

# Exo utero法の解説とin utero法 との比較

八田稔久

金沢医科大学・解剖学I

# Exo utero法

Mouse embryos develop normally exo utero.

Muneoka K, et al.

J. Exp. Zool, 239:289-293, 1986.

子宮筋層を切開し、胎膜につつまれた状態の胎児を腹腔(子宮外)で発生継続させる方法。

胎児は、胎盤を介して母体から栄養を受け続ける。

# マウスの胎児器官に操作を加えて発生に及ぼす影響を観察する実験系

- 部分胚培養、器官培養、スライス培養
- 全胚培養
- 胎児子宮外発生(exo utero development) 法
  - ⇔ in utero法 (in-utero embryo manipulation, micro injection)

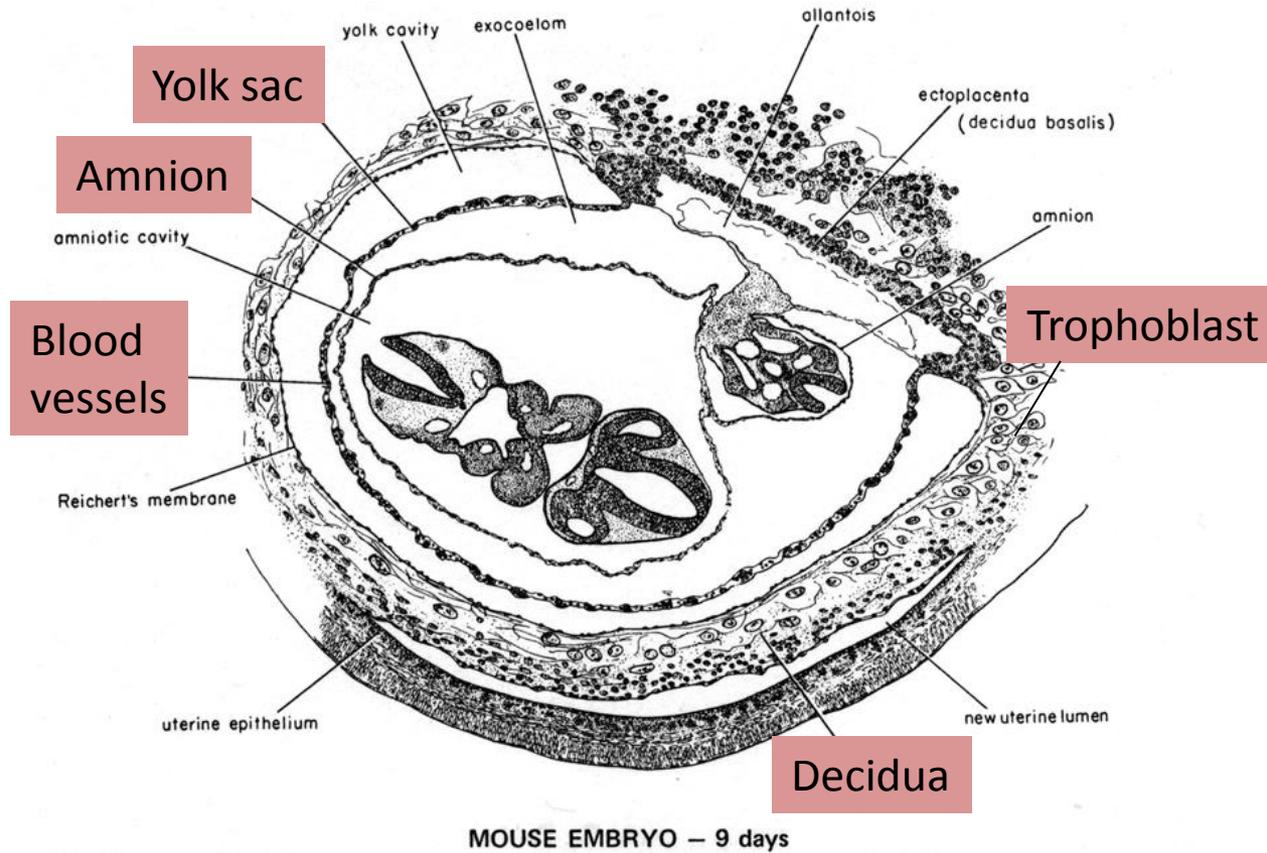
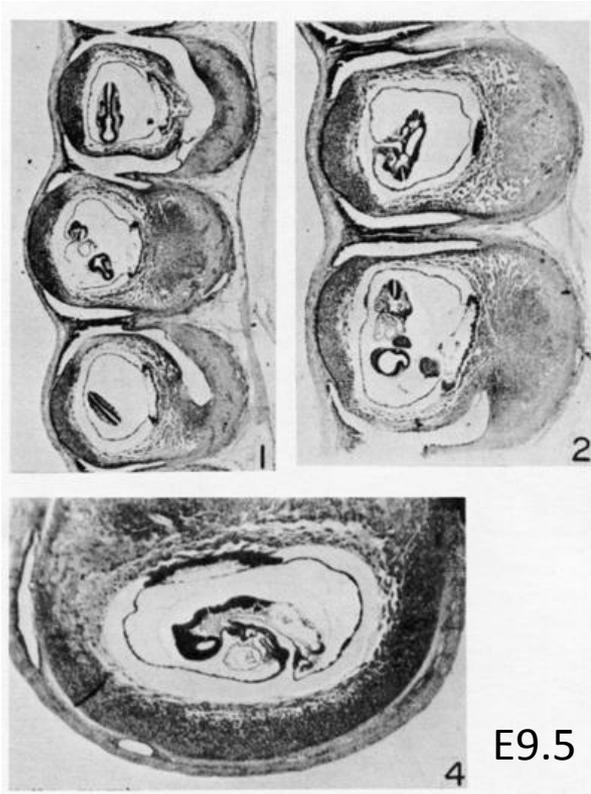
# カバーする時期(マウス)

