

II. ウサギの受精卵移植

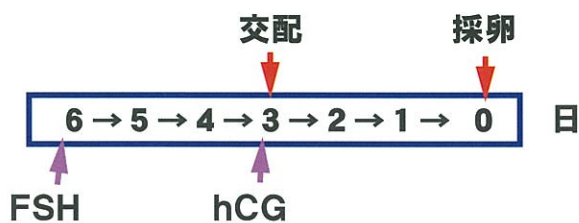
1. 過排卵処理

採卵予定日の6日前にFSHを2ml皮下注射



FSH注射の72時間(3日)後(=採卵予定日の3日前)に交配

交配後hCGを0.5ml静脈注射



FSH (Follicle stimulating hormone); 卵胞刺激ホルモンのことで、卵胞の形成を促し、多くの卵胞を作らせる働きがある。

hCG (human Chorionic Gonadotropin); ヒト絨毛性性腺刺激ホルモンのことでLH (Luteinizing Hormone) 黄体形成ホルモンと類似した働きを持ち、成熟した卵胞を排卵に至らしめる働きがある。

2. 実験前日の準備

(1) 灌流液

市販の199 (ワナインナイン) 液か作成したPB1液のいずれかで灌流します。

Omedium199 Earle's (ギブコ社: 12340-030) にウサギ血清20%添加した溶液を用います。作成はクリーンベンチ内で無菌的に行なうようにして下さい。(菌が繁殖しやすいため)

前日からインキュベーターに入れてCO₂平衡しておきます。

OPB1液で灌流を行なう場合にはお湯(37℃)の中に入れて温めてから使用します。

(PB1液の場合インキュベーターに入れるとpHが変わってしまうため当日準備。)

灌流液の量としては子宮角1本当たり10 mlです。

(2) 回収ディッシュ (シャーレー)

回収ディッシュ (ファルコン社1008) に199液100 μ l $\times$ 4ドロップを入れ流動パラフィンで覆ったものについては1枚/頭をCO₂平衡しておきます

(3) 解剖器具

乾熱滅菌しておきます。

3. 受精卵 (胚) の回収

(1) 灌 流

卵管の灌流については外科的方法と卵管等を摘出する方法があるため、その各々について簡単に概要を説明しますと以下のとおりです。

① 外科的方法

ウサギを麻酔 (静脈注射; ネンブタール1.5ml)

↓
腹部(外陰部の上方3~5cm)を押し膀胱に貯まっている尿を排出させ後、仰向けに保定

↓
腹部を剃毛し、70%エタノール等で消毒

↓
腹部を切れ込みのあった手術布または滅菌ガーゼで覆い、正中線に沿って5cm程度切開

↓
腸管の下にある卵管を引き出す(卵管は鉗子等で固定しておく作業しやすい)

↓
卵管の子宮側にチューブに接続した注射針(18G・1 $\frac{1}{2}$)を装着した試験管(回収用試験管)を挿入し、卵管の上から鉗子で針先を固定する

↓
卵管の卵巣側(卵管采)から注射筒(注射針18G・1 $\frac{1}{2}$)を差し込み、注射針は卵管の

上から指で押さえゆっくりと灌流液を流し込む(10ml中9mlを使用)

(針が卵管内に入っていれば卵管が膨らむか、回収用試験管に灌流液が出てくる)

↓
灌流(9ml)が終了したら、卵巣側から子宮側に向かって指で卵管をしごき、卵管内の灌流液を搾り出す

↓
回収用試験管を卵管から外した後、注射針へ灌流液(10ml中の残り1ml)を注入し注射針及びチューブ内に残っている可能性のある卵子を洗い流す

↓
もう一方の子宮角に同じ操作を行う

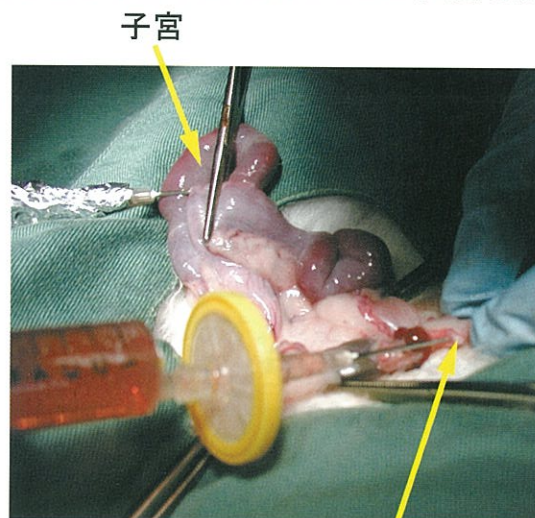
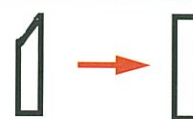


