นิพนธ์ต้นฉบับ

การเลี้ยงตัวอ่อนของหนูสายพันธุ์ผสม (Balb/C x CD-1) ในจานทดลอง*

ประมวล วีรุตมเสน**
กนกวรรณ มารต่อม** เย็นจิต จันทร์ประสิทธิ์**

Virutamasen P, Maltom K, Chanprasit Y. Cultivation of Mouse Embryo F1 (Balb/C x CD-1) in vitro. Chula Med J 1989 Feb; 33(2) : 95-100

Sexually mature (6-9 weeks old), virgin hyboid F1 (Balb/c x CD-1) mice were injected at 4:00 pm. with 5 IU. of pregnant mare's serum gonadotropin. After 48 hours, they were injected with 5 IU of human chorionic gonadotropin (hCG) before each female mouse was placed with a male of proven fertility. Mating was confirmed by the presence of vaginal plug in the morning after hCG injection. Forty six hours after mating female mice were killed by cervical dislocation. Fallopian tubes were carefully removed under a septic precaution and were placed in Ham's F-10 media. The embryos were recovered by flushing the fimbrial end of the oviducts. Five hundred and thirty fertilized oocytes at 2-cell stage were collected under dissecting microscope and placed in one ml Ham's F-10 media, in a four-well multidish. Embryos at 2-cell stage were incubated at 37°C in constant stream of humidified 5% 02 : 5% CO2 : 90% N2. Fertilized oocytes were periodically observed up to 4 days after incubation when 78% of the fertilized oocytes were found to have developed into blastocysts.

Reprint request : Virutamasen P, Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University. Bangkok 10500, Thailand.
Received for publication. February 1, 1988.

* ได้รับเงินทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช-ไชน่า เมดิคัลบอร์ด คณะแพทยศาสตร์
** ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเพาะเลี้ยงตัวอ่อนของหนู mice จากระยะ 2-เซลล์ในห้องปฏิบัติการให้เจริญแบ่งตัวไปเป็น Blastocyst ได้มีผู้นำมาใช้เป็นการควบคุมคุณภาพห้องปฏิบัติการ การเตรียมน้ำเพาะเลี้ยงเพื่อการผสมไข่กับตัวอสุจิและเพื่อเลี้ยงตัวอ่อนของคน[1,2] อุปกรณ์เครื่องใช้ทุกชนิดก่อนที่จะนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนของคน จะต้องได้รับการตรวจสอบและทดลองใช้เลี้ยงตัวอ่อนของหนูก่อน ได้มีผู้นำหนูพันธุ์ผสมจากสายพันธุ์แท้ชนิดต่าง ๆ เช่น C57 BL/6 × CBA[3], Balb/C × C57 B1/6 × BBA/2J[4] มาผสมพันธุ์เพื่อนำตัวอ่อนมาเลี้ยงในน้ำเพาะเลี้ยง พบว่ามีการเจริญเติบโตแบ่งตัวได้ดี แต่หนูสายพันธุ์แท้ดังกล่าวไม่สามารถหาได้ในประเทศไทย ในการศึกษานี้ได้ทดลองนำตัวอ่อนจากหนูเพศเมียพันธุ์ผสม (F1) ซึ่งได้จากการผสมระหว่างแม่หนูเพศเมียพันธุ์แท้ Balb/C กับหนูเพศผู้พันธุ์แท้ CD-1 ที่ได้จากศูนย์เลี้ยงสัตว์ทดลองของกรมแพทย์ทหารบก เพื่อนำผลของการศึกษามาใช้เป็นสิ่งควบคุมประสิทธิภาพของห้องปฏิบัติการ การเตรียมเพาะน้ำเลี้ยงตัวอ่อนซึ่งจะใช้ทำการศึกษาและวิจัยของการปฏิสนธินอกร่างกายของคนต่อไป