- 全胚培養: 器官形成初期(E6, 中胚葉形成)  
~ 器官形成後期(E10-E11)
- Exo utero法: E11(胎盤機能) ~ E18/19  
(E12-E18)
- In utero法: E7/8?(神経管閉鎖) ~ E18/19  
(E12/13-E18)

# マウス胎児の胎齢とCRL

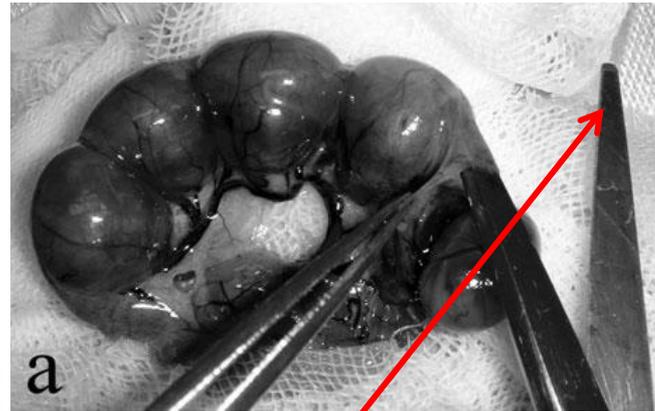
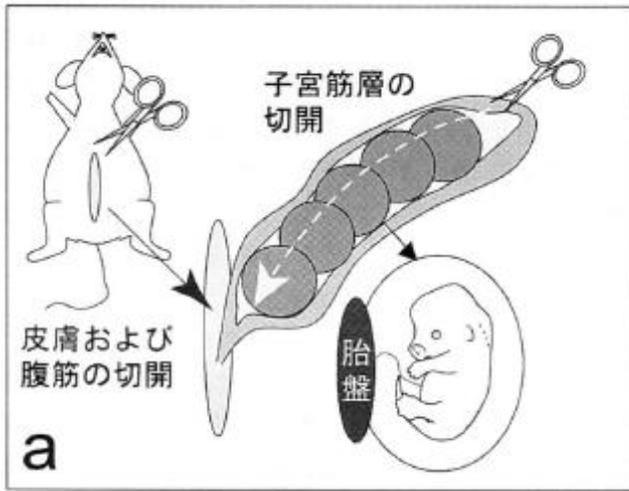
胎齢	CRL(mm)	
	mean	range
E9.5	2.8	2 – 3.5
E10.5	4.34	3 – 5
E11.5	6.1	4 – 6.5
E12.5	8.03	7 – 9
E13.5	9.31	6 – 10.5
E14.5	10.7	9.5 - 11.5
E15.5	13.31	11 – 14.5
E16.5	16.7	15 – 18.5
E17.5	19.83	18 – 22
E18.5	21.53	18 - 25

# Exo utero法の限界がE11である理由



- ・～E10 未発達な胎盤
- ・厚い栄養膜と脱落膜に覆われる
- ・胎児の栄養は、胎盤の発達までは胎児を包む脱落膜/栄養膜からの拡散  
⇒剥がさなければ胎児を透見できないが、剥がすと胎児は死ぬ