図35 灌流 卵管采

注 注射針については卵管を傷付けないように砥石等で先端を丸めた上で滅菌したものを使用します。



②卵管摘出法

外科的方法に準じて開腹し、卵巣、卵管、子宮(膈の一部を付けたまま)摘出

↓
生理食塩水で湿らせた濾紙の上に置く

↓
卵管采を傷めないように注意しながら卵管采を卵巣と切り離す

↓

以下外科的方法に同じ(卵管の蛇行部の間膜を切除し、卵管を伸ばすと成績が良くなる)

(2) 受精卵の回収

灌流後、受精卵の回収に取りかかります。回収用試験管を揺らさないように注意しつつ、スポイトで灌流液の下の方から(受精卵は灌流液中に沈んでいるため)吸い上げ、マス目を付けたディッシュに移します。この場合灌流した液には血液など受精卵に悪影響を及ぼす因子が存在するため直ちに回収・洗浄するようにして下さい。また受精卵の周りの付着物についても取り除くためピペットは細い物(受精卵よりやや大きい口径)を使います。

使用培地は前日に準備したウサギ血清20%添加medium199液100 μ lのスポット(塊)を4カ所作成し流動パラフィンで覆ったディッシュです。



図36 回収液
(両子宮角分)



図37 ピペット

【ピペットの作成】

- ・ピペットはガラス管の真ん中をバーナーであぶる
- ・両側に引っ張る
- ・真ん中で切る(折る)
- ・先端をバーナーであぶり、ピンセットで引っ張り細くする
- ・先端を切る(折る)

(3) 受精卵の洗浄

回収した受精卵は3回ピペットで吸い取り、他のドロップへ移動させる操作を実施し(この操作を「受精卵の洗浄」という。)、4番目のドロップに凍結処理を行なう前まで置いておきます。ピペットは流動パラフィンで汚れたときは新しい物に交換します。恒温プレートは20℃～25℃前後*に設定しておきます。

{ *37℃等の温度では卵の代謝が活発
に行われるため品質低下を招くため }

◆操作はクリーンベンチ内で行うように心掛けて下さい。

血清添加medium199
(回収受精卵の洗浄用)

