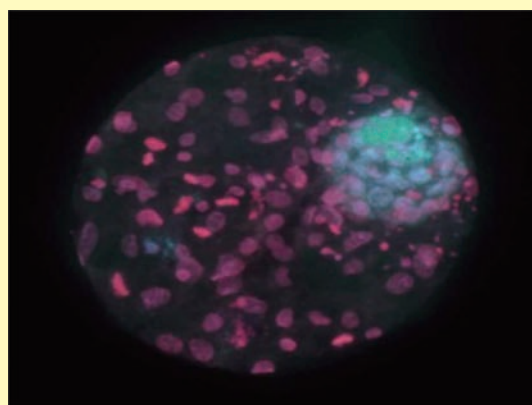
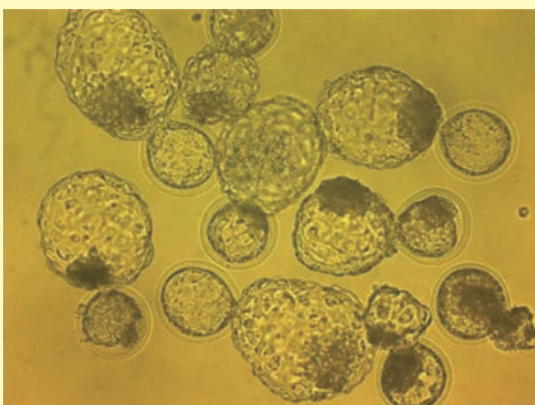
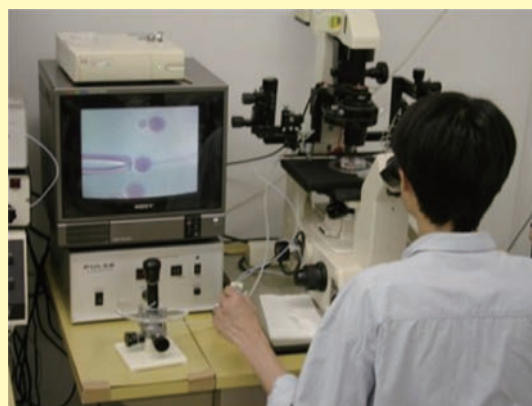




牛における核移植胚作出と 胚の品質評価のためのマニュアル



2011年3月

農研機構 畜産草地研究所

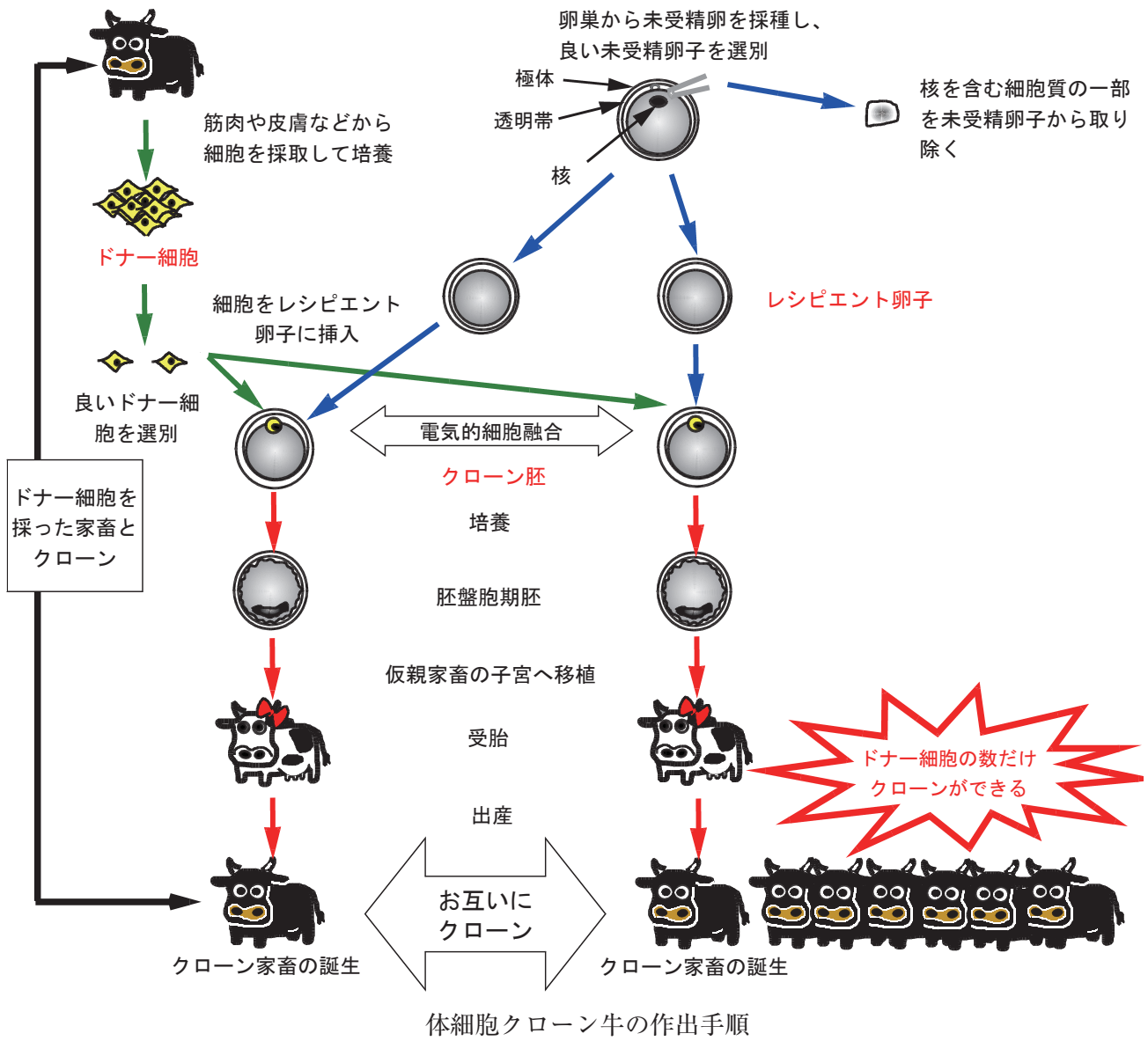
【表紙の説明】

左上：核移植中の卵子

右上：核移植操作

左下：生産された核移植胚（以上、畜産草地研究所）

右下：二重染色法による牛胚盤胞画像（九州沖縄農業研究センター）



(農林水産省： <http://www.s.affrc.go.jp/docs/clone/pdf/qanda.pdf> より転載)



生後0日



生後20日

体細胞クローン子牛



人工哺乳



自然哺乳

哺乳中の体細胞クローン牛



ドナー牛（右奥）と5頭の体細胞クローン牛



ドナー牛（左）と6頭の体細胞クローン牛

畜産草地研究所で生産された体細胞クローン牛

(畜産草地研究所)

技術リポート 9号
牛における核移植胚の作出と胚の品質評価のためのマニュアル
の刊行にあたって

本マニュアルは、先に刊行された「体細胞クローン牛生産のための周産期と新生子管理のマニュアル（技術リポート 8号、平成 22 年 3 月）」の姉妹編で、核移植胚の作出と胚の品質評価に関する技術体系やそれに関連するデータを記録している。この 2 冊のマニュアルにより、これまで実施された「体細胞クローン」に関するプロジェクト研究によって蓄積されてきた「核移植胚の生産から周産期管理、さらには新生子管理まで」の情報が整理され、全国の関係者に提供されることになる。

体細胞クローン牛に関する農林水産省の最初のプロジェクト研究は、21 世紀グリーンフロンティア研究・遺伝子組換え及びクローン技術による画期的な動植物の研究「体細胞クローン動物における個体発生機構に関する研究（平成 11～17 年度；農林水産技術会議事務局）」であった。その主要目的は、「体細胞クローン技術の高度化・安定化を目指し、個体発生の基礎的メカニズムを解明する」とされた。この研究プロジェクトの前期（平成 11～13 年度）では、4 系 15 小課題が旧農林水産省畜産試験場を中心とした 9 機関 15 研究室により実施された。

平成 13 年度には、国研の独立行政法人化に伴い、上記プロジェクト研究は、農林水産省・委託プロジェクト研究として一新され、後期（平成 14～17 年度）の研究（3 系 15 小課題）として実施されることとなった。その際の担当機関は、畜産草地研究所を中心とした 10 機関 14 研究室であった。しかし、平成 14 年度、研究内容の見直しを再度行い、1 系 8 小課題に整理され、7 機関 8 研究室による研究体制に移行し、平成 17 年度にこのプロジェクト研究は終了した。

平成 18 年度からは、農研機構の交付金プロジェクト研究として「体細胞クローン牛の作出率向上のための個体発生機構の解明（平成 18～22 年度）」が、体細胞クローンの飛躍的な作出率の向上と安定化を図ることを目的に開始された。このプロジェクト研究（6 中課題、16 小課題）には、畜産草地研究所と九州沖縄農業研究センターを含む 4 機関 5 チーム等が携わった。

この 12 年間にわたる一連のプロジェクト研究を通じた大きな課題の一つが「体細胞クローン牛の生産率向上」であった。特に、核移植胚の発生能に関する研究が精力的かつ継続的に行われてきた。これらの研究によって、ある一定の品質（発生能）を有する核移植胚の作出技術が確立されたと考えられる。この技術をまとめた本マニュアルによって提供される情報が牛のクローン研究をこれから行おうとしている初心者はもとより、経験豊富な研究者にも活用されることで、「体細胞クローン牛の生産率向上」が達成されていくことを念願している。

平成 23 年 3 月

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構
畜産草地研究所 所長 松本光人

目次

マニュアル

1. 核移植胚の作出方法	
(1) レシピエント卵子の準備	1
① 卵巣輸送	
② COC の採取	
③ 成熟培養	
④ 成熟卵子の裸化处理	
(2) レシピエント卵子の除核	4
① ホールディングピペットの作製	
② カuttingニードルの作製	
③ 除核	
④ 除核の確認	
(3) ドナー細胞の注入	7
① インジェクションピペットの作製	
② ドナー細胞の準備	
③ インジェクション	
(4) 細胞融合	9
(5) 活性化処理と発生培養	10
(6) 主な培養液や試薬の調製	11
(7) 核移植胚の発生能に関するデータ	17
① レシピエント卵子の由来による影響	
② ドナー細胞の体外培養による影響	
③ 様々な細胞融合と活性化のタイミングにより作出された核移植胚の発生能	
④ 集合核移植胚の発生能	
⑤ ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤処理	
2. 胚の品質評価法	
(1) 胚盤胞の二重染色法	28
① 染色手順	
② 二重染色操作時の注意点	
③ 準備	
④ 免疫学的二重染色法の解説	
(2) 体細胞クローン胚における DNA メチル化の検出法	33
① 実験の手順	
② 準備	
③ 初期胚におけるメチル化状態検出の解説	
付録	43

マニュアル

1. 核移植胚の作出方法

(1) レシピエント卵子の準備

レシピエント卵子は、食肉処理場由来卵巣または生体から卵丘細胞-卵子複合体 (Cumulus-Oocyte Complexes; COC) を採取して、体外成熟後に用いる。ここでは食肉処理場由来卵巣を用いた場合について記述する。

①卵巣輸送

卵巣は、20～30℃にした滅菌生理食塩液に抗生剤（ペニシリン G カリウム明治 100 単位/ml、硫酸ストレプトマイシン 100 mg 力価/ℓ）を加えた液に入れ、輸送する。

② COC の採取

予め、抗生剤（ペニシリン G カリウム明治 100 単位/ml、硫酸ストレプトマイシン 100mg 力価/ℓ）を添加した卵巣洗浄用滅菌生理食塩液および m-PBS+BSA (3 mg/ml) を 38℃ に保温しておく。実験室に持ち帰った卵巣は、ステンレス製ビーカーに取り出し、生理食塩液で数回洗浄する (図 1)。



図 1. 食肉処理場由来卵巣

吸引法 (18G × 1½ 注射針を装着した 5 ml のシリンジ) で 2-6 mm の小卵胞から COC を吸引し、尖底遠沈管に集める (図 2)。遠沈管は 38℃ の恒温槽で保存する。



図 2. シリンジによる COC の吸引 (左) と尖底遠沈管の底に回収された COC

*本文中にゴシック体で示した培養液や試薬の調製法は、(6) 主な培養液や試薬の調整 (p11) の中で解説してある。

パスツールピペットで遠沈管の底にたまったCOCを吸い上げ、予め底面に針等で格子状に線を引いた100 mmシャーレに移す。実体顕微鏡下で卵子採取用に先端を細くしたピペットでCOCを拾い上げ、m-PBS + BSA (3 mg/ml) を2 ml入れた35 mmシャーレに集める(図3)。数層の卵丘細胞が緊密に卵子の周りを囲んでいるCOCを選別し、成熟培養を行う。

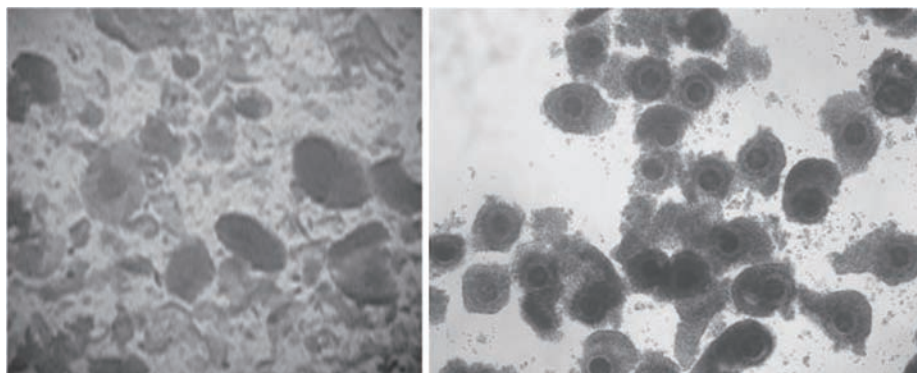


図3. 卵胞吸引後の液(右)から拾い上げたCOC(左)

③成熟培養

予め、成熟用培地(TCM-199+10%ウシ胎子血清[FBS])を準備しておく。成熟用培地で数回洗浄し(図4)、20~22時間培養する(38.5℃, 5% CO₂ in air)。



図4. 卵子洗浄の様子

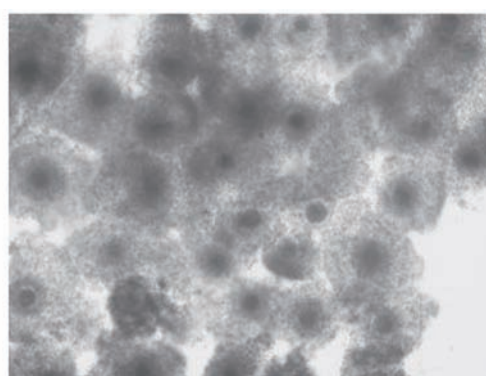


図5. 体外成熟後のCOC

④成熟卵子の裸化処理

0.1%ヒアルロニダーゼ加M2液1 ml(使用直前まで38℃に保温)の入った尖底遠沈管に成熟卵子(図5)を移し、3~5分程度ボルテックスによりある程度の卵丘細胞を除去する。液をパスツールピペットで時計皿に移し、更に遠沈管の壁をヒアルロニダーゼ加M2液1 mlで洗浄し、時計皿に移す。時計皿に入った成熟卵子をピペッティングで完全に裸化する。裸化卵子をTCM-199A+20% FBSのドロップに移し、第1極体の放出が確認でき、かつ細胞質が均一な卵子を洗いながら選別する。選別した卵子は、TCM-199+10% FBSのドロップに移し、洗浄後CO₂インキュベータ内で使用するまで保管する。

*牛海綿状脳症(BSE)の発生(平成13年9月)以降、BSE検査の結果を待つため、卵巣の当日利用が困難となっている。そのため、多くの場合、半~1日程度、保存した卵巣を

実験に用いることになる。卵巣の保存が核移植胚の発生能に及ぼす影響については(7) ①に記載する。なお、食肉処理場で採取した卵巣を試験に利用する際は、と畜場法とその関連法規に基づく適切な措置を講じる。

と畜場法施行規則(第12条第2項1～5号)には、卵巣をと畜場から持ち出すための都道府県知事による許可の基準として、以下の記載がある(詳細は付録を参照)。

- 一 解体後検査が終了するまでの間、持ち出された牛の卵巣がいずれの牛から得られたものであるかを識別するための措置が適切に講じられていること。
- 二 解体後検査が終了するまでの間、持ち出された牛の卵巣の紛失を防止するための措置が適切に講じられていること。
- 三 持ち出された牛の卵巣の保存を行う施設が、家畜改良増殖法(昭和二十五年法律第二百九号)に規定する家畜人工授精所、独立行政法人家畜改良センター又は牛の改良増殖に係る研究を行う機関であって、解体後検査が終了するまでの間、当該牛の卵巣を適切に保存しておくことができるものであること。
- 四 牛の卵巣が持ち出されると畜場の管理者により、当該牛の卵巣を持ち出した者の氏名又は名称及び連絡先、当該牛の卵巣の保存を行う施設の名称及び連絡先その他管理体制の確保のため必要な情報を適切に記録するための措置が講じられていること。
- 五 持ち出された牛の卵巣の保存を行う施設において、当該牛の卵巣を持ち出した者の氏名又は名称及び連絡先、当該牛の卵巣が持ち出されたと畜場の名称及び連絡先その他管理体制の確保のため必要な情報を適切に記録するための措置が講じられていること。

(2) レシピエント卵子の除核

①ホールディングピペットの作製

ガラス管（ナリシゲ G-1）をマイクロプーラーで細く引き伸ばす（図6）。



図6. マイクロプーラー

先端の外径が100 μm 前後の場所をアンプルカッター等で折れないように軽く傷つけ、その位置より先端の方を押すようにして切断する。マイクロフォージのヒーター線の中心に予め先端が細く引かれたピペットの先端部を接触させガラスのビーズ玉を作る。マイクロフォージのヒーター部のビーズ玉に先端部を接近させ、丸く溶かす（図7）。

先端部から少し離れた適度な場所（上に曲がらないような太さの位置）をヒーター部のビーズ玉に接近させ約45度の角度に曲げる。

②カッピングニードルの作製

ガラス管（Drummond Microdispenser, 3-000-210-G）をマイクロプーラーで細く引き伸ばす（図6）。先端の外径が15～30 μm の部分を微細ピンセット（あるいはアンプルカッター）で切断する。先端部をヒーター部のビーズ玉にあて、先端を引き伸ばす（図8）。

先端部から少し離れた適度な場所（上に曲がらないような太さの位置）をヒーター部のビーズ玉に接近させ約45度の角度に曲げる。

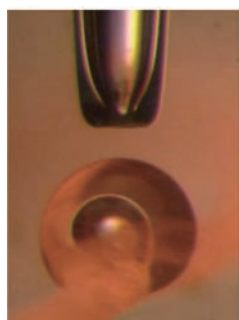


図7. ホールディングピペットの作製

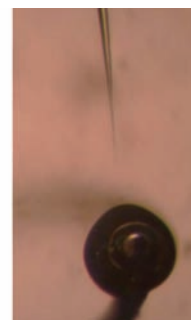


図8. カッピングニードルの作製

③除核

TCM-199A + 20% FBS の除核用ドロップ (50 μ l) を作成し、オイルカバーする。マニピュレーターにホールディングピペットとカッティングニードルをセットする (図 9)。

