

# 平成 23 年度 名古屋大学技術職員研修（生物・生体コース）の受講報告

○鴻田一絵<sup>A)</sup>、前坂昌宏<sup>A)</sup>、森ララミ<sup>A)</sup>、瀧健太朗<sup>B)</sup>

<sup>A)</sup> 教育・研究技術支援室 生物・生体技術系

<sup>B)</sup> 医学系技術支援室 生物・生体技術系

## 概要

平成 23 年度 名古屋大学技術職員研修（生物・生体コース）（テーマ：メダカの人工授精）について、実習の内容を報告する。

### 1 はじめに

本研修は、本学の技術職員に対し、その職務に必要な専門的知識および技術を習得させ、技術職員の資質の向上と応用能力の開発および養成を図ることを目的として毎年開催されているものである。

生物・生体コースの今年のテーマは「メダカの人工授精」であった。

メダカ (*Oryzias latipes*、図 2) は実験動物として多くの優れた性質をもつ。たとえば同じ脊椎動物の実験動物としてよく利用されるげっ歯類 (マウス、ラット等) と比較し、①飼育が容易で維持費管理費が少なく、また取り扱いが容易であること ②世代交代が早く多産で、一定条件下では一年を通して産卵可能であるため、個体数の調節がしやすいこと ③体外発生をするため胚発生の解析がしやすいこと ④胚が透明であるため、蛍光物質を利用して生きたまま内部の観察ができること ⑤小型で体制が単純であるため、器官発生の研究がしやすいこと ⑥多くの変異体が単離されており、遺伝学的な研究に利用しやすいこと ⑦トランスジェニックの作製が容易であることなどの利点がある<sup>[1] [4] [5]</sup>。

メダカと並んで実験用のモデル動物として確立された小型魚類にゼブラフィッシュ (*Brachydanio rerio*) がある。ゼブラフィッシュは研究人口が多く、研究基盤もよく整備されている。しかし、メダカにはゼブラフィッシュにはない利点がある<sup>[5]</sup>。より幅広い温度域に適応可能で、近交系が多く存在し、ゲノムサイズが小さい。精子凍結、人工授精も安定的にできる。また、メダカは日本において江戸時代から観賞魚として飼育されてきた歴史があり、日本における研究の蓄積があることも大きな利点である。

そのような背景において、名古屋大学におけるメダカの研究は広く世界に知られている。故・山本時雄先生による脊椎動物初の人為的な性転換をはじめ、富田英夫先生が自然突然変異系統を同定された“富田コレクション”、若松佑子先生が開発された“透明メダカ”など、現在のメダカの発生遺伝学のみならず、ヒトを含めた脊椎動物の疾患研究に大きく貢献する成果を世に送り出した<sup>[5] [6]</sup>。現在も生物機能開発利用研究センター (ホームページ <http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~junkei/index.html>) において約 50 系統のメダカが飼育されており、メダカの研究のみならずバイオリソースの保存に重要な役割を果たしている。

今回の研修では、このような名古屋大学におけるメダカ研究の歴史を活かし、また生物・生体系を専門とする技術職員が実験動物の取り扱いや実験手法の一端を学ぶ目的で、メダカの人工授精の実習が行われた。以下、2011 年 9 月 1～2 日に行われた実習の内容を報告する。

## 2 人工授精の手順<sup>[1]</sup>

### 2.1 精子凍結方法

人工授精の前日、以下の手順で精液を凍結保存した。

#### (1) 凍結保存液の準備

凍結保存用チューブに DMSO (Dimethyl sulfoxide  $C_2H_6OS$  魚類精液の保存において有効な凍結保護剤のひとつ) を  $50\mu L$  入れ、さらに FBS (fetal bovine serum, 牛胎児血清)  $350\mu L$  を加えた後、氷上に静置した。

#### (2) メダカ雄の解剖と精巣の採取

メダカ塩類溶液 (BSS ; balanced salt solution、メダカ用生理食塩水) を  $100cc$  ビーカーに入れて氷上で冷却した。そこへ予め雌から隔離して飼育されたメダカ雄を投入した。麻酔状態になったメダカをキムワイプに取り、眼科用ハサミで延髄を切断した。次に、肛門から喉のあたりまで腹部正中を切開した。さらに左側体腔に沿ってハサミを入れて体壁を切除した (図 1)。消化管等をピンセットで除け、露出させた精巣 (図 3) を、精巣後部の輸送管を切断して摘出した。

#### (3) 精子の凍結保存

摘出した精巣を、予め準備した FBS $100\mu L$  (直径  $6cm$  のポリスチレン製ディッシュ) に入れてほぐした。精子が遊離した液をマイクロピペットで吸い取り、(1) の凍結保存液に入れてよく混合した。混合液が入った凍結保存用チューブは、専用のイソプロピルアルコール容器に入れ、 $-80^{\circ}C$ フリーザーで凍結保存した。

