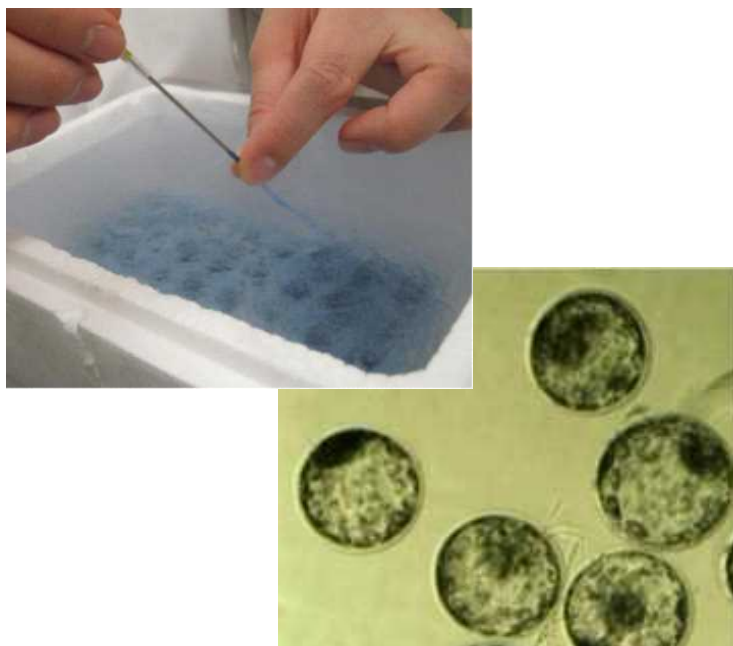




マイクロボリュームエアクリーニング (MVAC) 法 によるブタ胚（体内生産胚）のガラス化保存方法



胚の採取

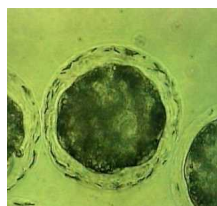
MVAC 法でガラス化するのに適している胚の発育ステージは胚盤胞～拡張胚盤胞である（図1）。このステージであれば加温後に高い生存性が得られている。そのため、これらの発育ステージの胚を効率的に採取するため、供胚豚は発情誘起処理後に胚を採取する方が望ましい。

性成熟豚の発情誘起で確実性の高い人工流産法での発情誘起処理開始から採胚までのタイムスケジュールを下記に示したので参考にしてください（処理する供胚豚は人工授精後21～40日齢の雌豚）。

処理日程	
0	P G F ₂ α (PM 5 : 0 0)
1	P G F ₂ α + e C G (PM 5 : 0 0)
2	
3	
4	h C G (PM 5 : 0 0)
5	Day 0 A I (PM 5 : 0 0)
6	Day 1 A I (AM 1 0 : 0 0)
7	Day 2
8	Day 3
9	Day 4
1 0	Day 5
1 1	Day 6 採胚日 (午前中に採胚：胚盤胞～拡張胚盤胞) (胚日齢) (午後に採胚：拡張胚盤胞 ※脱出胚盤胞が混ざる 場合がある。)

使用薬品

P G F ₂ α	: クロプロステノールN aとして0. 1 8 4 m g (プラネート MSD アニマルヘルス)
e C G	: 血清性性腺刺激ホルモンとして1 5 0 0 IU (セロトロピン あすか製薬株式会社)
h C G	: 胎盤性性腺刺激ホルモンとして5 0 0 IU (プベローゲン ノバルティス)



初期胚盤胞



胚盤胞



拡張胚盤胞

図1 ガラス化保存に適したブタ胚

胚スティック封入用ストローの準備

発泡スチロール内に試験管立て等をいれ、液体窒素を充填する。
試験管立てに胚スティックに同封されている青いストローを立て、ストロー内の空気を冷やす。その際、ストローの栓を少しゆるめておく。後でふたを外す時にとりやすい(図2～3)。また、ストロー内は滅菌済みのため、栓をゆるめる際に完全に取りないように気をつける。