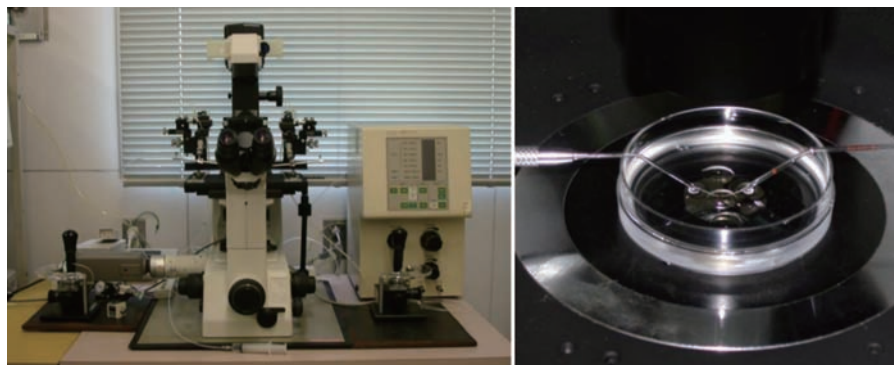


図 9. マイクロマニピュレーター (左) にホールディングピペットとカッティングニードルをセットした様子 (右)

約 30 個の卵子を除核用ドロップに入れ、卵子の第 1 極体が上になるように、ホールディングピペットで吸引固定する (図 10)。細胞質を痛めないように第 1 極体の真上の透明帯にカッティングニードルを貫通させ (図 11)、ホールディングピペットから卵子を離して、ホールディングピペットとカッティングニードルを摺り合わせて透明帯を切開する (図 12)。

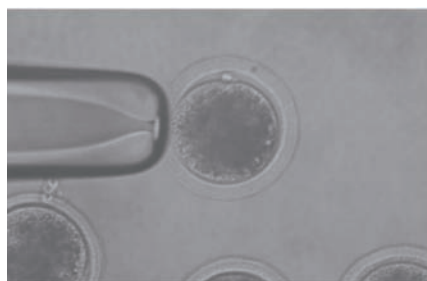


図 10. 卵子の固定

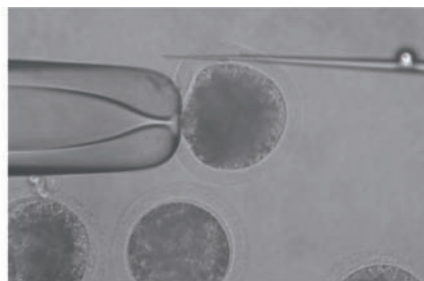


図 11. 透明帯の切開 (1)

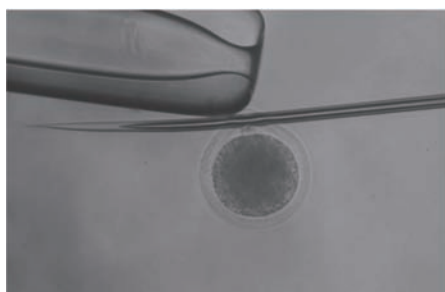


図 12. 透明帯の切開 (2)

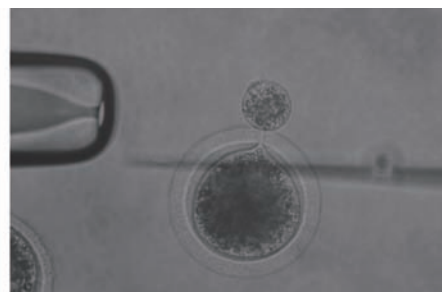


図 13. レシピエント卵子の除核

切開部を上にし、カッティングニードルで上から押さえながら、第 1 極体とその近くの細胞質 (卵子の核を含むと思われる) を押し出す (図 13)。

④除核の確認

除核前に次の2種類のシャーレを準備する。1) シャーレに TCM-199A + 20% FBS の微小滴 (約 2 μ l) を卵子1個につき2段つくってオイルカバーし、38℃ホットプレート上に置く (例: 上段は極体+近くの細胞質、下段は核移植用の卵細胞質)。2) TCM-199A + 20% FBS + 0.1% Hoechst 33342 の微小滴を卵子1個につき1段つくってオイルカバーして遮光する (図14)。

除核操作後、1) のシャーレに「極体+近くの卵細胞質」および「核移植用卵細胞質」を上下段ペアで入れる (図15)。2) のシャーレに1) のシャーレから「極体+近くの卵細胞質」を順番に移動し、約30分間室温で遮光して静置する。

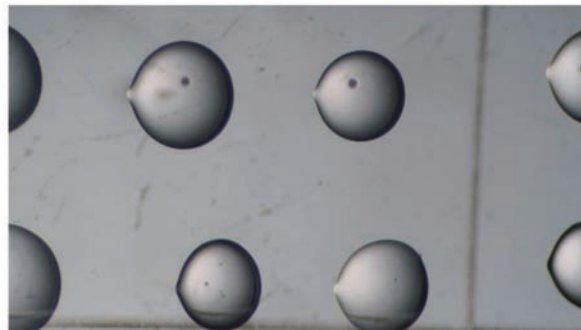
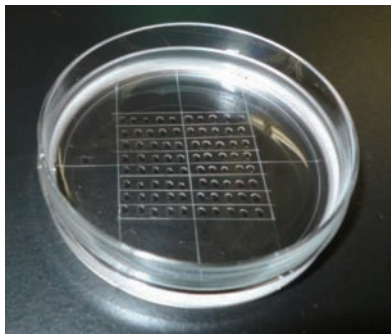


図14. 除核確認用シャーレ 図15. 核移植用卵細胞質 (上) と押し出した細胞質 (下)

蛍光顕微鏡 (UV 励起) で核の有無を検査する (図16)。除核確認済みの卵子は TCM-199 + 10% FBS に移し、CO₂ インキュベータ内へ戻す。



図16. 除核成功の確認 (ヘキスト染色)

(3) ドナー細胞の注入

①インジェクションピペットの作製

ガラス管 (Drummond Microdispenser, 3-000-210-G) をマイクロプラーで細く引き伸ばす (図 6)。核移植に用いるドナー細胞の大きさに適合した内径のガラス管の部分にヒーター部のビーズ玉にあて、徐々にヒーターの強さを上げていき、先端部が上下に動揺したらヒーターのスイッチを OFF にして先端部を切断する (図 17)。

先端部から少し離れた適度な場所 (上に曲がらないような太さの位置) をヒーター部のビーズ玉に接近させ約 45 度の角度に曲げる。

(ピペットの先端のガラス部を薄くする場合: 先端部内面をフッ化水素 [約 10% の溶液] で 40 ~ 50 回洗浄し、壁を薄くする。超純水で同様に 60 ~ 70 回洗浄する。)

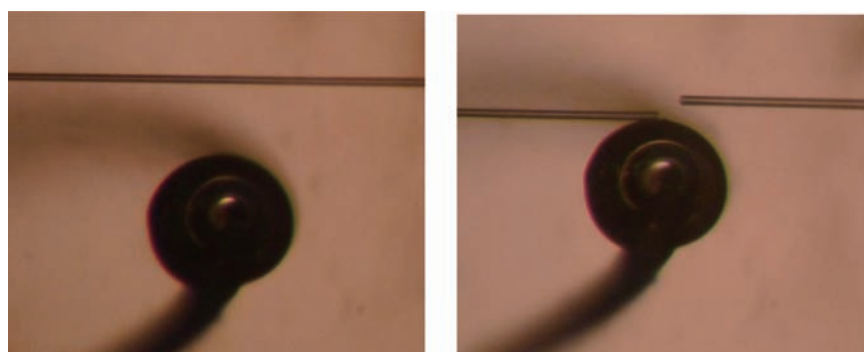


図 17. インジェクションピペットの作製の様子 (左は切断前、右は切断後)

②ドナー細胞の準備

ドナー細胞を培養している 35 mm シャーレから上清 (培養液) を吸引除去し、PBS (-) を 2 ml 加える。上清を吸引除去し、0.125% トリプシン + 0.05% EDTA・2Na を約 300 μ l 加え、室温またはインキュベータで 5 分間程度静置する。シャーレの底を指で弾くなどして、ドナー細胞の浮遊を確認した後、PBS (-) + 0.5% FBS でシャーレ内をピペッティングしながら液を吸い取り、尖底遠沈管に入れ遠心する (1,200 rpm (280 x g)、5 min)。上清を除去し、沈渣を指で攪拌後、PBS (-) + 0.5% FBS を加え、よく混和した後に、適量を細胞インジェクション用のドロップに注入する (図 18)。

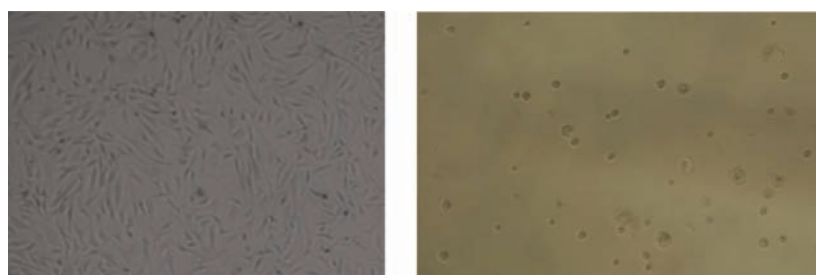


図 18. 培養細胞 (右: 単離前、左: 単離後)

③インジェクション

インジェクション用シャーレに **TCM-199A** + 20% FBS + フィトヘマグルチニン (PHA)-P (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (レシピエント卵子用) の 30 μl ドロップと **PBS** (-) + 0.5% FBS (ドナー細胞用) の 15 μl ドロップをそれぞれ作成し、オイルカバーする。マニピュレータにホールディングピペットとインジェクションピペットをセットする。ドナー細胞およびレシピエント卵子をそれぞれのドロップへ移す (卵子は 30 分で処理できる個数を移す)。

インジェクションピペットでドナー細胞を 1 個ずつ (計 1 ~ 数個) 吸引する。このインジェクションピペットをレシピエント卵子用のドロップに移動させ、レシピエント卵子をホールディングピペットにより固定してドナー細胞をレシピエント卵子の切開部から囲卵腔内に注入する (図 19 左)。ドナー細胞を注入したら、インジェクションピペットを抜く (図 19 右)。レシピエント卵子とドナー細胞が接着していないときは透明帯の上からドナー細胞とレシピエント卵子が接着するようにインジェクションピペットで押さえる (図 19 下)。

インジェクションが終了したら卵子は **TCM-199** + 10% FBS に移し、 CO_2 インキュベータ内へ戻す。

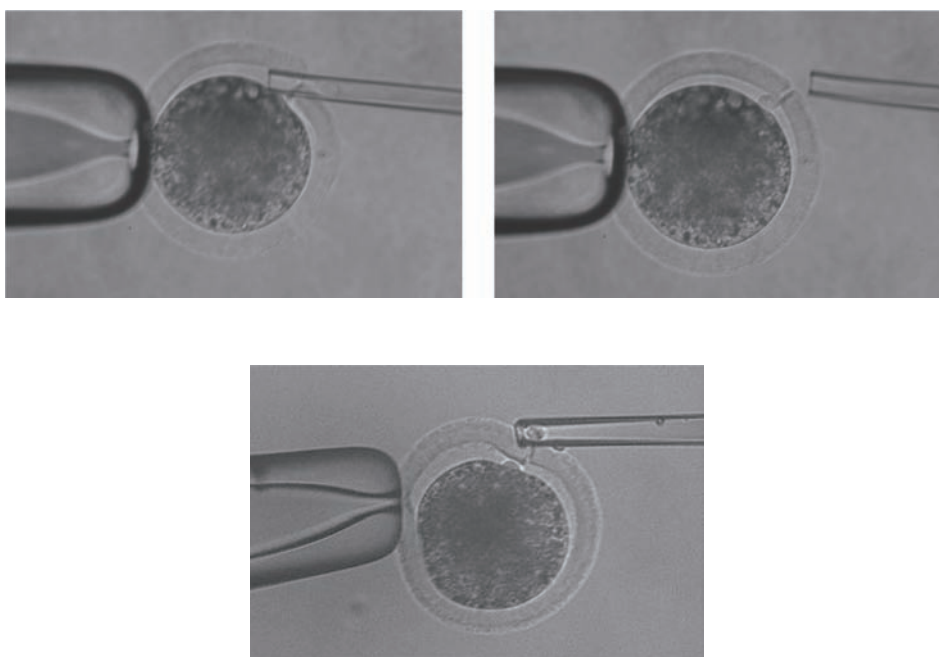


図 19. インジェクション (ドナー細胞を囲卵腔に注入) の様子

(4) 細胞融合

予め室温にした融合液 (Zimmerman's fusion medium: ZFM) を Nunc 4well dish (176740) の各 well に 1 ml (1 番目と 4 番目は TCM-199A + 20% FBS 200 μ l と ZFM 800 μ l でもよい)、well 間に 4 ml 入れ、さらに融合用のシャーレに融合液を満たす。ニードル型電極をマニピュレータにセットする (図 20 左)。

卵子 (10-15 個) をピペットで吸い、そのピペットに付着したオイルを 4well dish の well 間の ZFM で落とし、最初の well に入れる。卵が沈むのを確認したら新しいピペットで 2 番目、3 番目の well に移動する。そして、融合用シャーレに卵子を移す。

ドナー細胞とレシピエント卵子の接触面が電流方向に対して垂直 (図 20 右) になるよう、ニードル型電極で挟み込む。ニードル型電極、DC 25 V/150 μ m、10 μ sec \times 1 回の条件で、通電する。

4well dish の 4 番目の well に移す。室温においた TCM-199A + 20% FBS に移し、洗浄する。その後、卵子の入った TCM-199A + 20% FBS のシャーレを 38 $^{\circ}$ C のホットプレート上で 30-60 分静置する。融合率を確認後、融合した卵子のみ活性化処理に用いる。

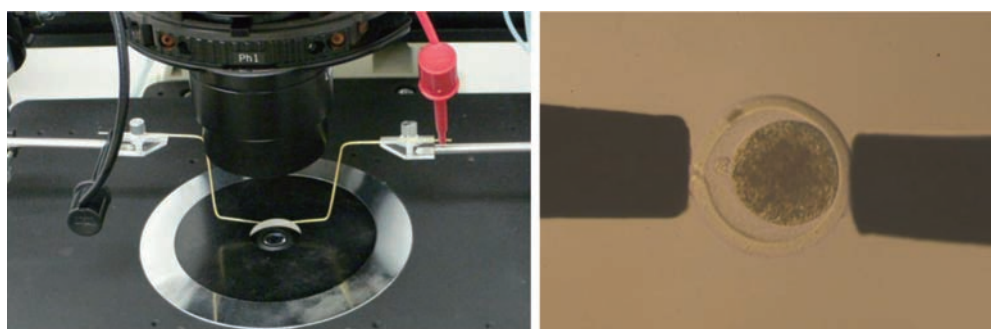


図 20. 細胞融合用ニードル型電極 (左) と細胞融合の様子 (右)

(5) 活性化処理と発生培養

融合確認後 10 μ M Ca イオノフォア + m-PBS (BSA free) で 5 分間遮光して室温で反応させる。培養液（血清の入った培地）が混じらないように卵子がシャーレの底に付着するのを目安としてドロップを数回移す。5 分経過後は、Ca イオノフォア + m-PBS (BSA free) を約 80% 除去し、TCM-199 + 10% FBS + 2.5 μ g/ml サイトカラシン D + 10 μ g/ml シクロヘキシミドを加えて反応を停止させる。TCM-199 + 10% FBS + サイトカラシン D + シクロヘキシミドのドロップに移し、数回洗浄後（38.5 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ in air）で 1 時間培養する（38.5 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ in air）。TCM-199 + 10% FBS + シクロヘキシミドのドロップに移し、CO₂ インキュベータ内で 4 時間培養する（38.5 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ in air）。発生培地（IVD-101）で数回洗浄後に CO₂ インキュベータで低酸素下（38.5 $^{\circ}$ C, 5% O₂, 5% CO₂）で 7 日間培養する。それによって、移植可能な発生段階（胚盤胞）まで発生した核移植胚が得られる（図 21）。

核移植胚を受胎牛に移植し、同一の細胞提供牛に由来する多子を生産できる（図 22）。なお、受胎率を高めるためには、胚の品質だけではなく、受胎牛に対する日常の飼養管理、移植時の受胎牛選別ならびに優れた移植技術も重要である。

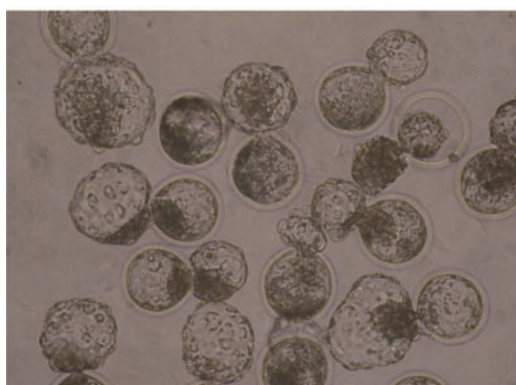


図 21. 培養 7 日後の胚盤胞期の核移植胚



図 22. 細胞提供牛（右上）とクローン子牛

(6) 主な培養液や試薬の調整

・ 抗生剤ストック液 [Antibiotic stock (PC+SM)]

ペニシリン (結晶ペニシリン G カリウム明治、20 万単位)	5 本
ストレプトマイシン (硫酸ストレプトマイシン明治、1 g 力価)	1 本
生理食塩水	

- 1) ストレプトマイシン (SM) のバイアルに生理食塩水 2.8 ml を加え、3.5 ml とする。
- 2) ペニシリン (PM) のバイアル 1 本につき、1) を 0.7 ml と生理食塩水を 1.3 ml 加える。
- 3) 冷凍保存する。

<ストック液の最終濃度>

$$\text{PC} : 20 \text{ 万単位} / 2 \text{ ml} = 10 \text{ 万単位} / \text{ml} = 100 \text{ 単位} / \mu\text{l}$$

$$\text{SM} : 200 \text{ mg} / 2 \text{ ml} = 100 \text{ mg} / \text{ml} = 100 \mu\text{g} / \mu\text{l}$$

・ PBS (－)

[1,000 ml]

Dulbecco's PBS (－) (日水製薬; 05913)	9.6 g
(NaCl	8,000 mg)
(KCl	200 mg)
(Na ₂ HPO ₄	1,150 mg)
(KH ₂ PO ₄	200 mg)

- 1) 1,000 ml のメスシリンダーに Dulbecco's PBS (－) を 9.6 g 入れる。
- 2) 超純水を 1) に注いで溶解し、1,000 ml にメスアップする。
- 3) オートクレーブ (121℃、15 min) を用いて滅菌する。

