

## 第 4 專 門 技 術 群 (生物・生態系)

# 平成23年度第4専門技術群（生物・生態系）「専門研修」報告書

## 1. はじめに

大学における教室系技術職員の職務は多様であり、それぞれの分野において専門的かつ高度な知識や技術が要求される。第4専門技術群は生態・農林水産分野と医学・実験動物分野で構成されており、本年度は京都大学大学院医学研究科内での実験動物に関する研修会を企画した。近年の動物実験施設では実験動物の感染症コントロールが重要な課題となっており、マウスを感染症から守るために「体外受精」を行い受精卵の状態に動物施設へ導入することが広く行われている。今回は動物施設等で業務をしている人以外は触れる事がほとんど無いと思われる生きたマウスを用いて、体外受精と凍結保存に関連する業務についての理解を深めることを目的とする。今回のように他部局の業務に触れる事は技術職員間の相互理解を深める良い機会となるであろう。また、日常業務で顕微鏡や動物に触れる機会のない職員にとってそれらを使つての実習は、自らの見識を広める事ができ、今後の職務の遂行に資するものである。

## 2. プログラム

開催日 平成23年1月25日(水曜日)

開催場所 京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設4階実習室と講義室

### 研修内容

9:00～9:15 受付・開講式

挨拶：医学研究科附属動物実験施設長 芹川 忠夫 教授

技術職員紹介

9:15～11:30 実習説明に引き続き実習

『マウスの採卵・精子採取・体外受精』と『マウスピース・キャピラリーの準備』

説明：宮地 各班担当：出口、渡邊、北野、山根、田中、山崎、宮地

11:30～12:30 昼食・昼休み

12:30～13:30 講義

『マウスの生殖工学』と『マウス受精卵の凍結保存』

講師：ウイルス研究所附属感染症モデル研究センター

技術専門職員 宮地 均

13:30～14:30 見学と実習

『卵管からの受精卵回収』と『卵子洗浄の練習』

説明：宮地 各班担当：出口、渡邊、北野、山根、田中、山崎、宮地

14:30～14:45 休憩

14:45～17:00 実習

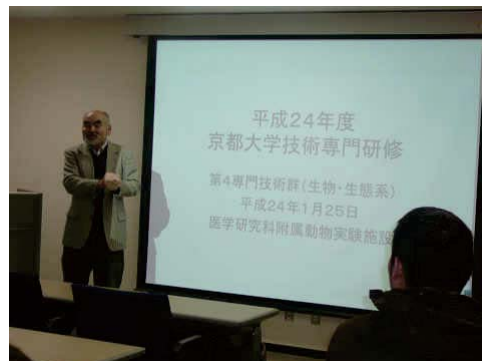
『マウス受精卵の凍結保存と融解』と『マウス前核の観察』

説明：宮地 各班担当：出口、北野、山根、田中、山崎、宮地

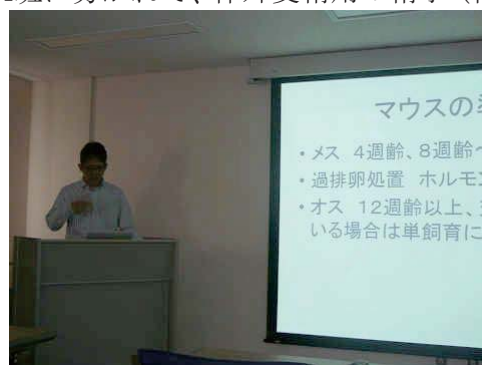
17:00～17:15 質疑応答・閉講式、解散

### 3. 講義・実習・見学について

寒空の下、水溜りに薄氷が張る朝、今回の専門研修が開始された。動物実験施設は、医学部構内の東大路通通りに位置している。開講式で医学研究科附属動物実験施設長、芹川忠夫教授の挨拶、講師及び実習補助兼参加者の技術職員の紹介が行われた。前記のとおり参加者（16名）の中には、今回では実習補助者が7名（実習が自らの業務に近い）も参加されており、その後の実習において大きな手助けとなっていた。芹川教授のお話から、当施設には実験動物飼養に全部で1万ケージ程あるが、それでも不足しており、今回の実習である体外受精と凍結保存は非常に有効な方法であることが学習できた。



1日間で行うには、時間的にハードな内容の研修であるため、早速、宮地均氏の実習説明が行われ、白衣・手袋・マスクを纏い実習室へと入った。A～Dの4班に分かれて、体外受精用の精子（精巢上体管）と未受精卵（卵管膨大部）をマウス（体長5～6cm）から取り出す。この前に、苦痛を可能な限り小さくするために講師が頸椎脱臼を行うが、これを参加者が希望する場合は失敗時を考慮して麻酔（Avertinを使用）後に行った。その後の対象器官の摘出において、解剖や血が苦手な者には講師が代行し、その器官からの精子や未受精卵の取り出しは全参加者が自ら行った。精子塊や卵子塊は、非常に小さな対象物であるため、その位置の識別や取り出しは手の震え等で慣れないと困難な作業であった。取り出し後、HTF培地へ入れた精子塊を顕微鏡下で見ると、精子は鞭毛の動きがわかる程度のゆっくりしたものであったが、1時間培養後では鞭毛の動きが確認できない程、非常に激しく動いている精子が観察された。未受精卵を顕微鏡で観察すると、モヤモヤしたものの中に包まれた丸（φ約0.1mm）が見えるだけで、焦点深度が合っていないと見過ごしてしそうな小さな球であった。



