

# 災害・緊急時のマウス精子凍結法 ～EQ法(Easy & Quick method)～

バイオリソース研究センター  
統合発生工学研究開発室  
研修技術アップデート #1

# 目次

- 説明
- 試薬と器具・機材
- 方法1. 凍結液とマイクロチューブ、チューブホルダーの準備
- 方法2. 精巣上体の摘出と精子の凍結保存
- 方法3. 体外受精の準備
- 方法4. 精子の融解と体外受精への利用
- 成績1～3
- 参考文献
- 補足
- 作成者

# 説明

## 利点

- 特に災害や緊急時に多くのマウスの精子を保存したいときに効果的な方法であり、融解後は体外受精に利用が可能。
- 液体窒素が不要で、 $-80^{\circ}\text{C}$ のフリーザーで保存が可能。
- 未経験者でもすぐに実行でき、短時間で100匹の雄の精子保存が可能。

## 説明

- 20%ラフィノース水溶液を入れたマイクロチューブに精巢上体を入れてハサミで切り刻み、 $-80^{\circ}\text{C}$ フリーザーに直接保存する簡単な方法。
- 長期的な保存や高い受精率を期待するならば、従来の方法で保存することが望ましい。

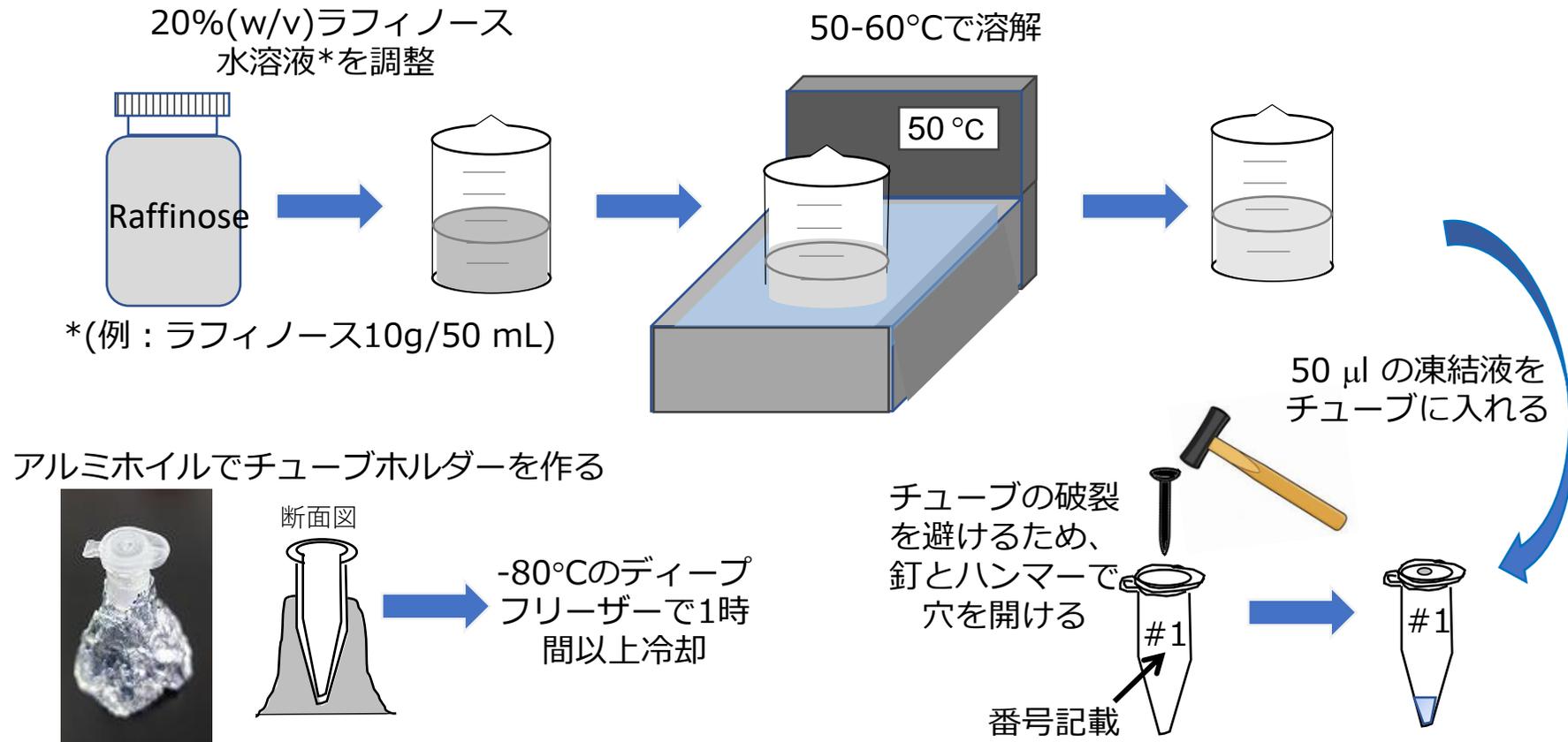
# 試薬と器具・機材

ラフィノース  
マイクロチューブ (1.5 mL)  
アルミホイル  
鋭利なハサミ (眼科用など)  
ピンセット  
チューブ収納箱など  
50°Cで溶解させるための加温装置 (ウォーターバスなど)

