

区分	指導	題名	0.1Mトレハロース添加 1.8M エチレングリコールを耐凍剤とした凍結胚の生存性		
【要約】 ダイレクト移植による受胎率向上を図るため、凍結溶液に糖を加えたものと加えないものの培養比較試験を実施した。0.1M 濃度のトレハロースを添加した 1.8M エチレングリコール区は、孵化率が最も高く、受胎率向上が示唆された。					
キーワード	ウシ胚の凍結	ダイレクト法	トレハロース	畜産研究所 家畜工学研究室	

1 背景とねらい

凍結胚の受胎率向上は、胚移植技術の推進をはかる上で解決すべき重要課題である。これまでステップワイズ法とダイレクト法の技術を提示してきたが、耐凍剤として 1.8M エチレングリコールを用いたダイレクト法は受胎成績の向上に寄与していない。そこで、この手法の技術的特徴について、再度、全国14府県の協同試験として研究し、安定したダイレクト法を確立することとなった。今回は受胎率の改善が期待できる凍結方法を培養成績から参考に供する。

2 成果の内容

(1) 10%エチレングリコール(1.8MEG)を耐凍剤としたときの孵化率 51%に対し、3試験区(1.8MEG+0.1M シュークロース(Su)区、1.8MEG+0.1M トレハロース(Tre)区、1.8MEG+0.4%ウシ血清アルブミン(BSA)区)は、それぞれ 62.7%、65.3%、55.1%と高く、1.8MEG+0.1M トレハロース区の生存率が有意($P<0.05$)に高かった。(図-1)

3 成果活用上の留意事項

- (1) 0.1Mトレハロース添加 1.8M エチレングリコール溶液の作成及び胚の凍結処理方法は、7試験成績の概要(1)に示した。
- (2) 供試胚は、黒毛和種またはホルスタイン種の生体から回収した A ~ B ランクの後期桑実胚~胚盤胞を用いた。
- (3) 生存率は 20%FCS+0.1mM Ⅱカプトタール加 TCM199 培地で3日間培養により、孵化率で求めた成績である。
- (4) 4区の供試胚数は、EG区 100個、EG+Su区 102個、EG+Tre区 98個、EG+BSA区 98個である。
- (5) 胚のストロー封入方法を(図-2)に示した。
- (6) EGを耐凍剤とした融解胚は、形態的に細胞膜の物理的崩壊、微細構造の障害が見られ、胚のランクが低下するので、A,B ランクを使用する。

4 成果の活用方法等

- (1) 適応地帯又は対象者等
県下全域の胚移植に関わる技術者
- (2) 期待する活用効果
凍結胚受胎率の改善につながる。

5 当該事項に係る試験研究課題

(864)受胎率向上のための受精卵の凍結・融解方法の比較検討(H14~H16)。

6 参考資料・文献

- (1) エチレングリコールを用いた牛胚の簡易凍結法,平成5年度普及奨励事項および指導上の参考事項(岩手県農政部)23-24(1994)
- (2) EGLおよびPDを用いた牛凍結胚の直接移植法,平成4年度東北農業研究成果情報 No7, 155-156(1993)
- (3) 辻野堂史ら,ウシ受精卵凍結保存手法に関する全国アンケートの集計結果,ET ニュースレター, No21 15-34
- (4) 大江正人ら,エチレングリコールを用いた牛の体内,体外受精凍結胚の直接移植,Journal of Reproduction and Development, vol.39, No5,11-15(1993)
- (5) 堂地修ら,Ethylene glycolを用いて凍結したウシ胚のDirect Transfer法による移植,第84回日畜学会大会講演要旨,61(1991)

7 試験成績の概要 (具体的なデータ)

(1) 凍結溶液の作成方法及び胚の凍結方法

1) 基本溶液の作成

基本溶液はダルベッコのPBSに抗生物質 (PBS100mlに対してペニシリン1万単位、ストレプトマイシン1万 μ gを加える。)を加える。

2) ストック液の調整

100mlのメスシリンダーを用意する。

PBSを約40ml入れる。

トレハロースを3.783g秤量してメスシリンダーに入れ、完全に溶かす。

EGを10ml加える。(ピペット内を十分にピペッティングする)

