

連載 企画

マウス・ラット生殖技術の新時代 ～課題を解決し、職人技から誰でもできる技術へ～（I）

人工偽妊娠誘起法開発までの道のり

大阪公立大学大学院 獣医学研究科 金子 武人

はじめに

マウス・ラットは、古くから実験動物として多くの系統が樹立され研究に活用されている。そのため、新規系統の作製に必要な多くの遺伝子改変技術が開発されてきた。近年のゲノム編集技術の開発は、その勢いを加速させ、現在では様々な遺伝子改変系統が作製され研究に用いられている。生殖技術は、それら系統の作製、維持、保存において必要不可欠な技術であり、これまで多くの技術が開発されてきた。しかしながら、これらの技術は自動操作の機械などを用いる訳ではなく、その多くは修練した技術と経験により行われてきた。マウスにおいては、すでに多くの研究機関で必要な生殖技術を導入しているが、習得の難しさから必要であるにもかかわらず未だ導入することができない技術も見受けられる。筆者は、実験動物に必要な生殖技術を普及することを目的に、定期的に技術研修会を開催するとともに、これまで用いられてきた生殖技術をより簡易で確実なものに改良するための開発を行ってき

た。今回連載の機会をいただいたことでマウス・ラットを中心とした最新の生殖技術について開発までの道のりを紹介したい。第1回目は、近年開発、機材の製品化に成功した「人工偽妊娠誘起法」について紹介する。

マウスにおける胚移植の現状

胚移植技術は、体外受精胚、ゲノム編集胚、凍結保存胚などからの個体作製や病原微生物に感染した個体から採取した胚の清浄化などに用いられ、動物の個体作製に必要な技術である。マウスの胚移植においては、すでに技術を導入しそれぞれの研究機関で実施しているところが多いと思われる。胚移植には、産子を得るための胚とそれを移植する雌動物が必要である。雌動物の卵管や子宮内に胚を外科的に導入するのが一般的な方法であるが、マウスの場合は単に胚を移植しただけでは子宮に着床することはできない。マウスやラットなどの齧歯類は、不完全性周期動物に分類され、排卵後に形成される黄体が維持されない。このため、移植した

胚は子宮に着床することができない。黄体を維持するためには雄との交尾刺激が必要とされており、胚移植に用いる雌は交尾した雄由来の産子が得られないように精管を結紮した雄マウスとの交尾により刺激だけが与えられる。これにより雌は黄体が維持され、偽妊娠状態となる。この雌に移植した胚は子宮に着床でき産子に発生していくことができる。

ラットにおける胚移植の現状

ラットにおいても、胚移植は系統維持や新規系統の作製に用いられてきたが、近年のゲノム編集技術の応用により、その需要はこれまで以上に増加している。ラットも基本的にはマウスと同様の方法で雌の偽妊娠誘起が可能であり、胚移植の手技もほぼ同様であるためマウスに習熟していればそれほど難しい技術ではないと筆者は思っている。また、マウスと異なりラットは性周期が安定しているため精管結紮雄との交尾が正確に行われ、比較的容易に偽妊娠雌を生産することができる。今回の開発ではWistar-Imamichi系統を用いたが、数ある系統の中でこの系

続は4日間の正確な性周期を示すことに加え、非常に温順であるため取り扱いが容易であることから胚移植に推奨できる系統の一つである。

マウス・ラットにおける胚移植の課題

マウス・ラットともに移植した胚を子宮に着床させ産子に発生させる技術は確立されている。しかしながら、上述したように産子を得るための胚とそれを移植する雌動物に加えて精管結紮した雄が必要となる。国内ではマウスの需要が多いため複数の動物生産業者が偽妊娠誘起した雌動物を商品として販売しており、それを購入することで自家生産の必要はないが、納品数や納品日が限定されることにより高い計画性が求められるのが現状である。また、ラットにおいても偽妊娠誘起した雌を購入することはできるが、一部の地域では入手が困難である。自家生産する場合においても、個体サイズが大きいため生産専用の飼育スペースを確保しなければならないのが問題点として挙げられる。また、自家生産の場合は、動物が交配しなかった時は胚移植を中止しなければならないだけでなく、それを回避するため余剰に動物を生産することになり動物福祉の観点からも改善が必要である。

人工偽妊娠誘起法の開発

マウス・ラットにおける胚移植の課題から、筆者らは精管結紮雄を用いずに偽妊娠雌を計画的に自家生産できることが、問題の克服

さらには技術の普及につながると考えた。特にラットにおいては、需要の増加や商品購入の現状から自家生産しなければならないため、開発の必要性は非常に高かった。そこで筆者らの研究グループは、ラットにおいて精管結紮雄を用いずに人工的に雌に偽妊娠誘起する方法の開発に着手することになる。課題は、「雄の交尾行動から得られる刺激をどのような方法で再現するか」にある。歴史をたどると、これまでも人工的に雌に偽妊娠を誘起する方法は試されている。例えばガラスの棒を膣内に挿入し子宮頸部を刺激することで偽妊娠を誘起する方法が開発されている。また、膣内に電極を挿入し通電することで刺激を与え偽妊娠を誘起した報告も見られる。しかしながら、前者は作業員の手作業による技術的な差異、後者は動物愛護の観点からみても問題があるため良法とは言い難い。

そのような状況の中、共同研究機関であった一般財団法人動物繁殖研究所においてラットの交尾行動をモニタリングし、これらの行動パターンを元にして振動刺激を与えた結果、雌の性周期回帰が遅くなるということを発見した。そこで、この振動刺激を与えた雌が偽妊娠誘起されているのか検証するため、雌の卵管内に実際に胚を移植し、

