

第20回 動物生殖工学研究会  
プログラム・抄録集

平成19年12月1日(土)

北里本館 大会議室

---

## プログラム

開会挨拶

会長 横山峯介

### 1 特別講演

Cre-変異 lox を用いた遺伝子交換システムによるエンドセリンの  
発生学的機能解析  
栗原 裕基先生  
(東京大学大学院医学系研究科)

### 2 一般講演

- (1) マウス麻酔薬 (イソフルレン) の実用化に向けて  
○ 望月忍・松田正史・石倉知征・久永勇・齊藤菜摘・佐藤桃子・長谷川孝徳  
(理化学研究所 免疫アレルギー科学研究センター)
- (2) イヌにおける着床前の胚発生および胚のガラス化保存  
—発生ステージによる凍結感受性の違い—  
阿部靖之<sup>1</sup>, 諏訪義典<sup>2</sup>, 鈴木宏志<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>帯広畜産大・原虫研セ・ゲノム機能学、<sup>2</sup>北海道盲導犬協会)
- (3) ちょっと素敵なおんちの話  
大塚 純 (ヤクルト本社中央研究所)
- (4) レーザーアブレーションシステム XYClone の概要説明  
角石 賀彦 (株式会社メトラン 国際部バイオサイエンスグループ)

### 3 技術領域指定演題～私の愛する体外受精法～

- (1) 体外受精法の紹介  
持田 慶司 ((独)理化学研究所 バイオリソースセンター 遺伝工学基盤技術室)
- (2) 熊大・CARD・資源開発分野における体外受精方法について  
堀本 紀代子、春日 幸恵、近藤 朋子、町田 宏美、中川 佳子、古賀 美佳、  
竹下 由美、土山 修治、金子 武人、中嶋 直己 (熊大・CARD・資源開発分野)
- (3) 三菱化学生命科学研究所におけるマウスの体外受精法  
日野 敏昭 (三菱化学生命科学研究所・生殖工学室)

懇親会

1 特別講演

Cre-変異 lox を用いた遺伝子交換システムによるエンドセリンの  
発生学的機能解析

栗原 裕基先生  
(東京大学大学院医学系研究科)

---

## 2 一般講演

### (1) マウス麻酔薬（イソフルレン）の実用化に向けて

- 望月忍・松田正史・石倉知征・久永勇・齊藤菜摘・佐藤桃子・長谷川孝徳  
（理化学研究所 免疫アレルギー科学研究センター）

日本の動物実験に係る法令の変遷は、議員立法により「動物の保護および保管に関する法律」が昭和48年に策定された。それをうけて昭和55年に「実験動物の飼養および保管に関する基準」が告示された。その後、平成11年に「動物の愛護および保管に関する法律」へ改正（罰則強化）され、平成18年に「実験動物の飼養および保管に関する基準」に苦痛の軽減が盛り込まれた。苦痛の分類はカテゴリーA～Eに分類され、苦痛の軽減には麻酔薬が必須のものである。麻酔薬は薬効と副作用をよく理解したうえで目的とする麻酔薬を選定する必要がある。われわれは、操作した胚を移植する際には、主にトリプロモエタノールやケタミン・キシラジンの混合薬を中心に用いてきた。取り扱い、管理方法が厳しくなったものや、安定的に購入することができなくなったものなどもあり、それらに変わる安全性（人に対しても）の高い小動物用の麻酔薬も併用できる体制整備の必要性があるものとする。

そこで、今回は麻酔薬として中動物などでは一般的に用いられている「イソフルレン」を候補として検討した。

麻酔器は株式会社シナノ製作所製のSN-487-1Tをマウス用として実用的なサイズに改良したものを用いた。メーカー推奨の吸引濃度、時間では十分な麻酔効果を得ることができなかった。術中、安定した麻酔効果が得られることが必須条件となる。実際は、麻酔 box にマウスを入れ導入麻酔（前麻酔：動きが止まるまで）を施し、その後安定した麻酔効果が得られるまで吸引させる。その後 box よりマウスを出し、マウスの鼻先にマスクを装着し術（移植中も吸引麻酔は継続させる）を行う。その後、覚醒を確認するといった一連の作業である。