ストローは栓のすぐ下まで液体窒素に漬っている状態で冷却しておく。その際、ストロー内に液体窒素が侵入していないかを確認する(図4)。

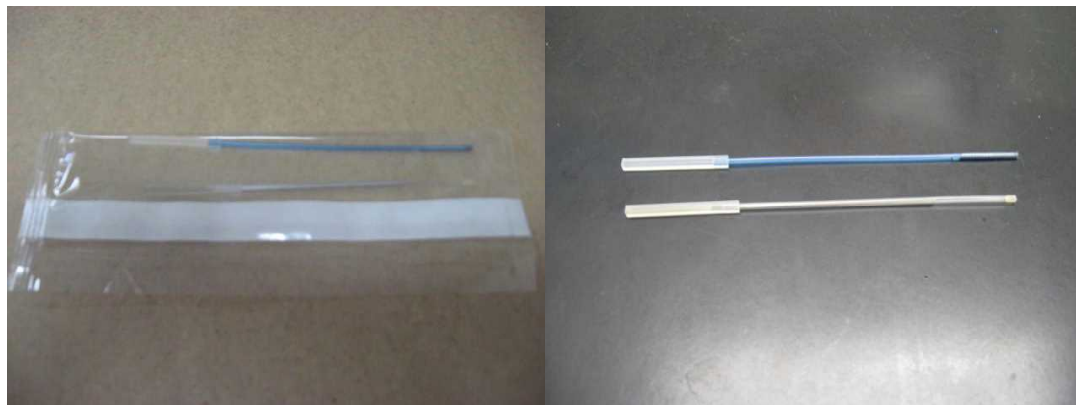


図2 滅菌済み胚スティックセット
青いストロー：空気冷却保存用ストロー
透明のストロー：胚スティックと保護カバー

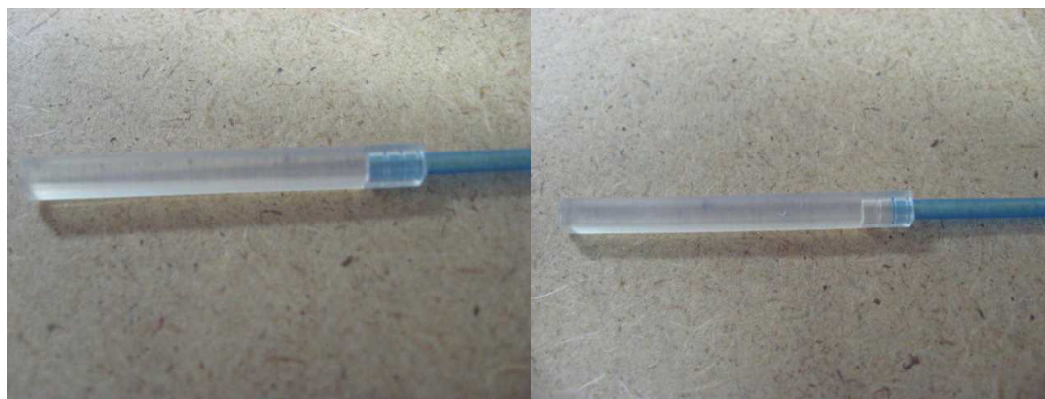


図3 空気冷却保存用ストローのシリコン製の栓を右の図のように少しゆるめておく

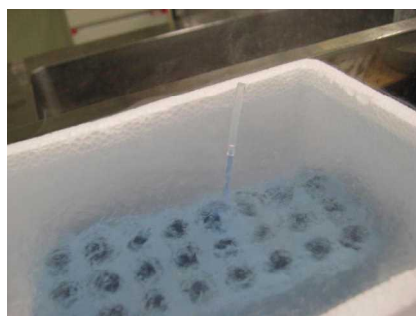
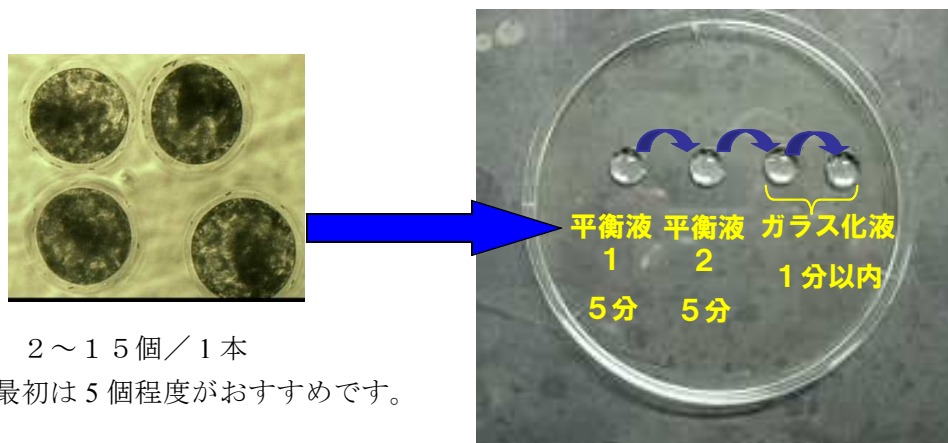


図4 空気冷却保存用ストローの冷却

胚の平衡（ブタ胚の場合）およびガラス化

90 mmのシャーレのふた等に100 μ lの平衡液1および平衡液2のドロップを1カ所ずつ作製し、100 μ lのガラス化液のドロップを2カ所作製する。各溶液は38℃に加温した後、加温盤の上で作業する(図5)。



