

偽妊娠ラット作製器具 ～EGET～の紹介

株式会社夏目製作所 プランニングチーム
永井 類、小川 哲平

■EGET開発の背景について

胚移植とは、「体外に取り出した・体外で作製した胚を、雌の卵管、子宮内に導入し、着床させ産子を得る技術」であり、その技術は実験動物に限らず、臨床や、産業動物などでも広く使用されている。

胚移植の歴史は、実は古く、ウサギを用いた報告はHeape, W.より1890年に報告されており、マウスでは1956年にMcLaren, A.& Michie, D.らにより、ラットでは1959年にNicholas, J. S.らにより報告されている¹⁾²⁾³⁾。

動物実験領域での胚移植技術は、1. 遺伝統御として（遺伝子改変動物作製、突然変異から元の遺伝子形質への復元など）、2. 微生物統御として（胚クリーニング、SPF化など）、3. 自然交配できない個体の作製（病態モデルなどの維持、供給など）、4. 施設管理の省力化（繁殖個体の削減、省スペース化など）、5. 輸送（凍結胚を用いる場合など）、6. 災害対策（貴重な遺伝子資源の保存）、などの幅広い分野で活用されている。

マウス・ラットは、不完全性周期動物（ヒトは完全性周期動物）であり、黄体が機能しないため、妊娠状態になるためには交尾刺激が必要である。

従来の胚移植では、レシピエントとなる雌と、精管結紮を行った雄との交配を行う方法にて、偽妊娠誘起を行うことが一般的であった。

そのため、実験計画上「性周期既知の雌個体の確保」「精管結紮雄の作製」「精管結紮雄の維持」「プラグの確認作業」「適正なタイミングでの胚移植作業」など、多くの時間的・経済的コストを払う必要があった。

一部の地域では、偽妊娠雌の購入が可能であるが、胚移植に供するまでの時間的な制約もあり遠方への輸送が難しく対応エリアは限定的である。日時や匹数が限定的になる状況も多く、急なオーダーでは希

望の匹数を準備できないケースも考えられる。

このような背景から、より簡単に偽妊娠雌を作製できるよう、動物にも、実験者にも、経済的にも負担の少ない方法での偽妊娠誘起法が求められていた。

過去にはガラス棒や電気刺激での報告⁴⁾⁵⁾があることから、このような課題は広く認識され、個々に課題解決のアプローチを行っていたことが示されている。しかし、偽妊娠誘起法を実践するための標準的なプロトコルと器具を合わせて入手する状況までには至っていなかった。当社では、岩手大学様、動物繁殖研究所様と協力して、このような課題を解決するための製品化に取り組むことになった。

■Wistar-Imamichi系ラットの性行動について

動物繁殖研究所で維持されているWistar-Imamichi系ラット（以下、W-I系ラット）は、温和しくて取扱い易く、9週齢以上の雌では性周期は100%安定した4日周期を描き、明確な発情兆候を示す。そのことから、W-I系ラットは偽妊娠動物作製には最適な系統である。以下に動物繁殖研究所が2017年東北実験動物研究会にて発表した内容からW-I系ラットの性行動についてご紹介する。

表1で示されているのは、雌40匹に対して49日齢から膣垢像を観察して調べた結果である。7週齢で87.5%、8週齢で97.5%、9週齢で100%の動物が正常な4日性周期を描いている。

このように非常に安定性の高い若齢性成熟をみせるW-I系雌ラットだが、その交尾行動パターンを説明する。交尾行動には乗駕のMount、挿入のIntromission、射精のEjaculationがあり、子宮頸管への交尾刺激を伴う行動はこの3つの内、挿入と射精で

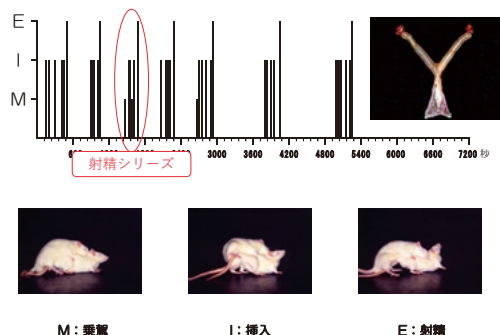
表1

正常4日性周期化の週齢

7 週齢	8 週齢	9 週齢
87.5 %	97.5 %	100.0 %

n=40
ギムザ染色法による膣垢像で判定

表2 Wistar-lmamichi系雄性ラットの交尾行動パターン



不完全性周期動物における交尾刺激と妊娠の関係

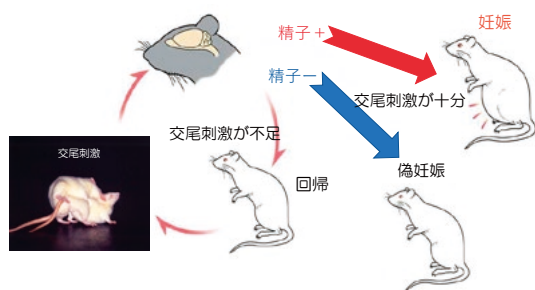


図1

ある。

乗駕あるいは挿入から始まって射精で終わる、この一連の行動を射精シリーズと呼び、若齢性成熟W-I系ラットの雄は2時間の間に6から8回射精をする。

表2は、7200秒間（2時間）の交尾行動パターンであり、短い線が乗駕（M）、中程度の線が挿入（I）、最も長い線が射精（E）を示す。これより、同居からおおよそ1時間半で7回の射精シリーズがあったことが分かる。射精シリーズごとに雄はプラグの形成をとまなう射精をする。