# 子宮筋層の切開

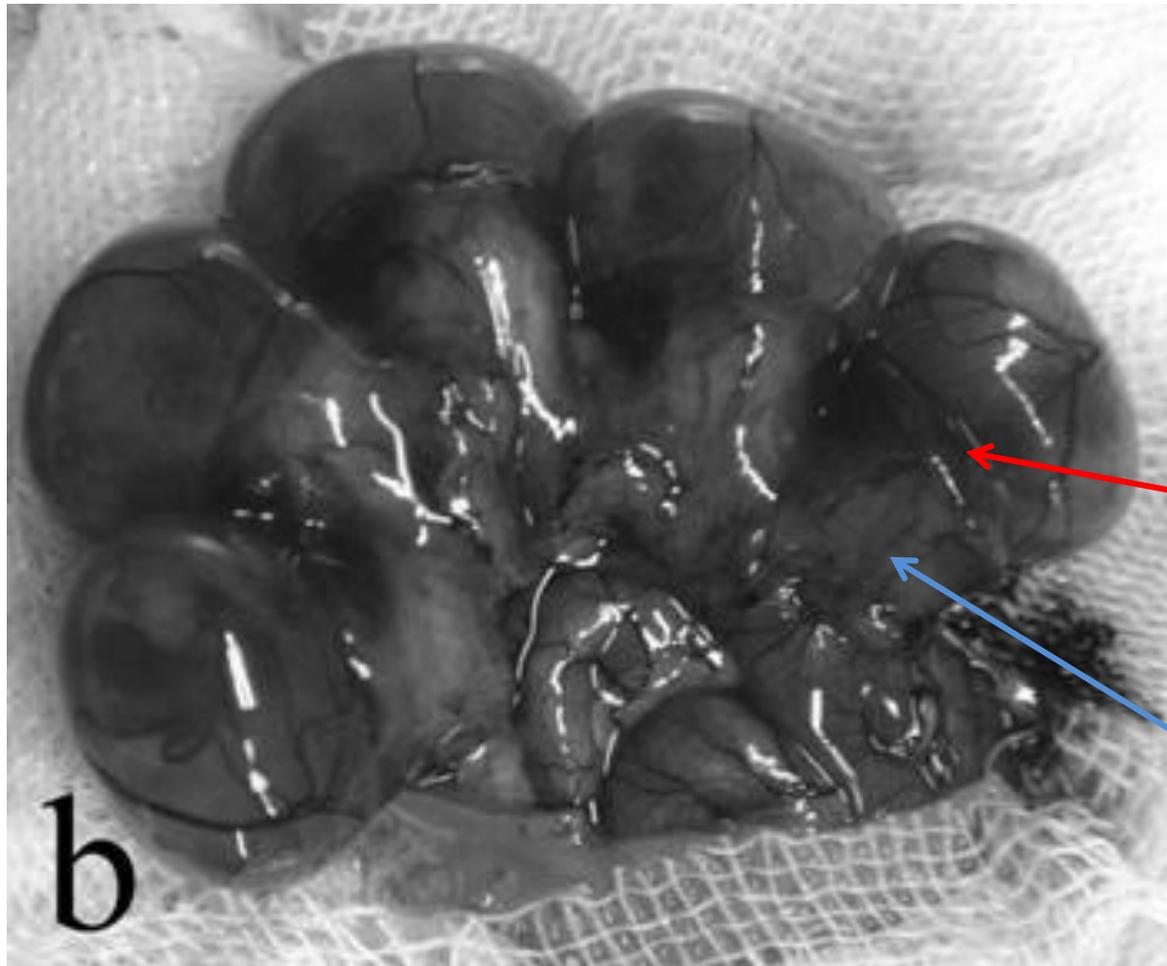


E13

ハサミとピンセットの先端は丸いものを使え！

E11ではyolk sacの上に、脱落膜、栄養膜が多少残る。  
⇒取り除いても問題ないが、yolk sacの血管に注意。

# 胎盤を触ってはいけない！

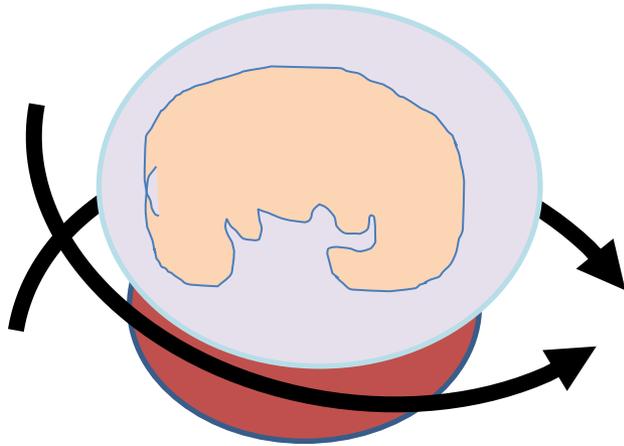


胎盤

子宮筋層

# 余剰な胎児を間引く

- 片側子宮に3(4)匹残して、あとは間引く。  
それ以上残すと、死亡率が上がる。
- 間引くときは、切れのあまり良くないハサミで胎膜ごと胎盤から切り取る。胎盤は残す。



