バイオリソース技術の提供について

バイオリソース技術

　実験動物としてのマウスの価値は計り知れないものがあり、マウス以上に扱いやすい実験動物は存在しません。一方で、マウスを飼育する動物実験施設の微生物学的清浄度には、施設ごとに大きな違いがあるのも事実です。このため、施設間で生きた動物をやりとりするのは可能な限り避けなければなりません。ところが最近の遺伝子組換え技術の進歩により、様々な遺伝子改変動物が研究者の間で譲受・譲渡されるのが日常になりつつあり、上記のような微生物汚染対策として、生きた個体ではなく「精子」あるいは「胚（受精卵）」による動物のやりとりが行われるようになってきました。このため、精子や胚の保存と、これらから生体に戻す技術を持たなければ、施設間での動物のやりとりが難しくなりつつあります。

　また、貴重な遺伝子改変動物でも、実験に使う予定が無い場合に繁殖しながら系統を維持するためには、動物施設の飼育スペースや飼育料金などの経済的な負担があるほか、系統維持のための遺伝子検査などに労力を使うことになりますし、場合によっては継代を重ねるうちに予期しない変異が入ってしまう可能性もあります。このような場合には、系統を精子や胚で保存しておくことが有効です。このように、貴重な系統を保存したり、個体に戻すためにも体外受精や胚移植などの技術が使われています。また、貴重な系統を保存しておくことは、万一、動物施設で感染事故が発生して、すべての動物を淘汰しなければならなくなったような場合でも、すぐに元の系統を復活できるので安心です。

　当施設でも、このような「精子」や「胚」での動物の保存・輸送に対応するため、精子や胚の凍結保存技術、あるいはこれらからの個体作製技術の向上を目指してきました。今回、当施設のバイオリソース部門として、このような技術を利用者に提供することとしましたので、大いに活用していただけると幸いです。

　なお、外国から動物を輸入する場合には、感染症の持ち込みを防ぐために輸入届出制度があり、生きた動物を輸入する場合の手続きが非常に煩雑になっていて、事実上個人で輸入することはほとんど不可能になっています。これに対する対策としても、胚や精子による輸送が有効であることを付記しておきます。

系統保存方法の選択

　マウスの系統保存方法としては、精子保存と胚保存の２つの方法が現在までに確立されていますが、最近は精子保存の方が主流となっています。ここでは、それぞれの特徴について説明します。

　TgやKOなどの遺伝子改変動物で、バックグラウンドのマウス系統がC57BL/6など市販の動物で良い場合は、精子で保存する方法と、胚で保存する方法の２つの方法から選択できます。これに対して、（手に入りにくい近交系系統など）バックグラウンドを含む系統そのものを保存する必要があり、生体に戻すときに採卵して体外受精するための野生型メスが全く用意できないと考えられるようなときは、胚で保存する必要があります。

選択する際に考慮すべきことは、精子の保存は個体に戻すときに野生型のメスの卵と体外受精することになるので、ホモマウスの精子を保存すると生まれる個体はヘテロになるということです。ヘテロマウスの精子を保存した場合は、仔の半数のみが遺伝子を持つことになります。精子保存の利点は、保存する時にかかる費用が安く、万一の感染事故に対する対策として適していることと、個体に戻す操作を10回程度行う分を保存できるので安心なこと、戻したときの個体数が20匹程度期待できることなどがあげられます。

一方胚保存では、（当施設では）遺伝子改変オスマウスと野生型メスとの体外受精を行ってから保存するのを基本的な手順としていますが、そのほかにメスさえ用意すれば、ホモ同士やヘテロ同士等の交配の受精卵を保存することができます。ただし、この場合は採卵用に若いメスをある程度の数用意しなければなりません。また胚保存の場合は、保存できる卵（受精卵）の数がメス10匹あたり100個程度となり、保存から個体に戻す操作は２～３回（１回に40個として）行う分にしかなりません。さらに、このときの個体に戻す操作１回で期待できる出生数が５～10匹程度にしかなりません。従って安全のため200個程度の胚を保存することを目標にしますが、このためには、野生型メスとの体外受精による方がメスを用意しやすいので容易です。当施設で設定している胚保存の料金は、野生型メスと体外受精を行う場合の料金で、必要なメスマウスの料金を含んでいます。従って、メスも依頼者が用意する場合には、その分料金は安くなります。

　当施設としては、上記のようにTgやKOマウスの保存には、精子保存をお勧めします。また胚保存は、C57BL/6、BALB/cなどの系統では実績がありますが、系統や遺伝子変異によっては保存操作に適さない（感受性の）場合もあります。

　以下に当施設で提供する各種技術の、基本条件等について記載します。基本条件からの変更等を希望する場合は、担当者（幸田、内線9062）にご相談ください。

Ａ．基本技術条件

１．精子保存

　基本的には３匹のオスを使用します。このオスは、（可能であれば交配実績のある）10週齢以上６ヶ月未満のオスが望ましいですが、この条件がそろわなくても、最悪１匹からでも可能です。精巣上体から精子を回収し、混合のうえで、10本の凍結ストローに入れて液体窒素中で保存します。

２．凍結精子からの個体作製

　凍結ストローを１本融解し、野生型のメス10匹にホルモン処理して得た未受精卵とで体外受精を行います。一晩培養後、２細胞期の受精卵を偽妊娠メスの卵管に移植し、仮親とします。その後、予定日に生まれない場合は、帝王切開して里親に育てさせます。通常、20匹程度の産子が期待できます。

　３～４週齢で離乳し、必要な場合は耳パンチで個体識別し、尻尾を一部切断して遺伝子チェック用に依頼者に提供することができます。PCRプライマーの提供を受けて遺伝子チェックを行うこともできます（別料金）。また、他の動物施設等へ搬入するために、通常の当施設のモニタリング以外に微生物検査の成績が必要な場合には、里親を実験動物中央研究所に送り検査を委託します（別料金）。検査後、８週齢までに依頼者にマウスを提供します。

