

動物実験支援センターの発生工学技術支援の紹介と

今後の展望について

山根睦

生物・生体技術支援室 実験動物グループ

概要

動物実験支援センター（Center for Animal Research and Education, 以下 CARE）は、名古屋大学内の全学共同利用の動物実験施設として運営され、様々な研究分野の研究者が利用している。また、名古屋大学では動物愛護の 3R 理念（Reduction（削減）：使用動物数の削減、Refinement（苦痛の軽減）：動物に与える苦痛を軽減すること、Replacement（代替）：動物を使用しない代替法を利用すること）に則った動物実験を行うように研究者に指導・支援しており、CARE も 3R 理念に則った運営をしている。本発表では、CARE 内の技術職員が行っている重要な支援業務の一部である「発生工学技術支援」について意義と内容を紹介し、今後の展望を報告する。

1 はじめに

CARE ではマウス・ラットの飼育と、実験に関する様々な支援を行っている。飼育エリア内はバリアを構築し高い清浄度を維持すると共に、温湿度など常に一定にした飼育環境を維持している。飼育している動物は全て SPF 動物（Specific Pathogen Free, 特定の病原性微生物に非感染で有ることが保証されている動物）であり、CARE と同等以上の SPF 環境が確認できている特定の動物販売業者を除いて、生体搬入は禁止している。

高精度で安定した環境で動物飼育することで実験以外の因子の影響が少なくなり、データの再現性・信頼性を担保することができるだけでなく、実験に使用する動物数の削減にもつながる（Reduction）。また、病原性微生物の感染による苦痛を与えない（Refinement）為にも、厳格な環境の維持管理が重要である。

発生工学技術は、CARE 動物の清浄度を維持するために必須の技術となっている。外部施設からの新規動物導入時は胚移植することにより清浄な動物として研究者に供給し、胚や配偶子を凍結保存することにより自然災害時や万一の感染事故のバックアップとして速やかに清浄な個体を作成することができる。

なお、CARE 内の動物実験は名古屋大学動物実験委員会の承認のもとで行われています。

2 発生工学技術支援について

CARE での発生工学技術支援は、マウスを対象として、主に以下の 3 つの業務に大別できる。

1. 外部施設からの新規導入時のクリーン化
2. 新規遺伝子組み換え動物の作成
3. 胚・配偶子の凍結保存による系統維持

2.1 外部施設からの搬入時クリーン化業務

動物実験を行う研究では、国内外動物施設からの動物の譲渡譲受は頻繁に行われている。各動物実験施設の清浄度は多様であり、生体での導入は病原性微生物持ち込みリスクが避けられないので、CARE では外部施設からの生体受け入れは原則不可としている。代わりに、譲受を希望するマウスの胚や精子を受け入れ、体外受精・胚移植を行って出産させることで清浄化された動物を CARE 内の依頼者に提供している。

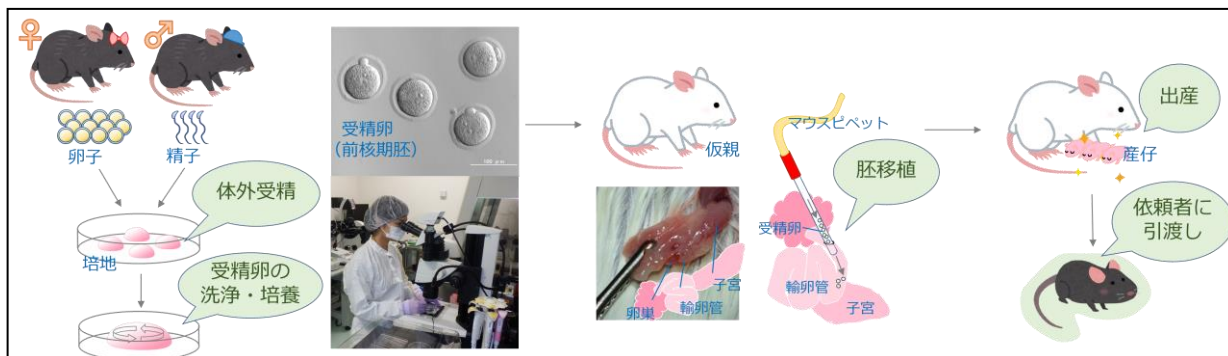


図 1. 体外受精・胚移植の流れ

2.2 遺伝子組換え動物の作成

従来の遺伝子組み換え動物の作成には高額な装置と高度な技術が必要だったため、他の動物施設で作成された動物が導入されてきた。近年、CRISPR/Cas9 を用いた電気穿孔法による遺伝子改変（編集）技術の開発により、遺伝子改変動物作成が容易になり、多数の動物実験施設で導入され、遺伝子改変動物の作成が進められている。CARE でも今年度から CRISPR/Cas9 技術の導入検討を行い、来年度からの本格稼働に取り組んでいる。

CRISPR/Cas9 は細菌の免疫機構を利用したもので、任意の DNA 配列に傷を作り、その傷を修復する時の偶発的エラーにより、DNA 塩基対の挿入や欠損ができる。変異 DNA はアミノ酸コードが変異（コドンのフレームシフト）しているため、本来の機能的なタンパク質が生成出来ない。また、修復時に傷の間に外来 DNA を組み込むことで目的とする遺伝子配列に外来遺伝子を挿入（ノックイン）することも可能である。

マウスの受精卵（1細胞期）を CRISPR/Cas9 によって遺伝子改変し、産まれたマウスの生殖細胞が変異 DNA を持っていれば系統として確立できる。電気穿孔法ではスライドガラス上の電極間に満たした溶液内に受精卵を並べ、電気穿孔装置（エレクトロポレーター）により電気パルスを送る。数ミリ秒のパルスにより受精卵細胞膜及び核膜に穿孔ができ、遺伝子編集に必要な分子が細胞内に流入する。その後、電極間から受精卵を回収し、仮親に胚移植を行い出産させる。

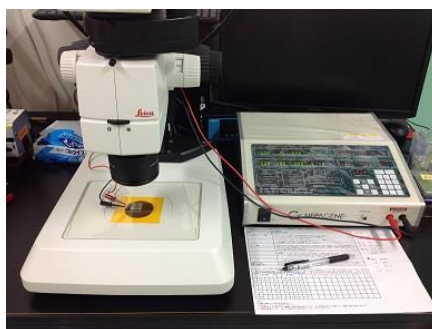


図 2. CRISPR/Cas9 の様子（左：顕微鏡、右：エレクトロポレーター）

2.3 遺伝資源の凍結保存

マウスは生体を繁殖させて維持する他に、胚や配偶子を凍結保存しておくことができる。凍結保存することによって、バックアップ以外にも様々な用途に活用できるため、CARE では凍結保存を推奨している。

- ・汚染事故、災害時のバックアップと早期復旧対応
- ・系統維持の省力化、経費節減（生体での交配維持よりも圧倒的に低コスト）
- ・遺伝子組換え動物のバックアップ
- ・他施設との動物授受の簡便化、感染リスクの低減
- ・遺伝子改変（編集）マウス作成用受精卵の供給

3 今後の展望

発牛工学技術支援業務の依頼は、これまで CARE を利用している研究者からの依頼が大勢を占めている。CARE は全学の動物実験を支援することが主務であるため、今後は発牛工学技術についても CARE 利用者以外の研究者への各種技術支援が出来ることを積極的に発信し、より多くの研究を支援していくことを目指す。

4 謝辞

今回の発表にあたり、発表をご快諾いただきました動物実験支援センターの皆様に感謝いたします。