

# マウス凍結受精卵供与に関する諸問題について

○矢野久美子、大矢康貴、小木曾昇

部局系技術支援室 医学技術系 第1医学系

## 概要

発生工学技術のめざましい進歩により様々な遺伝子組換え動物が作製され医学研究をはじめとして多くのバイオサイエンス研究分野で利用されている。作製された動物は国内外を問わず他研究機関への授受が行なわれ、その数は近年顕著に増加している。それらの動物は、特に米国において微生物培養検査が実施されていない等、施設のモニタリング検査項目が供与先と適合しないことや、病原性微生物（ウイルス、微生物、寄生虫）に感染している例がある。それらの問題を解決すべく2006年7月より発生工学技術を利用した病原性微生物除去（クリーン化）、系統保存（受精卵凍結）を実験動物部門の技術支援業務として開始した。現在ではこれらの業務に加え、体外受精を利用した個体作製（例、計画的な動物生産、繁殖障害を伴う系統維持・生産）や凍結受精卵供与（または購入）による融解・移植の依頼が年々増加している。しかし、凍結受精卵供与では供与機関により凍結法が異なることや受精卵の生存性にばらつきが見られるなどの問題点が発見された。そこで、今回凍結受精卵供与に関する問題点と現在までの技術支援状況について報告する。

## 1 受精卵の実験操作（凍結・融解から移植）

### 1.1 供与受精卵

2006年～2008年までに、8研究機関から供与された20系統の凍結受精卵を融解・移植し、その成績について考察を行なった。

### 1.2 受精卵融解方法

凍結受精卵の融解については、供与先の融解方法（緩慢法、ガラス化法）に従って行った。例えば、簡易ガラス化法は、1997年に中尾、中潟らが開発した方法と修正された方法がある<sup>[1][2]</sup>。当部門では、修正簡易ガラス化法を行っている（図1）。具体的には、凍結時のDAP213溶液の添加量が90 $\mu$ lから45 $\mu$ l、融解時の液体窒素からの室温放置時間が90-120秒から30秒に改良されている。供与（購入）された緩慢法、簡易ガラス化法による凍結受精卵を融解し、受精卵の回収数（回収率）、形態的生存数（生存率）を比較した。

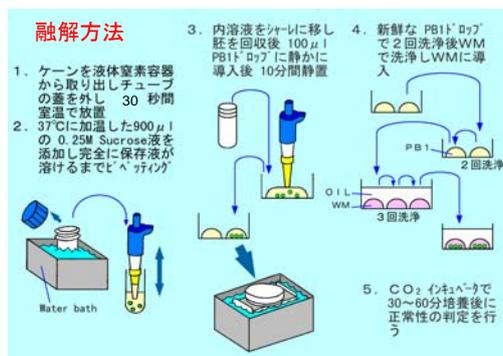


図1. マウス凍結受精卵の融解

### 1.3 受精卵移植

レシピエント（偽妊娠）として、精管結紮雄マウス（Jcl:MCH）と一晚同居後、膣栓が確認された雌マウス（Jcl:MCH）を使用した。マウスをネブプタール麻酔処置し、卵管に受精卵（2細胞期胚）を移植した。各々の方法による出産数（出産率）を比較した。

## 2 結果

受精卵はすべて2細胞期で凍結保存されていたが、その凍結方法は機関により異なっていた。また、凍結受精卵の保存容器も機関により異なるものが使用されていた。以下（表1.）に4種類の凍結・融解方法による凍結受精卵の融解・移植結果についてまとめた。

