

## 試験研究成果普及情報

部門	養豚	対象	研究
課題名：ブタ桑実胚ガラス化保存法の検討と移植試験			
[要約] ブタ桑実胚の保存方法として、細胞質内脂肪顆粒を除去し、MVC 法で保存すると胚の生存性が高まり、高い受胎率を示す。			
キーワード（専門区分） 繁殖（研究対象） 家畜類 - 豚 （フリーキーワード）胚移植，凍結保存，ガラス化，後期桑実胚、MVC 法			
実施機関名（主 査）千葉県畜産総合研究センター 生産技術部 生物工学研究室 （協力機関）明治大学 農学部 発生工学研究室，東総食肉衛生検査所 （実施期間）2002 年度～2003 年度			

### [目的及び背景]

ウイルス感染等の恐れのないブタ胚の発育ステージである桑実胚期の保存法として、ガラス化方法の改良と脂肪除去方法について検討した。保存胚を凍結融解後体外で培養し、その生存性を比較し、これらの成績を基に移植試験を実施した。

### [成果内容]

1. 桑実胚に適するガラス化保存方法を検討するために、ストロー内ガラス化保存法（ST; Ishimori ら 1993 年）とゲルローディングチップ法（GLT; Tominaga ら 2002 年）及び最小容量冷却法（MVC; Kuwayama ら 2000 年）を比較した。ガラス化保存後の 48 時間の体外での生存率および移植可能胚の割合は、より少容量のガラス化液（VIT）を用いる方法ほど高い傾向を示した。MVC 法は、VIT 液に含まれる耐凍剤の濃度が低く細胞毒性の低減及び VIT 液の量が最小で凍結・融解速度（cooling rate）が早く危険温度域の感作時間の短縮が期待できた。

また、MVC 法の凍結板（Cryotop®）先端部には、1 度に 10～15 個の胚の保存が可能であり、豚等の多胎動物胚の凍結方法の操作性を高めることが確認された（表 1,2）。

2. ガラス化保存に対する細胞質内脂肪顆粒の除去効果を検討するために、無処置凍結桑実胚にサイトカラシン B を含む TALP 液と共に遠心処理することにより、細胞質内脂肪顆粒を細胞外へ分離した脂肪顆粒分離胚及び脂肪顆粒を顕微操作によって除去した胚を MVC 法で凍結保存した。融解後の 48 時間の体外での生存率および移植可能胚の割合は、脂肪顆粒を除去した胚が、対照の非凍結の新鮮胚に匹敵する生存性を示し、平均細胞数も 90 以上に発育した、脂肪顆粒除去処理と MVC 法の併用法は、胚の生存性を更に向上させ、保存法として有効と考えられた（表 3）。

3. 保存胚をレシーピエント 5 頭に移植したところ、全頭が受胎したが、1 頭は流産し、4 頭が分娩し、合計 14 頭の正常な子豚が生まれた。

### [留意事項]

この方法は、研究用ブタ、純粋種豚、稀少種などへの応用においては十分に試験研究領域で実用的な技術レベルにあると思われる。

[普及対象地域] 県下全域      [行政上の措置] 特に無し      [普及状況] 無し

[成果の概要]

表 1 ガラス化液及び融解・希釈液

	平衡液及びガラス化液	器材	VIT 液量	保存可能胚数
ST 法	20%DMSO + 20%EG + 0.6MSuc	0.25mL 牛精液保存用ストロー	10 $\mu$ L	4
GLT 法	20%DMSO + 20%EG + 0.6MSuc	ゲルローディングチップ	0.6 $\mu$ L	5
MVC 法	15%DMSO + 15%EG + 0.5MSuc	凍結板(Cryotop:北里サブライ)	0.1 $\mu$ L	10 ~ 15

EG: エチレングリコール, DMSO: ジメチル・スルオキシド, Suc: ショ糖

表 2 ガラス化保存法別豚桑実胚の体外での生存性

方法	処置胚数	生存胚数 (%)	移植可能胚数 (%)	細胞数 (M $\pm$ SD)
ST 法	30	6 <sup>dq</sup> (20)	0 <sup>d</sup> (0)	53 $\pm$ 14 <sup>c</sup>
GLT 法	46	18 <sup>d</sup> (39)	10 <sup>d</sup> (22)	55 $\pm$ 21 <sup>d</sup>
MVC 法	43	26 <sup>bp</sup> (60)	16 <sup>b</sup> (37)	61 $\pm$ 28 <sup>d</sup>
非凍結胚	39	34 <sup>a</sup> (87)	23 <sup>a</sup> (59)	94 $\pm$ 32 <sup>a</sup>

a>b (P< 0.05), a>c (P< 0.01), a>d (P<0.001), p>q (P<0.01)

培養; 10%牛胎子血清添加 NCSU23 培養液にて 48 時間培養

表 3 脂肪顆粒処置法別 MVC 法保存桑実胚の体外での生存性

方法	処置胚数	生存胚数 (%)	移植可能胚数 (%)	細胞数 (M $\pm$ SD)
無処置凍結胚	42	24 <sup>dq</sup> (57)	21 <sup>dq</sup> (50)	65 $\pm$ 30 <sup>d</sup>
脂肪分離凍結胚	38	29 <sup>b</sup> (76)	21 <sup>c</sup> (71)	56 $\pm$ 26 <sup>d</sup>
脂肪除去凍結胚	37	35 <sup>a</sup> (95)	35 <sup>a</sup> (95)	92 $\pm$ 25 <sup>a</sup>
非凍結胚 (新鮮)	40	34 <sup>p</sup> (85)	34 <sup>p</sup> (85)	103 $\pm$ 31 <sup>a</sup>

a>b (P< 0.05), a>c (P< 0.01), a>d (P<0.001), p>q (P<0.05)

培養; 10%牛胎子血清添加 NCSU23 培養液にて 48 時間培養

[発表及び関連文献]

2003 年国際胚移植学会 (2003 International Embryo Transfer Society)

第 96 回日本繁殖生物学会 (2003)

第 29 回豚の繁殖衛生セミナー (2003)

第 28 回千葉県獣医学会 (2004)

平成 14 年度試験研究成果発表会資料 (2003)

平成 15 年度試験研究成果発表会資料 (2004)

ブレインテクノニュース・101 (2004)