

CARD FERTIUP[®]を用いた マウス精子の融解と体外受精

熊本大学 CARD 中瀬研究室



凍結保存の手順

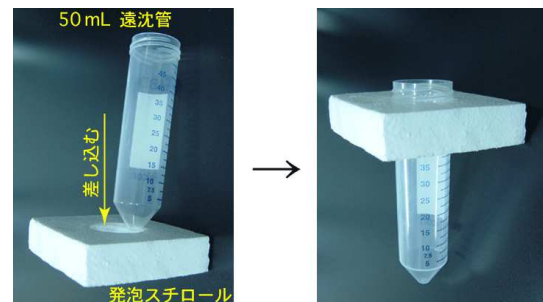
—準備器材など—

- 1 過排卵処理した雌マウス
- 2 CARD FERTIUP[®]マウス精子前培養培地 (九動株式会社 fertiup@kyudo.co.jp)
- 3 CARD MEDIUM[®] (九動株式会社 fertiup@kyudo.co.jp)
- 4 CARD mHTF
- 5 チップ (Pipette Tip Cat.No.114 Quality Scientific Plastics)
- 6 ディッシュ (コーニング 35mm X 10mm Cat.No.430588)
- 7 ストロー操作用シリンジ
- 8 恒温水槽 (37°C)
- 9 精子融解用フロート
- 10 オートピペッター (GILSON PIPETMAN P-10 P-20)
- 11 CO2 インキュベーター (37°C 5% CO2 95% air)
- 12 ハサミ
- 13 キムタオル

—方法—

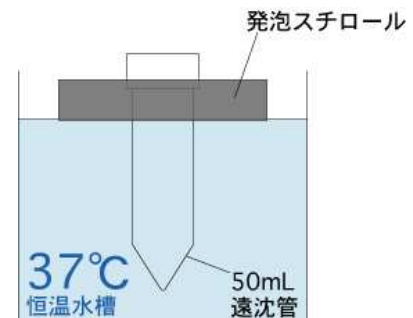
●精子融解用フロートの作製

- 1 50mL 遠沈管と発泡スチロールを右図のように組み合わせ、精子融解に用いるフロートを作製する。



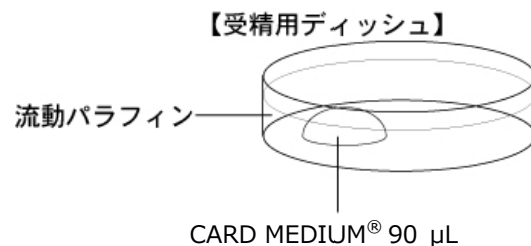
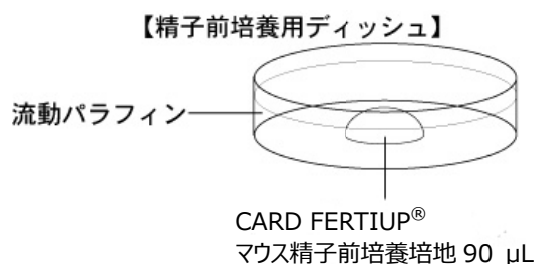
●融解前の準備

- 1 恒温水槽を準備する (37°C)。
- 2 精子融解用フロートの中に 37°C の温水を満たし、恒温水槽に、右図のように浮かべてセットする。
- 3 精子を融解する 30 分前に、下図 (左) のように精子前培養用ディッシュ (90μL の CARD FERTIUP[®]マウス精子前培養培地ドロップ 1 個) を作製し、インキュベーター内に静置しておく。
*CARD FERTIUP[®]マウス精子前培養培地は開封後、使い切るようにする。

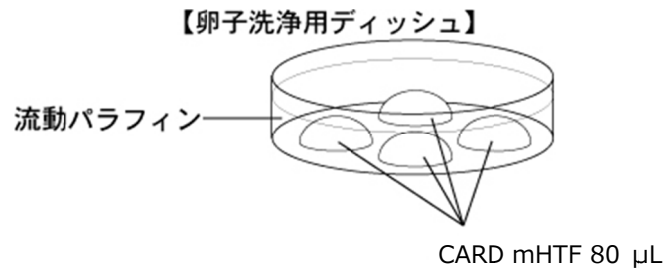


- 4 採卵 10 分前に、下図 (右) 受精用ディッシュ (90μL の CARD MEDIUM[®]ドロップ 1 個) を作製し、インキュベーター内に静置しておく。