・ 修正ダルベッコ PBS (m-PBS)

[1,000 ml]

Dulbecco's PBS (－) (日水製薬; 05913)	9,600 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	132.4 mg
MgCl ₂ ·6H ₂ O	100.0 mg
D (+) -Glucose	1,000 mg
Pyruvic Acid sodium salt	40.0 mg
Antibiotic stock (PC+SM)	1.0 ml

- 1) 1,000 ml のメスシリンダーに Dulbecco's PBS (－) を 9.6 g 入れ、約 700 ml の超純水で溶解する。
- 2) 約 200 ml の超純水で CaCl₂·2H₂O (132.4 mg) および MgCl₂·6H₂O (100.0 mg) を溶解する。
- 3) 1) と 2) をなるべく時間をかけて混合する (白濁した液は使用不可)。
- 4) 3) に D (+) -Glucose (1,000 mg) および Pyruvic Acid sodium salt (40 mg) を加え溶解し、抗生剤ストック液 (1 ml) を加える。
- 5) 溶解を確認したら、1000 ml にメスアップし、0.22 μm のフィルターで滅菌する。

• TCM-199

[1,000 ml]

TCM-199(Gibco 31100-035)	9,900 mg
NaHCO ₃	2,200 mg
Antibiotic stock(PC+SM)	1.0 ml

- 1) TCM-199 粉末(9.9 g)を超純水 約 900 ml に溶解する。
- 2) NaHCO₃(2.2 g)を加える。
- 3) 抗生剤ストック液(PC+SM)を1 ml加える。
- 4) 溶解を確認したら、1000 ml にメスアップし、0.22 μm のフィルターで滅菌する。

• TCM-199A

[1,000 ml]

TCM-199 (Gibco 31100-035)	9,900 mg
NaHCO ₃	350 mg
HEPES	4,776 mg
Antibiotic stock (PC+SM)	1.0 ml

- 1) TCM-199 粉末(9.9 g)を超純水 約 850 ml に溶解する。
- 2) NaHCO₃(350 mg)を加える。
- 3) 別の容器で、HEPES(4.776 g)を超純水 約 100 ml に溶解する。
- 4) TCM-199 溶液に HEPES 溶液を加える。
- 5) 抗生剤ストック液(PC + SM)を1 ml加え、pH7.2 に調整する。
- 6) 1000 ml にメスアップし、0.22 μm のフィルターで滅菌する。

• M2 液

[100 ml]

NaCl	553 mg
KCl	36 mg
KH ₂ PO ₄	16 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	29 mg
NaHCO ₃	35 mg
D(+)-Glucose, anhydrous	100 mg
Pyruvic Acid sodium salt	3.6 mg
0.5% Phenol Red	200 μl (1 mg)
DL-Lactic Acid sodium salt	261 mg (60%液の場合 332 μl)
BSA	400 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	25 mg
HEPES	497 mg
Antibiotic stock (PC+SM)	100 μl

- 1) 100 ml のメスシリンダーに約 80 ml の超純水を入れ、NaCl(553 mg)を加えて混和する。

- 2) KCl(36 mg)を加える。
- 3) KH₂PO₄(16 mg)を加える。
- 4) MgSO₄·7H₂O(29 mg)を加える。
- 5) NaHCO₃(35 mg)を加える。
- 6) D(+)-Glucose(100 mg)を加える。
- 7) Pyruvic Acid(3.6 mg)を加える。
- 8) DL-Lactic Acid(60%液 332 μl)を加える。
- 9) 0.5% Phenol Red液(200 μl)を加える。
- 10) CaCl₂·2H₂O(25 mg)を約 5 ml の超純水に溶解して加える。
- 11) HEPES(497 mg)を加える。
- 12) BSA(400 mg)を加える。
- 13) 抗生剤ストック液(PC+SM)を100 μl加える。
- 14) pH7.2-7.4 に調整し、超純水で 100 ml にメスアップし、0.22 μm のフィルターで滅菌する。

0.1%ヒアルロニダーゼを作製する場合は BSA の代わりに PVP(1,000 mg)を溶解し、0.1%のヒアルロニダーゼを加え溶解し、0.22 μm のフィルターで滅菌する。

・活性化用培地 Ca イオノフォア ストック液

[2 ml]

Ca ionophore (A23187)	10 mg (19 mM)
DMSO	1.9 ml

- 1) 10 mM/ml に調製後、10 μl ずつ分注し、-20℃で遮光保存する。
- 2) m-PBS (BSA free) 1 ml 当たり 1 μl 加えて使用する (最終濃度 10 μM /ml)。

・活性化用培地 サイトカラシン D ストック液

[1 ml]

Cytochalasin D	1 mg
DMSO	1 ml

- 1) 1 mg/ml に調製後、2.5 μl およびストック用 (約 100 μl) をマイクロチューブに分注し、-20℃で保存する。
- 2) 2.5 μl を分注したマイクロチューブに培養液を 1 ml 加えて使用する (最終濃度 2.5 μg/ml)。

・活性化用培地 シクロヘキシミド ストック液

[5 ml]

Cycloheximide	5 mg
---------------	------

- 1) 超純水で 1 mg/ml に調製後、100 μl × 50 本に分注し、-20℃で保存する。
- 2) 培養液 1 ml に対し Cycloheximide stock 10 μl を加えて使用する (最終濃度 10 μg/ml)。

・細胞融合液 Zimmerman's mammalian cell Fusion Medium (ZFM)

[1,000 ml]

Sucrose	95,840 mg
Mg(CH ₃ COO) ₂ ·4H ₂ O	107 mg
Ca(CH ₃ COO) ₂ ·H ₂ O	17.6 mg
K ₂ HPO ₄	174 mg
Glutathione	31 mg
BSA	10 mg

- 1) メスシリンダーに超純水を約 900 ml 入れ、スターラーで攪拌しながら Sucrose (95,840 mg) を少しずつ溶解する。
- 2) Mg(CH₃COO)₂·4H₂O (107 mg) を加える。
- 3) Ca(CH₃COO)₂·H₂O (17.6 mg) を加える。
- 4) K₂HPO₄ (174 mg) を加える。
- 5) Glutathione (31 mg) を加える。
- 6) BSA (10 mg) を加える。
- 7) pH7.2 に調整し、1,000 ml にメスアップし、30 分程度攪拌する。
- 8) 0.22 μm のフィルターで滅菌し、4℃で保存する。
- 9) 常温に戻してから使用する。

・フィトヘマグルチニン-P (PHA-P) ストック液

[5 ml]

Phytohemagglutinin-P	50 mg
----------------------	-------

- 1) 超純水 10 ml で 5 mg/ml に調製後、-20℃で保存する。
- 2) 培養液 1 ml に対し PHA-P stock 10 μl を加えて使用する (最終濃度 50 μg/ml)。

・0.125%トリプシン +0.05% EDTA·2Na

[200 ml]

2.5% Trypsin	10 ml
EDTA·2Na	100 mg
Dulbecco's PBS(-) (Nissui 05913)	1,920 mg
D(+)-Glucose, anhydrous	200 mg
Tris	600 mg
0.5% Phenol Red	160 μl (0.8 mg)

- 1) 250 ml のメスシリンダーに約 100 ml の超純水を入れ、EDTA·2Na (100 mg)、D-PBS (1,920 mg)、Glucose (200 mg)、Tris (600 mg)、および 0.5% Phenol Red (160 μl) を加える。
- 2) 超純水で 190 ml にメスアップし、pH を 7.6 に調製する。
- 3) 最後に、2.5% Trypsin (10 ml) を加え、0.22 μm のフィルターで滅菌し 4℃で保存する。

表 1. 主に用いられる特殊試薬等の例

品名	包装単位	メーカー	コード番号
ペニシリン G カリウム	200,000 Unit × 10 vial,	明治製菓	PGSD
硫酸ストレプトマイシン	10 vial, 1 g (力価)	明治製菓	SSDN
ヒアルロニダーゼ	1 g	Sigma	H3506
ヘキスト 33342	25 mg	Sigma	B2261
トリプシン	100 ml	Gibco	15090
ウシ胎子血清 (FBS)	500 ml	Tissue Culture Biologicals	101
イオノフォア A23187	10 mg	Chalbiochem	100105
サイトカラシン D	5 mg	Sigma	C8273
シクロヘキシミド	1 g	Sigma	C7698
ダルベッコ PBS (-)	100 g	日水製薬	05913
ピルビン酸ナトリウム	5 g	Sigma	P2256
TCM-199	1 l × 10 本	Gibco	31100-035
IVD-101	10 ml × 5 本	機能性ペプチド研究所	IPF9651
HEPES	100 g	Dojindo	346-01373
フェノールレッド	25 g	Nacalai tesque	268-07
乳酸ナトリウム	60% Syrup 100 ml	Sigma	L7900
BSA (培養液用)	5 g	Sigma	A4378
BSA (卵子吸引用)	100 g	Serologicals Proteins Inc.	81-003-3
グルタチオン	1 g	Sigma	G4251
フィトヘマグルチニン -P (PHA-P)	50 mg	Wako	161-15251
オイル (流動パラフィン)	500 ml	Nacalai tesque	26137-85

注) ロットチェックなどの結果により、メーカーなどは適宜変更。

表 2. 胚操作に用いられるガラス管の例

用途	包装単位	メーカー	コード番号
ホールディングピペット	500 本、1 × 90 mm	ナリシゲ	G-1
カッピングニードル	100 本、10 $\mu\ell$	Drummond Microdispenser	3-000-210-G
インジェクションピペット	100 本、10 $\mu\ell$	Drummond Microdispenser	3-000-210-G

表 3. 核移植操作に用いられるディッシュ類の例

種類	包装単位	メーカー	コード番号
4-well	4/Bag, 120/Case	Nunc	176740
35 mm	20/Bag, 500/Case	Becton Dickinson	1008
60 mm	20/Bag, 500/Case	Becton Dickinson	3004
100 mm	10/Bag, 500/Case	栄研化学 (株)	AB2000

(7) 核移植胚の発生能に関するデータ

①レシピエント卵子の由来による影響

1) 保存卵巣に由来する成熟卵子を用いた核移植胚の発生能

牛海綿状脳症(BSE)の発生以降、BSE 検査終了まで卵巣を保存する必要が生じている。本研究では 15℃での卵巣の一日保存がウシ体細胞核移植胚の発生能に及ぼす影響について調べた。

[方法]

食肉処理場で採取した卵巣を 15℃のリン酸緩衝生理食塩水で保存し、保存時間により 2 区に分けた。当日卵巣区は食肉処理場搬出後 2-6 時間、1 日保存区は 26-30 時間目に卵巣から卵子を吸引した。その後、10% FBS を加えた TCM-199 培地を用いて成熟培養を行った。第 1 極体放出卵子を用いて核移植胚作出を行った。

ドナー細胞として血清飢餓培養後の卵丘細胞を用いた。除核卵母細胞と卵丘細胞の融合は 25 V/150 μm 、10 μsec 、1 回の電気刺激で行った。その後、Ca イオノフォア 5 分、サイトカラシン D (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) とシクロヘキシミド (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で 1 時間、シクロヘキシミドのみで 4 時間処理し、IVD-101 培地で 7 日間培養した。得られた胚盤胞 48 個 (当日卵巣区 29 個、一日保存区 19 個) を発情同期化した受胎牛の黄体側子宮角に移植した。

[結果]

成熟培養 24 時間後の成熟率は当日保存区の 79% (266/336) に対して、一日保存区では 67% (229/344) と有意に低い値であった。しかしながら、核移植後の胚盤胞期への発生率および胚移植後の分娩率は両区において違いが認められなかった (表 4)。

以上の結果から、15℃で 26-30 時間保存した卵巣から採取した卵子では、2-6 時間保存した卵巣から採取した卵子に比べ、成熟率は低下するが、成熟卵子を体細胞核移植に用いた場合は同等な体外発生能および受胎能が得られることが明らかになった。

表 4. 卵丘細胞由来核移植胚の発生成績

グループ	卵子数	分割数 (%)	胚盤胞数 (%)	移植頭数	受胎頭数 (%)	分娩頭数 (%)
当日卵巣	229	178 (78)	88 (38)	29	12 (41)	6 (21)
一日保存	194	158 (81)	73 (38)	19	8 (42)	4 (21)

[発表論文等]

Matsukawa *et al.* (2007) Effect of Ovary Storage on Development of Bovine Oocytes after Intracytoplasmic Sperm Injection, Parthenogenetic Activation, or Somatic Cell Nuclear Transfer. *J. Mam. Ova Res.* 24:114-119.

2) 体内成熟卵を用いた核移植胚の発生能

体細胞核の初期化はレシピエント卵子内で起こるため、レシピエント卵子の品質を改善することは核移植胚発生能の向上に繋がると考えられる。胚発生能の向上を目指して核移植のレシピエント卵子として体内成熟卵の使用を検討した。

[方法]

1. 体内成熟卵の採取

黒毛和種雌牛に図 23 に示すプロトコールでホルモン処理を行い、体内成熟卵を経膣採卵により採取した。卵胞刺激ホルモン (FSH) にはアントリン R・10 (共立製薬)、プロスタグランジン (PG) 製剤としてクロプロステノール (エストラメイト, ナガセ医薬品) 0.5 mg、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 製剤として酢酸フェルチレリン (コンセラル、ナガセ医薬品) を 0.1 mg 投与した。

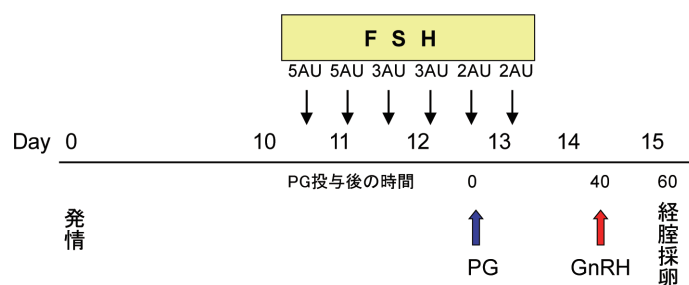


図 23. 対内成熟卵採取プロトコール

2. 核移植胚の作出

ドナー細胞として採取直後の卵丘細胞を用いた。除核卵母細胞と卵丘細胞の融合は 25 V/150 μ m、10 μ sec、1 回の電気刺激で行った。その後、Ca イオノフォア 5 分、サイトカラシン D (2.5 μ g/ml) とシクロヘキシミド (10 μ g/ml) で 1 時間、シクロヘキシミドのみで 4 時間処理し、IVD-101 培地で 7 日間培養した。得られた一部の胚盤胞を発情同期化した受胎牛の黄体側子宮角に移植した。

[結果]

表 5 に示すように上記のホルモン処理により体内成熟卵を経膣採卵により採取できた (図 24)。採取直後の卵丘細胞をドナー細胞とした核移植胚の体外発生率は、レシピエント卵子として体外成熟卵を用いた場合 (23%) に比べ、体内成熟卵を用いることでクローン胚の胚盤胞期への発生率 (46%) は有意に高い値を示した (図 25)。また、胚移植後には体外成熟卵を用いた対照区では 9 頭中 4 頭 (44%) 受胎し、1 頭 (11%) の産子が得られた。一方、体内成熟卵を用いた場合、4 頭中 2 頭 (50%) 受胎し、その後の流産は認められなかった。このことから体内受精卵を用いることで発生率の改善が見込めることが示唆された (表 6)。

以上の結果から体内成熟卵と同等の発生能が得られるように、現在の体外成熟培養法の更なる改良が必要であると考えられる。

表 5. 体内成熟卵の回収成績

供試頭数	吸引卵胞数	回収卵数 (%)	成熟卵数* (%) **
4	79	49 (62)	29 (59)

* 第一極体を有する卵子を成熟卵と見なした。

** 回収卵に対する割合

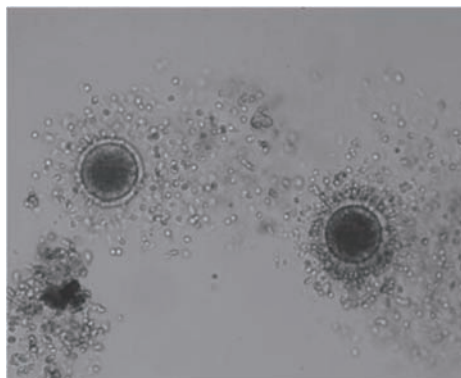


図 24. 経膈採卵により採取された体内成熟卵

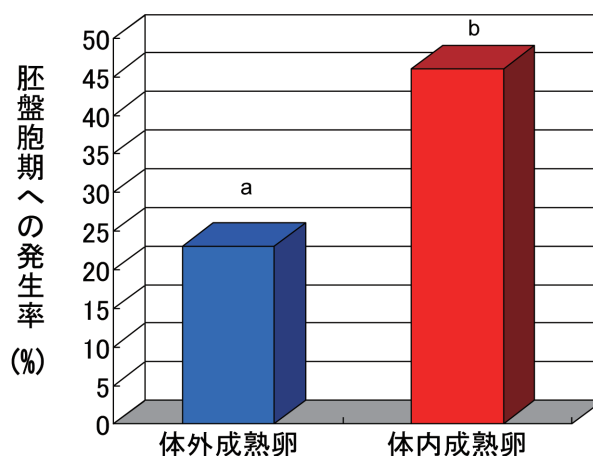


図 25. 核移植胚の胚盤胞期への発生率

表 6. 体外成熟卵および体内成熟卵を用いた核移植胚の移植成績

レシピエント 卵子	移植 頭数	受胎頭数 (%)				分娩頭数 (%)
		D35	D60	D90	D150	
体外成熟卵	9	4 (44)	3 (33)	2 (22)	1 (11)	1 (11)
体内成熟卵	4	2 (50)	2 (50)	2 (50)	2 (50)	2 (50)

[発表論文等]

Akagi *et al.* (2008) Bovine nuclear transfer using fresh cumulus cell nuclei and *in vivo*- or *in vitro*-matured cytoplasts. Cloning Stem Cells10:173-180.

体内成熟卵の利用による核移植胚の体外発生率の向上 平成 17 年度畜産草地研究成果情報.