2～15個／1本
最初は5個程度がおすすめです。

図5 平衡液およびガラス化液の準備

平衡液1→2の順で5分ずつ平衡する。平衡終了後、平衡液2をなるべく持ち込まないように気をつけながら胚をひとつ目のガラス化液に移し、直ちにふたつ目のガラス化液に移す。その後、胚スティックの先端から約1cm以内の場所に胚を含んだガラス化液を薄くのばす感じで付着させる(1 μ l程度を付着させる)(図6)。



図6 胚スティックへ胚を含むガラス化液を付着させる。

液体窒素中に冷やしておいた青いストローの栓を取り外す（その際、栓とストローの接合部分を指でつかんで少し暖めた後、ひっぱると外しやすい）（図7）。

青いストローの下部半分以上が液体窒素に漬された状態で胚スティックを青いストローに速やかに差し込む（図8）。

胚スティックが青いストローにしっかり差し込まれたことを確認した後、胚スティックを差し込んだストローをストローケース等に入れ、液体窒素タンクに保存する（図9）。



図7 シリコン製の
栓を指でつかみ
体温で柔らかくする。

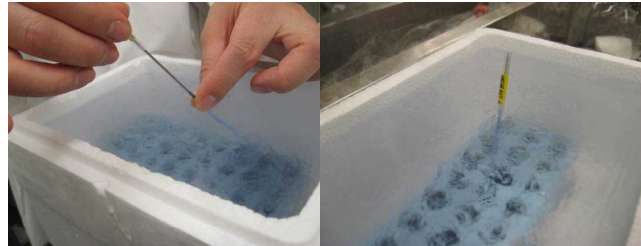


図8 青いストローの栓を外し、胚スティックを
しっかりと差し込む。

※ 指が液体窒素に接触して凍傷にならないように注意する。



図9 胚スティックを封入したストローをストローケースに入れ、
液体窒素タンク内で保存。

参考：胚スティック上に胚がきちんとのっている
か心配な場合は図10の様に実体顕微鏡の
サイドから光線を当てることで胚スティック
上の胚を確認できます。



図10

胚の加温・希釈

発泡スチロール内に液体窒素を充填し、その中に胚スティックを封入したストローを入れたストローケースを液体窒素タンクより移す。加温・希釈液を45℃のウォーバス内で暖めておく。実体顕微鏡に38℃に設定した加温盤をのせ、その上に45℃に加温した加温・希釈液が最低でも3ml入った35mmのシャーレをおく。(初めての方は胚スティックの先端1cmよりも手元に胚をのせてしまい、加温時に胚が加温・希釈液に浸からなくて、胚がうまく回収できないことがあります。そのため、最初は4mlぐらいの加温・希釈液をシャーレ入れた方が安心です。)

胚スティックを封入した青いストローの下部半分以上が液体窒素に漬った状態で、栓とストローの接合部分を指でつかんで暖める。

胚スティックの栓が柔らかくなってきたら胚スティックをストローから抜き、速やかに胚スティックの先端部分(胚を付着させた部分)を加温・希釈液に漬す(図11)。

胚スティックの先端を加温・希釈液中で揺すりながら、顕微鏡下で胚が胚スティックから遊離するのを確認した後、封入した胚数が加温液・希釈液中にあることを確認する(図12)。

遊離した胚はそのまま加温・希釈液で3分間希釈した後、ブタ後期胚培養用培地(PBM)で3回洗浄し、PBMのドロップに移し、39℃、5%CO₂、5%O₂のインキュベータ内で培養し、24、48時間後に生存性を確認する。



図11 シリコン製の栓を指でつかみ体温で柔らかくする。
シリコン製の栓が柔らかくなったら、
速やかに胚スティックをストローより抜く。



図12 胚を胚スティックから遊離させる。

受胚豚の準備

供胚豚よりも0～2日遅れで発情が発現した受胚豚を利用した方が受胎率が高い報告がある。今回、Day 6の胚をガラス化保存しているので、受胚豚はDay 5に調整すると良い。発情周期の同期化方法は以下のとおりである。

1) 人工流産法に受胚豚の準備

胚の採取の項に記載されている方法で発情誘起し、Day 5で移植を実施する。

2) 離乳母豚を利用する場合

離乳日にeCGを投与し、その72時間後にhCGを投与する。hCG投与翌日をDay 0としてDay 5で移植を実施する。

3) 自然発情を利用する場合

最終雄許容日を1日として5日目に移植を実施する。



頸管経由による豚胚移植

胚スティックの販売先：株式会社ミサワ医科工業

(TEL: 024-962-7713 FAX:024-951-6200)

ブタ後期胚培養用培地(PBM)及び

ブタ胚のガラス化保存液セットの販売先：株式会社 機能性ペプチド研究所

(TEL: 0237-53-1488 FAX: 0237-47-1477)

問い合わせ先：家畜改良センター管理課 平山、瀧下（胚のガラス化）

(TEL: 0248-25-6165 FAX: 0248-25-3990)