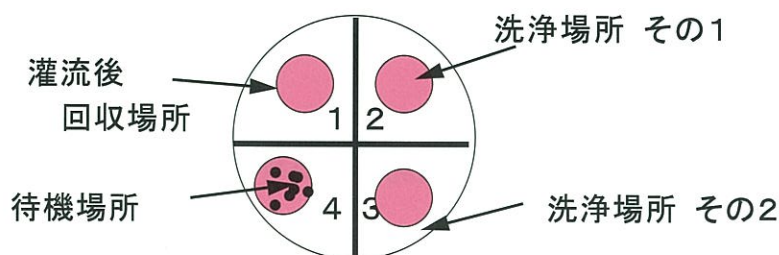


図38 ディッシュ上のドロップ

・凍結処理が始まる前に、PB1液スポットに受精卵を移し替えます

* 灌流後は素早く回収・洗浄すること。室温が20℃であれば室内に出したままでも大丈夫だが、出来るだけ早く凍結処理に入ること！

* 時間が経過しただけ卵子の品質は低下して行きます。

* 桑実胚の出現率が高くなるのは交配69時間後

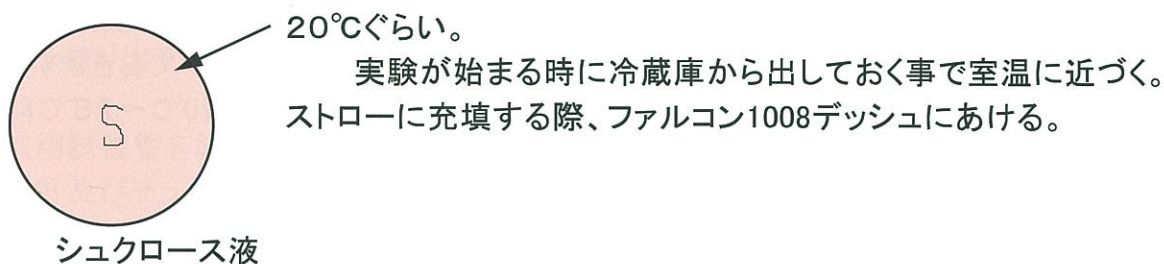
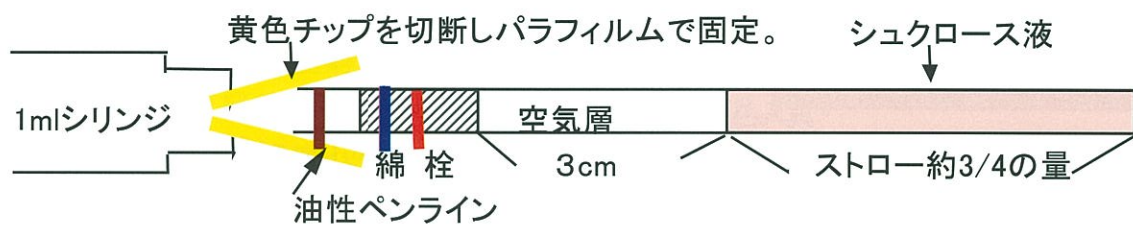
→hCGを午後4時に投与したら3日後の午後1時に採卵

4. 受精卵の処理

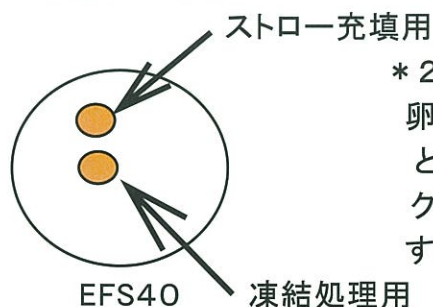
①ストロー及びディッシュの準備

受精卵用ストロー(0.25ml)を、1mlシリンジ(注射筒)に接続して、まずシュクロース(蔗糖)液と続いてEFS40を下図に示したような配置に吸引します。ストローには区別が付くようにシリンジ装着する前に油性ペンでラインを引き判別出来るようにしておいて下さい。

◆操作はクリーンベンチ内で行うよう心掛けて下さい。



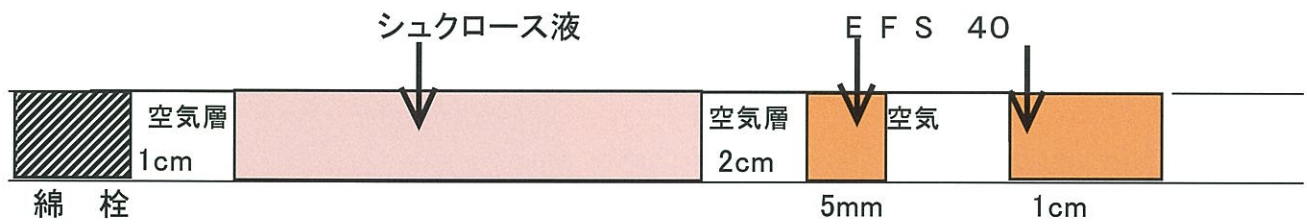
実験が始まる時に冷蔵庫から出しておく事で室温に近づく。
ストローに充填する際、ファルコン1008ディッシュにあける。



* 2スポット作るのは、一つはストロー充填用もう一つは卵凍結処理用として使用する。EFS40はストロー1本ごとに 新しい液(新しい場所)を作成し使います。これはシュクロースの混入でEFS濃度が変化する可能性があるためです。ドロップの容量はおおよそ50μl。

ここでEFS40に受精卵(桑実胚)を暴露する。

微量滴であればあるほど蒸発が早い＝濃度が更に濃くなる
使用直前に作成すること。



* ストローの先端(綿栓の逆方向)に液が残らないよう先端を上に向けて吸引する。

* 空気は液を分けるために吸引する。

② 受精卵の洗浄

室温下でPB1デッシュ内の受精卵を同PB1溶液が入ったピペットで隙間なく取り出し、EFS40ドロップ中に導入します。この瞬間にタイマー(ストップウォッチ)をスタートさせる(ストロー封入、凍結のための発泡スチロール板に載せるまで2分以内に行う)。EFS40が入ったピペットでEFS40中の受精卵をピペッティングして(細いピペットで吸ったり出したりして)できるだけPB1を除いたのちに、ストロー内のEFS40の中に導入します。

