

凍結胚を用いた受容雌としてのマウスの評価

○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

近年、発生工学分野において、一般的に胚の移植用受容雌には多産系で哺育の良好な ICR 系が汎用されている。しかし、限られた少数の凍結胚から産仔を作出する場合、1 匹の受容雌に全ての胚を移植するのは、その雌が妊娠しなかった場合を考えると極めて危険であり、さらに、妊娠しても産仔数が少ない場合には過熟仔となりやすく、死産や喰殺等の可能性が高くなる。そのため、融解した胚を少数に分けて、毛色の異なる系統の胚と混ぜて偽妊娠雌に移植することにより産仔を得られることが報告されている¹⁾。一方、受容雌に ICR 系ではなく近交系間の F1 交雑マウスを用いると、凍結・融解を介さない胚および、通常の移植胚数で良好な出産率が得られたとの報告^{2,3)}があるが、凍結胚を F1 交雑マウスに移植した報告はない。そこで、本研究では凍結胚の移植において、ICR 系よりも効率的な移植用受容雌の検索を行った。

1 材料および方法

1.1 供試動物

体外受精は 12 週齢～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。また、受容雌は ICR 系の Jcl:MCH、CD2F1/Crlj (BALB/cAnN×DBA/2N) および B6C3F1/Crlj (C57BL/6N×C3H/HeN) を用いた。

1.2 移植胚の作製

体外受精は豊田らの方法に従った⁴⁾。精子は遺伝子改変雄マウスの精巣上体尾部より採取し、HTF 培養液に懸濁、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成熟雌マウスの卵管膨大部より採取、HTF 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 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⁵⁾。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 0.9 ml 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、内容をシャーレに移し、さらに 0.4～0.5 ml 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 mWM 培養液 (100 μ l) で洗浄し、胚の形態的な観察を行った。

移植には偽妊娠第 1 日目の受容雌を用い、新鮮胚あるいは凍結胚を融解後、直ちに受容雌の卵管に移植、アイソレータ内で飼育した。胚移植は、経卵管壁卵管内移植法により行った。まず、ペントバルビタールナトリウムにて麻酔をした受容雌の側面中央の毛を刈り、腹壁を切開した後、卵巣・卵管・子宮を体外に露出させ、卵巣に付着した脂肪をクレンメで固定した。次に卵管采と膨大部を確認後、その間の卵管壁をカットし、卵管壁を細胞用マイクロピンセットで固定を行い、その開口部から胚を含むキャピラリーを膨大部側の卵管内に挿入し移植した。

1.3 精管結紮マウスと交配させた場合の膣栓の形成率（実験 I）

15 時以降に ICR 系、CDF1、B6C3F1 の外陰部を観察し、発情前期になっているマウスを選び出した。発情前期は色、湿り、腫脹の程度より分け、発情前期と選別した受容雌マウスはそれぞれ、精管結紮マウスと一晚同居させることで交配させた。翌日、膣栓の有無を確認することで交尾を判定し、膣栓の形成率（膣栓の付いた匹数／交配させた匹数）を算出した。

1.4 各マウスへ移植した場合の妊娠・産仔率（実験 II）

各マウスの偽妊娠マウスに融解した胚を片側 10 個、左右 5 個、左右 7 個、左右 10 個ずつの 4 種のパターンで移植した。これらの結果を各マウスの妊娠率、新生仔への産仔率、着床率と比較した。自然分娩しない場合は、出産予定日の午後（移植後 19 日目）に帝王切開し、着床数（胎仔数及び着床痕数）を計数した。同条件での結果を得るため、必ず同時期に作製した凍結胚を ICR 系、CDF1、B6C3F1 へ移植した。

1.5 各マウスの哺育能の算出方法および判定方法（実験 III）

妊娠出産後 1 日目で各マウス 1 匹当たりの哺育数を雄 3 匹、雌 3 匹の計 6 匹に調整し各マウスで哺育させ、これらの仔 6 匹の体重を 1 日、8 日、15 日、22 日齢の離乳期まで測定した。1 匹当たりの体重を算出し、仔を早く成長させることができるマウスを哺育能の高い受容雌と判定した。

1.6 統計解析

得られた測定値は、 χ^2 検定法、Fisher の直接確率検定法あるいは Student's t-test を用いて、それぞれ有意水準 5% で検定した。

2 結果

2.1 膣栓の形成率（実験 I）

膣栓の形成率を表 1 に示した。ICR 系の形成率は CDF1、B6C3F1 に比べ高値を示す傾向であったが、各マウス間に有意差は認められなかった。

表.1 膣栓の形成率成績

| 受容雌マウス | 交配させた匹数 ^a | 膣栓のついた匹数 ^b |
|--------|----------------------|-----------------------|
| ICR 系 | 36 | 25 (69.4) |
| CDF1 | 38 | 20 (52.6) |
| B6C3F1 | 45 | 22 (48.9) |

$$\text{形成率 (\%)} = \text{b} / \text{a} \times 100$$

2.2 各マウスの移植成績（実験Ⅱ）

表 2.に平均妊娠率および平均産仔数を示した。片側 10 個のパターンで移植した ICR 系の平均妊娠率は、CDF1 に比べ高値を示す傾向であったが、各マウス間に有意差は認められなかった。4 種のパターンで移植をした時の平均産仔数は、ICR 系が全てのパターンで高い傾向を示し、その中でも、胚を 14 個（左右 7 個）移植した時の平均産仔数は、その他のパターンと比べて高値を示す傾向であったが、各マウス間に有意差は認められなかった。