วัสดุและวิธีการ

นำหนูเพศผู้พันธุ์แท้ CD-1 และเพศเมียพันธุ์แท้ Balb/C จากศูนย์สัตว์เลี้ยงทดลองของกรมแพทย์ทหารบก มาเลี้ยงที่ศูนย์สัตว์ทดลองของคณะแพทยศาสตร์ ภายในห้องเลี้ยงปรับอุณหภูมิด้วยเครื่องทำความเย็นให้มีอุณหภูมิระหว่าง 70-75 องศาฟาเรนไฮต์ ปรับแสงสว่างในห้องด้วยเครื่องควบคุมอัตโนมัติ ให้มีแสงสว่าง 14 ชั่วโมง และมืด 10 ชั่วโมง โดยให้อาหารสำเร็จรูปเอฟอีซิลิค และน้ำโดยไม่จำกัดจำนวนตลอดเวลา เมื่อนำหนูมาเลี้ยงในห้องเลี้ยงดังกล่าวเป็นเวลาสองสัปดาห์จึงเตรียมหนูเพื่อผสมและการเก็บไข่โดยดัดแปลงจากรายงานไว้แล้ว[5] ดังมีรายละเอียดต่อไปนี้ นำหนูมาผสมกันโดยใช้หนูเพศผู้ 1 ตัว ต่อ เพศเมีย 1 ตัว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แยกหนูเพศเมียออกรอจนกว่าจะออกลูก คัดลูกหนู (F1) ที่เป็นเพศเมียมาเลี้ยงต่อจนมีอายุ 6-9 สัปดาห์ ซึ่งจะมีน้ำหนักระหว่าง 20-30 กรัม นำหนูเพศเมียพันธุ์ผสม (F1) มาทำให้ไข่ตกโดยการให้ Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG, Sigma Chemical Comp U.S.A) 5 ยูนิต ละลายในน้ำเกลือ 0.2 มล.ฉีดเข้าช่องท้องในช่วงเวลา 16.00 -17.00 น. 48 ชั่วโมงต่อมาฉีด Human Chorionic Gonadotropin (hCG Ayerst; Laboratory N.Y) เข้าช่องท้องตัวละ 5 ยูนิต ในน้ำเกลือ 0.2 มล. แล้วแยกกรงผสมพันธุ์เพศผู้พันธุ์แท้ CD-1, 18-19 ชั่วโมงหลังฉีด hCG เวลา 09:00-10:00 น. ตรวจดู Vaginal plug ถ้าพบแสดงว่ามีการผสมพันธุ์ 44-47 ชั่วโมงหลังฉีด hCG ทำให้หนูตายโดยใช้วิธี "Cervical dislocation" ทำความสะอาดหน้าท้องหนูด้วยแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 70 ผ่าท้องหนูด้วยกรรไกรและอุปกรณ์ที่สะอาดปราศจากเชื้อจุลินทรีย์และสารเคมี ตัดแยกหลอดมดลูกทั้งสองข้างออกนำใส่จานพลาสติคที่ผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Nunclon, Nunc Intermed, Demark) ซึ่งมีน้ำเพาะเลี้ยง Ham's F-10 ที่ผสมแล้ว 1.5 มล. (Ham's F-10 + 7.5% FCoS) นำหลอดมดลูกที่อยู่ในน้ำเพาะเลี้ยงมาตรวจดูด้วยกล้องขยายชนิด dissecting (Olympus, Tokyo) โดยใช้กำลังขยาย 15-20 เท่า ไล่ไข่ออกจากหลอดมดลูก โดยฉีดน้ำเพาะเลี้ยงตัวอ่อน (Ham's F-10 + 7.5% FCoS) ผ่านทาง fimbria โดยใช้หัวเข็มเบอร์ 30 (รูปที่ 1) เมื่อได้ไข่อยู่ระยะ 2 เซลล์ แยกไข่โดยใช้หลอดแก้วลนไฟแล้วดึงปลายให้เรียวเล็ก ดูดแยกไข่นำไปใส่ multipetridish (4-well) (Nunclon, Nunc, Intermed, Denmark) ที่มีน้ำเพาะเลี้ยงตัวอ่อน Ham's F-10 รวมกับ FCoS ร้อยละ 15 นำไปเลี้ยงในตู้อบที่มีความชื้นอากาศร้อยละ 100 ปรับอุณหภูมิระหว่าง 37 + 0.2 องศาเซลเซียส มีแก๊สผสม $N_2$90%, $CO_2$5% และ $O_2$5% ไหลผ่านตลอดเวลา ตรวจสอบปริมาณของแก๊สในตู้อบเฉพาะ CO_2 และ O_2 ให้มีปริมาณร้อยละ 5 ด้วย Bacharach Fyrite gas Analyzers จากนั้นสังเกตการเจริญเติบโตของไข่ที่ผสมแล้วจากระยะ 2 เซลล์ด้วย "Inverted microscope" (Olympus, Tokyo) มีกำลังขยาย 200 เท่าทุก 12-24 ชั่วโมง บันทึกจำนวนการเปลี่ยนแปลงของไข่จนถึงระยะ Blastocyst ซึ่งจะใช้เวลา 3-4 วันหลังจากเริ่มเพาะเลี้ยง

