

## 第78回麻布獣医学会 一般講演2

## 緩慢凍結法およびガラス化法による ウサギ桑実期胚の超低温保存

奥田 泰士<sup>1</sup>, 前泊 直樹<sup>1</sup>, 紫野 正雄<sup>1</sup>, 猪股 智夫<sup>2</sup>, 柏崎 直巳<sup>1</sup>

<sup>1</sup>麻布大学・獣医・動物繁殖, <sup>2</sup>実験動物

**【目的】** ウサギ初期胚の超低温保存は、貴重な遺伝資源の保存法として重要である。ウサギ桑実胚を緩慢凍結法（CSF法）および最小容量冷却ガラス化法（MVC法）により超低温保存し、加温後の胚の生存性を比較した。

**【方法】** FSHによる過剰排卵処置したウサギからhCG投与後48から53時間目に胚を回収した。CSF法は胚を室温下で1.5M凍害保護物質 glycerol（G区）、ethylene glycol（EG区）および1,2-propanediol（PROH区）添加凍結培地中で10分間平衡し、ストローに封入し-30℃まで0.5℃/minで冷却し、液体窒素で凍結した。凍結胚の融解は、37℃温水中で10秒間浸漬融解した後、胚を0.2M sucrose（S）添加PBS + 10% FCSに10分間平衡後、PBS + 10% FCSで3回洗浄した。MVC法は7.5% EG, 7.5% DMSOを含む平衡培地で3分間平衡し、直ちに15% EG,

15% DMSO, 0.5MSからなるガラス化培地で1分平衡後、Cryotop（北里サプライ）をもちいて液体窒素中に投入した。保存胚の加温は、0.5MS添加PBS + 20% FCSで5分間希釈後、PBS + 20% FCSで3回洗浄した。保存後の胚の生存性は、胚をM-199 + 10% FCS中で24時間培養し、培養後に胚の形態を維持もしくは発生が進んだものを生存とした。

**【結果】** CSF法およびMVC法による保存後の胚の生存率は、各々、G区0%、EG区87.5%、PROH区60.5%および93.3%であった。EG区およびMVC法の生存率は、PROH区およびG区と比較して有意に（ $P < 0.05$ ）高く、PROH区はG区より有意に（ $P < 0.05$ ）高かった。

**【結論】** 本研究のCryotopによるMVC法および1.5MEGによるCSF法は保存後の胚の生存性が高く、ウサギ桑実胚の超低温保存法として適している。