切断

絶対に胎盤を傷つけない。  
胎盤を剥がすのは禁忌。  
ピンセットで胎児、臍帯を取り除かない  
⇒臍動静脈の止血が必要となる

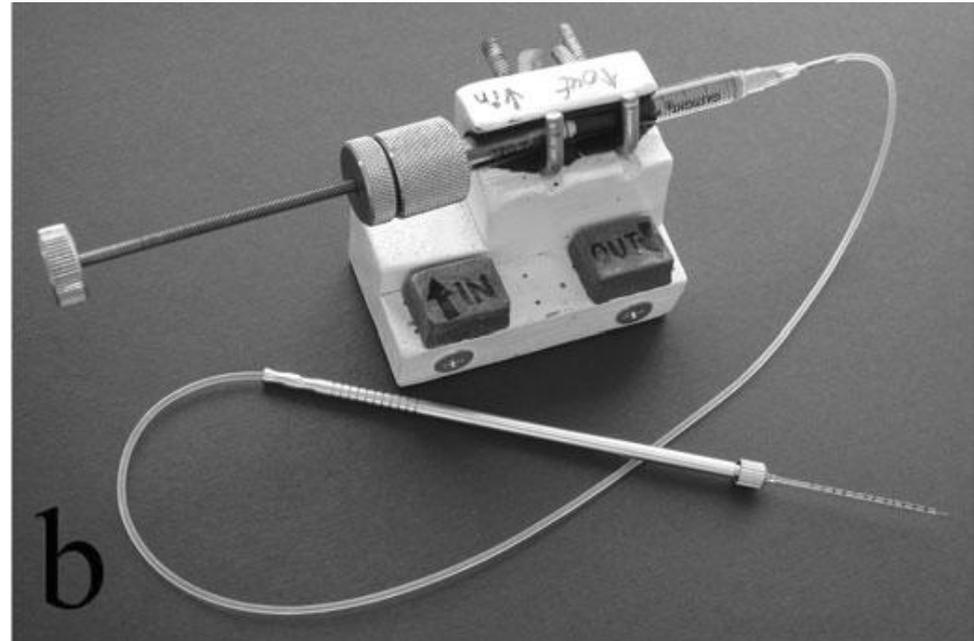
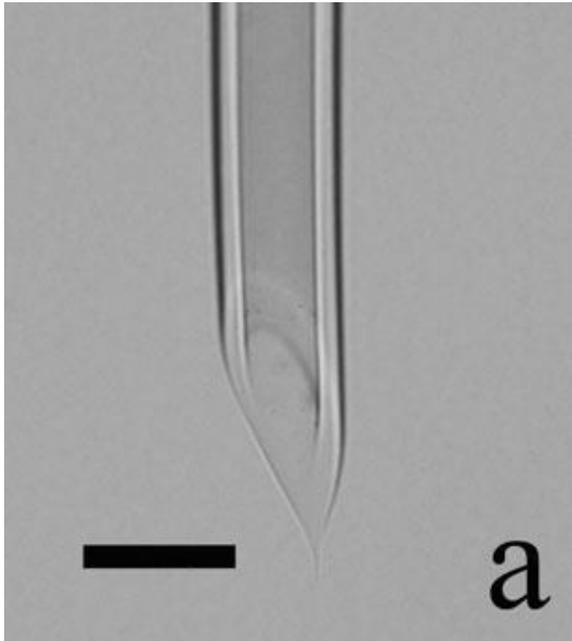
# 死亡胎児数と胎児生存率の関係