ความสะอาดห้องปฏิบัติการ

อากาศที่เข้าห้องปฏิบัติการผ่านเครื่องกรอง absolute filter (0.2 ไมครอน) ภายในห้องทำความสะอาดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ 7X ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 ทุก 7 วัน และภายในห้องจะเปิดแสงอัลตราไวโอเลตตลอดเวลาที่ไม่ใช้ห้อง ภายใน Laminar Flow Hood จะทำความสะอาดด้วยแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 70 ก่อนทำการทดลองทุกครั้ง ผู้ทำจะต้องสวมเสื้อที่สะอาด และผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ สวมหมวกและผ้าปิดจมูกตลอดเวลา ล้างมือด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อและแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 70 ก่อนทำการทดลอง

ผลการทดลอง

ได้ทำการทดลองหนูเพศเมียพันธุ์ผสม (F_1) 41 ตัว ซึ่งมีน้ำหนักตัวโดยเฉลี่ย 23.8 $\pm$ 1.5 กรัม (mean $\pm$ S.D)

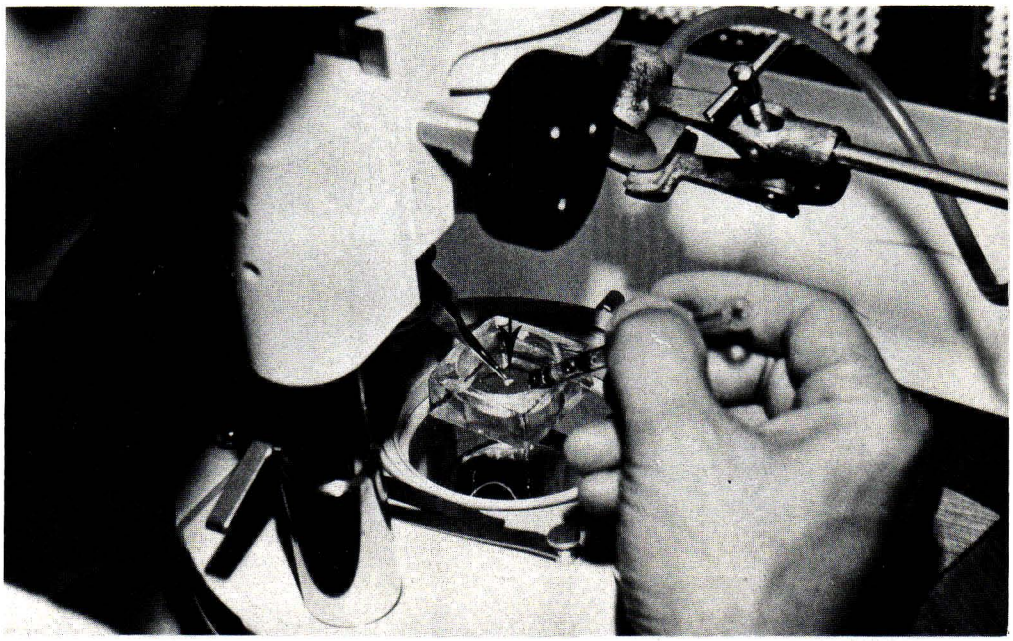


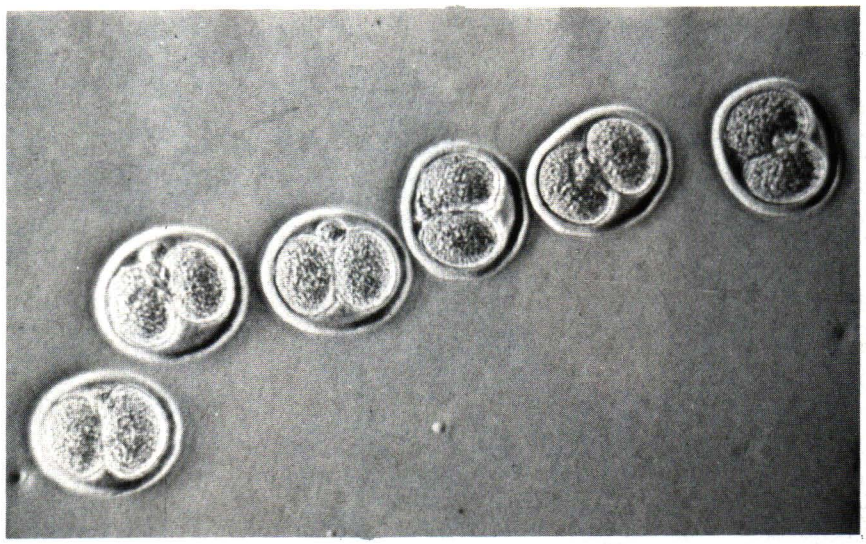
Figure 1. Demonstration of flushing mouse oocytes through the fimbriae (arrow) under dissecting microscope