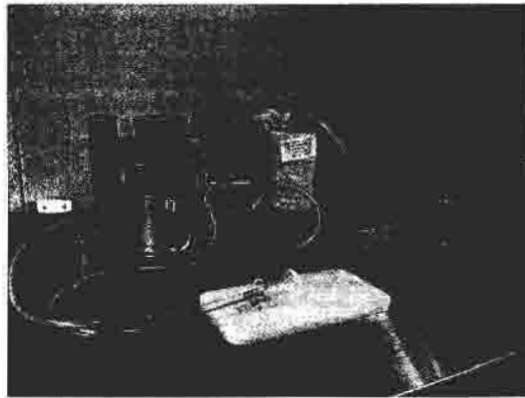
卵管移植を行う最適の条件として、麻酔濃度、前麻酔（導入）時間、麻酔（吸引）時間、覚醒までの時間を検討した結果、若干の知見が得られたので報告する。

卵管移植には十分使用可能であると感じたが、術中に吸引させるマスクの形状をさらに改良することによってより以上に使用勝手が良くなるものと思われる。また、効率よく気化したイソフルレンを回収する機器の開発も必須であるとする。

株式会社 シナノ製作所 (改良前型番 SN-487-1T)

雾化器濃度可変範囲 0.5-5%

雾化器必要最低流量 200ml/min



## (2) イヌにおける着床前の胚発生および胚のガラス化保存

—発生ステージによる凍結感受性の違い—

○阿部靖之<sup>1</sup>，諏訪義典<sup>2</sup>，鈴木宏志<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>帯広畜産大・原虫研セ・ゲノム機能学、<sup>2</sup>北海道盲導犬協会)

**【目的】**我が国では、慢性的な盲導犬不足が続いているが、その解決策のひとつとして、生殖工学技術を利用した盲導犬育成の効率化が考えられる。しかしながら、イヌの繁殖生理は十分に理解されていないことから、胚の凍結保存や移植などの技術開発は、他の動物と比較して大きく立ち遅れている。そこで本研究では、人工授精後の経過日数による胚の発生ステージおよび生殖道内の存在部位を調べるとともに、各発生ステージの胚をガラス化保存し、融解後の生存性について検討した。

**【方法】**人工授精を施したラブラドルレトリバーから、2～10日後に子宮および卵管を摘出し、PB1で灌流することによって胚を採取した。採取した胚は、5、10および20%エチレングリコール (EG) 溶液に、それぞれ5、2および2分間暴露した後、30%EG、0.5 M スクロース溶液に1分間暴露し、クライオトップに載せ液体窒素へ投入した。凍結保存後、0.5、0.25および0.125 M スクロース溶液にそれぞれ1分間暴露した後、PB1で洗浄することによって融解した。次に、胚の細胞膜の正常性を判定するため、10 μg/ml ヨウ化プロビジウム添加 PB1 中で染色後、蛍光顕微鏡下で観察し、赤色に染色された細胞 (割球) を被障害細胞、非染色細胞を正常細胞と判定した。

**【結果】**胚を採取した結果、22頭のドナー個体から計133個の胚が得られ、黄体数 (計164個) から算出した回収率は81.1%であった。採取部位別 (卵管、接合部、子宮) でみると、卵管では83.8% (31/37)、子宮・卵管接合部または複数箇所では77.4% (24/31)、子宮では81.3% (78/96) であり、部位による回収率の差異はみられなかった。また、胚の局在は、人工授精2～6日後 (推定 LH サージ8～10日後) では卵管、6または7日後 (推定 LH サージ10または11日後) では子宮・卵管接合部、6～10日後 (推定 LH サージ12～14日後) では子宮であった。得られた胚の発生ステージは、人工授精2～4日後では2～8細胞期、6～9日後では16細胞期～桑実期、10日後では胚盤胞であった。ガラス化・融解後の胚の生存性を調べた結果、8または16細胞期胚では正常細胞が全細胞の75%以上を占める胚が多く観察されたのに対し、胚盤胞では多くの細胞 (80%以上) が障害を受けていた。これらの結果から、ラブラドルレトリバーにおける着床前胚の発生速度および存在部位が明らかとなり、今後、効率的に胚を採取可能な基礎的な成績が整ったものと考えられる。また、本法によるイヌ胚のガラス化保存は可能であるが、発生ステージによる凍結感受性の差異が観察されたことから、ガラス化保存に供する胚の発生ステージを考慮する必要があることが知られた。