<http://nilgs.naro.affrc.go.jp/SEIKA/2005/nilgs/ch05039.html>

②ドナー細胞の体外培養による影響

ウシ体細胞核移植のドナーとして主に培養細胞が用いられているが、ドナー細胞の体外培養の影響については調べられていない。4種類の異なる培養条件の卵丘細胞（採取直後、成熟培養後、血清添加培養および血清飢餓培養）をドナーとして核移植後の発生能に及ぼす影響を検討した。

[方法]

ドナー細胞として採取直後の卵丘細胞（A区）、成熟培養（TCM199+10% FBS、20時間）後に卵丘細胞卵子複合体から分離した卵丘細胞（B区）、継代培養後3日目（培地：DMEM+10% FBS）の増殖期にある卵丘細胞（C区）、その後5日間血清飢餓培地（DMEM+0.5% FBS）で培養した卵丘細胞（D区）を使用し、核移植胚を作出した。

[結果]

卵丘細胞の細胞周期を分析した結果、採取直後（A区）および成熟培養後（B区）の細胞のG0/G1期の割合は89.7%（A区）、89.5%（B区）であった（表7）。血清濃度10%で培養した細胞ではG0/G1期の細胞の割合は76.0%（C区）であったが、血清飢餓培養を行うことでG0/G1期の細胞の割合が90.6%（D区）に増加した。

除核卵子との融合率はC、D区の培養細胞に比べて、A区やB区では有意に低かった（表8）。また、C区およびD区の胚盤胞への発生率（45%、46%）は、A区（18%）およびB区（32%）より有意に高い値であった。作出された胚盤胞を受胎牛に移植したところ、受胎牛24頭中9頭の妊娠（核移植後30日）が確認された（表9）。その後の妊娠経過を観察した結果、妊娠90日までに3頭、185日目に1頭が流産したが、全ての区から計5頭のクローン牛の作出に成功した（表9、図26）。

次に、体外培養の影響を受けない採取直後の卵丘細胞を用いたクローン胚について21頭の受胎牛に胚移植を行った。その結果、35日（核移植後）で10頭（48%）の受胎が確認された。しかし、その後6頭が流産し、4頭が分娩したものの、全て死産であった。このことから、体外培養の影響を受けない採取直後の細胞を用いた場合でも培養細胞を用いた場合の報告と同様に胚移植後に高頻度で流死産が発生することから、流死産の原因はドナーの体外培養に起因しているのではないことが示唆された。

表7. ドナー細胞における細胞周期のG0/G1期、S期およびG2/M期の割合

試験区	%、G0/G1期	%、S期	%、G2/M期
A（採取直後）	89.7 ± 0.4 ^a	7.5 ± 0.5 ^a	2.9 ± 0.2 ^a
B（成熟培養後）	89.5 ± 1.1 ^a	5.5 ± 1.1 ^{ac}	5.0 ± 0.7 ^b
C（血清添加培養）	76.0 ± 1.8 ^b	16.0 ± 1.8 ^b	8.0 ± 0.6 ^c
D（血清飢餓培養）	90.6 ± 0.6 ^a	3.8 ± 0.6 ^c	5.6 ± 0.7 ^b

^{a,b,c} 異符号間に有意な差があり（ $P < 0.05$ ）

表 8. 様々な培養条件の卵丘細胞を用いた核移植胚の体外発生能

試験区	卵子数	融合数 (%)	分割数 (%)	胚盤胞数 (%)
A (採取直後)	411	252(61) ^a	170(68) ^a	44(18) ^a
B (成熟培養後)	483	345(71) ^b	262(76) ^b	110(32) ^b
C (血清添加培養)	500	415(83) ^c	337(81) ^b	188(45) ^c
D (血清飢餓培養)	420	347(83) ^c	276(80) ^b	161(46) ^c

^{a,b,c} 異符号間に有意な差があり (P<0.05)

表 9. 様々な培養条件の卵丘細胞を用いた核移植胚の移植後の受胎能

試験区	移植胚数	受胎頭数 (%)			産子数 (%)
		Day 30	Day 60	Day 90	
A (採取直後)	2	2 (100)	1 (50)	1 (50)	1 (50)
B (成熟培養後)	6	1 (17)	1 (17)	1 (17)	1 (17)
C (血清添加培養)	7	2 (29)	2 (29)	2 (29)	2 (29)
D (血清飢餓培養)	9	4 (44)	3 (33)	2 (22)	1 (11)

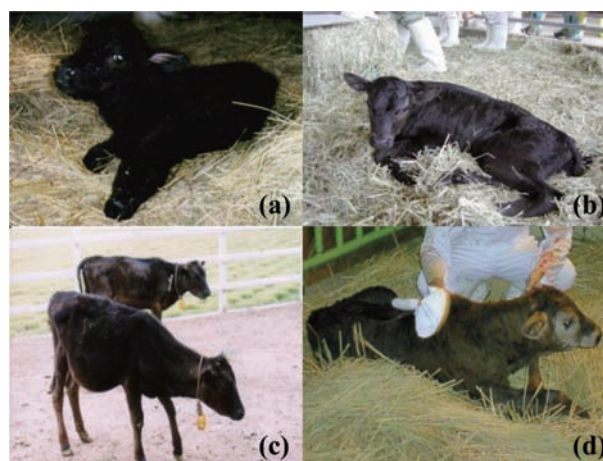


図 26. 成牛卵丘細胞由来体細胞核移植産子

ドナーとして (a) 採取直後、(b) 成熟培養後、(c) 血清添加培養あるいは (d) 血清飢餓培養後の細胞を用いた。

[発表論文等]

Akagi *et al.* (2003) *In vitro* and *in vivo* developmental potential of nuclear transfer embryos using bovine cumulus cells prepared in four different conditions. *Cloning Stem Cells* 5:101-108.

Akagi *et al.* (2008) Bovine nuclear transfer using fresh cumulus cell nuclei and *in vivo*- or *in vitro*-matured cytoplasts. *Cloning Stem Cells* 10:173-180.

③様々な細胞融合と活性化のタイミングにより作出された核移植胚の発生能

核移植胚の作出のためにはあらかじめ核を除いておいた卵子とドナー細胞との融合および卵子の発生の開始のために人為的な活性化刺激が必要不可欠な過程となっている。ウシ体細胞核移植胚の作出技術の効率化を図るために、本研究では核移植胚の作出に効果的な細胞融合と化学的活性化処理のタイミングを検討した。

[方法]

ドナー細胞と除核未受精卵子との融合は Zimmerman mammalian cell fusion medium 中で 25 V/150 μ m、10 μ sec の 1 回の直流パルスで行った。化学的活性化処理は 10 μ M カルシウムイオノフォアで 5 分間、10 μ g/ml シクロヘキシミド + 2.5 μ g/ml サイトカラシン D で 1 時間、その後 10 μ g/ml シクロヘキシミドで 4 時間、培養した。細胞融合と活性化は図 27 に示した 7 種類のタイミングで行い、核移植胚を作出した。

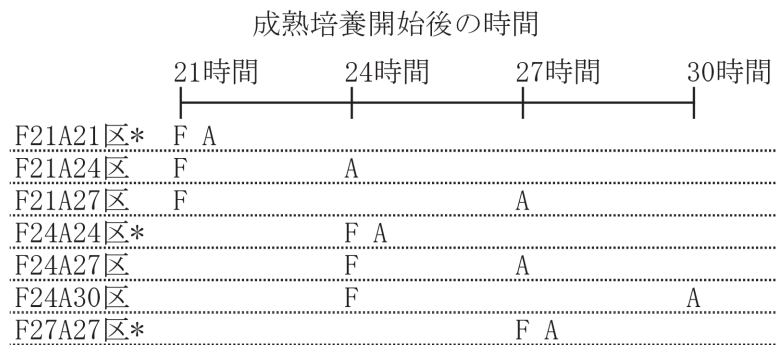


図 27. 細胞融合 (F) と科学的活性化処理 (A) の時間

* 融合直後に活性化

[結果]

血清飢餓培養後のウシ線維芽細胞と除核成熟卵子との融合率は、成熟時間 21 時間目は 78.9% (310/392)、24 時間目は 72.1% (377/523) および 27 時間目は 76.6% (121/158) であり、成熟培養開始からの時間の違いによる有意な差は認められなかった。

様々な細胞融合と化学的活性化のタイミングで作出された核移植胚の体外発生能を表 10 に示した。細胞融合直後に活性化を行った 3 区 (F21A21 区、F24A24 区および F27A27 区) の中で F21A21 区は有意に低い分割率 (67.4%) を示したものの、胚盤胞発生率は 3 区間で有意な差は認められなかった (F21A21 区: 28.1%、F24A24 区: 39.3% および F27A27 区: 40.5%)。細胞融合後 3 時間目に活性化処理を行った F21A24 区と F24A27 区は、63.2% と 47.0% と高率に胚盤胞まで発生した (図 28)。特に F21A24 区は他の区と比べて有意に高い発生率であった。細胞融合後 6 時間目に活性化処理を行った F21A27 区と F24A30 区では、低い胚盤胞発生率が認められた (F21A27 区: 3.2%、F24A30 区: 14%)。

血清飢餓培養後のウシ卵丘細胞を用いて F21A24 区と F24A24 区において作出された胚盤胞期胚を受胎牛に移植したところ、受胎率、分娩率およびクローン産子の出生後 60 日後の生存率は両区で有意な違いは認められなかった (表 11)。

以上の結果からウシ体細胞核移植において、細胞融合を成熟培養 21 時間後、化学的活性化処理をその 3 時間後に行うと受胎能を損なうことのない胚盤胞期胚へ効率的に発生することが示唆された。

表 10. 様々な細胞融合と化学的活性化のタイミングで作出された核移植胚の体外発生能

試験区	成熟培養開始からの時間		卵子数	分割数 (%)	胚盤胞数 (%)
	融合	活性化			
F21A21	21	21	89	60 (67.4) ^{ab}	25 (28.1) ^a
F21A24	21	24	125	97 (77.6) ^{bc}	79 (63.2) ^b
F21A27	21	27	96	52 (54.2) ^a	3 (3.2) ^d
F24A24	24	24	150	123 (82.0) ^c	59 (39.3) ^{ac}
F24A27	24	27	134	122 (91.0) ^d	63 (47.0) ^c
F24A30	24	30	93	63 (68.4) ^{ab}	13 (14.0) ^e
F27A27	27	27	121	99 (81.8) ^c	49 (40.5) ^{ac}

^{a,b,c,d} 異符号間に有意な差あり ($P < 0.05$)

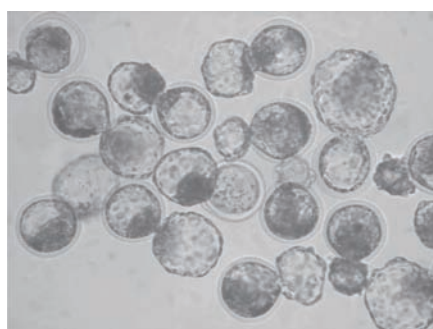


図 28. 成熟培養 21 時間、その 3 時間後に化学的活性化処理を行って作出された核移植胚(核移植後 7 日目)

表 11. 細胞融合のタイミングが卵丘細胞核移植胚の発生能に及ぼす影響

試験区	卵子数	胚盤胞数 (%)	移植数	受胎数 (%)		産子数	生後 60 日の生存数 (%)
				D35	分娩		
F21A24	147	67 (45.6) ^a	13	11 (84.6)	8 (61.5)	9*	3* (33)
F24A24	82	19 (23.2) ^b	7	5 (71.4)	4 (57.1)	4	1 (25)

* 1 胚移植による双子を 1 組含む, ^{a,b} 異符号間に有意差あり ($P < 0.01$)

[発表論文等]

Akagi *et al.* (2003) Developmental potential of bovine nuclear transfer embryos and postnatal survival rate of cloned calves produced by two different timings of fusion and activation. *Mol. Reprod. Dev.* 66: 264-272.

ウシ核移植において高い体外発生率が得られる細胞融合と活性化の時間 平成 14 年度畜産草地研究成果情報. <http://nilgs.naro.affrc.go.jp/SEIKA/02/ch043.html>

④集合核移植胚の発生能

ウシ核移植胚では、生体由来胚や体外受精胚と比べて、胚盤胞期の細胞数が少なく、受胎能を損なう要因の1つとして考えられる。そこで、胚移植時の細胞数を増加させるために、同じドナー核に由来する複数個の初期胚による集合処理を検討した。

[方法]

核移植後2日目の8細胞期胚あるいは4日目の16-32細胞期胚に胚の透明帯を0.5%アクチナーゼ処理により除去した。集合用培養液に50 µg/ml FITC-ヘマグルチニン-Pを含むTCM-199を用いて、針で作製した培養皿の窪みの中に透明帯を除去した核移植胚を2個(2NT集合胚)あるいは3個(3NT集合胚)を導入し接着させた(図29)。約20分後にIVD-101に移し、培養皿の窪みの中で培養した(図30)。

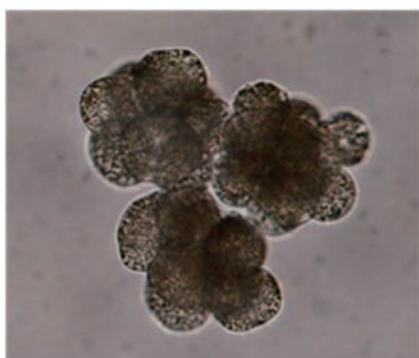


図 29. 3個の8細胞期核移植胚による集合胚

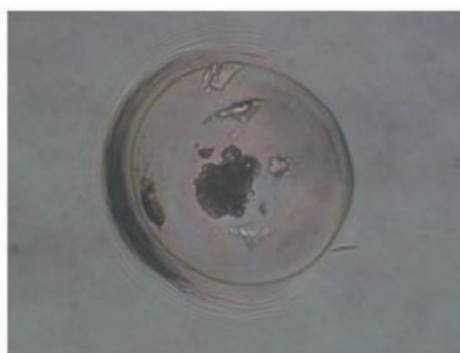


図 30. 集合処理3日後の集合胚

[結果]

ドナー細胞としてウシ卵丘細胞を用いて発生率を比較したところ、通常の核移植胚では2日目の8細胞期胚と4日目の16-32細胞期胚からの胚盤胞への発生率が56%と69%だったが、3個の核移植胚による集合胚では全て(100%)が胚盤胞(図31)まで発生し、通常の核移植胚と比べて有意に細胞数が増加した(図32)。また、総細胞数に対する内部細胞塊(将来胎子になる部位)の割合が多くなる傾向も認められた。

次にドナーとしてウシ線維芽細胞を用いて作出した核移植胚および集合胚を受胎牛に移植したところ、妊娠前期の受胎率は通常の核移植胚に比べて高い傾向が認められた。その後、集合胚においても通常の核移植胚と同様な流死産が認められたが、クローン牛の生産が可能であった(表12, 図33)。

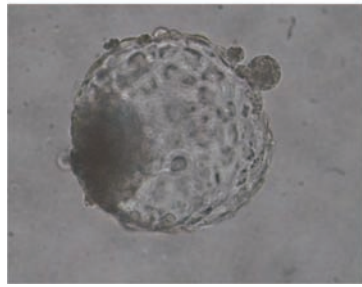


図 31. 胚盤胞期の集合核移植胚



図 32. 集合胚から作出されたクローン牛

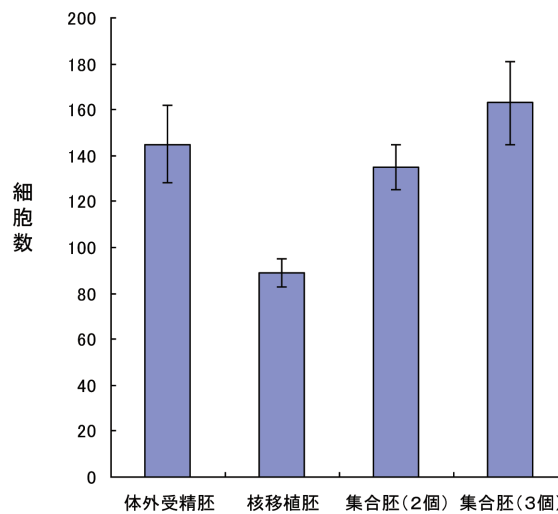


図 33. 体外受精胚、核移植胚および集合胚（核移植後 4 日目に集合処理）の胚盤胞期の総細胞数

表 12. 核移植後 2 日目に集合した核移植胚の発生能

グループ*	8 細胞 胚数	集合 胚数	胚盤胞 (%)	移植 頭数	受胎頭数 (%)		産子数
					D35	D90	
対照 (透明帯あり)	61	-	34(56)	10	3(38)	0(0)	0(0)
集合胚	60	20	19(95)	5	4(80)	1(20)	1(20)

* 対照：1 個の核移植胚、集合胚：3 個の核移植胚による集合胚

[発表論文等]

Akagi *et al.* (2005) *In vitro* development of aggregated nuclear transferred embryos derived from bovine cumulus cells. *Reprod. Fertil. Dev.* 17: 162 (The 31th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society).

Yamaguchi *et al.* (2007) Cloned calf production by aggregation of somatic cell nuclear-transferred embryos. *Reprod. Ferti. Dev.* 19: 166 (The 33th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society).