すべての受精卵がピペットからストロー内に入ったかどうかピペットの中身をEFS40中で確認します。ピペット内に受精卵が残っていたら時間(発泡スチロール板に載せるまでの時間)に余裕がある場合にはストロー内のEFS40中に導入します。全体の流れ及び各操作を以下に図示します。

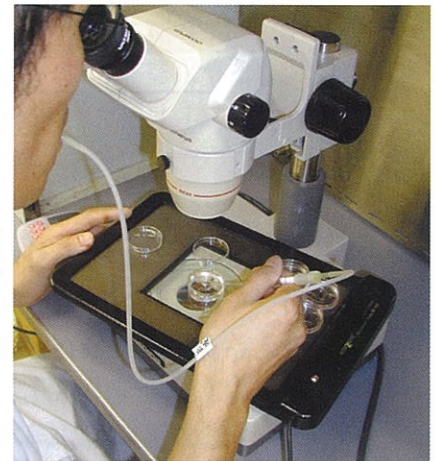
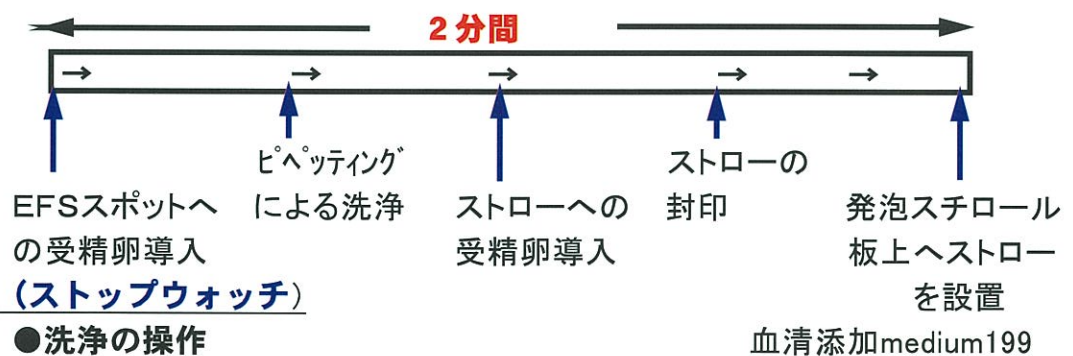