Becton Dickinson      cat#217410

# 方法

## 1. 凍結液とマイクロチューブ、チューブホルダーの準備



**\*チューブの素早い冷却に重要**

# 方法

## 2. 精巣上体の摘出と精子の凍結保存

精巣上体尾部を摘出



血液と脂肪を除去



マイクロチューブに入れる



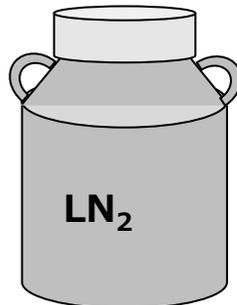
ハサミで10-15回、切込みを入れる



室温で3-4分間静置



保存が1ヶ月以上の場合は、液体窒素の中に保管する



1ヶ月<

冷やした箱などに、チューブを保管する



-80 °C、冷凍庫内

-80°Cフリーザーの冷却したホルダーへチューブを入れる



1時間<

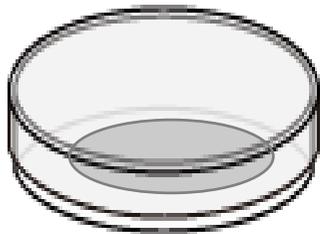
-80 °C、冷凍庫内

アルミホイルのホルダー

# 方法

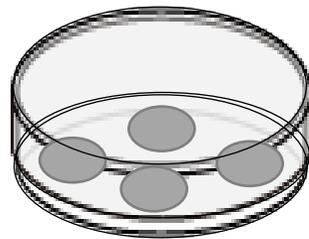
## 3. 体外受精の準備

精子前培養用ディッシュ



1 ドロップ×300  $\mu\text{L}$

受精用ディッシュ



4 ドロップ×80  $\mu\text{L}$

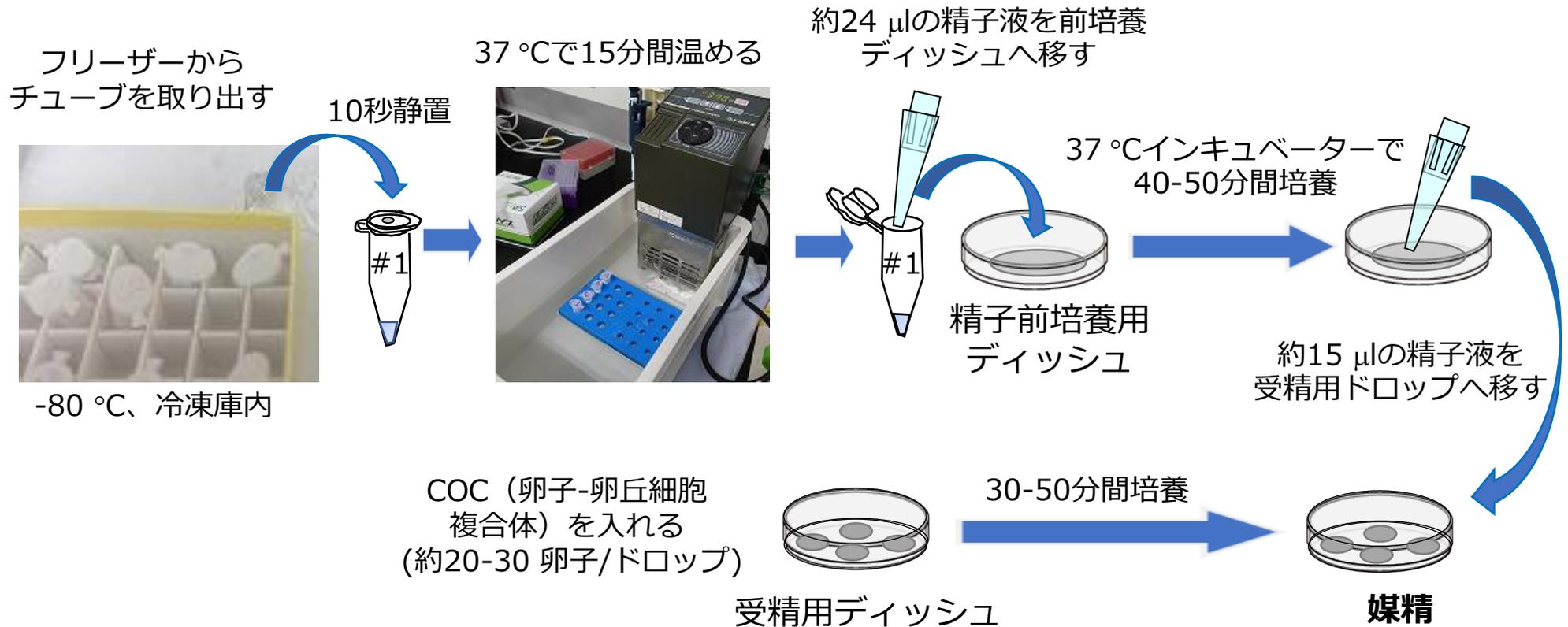


各培養液\*のドロップをオイルで覆い、37 °C のCO<sub>2</sub>インキュベーターで30分以上平衡

\*培養液や体外受精条件の詳細は、論文を参照。

# 方法

## 4. 精子の融解と体外受精への利用



# 成績

## 1. 標準法とEQ法で凍結した精子を用いた体外受精率

系統	方法	例数	卵子数		平均受精率 (±標準誤差)
			受精卵数	使用卵数	
C57BL/6N	標準	8	427	469	91.4 (± 1.5)
	EQ	7	209	401	49.9 (± 7.0) **
C57BL/6J	標準	10	583	754	77.3 (± 1.4)
	EQ	7	118	380	30.8 (± 2.0) **

結果：簡易なEQ法でも30%以上の受精率が得られた。

# 成績

## 2. EQ法の凍結精子を用いた体外受精へのカルシウム濃度の影響

系統	Ca <sup>++</sup> 濃度	例数	卵子数		平均受精率 (±標準誤差)
			受精卵数	使用卵数	
