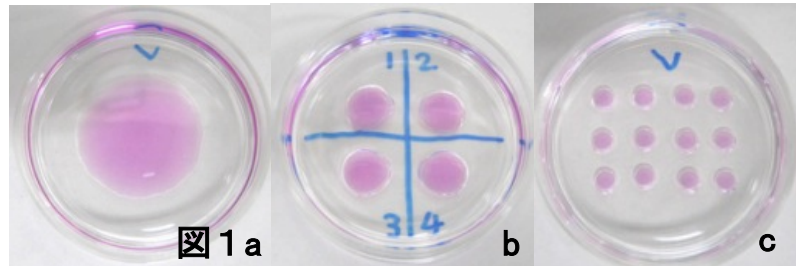


マウス凍結精子を用いた体外受精

注意: 本プロトコールにおける、マウス凍結精子の Methyl- β -cyclodextrin および還元型 glutathione を使用した体外受精法には、特許として登録された発明(特許第5439677号、特許権者: 国立大学法人熊本大学(以下「熊本大学」)、発明者: 中潟 直己、竹尾 透)の技術が含まれています。利用者が本プロトコールを用いる場合は、上記特許の実施に該当します。その場合は、①熊本大学の実施許諾を受ける(連絡先: 熊本大学 マーケティング推進部 産学連携ユニット Mail: liaison@jimu.kumamoto-u.ac.jp)、もしくは②熊本大学から本技術を用いた製品を販売することにつき実施許諾を得た企業の製品を使用する等、特許法上必要な措置を講じて下さい。

1. 培養用ディッシュの準備

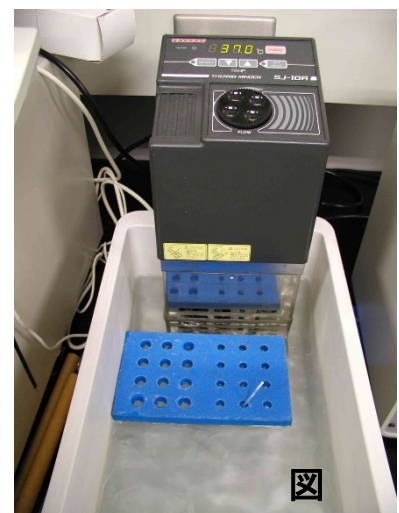
以下の要領で各種培養用ディッシュを作製し、少なくとも30分間以上インキュベータ(37°C、5%CO₂ in air)内で平衡させる。



- (1) 精子前培養用ディッシュ: 400 μ L の 0.4 mM Methyl- β -cyclodextrin (MBCD)を含む PVA-mHTF (参考資料*)を 35 mm ディッシュに載せてから、ピペットチップの先端で辺縁部を平たく伸ばし、直径約 20 mm に広げる。約 3.3 mL のミネラルオイルを上から静かに注ぎ、培養液が完全に覆われるのを確認する(図 1a)。
- (2) 卵子採取および受精用ディッシュ:
80 μ L の 1.25 mM glutathione (GSH)を含む mHTF (参考資料**)を 35 mm ディッシュに 4 カ所滴下して、同様にミネラルオイルで覆う(図 1b)。
- (3) 胚培養用ディッシュ: 10 μ L の胚培養液(mCZB または KSOM/aa など)を 35 mm ディッシュに 12 カ所滴下して、同様にミネラルオイルで覆う(図 1c)。

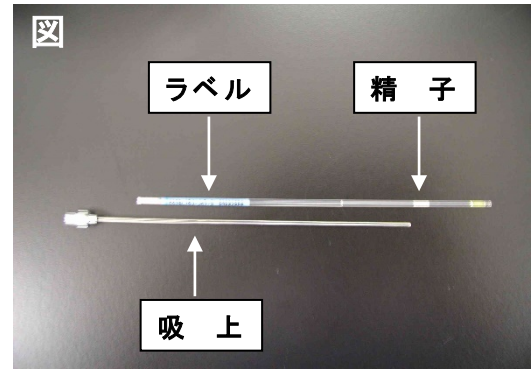
2. 凍結精子の回収と前培養

- (1) フェイスマスクと凍結用手袋を着け、ピンセットを用いて液体窒素中からストローを取出し、空気中で 5-10 秒保持した後、37°Cの温水に凍結精子の部分から徐々に全体を浸して、15 分間温める(図 2)。
- (2) 37°Cに予め温めておいたディッシュの蓋などに、精子液だけを以下の手順で取り出す(図 3)。
 - 1) 温水からストローを取り出し、周りの水分を拭き取る。
 - 2) ラベル側に綿栓が残っていたら細いピンセットで摘み取る。
 - 3) ラベルと反対側の栓と精子液(白濁した溶液)の間の空気の部分をハサミで切り離す。