- 死亡胎児が多くなると、生存胎児の割合が急激に下がる現象が認められる。
- 速やかに、余剰胎児を取り出すこと。  
死亡した状態で残してはいけない。

⇒母体免疫系との関係かもしれない

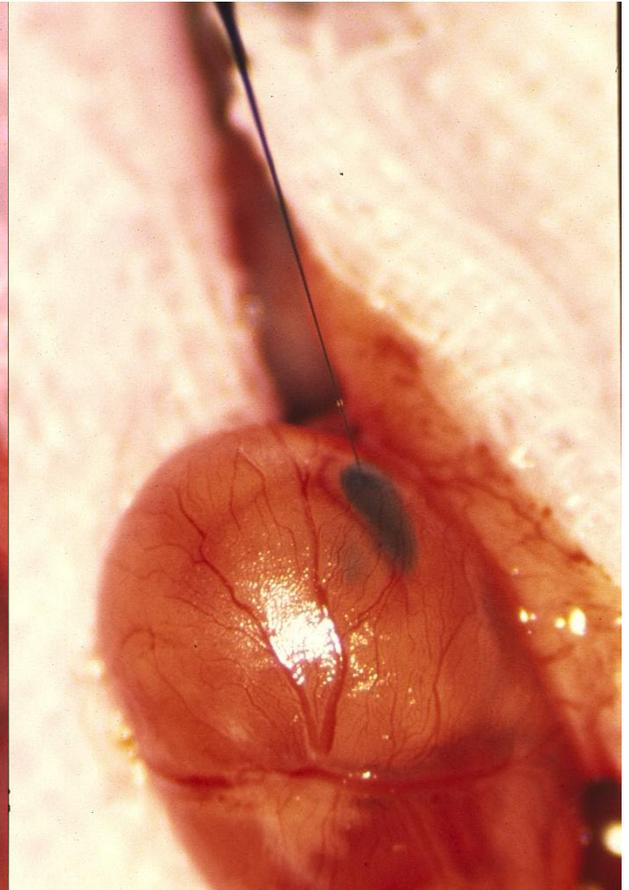
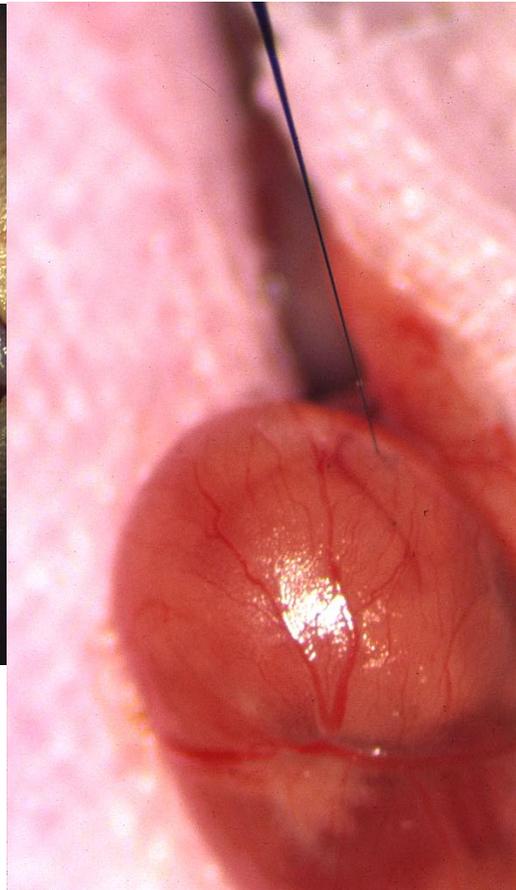
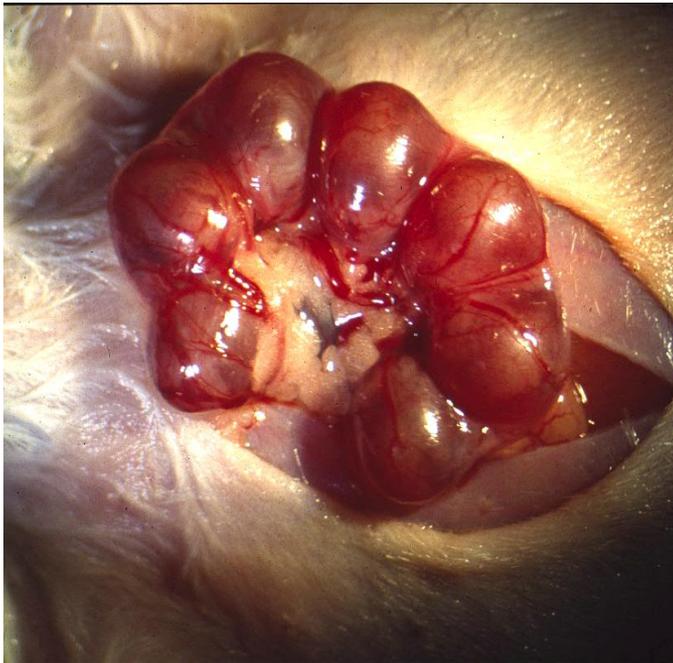
# インジェクション装置

- ガラス針 (外径20-100 $\mu\text{m}$ ) + シリンジ (oil/air)
- ガラス針 (外径 100 $\mu\text{m}$ ~) + マウスピース (air)
- 金属注射針 (外径150 $\mu\text{m}$ ~) + シリンジ (air)



