

グリセリンを耐凍剤とした牛ドナー胚のガラス化保存法					
[要約] 核移植用の牛ドナー胚として用いられる受精後 5、6日目の初期胚は、40%グリセリン、1Mシュクロース添加PBSでガラス化保存することにより、融解後高い生存率が得られ、1胚あたり24個の細胞が利用できる。					
担当部署	畜産研究所・大家畜部・畜産工学研究室			連絡先	092-925-5232
対象作物	乳用牛・肉用牛	専門項目	バイオテク	成果分類	技術改良

[背景・ねらい]

受精卵クローン胚を作出するには、核移植用の初期胚と成熟卵子が必要であるが、両方を同日に揃えることが困難である場合が多い。ドナー胚か成熟卵子が保存できれば、クローン胚の計画的な作出が可能となるが、現段階では、ドナー胚を保存の方が実用的と考えられる。しかし、従来の緩慢凍結法では、融解後のドナー胚の生存性は低く、また、ドナー細胞として利用出来る細胞数は少ない。一方、マウス初期胚の保存には、ガラス化保存法が有効な方法として用いられている。

そこで、牛ドナー胚の融解後の高い生存性が得られるガラス化液やガラス化条件等を明らかにし、ドナー胚のガラス化保存法を確立する。(要望機関名：畜産課(H11))

[成果の内容・特徴]

1. ガラス化液の耐凍剤としてはグリセリンが適しており、また、グリセリンの濃度は40%が適している(表1)。
2. 40%グリセリンを耐凍剤としたガラス化法では、前処理液による平衡時間は2分とし、ガラス化液への浸漬時間は1分が適している(表2)。
3. ドナー胚をガラス化保存することにより、融解後の有効細胞率が高く、1胚あたり平均24個の細胞が核移植用に利用できる(表3)。

[成果の活用面・留意点]

1. 受精卵クローンを作出する機関において、ドナー胚の保存に利用でき、卵子の採取に合わせた計画的なクローン胚作出が可能となる。
2. ドナー胚のガラス化液への浸漬時間は厳守する。

[具体的データ]

表 1 ドナー胚のガラス化保存成績 (平成11年)

凍結法	耐凍剤	濃度 (%)	供試胚数	生存胚数 (%)	発育胚数 (%)
ガラス化	EG	30	12	4 (33)	3 (25)
		40	10	4 (40)	3 (30)
	GL	30	12	6 (50)	5 (42)
		40	13	9 (69)	8 (62)
緩慢凍結			10	4 (40)	3 (30)

- 注) 1. ドナー胚 体外受精後、5日目の胚
 2. ガラス化法 前平衡処理 ガラス化液浸漬 (同時に胚をストロー内に封入) ガラス化 (胚を封入したストローを液体窒素へ投入)
 前平衡処理 PBSに、10%グリセリン (GL)、20%子牛血清 (CS) を添加; 平衡時間 5分
 ガラス化液 PBSに、耐凍剤としてエチレングリコール (EG) もしくは GL と 1M シュクロース (Suc)、20% CS を添加; 浸漬時間 1分
 3. 緩慢凍結 凍結液: PBSに、10% EG、0.1M トレハロース、20% CS を添加
 凍結法: 室温 (-1 /分) -7 (10分保持、植氷) -(-0.3 /分) -30 液体窒素
 4. 生存胚 融解後細胞膜が明瞭な胚; 発育胚 培養24時間で元の発育ステージ以降に進んだ胚

表 2 前平衡時間とガラス化液浸漬時間の影響 (平成12年)

浸漬時間 (分)	前平衡時間 (分)	供試胚数	生存胚数 (%)	発育胚数 (%)
0.5	1	10	2 (20)	1 (10)
	2	12	8 (67)	7 (58)
	5	11	7 (64)	5 (45)
1	1	12	8 (67)	6 (50)
	2	12	10 (83)	9 (75)
	5	12	8 (67)	8 (67)

- 注) 1. ガラス化液 PBSに、40% GL、1M Suc、20% CS を添加
 2. 前平衡及び浸漬時間 表 1 と同じ

表 3 融解後の有効細胞数 (平成12年)

保存方法	供試胚数	有効細胞数 (/胚)	有効細胞率 (%)
ガラス化	5	23.6 ± 1.9	82
緩慢凍結	5	15.2 ± 2.0	53
新鮮胚	5	28.8 ± 1.7	-

- 注) 1. ガラス化 表 2 と同じ; 緩慢凍結 表 1 と同じ
 2. 有効細胞 融解後、生存胚の割球をトリプシン-EDTA液で単離し、細胞膜が明瞭な細胞
 3. 有効細胞率 (有効細胞数 / 新鮮胚有効細胞数) × 100

[その他]

研究課題名: ドナー胚凍結保存技術の確立
 予算区分: 経常
 研究期間: 平成12年度 (平成11~12年)
 研究担当者: 上田修二、森 美幸、笠 正二郎
 発表論文等: 平成12年度畜産関係試験成績書