ได้ไข่ที่ผสมแล้วระยะ 2-เซลล์ 530 ใบ โดยเฉลี่ย 12.9 ใบต่อหนู 1 ตัว 17 ชั่วโมงหลังเลี้ยงด้วยน้ำเพาะเลี้ยง Ham's F-10 ร้อยละ 69.6 จะแบ่งตัวไปเก็บ 4-เซลล์และร้อยละ 2.4 แบ่งตัวไปเป็น 8-เซลล์ จะเริ่มพบ morula เมื่อเลี้ยงได้ 41 ชั่วโมง และพบ Blastocyst เมื่อเลี้ยงครบ 65 ชั่วโมง 70 ชั่วโมงหลังจากเริ่มเลี้ยงมีไข่ 416 ใบเจริญเติบโตเป็น Blastocyst คิดเป็นร้อยละ 78.8 และมีเพียงร้อยละ 13.2 ตัวอ่อนที่อยู่ในระยะ 2-เซลล์ไม่เจริญเติบโต (ดูรายละเอียดในตารางที่ 1) รูปที่ 2 แสดงการแบ่งตัวของตัวอ่อนในช่วงเวลาต่าง ๆ และมีเพียงร้อยละ 13.2 ที่ยังคงอยู่ในระยะ 2-เซลล์ ไม่มีการเจริญเติบโตต่อ

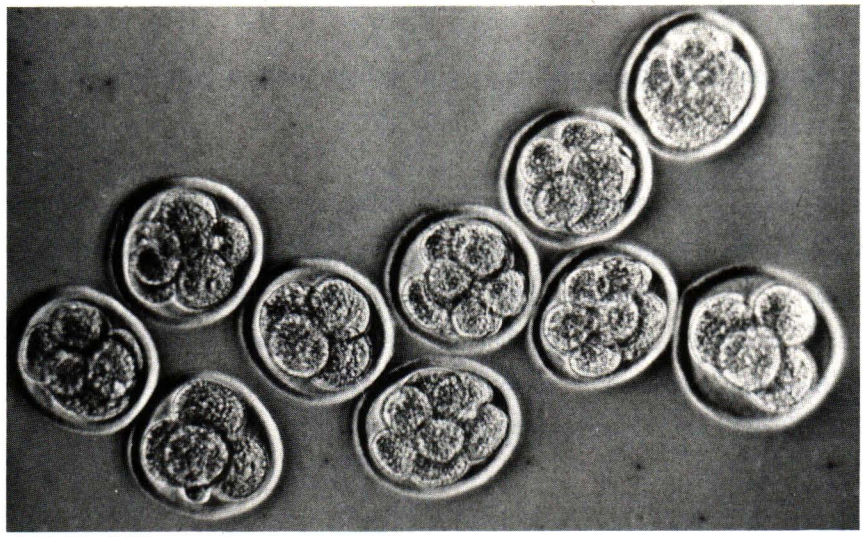
Table 1. Stage of development of mouse embryos at different periods.

Observation period (hours)	Stage of development					
	2-cell	3-cell	4-cell	8-cell	morula	blastocyst
0	530	-	-	-	-	-
17	144	4	369	13	-	-
41	86	5	54	4	341	-
65	71	4	11	17	67	360
70	70	4	12	17	11	416

