

コモンマーモセットの体外受精卵作製作業における工夫について

医学系部門 生命科学実験班

島山 照彦

1. はじめに

依頼業務において、『コモンマーモセットの飼育管理および研究補助業務』を行っており、そのなかで体外受精作業を定期的実施している。体外受精作業は、主に『ホルモン測定』、『ホルモン投与』、『採卵処置』、『精子採取』、『体外受精(IVF)』の作業に分かれている。最終的に、体外受精卵を得ることが目的だが、これら一連の作業を全て完結させるまでには、多大な時間と人手を要する。そのため、ひとつひとつの作業を簡便化・効率化することが重要となる。これらの作業のなかで、私は特に射出精子の採取手段および調整方法について検討を行っている。簡易的に射出精子を採取する手段と、体外受精に使用するための調整方法について検討をしているので、現在までの進捗状況を報告する。

2. 依頼業務について

私の依頼業務は、『衛生管理業務』、『飼育管理業務』、『研究支援業務』、『その他業務』の4つに分類されている。各業務の作業内容は以下の通りである。

(1) 衛生管理業務

- ・ 衛生設備と関連機器の運転および管理
- ・ 飼育機材等の衛生管理および保守
- ・ 動物死体および廃棄物管理

(2) 飼育管理業務

- ・ 実験動物の飼育管理および飼育関連のデータベース運用

(3) 研究支援業務

- ・ 生殖工学技術を用いた作業及び研究補助
- ・ 学生実習などの補助

(4) その他業務

- ・ その他動物実験、実験動物に関する業務

上記の『その他業務』の中で、業務指示者の参加しているプロジェクト『脳科学研究戦略推進プログラム』¹⁾の支援を行っている。本支援においては、コモンマーモセットの飼育管理ならびに生殖工学的な技術支援を定期的に行っている。

3. コモンマーモセットの飼育について

(1) 背景

2009年2月より、当動物実験施設において、コモンマーモセットの飼育(一部繁殖)を開始し、研究支援業務を行っているので、業務内容を紹介したいと思う。飼育開始の背景として、平成20年度より、当施設が文部科学省「脳科学研究推進プログラム」の拠点となっており、業務指示者の外丸祐介教授が、「コモンマーモセットの遺伝子改変後術の基盤整備(ES/体細胞クローン技術の応用)」というテーマで研究を進めていく上で、動物個体を飼育する必要になってきたため、今回飼育を開始することとなった。

(2) コモンマーモセットとはどのような動物か

広鼻猿類(新世界ザル)に属するコモンマーモセット(*Callithrix jacchus*, 以下マーモセット)は、小型の霊長類で、施設内での集団飼育に適しており、約半年に一回の割合で出産することが可能で、かつ多産のため、霊長類の生体資源として有用とされている。

(3) 飼育環境の整備

新規にマーモセットを納入するにあたり、施設内に飼育可能なケージ類が無かったため、既存のニホンザル飼育用ケージを改造することになった。必要箇所を修正・改造し、飼育作業に必要な物品を取り揃え、動物の納入・飼育開始に至った(図1, 図2)。

(4) 飼育管理について

日常管理は、健康チェック(動き・餌の摂取量・便



図 1. 改善前(ニホンザル用)



図 2. 改善後(マーモセット用)

等), 給餌, ケージ洗浄, 体重測定, 採血, ホルモン投与, 採卵などの作業を行っている. マーモセットは下痢を頻発することが知られており, 当施設においても下痢をする個体が存在する. 必要に応じて下痢止めや補食等を与え, 下痢の改善を試みている. また, 個体同士の闘争も度々起こるため, 最適なペアリングを試み, 相性を検索しながら, 飼育管理を行っている.

4. 体外受精卵作製作業の工夫について

(1) 目的

我々は, マーモセットの体外受精に取り組んでおり, 特に射出精子の採取手段および調整方法について検討を行っている. 簡易的に射出精子を採取する手段と, 体外受精に使用するための調整方法について検討をしているので, 現在までの進捗状況を報告する.

(2) 材料

精子採取には, 性成熟に達したマーモセット(EDM: C.Marmoset (Jic))の雄個体 6 匹(48~84 ヶ月齢)を使用した. 精子調整用および体外受精用の培地には, TYH と IVF100(株式会社機能性ペプチド研究所)を使用し, それぞれの培地で検討した. 電動ハブラシにラット気管送管用チューブを装着し, 振動で陰茎を刺激して採取を試みた(図 3).



図 3. 精子採取用の電動歯ブラシ

5. 実験 1 (射出精子の採取)

(1) 射出精子の採取方法

電動ハブラシで 10 秒間刺激し, 射出に至らない場合は更に 10 秒間刺激することで, 採取日を変えて各個体について数回の採取を試みた. また, 補助者無しでの採取を目指し, すべての個体において, 保定器を使用して採取した.

(2) 射出精子の採取結果

精子運動能に個体差はあるが, 簡易的に体外受精に供試できる精子が得られた. 5/6 匹から運動精子を採取でき, 4 匹については毎回採取することができた(表 1). また, 保定器を用いることで, 補助者無しの単独で採取することが可能であった.