(3) ちょっと素敵なおんちの話

大塚 純

ヤクルト本社中央研究所

「人は自分だけでは生きていけない。母の胎内を出た瞬間から死ぬまで決して離れないヤツがいる。いくら嫌いだといっても離れない。その名は常在菌。」\*

素敵なおんちを作るために働いてくれる菌がいます。どんな働きをしているのでしょうか。

\*「人体常在菌のはなし」青木 卓著（集英社新書）から

#### (4) レーザーアブレーションシステム XYClone の概要説明

角石 賀彦

株式会社メトラン 国際部バイオサイエンスグループ

弊社取り扱いの米国 Hamilton Thorne Biosciences 社のレーザーアブレーションシステム XYClone の概要説明。

XYClone は Class I 赤外線レーザーを使用し、ターゲットの透明帯を正確かつ瞬時に切開できる装置です。

XYClone は先の尖ったピペットを使わずに核除去や細胞注入が行えるので、細胞の物理的損傷を最小限にして、細胞溶解を減らし、生産効率を高めることができます。

顕微鏡に簡単にに取り付けることができ Windows 対応のオペレーションソフトを使用するため、操作の習得が容易です。

レーザー光源一体型対物レンズモジュールはレーザー透過用に特別に設計された 40x の対物レンズを採用し、1480nm、300mW の赤外線レーザー光源で構成されています。ほとんどの倒立顕微鏡に対応し、蛍光観察、ホフマン観察などの標準的な顕微鏡機能をフルに利用することができます。

また一体型の為、レーザーとミラー、レンズの調整が出荷時になされており、使用する顕微鏡に依存することなく安全なレーザー照射ができるよう設計されています。

ES 細胞のインジェクション、体細胞移植、内部細胞塊単離、レーザーアシステッド IVF や ICSI に適しています。

臨床用の ZILOS-1k は国内でも 30 以上の施設で不妊治療に採用されており、その安全設計は高く評価されています。



株式会社 メトラン

本社/工場 〒332-0015 埼玉県川口市川口 2 丁目 12 番 18 号

TEL048-242-0333 FAX048-242-0550

神戸出張所 〒650-0015 兵庫県神戸市中央区多聞通 3 丁目 3-16

TEL078-341-7400

URL <http://www.metran.co.jp> Mail [kakuishi@metran.co.jp](mailto:kakuishi@metran.co.jp)



### 3 技術領域指定演題～私の愛する体外受精法～

#### (1) 体外受精法の紹介

持田 慶司

(独)理化学研究所 バイオリソースセンター 遺伝工学基盤技術室

バイオリソースセンターはナショナルバイオリソースプロジェクトのマウス中核機関として、マウス系統の収集・保存・提供を業務としている。当研究室は、体細胞核移植クローン技術、顕微授精技術、効率的な胚・配偶子の凍結保存方法、新規幹細胞樹立の4つの技術開発を研究の柱としている一方で、リソース機関として重要なマウス系統の保存に関する技術的バックアップも行っている。つまり当センターの立ち上げ以来6年間にわたり生殖工学技術の指導と協力を行ってきた中で、私の具体的役割は受精卵の作出～凍結保存～個体化までの一連の成績の安定化、および保存したリソースの管理であった。その受精卵作出の主流となっている体外受精法は、各論において様々なバリエーションがあり得ると思われるが、エンブリオバンクとして年間に百数十回行っている方法とは多少異なる、当研究室における体外受精法をここでご紹介したい。

受精率を左右する要因について挙げ始めるとキリがないほどで、卵子の条件、精子の条件、受精の場の条件を整えると共に、その後の発生のために最高の条件を作り出すためには、自分1人が実験を死ぬまで続けても答えは出ないと思われる。せいぜい、致命的なダメージを与えないよう配慮する程度に過ぎないことは、様々な近交系マウスなどを扱っていると身に染みることである。「いかに体内での受精の状態に近づけるのか」とは永遠の課題であり、野生由来マウスのある系統や AKR, 129、更には種を越えてしまうがスナネズミ・マストミスなどの経験から、体外受精とは深遠なりと感じてしまう。

例えば安楽死させてから何分以内に卵管を取り出す必要があるのか、培養液の水は何を使うべきか、Na pyruvate は調整後何時間で効果が落ちるものなのか、そして当然 BSA やオイルのロットチェックの必要性、精子の運動性や濃度の測定は重要かなどの疑問は常に感じるものの、一つ一つすべてを検証していくことは個人としては困難であろう。そんな中で、我々の行っている体外受精法を披露することが多少なりとも参考になればと考えている。