表.2 各マウスの移植成績

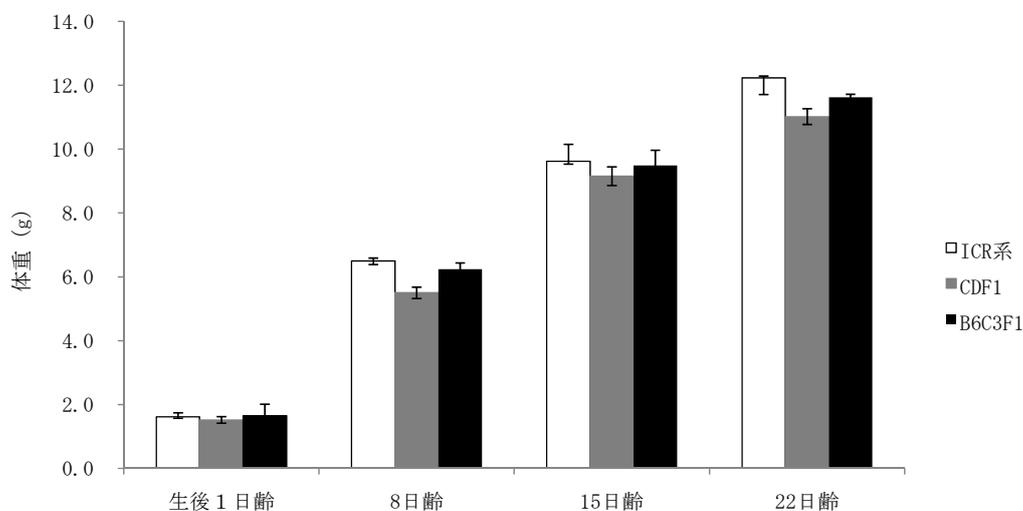
| 受容雌マウス | 移植胚数 | 平均産仔数 (%) | 移植した受容雌数 ^a | 妊娠した受容雌数 ^b (%) |
|--------|-------|------------|-----------------------|---------------------------|
| ICR 系 | 10 | 5.5 (55.0) | 4 | 4 (100) |
| CDF1 | 10 | 4.0 (40.0) | 5 | 3 (60.0) |
| B6C3F1 | 10 | 5.3 (52.5) | 4 | 4 (100) |
| ICR 系 | 14 | 9.3 (66.1) | 5 | 5 (100) |
| CDF1 | 14 | 8.8 (62.5) | 4 | 4 (100) |
| B6C3F1 | 14 | 7.5 (53.6) | 4 | 4 (100) |
| ICR 系 | 20 | 9.2 (46.0) | 5 | 5 (100) |
| CDF1 | 20 | 8.7 (43.3) | 4 | 3 (80.0) |
| B6C3F1 | 20 | 8.8 (43.8) | 4 | 4 (100) |
| ICR 系 | 片側 10 | 5.8 (57.5) | 4 | 4 (100) |
| CDF1 | 片側 10 | 2.5 (25.0) | 7 | 2 (28.6) |
| B6C3F1 | 片側 10 | 3.5 (35.0) | 4 | 4 (100) |

移植した受容雌の妊娠率(%) = a / b × 100

2.3 各マウスの哺育能（実験Ⅲ）

1 匹当たりの体重を表 3.に示した。ICR 系に哺育された仔の 1 匹当たりの平均体重は、CDF1、B6C3F1 に比べすべての日齢で高値を示す傾向であったが、各マウス間に有意差は認められなかった。

表.3 各マウスにおける哺育能の成績



3 まとめ

実験Ⅰ（膈栓形成率）、実験Ⅱ（妊娠率、産仔率など）、実験Ⅲ（哺育能）のいずれの項目においても、ICR系とCDF1、B6C3F1の間に有意差は認められなかった。寧ろ、ICR系はCDF1、B6C3F1に比べ、実験Ⅰ～Ⅲにおいて高値を示す傾向があり、CDF1やB6C3F1はICR系よりも受容雌として効率が良いとは言えなかった。一方、凍結胚ではなく新鮮胚を用いた同様の実験では、BDF1マウスはICR系に比べ受容雌として効率が良いと報告⁶⁾されており、我々の結果とは多少異なる傾向であったが、その原因は不明である。今後は、各マウスの例数を増やすと同時にddY系等の他のマウス系統についても移植用受容雌として適性を検討してみたい。

本研究は科学研究補助金・奨励研究（課題番号；19924002）によって支援、遂行しました。

参考文献

- [1] 川野佳代,山村綾子,小川真美,香山敬志,中島竜之,西川尊樹,三小田伸之,金子武人,中瀬直己（2001）:少数胚からの効率的な産子の作出法に関する研究.第48回日本実験動物学会講演要旨集,B-05,145.
- [2] 矢川沙知,中尾和貴,金子有紀,木佐美智子（2005）:受精卵を移植したBDF1マウスの分娩及び哺育率の検討.第39回日本実験動物技術者協会総会講演要旨集,A-23,90.
- [3] 木佐美智子,中尾和貴,金子有紀,矢川沙知（2005）:胚移植レシピエントマウスとしてのBDF1の検討.第39回日本実験動物技術者協会総会講演要旨集,A-23,91.
- [4] 豊田裕,横山峯介,星冬四郎（1971）:マウス卵子の体外受精に関する研究.家畜繁殖研究会誌,16,147-151
- [5] Kazuki NAKAO, Naomi NAKAGATA and Motoya KATSUKI（1997）:Simple and efficient vitrification procedure for cryopreservation of mouse embryos. *Exp. Anim.*,46（3）, 231-234.
- [6] 金子有紀,中尾和貴,木佐美智子,矢川沙知（2005）:レシピエントにおけるICRとBDF1の比較.第39回日本実験動物技術者協会総会講演要旨集,A-23,90.