### 2.2 メダカ雌の解剖と未受精卵の採取

メダカ雌からの未受精卵採取は人工授精の直前に行った。使用したメダカ雌は、人工授精前日に産卵が確認され、また予め雄から隔離された個体であった。メダカ雄の解剖と同様によく冷した BSS で麻酔し、ハサミで体壁を切除した (図 4)。露出させた卵巣を体腔から剥離した後、卵巣後部の輸卵管を切断して摘出した。摘出した卵巣を、予め準備した BSS (直径  $6cm$  のポリスチレン製ディッシュ) に入れ、卵巣膜を破いて排卵後の卵 (当日産卵予定) を露出させた。ノエスせん刀で付着糸を切って卵を 1 個ずつばらした後、卵を別のディッシュに準備した BSS へパスツールピペットで移動させた。

上記の作業を 4 個体について行った。採取した卵は、個体差による受精率の影響をなくすため、同じディッシュに移動し混合した後、半数ずつ 2 つのホールスライドグラスに取り分けた (図 5)。

### 2.3 人工授精

半数に分けた卵に対し、前日に採取し凍結保存した精子 (凍結精子) と人工授精直前に採取した精子 (当日採取した精子) をもちいてそれぞれ人工授精を行った。

#### (1) 凍結精子

凍結させた精子液が入った凍結保存用チューブを  $30^{\circ}C$  のウォーターバスを使って解凍した。未受精卵を準備したホールスライドグラス内の BSS を、卵が露出しない程度にマイクロピペットで減らした。そこへ解凍した精子液を加え、ホールスライドグラスを静かに揺すって混合した (図 6)。しばらく静置し、実体顕微鏡下で受精を確認後、BSS を追加した。

(2) 当日採取した精子

摘出した精巣を、(1)と同様に、予め準備しておいたディッシュのFBSに入れてほぐし、精子を遊離させた。この液を未受精卵が入ったホールスライドグラスに加えた。以後の手順は凍結精子と同様である。

精子液を加えて2~3時間後、それぞれの卵の状態を実体顕微鏡下で観察した。油滴の大部分が融合し植物極へ集合した状態(図7)を受精が成功したと見なし、授精卵数を数えて授精率を算出した。

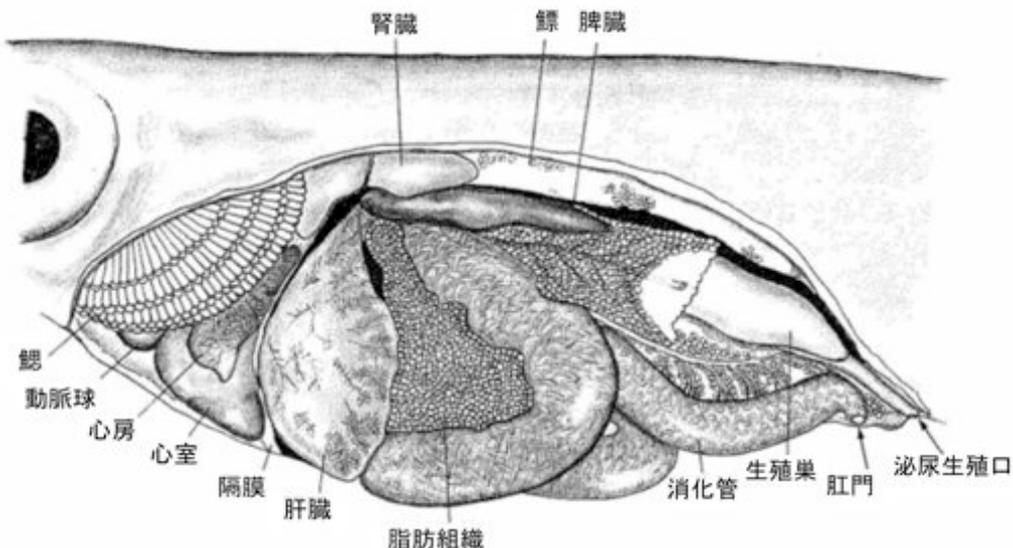


図1. メダカの内臓<sup>[2]</sup>



図2. 実験にもちいたメダカ



図3. メダカ雄の内臓  
(白色点線部分が精巣)



図4. メダカ雌の内臓  
(白色点線部分が卵巢)

