

通し番号	4 1 2 5
------	---------

分類番号	16・67・22・16
------	-------------

(成果情報名) 耐凍剤 (EG) 濃度を減少させて、微量のガラス化溶液で豚胚をガラス化すると生存率を低下させずに融解時間を短縮できる	
[要約] 試験区は対照区よりも細胞毒性の高いEG濃度を低下させるとともに、EG液量を少量化させてガラス化の冷却速度を上げた。融解後の段階希釈を対照区の6段階から試験区の4段階に減らした結果、融解時間を45分から10分へと35分短縮することができた。融解後の生存率は両区とも50数%と同等であった。	
(実施機関・部名) 神奈川県畜産研究所 畜産工学部	連絡先 046-238-4056

[背景・ねらい]

豚においては国内の血統・近交系の多様性の減少が著しく、今後、豚の育種・品種改良に影響を及ぼすことが予想される。この対策の一つとして豚胚の凍結保存が有望である。豚胚は低温耐性が低いため凍結保存が困難であり保存技術の確立が望まれる。ガラス化法は細胞外に氷晶を形成しないため、細胞の物理的損傷が少なく豚胚の保存に適するが、融解後の生存性をより向上させるため、ストローを用いた従来法と異なる新たな豚胚のガラス化保存手法について検討した。

[成果の内容・特徴]

- 1 対照区では、0.25mlストロー内にて、8Mのエチレングリコール (EG) 液20 μ lを液体窒素蒸気に曝すことよりガラス化した。一方、試験区では、6MのEG液5 μ lを直径1mmの銅製針金上に乗せ、液体窒素に直接投入することによりガラス化した (表1)。
- 2 試験区は対照区よりも細胞毒性の高いEG濃度を低下させるとともに、EG液量を少量化してガラス化冷却速度を上げた。
- 3 融解後の段階希釈を対照区の6段階から試験区の4段階に減らした結果、融解時間を45分から10分へと35分短縮された。
- 4 融解後の胚の生存率は、対照区では72個中39個が生存し54.2%であった。試験区では69個中37個が生存し53.6%であった。対照区と試験区に有意差はなかった (表2)。
- 5 供試豚ごとのガラス化融解後の胚の生存性は両区ともほぼ同様であり、個体差は試験区も改善できなかった (表2)。

[成果の活用面・留意点]

- 1 試験区は対照区より細胞毒性の高い耐凍剤 (EG) の濃度を低くしたため、融解後の胚の細胞からEGを除去する行程を少ない段階数で短時間に行えるメリットがある。

[具体的データ]

表1 ガラス化手法の比較

	ガラス化溶液	ガラス化溶液量	最大保存可能胚数	ガラス化器材	融解段階希釈回数	融解時間(分)
対照区	8MEG+7%PVP+0.5%BSA+PB1	20 µl	7~8	0.25mlクリスタルストロ-	6	45
試験区	6MEG+7%PVP+1MGAL+0.5%BSA+PB1	5 µl	5	銅製針金(1mm)	4	10

注：E Gはエチレングリコールを、P V Pはポリビニールピロリドンを、B S Aは牛血清アルブミンを、G A Lはガラクトースを示す。

表2 ガラス化胚の融解後生存率

供胚豚	対照区		試験区	
	生存胚/供試胚	生存率	生存胚/供試胚	生存率
a	0/5	0.0 %	0/7	0.0 %
b	3/7	42.9 %	3/5	60.0 %
c	2/6	33.3 %	2/6	33.3 %
d	1/8	12.5 %	1/8	12.5 %
e	3/8	37.5 %	3/8	37.5 %
f	2/8	25.0 %	2/8	25.0 %
g	5/5	100.0 %	5/5	100.0 %
h	7/7	100.0 %	7/7	100.0 %
i	9/9	100.0 %	8/8	100.0 %
j	7/9	77.8 %	6/7	85.7 %
合計	39/72	54.2 %	37/69	53.6 %

[資料名]平成16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・益田富男