

通し番号	4 3 3 3
------	---------

分類番号	19-57-22-08
------	-------------

(成果情報名) 水溶性プルランフィルムを用いて牛胚を超急速ガラス化保存できる
<p>[要約] 水溶性プルランフィルムを用いた牛体外生産胚の超急速ガラス化保存について検討した。試験1：体外生産胚を室温で0.3M Suc添加20%FCS D-PBS (0.3MS)に2分、0.6MS添加の同液に2分平衡し、プルランフィルム上にEDS液 (10%EG+10%DMSO+0.6MS) とともにのせ、1分以内に液体窒素に浸漬した。加温は、直接プルランフィルムを38℃の0.6MSに浸漬し、2分間静置後、0.3MSに2分、m-PBSに2分静置して行った。試験2：ガラス化液に15%EG+15%DMSO+0.6MS (EDS30) を用いた。胚を室温で50%EDS30に4分平衡し、その後は試験1と同様に保存し、加温も試験1と同様に行った。試験3：市販のクライオトップ用のガラス化液、加温液を用いてプルランフィルムでガラス化、加温した。培養24時間後の生存率は試験1で52.9%、試験2で89.3%、試験3で84.6%であった。胚の呼吸量 ($F \times 10^{-14} \text{ mol s}^{-1}$) は、試験2で保存前1.50、加温後1.58、試験3で保存前1.43、加温後1.44と保存による低下は認められなかった。これらことからEDS30や市販のガラス化液を使用することで、水溶性プルランフィルムを用いた牛胚盤胞の超急速ガラス化保存が可能なが示された。</p>
(実施機関・部名) 神奈川県畜産技術センター 畜産工学部 連絡先 046-238-4056

[背景・ねらい]

天然多糖類である水溶性プルランフィルム上で、マウス桑実胚を超急速ガラス化できることが報告されている。そこで、本試験では、プルランフィルムを用いて3種のガラス化液によって牛体外生産胚を超急速ガラス化保存し、低温保存前、加温時の呼吸量を測定し、保存後の生存性と呼吸量の変化を検討した。

[成果の内容・特徴]

- 1 プルランフィルム(図1)上で媒精後7日目の牛体外生産胚を3種のガラス化液を使用して超急速ガラス化保存した(表1)。その結果、試験1では、生存率、透明帯脱出率ともに対照区と比較して有意に低く、生存率では、試験2とも有意差が認められた(図2)。
- 2 しかし、試験2、3では、生存率、透明帯脱出率ともに非ガラス化区(対照区)と有意差は認められず(図2)、呼吸量の低下も認められなかった(表2)。

[成果の活用面・留意点]

プルランフィルムは、温度、湿度の変化により変形するため、注意が必要である。

[具体的データ]



図1 プルランフィルムを接着した基材

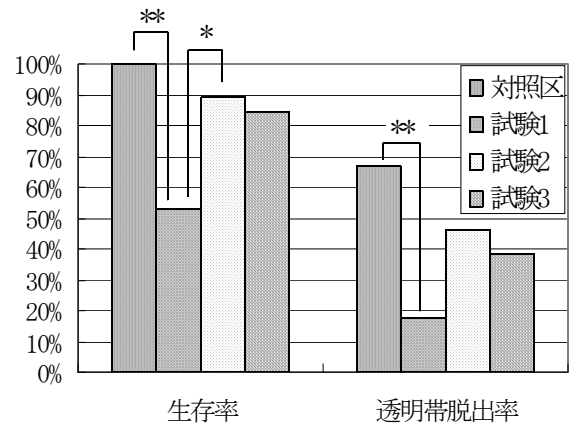


図2 ガラス化保存した胚の生存率と透明帯脱出率

表1 各試験で使用したガラス化法及び加温法

試験区	ガラス化法		加温法	
	平衡液及びガラス化液	時間(分)	加温液	時間(分)
試験1	20%FCS+D-PBS	2	0.6M Suc+20%FCS+D-PBS	2
	0.3M Suc+20%FCS+D-PBS	2	0.3M Suc+20%FCS+D-PBS	2
	0.6M Suc+20%FCS+D-PBS	2	20%FCS+D-PBS	2
	10% EG+10% DMSO+20%FCS+D-PBS	1		
試験2 試験1の平衡方法とガラス化液濃度を変更	20%FCS+D-PBS	2	0.6M Suc+20%FCS+D-PBS	2
	7.5% EG+7.5% DMSO+20%FCS+D-PBS	4	0.3M Suc+20%FCS+D-PBS	2
	15% EG+15% DMSO+20%FCS+D-PBS	1	20%FCS+D-PBS	2
試験3 市販のガラス化液を使用	20%FCS+D-PBS	2	1M Suc+20%SSS+199	1
	7.5% EG+7.5% DMSO+20%SSS+199	5~10	0.5M Suc+20%SSS+199	3
	15% EG+15% DMSO+20%SSS+199	1	20%SSS+199	5
			20%SSS+199	5

FCS:牛胎児血清(fetal calf serum); D-PBS:ダルベッコリン酸緩衝液; Suc:シュエークロース; EG:エチレングリコール; DMSO:ジメチルスルホキシド; 199:細胞培養液(TCM199); SSS(Synthetic serum substitute)

表2 試験2と試験3でのガラス化保存前後の呼吸量と生存細胞の割合

試験区	例数	呼吸量 ($\times 10^{-14}$ mol s^{-1})		細胞数	生存細胞数/ 総細胞数(%)
		ガラス化前	加温後		
試験2	5	1.50 ± 0.15	1.58 ± 0.42	107.8	98.3
試験3	5	1.43 ± 0.35	1.44 ± 0.36	115.0	97.6

[資料名] 平成19年度試験研究成績書(繁殖工学・乳牛・肉牛・飼料作物)

[研究課題名] 胚移植を活用した優良牛の造成

[研究期間] 平成19~21年度

[研究者担当名] 坂上信忠、秋山清、横溝翔子¹、高木優二¹ (¹信州大農)