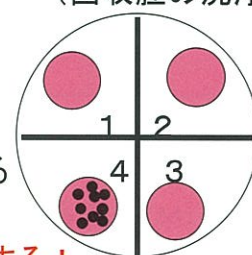
図39 受精卵の吸引

【凍結までの流れ】



* ピペットにPB1を吸引し凍結する受精卵を選抜、PB1ドロップに移し替える。

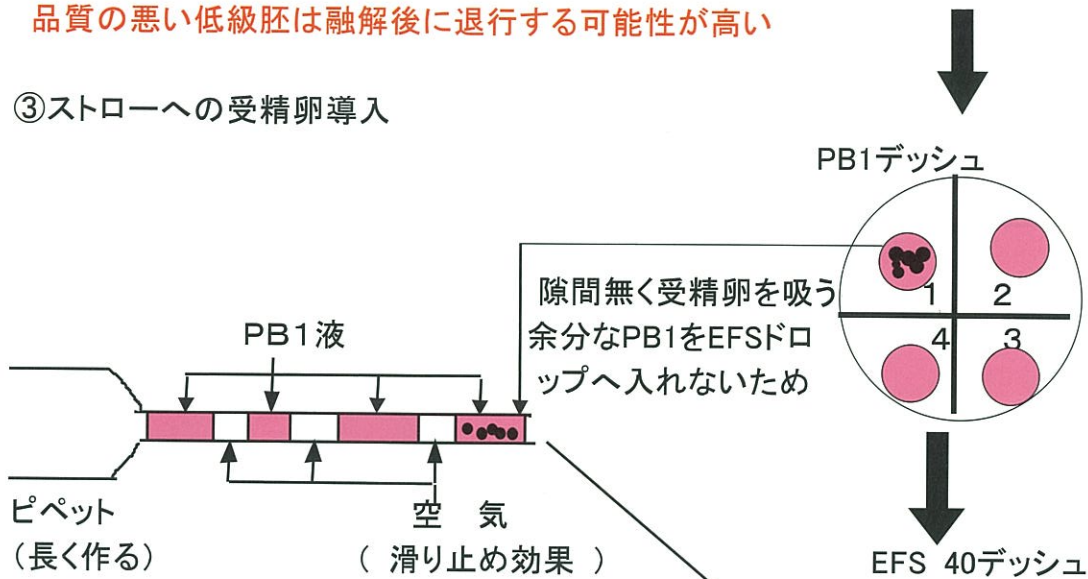
* ピペットは流動パラフィンで汚れたときは新しい物に替える



ステージは16細胞か桑実胚で形態の良い受精卵を凍結する！

品質の悪い低級胚は融解後に退行する可能性が高い

③ストローへの受精卵導入



* PB1からEFS40ドロップへ受精卵を移したら
EFS用ピペット(EFSを吸したピペット)に
付け替える。新たなピペットで受精卵と
EFSをよくなじませるために、ピペッティ
ング (ピペットでの液の吸排) する。
この時、受精卵周辺のPB1をEFSに置き
換える感で行なう。(おろそかにすると、凍害が生じます！)

* EFSと持ち込んだPB1がよく混合したら
ピペットに吸い込みストローのEFS40内
へ受精卵を充填する。

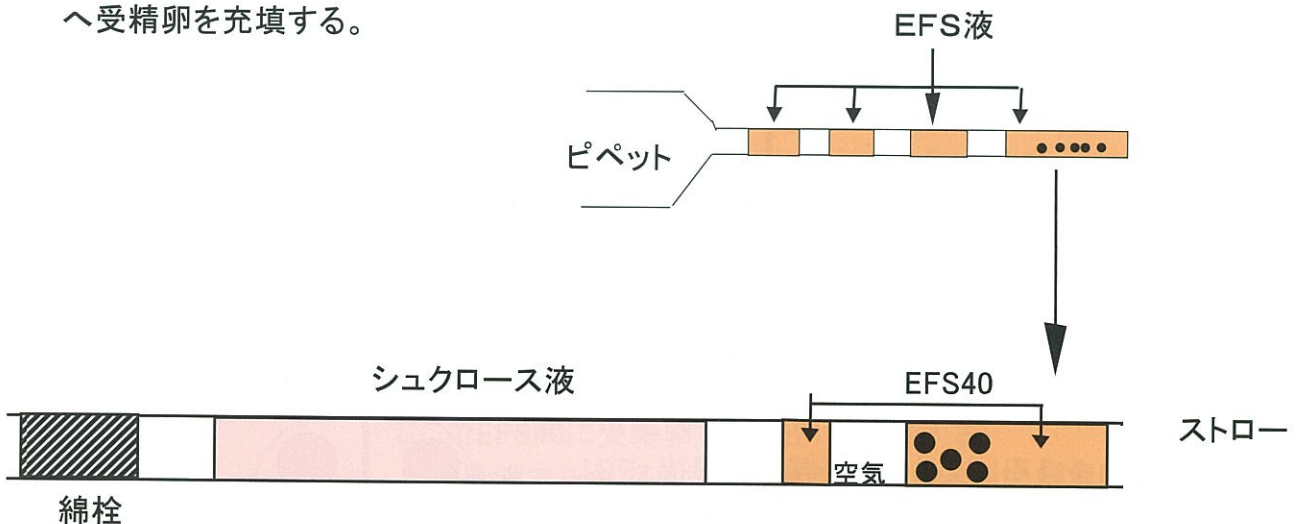
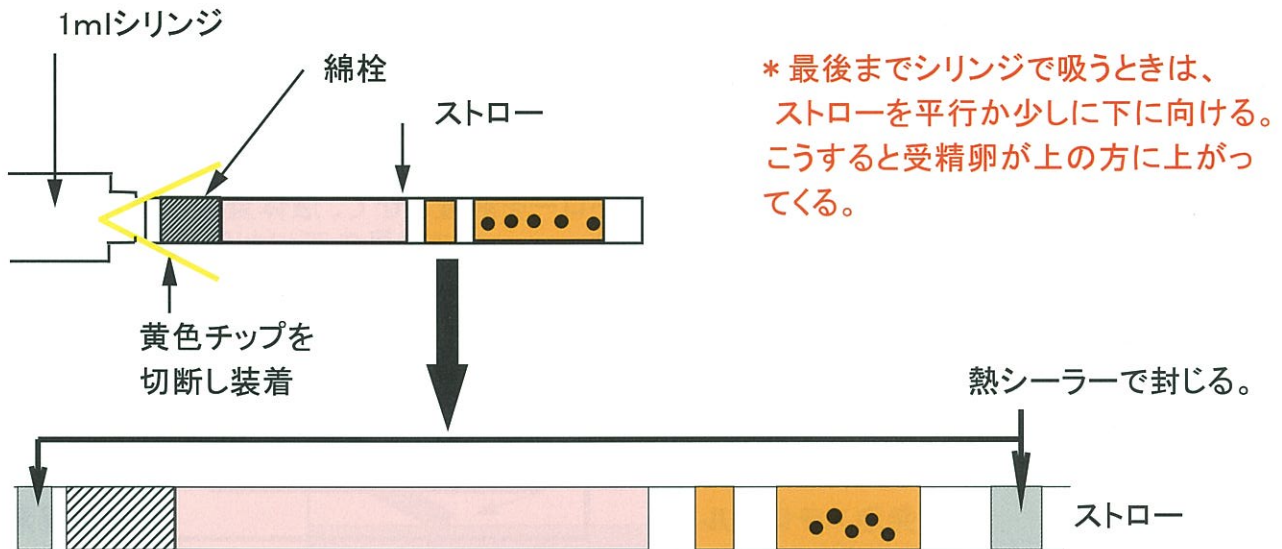




