

[成果情報名] 開発した超急速ガラス化保存用具（特許出願）を用いた牛胚の市販ストロー内保存方法及び融解・希釈方法

[要 約] 開発した保存方法は、市販の 0.25ml 移植用ストローをそのまま保存容器として使う方法である。また、融解・希釈する方法は、保存胚の入った保存用具付ストローを 30℃ 微温水中に浸水させ、保存用具を押し込むことによりストロー内で簡便に農家庭先において希釈できる方法である。

[部 署] 山形県農業総合研究センター畜産試験場・飼養管理部

[連絡先] TEL 0233-23-8818

[成果区分] 普

[キーワード] 牛胚、超急速ガラス化保存、融解希釈、保存用具、市販ストロー、ダイレクト移植

[背景・ねらい]

胚の凍結融解後の生存性は、超急速ガラス化保存法（クライオトップ用具：以下 従来法）が慣行の緩慢凍結法に比べ高い生存性があると言われている。

しかし、この方法は、融解・移植時にはシャーレを用いての段階的希釈や移植用ストローへ詰め替えなど煩雑な操作が必要で、農家庭先での利用は困難であった。

そこで、移植用ストローに対応した超急速ガラス化保存法による受胎率が高く（50%以上）、実用性の高いダイレクト移植技術の確立を目指した。

[成果の内容・特徴]

1. 開発した超急速ガラス化保存用具（以下 保存用具）を用いた保存方法は、市販の 0.25ml 移植用ストローをその保存用具の保存容器として使う方法である（図 1）。
2. ストロー内に事前に希釈液を充填しておく必要があるが、従来法に比べより安全に急速冷却できる（表 1、図 1）。
3. 融解・希釈方法は、保存胚の入った保存用具付ストローを 30℃ 微温水中に浸水させ、保存用具を押し込むことによりストロー内で簡便に希釈できる方法である（図 1）。
4. 従来法のシャーレを用いての段階的希釈などの煩雑な操作が不要で、農家庭先で短時間に操作でき、胚の融解後の生存性も良好である。（表 1、図 1）。
5. 希釈後は、従来法の移植用ストローへの詰め替え操作が不要で、微温水から保存用具付のストローを取り出し、連結したストローから保存用具を取り外すと緩慢凍結法と同様に農家庭先でのダイレクト胚移植が可能となる。しかも受胎性も良好である（表 1、図 1）。

[成果の活用面・留意点]

1. 開発した超急速ガラス化保存用具（特許出願）は図中写真に示したが、平成 26 年度市販予定となっている。
2. ガラス化保存時各培地の組成は以下のとおりとした。
 - ・平衡液：8.5%EG+8.5%DMSO+10%血清加 m-PBS+0.3MSuc
 - ・ガラス化液：17%EG+17%DMSO+10%血清加 m-PBS+0.3MSuc、
 - ・希釈液：0.3MSuc+20%子牛血清加 0.4%BSA D-PBS とした。

（EG：エチレングリコール、DMSO：ジメチルスルホキシド、Sus：スクロス、m-PBS：修正リン酸緩衝液）

[具体的なデータ]

表1 開発した保存用具を用いた超急速ガラス化保存法の効果(生存性、操作性、受胎性)

処理区	融解胚数	生存率(%)		操作時間 (分)/胚	細菌汚染 可能性	胚移植頭数	妊娠鑑定状況(頭)		受胎率 (%)	移植者別受胎率(%)	
		24h後	48h後				受胎	不受胎		経験多い	経験少ない
開発した保存用具	25	96.4	88.7	11	無	55	30	25	54.5	48.6	66.7
クライオトップ用具	23	95.8	91.7	25	有	-	-	-	-	-	-

操作時間は1胚当りのガラス化平衡+ガラス化保存+加温融解に要する作業時間を示す。
細菌汚染可能性は、ガラス化保存工程において、胚を液体窒素に直接接触させる操作あったものを可能性ありとした。
移植者の経験は年間延べ20頭以下を経験少ないとした。

