

令和6年度実験動物関係高度技術研修の報告

山中 緑（生理学研究所 技術課）

YAMANAKA Midori : Report on advanced technical training related to experimental animals in 2024

Every year, The Japanese Association for Laboratory Animal Facilities of National University Corporations (JALAN) holds training sessions every year to improve the quality of staff involved in animal experiments at universities and other institutions, and to promote the development of education and research. In fiscal year 2024, "Advanced Technical Training on Reproductive Engineering Techniques for Experimental Animals Other Than Mice" will be held at Kyoto University, and "Mouse Reproductive Engineering" training will be held at Kumamoto University. I was able to participate in both training sessions, so I will report on the training content."

1. 概要

国立大学法人動物実験施設協議会（国動協）では毎年大学等における実験動物関係職員の資質向上と教育・研究の発展を図るため、研修を開催している。令和6年度は「マウス以外の実験動物の生殖工学技術に関する高度技術研修」が京都大学、「マウス生殖工学」の研修が熊本大学で行われることとなり、2つの研修に参加することができたため研修内容を報告する。

2. 研修報告

1) マウス以外の実験動物の生殖工学技術

2024年10月22日（火）から10月25日（金）まで（図1）、京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設で行われた。受講者は10名で技術職員とURA（University Research Administrator）であった。ラットの生殖工学の導入を検討している方が多く、経験者は少なかった。講習はラットの生殖工学を中心に講義・実習が行われ、実習の合間にラット以外の生殖工学についての講義が行われた。実習では実習生2名に対し、講師1名の手厚い実習だった。

10月22日(火)	
13:00~13:05	研修・講義・Q&A 閉校式(閉会の挨拶)
13:05~13:30	講師紹介・参加者自己紹介
13:30~14:30	講義:NBRRラットの紹介とラットの生殖工学技術
	休憩
14:45~16:45	実習:ラット取り扱いの基本
	休憩
17:00~18:00	講義:齧歯類の生殖工学技術概論
18:30~20:00	ウエルカム・レセプション(4階セミナー室)
10月23日(水)	
	研修・講義・Q&A
9:00~12:00	実習:ラット精子の凍結保存
12:00~13:00	休憩
13:00~14:30	講義:ラットのゲノム編集
	休憩
14:40~16:10	講義:マウス以外の生殖工学技術
16:10~17:10	見学:動物実験施設の見学(医産連携サル舎む)
17:30~19:30	懇親会(4階セミナー室)
10月24日(木)	
	研修・講義・Q&A
9:00~11:00	実習:ラット精子の融解とCapacitation
11:00~12:00	休憩
12:00~13:30	実習:ラット卵子の採取とInsemination
	休憩
14:00~15:30	講義:ゴールデンハムスターの生殖工学技術
	休憩
15:40~17:10	講義:ブタの生殖工学技術と医療応用への展開
	休憩
17:20~18:20	実習:受精卵のwashと培養
10月25日(金)	
	研修・講義・Q&A
9:00~11:30	実習:偽妊娠ラットへの2cellの移植
	休憩
11:40~12:00	修了書授与・閉校式(閉会の挨拶)

図1. 研修日程表

【研修内容】

A) 精子の凍結保存



図2. 精巢上体を刻むところ

卵黄凍結液の中で精巢上体尾部に切りこみを入れて（図2）、精子混濁液を作成し、凍結を行った。融解したところ、精子濃度が薄いことが判明し、切りこみが甘く、十分な精子量が得られなかった。ラットの精子凍結は、①1時間室温静置 ②15分冷蔵庫に静置 ③液体窒素に浮かべたフロートで15分静置と徐々に冷やす方法で、マウスとは異なっていた。

B) ラットの過排卵処理のスケジュール

時間が重要で3つ目のホルモン投与から16~18時間を超えると卵子が劣化して受精率・発生率が悪くなるということだった（表1）。

表1. ホルモン投与のタイミング

DAY1	LHRH(200μL/匹)投与 11:00~17:00 雌3.5~4.5週齢
DAY3	PMSG(300IU/kg)+AIS(100μL/匹)投与 18:00~21:00
DAY5	hCG(300IU/kg)投与 18:00~21:00
DAY6	採卵・媒精
DAY7	胚移植

C) 偽妊娠ラットの準備

偽妊娠ラットを作製する際は膣栓を見つけやすいようにケージに金網入れて、雌雄を交配させるということだった。

D) 2cell 胚移植

卵管采から 2cell を移植した。マウスよりはやや大きいため、うまく胚を導入することが出来た。

2) マウス生殖工学技術

2024 年 11 月 19 日 (火) から 11 月 22 日 (金) まで (図 3)、熊本大学生命資源・支援センターで行われた。受講者は 15 名で国立大学法人及び大学共同利用機関法人の方やその他の機関や企業から参加していたが、マウスの生殖工学は未経験の方が多かった。実習では実習生 2 名に対し、講師 1 名の手厚い実習だった。

