

牛体外受精卵の実用的なガラス化凍結法							
<p>【要約】 牛体外受精卵を8%エチレングリコール+ 0.25Mシュクロース添加 PBSで前処理後EFS40でガラス化凍結する方法によって、融解後72.2%の高い生存率が得られ、ガラス化凍結卵を移植することにより産子を得ることができる。</p>							
畜産研究所・大家畜部・畜産工学研究室						連絡先	092-925-5231
部会名	畜産	専門	バイオテック	対象	家畜類	分類	研究

【背景・ねらい】

受精卵の凍結処理はプログラムフリーザを必要とし長時間を要する。一方、ガラス化凍結保存は、プログラムフリーザを必要とせず、短時間の凍結が可能であるが、凍結・融解後の生存率や移植後の受胎率が低いなどの問題点が残されている。

そこで、マウス拡張胚盤胞で高い生存率が得られているガラス化凍結法を牛拡張胚盤胞用に改良し、また、融解後の受精卵の形態を電子顕微鏡で観察するとともに、移植後の受胎率を検討することによって、実用的なガラス化凍結保存法を確立する。

【成果の内容・特徴】

①受精卵を前処理液で平衡後ガラス化液に浸漬してガラス化凍結する方法は、従来の8段階添加法等に比べて平衡処理が2段階と簡便で実用的である。

受精卵をEFS40（ガラス化液）で凍結するとき、8%エチレングリコールと0.25Mシュクロースを含むPBS（リン酸緩衝液）で前処理すると従来の前処理液に比べ、融解後の生存率が向上する（表1）。

②ガラス化凍結・融解後、生存していると判定した受精卵の電子顕微鏡で見られる微細構造は、新鮮卵と比較して顕著な相違は認められない（表2）。

③この方法によるガラス化凍結卵を移植し、受胎することが可能である（表3）。

【成果の活用面・留意点】

①ガラス化凍結は、プログラムフリーザが利用できない場合の有効な凍結方法となり、また、通常の凍結が困難な未受精卵などの凍結に応用できる。

②ガラス化液の耐凍剤は高濃度なため、一般の凍結保存のように無希釈での融解・移植は困難であり、融解後耐凍剤を除去した後、ストローに封入して移植する必要がある。

③ガラス化液は耐凍剤の濃度が高く毒性が強いため、凍結時と融解時の受精卵の取扱い（温度、時間）に留意する。

[具体的データ]

表1 EFS40でガラス化凍結するときの前処理液が融解後の生存性に及ぼす影響
(平成4年)

前処理液 ^{①)}	供試卵数	生存胚数(%)	
		24h	48h
10%EG	26	10(38.5)	8(30.8)
8%EGS	18	13(72.2)	13(72.2)

注) ①^{①)} 10%EG: 10%エチレン glycol+PBS、8%EGS: 8%エチレン glycol+0.25Mシュクロース+PBS

②平衡時間 前処理液 5分、ガラス化液 0.5分; 平衡温度 25℃

表2 新鮮卵及びガラス化凍結卵の微細構造の比較 (平成2~4年)

	新鮮卵	ガラス化凍結卵 ^{①)}	
		生存卵	変性卵
原形質膜	正常	正常	破壊による細胞小器官の流出、遊離
内細胞塊	正常	正常	栄養膜細胞との接続部位の変化
核、核膜	正常	正常	変形
透明帯	正常	正常	正常

注) ①^{①)} EFS40で凍結・融解後、24~36時間培養して、凍結時の発育ステージ以上に発育したものを生存卵、また変性部が大半を占めるものを変性卵と判定

表3 EFS40でガラス化凍結した
体外受精卵の移植成績 (平成4年)

移植頭数	受胎頭数(%)
3	1(33)

[その他]

研究課題名: ガラス化処理による体外受精卵の凍結保存

予算区分: 県特

研究期間: 平成4年度 (平成2~4年)

研究担当者: 上田修二、平嶋善典、北原利孝

発表論文等: 平成4年度畜産関係試験成績書