

東京うこっけい PGCs の採取適期と凍結保護剤の検討

中村 梓
(畜産技術科)

【要 約】東京うこっけいにおける PGCs の採取適期は、孵卵時間 52～54 時間である。また、凍結保護剤にプロピレングリコールを用いると DMSO と同等以上の凍結保護効果の可能性がある。

【目 的】

東京うこっけいの安定的な系統維持体制を構築するため、本年度では東京うこっけいにおける PGCs の採取適期を明らかにする。また、細胞によって適切な凍結保護剤が異なるため、透過性保護剤を変えた際の凍結融解後の回収率および生存率を検証する。

【方 法】

1. 東京うこっけいの PGCs 採取適期の検討

PGCs の回収は孵卵約 2.5 日目に行うが、ニワトリの品種や孵卵条件によっても発生スピードは異なる。孵卵時間を変化させたときの発生ステージを確認し、PGCs を回収するのに最適な孵卵時間を確認した。発生ステージは Hamburger Hamilton によるニワトリ胚の発生段階表により評価した（図 1）。孵卵器内の環境は、温度 37.6℃、湿度 53～63% を維持し、1 時間に 1 回の頻度で転卵した。

2. 透過性凍結保護剤の検討

回収した PGCs は 10% の各透過性凍結保護剤を含む基礎培地（DMEM）に 150 個前後懸濁し、クライオチューブに注入した。冷凍容器（Mr.Frosty）を使用して、-80℃のディープフリーザーで約-1℃/分速度で冷却後、液体窒素（-196℃）に移し保管した。凍結融解後の PGCs の生存率はトリパンブルー染色によって計測した。

対照区：ジメチルスルホキシド（DMSO）試験区：プロピレングリコール（PG）、ジメチルホルムアミド（DMF）、ジメチルアセトアミド（DMA）、グリセロール（GLY）

【成果の概要】

1. 一般的に PGCs の回収は Stage14～16 が適している。各孵卵時間から回収できる stage14～16 の割合は、孵卵 52 時間は 83.3%、54 時間は 90.5%、56 時間は 73.8%、58 時間は 79.4%、60 時間は 40.0% であった。（図 2）このことから、東京うこっけいでは 52～54 時間孵卵した胚から PGCs を回収するのが最適である。また、各ステージから回収できる 1 胚あたりの PGCs の平均個数は表 1 のとおりであった。
2. PGCs 融解後の回収率から、DMF（6%±1.6%）および DMA（6%±3.0%）は、対照区（22%±0.7%）と比較して有意に低かった（図 3；A-a）。また、PG（26%±5.3%）は有意な差はなかったものの対照区より回収率および生存率が高く、DMSO と同等以上の凍結保護効果があると考えられる。

【残された課題・成果の活用・留意点】

PG の最適な保護剤濃度および非透過性保護剤の検討を行い更なる回収率向上を目指す。

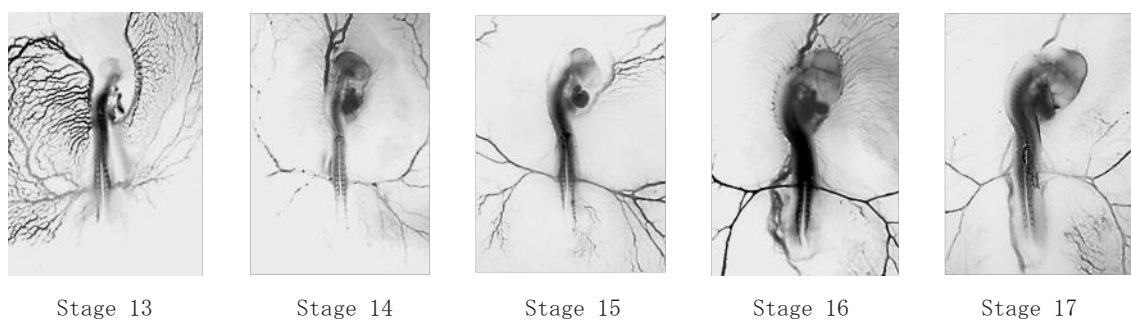


図1 発生ステージ

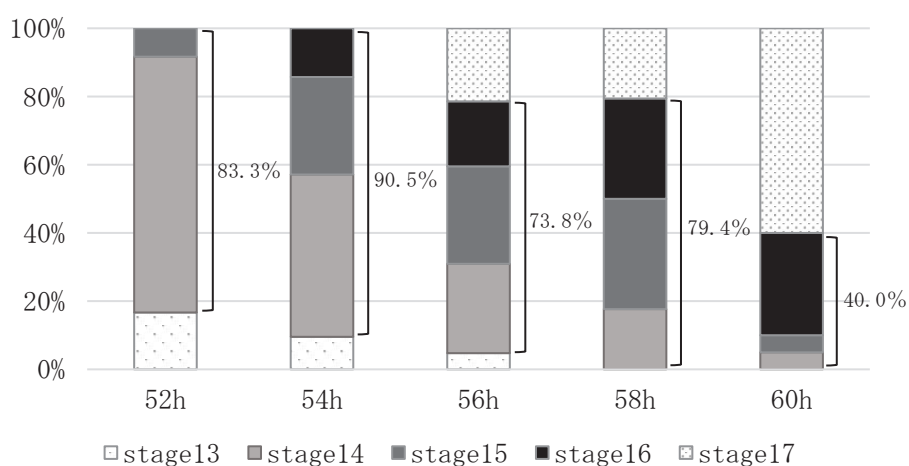


図2 孵卵時間ごとの発生ステージ

表1 各ステージから回収できる1胚あたりのPGC数

	発生ステージ				
	stage13	stage14	stage15	stage16	stage17
平均	23.8	42.0	41.6	35.5	10.5
標準誤差	7.30	5.22	6.55	0.71	0.00

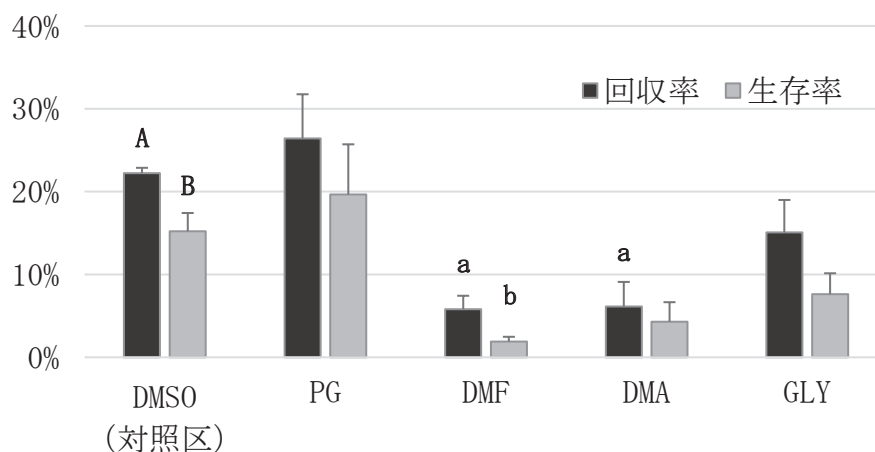


図3 各凍結保護剤の回収率および生存率

A-a $P < 0.05$ B-b $P < 0.05$