⑤ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤処理

マウス核移植において、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDACi) であるトリコスタチン A (TSA) で胚を処理することにより発生率が向上することが報告されている。ウシにおいて TSA 処理が核移植胚の体外発生能に及ぼす影響について検討した。

[方法]

核移植後に Ca イオノフォアで卵子活性化処理開始後、活性化培地および発生培地に TSA を添加し、胚盤胞期胚への発生率、細胞数を調べた。

[結果]

成牛雄皮膚由来線維芽細胞を用いた核移植胚において TSA の添加濃度 (0, 0.5, 5, 50, 500, 5000 nM) および添加時間 (0, 5, 10, 20, 40 h) を検討したところ、5 nM の濃度の 20 時間の処理で無処理に比べて有意に胚盤胞形成率が向上した。

次に成牛雌皮膚由来線維芽細胞 (A)、胎子雌胚由来線維芽細胞 (B) と成牛雄皮膚由来線維芽細胞 (C) を用いて核移植胚について 5 nM TSA で 20 時間処理したところ、図 34 に示すようにドナー細胞 B、C を用いた核移植胚の胚盤胞への発生率は、TSA 処理により有意に増加したが、ドナー細胞 A については有意な増加は認められなかった。また、TSA 処理は核移植胚の胚盤胞期の総細胞数には影響を及ぼさなかった (図 35)。

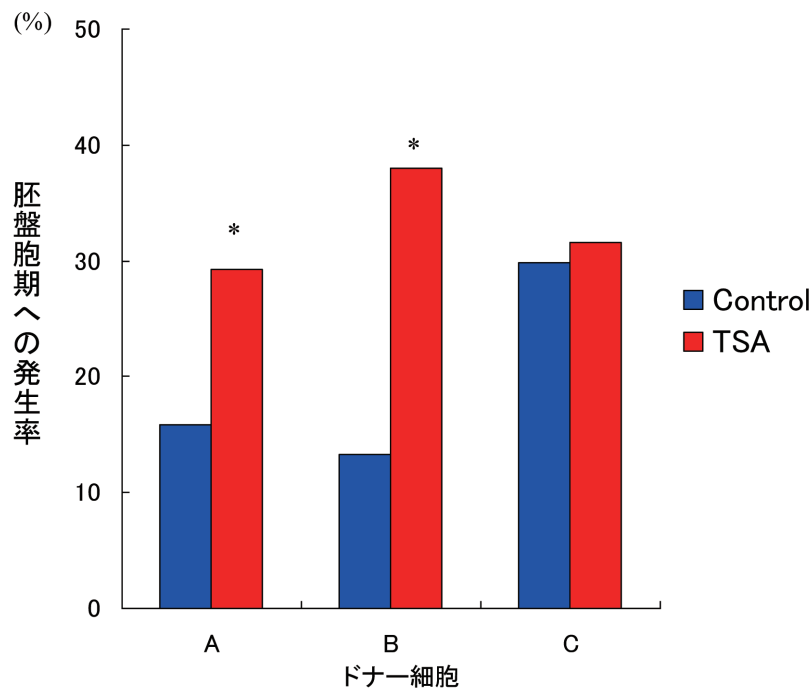


図 34. 体細胞核移植胚の胚盤胞発生能に及ぼす Trichostatin A の効果

ドナー細胞は、成牛雄皮膚 (A)、胎子雌胚 (B)、成牛雌皮膚 (C) 由来線維芽細胞
*それぞれのドナー細胞において対照区と比べて有意差あり (P<0.05)

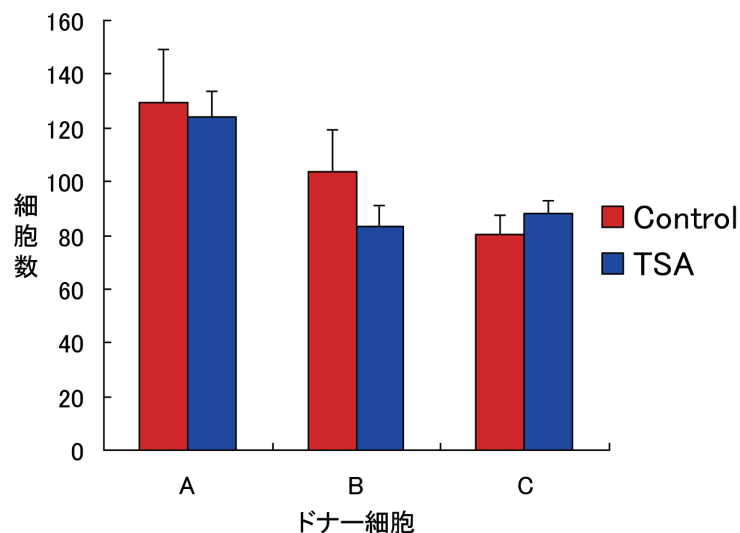


図 35. 体細胞核移植胚の胚盤胞発生能に及ぼす Trichostatin A の効果
ドナー細胞は、成牛雄皮膚 (A), 胎子雌肺 (B), 成牛雌皮膚 (C) 由来線維芽細胞

また、ドナー細胞 A について別の HDACi であるスクリプタイド処理を行ったところ、5 nM と 500 nM の 20 時間の処理で胚盤胞形成率の向上が認められている。以上のことから HDACi 処理の効果はドナー細胞によって異なることが示唆され、それぞれのドナーについて最適な処理条件を決定することが必要である。

[発表論文等]

Akagi *et al.* (2011) Treatment with a histone deacetylase inhibitor after nuclear transfer improves the preimplantation development of cloned bovine embryos. *J. Reprod. Dev.* in press.

Trichostatin A の培地添加によるウシ体細胞クローン胚の体外発生能の改善 平成 19 年度畜産草地研究成果情報 . <http://nilgs.naro.affrc.go.jp/SEIKA/2007/nilgs/ch07029.html>

【1. 核移植胚の作出方法】

執筆者：赤木悟史（畜産草地研究所）、高橋清也（農林水産技術会議事務局）、長谷川清寿（島根県畜産技術センター）、松川和嗣（高知大学農学部）、水谷英二（畜産草地研究所）

2. 胚の品質評価法

(1) 胚盤胞の二重染色法

と場由来卵子や生体内卵子吸引法によって得られた卵子を用いて生産される体外受精胚の研究では、胚の培養液や温度、気相といった培養条件による胚の品質変化を評価することを目的とした物が多い。その評価は、肉眼的所見に加えて胚盤胞発生率によるものが一般的である。

しかしながら、胚盤胞発生率や肉眼的所見が胚の品質を反映しているかという問題も依然生じている。外見上は拡張胚盤胞に達しており、肉眼的所見も良い胚であっても、胚盤胞構成細胞数を測定すると、少ないことも時に観察される。さらに胚盤胞は将来胚になる部分である内部細胞塊 (Inner Cell Mass; ICM) および胎盤になる栄養外胚葉 (Trophectoderm; TE) より構成されているが、それぞれの細胞数構成比は胚によって異なる場合も多い。正常な着床、受胎が実現するためには、TE/ICM 比ならびに ICM、TE を併せた総細胞数が重要であると考えられている。体内受精胚における TE/ICM 比は牛 7 日目拡張胚盤胞では約 3 前後、総細胞数は報告により差はあるものの 120 前後とされているが [Van Soom, A. *et al.* (1997), Koo, D.B. *et al.* (2002)], 核移植胚や体外培養胚では細胞数や TE/ICM 比が大きくなることも多く、これに近い TE/ICM 比及び細胞数であれば体外受精胚においても質的に体内受精胚に近いと判定しうる根拠となっている (図 36)。

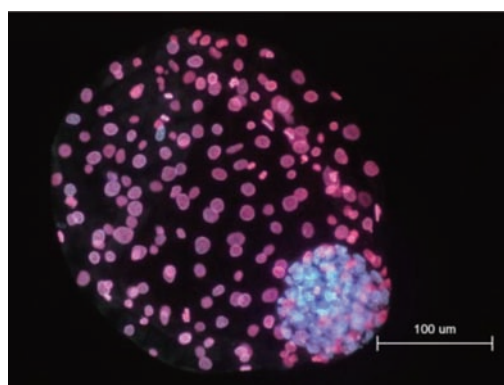


図 36. ウシ胚盤胞の二重染色画像

①染色手順

1) Solution I, II を 4well ディッシュに 300 μ l ずつ分注する。

Solution I : Propidium Iodide (PI) 添加 Triton X-100 溶液

Solution II : Hoechst33342 溶液

2) 胚盤胞は透明帯が付いたまま 30 ~ 60 秒間、solution I にて染色する。(この時、透明帯内の細胞が少し縮むのが染色終了の目安)

3) すぐに胚盤胞を solution II に移し、遮光して 4 $^{\circ}$ C に 2 ~ 3 時間保存し、固定と染色を行う。(この際、solution II が蒸発しないようパラフィルム等でディッシュを密封しておく)。

注) : 時間の都合により、ステップ 2 の染色時間を overnight ~ 3 日まで延長しても染色

結果には大きく影響しない。

4) 染色後、胚盤胞をグリセリンで一度洗浄し、グリセリンとともにスライドガラスへ載せ、空気が入らないように注意してカバーガラスで封入する。なお、グリセリンは蒸発しにくいためにプレパラート作成後、4℃にて保存しても1ヶ月ほどはグリセリンが蒸発することはないので、別の日に作製した二重染色標本をまとめて観察することも可能。

注1) グリセリンは粘度が高いため、操作しにくい場合、事前に37℃で粘度を下げしておく。特に、気温が低下する冬場には粘度がさらに高くなるので注意が必要。扱う際のピペットの口径は大きめに作っておくと操作がしやすい。

染色画像取得時にバックグラウンドが高くなる場合は、グリセリンの洗浄時間を長くする。

注2) 4) の押しつぶしが不十分だと核が重なり合って細胞の観察が上手くいかないため、核が重ならないように十分に押しつぶす。

5) 蛍光顕微鏡にて鏡検。(UV フィルターのみで染め分けた画像を観察可能。)

ICM を青、TE をピンクに染め分けた画像が得られる。画像を顕微鏡付属のカメラで撮影。それぞれの細胞数(核数)をカウントする。

②二重染色操作時の注意点

本染色法は、補体を用いずに比較的簡単な手順で胚の二重染色画像を得られる手法としての有効性は高い。しかしながら、この本染色法にも欠点がある。胚の品質が悪い場合に、おそらく膜の状態も良くないことが原因と考えられるが、Triton X-100 処理で過剰にPIが内部にまで入り込んでしまう場合など、品質や反応温度などの物理的要因に染色効率が左右されてしまうことがあるという点である(図37)。明視野所見で明らかにICMが存在しているにもかかわらず、染色で失敗をしてしまい、すべての細胞がピンク色に染まる場合や、逆にすべて青く染まってしまう場合もある。その場合、PI添加Triton X-100処理の時間を若干短めにするなど、胚の状況、温度等の作業環境にあった条件設定ができれば、その後の結果がばらつくことは少なく、安定的な結果を得ることが可能である。

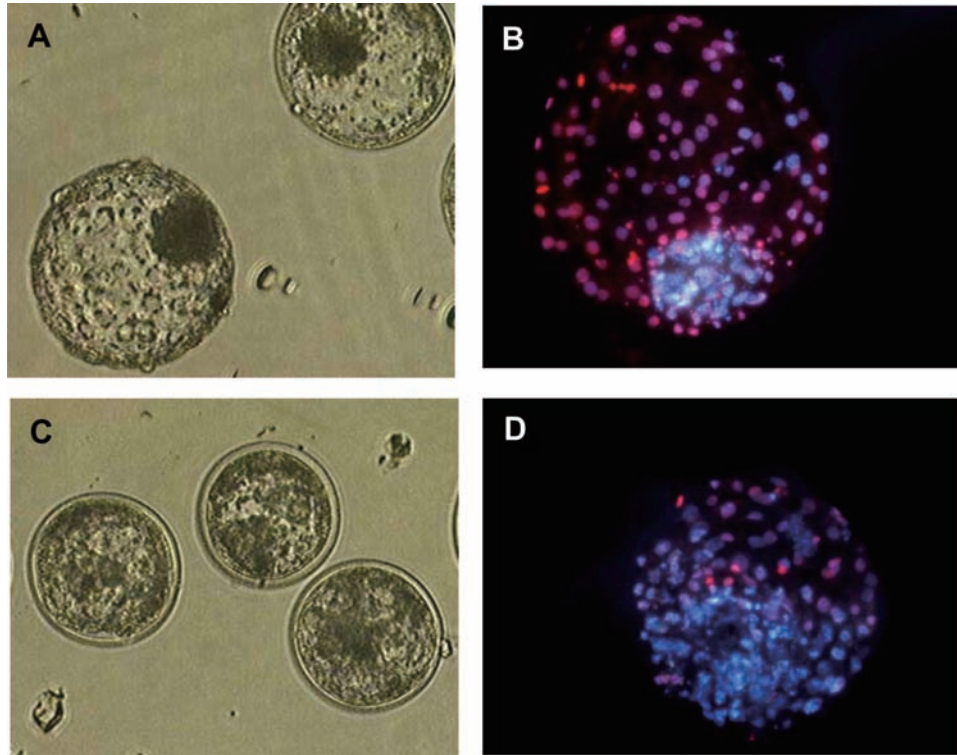


図 37. 胚の品質と二重染色画像

(A) A ランク胚明視野画像。(B) A ランク胚二重染色画像。
 (C) 低ランク胚明視野画像。(D) 低ランク胚二重染色画像。

③準備

1) 必要な機器

蛍光顕微鏡

UV 照射が可能なタイプ。CCD カメラ、フィルムカメラが接続可能なもの。画像をモニターに接続できれば、モニター画像からのデジタルカメラでの撮影も可。

2) 必要な試薬

Propidium Iodide (PI)、bis-benzimide (Hoechst33342; ヘキスト)、Triton X-100、グリセリン、PBS

3) 使用する器具

Nunc 4well ディッシュ、マウスピペット、スライドガラス、カバーガラス、蛍光顕微鏡

4) 試薬の調製

Solution I : 0.2% (v/v) Triton X-100 in PBS に 0.1 mg/ml 濃度で PI を希釈する。

Solution II : 100% EtOH に 25 µg/ml の濃度で Hoechst33342 を希釈する。

④免疫学的二重染色法の解説

1) 原理

胚盤胞細胞数の計測に一般的に用いられている方法は、蛍光色素を用いた核染色法である。蛍光色素を使った染色法は一般的な染色法よりも核の識別が容易である。蛍光色素で染色してしまった胚を移植に用いることはできないが、体外培養法の検討を行う上では非常に有用である。これまでも、Hoechst33342で染色する方法、また固定した後にDAPIで染色する方法が行われている。しかしながら、一色による染色ではICMとTE細胞の見分けがつかず、総細胞数は把握できてもTE、ICMそれぞれの構成比を得ることは不可能であった。そこで、ICMとTEをそれぞれ異なった色で染め分けるDifferential Staining（二重染色法）が用いられるようになった。

蛍光二重染色法として報告されていたのは、補体を用いた免疫学的な手法による染色法である [Papaioannou, V.E., Ebert, K.M. (1988), Iwasaki, S. *et al.* (1990), Stojkovic, M. *et al.* (1998)]。この染色法は、死細胞や細胞膜に障害を受けた細胞核のみに染まる Propidium Iodide (PI) と生細胞、死細胞どちらの核も染まる bis-benzimide (Hoechst33342; ヘキスト) を併用して染色する方法である (図 38 (A))。

しかしながら、この手法は染色の前に透明帯を除去する必要があるため、染色課程で胚盤胞の形が保持されず細胞が剥がれる可能性があり操作に注意が必要であること、抗体処理、染色処理併せて1時間以上の時間がかかること、染色試薬以外にも抗血清や補体などの試薬が必要となるなど、簡便とはいえない。また、この染色法では抗体の性質などにより染色性が大きく変化し、安定した染色結果を得ることが難しい欠点があり、この方法が発表されて以降も単色による核染色によって胚盤胞の細胞数を評価する方法も依然として行われていた。

2) 界面活性剤の利用による二重染色法

そこで、de la Fuente (1997) らによって化学的手法による胚盤胞染色法が紹介された。この方法は、TE細胞のカルシウムイオノフォア結合特性に依存したPIの選択的な取り込みを促進する方法である。この方法をさらに簡便化し、2001年に報告されたのがThouasらによる新たな胚盤胞の二重染色法である (図 38 (B))。この方法は、蛍光試薬及び観察方法は免疫学的染色法と共通であるが、補体反応によってTE細胞膜を部分破壊する代わりに界面活性剤を用いることで、補体反応よりも信頼性が高く簡便であり、画期的な方法であるとして、現在多くの研究者によって多種の胚の二重染色法として活用されている [Thouas, G.E. (2001)]。

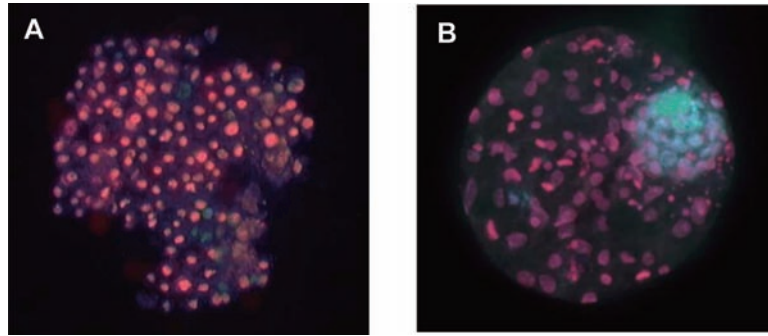


図 38. 免疫学的および化学的染色法による胚盤胞画像
 (A) 免疫学的染色法 (B) 化学的染色法による胚盤胞画像

引用文献

- de la Fuente, R., King, W.A. (1997) Use of chemically defined system for the direct comparison of inner cell mass and trophectoderm distribution in murine, porcine and bovine embryos. *Zygote* 5: 309-320.
- Koo, D.B., Kang, Y.K., Choi, Y.H., Park, J S Kim, H.N., Oh, K.B., Son, D.S., Park, H., Lee, K.K., Han, Y M (2002) Aberrant allocation of inner cell mass and trophectoderm cells in bovine nuclear transfer blastocysts. *Biol. Reprod.* 67: 487-492.
- Papaioannou, V.E., Ebert, K.M. (1988) The preimplantation pig embryo: cell number and allocation to trophectoderm and inner cell mass of the blastocyst in vivo and in vitro. *Development* 102:793-803.
- Iwasaki, S., Yoshida, N., Ushijima, H., Watanabe, S., Nakahara, T. (1990) Morphology and 32 proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized in vitro and in vivo. *J. Reprod. Fert.* 90: 279-284.
- Stojkovic, M., Buttner, M., Zakhartchenko, V., Brem, G., Wolf, E. (1998) A reliable procedure for differential staining of in vitro produced bovine blastocysts: comparison of tissue culture medium 199 and Menezes's B2 medium. *Anim. Reprod. Sci.* 50: 1-9.
- Thouas, G.E., Korfiatis, N.A., French, A.J., Jones, G.M., Trounson, A.O. (2001) Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. *Reprod BioMed Online Paper* 3: 25-29.
- Van Soom, A., Boerjan, M.L., Bols, P.E.J., Vanroose, G. Lein, A., Coryn, M., de Kruif, A. (1997) Timing of compaction and inner cell allocation in bovine embryos produced in vivo after superovulation. *Biol. Reprod.* 57: 1041-1049.

