

# 中部大学 実験動物教育研究センターにおける マウス生殖工学業務について

長原 美樹（中部大学 実験動物教育研究センター）

NAGAHARA Miki : Mouse reproductive engineering services at Chubu University

## 【はじめに】

本学の実験動物教育研究センターは 2006 年から稼働しており、飼育動物種はマウスとラットである。2016 年よりマウスの生殖工学技術による利用者支援業務を立ち上げた。当初はセンター内にて飼育されている遺伝子組換えマウス系統のバックアップ（系統保存、飼育スペースの節約など）を目的とした精子の凍結保存から開始した。その後は、体外受精、胚凍結、胚移植、外部機関より導入した凍結精子・凍結胚からの個体化、センター内の繁殖の悪い遺伝子組換えマウス系統の体外受精による個体化支援、受精率の確認なども依頼を受け実施している。今回、業務を立ち上げた 2016 年から 2023 年 12 月までの実績について報告する。

## 【使用試薬および操作手順】

### 1、使用試薬等（全て九動株式会社から購入、試薬名の CARD は省略）（図 2）

- ・精子凍結保存：FERTIUP マウス精子凍結保存液
- ・胚凍結保存：1M DMSO、DAP213
- ・凍結胚融解・胚移植：0.25M Sucrose、KSOM
- ・過排卵処理：HyperOva®(または PMSG)、hCG
- ・体外受精：mHTF または CARD MEDIUM®、FERTIUP マウス精子前培養培地

### 2、操作手順：マウス生殖工学技術マニュアル<sup>1)</sup>に準拠

#### 1) 体外受精、胚凍結、胚移植

- ・体外受精前日に培地を準備し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内でガス平衡させる。
- ・雌マウス過排卵処理；採卵 3 日前と 1 日前にホルモン投与（18 時）。
- ・体外受精；雄マウスから採精し前培養約 60 分、雌マウスから採卵、媒精する。
- ・3 時間以降後、受精卵を Wash する。
- ・前核期胚は媒精から 6 時間以降後に選別、胚凍結または実験に使用する。2 細胞期胚は受精翌日に卵管より移植する。胚凍結する場合は簡易ガラス法に

て凍結保存する。

- ・胚移植は、2 細胞期胚を偽妊娠雌マウスの卵管から移植する。
- 2) 精子凍結：採精し精子凍結保存液に懸濁後 10 $\mu$ L ずつストローに充填、1 系統につき約 10 本保存する。B6 マウス系統の前核期胚作製等では CARDmHTF を使用、遺伝子組換えマウス系統の依頼では、依頼者から特に指定がなければ FERTIUP マウス精子前培養培地・CARD MEDIUM®キットを使用。

## 【利用者からの依頼】

- ・精子凍結保存、体外受精、胚凍結保存、胚移植
- ・外部機関からの導入（凍結精子・凍結胚からの個体化）、繁殖の悪い系統や受精率確認のための体外受精・胚凍結
- ・実験に使用する前核期胚の作製・凍結保存

## 【精子凍結保存】

	精子凍結回数	系統数
2016	41	23
2017	21	10
2018	23	14
2019	4	4
2020	10	7
2021	7	7
2022	2	2
2023	1	1

表 1：精子凍結回数

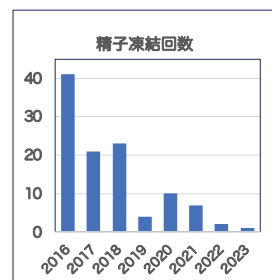


図 1：年毎の精子凍結回数

## 【胚凍結保存】

	胚凍結回数	前核期胚	2細胞期胚
2016	14	1	13
2017	21	8	13
2018	19	2	17
2019	11	2	9
2020	3	2	1
2021	12	6	6
2022	12	9	3
2023	28	9	19

表 2：胚凍結回数



図 2：九動(株)試薬

## 【胚移植】

	移植胚数	移植胚数	産仔数	産仔率(%) (産仔数/移植胚数)
2016	71	1274	217	17.0
2017	120	2258	364	16.1
2018	56	1211	187	15.4
2019	25	489	111	22.7
2020	0	0	0	0.0
2021	0	0	0	0.0
2022	9	161	23	14.3
2023	3	62	0	0.0

