

豚受精卵の長期保存方法の確立

耐凍剤に 6M エチレングリコール+1M ガラクトース+7%ポリビニールピロリドンを用いガラス化保存された豚胚の融解後の生存性は高く、同耐凍剤を用い超急速凍結された融解胚の外科的移植により、75 %の受胎率で産子(平均 6.7 頭)が得られる。

農業研究センター 畜産研究所 中小家畜部(担当者：崎村 武司)

研究のねらい

豚胚の凍結技術は、優良遺伝子の保存等に有用な手段であり、様々な目的に利用される可能性を含んでいる。しかし、豚胚の移植には、外科手術に頼る採胚、移植手法とともに、その凍結保存の困難性という基本的な問題が存在する。この問題に対し、近年、凍結による胚の損傷を軽減させる、ガラス化法による凍結胚移植の成功が報告され、豚胚移植の利用価値を高める技術として期待されている。

そこで、ガラス化保存技術(急速および超急速凍結法)の改善により、胚の生存性および移植による産子生産性を向上させることを目的とする。

研究の成果

1. 急速凍結法においては、豚胚凍結時の耐凍剤に 6M エチレングリコール(EG)+1M ガラクトース(Gal)+7%ポリビニールピロリドン(PVP)を用いた方が、8MEG+7%PVP と比較して、融解後の生存性が高い。また、直径が 199 μ m 以下の拡張胚盤胞の、融解後の生存性は著しく低下する(表 1)。
2. 超急速凍結法は、急速凍結法と比較して、胚の凍結、融解後の生存性を向上させる { 10%牛胎児血清(FBS)加 mCZB にて 5%O₂、5%CO₂、湿度飽和の気相で 48 時間培養 } (表 2)。
3. 超急速凍結法により凍結した胚を外科的に移植することで、75 %の受胎率で産子(平均 6.7 頭)が得られる(表 3)。

普及上の留意点

1. 超急速冷却法を用いて冷却保存した胚の融解、培養後の生存率と移植における受胎率が良好なことから、豚胚の保存手段として利用できる。
2. 胚の耐凍性には個体差が存在するため、移植には供胚豚ごとにサンプルの凍結、融解後の生存率を評価し、良好な供胚豚のものだけ移植を実施する必要がある。

表1 胚のランク別、耐凍剤別生存成績

ステーション	直径(μm)	耐凍剤	供試胚数	生存率(生存胚数)
EX*1	199	6MEG*2	12	50.0%(6)
	"	8MEG	18	27.8%(5)
	200~229	6MEG	8	87.5%(7)
	"	8MEG	21	76.2%(16)
	230	6MEG	6	83.3%(5)
"	8MEG	4	75.0%(3)	
H	-	6MEG	13	92.3%(12)
	-	8MEG	7	42.9%(3)

急速凍結法により凍結、培養液は全て10%FBS加mCZBを使用
5%O₂、5%CO₂、湿度飽和の気相で48時間培養

*1 EX: 拡張胚盤胞 H: 脱出胚盤胞

*2 6MEG: 6MEG+1MGal+7%PVP 8MEG: 8MEG+7%PVP

表2 凍結方法の違いによる融解後の胚の生存成績

凍結方法	供試胚数 (個)	生存率(生存胚数)	
		24時間後	48時間後
急速凍結法	22	63.6%(14)	59.1%(13)
超急速凍結法	21	85.7%(18)*	71.4%(15)

耐凍剤には6MEG、直径200μm以上の胚を供試

培養液は全て10%牛胎児血清加mCZBを使用

5%O₂、5%CO₂、湿度飽和の気相で48時間培養

急速凍結法: 0.25mlプラスチックH-に耐凍剤と共に胚

封入し直接液体窒素に投入する方法

超急速凍結法: 胚と微量の耐凍剤を直径約1mmの針金のループ部分に移し直接液体窒素に投入する方法

*: P<0.1

表3 移植成績

受胚番号	産歴	凍結方法	耐凍剤	移植方法	移植胚数(EX/H)*2	妊否	産子数	産子率(%)
1589	未経産	急速	6MEG*1	非外科	20(6/14)	否	-	0.0
1582	"	"	8MEG	"	23(7/16)	否	-	0.0
1419	"	"	6MEG	"	29(14/15)	否	-	0.0
1531	"	"	8MEG	"	30(15/15)	否	-	0.0
1610	"	"	6MEG	"	34(21/13)	否	-	0.0
1578	"	"	8MEG	"	22(22/0)	否	-	0.0
1625	"	"	6MEG	"	34(18/16)	否	-	0.0
1556	"	"	8MEG	"	30(19/11)	否	-	0.0
1530	1産	"	6MEG	外科	25(25/0)	否	-	0.0
1152	"	"	"	"	19(9/10)	否	-	0.0
444	未経産	"	"	"	22(10/12)	否	-	0.0
666	"	超急速	"	"	26(9/17)	妊	6	23.0
463	"	"	"	"	31(31/0)	否	-	0.0
125	1産	"	"	"	27(27/0)	妊	6	22.2
611	"	"	"	"	23(16/7)	妊	8	34.8

*1 6MEG: 6MEG+1MGal+7%PVP 8MEG: 8MEG+7%PVP *2 EX: 拡張胚盤胞 H: 脱出胚盤胞