【2. (1) 胚盤胞の二重染色法】

執筆者：高橋昌志、阪谷美樹（九州沖縄農業研究センター）

(2) 体細胞クローン胚における DNA メチル化の検出法

近年、体細胞クローン研究において、分化した体細胞をドナーとすることで、通常受精を経た初期胚に見られるようなゲノムの初期化が十分に起こらないために、正常な遺伝子調節が成されていないことがその原因の一つとしてとらえられている。この不全現象を「後性的遺伝子修飾機構:エピジェネティクス」の観点から DNA の修飾・発現機構不全を解明、評価、および制御することで、より受精胚に近い発生・分化条件を整える研究が期待される。

そのため、胚のゲノムメチル化状態を簡易・迅速かつ精度の高い手法によって解析、評価することで、クローン胚の作出条件、培養条件を整えることや移植時の胚の品質評価が可能である。

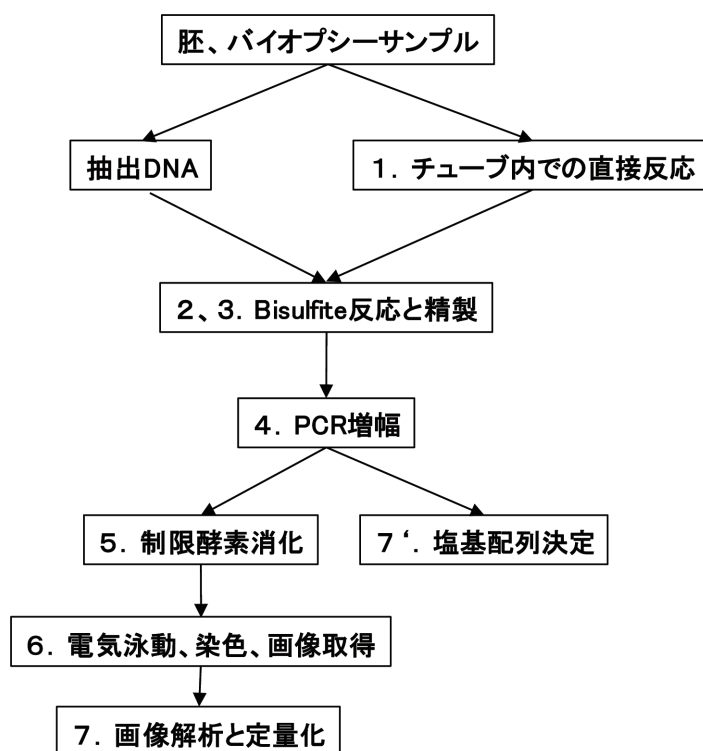


図 39. 実験の流れ

①実験の手順

Satellite I 配列を増幅するプライマーを使って、AciI 酵素消化で解析する場合 EZ DNA Methylation-Direct™ Kit を使った場合の例

1) 細胞のプロテイナーースK消化

0.2 ml PCR 反応チューブに以下の試薬調製を行う。

10 μ l	溶解バッファー
~ 9 μ l	サンプル浮遊液
1 μ l	プロテイナーースK
x μ l	ミリQ水
<hr/>	
20 μ l	合計量

- ・ PCR 装置にチューブをセットし、50℃ - 20 分反応。終了後、4℃ 保存。

2) Bisulfite 反応

- ・ ステップ 1 で準備したサンプル入り PCR チューブキット付属の CT 変換反応液を 130 μl 添加 (サンプル液が 20 μl に満たない場合、ミリ Q 水を追加)。
- ・ PCR 装置に反応チューブをセットし、
 - a) 98℃ - 8 分
 - b) 64℃ - 3.5 時間
 - c) 4℃ - 20 時間まで保持可能

3) 変換 DNA の精製と溶出

- ・ 付属のスピンカラムを使い、プロトコールに従って吸着、洗浄、溶出を行う。
反応サンプルは - 20℃ 以下で 3 ヶ月程度保存可。

4) PCR 増幅 (Satellite I 領域を増幅)

- ・ 変換 DNA サンプルを Taq ポリメラーゼを使って増幅 (プロメガ社製 GoTaq を使った場合)。

0.2 ml PCR 反応チューブに以下の試薬調製を行う。

10 μl	2x 酵素 Mix
~ 8 μl	サンプル DNA 液
1 μl	10 pmol センスプライマー (AATACCTCTAATTTCAAACCT)
	[Kang, Y.K.et al. (2001)]
1 μl	10 pmol アンチセンスプライマー (TTTGTGAATGTAGTTAATA)
	[Kang, Y.K.et al. (2001)]
x μl	ミリ Q 水
<hr/>	
20 μl	合計量

- ・ PCR 装置に反応チューブをセットし、

95℃ - 3 分	} 35 - 40 サイクル
95℃ - 30 秒	
46℃ - 30 秒 ^{注1)}	
72℃ - 30 秒	
22℃ - 5 分	
4℃	

注 1) 別の目的領域を増幅する場合、プライマーの T_m 値に合わせてアニーリング温度を調整。

注 2) 別の目的領域が単一遺伝子の場合、二段階 (Nested) PCR による再増幅が必要になることがある。

5) メチル化感受性制限酵素消化

PCR 増幅産物をメチル化感受性制限酵素によって消化し、ターゲット領域のメチル化状態を定量解析する（ここでは、Aci I を用いた消化反応についての例を記載する）。

・0.2 ml PCR 反応チューブに以下の試薬調製を行う。

8.5 μ l	PCR サンプル
1.0 μ l	10 x バッファー*
0.5 μ l	制限酵素 (Aci I)
<hr/>	
20 μ l	合計量

PCR 装置にセットし、37°C—30 分、反応終了後は 4°C で保持。

* PCR 反応液を多めに使う場合、バッファーは添加しなくても可、PCR 反応液が少ない場合、PCR 反応液とミリ Q 水で 8.5 μ l に調製して 10X バッファーを 1 μ l 添加する。

6) 電気泳動、染色、画像取得

電気泳動による分離、染色には一般的な DNA の電気泳動と同じようにアガロースゲルかポリアクリルアミドゲルを使う方法がある。分離能と染色後の精度の高い定量性を考えるとポリアクリルアミドゲルを使うのが望ましい。

6-1) 泳動装置のマニュアルに従って 10% 程度のポリアクリルアミドゲルを作成。（サララップで包み、4°C で乾燥させずに保存することで 1 週間程度は使用できる。）

6-2) サンプルを各レーンにアプライし、定電圧（電流：使用泳動装置のマニュアルに従う）で泳動。未消化サンプルもコントロールとして同時に流しても良い。

6-3) 泳動終了後、DNA 染色試薬*でゲルを 30 – 60 分染色（アガロースゲルの場合、ゲル作製時に DNA 染色試薬を添加しても可）

*エチジウムブロマイド、サイバーグリーン等の試薬があるが、変異性があるので手袋をして扱う。最近は無毒性の（少ない）染色試薬も入手可能。廃液、廃ゲルは廃棄規定に従って処理。

6-4) 染色後のゲルをトランスイルミネーターで照射、染色イメージの記録。

CCD カメラ付き画像解析装置、熱転写プリンタ、あるいはポラロイドカメラで撮影。

7) 画像解析と定量化

7-1) CCD カメラ取得画像はそのまま、ポラロイド、熱転写プリントは、スキャナー等でイメージ画像を取得。

PCR によって、satellite I 領域は 210bp のバンドとして検出される (図 40、赤矢印)。Aci I 制限酵素配列の認識によって 35, 86, 90bp の消化断片が現れる (図 40、'+' レーン: 黄色矢印、35 bp は検出限界以下なので省略)。

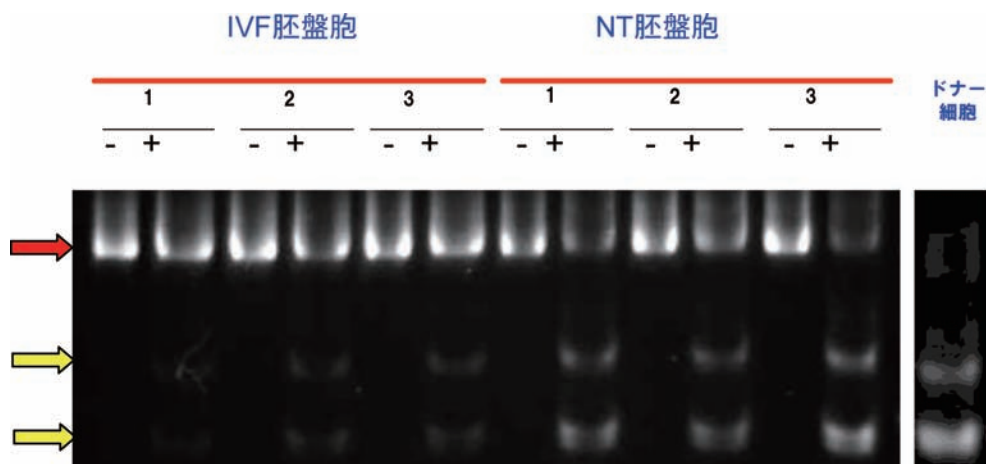


図 40. COBRA 法による体外受精、クローン胚およびドナー細胞の Satellite I 領域におけるメチル化状態の解説
(-) は制限酵素なし、(+) は制限酵素処理

7-2) 市販画像解析ソフト、フリーソフト (NIH image, Scion Image, ImageJ) などで白黒二極化に変換

- ・サンプルレーン内の分離バンドの濃度 (ピクセル数) を取得。
- ・サンプルレーン全バンドの濃度 (ピクセル) の合計に対する消化・分離されたバンドの割合をメチル化程度で表す。

7') DNA 塩基配列決定**

7'-1) 4) で得られた PCR 産物をクローニングベクターに組み込み、大腸菌にトランスフェクション後、PCR 産物が組み込まれたコロニーを選別し、大腸菌を培養。

7'-2) PCR 産物の組み込まれたプラスミドを抽出、精製し、塩基配列を決定し、図 41 に示すような図を作成。

**この操作は DNA 組換え実験にあたるので、各所属機関の遺伝子組換え実験安全委員会による承認が必要。

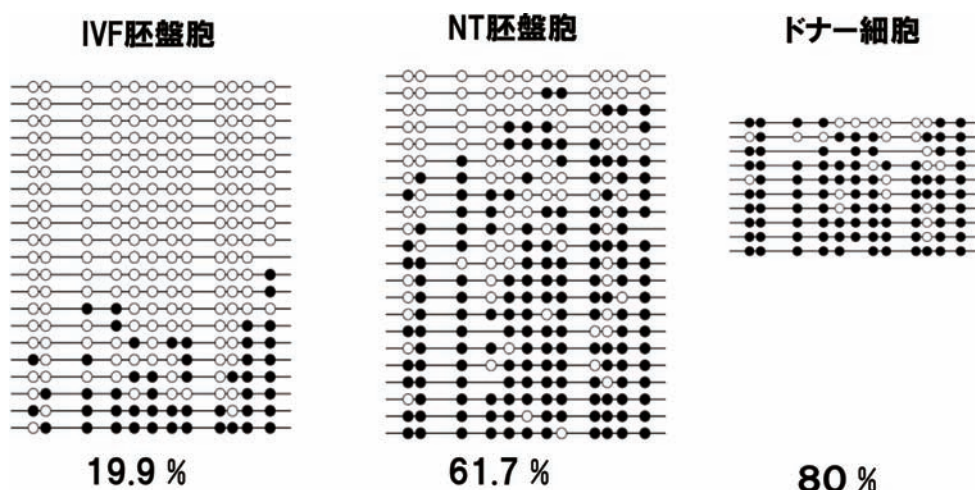


図 41. Bisulfite sequencing 法による体外受精、クローン胚およびドナー細胞の Satellite I 領域におけるメチル化状態の解説

②準備

1) 必要な機器、器具

性判定に関わる機器を備えてあれば基本的には実験は可能。

- ・オートピペッター (DNA 操作専用 1000, 200, 20, 2 μ l)
- ・0.2 ml PCR 反応チューブ、2 ml チューブ (滅菌済み、未滅菌であればオートクレーブ処理)
- ・遠心器 (1.5—2 ml のチューブが遠心出来るもの、卓上型でも可)。サンプル数が多い場合もあるので、遠心できる本数が多いタイプがあれば可。血液処理目的の機器等との併用は避ける。
- ・クリーンベンチ (簡易でも可)、空気中に浮遊する牛由来 DNA を含むフケ、埃等からのサンプルへの混入を防ぐため。
- ・PCR 装置 (0.2 ml のチューブが使い、オイルフリーの反応が出来るタイプ)
- ・ポリアクリルアミドゲル作成装置とパワーサプライ、または水平サブマリン型ゲル電気泳動装置 (アガロースゲル電気泳動装置一式でも可、ただし感度と展開能は落ちる)
- ・振とう器 (ポリアクリルアミドゲル染色用)
- ・ゲル撮影装置 (UV 照射が出来るトランスイルミネーター、ゲルイメージ撮影用 CCD カメラ、感熱プリンタ、ポラロイドカメラ)
- ・イメージスキャナ (CCD カメラによるデータ取り込み環境がない場合)
- ・画像解析ソフト、市販、フリーソフトウェア
NIH image (Mac)
Scion Image, Image J (Win) など

2) 必要な試薬

- ・胚、細胞洗浄用 PBS - PVP (PVA)
ポリビニルピロリドン (PVP)、ポリビニルアルコール (PVA) 0.5% 添加 PBS 溶解後、フィルター滅菌か、オートクレーブ
- ・DNA 抽出キット (DNA メチル化ダイレクトキットを用いる場合、全てキット内の試

薬で操作は可)

- ・ Bisulfite 処理キット (DNA メチル化ダイレクトキット (EZ DNA Methylation-Direct™ Kit: フナコシ) を用いる場合、全てキット内の試薬で操作は可)
- ・ ターゲット配列増幅用プライマー
ターゲット配列によって設計が必要。また、プライマー設計に際しては、非メチル化シトシン (C) がチミン (T) に変換された鋳型からの設計になるので、専用のメチル化 PCR プライマー設計ソフトが必要。プライマー合成は外注。
- ・ オンラインプライマーデザイン
MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>)
- ・ PCR 試薬
Taq ポリメラーゼ
dNTP (Taq ポリメラーゼ試薬に付属の場合もあり)
- ・ 制限酵素
認識、消化部位によって複数あるので、ターゲット増幅サイトを設計する際には、認識・消化部位が PCR 産物内にあることが必要。
- ・ 電気泳動用試薬

[ポリアクリルアミド電気泳動を使う場合#]

アクリルアミド、N', N'-メチレンビスアクリルアミド、トリスヒドロキシメチルアミノメタン (Tris)、ホウ酸、EDTA・2Na、重合剤 (過硫酸アンモニウム、) 架橋剤 (N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン: TEMED)

ゲルおよび泳動バッファーの作製は、ポリアクリルアミド電気泳動機器に付属している試薬調製及びゲル作製法に従う。

#アクリルアミドモノマーは毒劇物なので、管理と保管ならびに取り扱い時に注意が必要。

[アガロースゲル電気泳動を使う場合]

ゲルおよび泳動バッファーの作製は、アガロースゲル電気泳動機器に付属している試薬調製及びゲル作製法に従う。

アガロース粉末、トリスヒドロキシメチルアミノメタン (Tris)、EDTA・2Na、酢酸 (TAE バッファー)

- ・ DNA 染色試薬##

エチジウムブロマイド (Ethidium Bromide)、サイバーグリーン (SYBR Green)、サイバーゴールド (SYBR Gold)、ゲルレッド (GelRed) 等

##これらの試薬は基本的に DNA に結合するので、変異源として取り扱いと廃液処理には注意が必要。

③初期胚におけるメチル化状態検出の解説

クローン胚の作成効率を上げる場合には、メチル化の制御ならびに検出が重要な鍵を握るともいえる。近年、メチル化状態の解析手法にはめざましいものがあり、網羅的なメチル化、あるいは特定の遺伝子配列におけるメチル化解析等、発生・分化、あるいは細胞のガン治療とも相まって様々な手法が日進月歩で開発されている (図 42)。しかし、高価格の分析機器を必要とする手法もあり、クローン胚のような構成細胞が少なく、十分な DNA を確保しにくいサンプルを用いる場合には PCR による解析を併用した手法がとりやすいと考えられる。近年、遺伝子特異的にメチル化状態を比較的容易に解析できる手法として、亜硫酸水素 (bisulfite) 法による検出手法が簡便で信頼性の高い手法として広範囲にわたって利用され

ている。Bisulfite 法は早津らによって開発されたメチル化を解析する手法である [Hayatsu, H. *et al.* (1970)]。基本原理としては、メチル化を受けていないシトシンは Na-bisulfite で処理することで、ウラシルに置換されるが、メチル化を受けているメチルシトシンは置換されない。このため、bisulfite 処理後、鋳型の段階でメチル化された DNA とメチル化されない DNA で全く異なった塩基組成に変換される (図 43)。この原理を利用した様々な解析法が開発されている。

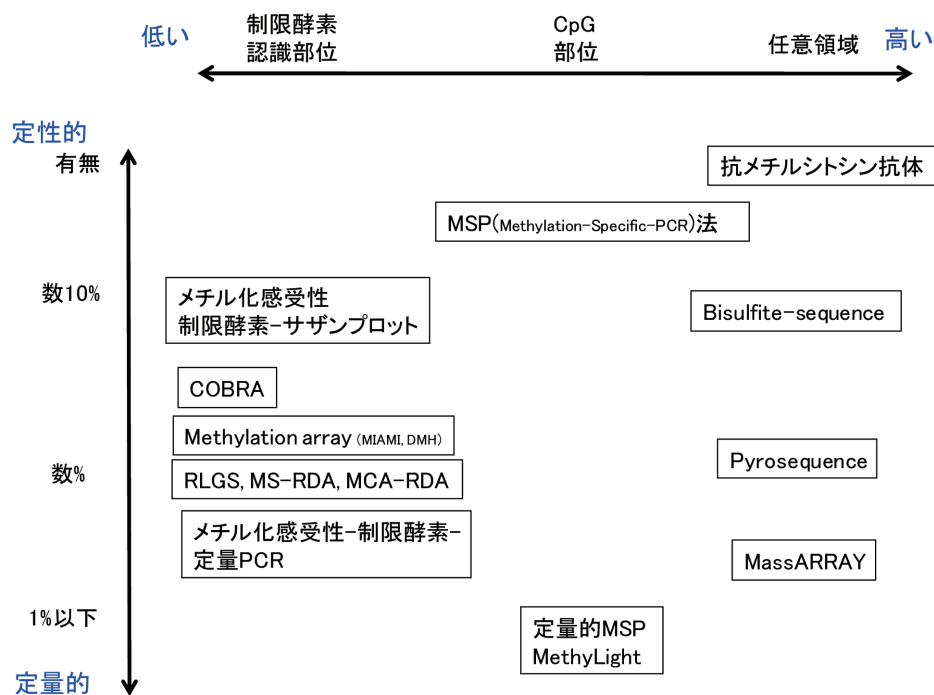


図 42. メチル化解析手法 牛嶋らの図を引用改変

サンプルの DNA を Bisulfite 処理後、PCR により CpG アイランドを有する特定領域を増幅し、メチル化を受け、変換されていない部位についての配列決定による Bisulfite sequencing や、制限酵素の処理を行うことで、鋳型でのメチル化状態を反映した定量的な解析方法である Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) が有効な手法として細胞分化やガン化におけるメチル化解析に広く用いられている [Bird A.P., Southern E.M. (1978)]。また、シークエンシングにより、塩基配列中のどの CpG アイランドがメチル化されているかということも解析が可能となる [Clark, S.J. *et al.* (1994)]。本手法を使った牛クローン胚でのメチル化状態検出の有効性が報告され、クローン胚における異常の早期検出とその評価手法への利用が広がっている 4)。実際に、胚のメチル化状態を COBRA 法 (図 39) および Bisulfite sequencing (図 40) によって解析すると、クローン胚盤胞のメチル化がほぼドナー細胞の状態を反映していることが判定できる。