C57BL/6N	2 mM	7	209	401	49.9 (± 7.0)
	5 mM	7	176	307	56.7 (± 4.9)
C57BL/6J	2 mM	7	118	380	30.8 (± 2.0)
	5 mM	7	150	301	50.9 (± 10.5)

結果：高カルシウム濃度で受精率が改善される傾向が見られた。

# 成績

## 3. EQ法で1ヶ月間保存した精子を用いた受精卵の移植成績

系統	使用雌数			胚数				
	移植数	妊娠数	(%)	移植数	着床数	(%)	産子数	(%)
C57BL/6N	3	3	(100)	45	39	(87)	26	(58)
C57BL/6J	4	4	(100)	60	49	(82)	33	(55)

結果：両系統共に高い産子発生率が得られた。

# 参考文献

- Mochida K, Hasegawa A, Shikata D, Itami N, Hada M, Watanabe N, Tomishima T, Ogura A. [Easy and quick \(EQ\) sperm freezing method for urgent preservation of mouse strains](https://doi.org/10.1038/s41598-021-93604-y). Sci. Rep. 2021, 11:14149.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-93604-y>

# 補足

## 凍結のポイント

- チューブを早く冷却することが重要なので、予めアルミホイルでチューブの形状に合わせた台座を作成し、冷却しておく。
- 短時間で多くのマウスの精巣上体を保存できる簡易法のため、精子は凍結の傷害を受け易い。凍結後は液体窒素に早く移した方が長く保存できる。
- 通常時はストローを用いた凍結法の方が体外受精に使い易い。
- $-80^{\circ}\text{C}$ よりも温度の高いフリーザーは精子保存に使用できません。

# 作成者

- 統合発生工学研究開発室
- 質問などの連絡先
  - 持田慶司：[keiji.mochida@riken.jp](mailto:keiji.mochida@riken.jp)
  - 守田昂太郎：[kohtaro.morita@riken.jp](mailto:kohtaro.morita@riken.jp)