(2) - 熊大・CARD・資源開発分野における体外受精方法について -

福本 紀代子、春口 幸恵、近藤 朋子、町田 宏美、中川 佳子、  
古賀 美佳、竹下 由美、土山 修治、金子 武人、中瀧 直己  
熊大・CARD・資源開発分野

熊大大学生命資源研究・支援センター動物資源開発研究部門(CARD)・資源開発分野では、これまで、遺伝子改変マウスを中心に約1000系統以上の体外受精を行い、膨大な数の2細胞胚を作出している。本発表では当施設の体外受精方法について紹介する。

マウスの体外受精

1、過剰排卵処理方法

動物用セロトロピン(あすか製薬株式会社)、動物用ゴナトロピン(あすか製薬株式会社)を各7.5単位/匹

2、体外受精に用いる器具とその滅菌法

使用前に70%エタノールで消毒

3、血清アルブミンの選択

CALBIOCHEMの製品を使用

4、パラフィンオイルの選択

組織培養用流動パラフィン(ナカライテスク株式会社)を使用

5、シャーレの選択

35mmディッシュ(コーニング)を使用

6、培養液の作成、保存方法、使用期限等

作製・ロットチェック後、アンプル封入して4℃保存し、3ヶ月以内に使用

7、培養条件(温度、気相等)

37℃ 5%CO<sub>2</sub>

8、精子の採取方法(マウスの週齢、採取部位、培養液、活力検査の時期・方法を含む)

14週齢以上の雄の精巢上体尾部より採取した精子をFertiUP精子前培養培地100μlへ導入し、30分後倒立顕微鏡で目視にて活力判定

9、卵子の採取方法(マウスの週齢、培養液を含む)

10週齢の雌の卵子塊をHTF200μlのドロップに導入

10、授精方法(精子濃度を含む)

3-5μlの原精子懸濁液を卵子が入ったドロップへ添加(300-500精子/μl)

11、受精の判定方法

媒精後5-6時間後に倒立顕微鏡にて雌雄両前核、第2極体を観察ヒアルロニダーゼ添加無し

12、培養方法(卵の移し替え手順を含む)

形態的に正常な卵子をHTF100μlで3回洗浄し、翌日まで37℃5%CO<sub>2</sub>内インキュベータにて培養

13、受精率を左右する要因とその克服方法(系統差を含む)

静電気の除去、湿度の調整、精子運動性、媒精量(精子濃度)  
透明帯穿孔卵子の使用

14. その他留意すべきこと、コツ等

解剖から採卵、採精までの時間をスピーディに行う  
精子が空気にふれないよう採精をオイル中で行う  
静電気に注意する

---

### (3) 三菱化学生命科学研究所におけるマウスの体外受精法

日野 敏昭

三菱化学生命科学研究所・生殖工学室

体外受精は、卵子と精子の相互作用や受精のメカニズムを解明するための研究手段として開発され、大きな成果をはたしてきた。一方、個体作成や感染症動物の SPF 化といった実用的な面のみならず、生殖工学において、初期胚を得る手段として高い実用的価値を持っている。

三菱化学生命科学研究所において体外受精を行う目的は主に3つある。1つ目は系統保存のため、2つ目は個体作製のため、3つ目は SPF 化のためである。系統保存は、2細胞期胚を凍結保存しているが、十分量の2細胞期胚を計画的に得るために体外受精を行っている。また、行動解析のように大量の個体を一度に必要とする場合や、交配のかけにくいマウスに対して体外受精を行い、個体を作製している。SPF 化は、外部からの動物に対して体外受精を行い、清浄化してから動物施設に導入している。

本研究所で行なわれている体外受精は、豊田らが1971年に報告した「マウス卵子の体外受精に関する研究<sup>1), 2)</sup>」に準拠している。体外受精は、雌の生殖道内で起こっている現象を人為的に体外で起こさせることを意味し、成功させるポイントは、体外で起こさせる受精環境を体内での環境に可能な限り近づけることだと考える。本演題では、体外受精に必要な器具や培地の準備、過排卵処置や精子、卵子の採取について、我々が日常行っている方法に沿い、時系列にまとめて紹介する。

1) 豊田(裕)・横山(峯)・星(冬): 家畜繁殖誌, 16, 147-151, 1971.

2) 豊田(裕)・横山(峯)・星(冬): 家畜繁殖誌, 16, 152-157, 1971.