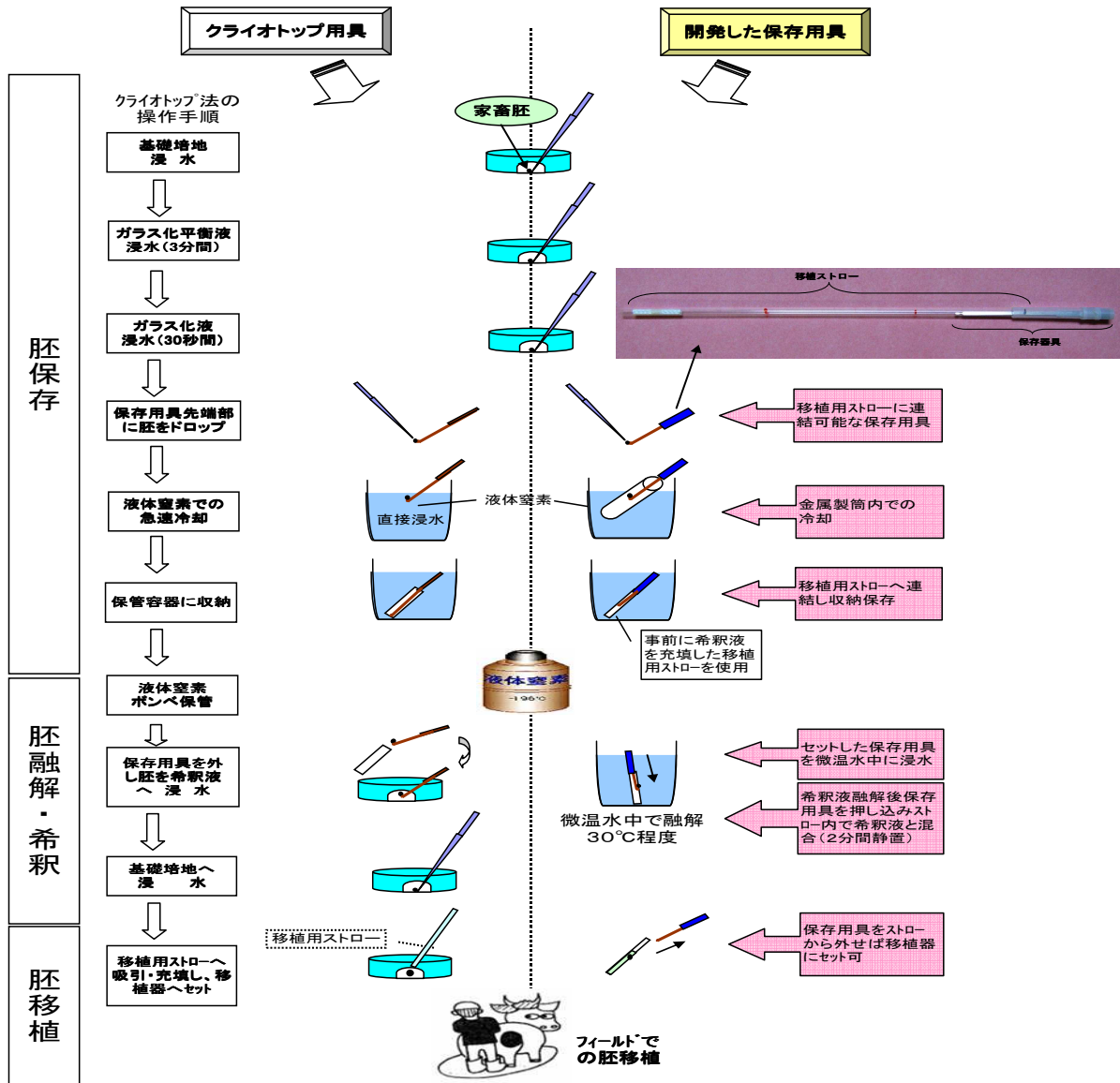


図1 開発した超急速ガラス化保存法の操作手順の違いと特徴

[その他]

研究課題名：牛超急速ガラス化保存胚の実用化に向けたダイレクト移植技術の確立
 予算区分：県単
 研究期間：平成24年(平成23~24年)
 研究担当者：高橋文昭
 発表論文等：山形県農業研究報告6号投稿及び日本畜産学会第118回大会発表予定