不完全性周期動物における交尾刺激と妊娠の関係については、図1で示すように子宮頸管への交尾刺激が脳に伝わり、交尾刺激が十分で精子が有る場合は妊娠、交尾刺激が十分でも精子が無い場合は偽妊娠、交尾刺激が不十分だった場合は性周期回帰となる。

つまり、偽妊娠動物を作製するためには、「必要十分量の子宮頸管に対する刺激」が不可欠であることがわかる。

そこで、この必要十分量の刺激を、安全かつ短時間で疑似的に与えることができる器具として偽妊娠ラット作製器具EGET（イーゲット）を開発した。

■EGETの使用法

EGETの使用は「保定」「挿入」「振動」の3つのステップに分かれる。

まず「保定」についてだが、刺激を与えている間に動物が動いてしまわないことが重要となる。EGETパッケージにも印刷されているイラスト（図2）のように実施者の脇と腕に動物を挟み、左後肢を親指・人差し指、右後肢を小指・薬指で保定する（または右後肢は脇に当てて保定する）方法（写真1）は挿入部が見えやすく有効である。また、動物をケージトップに乗せ、後肢が持ち上がらない程度に尾を上へ引っ張るようにして膣部を露出する保定（写真2）での実施も可能である。

「挿入」はEGETのプロブ（φ5mm×L27mm）を膣に挿入する操作となる。挿入したプロブ先端部が“子宮頸管にしっかり当たっていること”を確認する。また、このときプロブ先端を微酸性水などで濡らしておくとし挿入がしやすい（ただし、エタノールな



図2



写真1



写真2

どの刺激性が強い消毒薬は動物に痛みを与える可能性があるのでは不向きである）。

挿入ができれば、EGET本体のスイッチを押すとバイブレーションが始まる。「30秒刺激を与え、スイッチを切り、30秒休憩」を3セット行う。ちなみにEGETはスイッチを入れて30秒経過後にバイブレーションのリズムが一瞬変動し、刺激時間の目安とできる。

EGETは与える刺激（バイブレーション量）を担保するため、使用期限を250匹また1年間のいずれか早く到達するタイミングとしている。

■EGETで期待できる効果/成果

このようにEGETでは簡単な方法で偽妊娠状態の雌を短時間で作製することができる。精管結紮雄が不要となるため、使用動物数が削減（Reduction）でき、その雄の生体購入コスト、生体維持するための飼育スペース・飼育管理コストや作業時間も全て不要となる。

また、精管結紮雄を使用し、偽妊娠雌を作製す

る場合はそれらの一晚同居が必須となるが、EGETを用いた作製方法であれば、短時間での作製が可能となる。大阪公立大学（元岩手大学）金子武人先生の研究では胚移植当日に刺激を与えた場合でも移植した受精卵が着床し発育することを確認されている（論文：Successful pseudopregnancy of rats by short period artificial stimulation using sonic vibration, PMID35075219, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35075219/>）。

■EGETの今後の展望

EGETを用いた偽妊娠作製法については、マウスへ技術展開する要望が非常に強く、現在開発が進んでいる。ラットとマウスでは繁殖行動が異なり、偽妊娠を得るために必要な刺激量が異なるため、「刺激」操作のプロトコルやマウスの膣に挿入するにあたり動物にとって負担のないプローブ径などの検討を行っている。

一般的に使用数の多いマウスにも転用することができれば、削減できる動物数や実験コストへのインパクトも大きく、貢献度は高くなると考えている。

EGETはノルウェーに本部をおく3Rs製品のデータベースサイト“norecopa”（<https://norecopa.no/norina/kn-595-e-get-apparatus-for-creation-of-pseudo-pregnant-rats/>）にも掲載をされ、海外からの注目が高まっており、海外機関への導入も始まっている。今後、国内でのアカデミア・企業における教育のシーンでもReductionを達成する一手法として、紹介いただけるよう更に情報発信したいと考えている。

夏目製作所では、より一層の実験動物業界関係者との連携による製品・サービスの実現化を目標に掲げている。研究者・実験者の皆さまが抱える“お困りごと”を「まずは夏目に聞いてみよう」とご相談いただけるような取り組みを意識して、活動を行っている。昨年10月にオープンしたコンシェルジュサイト（図3）もその取り組みの一つであり、“一人のアイデアからの特注品を業界全体のノウハウとして使えるよう”、“より良くなりそうならやってみる”を皆さまと伴走させていただきながら、実現していくためのメッセージサイトとなっている。



図3

参考文献等

1. Preliminary Note on the Transplantation and Growth of Mammalian Ova within a Uterine Foster-Mother. Heape, W. Proceedings of the Royal Society of London (1854-1905). 1890-01-01. 48:457-458
2. Studies on the Transfer of Fertilized Mouse Eggs to Uterine Foster-Mothers: I. Factors Affecting the Implantation and Survival of Native and Transferred Eggs. Anne McLaren, Donald Michie, J Exp Biol (1956). 1956-06-01. 33 (2): 394-416.
3. Development of Transplanted Rat Eggs. J. S. Nicholas. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine (1933). Volume 30, 1111-1113.
4. ラットにおける電気刺激による簡便な偽妊娠誘起法. 東北大学農学部 菅原七郎・竹内三郎. 日本畜産学会報35 (1956) (tokubetu), 80-86.
5. マウス・ラットの人工授精法の検討. 東北大学農学部 猪 貴義. 実験動物彙報10巻4-6号(1961), 107-110.

(日動協ホームページ、LABIO21カラーの資料の欄を参照)