

非発情雌を用いて偽妊娠マウスを作出してみた

野口 裕司（基礎生物学研究所 技術課）

NOGUCHI Yuji: Generating pseudopregnancy mice using non estrus female mice

1. はじめに

体外受精で得られたマウス胚を個体へと発生させるためには、偽妊娠を誘起した受容雌が必要である。普段、休止状態にある黄体に対して、雄との交尾刺激により活性化させることを偽妊娠という。その黄体が機能しなければ、胚移植を試みたとしても、産子を得ることはできない。一般的には胚移植日の前日夕方に、精管を結紮した雄と一晩同居させることで作出する。ただし、雄との交尾を成立させる条件としては、雌が発情していることである。そのため、計画的に偽妊娠マウスを作出するにあたっては、メスコロニーの中から、発情兆候を示す個体、すなわち性周期が発情前期にある雌を探し出すことが求められる（図 1-左）。同居後の翌日、交尾に至った雌の外陰部には、膣栓（交尾成立の証である乳白色の凝固塊）が形成される。



図 1. 雌の外陰部に現れる変化の違い

本来、マウス雌は、4～5日の周期で発情する（「発情前期」、「発情期」、「発情後期」、「発情停止期」の4期を順に繰り返す）。しかし、長年に亘って本作出作業に携わってきた経験上、その規則性は大いに失われている印象を受ける。通常であれば、コロニー全体の1/4が発情前期の個体であっても不思議ではないのだが、実際は10～15%といった感じではなかろうか。もしかしたら、リー・ブート効果（Lee-Boot effect）により、発

情の遅延や不規則化が生じてしまっているのかもしれない。その結果、非発情状態の個体が多数存在することとなり、発情前期雌の数が少なくなっているものと考えられる。そこで、その様な状況を逆手に取ってみた。従来の方法（発情前期雌を使用）ではなく、圧倒的なシェアを占める非発情雌の方に注目し、それらを用いて偽妊娠マウスを作出することができるか否か、その可能性について検討してみた。

2. 方法

雌の集団飼育によるリー・ブート効果を補完する術として、ホイットン効果（Whitten effect）が知られる。非発情状態にある雌が、雄の尿中に含まれるフェロモンに暴露されると、約72時間後（約3日後）に発情が開始されるという。この作用を利用すれば、発情前期雌の場合と同様、偽妊娠マウスを作出できるのではないかと考えた。

午前時（10:30～11:30）、メスコロニー（Jcl:ICR、10～19W、最大10匹/ケージ）において、明らかに発情兆候が見られない個体を識別する（図 1-右）。外陰部が膨張しておらず、赤みを帯びていないものを敢えて選び、精管結紮雄とつがいで3日間同居させる。その3日目に、雌の外陰部を観察して膣栓が確認されたものを、偽妊娠マウスとして使用した。なお、交尾成立（膣栓の有無）の判定は、毎朝実施した。

3. 結果

偽妊娠マウスとして実用する上では、クリアすべき3つの課題があると考えられる。1）計画的に作出できること、2）きちんと産子が得られること、3）胚移植のタイミングが見極められること、である。それぞれを検証してみた。

(1) 計画的に作出できるのか？

雌雄を同居させておけば、いつの日か交尾は成立する。しかし、無計画な作出は、実験に支障を来すため、胚移植日の予定に合わせ、偽妊娠マウスを用意する必

要がある。実際のところ、ホイットン効果の影響により、雄を受け入れて交尾が行われる発情期が、3日目に到来するのであろうか。本試みは、2021年度から検証を開始しており、計296匹の雌を用いた。その結果、全体の217匹（73%）が3日目に膣栓が確認された。他、1日目が5匹（2%）、2日目が38匹（13%）、そして全く膣栓が確認されなかったものは36匹（12%）であった。なお、毎度作出作業において、半数以上の雌雄ペアが、期待する3日目に交尾成立に至った（図2）。

