

通し番号	4 1 9 7
------	---------

分類番号	17-67-22-14
------	-------------

(成果情報名) クライオトップ法は豚胚の冷凍保存手段として有効である
[要約] 細胞毒性の高い耐凍剤濃度を対照区の50%から試験区の30%に低下させるとともに、耐凍剤液量を対照区の20 $\mu$ lから試験区の0.1 $\mu$ lへ極少量化させてガラス化の冷却速度を上げた。融解後に24時間培養した胚の生存率は対照区では58.3%であったのに対し、試験区では24時間後で75.0%と大幅な向上が認められた。
(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]

クライオトップ法はプラスチックの凍結板上で必要最小量の凍結液とともに液体窒素中に直接浸してガラス化するため、冷却速度を速めることができる。既に人胚で使用されており、耐凍能が低いと言われる牛の未成熟卵子でも高成績が報告されている。そこで耐凍能が低い豚胚生存率の向上を図るためクライオトップ法の応用について検討した。

#### [成果の内容・特徴]

- 1 対照区は、0.25mlストロー内にて、胚を含むEG液（50%EG）20 $\mu$ lを液体窒素蒸気に曝すことによりガラス化した。一方、試験区では、市販のクライオトップキット（北里サプライ、図1）を用い凍結板クライオトップ上にて、胚を取り巻く必要最小量のVS液（15%DMSO + 15%EG）0.1 $\mu$ lを液体窒素中に直接浸すことによりガラス化した（表1、図2）。
- 2 試験区は対照区よりも細胞毒性の高い耐凍剤濃度を低下させるとともに、耐凍剤液量を極少量化してガラス化冷却速度を上げた（表1）。
- 3 ガラス化した胚を融解後、培養して生存率を調査した結果、対照区では24時間後で58.3%（7/12）、48時間後で50.0%（6/12）であったのに対し、試験区では24時間後で75.0%（9/12）、48時間後で66.7%（8/12）と大幅な向上が認められた（表2）。

#### [成果の活用面・留意点]

- 1 豚胚を冷凍保存する手段としてクライオトップ法は非常に有効であるが、0.1 $\mu$ lと極少量の凍結液とともに胚をガラス化するため、胚のハンドリングに留意する必要がある。

[具体的データ]

表1 ガラス化方法比較

方法	ガラス化溶液	器材	ガラス化溶液量
ストロー法	8MEG+7%PVP	0.25mlストロー	20 $\mu$ L
クライオトップ法	15%DMSO+15%EG+0.5MSuc	クライオトップ凍結板(北里サプライ)	0.1 $\mu$ L

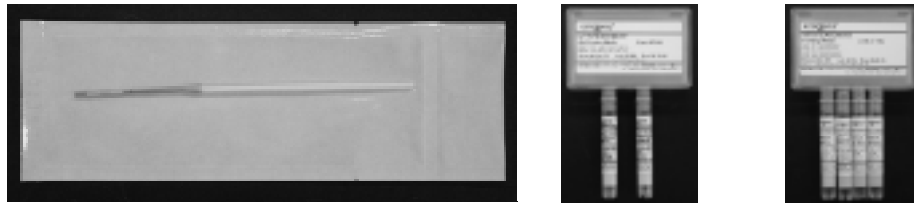


図1 クライオトップ(北里サプライ) 凍結液キット 融解液キット



クライオトップ 把持部 クライオトップシート部 VS液と胚

図2 クライオトップによるガラス化状況

表2 ガラス化融解後の生存率

方法	供試胚数	融解24時間後		融解48時間後	
		生存胚数	生存率(%)	生存胚数	生存率(%)
ストロー法	12	7	58.3	6	50.0
クライオトップ法	12	9	75.0	8	66.7

[資料名] 平成17年度 試験研究成績書(繁殖工学・養豚)

[研究課題名] 豚胚の凍結保存に関する試験(1)豚胚の凍結保存方法の検討

[研究期間] 平成15~19年度

[研究者担当名] 仲澤慶紀・坂上信忠・秋山 清・小嶋信雄・前田高弘