

[成果情報名] ガラス化保存胚をダイレクト移植できる新たな胚保存・融解器具

[要約] 受胎率の高いガラス化保存胚をダイレクト移植できる、新たな胚保存・融解器具を開発する。胚の保存融解では緩慢凍結法より生存率が高く、移植受胎率も60%を達成することができる。

[キーワード] ガラス化、ダイレクト移植、体外受精、融解器具

[担当] 育種繁殖研究部

[代表連絡先] 電話 0824-74-0332

[研究所名] 広島県立総合技術研究所畜産技術センター

[分類] 研究成果情報

[背景・ねらい]

広島県では、平成32年に和牛胚を乳用牛に2,000個移植することによる1,200頭の和牛生産を目標とし、胚移植での受胎率60%以上の達成と民間移植師による胚移植の県内普及を推進している。ガラス化保存胚は、現行の凍結保存胚ダイレクト移植法に比べて高い受胎率が期待できるが、融解後に顕微鏡下でストローに詰め替える必要があるため、民間移植師が畜産農家の庭先でダイレクト移植できない課題がある。

そこで、ガラス化保存胚を畜産農家の庭先で移植可能な保存・融解器具を開発する。

[成果の内容・特徴]

1. ストロー内にガラス化胚と融解液を封入し、ガラス化胚が位置するストロー周囲に保冷器を装着する器具を開発する。本器具により、融解液加温中も胚のガラス化状態が維持でき、加温した融解液にガラス化胚を押込むことで急速な融解が可能である(図1)。
2. 融解時にガラス化胚の生存性を高く維持するには、急速に加温する必要がある。ストロー内融解液を十分な温度(35℃)まで温めるには15秒必要であることから、胚の保冷状態を15秒以上維持できる機能が必要である。保冷器に液体窒素を貯留できる構造にすることで保冷効果が高まり、保冷器が装着されたストロー内部の温度を35秒間-196℃に維持できる。また、35℃まで加温した融解液に胚載置部を押し込んで胚を浸漬することにより、胚の急速な融解が可能となる(図2)。
3. 開発器具を用いて体外受精胚のガラス化保存・ストロー内融解試験を実施し、融解後の胚の生存率を緩慢凍結法(0.9Mエチレングリコール, 0.8Mプロピレングリコール及び0.1Mスクロース)および市販のガラス化保存器具(クライオトップ)による方法と比較する。培養24時間後の生存率は、開発器具が緩慢凍結した胚よりも有意に高く(96.3% vs 84.3%)、融解胚の総細胞数は多い(136.4個 vs 116.5)。市販のガラス化器具とは、生存率および細胞数ともに同等の成績である(表1)。
4. 試作器具を用いて保存した体外受精胚(和牛胚)を、牛舎内で融解し直接移植器具に装着してホルスタイン種未経産牛へ移植する。開発当初の保冷効果が低い試作器1および2では、受胎率が低い。保冷効果を高めた試作器3では受胎率60%(9頭受胎/15頭移植)を達成し、クライオトップと同等の移植成績を得ている(表2)。

[成果の活用面・留意点]

1. 受胎率が高いガラス化胚のダイレクト移植および広域流通が可能となるため、胚移植の普及に寄与することができる。さらに、和牛体外受精胚の乳用牛への移植が普及し、乳用牛からの和牛子牛生産体制が定着することにより和牛の増頭につながる。
2. 緩慢凍結胚の移植成績との比較ができていないため、現在大規模酪農家において開発器具による保存胚と緩慢凍結胚を用いた60頭規模の移植試験を実施中である。

さらなるガラス化胚ダイレクト移植技術の高度化のため、器具の材質や融解液の検討・改良を進めるとともに、開発器具の操作マニュアルを作成する必要がある。

[具体的データ]

