

【注意】発行当時の原稿をそのまま掲載しております。農薬について記載のある場合は、最新の農薬登録内容を確認し、それに基づいて農薬を使用してください。また、成果情報によっては、その後変更・廃止されたものがありますのでご注意ください。

[ 成果情報名 ] ウシ胚由来バイオブシー栄養膜細胞の培養方法の確立

[ 要 約 ] ウシ胚からヘルニア法によりバイオブシーした栄養膜細胞を、10%ウシ胎子血清を添加したESM-2培地で培養することにより効率的に増殖させることができる。

[ 部 署 ] 山形県農業総合研究センター 畜産試験場・家畜改良科

[ 連 絡 先 ] TEL 0233-23-8819

[ 成 果 区 分 ] 普

[ キーワード ] ウシ胚、栄養膜細胞、バイオブシー、培養細胞

---

[ 背景・ねらい ]

近年、遺伝病や経済形質についての遺伝子診断やマーカー解析が可能になり、胚の段階での複数項目診断も報告されている。しかし、一般的には胚から採取できる細胞数は限られるため、診断できる項目数や判定精度などの点で課題が残されている。そこで、ひとつの胚に対して高精度な多項目の遺伝子診断を可能にするDNA量を得るため、バイオブシーした栄養膜細胞を効率的に増殖させる培養方法を確立する。

[ 成果の内容・特徴 ]

1. ヘルニア法によるバイオブシー（図1）とウシ胎子血清を添加したESM-2培地での培養を組み合わせることで、ウシ胚からバイオブシーした栄養膜細胞を効率的に増殖させることができる（表1）。
2. ESM-2培地に10%濃度のウシ胎子血清を添加することにより、高い生存性を維持し栄養膜細胞を増殖させることができる（表2）。
3. 栄養膜細胞は、培養により胞状を維持したまましばらく成長したのち、自然に培養プレートに定着し平面状に増殖する（図2）。

[ 成果の活用面・留意点 ]

1. HPM199およびESM-2培地は（株）機能性ペプチド研究所の製品である。
2. 胚によってヘルニア形成に時間差が生じる。
3. ヘルニア状の栄養膜細胞の直径が小さい場合、切断後培養しても増殖しない可能性が高いため、切断時の直径は100 $\mu$ m以上であることが望ましい。
4. それぞれの栄養膜細胞によって、増殖速度にバラつきが生じる。
5. 推定細胞数は、ヘキスト染色によりカウントした単位面積あたりの細胞数と増殖した栄養膜細胞の表面積から算出した。

【注意】発行当時の原稿をそのまま掲載しております。農薬について記載のある場合は、最新の農薬登録内容を確認し、それに基づいて農薬を使用してください。また、成果情報によっては、その後変更・廃止されたものがありますのでご注意ください。

[ 具体的データ ]



図1 ヘルニア法の手順 a:スリットを入れる b:ヘルニアを形成する c:くびれの位置で切断する

表1 バイオブシー法及び基礎培地の違いによる生存率および推定細胞数

バイオブシー	培地	n	培養1日後						培養7日後					
			生存率		推定細胞数			生存率		推定細胞数				
			+	%	平均	最小	最大	+	%	平均	最小	最大		
1区 従来法	HPM199+10%FBS	40	1	2.5	c	33	-	-	0	0.0	c	-	-	-
2区 従来法	ESM-2+10%FBS	44	5	11.4	c	41	20	80	3	6.8	bc	2095	81	5878
3区 ヘルニア法	HPM199+10%FBS	36	20	55.6	b	69	28	235	6	16.7	b	629	96	1470
4区 ヘルニア法	ESM-2+10%FBS	34	34	100.0	a	64	26	180	31	91.2	a	1682	145	7090

注) 行間の異符号間で有意差あり(p<0.01)

表2 培地への添加血清濃度の違いによる生存率および推定細胞数

血清濃度	n	培養1日後						培養7日後					
		生存率		推定細胞数			生存率		推定細胞数				
		+	%	平均	最小	最大	+	%	平均	最小	最大		
1区 0%	34	28	82.4	ab	65	28	198	9	26.5	b	172	69	343
2区 2.5%	39	35	89.7	ab	66	35	216	32	82.1	a	1409	96	6899
3区 5%	38	31	81.6	b	89	41	235	28	73.7	a	2012	163	6899
4区 10%	34	34	100.0	a	64	26	180	31	91.2	a	1682	145	7090

注1) 行間の異符号間で有意差あり(p<0.01)

注2) 栄養膜細胞はヘルニア法でバイオブシーし、基礎培地にはESM-2を用いた



図2 栄養膜細胞の増殖の様子  
左:培養3日目 右:培養7日目 パーはいずれも500μm

[ その他 ]

研究課題名：多項目遺伝子診断胚の実用化

予算区分：県単

研究期間：平成 17 年度（平成 15～17 年度）

研究担当者：菅和寛、青柳和重、千代豊（機能性ペブ研）、星宏良（機能性ペブ研）

発表論文等：特許出願（特願 2005-97260）、第 98 回日本繁殖生物学会大会にて口頭発表