11月19日(火)	
時間	研修・講義・Q&A
8:40~9:00	受付
9:00~9:30	開校式・挨拶・お知らせ・研修の説明、自己紹介
9:30~9:40	準備・移動
9:40~11:30	実習:新鮮精子を用いた体外受精 (解剖・採精・採卵・採精)
11:30~12:00	講義:マウス生殖工学とCARDマウス/バンク
12:00~13:00	昼食・休憩
13:00~14:00	実習:マウスピース・キャピラリー作製と胚操作の練習
14:00~15:00	実習:精子の洗浄
15:00~15:10	休憩
15:10~16:00	実習:帝王切開
16:00~16:30	講義:動物実験施設管理における生物モニタリング
16:30~17:00	実習:精子の観察
17:00	実習終了

11月20日(水)	
時間	研修・講義・Q&A
8:30~9:20	実習:2細胞胚のカウント
9:20~10:30	実習:胚の凍結保存
10:30~10:40	休憩
10:40~12:00	実習:精子の凍結保存
12:00~13:00	昼食・休憩
13:00~14:30	胚の凍結保存
14:30~14:40	休憩
14:40~16:00	実習:胚の融解
16:00~17:00	実習:精巣上体尾部の冷蔵保存
17:00	実習終了

11月21日(木)	
時間	研修・講義・Q&A
9:00~11:20	実習:FERTILIPを用いた体外受精 冷蔵精子・新鮮精子 実習:FERTILIPを用いた体外受精 凍結精子・新鮮精子
11:20~12:00	実習:卵管内移植1
12:00~13:00	昼食・休憩
13:00~14:00	精子の洗浄
14:00~15:00	実習:精管精管の作製
15:00~15:10	休憩
15:10~16:20	実習:冷蔵胚の回収
16:20~17:00	実習:精子の観察
18:00~20:00	情報交流会

11月22日(金)	
時間	研修・講義・Q&A
9:00~9:40	実習:2細胞胚(凍結精子および冷蔵精子)のカウント
9:40~12:00	実習:卵管内移植2 記念撮影・昼食・休憩
12:00~13:00	講義:最先端技術 (マウスおよびゾウガの生殖系・生殖工学)
13:00~14:20	休憩
14:20~14:30	休憩
14:30~15:30	実習:生殖工学パーソナルトレーニング
15:30~16:00	閉校式・研修成果の振り返り及びまとめ
16:00	解散

図 3. 研修日程表

【研修内容】

A) キャピラリーホルダー

胚の移動は呼吸で行っている。唾液が胚に影響するためフィルターを付ける。フィルターの大きさが小さい場合は頻りに交換したほうがよい。半年に 1 回すべてを作り直しているとのことだった。

B) 精巣上体尾部の冷蔵保存輸送

近年発表された精巣上体を冷蔵保存し輸送する方法は、精子を凍結して液体窒素で輸送するより安くなるとのことだった。冷蔵保存輸送で重要なことは ①精巣上体のチューブを入れる紙箱を輸送時まで冷蔵で保存する ②輸送時の温度管理のために温度のログをとる ③精巣上体のチューブが傾かないように入れることだった。

C) 2cell 胚の冷蔵保存輸送

精巣上体尾部同様 2cell 胚の冷蔵保存輸送が可能で、その胚を凍結しても問題ないとのことだった。

D) パーソナルトレーニング

研修内容から重点的にトレーニングしたい手技などを各自で行った。

・精子混濁液の調整

精子凍結保存で調整した混濁液の濃度が薄かったため切りこみを入れるコツなどを教わった。

・卵管灌流

トレーニングの一つに選択肢があったため行ったが、卵管に培養液をうまく注入することが出来ず、胚を取り出すことはできなかった。

3. まとめ

1) マウス以外の実験動物生殖工学研修

現在はマウスの生殖工学を行っており、ラットの生殖工学は以前に短期間研修を受けたことはあったが、今回のようにじっくり行うことはなかった。マウスの生殖工学技術は発展成熟してきているが、ラットは発展途上で、精子の凍結技術は最近の技術であり、また受精卵の凍結技術は開発段階とのことだった。ラットの精子凍結事業や胚移植を行うには準備も必要で、これら学んだ技術を習得し、今後請け負うことを目指している。

2) マウスの生殖工学研修

平素行っている作業を見直す機会となり、参加者や講師との交流は、マウスの生殖工学における様々な知見を得ることができ、今後の業務に活かすことのできる有意義な講習となった。研修後に体外受精や胚移植を行ったところ、研修の成果が出たようで成績が良かった。さらにはマウス精子やマウス胚の冷蔵輸送は興味深く、今後の業務に活用していきたいと考えている。

謝辞

1) マウス以外の実験動物生殖工学研修

京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設
浅野 雅秀 教授、職員の方々

2) マウスの生殖工学研修

熊本大学生命資源研究・支援センター・資源開発分野
竹尾 透 教授、職員の方々

参考文献

- 1) 2024 年度高度技術研修 マウス以外の実験動物の生殖工学技術に関する高度技術研修マニュアル (2024)
- 2) 令和 6 年度実験動物関係高度技術研修 マウス生殖工学技術マニュアル (2024)