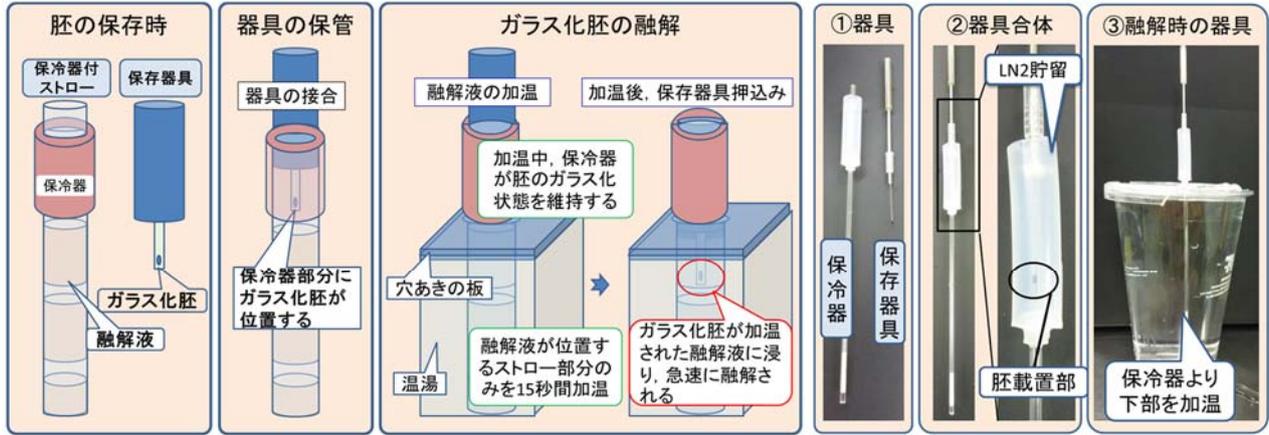


図1 開発したガラス化胚保存・融解器具の模式図と器具写真

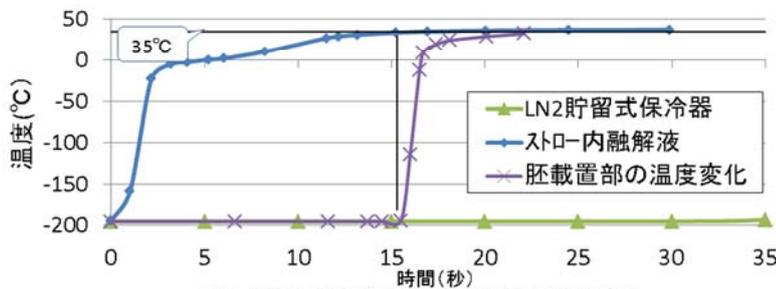


図2 融解液温度および保冷器内温度変化

表1 保存・融解した胚の培養後の生存性と培養24時間後の総細胞数

| | 供試胚数 | 生存数 (%) | | 孵化数 (%) | 細胞 カウント胚 | 総細胞数 |
|-------------|------|----------------------------|--------------|--------------|-------------|--------------------------|
| | | 24h後 | 48h後 | 48h後 | | |
| 開発器具 | 54 | 52 ^a (96.3) | 50 (92.6) | 34 (68.0) | 25 | 136.4 ± 5.8 ^a |
| クライオ トップ | 63 | 61 ^a (96.8) | 59 (93.7) | 38 (64.4) | 18 | 132.1 ± 4.8 ^a |
| 緩慢凍結 | 121 | 102 ^b (84.3) | | | 102 | 116.5 ± 5.0 ^b |

^{ab} 異符号間に有意差あり (p<0.05)

表2 器具を用いた保存胚の移植試験

| 使用器具 | 保冷効果 (-196°C維持時間) | 移植 頭数 | 受胎 頭数 | 受胎率 |
|-------------|----------------------|----------|----------|-------|
| 試作器1 (開発初期) | 6秒 | 11 | 0 | 0% |
| 試作器2 (改良形) | 16秒 | 12 | 2 | 16.7% |
| 試作器3 (最終形) | 35秒 | 15 | 9 | 60.0% |
| クライオトップ | | 12 | 7 | 58.3% |

(日高健雅、福本豊)

[その他]

研究課題名：ガラス化保存胚ダイレクト移植用の新たな器具の開発

予算区分：県単

研究期間：：2014～2017年度

研究担当者：日高健雅、福本豊、今井昭、森本和秀

発表論文等：日高ら「ガラス化保存された生殖細胞の融解用器具および融解方法」特許第6238186号(2017年11月10日)