- ラベル側から吸上針(または太めの針金など)を挿入して、精子液だけを、温めたディッシュの蓋に押し出す。

- 前培養用ディッシュの培養液の中に、ピペッターを用いて精子液を全量移し、インキュベータ内で40~60分間培養する。



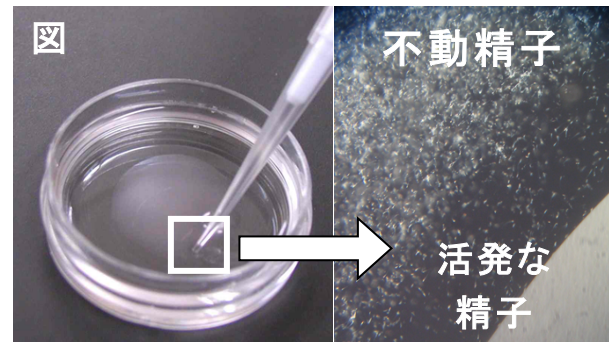
3. 採卵

過排卵誘起処理を行った雌から採卵を行い、受精用ディッシュの各小滴あたり雌 1 匹から得られた卵丘細胞と卵子の塊を導入する。30分~1時間このまま培養した後で媒精を行うと、受精率が高く安定する。

4. 媒精

- 精子の運動性と濃度および生存精子の比率を実体顕微鏡で確認する。

- 約2割以上の精子が生存している場合、ピペッターのチップで培養液の縁を周りながら、運動性の高い精子を約20 μ L 吸い取り、受精用の卵子の入った培養液の中に移し、インキュベータ内で培養する(図4)。
注意点: 精子の濃度や運動性が著しく低い場合や卵子数が40個を超える場合は、精子液を追加する。



- 媒精から約20分後に卵子の状態を確認して、精子が不足している場合には更に追加する。
注意点: 卵丘細胞が分離せずに、媒精時と変わらなければ、精子液を10~30 μ L 程度更に加える。

5. 受精卵の洗浄と受精判定

- 媒精から3~4時間後に、正常卵だけを培養用ディッシュに移しインキュベータ内で一晚培養する。
 - 受精用ディッシュの小滴ごとに卵丘細胞や形態的に異常な卵子を取り除き、正常と思われる卵子を新鮮な培養液に一度移した後、培養用ディッシュの各小滴内に移す。
 - 実体顕微鏡もしくは倒立顕微鏡下で正常卵子の形態を観察し、前核が3つ以上または中央に1つ大きな前核だけが見える卵子は異常卵子として除去する。
- 翌日、2細胞に分割した胚を受精卵と判定し、膈栓を付けた日の偽妊娠雌の卵管内へ移植する。
 - 移植は片側の卵管ごとに6-10個を基準とし、複数の偽妊娠雌を用いる。
 - 移植した日から19日後が分娩予定となり、昼までに分娩しない場合には帝王切開で胎仔を取り出すと良い。その場合には、分娩直後~2日経過後の里親を使用する。

上記プロトコールについては長谷川らの論文をご参考にしてください(J. Reprod. Dev. 2014; 60: 187-193.)

参考資料 Composition of media for IVF and embryo culture

	mHTF		PVA- mHTF#	mCZB	KSOM/aa##
	mM	mg /100 ml	mg /100 ml	mg /100 ml	mg /100 ml
NaCl	101.6	581.7	581.7mg	476.5mg	555mg
KCl	4.7	35	35	35.8	18.6
KH ₂ PO ₄	0.4	5	5	16.3	4.8
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2	5	5	29.6	5
NaHCO ₃	25	210	210	211	210
CaCl ₂ · 2H ₂ O	2	30	30	25	25.1
EDTA · 2Na	-	-	-	3.7	0.4
Polyvinyl alcohol	-	-	10	10	-
Phenol red (Na塩)	-	0.2	0.2	0.2	0.2
Glucose	2.8	50	50	100	3.6
Na pyruvate	0.3	3.6	3.6	3.5	2.2
Na lactate (60%シロップ ^o)	23.3	400μl	400μl	370μl	174μl
Glutamine	-	-	-	14.6	14.6
Hypotaurine	-	11	11	-	-
Penicillin G · K salt	-	10	10	6	6.3
Streptomycin sulfate	-	-	-	5	5
Bovine serum albumin	-	300	-	300	100

: Add 0.4 mM Methyl-β-cyclodextrin (MBCD) before use.

: Add the essential and non essential amino acids before use.

* MBCD (Methyl-β-cyclodextrin; Sigma C-4555-1g) の調整方法

(購入可能な FERTIUP 精子前培養液と濃度が異なります)

(1) 50 mM MBCD を調整する。

MBCD を 66.7mg 秤量し、蒸留水 1mL に加える。

(2) 0.4 mM MBCD を含む精子前培養液を調整する。

使用当日に、(1)で調整した 50 mM MBCD を PVA-mHTF に 0.8% (v/v)加えて精子前培養液とする。

例) 1mL 必要な場合には、PVA-mHTF 992 μL に 50 mM MBCD 8 μL を加える。

** GSH (Glutathione; Sigma G6013-5G) の調整方法

(購入可能な CARD MEDIUM 体外受精用培地をご利用いただけます)

(1) 25 mM GSH を調整する。(25 mM GSH: 7.683 mg/mL = 1 mg/130 μL)

GSH を 3mg 前後 秤量し、1.0 mg あたり mHTF を 130 μL 加える。

(2) 1.25 mM GSH を含む受精用培養液を調整する。

使用当日に、(1)で調整した 25 mM GSH を mHTF で 20 倍希釈して受精用培養液とする。

例) 500 μ L 必要な場合には、mHTF 475 μ L に 25 mM GSH 25 μ L を加える。