３．胚保存

　基本は、オスマウス３匹（精子保存と同様の条件）を提供してもらい、ホルモン処理した野生型メス20匹由来の未受精卵とで体外受精を行い、２細胞期胚を液体窒素で保存します。凍結チューブ１本あたり40個×５本の保存を目標とします。

　ホモ同士交配の受精卵を保存したい場合などは、オス３匹、メス10～20匹を提供してもらい、体外受精させることもできます。この場合のメスは、8-15週齢が望ましいです。メスの週齢のほか、改変遺伝子によっては受精・保存・融解の効率に影響を及ぼすことがあります。

４．凍結胚からの個体作製

　凍結チューブ１本の胚を融解し、偽妊娠メスの卵管に移植します。40個の胚を移植した場合、産子は５～10匹程度と予想されます。予定日に生まれない場合は、帝王切開して里親に育てさせます。

　３～４週齢で離乳し、必要な場合は耳パンチで個体識別し、尻尾を一部切断して遺伝子チェック用に依頼者に提供することができます。PCRプライマーの提供を受けて遺伝子チェックを行うこともできます（別料金）。また、他の動物施設等へ搬入するために、通常の当施設のモニタリング以外に微生物検査の成績が必要な場合には、里親を実験動物中央研究所に送り検査を委託します（別料金）。検査後、８週齢までに依頼者にマウスを提供します。

５．体外受精し個体を提供

　この操作は、たとえば病原体で汚染したマウスのクリンアップを目的として、提供されたオス・メスから体外受精で受精卵を作製し、SPFの仮親に移植して微生物学的にSPFといえる産子を得るために行います。あるいは、この技術を使うことにより、自然交配では繁殖がうまくいかずオス１匹しか残っていないというような場合でも、産子が得られる可能性があります。

オス３匹・メス10匹、双方のマウスが提供されることを基本としていますが、一方のみの提供で、相手方に野生型のメス（10匹）又はオス（３匹）を用いる場合は、その料金が加算されます。

３～４週齢で離乳し、必要な場合は耳パンチで個体識別し、尻尾を一部切断して遺伝子チェック用に依頼者に提供することができます。PCRプライマーの提供を受けて遺伝子チェックを行うこともできます（別料金）。また、他の動物施設等へ搬入するために、通常の当施設のモニタリング以外に微生物検査の成績が必要な場合には、里親を実験動物中央研究所に送り検査を委託します（別料金）。検査後、８週齢までに依頼者にマウスを提供します。

６．ES細胞からのキメラマウス作製

　近年、世界的に行われているノックアウトマウスプロジェクトにより、多数の遺伝子のKOマウスの作製が進められています。しかし、このプロジェクトはすべてマウス個体の作製まで行うわけではなく、KOマウスを作るためのES細胞の作製で終わり、あとは個々の研究者がそのES細胞からキメラマウスを作製することになっています。この作業についても、施設として技術を提供します。

　ES細胞からキメラマウスを作製する効率は、そのES細胞の品質により大きく左右されます。ノックアウトマウスプロジェクト以外でも、個々の研究者が作製した遺伝子改変ES細胞からキメラマウスを作ることも可能ですが、そのES細胞の品質によっては、キメラマウスができない、あるいはキメラマウスができてもES細胞由来の子孫が得られないことがあることを、ご了解ください。

　基本操作としては、ES細胞と異なる毛色の系統から正常卵を得るために、10匹のメスに過排卵処理を行い、オスと交配後に８細胞期胚を回収します。これとES細胞を凝集させた後、胚盤胞まで成熟させてから仮親の子宮に移植します。この操作を３回行うことを基本としています。施設としては、３～４週齢での離乳時に毛色でキメラ率を判断し、キメラ率の高いマウスを８週齢までに提供します。これ以後の、交配によるF1マウスの作製まで依頼する場合は別料金とします。

　なお、ES細胞から個体を作るにあたり、そのES細胞が病原微生物に感染していないことを確認する必要があります。この証明が無い場合には、施設から実験動物中央研究所に検査を委託しますが、この費用も依頼者が別途負担することになります。

７．精子・胚の保存料金

　精子や胚を保存するときは、念のため２種類の別な液体窒素容器に分けて保存しています。このための液体窒素の料金として、１系統・１年ごとに規定料金を負担していただきます。

Ｂ．利用料

　利用料金は、下の表に示すとおりです。プラットフォーム動物実験施設内で飼育しているSPF動物からの操作は「施設内」料金、他施設等で飼育している動物からの操作は「施設外」料金を適用します。なお、プラットフォーム入居者（部屋単位）はこれより若干料金が低くなります。また、施設の動物を使用する数が基本操作と異なる場合は、マウスの価格分、上下します。

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 項目 | 単位 | 料金（施設内） | 料金（施設外） |
| ① 精子保存 | 1件 | 21,000円 | 36,000円 |
| ② 保存凍結精子をマウス個体として供給 | 1件 | 180,000円 | 180,000円 |
| ③ 胚保存 | 1件 | 109,000円 | 124,000円 |
| ④ 凍結胚をマウス個体として供給 | 1件 | 75,000円 | 75,000円 |
| ⑤ 体外受精のうえ、マウス個体として供給 | 1件 | 145,000円 | 171,000円 |
| ⑥ キメラマウスの作製及び供給 | 1件 | 536,000円 | 536,000円 |
| ⑦ ①、③にかかる保存料金（１系統あたり） | 1年 | 13,000円 | 13,000円 |

 （2019年　料金改定）