* 体外受精にどのような精子を用いるかで、CARD MEDIUM[®]の調整方法が異なる。CARD MEDIUM[®]添付の取扱説明書を参照すること。

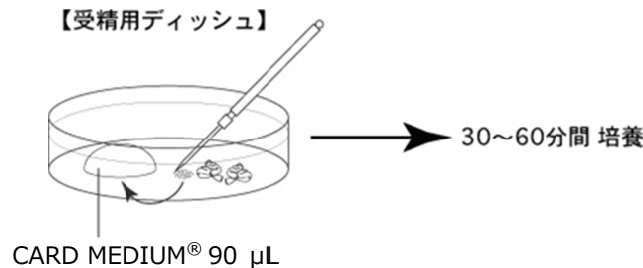


5 卵子洗浄用ディッシュ（80 μ L の CARD mHTF ドロップ 4 個）を作製し、インキュベーター内で 30 分以上静置しておく。



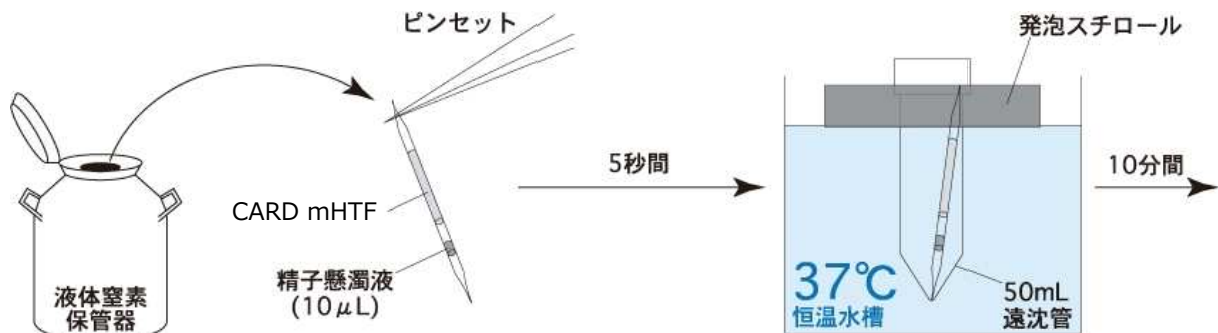
● 卵子の採取

- 1 過排卵処理を施した雌マウスを hCG 投与 15～17 時間後に安楽死させ、採卵した卵子塊を、受精用ディッシュの CARD MEDIUM[®] ドロップに導入する（1 ドロップあたり 2～3 匹分の卵子塊）。
 - * 安楽死から、卵管を採取・卵子塊を受精用 CARD MEDIUM[®] ドロップに導入するまでの操作は、極力短時間で行う（30 秒以内）。
 - ** 1 人で行う場合は、一度に複数の雌を安楽死させるのではなく、1 匹ずつ安楽死させ、すばやく採卵する。
- 2 採卵後、受精用ディッシュを CO₂ インキュベーター内に静置し、30～60 分間培養する。



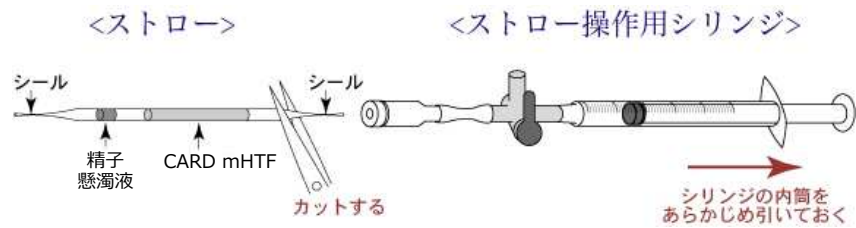
● 精子の融解

- 1 ピンセットを用いて、液体窒素保管器からストローを取り出し、空気中で 5 秒間保持し、37 $^{\circ}$ C 恒温水槽中のフロート内に素早く移し、10 分間加温する。
 - ポイント：**確実に 37 $^{\circ}$ C で加温するために、凍結精子の部分を下方向に向けて、ストローを精子融解用フロートへ入れる。
 - ポイント：**凍結・融解したマウス精子は、おかれている周囲の環境の変化に弱いので、精子が動き出す前に粘性が高い精子保存液から粘性の低い培地（CARD FERTIUP[®] マウス精子前培養培地）に移すと、融解後の運動性が十分に回復しない。融解したマウス精子は、5 分以上 37 $^{\circ}$ C で加温すると動き出すため、必ずストローを 10 分間 37 $^{\circ}$ C の温水中に静置した後、精子懸濁液を前培養用培地（CARD FERTIUP[®] マウス精子前培養培地）に移す。
- 2 加温後、ストローを 37 $^{\circ}$ C 恒温水槽中から取りだし、ストロー表面の水分をキムタオルでふき取る。

