径とも、ほぼ通常の0.25mlのプラスチックストローと同じであるため、一般的な液体窒素ポンベのキャニスターへの収納が可能である。
- 3．超急速ガラス化法は、胚と共にシートに載せるガラス化液の液量を最少容量（1μl以下）に抑える。

[具体的データ]

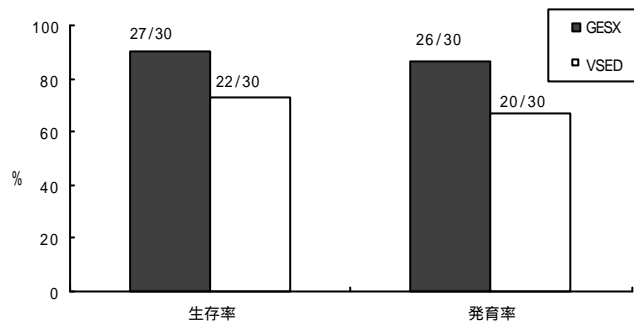


図1 ガラス化法が融解後の生存性に及ぼす影響 (平成13年度)

- 注) 1. GESX(VS3) 20%グリセリン(G), 20%エチレングリコール(EG), 0.3Mシュクロース(Suc), 0.3Mキシロース(Xyl), 3%ポリエチレングリコール(PEG)添加 PBS; 2段階前平衡 VS1(5分) VS2(5分) VS3(1分); VS1: 10%G, 0.1M Suc, 0.1M Xyl, 1%PEG添加PBS; VS2: 10%G, 10%EG, 0.2M Suc, 0.2M Xyl, 2%PEG添加PBS
2. VSED 25%エチレングリコール、25%DMSO、4mgBSA/ml添加PBS; 1段階前平衡 50%VSED(1分) VSED(30秒)
3. 0.25mlストロー
4. 生存率 培養48時間以内に元の形態に戻った胚の割合
発育率 培養48時間以内に元の形態以上に発育した胚の割合
5. 供試胚 体外受精胚(胚盤胞)図2-3も同じ

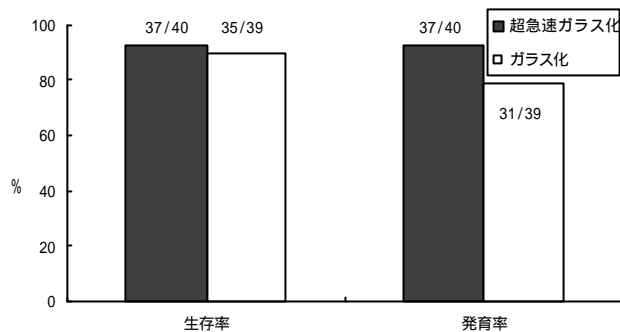


図2 ガラス化法と超急速ガラス化法の比較 (平成13年度)

- 注) 1. ガラス化液 GESX
2. 超急速ガラス化法 VS1(5分) VS2(5分) VS3(30秒); ガラス化液量 1μl以下: Cryotop(北里サプライ)
3. ガラス化法 VS1(5分) VS2(5分) VS3(1分); ガラス化液量10μl; 0.25mlストロー

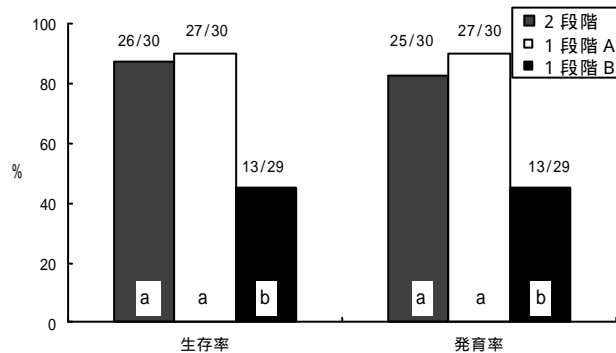


図3 平衡処理が融解後の生存性に及ぼす影響 (平成14年度)

- 注) 1. ガラス化液 GESX
2. 超急速ガラス化法 Cryotop(北里サプライ)
3. 平衡処理 2段階: VS1(5分) VS2(5分) VS3(30秒)、1段階A: VS1(5分) VS3(30秒)、1段階B: VS2(5分) VS3(30秒)
4. 異符号間に有意差あり(p<0.05)

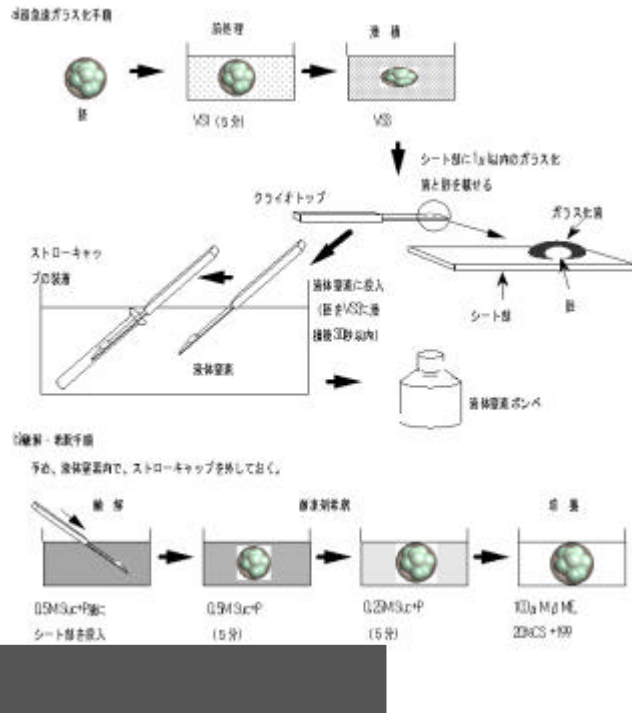


図4 ガラス化液GESXによる超急速ガラス化法の手順

[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: 県特

研究期間: 平成14年度(平成12~14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