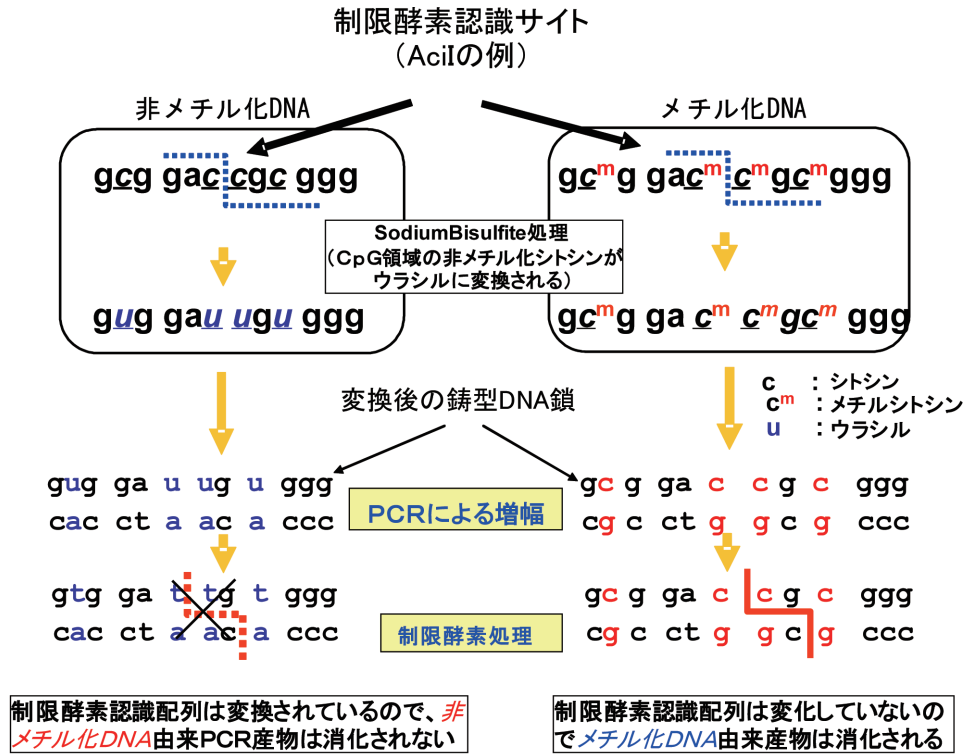


図 43. Bisulfite (亜硫酸水素) 処理による DNA メチル化塩基の変換と制限酵素消化法を用いたメチル化、非メチル化 DNA の選別

Bisulfite 法を利用することで、少数胚におけるメチル化解析が可能であり、特に、クローン胚における作出過程あるいは培養過程における操作の影響等、胚正常性評価への利用が考えられる。しかしながら、ゲノム DNA 中の反復配列であるサテライト I 領域のような増幅が容易な配列についてのみならず、発現遺伝子やプロモーター領域のような単一遺伝子配列をバイオプシー等によって胚から得た少数の細胞 DNA 試料から正確に解析するためには、さらなる増幅条件やプライマー配列設計等の条件検討が必要である。加えて、クローン胚の異常を引き起こす原因遺伝子は未だ解明されておらず、どの領域におけるメチル化状態をもって遺伝子機能発現の正常性を判断するかが確定されていないし、「メチル化正常性」評価の基準といえる数値も未だ確定していない。このことから、より精密な評価を行う際には、複数の遺伝子領域におけるメチル化解析を実施すると同時に、どのレベルを持って正常、異常と判断するかの基準データを蓄積していくことも必要であろう。

引用文献

- Bird A.P., Southern E.M. (1978) Use of restriction enzymes to study eukaryotic DNA methylation: I. The methylation pattern in ribosomal DNA from *Xenopus laevis*. *J Mol Biol.* 118:27-47.
- Clark, S.J., Harrison, J., Paul, C.L., Frommer, M. (1994) High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res.* 22:2990-2997.
- Hayatsu, H., Wataya, Y., Kai, K. (1970) The addition of sodium bisulfite to urAcil and to cytosine, *J. Am. Chem. Soc.*, 92, 724-726.
- Kang, Y.K., Koo, D.B., Park, J.S., Choi, Y.H., Chung, A.S., Lee, K.K., Han, Y.M. (2001) Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nat Genet.* 28:173-177.

【2. (2) 体細胞クローン胚における DNA メチル化検出法】
執筆：高橋昌志、山中賢一（九州沖縄農業研究センター）

付 録

と畜場法

(昭和二十八年八月一日法律第百十四号)

最終改正：平成一九年六月二七日法律第九六号

(この法律の目的)

第一条 この法律は、と畜場の経営及び食用に供するために行う獣畜の処理の適正の確保のために公衆衛生の見地から必要な規制その他の措置を講じ、もつて国民の健康の保護を図ることを目的とする。

(国、都道府県及び保健所を設置する市の責務)

第二条 国、都道府県及び地域保健法(昭和二十二年法律第百一号)第五条第一項の規定に基づく政令で定める市(以下「保健所を設置する市」という。)は、家畜の生産の実態及び獣畜の疾病の発生の状況を踏まえ、食品衛生上の危害の発生を防止するため、食用に供するために行う獣畜の処理の適正の確保のために必要な措置を講じなければならない。

(定義)

第三条 この法律で「獣畜」とは、牛、馬、豚、めん羊及び山羊をいう。

2 この法律で「と畜場」とは、食用に供する目的で獣畜をとさつし、又は解体するために設置された施設をいう。

3 この法律で「一般と畜場」とは、通例として生後一年以上の牛若しくは馬又は一日に十頭を超える獣畜をとさつし、又は解体する規模を有すると畜場をいう。

4 この法律で「簡易と畜場」とは、一般と畜場以外のと畜場をいう。

5 この法律で「と畜業者」とは、獣畜のとさつ又は解体の業を営む者をいう。

(と畜場の設置の許可)

第四条 一般と畜場又は簡易と畜場は、都道府県知事(保健所を設置する市にあつては、市長。以下同じ。)の許可を受けなければ、設置してはならない。

2 前項の規定による許可を受けようとする者は、構造設備その他厚生労働省令で定める事項を記載した申請書を都道府県知事に提出しなければならない。

3 第一項の規定により許可を受けて設置したと畜場について、構造設備その他厚生労働省令で定める事項を変更しようとする者は、あらかじめ、都道府県知事に届け出なければならない。

第五条 都道府県知事は、前条第一項の規定による許可の申請があつた場合において、当該と畜場の設置の場所が次の各号のいずれかに該当するとき、又は当該と畜場の構造設備が政令で定める一般と畜場若しくは簡易と畜場の基準に合わないとき認めるときは、同項の許可を与えないことができる。

一 人家が密集している場所

二 公衆の用に供する飲料水が汚染されるおそれがある場所

三 その他都道府県知事が公衆衛生上危害を生ずるおそれがあると認める場所

2 都道府県知事は、公衆衛生上必要があると認めるときは、前条第一項の規定による許可を受けたと畜場(以下単に「と畜場」という。)につき、その構造設備の規模に応じ、当該と畜場において通例として処理することができる獣畜の種類及び一日当りの頭数を制限することができる。

(と畜場の衛生管理)

第六条 と畜場の設置者又は管理者は、と畜場の内外を常に清潔にし、汚物処理を十分に行い、ねずみ、昆虫等の発生の防止及び駆除に努め、厚生労働省令で定める基準に従い、と畜場を衛生的に管理し、その他公衆衛生上必要な措置を講じなければならない。

(衛生管理責任者)

第七条 と畜場の管理者(と畜場の管理者がいなくと畜場にあつては、と畜場の設置者。以下この項、第六項、次条及び第十八条第一項第五号において同じ。)は、と畜場を衛生的に管理させるため、と畜場ごとに、衛生管理責任者を置かなければならない。ただし、と畜場の管理者が自ら衛生管理責任者となつて管理すると畜場については、この限りでない。

2 衛生管理責任者は、と畜場の衛生管理に関してこの法律又はこの法律に基づく命令若しくは処分に係る違反が行われないように、当該と畜場の衛生管理に従事する者を監督し、当該と畜場の構造設備を管理し、その他当該と畜場の衛生管理につき、必要な注意をしなければならない。

3 衛生管理責任者は、と畜場の衛生管理に関してこの法律又はこの法律に基づく命令若しくは処分に係る違反が行われないように、当該と畜場の衛生管理につき、当該と畜場の設置者又は管理者に対し必要な意見を述べなければならない。

4 と畜場の設置者又は管理者は、前項の規定による衛生管理責任者の意見を尊重しなければならない。

- 5 次の各号のいずれかに該当する者でなければ、衛生管理責任者となることができない。
- 一 獣医師
 - 二 学校教育法（昭和二十二年法律第二十六号）に基づく大学、旧大学令（大正七年勅令第三百八十八号）に基づく大学又は旧専門学校令（明治三十六年勅令第六十一号）に基づく専門学校において獣医学又は畜産学の課程を修めて卒業した者
 - 三 学校教育法第五十七条に規定する者又は厚生労働省令で定めるところによりこれらの者と同等以上の学力があると認められる者で、と畜場の衛生管理の業務に三年以上従事し、かつ、都道府県又は保健所を設置する市が行う講習会の課程を修了した者
 - 6 と畜場の管理者は、衛生管理責任者を置き、又は自ら衛生管理責任者となつたときは、その日から十五日以内に、都道府県知事に、その衛生管理責任者の氏名又は自ら衛生管理責任者となつた旨その他厚生労働省令で定める事項を届け出なければならない。衛生管理責任者を変更したときも、同様とする。
 - 7 受講科目その他第五項第三号の講習会の課程に関して必要な事項は、厚生労働省令で定める。

第八条 都道府県知事は、衛生管理責任者が次の各号のいずれかに該当する場合であつて当該衛生管理責任者に引き続きその職務を行わせることが適切でないとき、と畜場の管理者に対し、その解任を命ずることができる。

- 一 この法律又はこの法律に基づく命令若しくは処分違反したとき。
- 二 前条第二項に規定する職務を怠つたとき。

（と畜業者等の講ずべき衛生措置）

第九条 と畜業者その他獣畜のとさつ又は解体を行う者（以下「と畜業者等」という。）は、と畜場内において獣畜のとさつ又は解体を行う場合には、厚生労働省令で定める基準に従い、獣畜のとさつ又は解体を衛生的に管理し、その他公衆衛生上必要な措置を講じなければならない。

（作業衛生責任者）

第十条 と畜業者等は、獣畜のとさつ又は解体を衛生的に管理させるため、と畜場ごとに、作業衛生責任者を置かなければならない。ただし、と畜業者等が自ら作業衛生責任者となつて管理すると畜場については、この限りでない。

- 2 第七条第二項から第七項までの規定及び第八条の規定は、作業衛生責任者について準用する。この場合において、必要な技術的読替えは、政令で定める。

（と畜場の使用等の拒否の制限）

第十一条 と畜場の設置者又は管理者は、正当な理由がなければ、獣畜のとさつ又は解体のためにと畜場を使用することを拒んではならない。

- 2 と畜業者は、正当な理由がなければ、獣畜のとさつ又は解体を拒んではならない。

（と畜場使用料及びとさつ解体料）

第十二条 と畜場の設置者若しくは管理者又はと畜業者は、と畜場使用料又はとさつ解体料について、あらかじめ、その額を定めて、都道府県知事の認可を受けなければならない。認可を受けたと畜場使用料又はとさつ解体料の額を変更しようとするときも、同様とする。

- 2 と畜場の設置者若しくは管理者又はと畜業者は、前項の規定により認可を受けた額を超えると畜場使用料又はとさつ解体料を受けてはならない。
- 3 と畜場の設置者若しくは管理者又はと畜業者は、第一項の規定により認可を受けたと畜場使用料又はとさつ解体料を、と畜場内の見やすい場所に掲示しなければならない。

（獣畜のとさつ又は解体）

第十三条 何人も、と畜場以外の場所において、食用に供する目的で獣畜をとさつしてはならない。ただし、次に掲げる場合は、この限りでない。

- 一 食肉販売業その他食肉を取り扱う営業で厚生労働省令で定めるものを営む者以外の者が、あらかじめ、厚生労働省令で定めるところにより、都道府県知事に届け出て、主として自己及びその同居者の食用に供する目的で、獣畜（生後一年以上の牛及び馬を除く。）をとさつする場合
 - 二 獣畜が不慮の災害により、負傷し、又は救うことができない状態に陥り、直ちにとさつすることが必要である場合
 - 三 獣畜が難産、産褥麻痺又は急性鼓張症その他厚生労働省令で定める疾病にかかり、直ちにとさつすることが必要である場合
 - 四 その他政令で定める場合
- 2 何人も、と畜場以外の場所において、食用に供する目的で獣畜を解体してはならない。ただし、前項第一号又は第四号の規定によりと畜場以外の場所においてとさつした獣畜を解体する場合は、この限りでない。
 - 3 都道府県知事は、公衆衛生上必要があると認めるときは、前二項の規定により、と畜場以外の場所において獣畜をとさつし、又は解体する者に対し、とさつ又は解体の場所、肉、内臓等の取扱方法及び汚物の処理方法を指示

することができる。

(獣畜のとさつ又は解体の検査)

第十四条 と畜場においては、都道府県知事の行う検査を経た獣畜以外の獣畜をとさつしてはならない。

2 と畜場においては、とさつ後都道府県知事の行う検査を経た獣畜以外の獣畜を解体してはならない。

3 と畜場内で解体された獣畜の肉、内臓、血液、骨及び皮は、都道府県知事の行う検査を経た後でなければ、と畜場外に持ち出してはならない。ただし、次の各号のいずれかに該当するときは、この限りでない。

一 この項本文に規定する検査のため必要があると認められる場合において都道府県（保健所を設置する市にあつては、市。以下同じ。）の職員が解体された獣畜の肉、内臓、血液、骨又は皮の一部を持ち出すとき。

二 厚生労働省令で定める疾病の有無についてのこの項本文に規定する検査を行う場合において都道府県知事の許可を得て獣畜の皮を持ち出すときその他の衛生上支障がない場合として政令で定めるとき。

4 前三項の規定は、都道府県知事が特に検査を要しないものと認めた場合を除き、前条第一項第四号又はこれに係る同条第二項ただし書の規定によりと畜場以外の場所で獣畜のとさつ又は解体が行われる場合に準用する。この場合において、前項中「と畜場外」とあるのは、「獣畜の解体を行った場所外」と読み替えるものとする。

5 前各項に規定する都道府県知事の権限に属する事務のうち、政令で定める疾病の有無についての検査に係るものは、前各項の規定にかかわらず、政令で定めるところにより、都道府県知事及び厚生労働大臣が行う。

6 前各項の規定による検査は、次に掲げるものの有無について行うものとする。

一 家畜伝染病予防法（昭和二十六年法律第百六十六号）第二条第一項に規定する家畜伝染病及び同法第四条第一項に規定する届出伝染病

二 前号に掲げるもの以外の疾病であつて厚生労働省令で定めるもの

三 潤滑油の付着その他の厚生労働省令で定める異常

7 前項に定めるもののほか、第一項から第五項までの規定により都道府県知事及び厚生労働大臣の行う検査の方法、手続その他検査に関し必要な事項は、政令で定める。

8 第一項から第五項までの規定により都道府県知事及び厚生労働大臣が行う検査の結果については、行政不服審査法（昭和三十七年法律第百六十号）による不服申立てをすることができない。

(譲受けの禁止)

第十五条 何人も、第十三条第二項の規定に違反してと畜場以外の場所で解体された獣畜の肉若しくは内臓、又は前条第三項（同条第四項において準用する場合及び同条第五項の規定の適用がある場合を含む。）の規定に違反して持ち出された獣畜の肉若しくは内臓を、食品として販売（不特定又は多数の者に対する販売以外の授与を含む。）の用に供する目的で譲り受けてはならない。

(とさつ解体の禁止等)

第十六条 都道府県知事は、第十四条の規定による検査の結果、獣畜が疾病にかかり、若しくは異常があり食用に供することができないと認めるとき、又は当該獣畜により若しくは当該獣畜のとさつ若しくは解体によりウイルスを伝染させるおそれがあると認めるときは、公衆衛生上必要な限度において、次に掲げる措置をとることができる。

一 当該獣畜のとさつ又は解体を禁止すること。

二 当該獣畜の所有者若しくは管理者、と畜場の設置者若しくは管理者、と畜業者その他の関係者に対し、当該獣畜の隔離、と畜場内の消毒その他の措置を講ずべきことを命じ、又は当該職員にこれらの措置を講じさせること。

三 当該獣畜の肉、内臓等の所有者若しくは管理者に対し、食用に供することができないと認められる肉、内臓その他の獣畜の部分について廃棄その他の措置を講ずべきことを命じ、又は当該職員にこれらの措置を講じさせること。

(報告の徴収等)

第十七条 都道府県知事は、この法律の施行に必要な限度において、と畜場の設置者若しくは管理者、と畜業者その他の関係者から必要な報告を徴し、又は当該職員に、と畜場若しくはと畜場の設置者若しくは管理者、と畜業者その他の関係者の事務所、倉庫その他の施設に立ち入り、設備、帳簿、書類その他の物件を検査させることができる。

2 前項の規定により立入検査をする職員は、その身分を示す証票を携帯し、かつ、関係者の請求があるときは、これを提示しなければならない。

3 第一項の規定による権限は、犯罪捜査のために認められたものと解釈してはならない。

(と畜場の設置の許可の取消し等)

第十八条 都道府県知事は、次に掲げる場合には、第四条第一項の規定による許可を取り消し、又はと畜場の設置者若しくは管理者に対し、期間を定めて、当該と畜場の施設の使用の制限若しくは停止を命ずることができる。

一 当該と畜場の構造設備が第五条第一項の規定による基準に合わなくなつたとき。

二 第五条第二項の規定による獣畜の種類及び頭数の制限が定められていると畜場において、その制限によらないで獣畜のとさつ又は解体が行われるに至つたとき。

三 第五条第二項の規定による獣畜の種類及び頭数の制限が定められていない簡易と畜場において、通例として、一日に十頭を超える獣畜又は生後一年以上の牛若しくは馬のとさつ又は解体が行われるに至つたとき。

- 四 当該と畜場の設置者又は管理者が、第六条又は第七条第一項若しくは第六項の規定に違反したとき。
- 五 当該と畜場の管理者が、第八条の規定による命令に違反したとき。
- 2 都道府県知事は、次に掲げる場合には、と畜業者等に対し、期間を定めて、とさつ若しくは解体の業務の停止を命じ、又はとさつ若しくは解体を行うことを禁止することができる。
- 一 当該と畜業者等が、第九条又は第十条第一項若しくは第二項において準用する第七条第六項の規定に違反したとき。
- 二 当該と畜業者等が、第十条第二項において準用する第八条の規定による命令に違反したとき。

(と畜検査員)

- 第十九条 第十四条に規定する検査の事務に従事させ、並びに第十六条及び第十七条第一項に規定する当該職員の職務並びに食用に供するために行う獣畜の処理の適正の確保に関する指導の職務を行わせるため、都道府県知事は、当該都道府県の職員のうちからと畜検査員を命ずるものとする。
- 2 都道府県知事は、食品衛生法（昭和二十二年法律第二百三十三号）第二十四条第一項に規定する都道府県等食品衛生監視指導計画の定めるところにより、と畜検査員に前項に規定する事務又は職務を行わせなければならない。
 - 3 と畜検査員の資格について必要な事項は、政令で定める。

(厚生労働大臣の調査の要請等)

- 第二十条 厚生労働大臣は、食品衛生法第六十条の規定に基づき報告を求めた場合その他食品衛生上の危害の発生の防止のため特に必要があると認めるときは、都道府県知事に対し、期限を定めて、第十四条第一項から第四項までの規定により行う検査及び第十七条第一項の規定による措置を実施し、食中毒の原因を調査し、調査の結果を報告するように求めることができる。

(国民の意見の聴取)