準備したこれらの精子と未受精卵を用いて“媒精”を行った後、2細胞期へと発生した胚を選別し、凍結保存用のDMSOを含んだ培地（凍結保存用の溶媒：シャーレ内のオイルに沈んだドロップ状のもの）に移動させる。この選別作業には、マウスピース・キャピラリー（非常に細いガラス管に口に啜るためのチューブを接続したもの）が必要となる。このキャピラリーの作成は、直径が鉛筆の芯程であるガラス管（5～6cm）の中央辺りをアルコールランプ



で熱し、約2倍に引き伸ばして細い部分を作って適当な場所をガラス切りで切断（傷を付けて引き切る）する。この作業もコツが要るようで、講師や実験補助者は簡単に作成しているようにみえるが、実際に行ってみると難しく、何度挑戦しても使用に耐えそうなものは僅かしか出来なかった。漸く、完成したと思い、管の先を丸めるためにアルコールランプにかざすと管先が溶けすぎて穴を塞いでいまったりと、更に、ガッカリする結果が待っていた。

また、受精卵が2細胞期に達するには1日間必要なため、事前に用意していただいた胚を用いた。この胚は、目的の2細胞期、未受精卵、異常発生の卵、死亡した卵と混在していたが、未受精卵塊を見た時のモヤモヤは全てきれいに無くなっていった（精子の働きによると伺った）。胚（卵）の選別は、キャピラリー先端の細い管に起こる毛細管現象を利用しながら、マウスピース・キャピラリーのチューブ側を口に咥えての吹き加減で胚を操作する。この時、繊細な吹き加減が要求され、培地を泡立ててしまうと失敗となってしまふ。顕微鏡下であることも含め、熟練を要する作業であることを実感した。

次に、胚の凍結保存（液体窒素：-196℃へ）→融解と続く決められた作業（管理された温度・時間・試薬）を行う。融解後の胚の生存率には、バラつきがあったが、ピペットの使い方であろうか？私自身も業務でピペットを使用するが、分野によってその使い方が異なる点も面白いものの一つであった。この際の方法・手順も、宮地均氏の分かり易い説明が事前になされており、更に多様な方法（複数の試薬やその濃度、各段階での時間管理等の多数のパターン）を自らが実際に実験により確認していることは、技術的な専門性を熱心に行われていることに感銘を受けた。

また、実習室には双眼顕微鏡と液晶モニターが接続されているものが一組あり、講師や実験補助者が顕微鏡下で作業する様子を複数の参加者が観察できるようになっていた。熟練者の作業を実際に見ることができ、自らがその作業を行う上で、非常に有効で助かる情報となった。最近、液晶モニターも安価になってきていることもあり、顕微鏡を使用する実習にはとても有効な方法であると思われた。

#### 4. おわりに

本研修は、ウイルス研究所附属感染症モデル研究センター、再生医科学研究所再生動物実験施設、iPS細胞研究所と医学研究科附属動物実験施設のご協力のもとで行われた研修であり、とても感興そそる実習内容でした。1日では全く収まりきれないような豊富な内容を何日も前から準備いただき、感謝しております。また、昼食時間のことまで考慮していただき、細かいご配慮にも感謝いたします（昼食時間は混雑を考慮して11:30から1時間、他の研修にもお勧めです）。講師や実習補助者の皆様、準備・協力していただいた方々、全てにこの場を借りて改めてお礼を申し上げます。今回の研修参加者の多くは生物と係わりがある職員のため、研修内容はどれも興味深い内容であり、非常に有意義な体験が得られました。この研修で得られた経験は、今後の各自の業務に活かされていくことと思います。

京都大学技術職員研修（第4専門技術群：生物・生態系）参加者名簿

No.	所属	氏名	フリガナ	所属専門 技術群	専門分野	備考
1	医学研究科	古田敬子	フルタ ケイコ	第4	生物	
2	医学研究科 附属動物実験施設	山根 知恵美	ヤマネ チエミ	第4	生物・ 生態系	実習補助
3	医学研究科 附属動物実験施設	山崎 賢一	ヤマザキ ケンイチ	第4	生物・ 生態系	実習補助
4	医学研究科附属 総合解剖センター	國領 久美子	クニリョウ クミコ	第4	病理組織 標本作製	
5	工学研究科	平野 裕一	ヒラノ ユウイチ	第2	土木工学	
6	農学研究科附属農場	小西 剛	コニシ ツヨシ	第4	栽培管理	
7	農学研究科附属農場	西川 浩次	ニシカワ コウジ	第4	栽培管理	
8	再生医科学研究所附属 再生実験動物施設	荻原 智幸	オギワラトモユキ	第4	実験動物学	
9	再生医科学研究所附属 再生実験動物施設	出口央士	デグチ エイチ	第4	実験動物学	実習補助
10	再生医科学研究所附属 再生実験動物施設	渡邊 仁美	ワタナベ ヒトミ	第4	生殖工学	実習補助
11	ウイルス研究所	小中 さつき	コナカ サツキ	第4	実験動物学	実習補助
12	ウイルス研究所附属感染 症モデル研究センター	宮地 均	ミヤチ ヒトシ	第4	実験動物学	講師及び 実習補助
13	iPS細胞研究所	田中 彰人	タナカ アキト		実験動物学	実習補助
14	生態学研究センター	小坂橋 忠俊	コサカハシダツトシ	第4	生物系	
15	フィールド科学教育研 究センター	佐藤 修一	サトウ シュウイチ	第4	森林管理	世話役
16	フィールド科学教育研 究センター	西岡 裕平	ニシオカ ユウヘイ	第4	森林管理	