PBSで80mlまでメスアップする。

メスシリンダーをパラフィルムでシールし、十分に混和する。

0.22 μ mのフィルターでろ過滅菌する。

試験管に8mlずつ分注し、-20℃で使用するまで凍結保存する。

3) 凍結溶液の調整

ストック溶液を温水(38℃)中で融解し、十分に転倒混和する。

子牛血清を2ml加えて十分に転倒混和する。

0.22 μ mのフィルターでろ過滅菌し、室温に保持する。

4) 凍結処理

胚は20%CS+PBS中で3回以上洗浄する。

凍結溶液で数回洗浄した後にストローに吸引し、10~15分平衡する

-70℃に冷却したプログラムフリーザー内にストローをセットし、2分後に植氷して10分間保持する。

冷却速度は-0.3℃/分で行い、-30℃で液体窒素に投入する。

5) 融解方法

液体窒素から取り出したストローは、6秒間のエアソーイング後、30℃の微温湯に20秒間保持し融解する。

(2) 培養成績

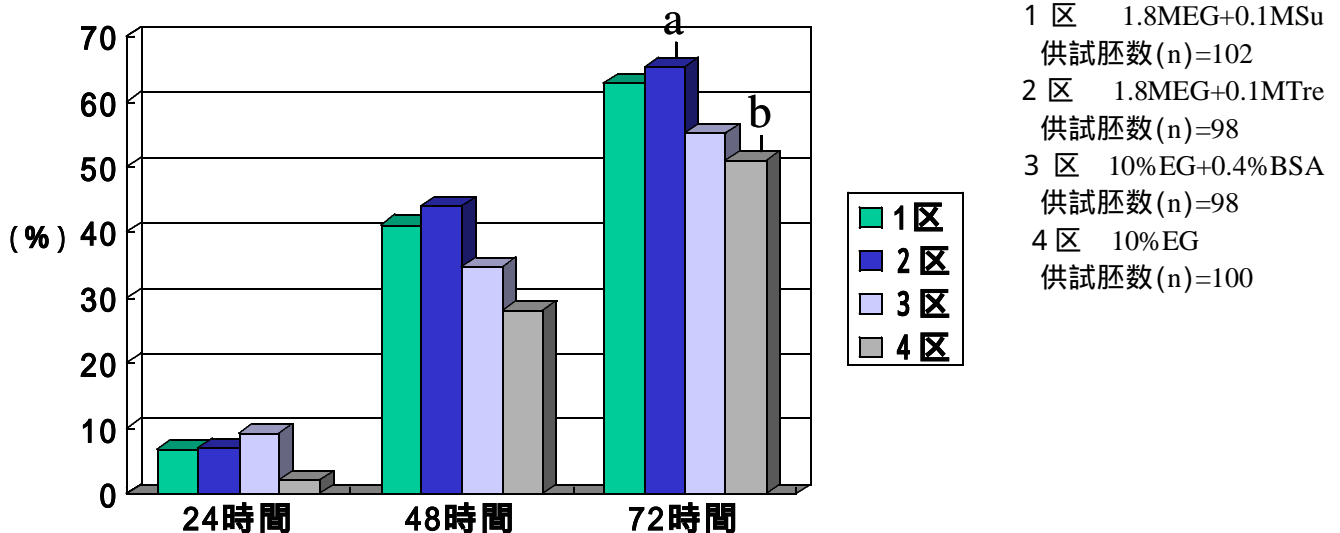
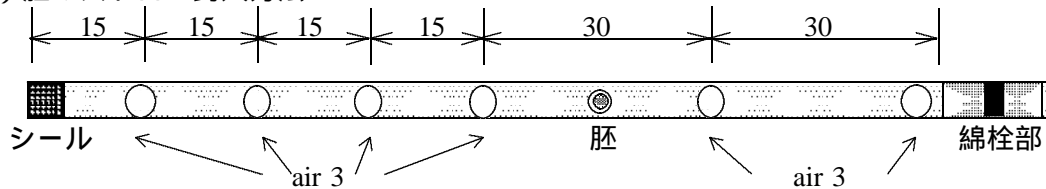


図 - 1 培養時間と孵化率

* a,b 異符号間で有意差あり (P<0.05)

(3) 胚のストロー封入方法



(図 - 2)

(単位: mm)