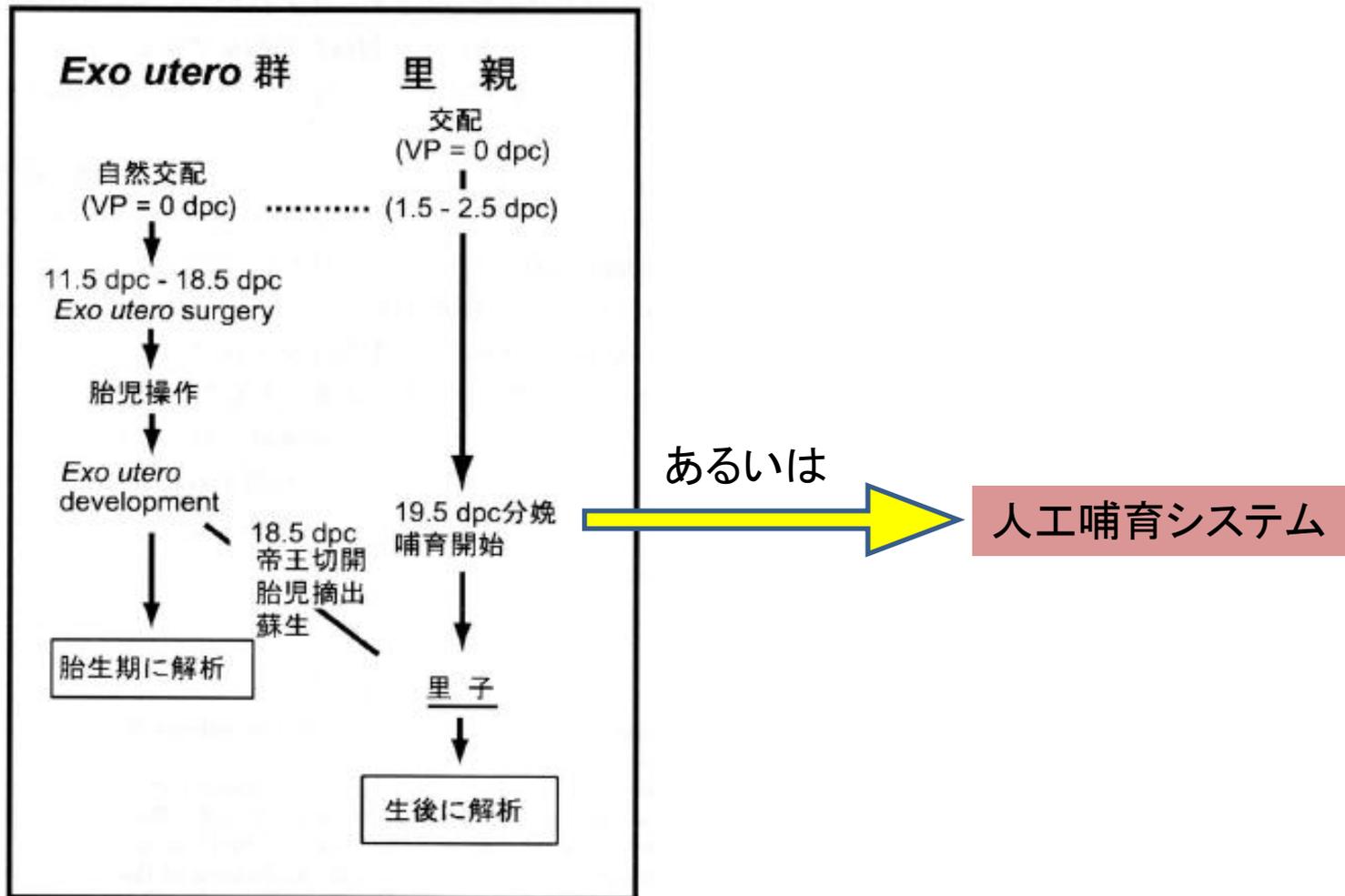
# E13.5マウス胎児へのmicro injection

胎児の左の脳(側脳室)に色素を  
注入している。ガラス針の直径:約20-40 $\mu$ m



卵黄嚢(とその下の羊膜)を  
通して、胎児が観察される。  
卵黄嚢の血管を傷つけては  
ならない。

# 生後解析のフローチャート



# Exo utero法の利点の例

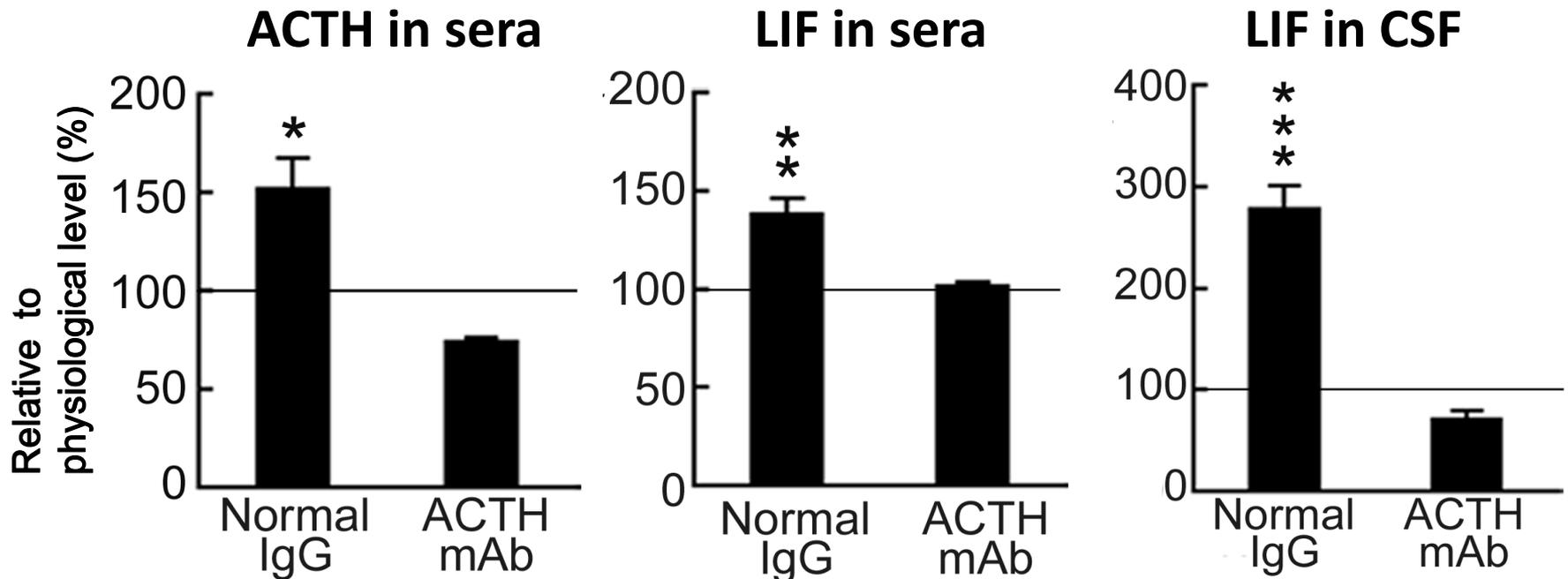
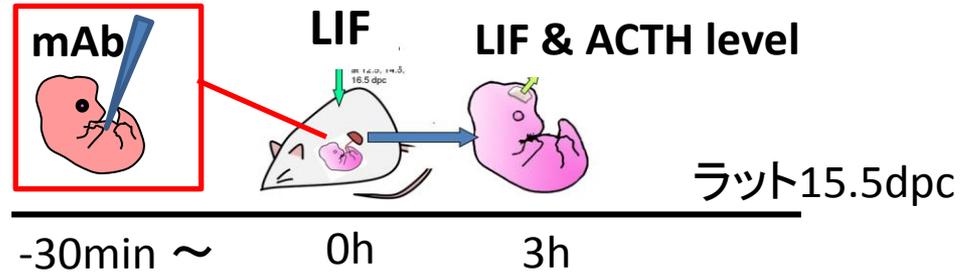
- 体表面から確認できる部位に対して正確なアプローチが可能
- 操作時期と部位を容易にコントロールできる
- 操作のタイミングをコントロールすることで in vitro並みの正確な処置が可能
- 母体との関係が解析可能
- 仮親を使うことで、生後の解析も可能
- 大がかりな実験装置は不要
- 低コスト