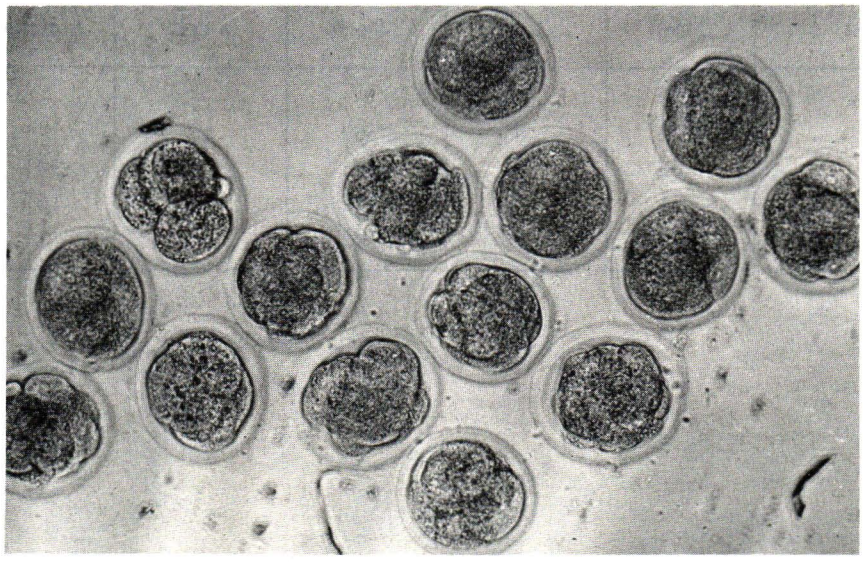
a.



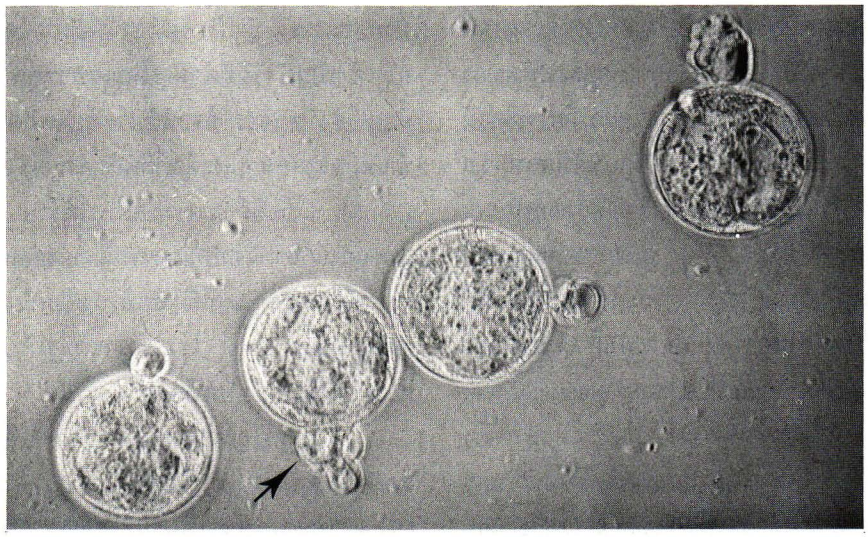
b.



c.



d.



e.

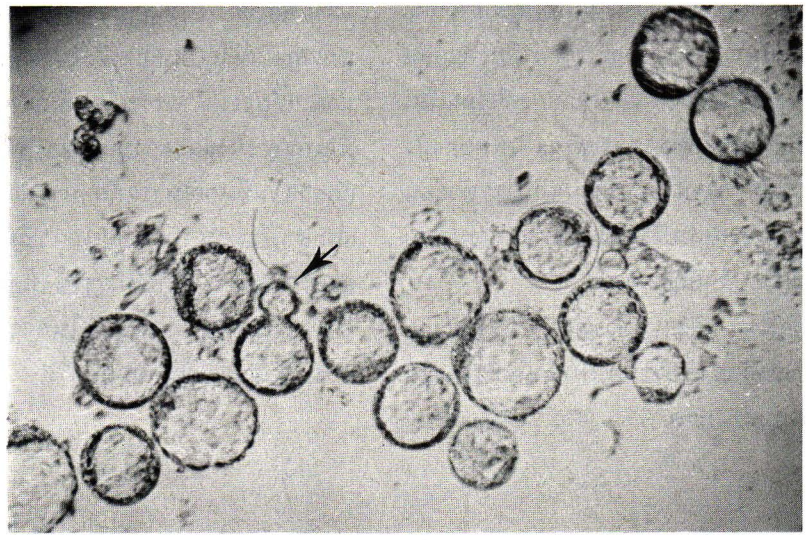


Figure 2. Mouse embryos at two-cell stage (a), four to six-cell stage (b) morula (c), early blastocyst (d) and late blastocyst (e). Inner cell mass of some blastocysts protrude through the cellular membranes ''hatching'' (arrow).