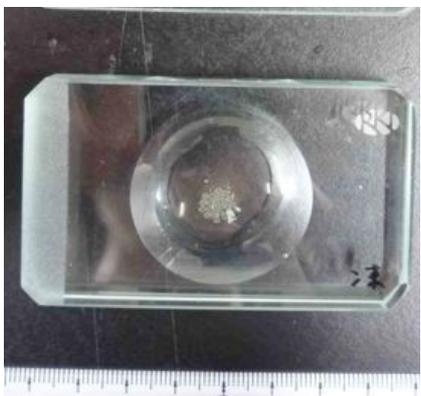


図5. ホールスライドグラスに入れた卵

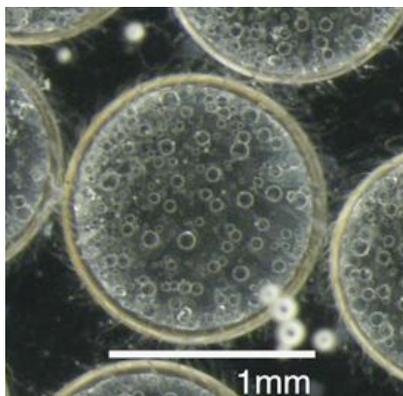


図6. 精子液を入れた直後の卵

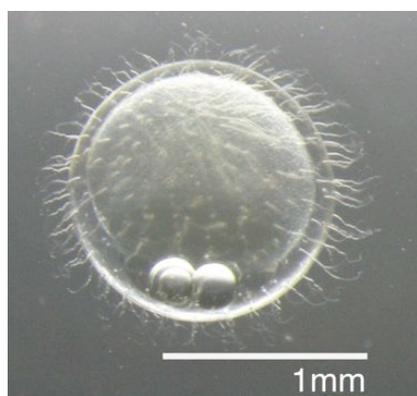


図7. 授精卵(写真は精子液を入れて約1時間後)

### 3 人工授精の結果とまとめ

精子液を加えてから2~3時間後の受精率について、4名の受講生の結果を表1にまとめた。

表1. 各受講者の結果（凍結精子および当日採取した精子での受精率）

		前坂	森	瀧	鴻田
凍結精子	授精卵数／全卵数	22／27	8／25	15／22	8／21
	受精率（％）	82	32	68	38
当日採取した精子	授精卵数／全卵数	23／24	15／25	21／22	14／21
	受精率（％）	96	60	95	67

いずれの受講者もそれぞれ20数個の卵（全卵数）をもちいて人工授精を行った。どの受講者も凍結精子より当日採取した精子をもちいた場合に受精率が高い結果となった。

受精率に差が生じた原因として、①メダカの個体差（精子や卵の質、精子液濃度の差など） ②作業過程における人為的な損傷（無意識での誤操作や過剰な刺激など） ③凍結・融解過程における精子の損傷などがあげられる。このうち精子の凍結・融解過程において、凍結保護剤の細胞毒性や凍結・融解の速度が精子に影響をおよぼすことが示唆されている<sup>[3]</sup>。一般的に、精子を凍結保存する際には、細胞内外の塩濃度の上昇を抑制させ、また脱水による細胞容積の極端な上昇を抑制して凍結による障害を最小限にする目的で、精子液に凍結保護剤を添加する。生物の種類によって最適な凍結保護剤は異なるが、今回使用したDMSOも含め、凍結保護剤は細胞毒性を示す。そのため、高濃度での使用や凍結前後における長時間の浸漬を避ける必要がある。今回の結果では受講者全員が凍結精子での受精率が低下したことから、精子液を凍結させるまでの時間が長過ぎた、あるいは解凍時間が長過ぎたことがとくに受精率の低下につながった可能性があると考えられた。加えて、メダカの人工授精の受精率は、凍結精子をもちいた場合81~100%であると報告されている<sup>[3]</sup>。今回の結果では、当日採取した精子でも受精率が60%台と低くなったケースがあったが、これは先にあげたメダカの個体差や作業過程における人為的な影響による可能性が考えられた。

### 4 実習を終えて

人工授精はバイオリソースの維持管理において基本的な技術だが、今回の実習を通し、その技術の奥深さを再確認した。また、研修全体を通し、実験動物としてのメダカの重要性や可能性を学び、さらに生物の系統維持・管理に携わる業務の大変さや面白さを垣間見ることができた。短い時間だったため知識や技術を十分身につけるには至らなかったが、とても有意義な経験をさせていただいた。

### 謝辞

本研修で実習の指導を賜りました生物機能開発利用研究センターの井上 慎子様、心よりお礼申し上げます。また、井上様とともに実習のご指導やご準備をしてくださりました厚味 智子様、また小型魚類についてのご講義を賜りました動物器官機能研究分野の日比 正彦先生、さらに名古屋大学全学技術センターの集会・企画係の皆様ならびに名古屋大学技術研修会ワーキンググループ委員の皆様へ感謝申し上げます。

## 参考文献

- [1] 井上 慎子, “メダカの人工授精”, 平成 23 年度 名古屋大学技術職員研修 (生物・生体コース) 配布資料
- [2] 岩松 鷹司, ”第 4 章 形態と生理”, メダカ学全書, 1997. 115
- [3] 楠田 聡, ”魚類精子と胚細胞の凍結保存における現状と展望”, 水産育種, 2004. Vol. 34, 1-25
- [4] 慶応義塾大学医学部 衛生学公衆衛生学教室ホームページ  
(<http://www.keiopublichealth.jp/research/occumed-field/intenvtox/medaka>)
- [5] 成瀬 清, "世界に誇る日本のメダカ研究", 総研大ジャーナル, 2008, Vol. 13, 2-7.  
(<http://www.soken.ac.jp/journal/no.13/no.13.html>)
- [6] 若松 佑子, ”施設紹介 生物機能開発利用研究センター 純系動物器官機能利用研究分野”, 名古屋大学理学部・大学院理学研究科 広報誌, 2003, Vol. 5, 16-17 (<http://www.sci.nagoya-u.ac.jp/kouhou/05/05.pdf>)