# Exo utero法の弱点、欠点、 in utero法との比較

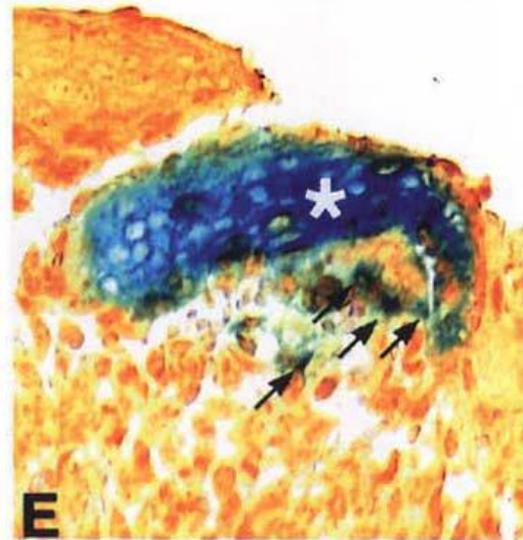
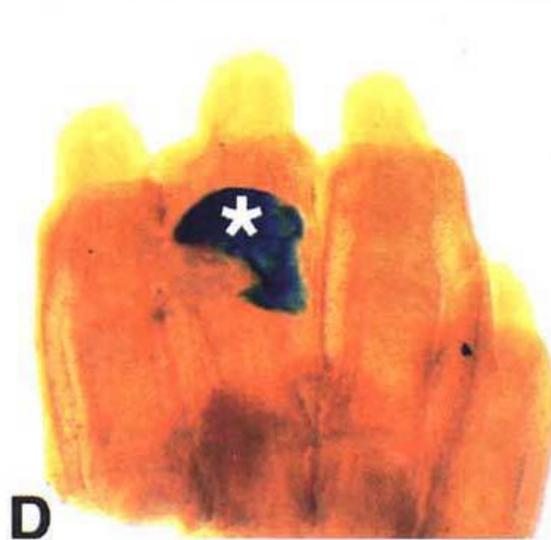
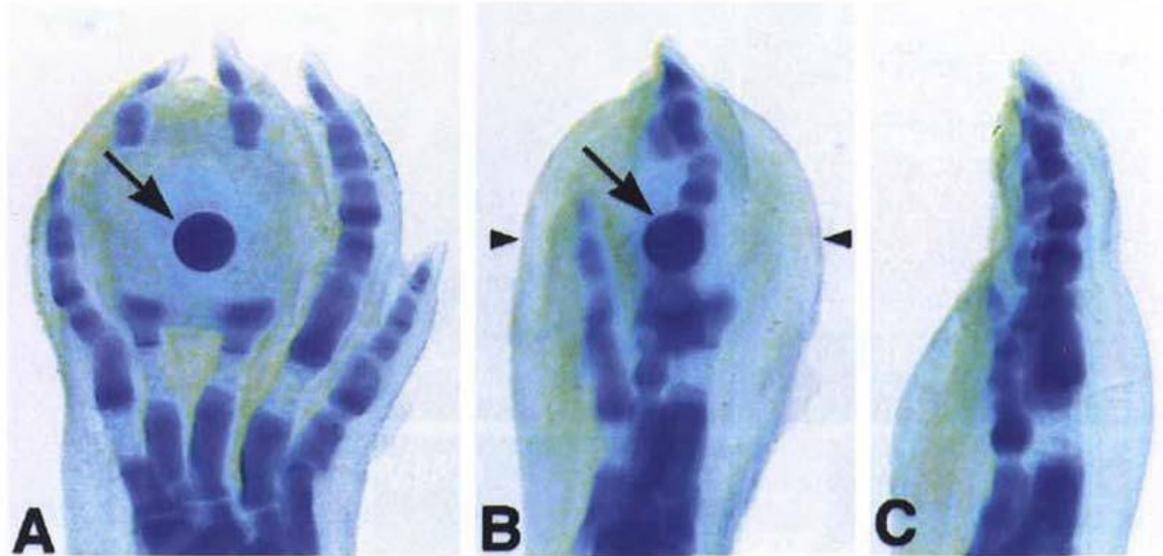
- E11より早い時期は対象外 ⇒ in utero
- 深さのコントロールが難しい ⇒ エコーガイド？
- 母獣1匹あたりで解析可能な胎児数が少ない(6匹～) ⇒ in utero
- 母体の影響を無視できない場合がある ⇒ in utero
- 外科的処置が引き起こす問題(炎症) ⇒ in utero
- 操作にやや熟練が必要 ⇒ in utero

# Exo uteroとin utero法はIn vitro的なin vivo実験である ～母体からの刺激に対する胎児のレスポンスの解析～

胎児のACTH総量の  
5倍のIgG量(モル比)を  
注入



# Exo utero法によるTGF-beta1ビーズおよび組織片の移植



# Exo utero development 操作の概略(マウス)

- 1 麻酔
- 2 子宮筋弛緩剤投与 (uterine:ritodrine hydrochloride)  
・・・E11, 12は反応悪い
- 3 腹部の剃毛
- 4 腹部の皮切(正中)、腹筋から剥離(動脈を触らない)
- 5 開腹(白線での腹筋正中切開)
- 6 子宮を引き出して胎児の確認、記録
- 7 片側ずつ子宮切開(胎盤の反対側を縦切開)
- 8 余剰胎児の間引き(3-4匹/片側を残す)
- 9 胎児への処置、腹腔内へ戻す
- 10 反対側で、7-9の繰り返し
- 11 腹筋の縫合、Hanks液の腹腔内投与 (1ml~)、皮膚を閉じる

## EXTRAPOLATION TABLE FOR MOUSE TO RAT EMBRYONIC AGES

MOUSE	RAT	MOUSE	RAT
1	2	8.5 – 9.0	10.5
2	3.25	9.5	11
3	4	10	11.5
4	5	10.25	11.75
4.5	6	10.50	12.125
5	6.75	11	12.5
5.5	7.25	12	13
6.0	7.50	12.5	13.5
6.5	7.75	13.0	14.5
7	8.5	14.5	15.5
7.5	9	15	16
7.75	9.5	16 – 16.5	17 – 18
8	10	17 – 19	19 – 22
Post Partem: 1 to 20	1 to 16	Post Partem: 21+	17+

(These are based upon similarities in embryological development but cannot apply to every minute detail.)