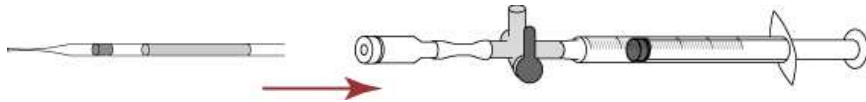


●精子懸濁液の取り出しと前培養

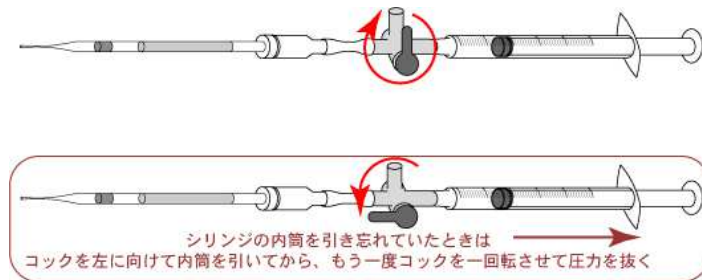
- 1 ストロ-の CARD mHTF とシール部分の間をカットする（ストロ-操作用シリンジの内筒を、あらかじめ引いておく）。



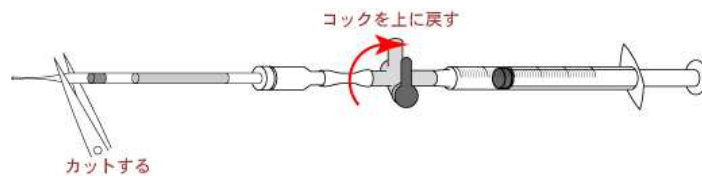
- 2 カットしたストロ-を、ストロ-操作用シリンジに差し込む。



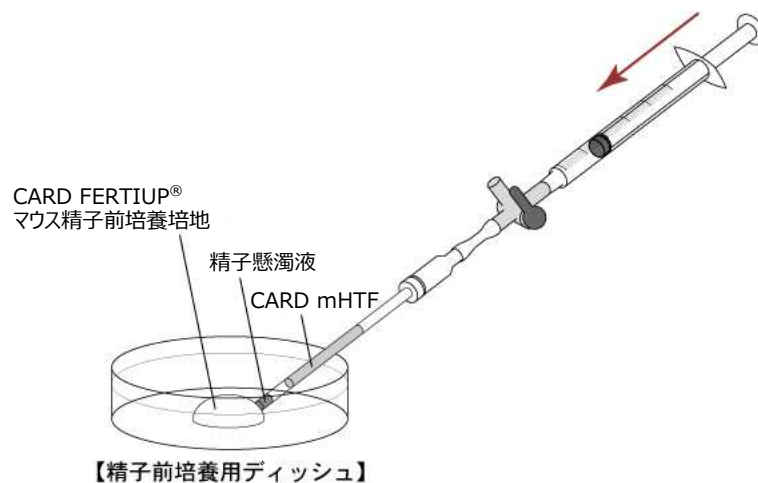
- 3 ストロ-をストロ-操作用シリンジに差し込むと、ストロ-内の圧力が高くなるので、その圧力を抜くため、三方活栓のコックを一回転させる。



- 4 コックを上に戻し、精子懸濁液とシール部分の間をカットする。



- 5 シリンジの内筒をゆっくり押し、精子懸濁液のみを精子前培養用ディッシュのドロップに導入する。

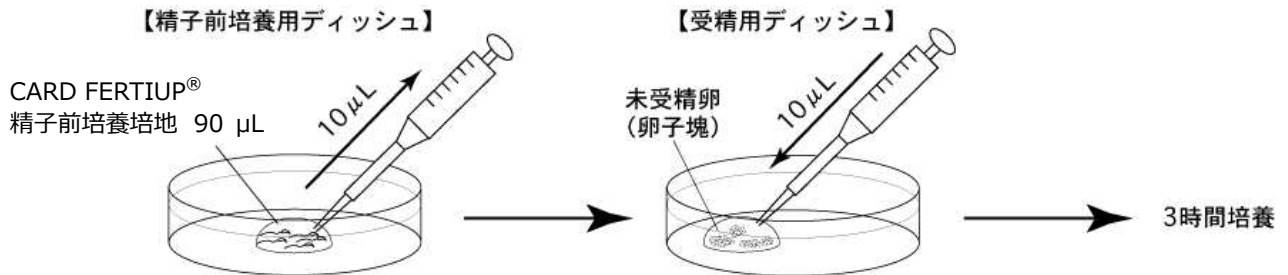


- 6 5の精子前培養用ディッシュをインキュベーターに入れ、30分間前培養を行う。

ポイント：精子が前培養培地へ十分に泳ぎ出すまで、精子前培養用ディッシュは、インキュベーター内へ入れて静置しておく。精子が十分動き出す前にディッシュを揺すったりすると、精子の運動性が回復しない場合があるので、注意する。

