

[平成21年度参考となる技術]

[技術名] ウシガラス化保存胚の融解時に生存性が高いストロー内希釈液

[要約] ガラス化保存胚のストロー内希釈液(Glycerol)中の Sucrose(Suc)濃度と生存性の関係について調査すると、0.25M Suc で 48 時間後の生存率と透明帯脱出率が高く、ストロー内希釈液として有効である。

[キーワード] ストロー内希釈液、直接移植、ガラス化保存、体外受精

[担当] 福井畜試・技術開発部・バイテク研究グループ

[連絡先] 電話 0776-81-3130 電子メール chikusi@perf.fukui.lg.jp

[背景・ねらい]

ガラス化保存胚は加温融解時に希釈性ショックを引き起こしやすいため、加温後ストロー内で保存液を希釈するストロー内希釈液が重要である。そこで希釈液の組成や濃度と生存性の関係を明らかにする。

[技術の内容・特徴]

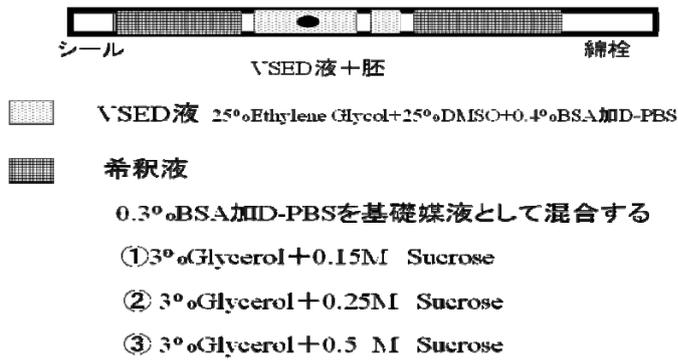
食肉センター由来の体外受精胚(7~8日目胚盤胞期および拡張胚盤胞期胚)を用い、胚の保存液は VSED 液とし、Suc 濃度の異なるストロー内希釈液を用いてストローを作成・保存する(図1)。胚の加温融解は、20℃の微温湯中にて行い、シール側を持ちストロー内で希釈液と混合後シャーレに移し、4分後培養液(0.1Mβ-ME 添加 20%FCS TCM199)に入れ、24、48時間後の生存率と透明帯脱出率を調査する。

1. ガラス化保存胚の加温融解後の生存率は、ストロー内希釈液濃度 0.25M の Suc が 24 時間および 48 時間後の生存率が高く、透明帯脱出率も高い(表1)。
2. 胚のステージでみると胚盤胞期では Suc 濃度別胚の生存率に差はみられないが、拡張胚盤胞期では 0.25M Suc で 24、48 時間後の生存率や透明帯脱出率が高い。(表2)

[技術の活用面・留意点]

1. VSED 液を保存液としたウシガラス化保存胚にはストロー内希釈液として 3%Glycerol+0.25M Sucrose 液が有効である。
2. ストロー内の保存液、希釈液の量や充填する位置により、加温後の希釈液と均一に混合するために、必ず胚の入った VSED 液層をストローの中央に充填することが重要である。
3. 体外受精胚や分割胚のガラス化保存に適応できる。

[具体的データ]



図一1 直接移植用ストロー充填方法

表1 ストロー内希釈液濃度と生存性

ストロー内希釈液 Sucrose濃度(M)	加温胚数	生存胚数		透明帯脱出胚数 (%)
		24hr (%)	48hr (%)	
0.15	117	89(76.1) ^b	74(63.2) ^B	61(52.1) ^D
0.25	63	56(88.9) ^a	54(85.7) ^A	46(73.0) ^C
0.5	71	56(78.9)	45(63.4) ^B	32(45.1) ^D

同一項目内の異符号間に有意差あり(a-b:p<0.05、A-B,C-D:p<0.01) X²検定

表2 発育ステージ別のストロー内希釈液濃度と生存性

ステージ	ストロー内希釈液 Sucrose濃度(M)	加温胚数	生存胚数		透明帯脱出胚数 (%)
			24hr (%)	48hr (%)	
胚盤胞	0.15	48	36 (75.0)	33 (68.8)	24 (50.0)
	0.25	19	15 (78.9)	14 (73.7)	9(47.4)
	0.5	30	24 (80.0)	22 (73.3)	13(43.3)
拡張 胚盤胞	0.15	69	53 (76.8) ^a	41 (59.4) ^B	37 (53.6) ^D
	0.25	44	41 (93.2) ^b	40 (90.9) ^A	37 (84.1) ^C
	0.5	41	32 (78.0)	23 (56.1) ^B	19 (46.3) ^D

同一項目内の異符号間に有意差あり(a-b:p<0.05、A-B,C-D:p<0.01) X²検定

[その他]

研究課題名：受精卵移植技術高度定着化確立事業

研究期間：2006～2008年度

研究担当者：田中 健、竹内隆泰、笹木教隆