วิจารณ์และสรุปผล

การเพาะพันธุ์ผสม (F_1) ของหนู mice จากเพศผู้พันธุ์แท้ CD-1 และเพศเมียพันธุ์แท้ Balb/C ในห้องเลี้ยงที่ปรับอุณหภูมิระหว่าง 70-75 องศาฟาเรนไฮต์ที่มีแสงสว่างพอเหมาะ สามารถทำได้ในสภาพอากาศ และสภาพแวดล้อมของศูนย์สัตว์เลี้ยงของประเทศของเรา ยิ่งกว่านั้นหนูพันธุ์ผสมเพศเมีย (F_1) ยังสามารถเจริญเติบโตทั้งน้ำหนักและภาวะการเจริญพันธุ์ภายใต้สภาพแวดล้อมที่ได้กำหนดขึ้นภายใต้สภาพแวดล้อมดังกล่าว เอื้ออำนวยให้หนูพันธุ์ผสมตอบสนองต่อการชักนำให้มีการตกไข่ (Superovulation) และผสมพันธุ์กับเพศผู้ได้เป็นอย่างดี แม่หนูพันธุ์ผสมแต่ละตัวสามารถให้ไข่ที่เกิดจากการผสม (in vitro) ในระยะ 2-เซลล์ โดยเฉลี่ย 12.9 ใบ ซึ่งเป็นจำนวนใกล้เคียงกับจำนวนของตัวอ่อนที่ได้จากแม่หนูพันธุ์อื่น ๆ[5,6] ในทางตรงข้าม หากได้แม่หนูพันธุ์ผสม (F_1) จากพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ที่ไม่แท้ การตอบสนองต่อการชักนำให้ไข่ตก และการเจริญเติบโตของตัวอ่อนจากระยะ 2-เซลล์ ไปถึง Blastocyst จะได้อัตราต่ำ[5] ซึ่งไม่อาจจะนำมาใช้เป็นดรรชนีควบคุมคุณภาพของห้องปฏิบัติการได้

การเตรียมห้องปฏิบัติการให้มีความสะอาดปราศ-

จากเชื้อจุลินทรีย์และสารเคมีตลอดจนไอออนของแร่ธาตุที่เจือปนมากับอากาศมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพราะมลพิษของอากาศอาจจะไปปนเปื้อนต่ออุปกรณ์การเพาะเลี้ยงหรือแม้แต่น้ำเพาะเลี้ยงตัวอ่อนในขณะเตรียมตัวอ่อนไม่สามารถเจริญเติบโตไปได้[2] น้ำบริสุทธิ์ที่นำมาล้างเครื่องอุปกรณ์และภาชนะในการเลี้ยงตัวอ่อนต้องเป็นน้ำที่ปราศจากสารเคมีและไอออน[2] ปัจจุบันในห้องปฏิบัติการใช้น้ำบริสุทธิ์ที่เตรียมขึ้นเองโดยเตรียมจากเครื่องกรอง Milli-Q Reverse Osmosis System (Milli-Q Reagent Grade Water System U.S.A.) น้ำที่ได้จากเครื่องกรองดังกล่าวมีความบริสุทธิ์ถึง 18 เมกกะโอห์ม น้ำบริสุทธิ์ที่ได้ยังนำมาใช้เตรียมน้ำเพาะเลี้ยงตัวอ่อนซึ่งน้ำเพาะเลี้ยงตัวอ่อนที่ดีจะต้องมี Osmolality 280 $\pm$ 5 มิลลิออสโมล/กก.[6] และมีความเป็นกรด-ด่าง (pH) ระหว่าง 7.2-7.6 ปริมาณ CO_2 ในตู้อบมีความสำคัญในการควบคุมความเป็นกรด-ด่างของน้ำเพาะเลี้ยงตัวอ่อน หากปริมาณ CO_2 น้อยจะทำให้น้ำเพาะเลี้ยงตัวอ่อนเป็นด่างมากขึ้น ซึ่งจะมีผลทำให้อัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนช้าหรือถ้าปริมาณอ๊อกซิเจนในตู้อบมากเกินไป ตัวอ่อนอาจจะตายได้[7] การตรวจสอบปริมาณแก๊สทั้งสองในตู้อบขณะเลี้ยงตัวอ่อนจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง

