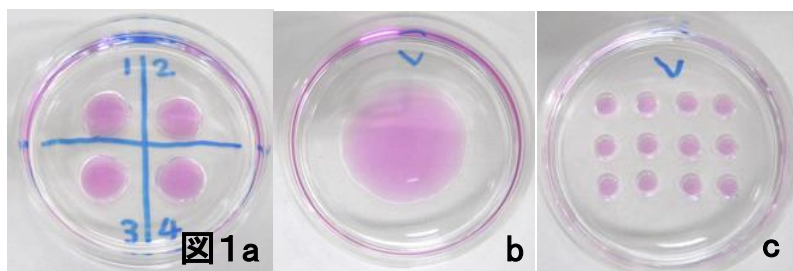


マウス凍結精子を用いた体外受精

注意:本プロトコールによる、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:熊本大学、発明者:中潟 直巳、竹尾透)の技術が含まれています。利用者が、この方法を「実施」(特許法上の実施と同義)する場合には、特許権者(熊大)の実施許諾(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 TEL:096-342-3209, FAX:096-342-3239)又は、特許権者からかかる技術を用いた製品を販売することに付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が求められています。

1. 培養用ディッシュの準備

各種培養用ディッシュを以下の要領で作製し、20 分間以上インキュベータ(37°C、5%CO₂ in air)内で平衡させてから使用する。



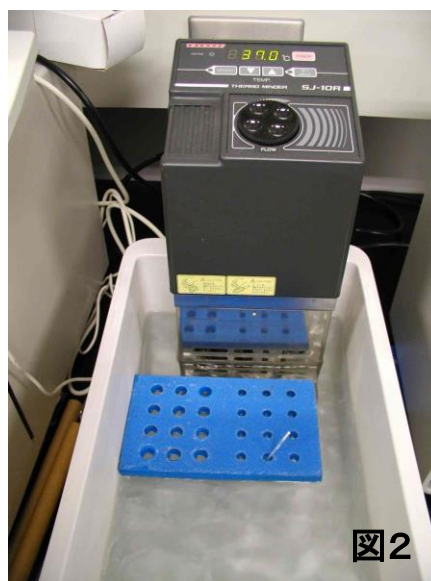
- (1) 卵子採取および受精用ディッシュ: 80 μ L の 1.25 mM glutathione (GSH)を含む mHTF(参考資料*)を 35 mm ディッシュに 4 カ所(雌 4 匹分/枚)滴下して、約 3.3 mL のミネラルオイルを上から静かに注ぎ、培養液が完全に覆われるのを確認する(図 1a)。
- (2) 精子前培養用ディッシュ: 300 μ L の 0.4 mM Methyl- β -cyclodextrin (MBCD)を含む PVA-mHTF(参考資料**)を 35 mm ディッシュに載せてから、ピペットチップの先端で辺縁部を平たく伸ばし、直径約 15 mm に広げる。(1)と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、(1)と同様にミネラルオイルで覆う(図 1c)。

2. 採卵

過排卵誘起処理を行った雌から hCG 投与後 15~17 時間以内に採卵を行い、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 時間以上培養した後に媒精を行うと、受精率が高く安定する。

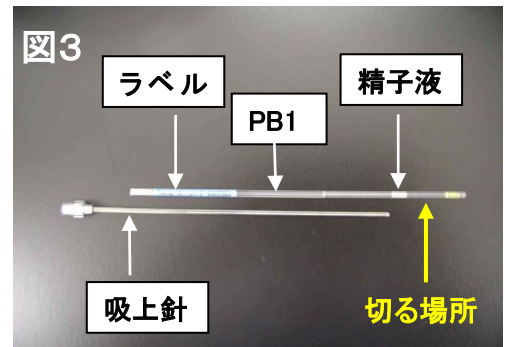
3. 凍結精子の回収と前培養

- (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、空気中で約 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けて、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。
- 4) 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ゆっくり押し出す。