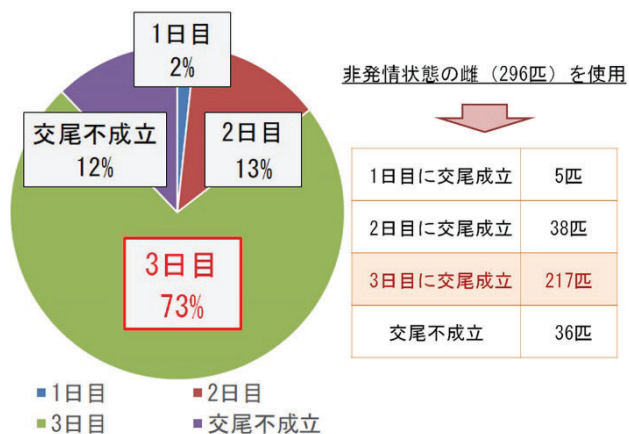


図2. 非発情雌を用いた交配の結果

(2) きちんと産子が得られるか？

3日目に膣栓が認められた217匹の雌に対して、B6系マウスの2細胞期胚（新鮮卵および凍結卵）を経卵管壁卵管内移植法にて移植してみたところ、191匹（88%）が無事出産に至った（帝王切開も含む）。なお、従来の方法と同様、卵管膨大部の膨らみが弱い場合は、偽妊娠が誘起されていない恐れがあるため、胚移植を断念した（図3）。

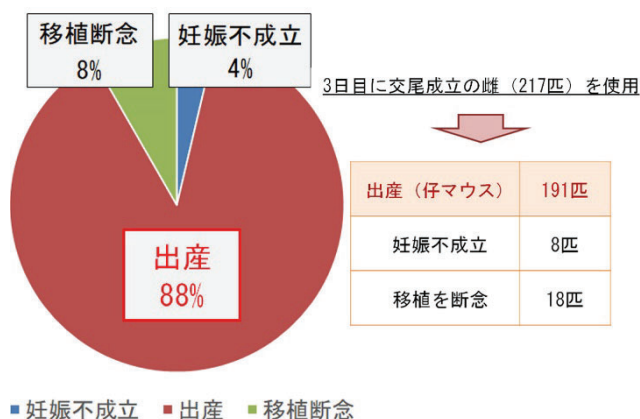


図3. 3日目に交尾が成立した雌への移植結果

(3) 胚移植のタイミングを見極められるか？

3日間も雌雄が同居していると、いつ交尾が行われるか、明確に把握することは困難であるため、その見極めは非常に重要となる。なぜなら、作出した偽妊娠マウスは、随時、胚移植に用いられるわけではない。初期胚は、偽妊娠1日目（0.5dpc）が適切なタイミングと言われる。その翌日の偽妊娠2日目に胚移植を試みたが、殆ど妊娠することはなかった。幸い、卵管膨大部の膨らみが、日によって変化することを観察することができ、見極めの目安となる。偽妊娠1日目の場合、見事に膨張する卵管膨大部が、偽妊娠2日目になると、打って変わって萎んでしまう。

4. まとめ

従来の発情前期雌を用いた方法と比べ、3日後の作出となるが、偽妊娠マウスとして十分活用できるものとする。雌の性周期に依存する必要がないため、小規模なメスコロニーであったとしても、数多くの偽妊娠マウスを得ることができ、作出作業に支障はなかった。これまでは約400匹の雌を常に保有して対応してきたが、今日は120匹前後まで飼育規模を縮小し、飼育コストおよび作業労力、作業時間の軽減に繋がった。また、非発情状態の雌が充実している状況であるが故に、束縛のない自由な時間帯（午前も可能）、かつ極めて短い作業時間（10分程度）で対応できるなどの様々な利点も得られた。さらに、雌を選抜する者の熟練度が求められないこともあり、経験の浅い初心者が作出作業を担う可能性についても期待できる。

ただ、本試みは、作出効率に多少の課題を持つ。目的の日に必ずしも交尾に至るわけではないため、その点を補う上でも、状況に応じて従来の方法を用いると良い。双方を両立し、互いの欠点を補填し合うことで、より実用性のある手段に成り得ると考える。少なくとも、一定の週齢を超えた雌はすべて安楽死処分の対象になることから、購入したマウスを無駄にしないという観点から見て、ひとつの有効な方法ではなかろうか。

謝辞

本件の試みに際して、様々なご尽力をいただきました。元(株)ジェーエーシーの藤本大司氏に深く感謝いたします。