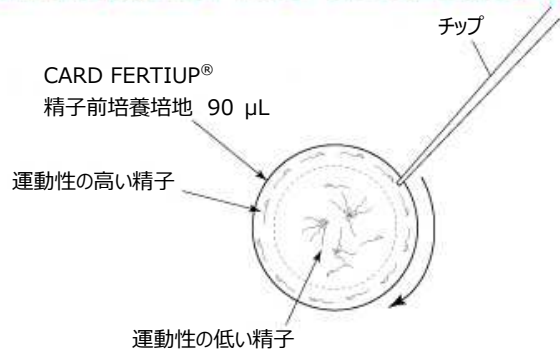
● 媒精

- 1 チップ (Pipette Tip Cat.No.114 Quality Scientific Plastics) を用いて、前培養した精子懸濁液 10 μ L を吸引し、卵子を含む受精用ディッシュの CARD MEDIUM[®] ドロップに添加する (媒精)。
- 2 媒精が終了した受精用ディッシュをインキュベーター内にもどして培養する。



- ポイント：** 媒精に用いる精子懸濁液は、良好な精子が集まる前培養液ドロップの辺縁から採取する (下図参照)。
- ポイント：** 精子懸濁液の採取は、1 ドロップから 3 ~ 4 回の実施が可能である。
- ポイント：** 精子懸濁液を卵子塊に吹きかけるように、受精用ディッシュのドロップに添加する。

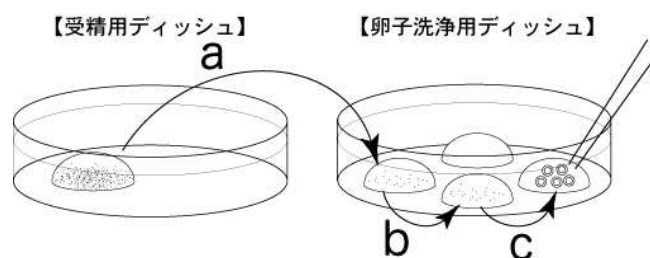
【精子前培養用のドロップを真上から見た図】



【精子前培養用ディッシュを真横から見た図】

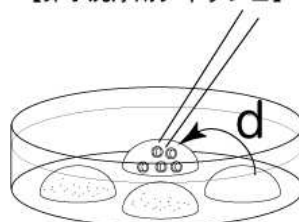


- 3 媒精から 3 時間後、形態的に正常な卵子のみを卵子洗浄用ディッシュの CARD mHTF ドロップ (a→b→c) で洗浄する。
 - * 洗浄時に透明帯表面に多数の精子が付着している場合は、チップを装着したオートピペッター (20 μ L) を用いて、受精用ディッシュ内の CARD MEDIUM[®] ドロップを 20 ~ 30 回ピペティングした後、卵子の洗浄を行う。
 - * * 洗浄の際は、極力、CARD MEDIUM[®] を卵子洗浄用ディッシュのドロップに持ち込まないように注意する。



- 4 媒精から約 6 時間後、卵子をよく観察し、単為発生卵と判定されたもの (卵細胞質内に 1 つの前核のみが認められるもの) を取り除き、翌日まで培養する。
- 5 翌日、卵子洗浄用ディッシュの残りのドロップに 2 細胞期へ発生した胚のみを移し (d)、胚数をカウント後、移植あるいは凍結保存に用いる。

【卵子洗浄用ディッシュ】



マウス生殖工学技術マニュアル

マウス生殖工学技術の詳細については、以下をご参照ください。

国立大学法人熊本大学 生命資源研究・支援センター (CARD) 資源開発分野 Web サイト
<http://card.medic.kumamoto-u.ac.jp/card/japanese/manual/index.html>

参考文献

- 1) Takeo T, Hoshii T, Kondo Y, Toyodome H, Arima H, Yamamura K, Irie T, and Nakagata N, Methyl-beta-cyclodextrin improves fertilizing ability of C57BL/6 mouse sperm after freezing and thawing by facilitating cholesterol efflux from the cells. *Biol Reprod.* 2008, 78(3):546-51.
- 2) Takeo T, and Nakagata N, Combination medium of cryoprotective agents containing L-glutamine and methyl- β -cyclodextrin in a preincubation medium yields a high fertilization rate for cryopreserved C57BL/6J mouse sperm. *Lab Anim.* 2010, 44(2):132-7.

参考文献

CARD FERTIUP[®]および CARD MEDIUM[®]は研究利用のみを対象としており、診断・治療目的には使用できません。

【製造・販売】



九動株式会社

KYUDO CO.,LTD.

〒841-0075 佐賀県鳥栖市立石町惣楽 883-1

TEL : 0942-82-6519 FAX : 0942-85-3175

E-mail : fertiup@kyudo.co.jp