表1. 凍結受精卵の異なる方法による融解・移植結果

| 凍結・融解方法    | 件数 | 凍結受精卵数 | 回収総数 | 回収率      | 受精卵生存総数 | 生存率       | 出産総匹数 | 出産率       |
|------------|----|--------|------|----------|---------|-----------|-------|-----------|
| 緩慢法        | 3  | 110    | 101  | 93.4±4.7 | 91      | 90.2±7.1  | 24    | 24.2±10.4 |
| 修正緩慢法      | 3  | 102    | 102  | 100.0    | 62      | 61.3±11.4 | 9     | 13.8±6.2  |
| 簡易ガラス化法    | 8  | 597    | 585  | 97.9±3.4 | 546     | 93.0±12.5 | 238   | 45.1±6.2  |
| 修正簡易ガラス化法  | 7  | 466    | 446  | 96.0±5.3 | 375     | 83.9±10.5 | 142   | 36.8±6.5  |
| 修正簡易ガラス化法* | 1  | 50     | 48   | 96.0     | 42      | 87.5      | 24    | 57.1      |

\*異種チューブ

## 3 凍結受精卵供与の問題点

### 3.1 凍結融解法

マウス受精卵の凍結融解方法は、①緩慢凍結融解法、②修正緩慢凍結融解法、③ガラス化法（簡易ガラス化法）がある。①と②では、プログラムフリーザーを用い、長時間を要して緩慢に凍結（1.5-2.5時間）と融解（約20分）を行う方法である。それに対して③は、氷水中（またはブロッククーラー）で短時間（15分程度）に凍結でき、融解（約30-120秒）も簡便に行える方法である。凍結保存容器も異なり、①ではストローが、②、③ではチューブが使用される。今回データをとった研究機関の多くは簡易ガラス化法で胚の凍結を行っていたのに対し、一部機関で緩慢法、修正緩慢法が使用されていた。今回の結果からは、修正緩慢法に比較し緩慢法、ガラス化法で保存された受精卵の生存率が良好である傾向が認められたが、系統の特性も考えられることから今後さらにデータの蓄積が必要であると考えられる。

### 3.2 凍結保存チューブ

簡易ガラス化法に定められた凍結保存チューブは、Cryotube nunc 366656（ヌンク社）、またはセラムチューブ MS-4501B（住友ベークライト社）である。供与されたチューブは、ほとんどが定法で定められたものを使用していたのに対し、定められていないメーカー名のチューブを使用している機関もあった。



図2. 凍結保存用チューブ（プロトコルに記載されていないチューブ）

### 3.3 凍結受精卵融解・移植

供与先の情報（例、凍結受精卵の融解回収率および生存率、出産率）が少ないまたは全くない。供与先の受精卵凍結技術のルーチン化または凍結受精卵授受を定期的に行っている場合は、受精卵の状態（自然交配または体外受精）、融解後の生存率や受精卵の培養状況を確認した基礎資料が作成されている。それに対して技術及び供与が不定期な供与先では、融解後の生存率や出産率について具体的数字は示されていない。

## 4 まとめ

凍結受精卵の融解・移植結果から、凍結方法の違いによる融解後の受精卵回収率に差は見られなかった。しかし、回収された受精卵の生存率や移植後の出産率については、方法により結果にばらつきが認められた。その理由は特定できるものではないが、凍結・融解方法の違いや、凍結保存または融解操作における技術的問題、凍結保存チューブの問題（形状、材質、肉厚）が示唆された。凍結方法自体による違いや、使用するチューブによる熱伝導性の違いなどについては、今後、更なる検討が必要である。また、当部門における胚操作の精度を比較検討するうえでも、凍結受精卵の供与にあたり、供与先からの基礎情報（受精卵の状態、凍結受精卵の融解による生存性や培養状況または出産匹数、凍結チューブ等の使用器材）を事前に入手することが必須であると思われた。凍結受精卵供与は今後も増加することが予想され、さらにデータを蓄積することで、より適切な凍結・融解方法や系統による差異などを検討し、研究支援業務に反映していくことができるものと考えられる。

## 参考文献

- [1] Kazuki NAKAO et al, “Simple and efficient vitrification procedure for cryopreservation of mouse embryos”, *Exp. Anim.*, 1997, 46, 231-234.
- [2] 小木曾昇, 廣江猛, 山崎由起子 “ジーンターゲティングの最新技術, 別冊実験医学 ザ・プロトコールシリーズ”, 羊土社, 2000, 96-114.