図40 ストローへの受精卵の吸引

④ストローの封入

シリンジで綿栓まで吸引したあと下端・及び上端を熱シーラーで封じます。



* 上端（綿栓側）を封じることで液体窒素（LN2）から取り出す時、綿栓が飛ばなくなる。

* 受精卵が充填されているEFS40の部分には手を触れないこと。

EFS40に暴露（接触・混合）してから室温（20℃）で2分間保持します。

室温が高いようなら暴露時間を短くし、逆に低いなら長く浸漬しておきます。

【注意点】

* 温度条件

EFSの細胞内浸透スピードが変化するため、温度条件はとても重要です。

温度が高いと早く浸透し、低いと浸透が遅くなります。

条件を揃えるため室温は $20^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ にします。

真夏・真冬は、設定温度になかなか達しないため、8時頃からエアコン始動させるなど準備を万全に行う必要があります。

* 受精卵の選抜

ガラス化に適した受精卵（16細胞（16c）、32細胞（32c）、桑実胚（M））のみを保存します。

Bランク桑実胚は保存しないようにします。

→融解・培養しても死んでしまいますのでムダです。

判断が難しい受精卵は半数を凍結、残りを培養観察。結果をみて保存、廃棄を判断。

* 記 録

受精卵の状態・数などを記録して融解後と比較する。

その他に、子宮・卵巢の状態や交配で雄を容易に許容したかなど。

5. 凍 結

①凍結の準備

凍結処理に入る最低10分前には発砲スチロールに液体窒素(LN₂)を入れておくこと
(発砲スチロール内温度を安定させるため！)

②凍 結

液体窒素液面に浮かせた発砲スチロール上にストローを静置させて、液体窒素蒸気中で3分以上(現状10分間)保持した後に液体窒素に浸漬(10分以上)します。

↑
この段階で約-135℃まで下がる。
液体窒素(LN₂)蒸気内=-135℃
液体窒素(LN₂)液内 = -196℃

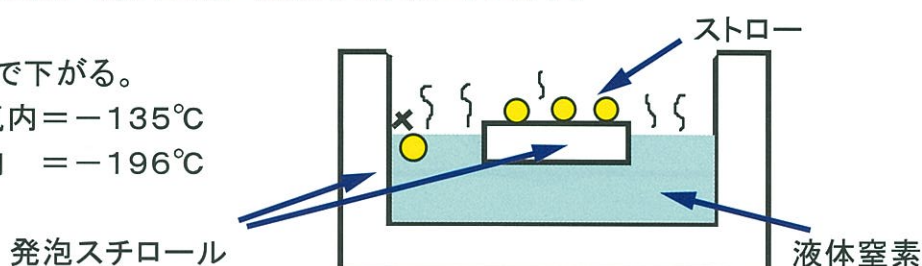


図41 ストローの凍結

* 発砲スチロール板にストローを乗せるときは慎重に！

→高い位置からストローを落とすと転がって液体窒素(LN₂)液内に落ちます。

出来るだけ低い位置で乗つける。板を触る感じです。

* 発砲スチロールは薄いもの(7mm程度の厚さ)を使います。

③保管器への移動

液体窒素中に浸漬(10分以上)後、ストローを保管容器(タンク)へ移す。

→LN₂内から外に出すと気温差は200℃にもなる。手早く行なわないと融解や氷結晶の成長が始まり胚に悪影響が出ます。

6. 融 解

融解の流れとしては次の通りです。