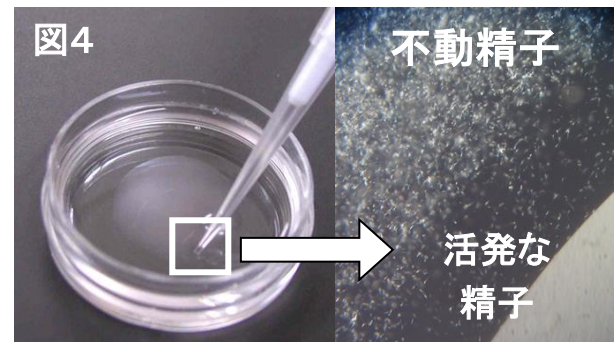
(3) 精子前培養用ディッシュの培養液の中に、ピペッターを用いて精子液を全量(約 10 μ L) 移し、インキュベータ内で 40~50 分間培養する。

4. 媒精

(1) 精子の活性と濃度および運動精子率を実体顕微鏡で確認し記録する。

(2) 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 15 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。



(3) 媒精から約 15 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 10~20 μ L 程度更に加える。

5. 受精卵の洗浄と受精判定

(1) 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晩培養する。

- 1) まず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の小滴に一度移した後、培養用ディッシュの各小滴内に移す。
- 2) 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(多精子受精卵)または中央に 1 つ大きな前核だけ(単為発生卵)が見える卵子は異常卵子として除去する。

(2) 翌日、2 細胞に分割した胚を受精卵と判定し、膣栓を付けた日の偽妊娠雌の卵管内へ移植する。

- 1) 移植は片側の卵管ごとに 6-10 個を基準とし、極力、複数の偽妊娠雌を用いる。
- 2) 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.)

プロトコール問合せ先: バイオリソース研究センター、持田 (keiji.mochida@riken.jp)

参考資料

Reagents	Campanies	Cat #	Size	mHTF		PVA-HTF*	mCZB	KSOM**
				mM	mg /100 ml	mg /100 ml	mg /100 ml	mg /100 ml
NaCl	FUJIFILM Wako Chemicals	191-01665	500 g	101.6	581.7	581.7 mg	476.5 mg	555 mg
KCl	FUJIFILM Wako Chemicals	163-03545	500 g	4.7	35	35	35.8	18.6
KH ₂ PO ₄	FUJIFILM Wako Chemicals	169-04245	500 g	0.4	5	5	16.3	4.8
MgSO ₄ · 7H ₂ O	FUJIFILM Wako Chemicals	131-00405	500 g	0.2	5	5	29.6	5
NaHCO ₃	FUJIFILM Wako Chemicals	191-01305	500 g	25	210	210	211	210
CaCl ₂ · 2H ₂ O	FUJIFILM Wako Chemicals	033-25035	500 g	2	30	30	25	25.1
EDTA · 2Na	FUJIFILM Wako Chemicals	343-01861	50 g	-	-	-	3.7	0.4
Polyvinyl alcohol	Sigma-Aldrich	P8136	250 g	-	-	10	10	-
Phenol red sodium salt	Sigma-Aldrich	P4758	5 g	-	0.2	0.2	0.2	0.2
Glucose	FUJIFILM Wako Chemicals	049-31165	500 g	2.8	50	50	100	3.6
Na pyruvate	Sigma-Aldrich	P8574	5 g	0.3	3.6	3.6	3.5	2.2
Sodium DL-lactate (60% sylup)	Sigma-Aldrich	L7900	100 mL	23.3	400 μl	400 μl	370 μl	174 μl
L-Glutamine reduced	Sigma-Aldrich	G6013	5 g	-	-	-	14.6	14.6
Hypotaurine	Sigma-Aldrich	H1384	250 mg	-	11	11	-	-
Penicillin G · K salt	Sigma-Aldrich	P7794	1 MU	-	10	10	6	6.3
Streptomycin sulfate	FUJIFILM Wako Chemicals	196-08511	5 g	-	-	-	5	5
Albumin, Bovine Serum,	Merck Millipore	12657	25 g	-	300	-	300	100

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

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

* 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 μL を調整する場合には、mHTF 475 μL に 25 mM GSH 25 μL を加える。

** 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 を調整する場合には、PVA-mHTF 992 μL に 50 mM MBCD 8 μL を加える。