การเจริญเติบโต และแบ่งตัวของตัวอ่อนในระยะแรก นอกจากจะต้องอาศัยองค์ประกอบในน้ำเพาะเลี้ยงได้แก่เกลือแร่ธาตุ, ความเป็นกรด/ด่าง และ osmolality ตลอดจนอุณหภูมิแล้ว พลังงานที่ตัวอ่อนจะต้องใช้ในการแบ่งตัว ยังเป็นปัจจัยที่สำคัญโดยเฉพาะพลังงานโปรตีนที่อยู่ในน้ำเหลืองที่อาจจะได้จากสัตว์หรือคนก็ตาม[3] การเลือกใช้น้ำเหลืองจากสายสะดือที่ติดกับรก (Fetal cord Serum, FCoS) มีข้อดีคือสามารถเก็บได้ง่าย ราคาถูก ซึ่งได้มีผู้ทดลองนำมาผสมกับน้ำเพาะเลี้ยงตัวอ่อนทั้งของสัตว์ และคนพบว่าได้ผลดี[8] แต่มีข้อเสียที่ต้องเลือกในรายที่มารดาไม่เป็น chorioamnionitis โดยเฉพาะการเก็บน้ำเหลืองนั้นต้องมีความระมัดระวังเป็นพิเศษ

จากปัญหาและผลการวิจัยนี้อาจจะสรุปได้ว่าสามารถสร้างหนูพันธุ์ผสม (F_1) จากหนูเพศผู้พันธุ์แท้ CD-1 กับหนูเพศเมียพันธุ์แท้ Balb/C ได้ที่ศูนย์สัตว์ทดลองในห้องที่มีอุณหภูมิและแสงสว่างที่พอเหมาะ หนูสายพันธุ์ผสมเพศเมีย (F_1) สามารถตอบสนองต่อการชักนำให้มีไข่สุกและผสมได้เป็นอย่างดี ไข่ที่ผสมแล้วในหลอดมดลูก เมื่อนำมาเลี้ยงในน้ำเพาะเลี้ยงที่เตรียมขึ้นโดยการปรับความเป็นกรด-ด่างและความเข้มข้นที่พอดีในตู้อบที่มีแก๊สผสมในอัตราส่วนที่พอเหมาะ ก็สามารถแบ่งตัวเจริญเติบโตไปได้ดี และสามารถนำกระบวนการนี้มาใช้เป็นวิธีการควบคุมคุณภาพของห้องปฏิบัติการได้ เพื่อที่จะนำประโยชน์ดังกล่าวไปทำการศึกษา และวิจัยในการปฏิสนธินอกร่างกายและการเลี้ยงตัวอ่อนในคนต่อไป

อ้างอิง

1. Quinn P, Warnes GM, Kerin JF, Kirley C. Culture factors in relation to the success of human in vitro fertilization and embryo transfer. Fertil Steril 1984 Feb; 41(2):202-210
2. Dandekar PV, Quigley MM. Laboratory setup for human in vitro fertilization. Fertil Steril 1984 Jul; 42(1):1-12
3. Shirley B, Wortham JWE, Witmyer J, Condon-Mahony M, Fort G. Effects of human serum and plasma on development of mouse embryos in culture media. Fertil Steril 1985 Jan; 43(1):129-134
4. Baukloh VL, Seki MM, Maas DHA. In vitro fertilization of the mouse. In : Semm K, eds. In Vitro Fertilization and Embryo Transfer. Hafez ESE. MTP Press, 1982.89-95
5. ประมวล วีรุตมเสน, วิสุทธิ์ บุญเกษมสันติ, เย็นจิต จันทร์-ประสิทธิ์, วิทยา ยศยิ่งยวด. การเลี้ยงตัวอ่อนของหนูในจานทดลอง. จุฬาลงกรณ์เวชสาร 2529 กันยายน; 30(9):875-882
6. Miyamoto H, Chang MC. Effect of osmolarity on fertilization of mouse and golden hamster eggs in vitro. J Reprod Fertil 1973 Jun;33(6):481-487
7. Brinster RL. Studies on the development of mouse embryos in vitro.1. The effect of osmolality and hydrogen on concentration. J Exp Zool 1965 Feb; 158(1):49-57
8. Leung PCS, Gronow MJ, Kellow GN, Lopata A, Speirs AL, McBain JC. Serum supplement in human in vitro fertilization and embryo development. Fertil Steril 1984 Jan; 41(1):36-39