着床するかを検討を行った。振動刺激は振動装置に装着した樹脂製プローブ（図左）を膣内に挿入し、30秒間の刺激を7回与えた。その後、麻酔下で卵管内に胚を移植し、産子までの発生を観察した。発情前期の雌に振動刺激を与えた結果、それらの雌はその後約14日間性周期の回帰は認められず、偽妊娠が誘起されていると考えられた。これらの雌を用いて刺激の翌日に胚を移植した結果、胚は子宮に着床し産子まで発生することが確認できた¹。これにより精管結紮を用いない人工偽妊娠誘起法が開発され、筆者らはこの方法を当初“Easy-ET”と命名し研究成果を報告した。

人工偽妊娠誘起法の改良とマウスへの応用

振動刺激により、ラットの偽妊娠誘起および胚移植による産子作出が成功した。しかしながら開発当初の方法は、7回目の刺激が終了するのに約40分を要していた。筆者らはこのプロトコルでは実用性が低く普及は難しいと判断し、作業の効率化を目的として刺激に要する時間の短縮を試みた。その



図：左) 人工偽妊娠誘起法開発当初の振動刺激装置、右) 製品化したラット用振動刺激装置

結果、30秒の刺激を2回与えただけでも偽妊娠が誘起できることが明らかとなり、移植した胚は産子にまで発生することが確認できた²。これにより作業時間の大幅な短縮に成功し、実用化の可能性が高くなった。さらに、刺激を与える時間は胚移植前日の発情前期のみならず、当日の発情期に刺激を与えても同様に産子が得られることがわかり、作業計画の幅を広げることができた²。これまで胚移植の前日に複数の雌の中から発情前期の個体を探しだし、精管結紮雄と交配させ偽妊娠誘起させることが必須であった。しかしながら、人工偽妊娠誘起法の開発により胚移植当日に偽妊娠誘起が可能となったことで、採卵、遺伝子導入、偽妊娠誘起、胚移植が1日で完了できるようになり、作業効率の大幅な改善に成功した。さらに、4日間の正確な性周期を示すWistar-Imamichi系統を用いることで、容易な個体選抜による計画的な胚移植が可能となった。

これまで得られた成果を論文や学会で発表すると、必ず聞かれる質問が「マウスでできますか？」である。読者の方もここまで読まれてそう思われたであろう。実験動物を用いた研究の現状を考えると想定内の質問であり、ラットでできればマウスで同じ方法を要求されるのは自然な流れである。そこで、筆者はこの方法がマウスにも適用できるのかを検証した。まずは、ラットで最初に成功した30秒間で7回の刺激パターンを用いて胚移植前日の発情前期の雌マウスに刺激を与えた。翌日これらの

雌に胚を移植した結果、マウスにおいても移植した胚は子宮に着床し産子に発生することが確認できた³。また、ラットと同様に胚移植当日に刺激を与えて胚移植したマウスからも産子を得ることに成功した³。これにより、マウス、ラットにおいて精管結紮雄を用いずに雌に偽妊娠誘起させ、胚移植に用いることができる新しい生殖技術が完成した。

人工偽妊娠誘起法の活用

これまでに、この人工偽妊娠誘起法を用いて自然交配胚、体外受精胚、凍結保存胚、ゲノム編集胚など多様な胚から産子が得られることを確認している。現在、精管結紮雄を用いて偽妊娠動物を自家生産している研究機関には、ぜひこの技術を活用していただきたい。筆者自身も人工偽妊娠誘起法を活用し現在、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）の創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム（BINDS）の支援を受けてトランスジェニック、ノックイン、ノックアウトといった遺伝子改変ラットの作製支援を行っている（F5-2疾患モデル動物提供支援<https://www.binds.jp/supports/F5-2>）。もし、所属する研究機関の研究者から作製の依頼を受けているが、まだ支援体制が整っていないというところがあれば、ぜひご相談いただきたい（個体作製料は無料です）。

おわりに

ラットの偽妊娠誘起に用いる振動装置は、開発当初のプロトタイプ

（図左）から操作性の良いデザインで振動刺激が伝わりやすい良好な材質のプロープが考案され、2023年10月に株式会社夏目製作所から「EGET」と命名され販売を開始した（図右）。前述の様にこの技術はEasy-ETと名付けたはずだったが、会話の中での「イージーイーティー」が「Easy-ET → EGET」にすり替わってしまった。しかし、EGETを読み替えると「イーゲット」になり、なんとなく産子が得られるようなニュアンスで、結局この名前「EGET：イーゲット」が採用され販売されることになった。現在、マウス用の販売に向けて準備しており、これを読まれる頃には販売が開始できるように体制を整えている。マウス、ラットともに人工偽妊娠誘起法を活用いただき、それぞれの施設において胚移植の新規導入や作業環境改善に少しでも貢献できれば幸いである。

参考文献

1. Kaneko T, Endo M, Tsunoda S, Nakagawa Y, Abe H. Simple induction of pseudopregnancy by artificial stimulation using a sonic vibration in rats. *Scientific Reports* 10, 2729. 2020. doi: 10.1038/s41598-020-59611-1.
2. Endo M, Tsunoda S, Tawara H, Abe H, Kaneko T. Successful pseudopregnancy of rats by short period artificial stimulation using sonic vibration. *Scientific Reports* 12, 1187. 2022. doi: 10.1038/s41598-022-05293-w.
3. Wake Y, Endo M, Tsunoda S, Tawara H, Abe H, Nakagawa Y, Kaneko T. Successful induction of pseudopregnancy using sonic vibration in mice. *Scientific Reports* 13, 3604. 2023. doi: 10.1038/s41598-023-30774-x.