表 3：胚移植と産仔率

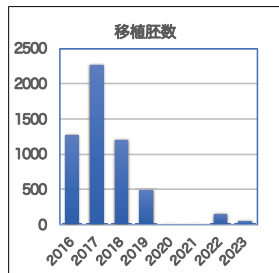


図 3：年毎の移植胚数

## 【外部機関からの導入】

系統	採卵総数	採卵正常	2Cell	受精率(%) (2Cell/正常)	移植胚数	産仔数	産仔率(%) (産仔数/移植胚数)
N KO系統1回目	328	262	44	16.8	44	18	40.9
N KO系統2回目	294	239	167	69.9	136	30	22.1
A1 KO系統	150	99	86	86.9	77	10	13.0
A7 KO系統	132	104	79	76.0	79	24	30.4
R Tg系統1回目	149	116	104	89.7	100	9	9.0
R Tg系統2回目	376	360	336	93.3	220	32	14.5
R KO系統	283	271	252	93.0	176	32	18.2
BA Tg系統	425	413	154	37.3	90	12	13.3
BB Tg系統	416	410	92	22.4	57	20	35.1
S Tg系統	342	305	275	90.2	72	30	41.7
B Tg系統	306	293	282	96.2	155	15	9.7
AC Tg系統	442	431	280	65.0	87	27	31.0

表 4：凍結精子の体外受精・胚移植

系統	凍結胚数	融解後胚数	正常胚数	移植胚数	産仔数	産仔率(%) (産仔数/移植胚数)
N KO系統	50	48	45	45	8	17.8
BT KO系統	30	30	30	30	8	26.7
AT KO系統	40	28	28	28	7	25.0
T Tg系統	40	40	32	32	0	0.0

表 5：外部機関から導入した凍結胚の移植結果

## 【繁殖の悪い系統の受精率確認】

- 2023 年度から依頼を受け、4 系統 13 回体外受精・胚凍結を実施した (mHTF 使用)。

## 【実験に使用する前核期胚の作製・凍結保存】

- B6 系統や依頼を受けた遺伝子組換えマウス系統について、定期的に体外受精をし前核期胚を凍結保存している (mHTF 使用)。

## 【結果】

- 2016 年の立ち上げから 2023 年までに、年々件数は減っているが、精子凍結保存は 109 本 68 系統、胚凍結保存は 120 回 (前核期胚 39 回、2 細胞期胚 81 回) 実施した (表 1, 2, 図 1)。
- 外部機関から遺伝子組換えマウス系統を、凍結精子 10 系統、凍結胚 4 系統導入しそれぞれ個体化した。試薬は原則 CARD MEDIUM®と FERTIUP マウス精子前培養培地のキットを使用し、受精率は 16.8～96.2%、胚移植後の産仔率は 0～40.9%であった (表 3, 4, 5, 図 3)。

- 作業は主に技術職員 1 名で実施しており、ゲノム編集マウスの作製依頼時には教員 1 名が加わる。また、卒業後に婦人科クリニックの胚培養士を目指す学生に対し希望があれば手技を指導し、胚操作業務と一緒に実施している。
- 胚操作業務を立ち上げた当初は、*in vitro* 電気穿孔法 (TAKE 法) でゲノム編集マウスを作製し、ほぼ全ての実験で胚移植が必須であった。しかし、数年前からは胚操作不要の *i-GONAD* 法が主流となり、作業の効率化が進んでいる (図 3)。
- 現在は実験用の前核期胚作製のための体外受精がメインとなっている。

## 【今後の課題】

- 現在、凍結サンプルの保管は液体窒素タンク 1 台 (35L) のみである。今まで不要なサンプルを廃棄するなどしてスペースを確保してきたが、保存サンプルが増え続けており、現在は保管スペースがほぼない状態である。保管タンクをもう 1 台増やすべきか検討中である。
- 液体窒素費用はセンター負担としているが、液体窒素の値上がり等の影響で受益者負担も考えている。
- 現在、胚移植をする機会がほとんどなく、今年度、外部機関から導入した遺伝子組換えマウス系統の凍結胚の移植 (1 件 40 個) では産仔が得られなかった (表 5)。技術を維持するためにも、定期的な移植練習が必要である。
- 胚操作を始めた頃はあまり気にならなかったが、最近、凍結胚融解後の正常胚の確率が 45～78.2% (全て前核期胚) と極めて低いため原因追求し改善が必要である。

## 【謝辞】

本報告をまとめるにあたりご指導いただきました、岩田悟講師ならびに常日頃から業務の補助をしてくださっているセンター職員の皆様方に深く感謝申し上げます。

## 【引用文献等】

- マウス生殖工学技術マニュアル(2013),中瀬直己,熊本大学 生命資源研究・支援センター,  
<http://card.medic.kumamoto-u.ac.jp/card/japanese/manual/ivf/index.html>