

平成13年度試験研究成果

区分	指導	題名	ウシ性判別胚のガラス化保存法	
〔要約〕 性判別したバイオプシー胚の修復培養には、市販の裸化卵子培養液(IVD101)がガラス化保存後の生存率と利便性から有効であった。また、ウシ性判別胚の保存は、ガラス化法が極めて安定した生存率と受胎率を示した。				
キーワード	ウシ性判別胚	修復培養	ガラス化保存	畜産研究所 家畜工学研究室

1. 背景とねらい

ウシ胚の性判別技術が実用化され、酪農家等には計画的な牛群更新を行う上で有用な技術として期待されている。胚の一部をバイオプシーした性判別胚は、凍結融解後の生存性および受胎成績の向上を図ることが課題となっている。

一方、胚のガラス化保存法は、細胞内外の氷晶形成を回避できるため融解後の生存性がバイオプシー胚でも無操作の胚と差がないことが報告されている。

そこで、受胎成績向上ため、バイオプシー胚の修復培養条件とガラス化保存法を検討した。

2. 技術の内容

- (1) 裸化卵子培養液IVD101(機能性ペプチド研)は、ガラス化保存後の発育試験から生存率が高く、バイオプシー胚の修復培養液として有効である。(表1)また、IVD101を用いたバイオプシー胚の修復培養時間は3~5時間である。
- (2) 市販のIVD101は、試薬の調整が不要であり、ロット単位の培養試験済みであるため取り扱いが簡便である。
- (3) ガラス化保存は、性判別胚を50%VSED溶液で1分間平衡後、100%VSEDに移動し、直ちにストロー内にカラムを作成(図1)する。開封部をシールし、液体窒素ガス中で2分間静置後に液体窒素液中に投入する。融解後のガラス化液の除去は、0.3%BSA+0.3MSUC加m-PBSに6%,4%,2%,0%のグリセリンを添加した溶液で段階希釈する方法である。
- (4) この方法により保存したガラス化胚の生存率は、体内胚90%,体外胚80%である。(表2)
- (5) ガラス化保存したウシ性判別胚の受胎率は、199区で12.5%、IVD区で56.0%でありIVD区が有意に高く、また性判別した新鮮胚の受胎成績も同様の傾向である。(表3)

3. 普及(指導)上の留意事項

- (1) ガラス化保存法は、融解後の生存性が極めて安定しており、かつ冷却操作にプログラムフリーザー等の高価な機器を使用しないため、従来の凍結方法に変わる胚の保存方法として期待がもてる。
- (2) ガラス化液は、高濃度の耐凍剤であるため細胞毒性を考慮し、胚の取り扱い操作を速やかに行う必要がある。

4. 技術の適応地帯 県下全域

5. 当該事項に係る試験研究課題

(302) 「雌雄判別技術を利用した乳用牛群改良技術の確立」(H11~15、県単)

6. 参考文献・資料

- (1) H.Ishimori et al, Vitrification of bovine embryos, Theriogenology 37, 228(1992)
- (2) M.Shin-noh et al, Effect of in-vitro culture of bovine embryos biopsied with a microblade on in-vitro survival after vitrification, Theriogenology 49, 227(1998)
- (3) 阿部宏之ら, 電子顕微鏡によるウシ体外培養胚の観察: 血清培地及び無血清培地で作出したウシ胚の微細構造について, 第13回東日本家畜受精卵移植技術研究会講演要旨, 40-41(1998)
- (4) 井上直弘ら, 牛操作胚のガラス化保存及び希釈方法の検討, 日本畜産学会第95回講演要旨, 59(1999)
- (5) 三牧由佳ら, バイオプシー後の培養時間がガラス化保存後のウシ胚の生存性及び受胎性に及ぼす影響について, 第15回東日本家畜受精卵移植技術研究会講演要旨, 48-49(2000)

7. 試験成績の概要

表1 修復培養液の違いがガラス化保存後の生存性に及ぼす影響

区 分	培 養 液	気 相	供試胚数	生存胚数	生存率
IVD区	IVD101	5%CO ₂ +5%O ₂ +90%N ₂	10	9	90.0
199区	TCM199+20%FCS +100 μ M ME	5%CO ₂ + 95%air	10	8	80.0

表2 ガラス化保存したウシ性判別胚の生存率

区 分	供試胚数	生存胚数	生存率
体外胚	10	8	80.0
体内胚	10	9	90.0

備考) バイオプシー後の修復培養液はTCM199+20%FCS+100 μ M MEを使用。

表3 性判別胚の受胎成績

区 分	修復培養	移植頭数	受胎頭数	受胎率
ガラス化	199区	8	1	12.5 ^a
	IVD区	25	14	56.0 ^b
	小計	33	15	45.5
新 鮮	199区	9	3	33.3
	IVD区	39	16	41.0
	小計	48	19	39.6

ab、異符号間で有意差あり (P<0.05)

図1 ガラス化保存法のストロー内カラム

