

凍結用チューブによる胚生存率の比較

○大矢康貴、大矢久美子

医学系技術支援室 生物・生体技術系

概要

近年、医学・生物学の研究分野では、技術の進展により遺伝子組換えや突然変異マウス等有用なマウスが多数作出されている。これらマウスの利用拡大に伴い、マウスの精子と胚の凍結保存技術は不可欠なものとなっている。当部門でも 2006 年 7 月より技術支援業務の一つとして開始し、現在まで多くの系統を凍結保存している。胚の凍結保存後は、保存成績を確認するため保存した胚の一部を融解し、個体作出成績を確認して業務を終了としているが、一時期から胚を融解した際の融解生存率にばらつきが出てきた。原因を追究したところ、凍結用チューブの製造ロットによりチューブの底に汚れや傷のようなものが確認できたため、凍結用チューブの検討を行った。検討には従来から数年に渡り使用してきた凍結用チューブ（従来チューブ）のうち旧ロットと新ロットのもの、さらに最近新たに使用を開始した現行チューブを用い、それぞれにおける胚の融解後の生存率を比較したので報告する。

1 材料および方法

1.1 供試動物

体外受精には 12～24 週齢の C57BL/6J Jcl 雄マウスおよび 9 週齢の C57BL/6J Jcl 雌マウスを用いた。

1.2 胚の採取・体外受精、凍結-融解

体外受精は豊田らの方法に従った^[1]。精子は C57BL/6J Jcl 雄マウスの精巣上体尾部より採取し、HTF 培地に懸濁、1 時間の前培養を行った。一方、卵子は妊馬血清性腺刺激ホルモン（PMSG）とヒト絨毛性腺刺激ホルモン（hCG）により過排卵処理を施した C57BL/6J Jcl 雌マウスの卵管膨大部より採取、HTF 培地中に導入した。体外受精は精子前培養後、最終精子濃度が 150 精子/ μ l となるように精子懸濁液を、卵子を含む HTF 培地内に導入することにより行った。なお、受精の有無は、媒精後 6～7 時間に倒立顕微鏡下で観察を行い、2 前核が認められた卵子を受精卵と判定した。

媒精 24 時間後に得られた 2 細胞期胚の凍結保存は簡易ガラス化法に従った^[2]。すなわち、まず 2 細胞期に発生した胚を室温にて 1M DMSO のドロップ（100 μ l）へ移し、胚を均等に小分けした（通常、1 ドロップに 40 個）。さらに新しい 1M DMSO のドロップへ移し、5 μ l の 1M DMSO 溶液と共に胚をチューブへ移し、あらかじめ 0 $^{\circ}$ C にしておいた冷却装置（CHILL HEAT:CHT-100 IWAKI）に移した。5 分後、0 $^{\circ}$ C に冷やしておいた凍結保存液 DAP213（2M dimethylsulphoxide, 1M acetamide, 3M propylene glycol in PB1）を 45 μ l 添加し、さらに 5 分後、チューブをケーンに装着し、直ちに液体窒素中に浸漬した。凍結胚の融解は、チューブを液体窒素保管器から取出し、速やかに中の液体窒素を捨て、室温で約 30 秒放置した。次にあらかじめ 37 $^{\circ}$ C に加温しておいた 900 μ l の 0.25 M sucrose 溶液をチューブ内に添加し、完全に保存液が溶けるまで素早くピペティングし、内容液をシャーレに移し、さらに 400～500 μ l の 0.25 M sucrose 溶液でチューブ内を共洗いし、胚を回収した。回収した胚は modified Whitten 培地（100 μ l）で洗浄し、胚の形態的な観察を行った。

1.3 供試胚、凍結用チューブ

体外受精した2細胞期胚を従来チューブ（新、旧ロット）と現行チューブで凍結したものを用いた。

1.4 融解試験

上記の各チューブで保存を行った凍結胚を一斉に融解し、融解後の胚回収数と正常2細胞期胚数を調べることによりチューブの種類が胚の生存に与える影響を検討した。

1.5 統計解析

得られた測定値は、Fisherの直接確率検定法を用いて有意水準5%で検定した。

2 結果

2.1 融解試験結果

従来チューブの新ロットで凍結保存を行った胚における融解後の回収数、正常2細胞期数は、現行チューブと従来チューブの旧ロットで保存した場合と比較して有意に減少することが明らかとなった（表.1）。

表.1 従来チューブと現行チューブで凍結保存した胚の生存率（%）

	凍結個数 ^a	回収数 ^b	正常2細胞期数 ^c
従来チューブ（新ロット）（n=10）	324	265（81.8）	227（70.1）
従来チューブ（旧ロット）（n=6）	235	232（98.7）	221（94.0）
現行チューブ（n=10）	340	338（99.4）	321（94.4）

回収率(%)=b/a×100

正常2細胞期率(%)=c/a×100

3 まとめ

凍結保存に用いる工業製品は均一な製品であり、品質も安定していると考えていたが必ずしもそうではなく、ロットによって品質にばらつきがあることが明らかとなった。特に今回比較を行った従来チューブの旧ロットと新ロットでは、チューブが半透明から透明になり見た目から明らかな変化があった。その他にもチューブの底の汚れや傷なども融解生存率に影響を与える可能性が考えられた。チューブの品質のうち、どの要因が胚の融解生存率に影響を与えるのかは不明であるが、凍結用チューブを変更することで従来通りの融解成績が得られるようになった。

参考文献

- [1] 豊田裕 et al, “マウス卵子の体外受精に関する研究”, 家畜繁殖研究会誌, 1971, 16,147-151.
- [2] Kazuki NAKAO et al, “Simple and efficient vitrification procedure for cryopreservation of mouse embryos”, *Exp. Anim.*, 1997, 46, 231-234.