

通し番号	
------	--

分類番号	15・77・22・19
------	-------------

(成果情報名) 始原生殖細胞の凍結保存方法の確立	
<p>[要約] 凍結培地の基礎となる血清として牛胎仔血清 (F B S) または鶏血清 (C S) を用い、耐凍剤として D M S O の添加量を 5、10、15% に設定し、300 μ l の凍結培地容量でセラムチューブ内にて -70 で凍結した。融解後は顕微鏡下で P G C を回収した。F B S の方が C S よりも生存 P G C 回収率が高い傾向であった。</p> <p>新たに F B S への D M S O 添加量を詳細に検討した結果、10 ~ 15% の添加が適当であった。</p>	
(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]

効率的な鶏育種改良や鶏を用いた有用物質の生産等を目的としてバイテク技術の応用による始原生殖細胞 (P G C) を用いる胚操作研究が進められている。近交係数を上げないで生体で特殊鶏を保持するには多大な費用、労力が必要であるので P G C を凍結保存して、効率良く再生できれば、低コストで特殊遺伝子の維持が可能となり、バラエティに富んだ鶏種の開発が可能となる。凍結、融解後の生存 P G C の回収率が高い凍結保存条件及び凍結用培地の検討を行った。

[成果の内容・特徴]

- 1 F B S を基礎に D M S O を 5%、10%、15% 添加した凍結培地と C S を基礎に D M S O を 5%、10%、15% 添加した凍結培地を用いて白色レグホンの P G C を凍結融解した。
- 2 セラムチューブ中の 4 μ l、300 μ l の凍結培地に P G C 4 ~ 30 個を注入し、-70 のディープフリーザーにて凍結した。
- 3 4 の培養培地 5 m l に凍結サンプルを移して瞬間的に融解し、サンプルと培地をディッシュに移し顕微鏡下で生存 P G C をピックアップした。(図 1)
- 4 凍結融解後の生存 P G C 回収率は F B S 凍結培地が 69.3% であり、C S 凍結培地の 61.3% より高かった。D M S O 添加量としては F B S に 15% 添加区が 84.4% であり最も高かった。(表 1)
- 5 F B S への D M S O 添加量を詳細に検討するため、0%、5%、10%、15%、20% 添加してロードアイランドレッドの P G C を凍結融解した結果、10% の添加量が適当であった。(表 2)

[成果の活用面・留意点]

凍結培地の基礎培地として F B S も C S も利用可能である。ただし C S よりも F B S の方が生存 P G C の回収率が高く、D M S O の添加量は 10 ~ 15% 程度が適当である。

[具体的データ]

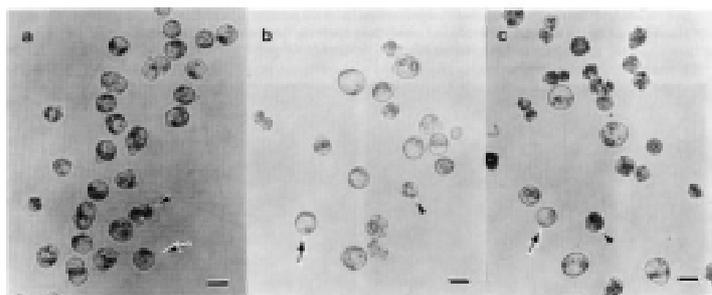


図1 PG Cの形態(矢印が生存PG C、矢印頭が死亡PG C)

表1 FBS及びCS凍結培地による凍結融解後の生存PG C回収率

サンプル	生存PG C数		回収率(%)
	凍結時	融解後	
5%DMSO-FBS	61	37	60.7
10%DMSO-FBS	90	58	64.4
15%DMSO-FBS	64	54	84.4
FBS計	215	149	69.3
5%DMSO-CS	60	41	68.3
10%DMSO-CS	90	45	50.0
15%DMSO-CS	90	61	67.8
CS計	240	147	61.3

表2 FBS凍結培地へのDMSO添加量が凍結融解後の生存PG C回収率に及ぼす影響

サンプル	生存PG C数		回収率(%)
	凍結時	融解後	
0%DMSO-FBS	231	88	36.5
5%DMSO-FBS	230	77	33.5
10%DMSO-FBS	253	91	36.0
15%DMSO-FBS	273	70	25.6
20%DMSO-FBS	208	28	13.5

[資料名] 平成15年度試験研究成績書(繁殖工学・養鶏)
 [研究課題名] 銘柄素材鶏作出のための生殖細胞利用技術の検討
 (2) 始原生殖細胞の凍結方法の検討
 [研究期間] 平成13~15年度
 [研究者担当名] 岸井誠男・引地宏二・仲澤慶紀