表 1. 個体毎の運動精子の採取成績

採取回数	1	2	3	4	5	
個体1	○	○	○	○	○	5/5
個体2	×	×	×	×	×	0/5
個体3	×	×	○	○	-	2/4
個体4	○	○	○	○	-	4/4
個体5	○	○	○	○	○	5/5
個体6	○	○	-	-	-	2/2

6. 実験 2 (採取した精子の評価)

(1) 採取した精子の評価方法

採取した射出精子を体外受精用培地 2 ml に懸濁し、400 G で遠心した後に、38°C、5% CO₂、95% Air 下で静置することでスイムアップした精子をさらに 400 G で遠心・濃縮した(図 4)。濃縮した精子は、60 倍の顕微鏡下で観察し、ヒトの精子運動性評価方法(芝原浩章, 日産婦誌 59 巻 4 号, 2007 年 4 月, N 32-33)に準じ、運動精子率を評価した。希釈回数(1 回および 2 回)による精子運動性への影響を確認した。次に、培地による運動性の違いを確認するため、採取した精子を半量ずつ分け、TYH と IVF100 でそれぞれ希釈した後に、2 回希釈・濃縮して精子運動率を評価した。

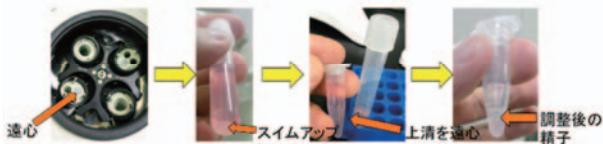


図 4. 精子の調整作業の略図

(2) 精子運動性評価方法

精子運動率は、運動性によって 4 種類(A~D)に分類し、5 カ所の視野で精子をカウントし、A+B の占める割合(%)で算出した。

- A: 速度が早く、直進する精子
- B: 速度が遅い、あるいは直進性が不良な精子
- C: 頭部あるいは尾部の動きを認めるが、前進運動していない精子

D: 非運動精子

(3) 採取した精子の評価結果

精子の運動性は、希釈回数で違いは見られなかった。また、TYH と IVF100 において違いは見られなかった(表 2, 表 3)。

(4) 体外受精・培養試験の方法

採取・2 回希釈調整した精子と、体外成熟卵子(M II 卵子)を用いて体外受精を実施した。体外受精した卵子は、媒精 6 時間後に全て培養用培地(ISM1)に移した。1-cell から 48 時間は低酸素条件(38°C、5% CO₂、5% O₂、90% N₂)で培養し、48 時間以降は、

表 2. 希釈回数による比較

培地	希釈回数	運動性				運動率
		A	B	C	D	A+B
TYH	1回	40%	22%	26%	12%	62%
	2回	32%	29%	26%	13%	61%
IVF 100	1回	60%	13%	17%	10%	73%
	2回	61%	13%	14%	9%	74%

表 3. 培地による比較

培地	運動性				運動率
	A	B	C	D	A+B
TYH	66%	10%	16%	8%	76%
IVF100	60%	18%	14%	8%	78%

10%血清を添加した ISM2 または BlastAssist を用いて、培養条件を変更(38°C、5% CO₂、95% Air)して MEF と共培養した。2 日に一度、1/2 量の培地交換をしながら、延べ 14 日間培養した。胚盤胞まで発生した卵子を観察し、体外受精率と発生率を求めた(図 5)。

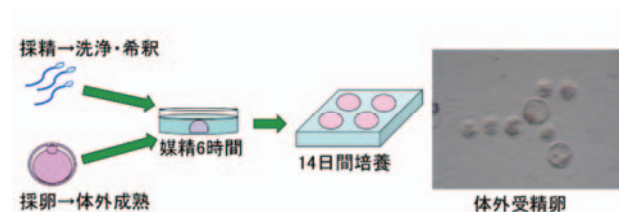


図 5. 体外受精・培養作業の略図

(5) 体外受精・培養試験の結果

体外受精試験を行い、安定的に受精卵を得ることができ、得られた受精卵は正常な発生能を有することが確認できた。これにより、精子の調整方法は適正であることが分かった(表 4)。

表 4. 体外受精・培養成績

体外受精培地	供試卵数	受精卵数	受精率	2細胞期	4細胞期	8細胞期	桑実胚	胚盤胞	発生率
TYH	14	9	64.3%	9	9	7	4	4	44.4%
IVF100	23	17	73.9%	17	17	16	12	10	58.8%

7. おわりに

マーモセットという動物自体，飼育や実験をしている研究機関は限られている．そのため，飼育・実験関連の情報が少なく，自分たちによって手探りで行わなければならないことが多いのが現状である．その厳しい状況の中で，少しでも技術職員としての支援ができるよう，日々，頭を柔軟にして工夫できる部分を模索しながら，業務に当たっていきたいと考える．

謝辞

マーモセットの飼育環境を整備するにあたり，ご指導賜りました公益財団法人実験動物中央研究所マーモセット研究部応用発生生物研究室²⁾の佐々木えりか様，並びに同研究部疾患モデル研究室の上岡美智子様，また，多大なるご指導ご助言賜りました，神崎道文技術班長に深く感謝致します．

参考 Web サイト(URL)，引用した情報

1) 脳科学研究戦略推進プログラム(文部科学省による HP)

<http://brainprogram.mext.go.jp/>

2) 公益財団法人実験動物中央研究所 HP

<http://www.ciea.or.jp/>