- 第二十一条 厚生労働大臣は、第六条、第九条、第十三条第一項第三号若しくは第十四条第六項第二号若しくは第三号の厚生労働省令を制定し、若しくは改廃しようとするとき、又は同条第七項の政令の制定若しくは改廃の立案をしようとするときは、その趣旨、内容その他の必要な事項を公表し、広く国民の意見を求めるものとする。ただし、食品衛生上の危害の発生を防止するため緊急を要する場合で、あらかじめ広く国民の意見を求めるいとまがないときは、この限りでない。
- 2 厚生労働大臣は、前項ただし書の場合においては、事後において、遅滞なく、広く国民の意見を求めるものとする。

(連絡及び協力)

- 第二十二条 厚生労働大臣及び農林水産大臣は、この法律の施行に当たっては、食用に供するために行う獣畜の処理の適正の確保に関する事項について、相互に緊密に連絡し、及び協力しなければならない。

(事務の区分)

- 第二十三条 第十七条第一項の規定により都道府県が処理することとされている事務は、地方自治法（昭和二十二年法律第六十七号）第二条第九項第一号に規定する第一号法定受託事務とする。

(罰則)

- 第二十四条 次の各号のいずれかに該当する者は、三年以下の懲役又は三百万円以下の罰金に処する。
- 一 第四条第一項の規定に違反した者
 - 二 第十三条第一項又は第二項の規定に違反した者
 - 三 第十四条第一項から第三項まで（同条第四項において準用する場合及び同条第五項の規定の適用がある場合を含む。）の規定に違反した者

- 第二十五条 次の各号のいずれかに該当する者は、一年以下の懲役又は百万円以下の罰金に処する。

- 一 第十五条の規定に違反した者
- 二 第十六条の規定による禁止若しくは命令に違反した者又は同条第二号若しくは第三号の規定により当該職員の職務の執行を拒み、妨げ、若しくは忌避した者
- 三 第十八条第一項の規定による命令又は同条第二項の規定による命令若しくは禁止に違反した者

- 第二十六条 次の各号のいずれかに該当する者は、五十万円以下の罰金に処する。

- 一 第七条第六項（第十条第二項において準用する場合を含む。）の規定による届出をせず、又は虚偽の届出をした者
- 二 第十一条の規定に違反した者
- 三 第十二条第一項の規定による認可を受けなくて、又は同条第二項の規定に違反して、と畜場使用料又はとさつ解体料を受けた者
- 四 第十三条第三項の規定による指示に違反した者
- 五 第十七条第一項の規定による報告をせず、若しくは虚偽の報告をし、又は当該職員の立入検査を拒み、妨げ、

若しくは忌避した者

第二十七条 法人の代表者又は法人若しくは人の代理人、使用人その他の従業者が、その法人又は人の業務に関し、次の各号に掲げる規定の違反行為をしたときは、行為者を罰するほか、その法人に対して当該各号に定める罰金刑を、その人に対して各本条の罰金刑を科する。

- 一 第二十四条 一億円以下の罰金刑
- 二 第二十五条又は前条 各本条の罰金刑

附 則 抄

(施行期日)

1 この法律は、公布の日から施行する。ただし、第十二条の規定は、公布の日から起算して一箇月を経過した日から施行する。

(屠場法の廃止)

2 屠場法(明治三十九年法律第三十二号)は、廃止する。

(と畜場設置の許可に関する経過規定)

3 この法律の施行の際、現に従前の規定による許可を受けて設置されていると畜場のうち、その構造設備が第五条第一項の規定による一般と畜場の基準に合うもの及び通例として一日に十頭を超える獣畜をとさつし、又は解体しているものは、この法律の規定による許可を受けて設置された一般と畜場とみなし、その他のものは、この法律の規定による許可を受けて設置された簡易と畜場とみなす。

(と畜検査員に関する経過規定)

4 この法律の施行の際、現に従前の規定によりと畜検査員を命ぜられている者は、この法律の規定によりと畜検査員を命ぜられたものとみなす。

(罰則に関する経過規定)

5 この法律の施行前にした行為に対する罰則の適用については、なお従前の例による。

附 則 (昭和三十七年九月一五日法律第一六一号) 抄

1 この法律は、昭和三十七年十月一日から施行する。

2 この法律による改正後の規定は、この附則に特別の定めがある場合を除き、この法律の施行前にされた行政庁の処分、この法律の施行前にされた申請に係る行政庁の不作為その他この法律の施行前に生じた事項についても適用する。ただし、この法律による改正前の規定によつて生じた効力を妨げない。

3 この法律の施行前に提起された訴願、審査の請求、異議の申立てその他の不服申立て(以下「訴願等」という。)については、この法律の施行後も、なお従前の例による。この法律の施行前にされた訴願等の裁決、決定その他の処分(以下「裁決等」という。)又はこの法律の施行前に提起された訴願等につきこの法律の施行後にされる裁決等にさらに不服がある場合の訴願等についても、同様とする。

4 前項に規定する訴願等で、この法律の施行後は行政不服審査法による不服申立てをすることができることとなる処分に係るものは、同法以外の法律の適用については、行政不服審査法による不服申立てとみなす。

5 第三項の規定によりこの法律の施行後にされる審査の請求、異議の申立てその他の不服申立ての裁決等については、行政不服審査法による不服申立てをすることができない。

6 この法律の施行前にされた行政庁の処分、この法律による改正前の規定により訴願等を行うことができるものとされ、かつ、その提起期間が定められていなかったものについて、行政不服審査法による不服申立てを行うことができる期間は、この法律の施行の日から起算する。

8 この法律の施行前にした行為に対する罰則の適用については、なお従前の例による。

9 前八項に定めるもののほか、この法律の施行に関して必要な経過措置は、政令で定める。

附 則 (昭和五八年一二月一〇日法律第八三号) 抄

(施行期日)

第一条 この法律は、公布の日から施行する。ただし、次の各号に掲げる規定は、それぞれ当該各号に定める日から施行する。

一 略

二 第一条から第三条まで、第二十一条及び第二十三条の規定、第二十四条中麻薬取締法第二十九条の改正規定、第四十一条、第四十七条及び第五十四条から第五十六条までの規定並びに附則第二条、第六条、第十三条及び第二十条の規定 昭和五十九年四月一日

(その他の処分、申請等に係る経過措置)

第十四条 この法律(附則第一条各号に掲げる規定については、当該各規定。以下この条及び第十六条において同じ。)の施行前に改正前のそれぞれの法律の規定によりされた許可等の処分その他の行為(以下この条において「処分等の行為」という。)又はこの法律の施行の際現に改正前のそれぞれの法律の規定によりされている許可等の申

請その他の行為（以下この条において「申請等の行為」という。）で、この法律の施行の日においてこれらの行為に係る行政事務を行うべき者が異なることとなるものは、附則第二条から前条までの規定又は改正後のそれぞれの法律（これに基づく命令を含む。）の経過措置に関する規定に定めるものを除き、この法律の施行の日以後における改正後のそれぞれの法律の適用については、改正後のそれぞれの法律の相当規定によりされた処分等の行為又は申請等の行為とみなす。

（罰則に関する経過措置）

第十六条 この法律の施行前にした行為及び附則第三条、第五条第五項、第八条第二項、第九条又は第十条の規定により従前の例によることとされる場合における第十七条、第二十二條、第三十六條、第三十七條又は第三十九條の規定の施行後にした行為に対する罰則の適用については、なお従前の例による。

附 則 （昭和六〇年七月一二日法律第九〇号） 抄

（施行期日）

第一条 この法律は、公布の日から施行する。

附 則 （平成五年一一月一二日法律第八九号） 抄

（施行期日）

第一条 この法律は、行政手続法（平成五年法律第八十八号）の施行の日から施行する。

（諮問等がされた不利益処分に関する経過措置）

第二条 この法律の施行前に法令に基づき審議会その他の合議制の機関に対し行政手続法第十三条に規定する聴聞又は弁明の機会の付与の手続その他の意見陳述のための手続に相当する手続を執るべきことの諮問その他の求めがされた場合においては、当該諮問その他の求めに係る不利益処分の手続に関しては、この法律による改正後の関係法律の規定にかかわらず、なお従前の例による。

（罰則に関する経過措置）

第十三条 この法律の施行前にした行為に対する罰則の適用については、なお従前の例による。

（聴聞に関する規定の整理に伴う経過措置）

第十四条 この法律の施行前に法律の規定により行われた聴聞、聴問若しくは聴聞会（不利益処分に係るものを除く。）又はこれらのための手続は、この法律による改正後の関係法律の相当規定により行われたものとみなす。

（政令への委任）

第十五条 附則第二条から前条までに定めるもののほか、この法律の施行に関して必要な経過措置は、政令で定める。

附 則 （平成一一年七月一六日法律第八七号） 抄

（施行期日）

第一条 この法律は、平成十二年四月一日から施行する。ただし、次の各号に掲げる規定は、当該各号に定める日から施行する。

一 第一条中地方自治法第二百五十条の次に五条、節名並びに二款及び款名を加える改正規定（同法第二百五十条の九第一項に係る部分（両議院の同意を得ることに係る部分に限る。）に限る。）、第四十条中自然公園法附則第九項及び第十項の改正規定（同法附則第十項に係る部分に限る。）、第二百四十四条の規定（農業改良助長法第十四条の三の改正規定に係る部分を除く。）並びに第四百七十二條の規定（市町村の合併の特例に関する法律第六条、第八条及び第十七條の改正規定に係る部分を除く。）並びに附則第七條、第十條、第十二條、第五十九條ただし書、第六十条第四項及び第五項、第七十三條、第七十七條、第一百五十七條第四項から第六項まで、第一百六十條、第一百六十三條、第一百六十四條並びに第二百二條の規定 公布の日

（従前の例による事務等に関する経過措置）

第六十九条 国民年金法等の一部を改正する法律（昭和六十年法律第三十四号）附則第三十二条第一項、第七十八条第一項並びに第八十七条第一項及び第十三項の規定によりなお従前の例によることとされた事項に係る都道府県知事の事務、権限又は職権（以下この条において「事務等」という。）については、この法律による改正後の国民年金法、厚生年金保険法及び船員保険法又はこれらの法律に基づく命令の規定により当該事務等に相当する事務又は権限を行うこととされた厚生大臣若しくは社会保険庁長官又はこれらの者から委任を受けた地方社会保険事務局長若しくはその地方社会保険事務局長から委任を受けた社会保険事務所長の事務又は権限とする。

（新地方自治法第五十六条第四項の適用の特例）

第七十条 第六十六條の規定による改正後の厚生省設置法第十四條の地方社会保険事務局及び社会保険事務所であって、この法律の施行の際旧地方自治法附則第八條の事務を処理するための都道府県の機関（社会保険関係事務を取り扱うものに限る。）の位置と同一の位置に設けられるもの（地方社会保険事務局にあっては、都道府県庁の置かれている市（特別区を含む。）に設けられるものに限る。）については、新地方自治法第五十六條第四項の規定は、適用しない。

（社会保険関係地方事務官に関する経過措置）

第七十一条 この法律の施行の際現に旧地方自治法附則第八條に規定する職員（厚生大臣又はその委任を受けた者により任命された者に限る。附則第五十八條において「社会保険関係地方事務官」という。）である者は、別に辞令が発せられない限り、相当の地方社会保険事務局又は社会保険事務所の職員となるものとする。

（地方社会保険医療協議会に関する経過措置）

第七十二条 第六十九條の規定による改正前の社会保険医療協議会法の規定による地方社会保険医療協議会並びにその会長、委員及び専門委員は、相当の地方社会保険事務局の地方社会保険医療協議会並びにその会長、委員及び専門委員となり、同一性をもって存続するものとする。

（準備行為）

第七十三条 第二百條の規定による改正後の国民年金法第九十二條の三第一項第二号の規定による指定及び同條第二項の規定による公示は、第二百條の規定の施行前においても行うことができる。

（厚生大臣に対する再審査請求に係る経過措置）

第七十四条 施行日前にされた行政庁の処分に係る第四百四十九條から第五百一十一條まで、第五百五十七條、第五百五十八條、第六十五條、第六十八條、第七十條、第七十二條、第七十三條、第七十五條、第七十六條、第八十三條、第八十八條、第九十五條、第二百一十一條、第二百一十二條、第二百一十四條、第二百一十九條から第二百二十一條まで、第二百二十九條又は第二百三十八條の規定による改正前の児童福祉法第五十九條の四第二項、あん摩マッサージ指圧師、はり師、きゆう師等に関する法律第十二條の四、食品衛生法第二十九條の四、旅館業法第九條の三、公衆浴場法第七條の三、医療法第七十一條の三、身体障害者福祉法第四十三條の二第二項、精神保健及び精神障害者福祉に関する法律第五十一條の十二第二項、クリーニング業法第十四條の二第二項、狂犬病予防法第二十五條の二、社会福祉事業法第八十三條の二第二項、結核予防法第六十九條、と畜法第二十二條、歯科技工士法第二十七條の二、臨床検査技師、衛生検査技師等に関する法律第二十條の八の二、知的障害者福祉法第三十條第二項、老人福祉法第三十四條第二項、母子保健法第二十六條第二項、柔道整復師法第二十三條、建築物における衛生的環境の確保に関する法律第十四條第二項、廃棄物の処理及び清掃に関する法律第二十四條、食鳥処理の事業の規制及び食鳥検査に関する法律第四十一條第三項又は感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律第六十五條の規定に基づく再審査請求については、なお従前の例による。

（厚生大臣又は都道府県知事その他の地方公共団体の機関がした事業の停止命令その他の処分に関する経過措置）

第七十五条 この法律による改正前の児童福祉法第四十六條第四項若しくは第五十九條第一項若しくは第三項、あん摩マッサージ指圧師、はり師、きゆう師等に関する法律第八條第一項（同法第十二條の二第二項において準用する場合を含む。）、食品衛生法第二十二條、医療法第五條第二項若しくは第二十五條第一項、毒物及び劇物取締法第十七條第一項（同法第二十二條第四項及び第五項で準用する場合を含む。）、厚生年金保険法第百條第一項、水道法第三十九條第一項、国民年金法第六十六條第一項、薬事法第六十九條第一項若しくは第七十二條又は柔道整復師法第十八條第一項の規定により厚生大臣又は都道府県知事その他の地方公共団体の機関がした事業の停止命令その他の処分は、それぞれ、この法律による改正後の児童福祉法第四十六條第四項若しくは第五十九條第一項若しくは第三項、あん摩マッサージ指圧師、はり師、きゆう師等に関する法律第八條第一項（同法第十二條の二第二項において準用する場合を含む。）、食品衛生法第二十二條若しくは第二十三條、医療法第五條第二項若しくは第二十五條第一項、毒物及び劇物取締法第十七條第一項若しくは第二項（同法第二十二條第四項及び第五項で準用する場合を含む。）、厚生年金保険法第百條第一項、水道法第三十九條第一項若しくは第二項、国民年金法第六十六條第一項、薬事法第六十九條第一項若しくは第二項若しくは第七十二條第二項又は柔道整復師法第十八條第一項の規定により厚生大臣又は地方公共団体がした事業の停止命令その他の処分とみなす。

（国等の事務）

第七十六条 この法律による改正前のそれぞれの法律に規定するもののほか、この法律の施行前において、地方公共団体の機関が法律又はこれに基づく政令により管理し又は執行する国、他の地方公共団体その他公共団体の事務（附則第六十一條において「国等の事務」という。）は、この法律の施行後は、地方公共団体が法律又はこれに基づく政令により当該地方公共団体の事務として処理するものとする。

（処分、申請等に関する経過措置）

第七十七条 この法律（附則第一條各号に掲げる規定については、当該各規定。以下この条及び附則第六十三條において同じ。）の施行前に改正前のそれぞれの法律の規定によりされた許可等の処分その他の行為（以下この条において「処分等の行為」という。）又はこの法律の施行の際現に改正前のそれぞれの法律の規定によりされてい

る許可等の申請その他の行為（以下この条において「申請等の行為」という。）で、この法律の施行の日においてこれらの行為に係る行政事務を行うべき者が異なることとなるものは、附則第二条から前条までの規定又は改正後のそれぞれの法律（これに基づく命令を含む。）の経過措置に関する規定に定めるものを除き、この法律の施行の日以後における改正後のそれぞれの法律の適用については、改正後のそれぞれの法律の相当規定によりされた処分等の行為又は申請等の行為とみなす。

- 2 この法律の施行前に改正前のそれぞれの法律の規定により国又は地方公共団体の機関に対し報告、届出、提出その他の手続をしなければならない事項で、この法律の施行の日前にその手続がされていないものについては、この法律及びこれに基づく政令に別段の定めがあるもののほか、これを、改正後のそれぞれの法律の相当規定により国又は地方公共団体の相当の機関に対して報告、届出、提出その他の手続をしなければならない事項についてその手続がされていないものとみなして、この法律による改正後のそれぞれの法律の規定を適用する。

（不服申立てに関する経過措置）

第百六十一条 施行日前にされた国等の事務に係る処分であって、当該処分をした行政庁（以下この条において「処分庁」という。）に施行日前に行政不服審査法に規定する上級行政庁（以下この条において「上級行政庁」という。）があったものについての同法による不服申立てについては、施行日以後においても、当該処分庁に引き続き上級行政庁があるものとみなして、行政不服審査法の規定を適用する。この場合において、当該処分庁の上級行政庁とみなされる行政庁は、施行日前に当該処分庁の上級行政庁であった行政庁とする。

- 2 前項の場合において、上級行政庁とみなされる行政庁が地方公共団体の機関であるときは、当該機関が行政不服審査法の規定により処理することとされる事務は、新地方自治法第二条第九項第一号に規定する第一号法定受託事務とする。

（手数料に関する経過措置）

第百六十二条 施行日前においてこの法律による改正前のそれぞれの法律（これに基づく命令を含む。）の規定により納付すべきであった手数料については、この法律及びこれに基づく政令に別段の定めがあるもののほか、なお従前の例による。

（罰則に関する経過措置）

第百六十三条 この法律の施行前にした行為に対する罰則の適用については、なお従前の例による。

（その他の経過措置の政令への委任）

第百六十四条 この附則に規定するもののほか、この法律の施行に伴い必要な経過措置（罰則に関する経過措置を含む。）は、政令で定める。

- 2 附則第十八条、第五十一条及び第百八十四条の規定の適用に関して必要な事項は、政令で定める。

（検討）

第二百五十条 新地方自治法第二条第九項第一号に規定する第一号法定受託事務については、できる限り新たに設けることのないようにするとともに、新地方自治法別表第一に掲げるもの及び新地方自治法に基づく政令に示すものについては、地方分権を推進する観点から検討を加え、適宜、適切な見直しを行うものとする。

第二百五十一条 政府は、地方公共団体が事務及び事業を自主的かつ自立的に執行できるよう、国と地方公共団体との役割分担に応じた地方税財源の充実確保の方途について、経済情勢の推移等を勘案しつつ検討し、その結果に基づいて必要な措置を講ずるものとする。

第二百五十二条 政府は、医療保険制度、年金制度等の改革に伴い、社会保険の事務処理の体制、これに従事する職員の在り方等について、被保険者等の利便性の確保、事務処理の効率化等の視点に立って、検討し、必要があると認めるときは、その結果に基づいて所要の措置を講ずるものとする。

附 則 （平成十一年一月二二日法律第一六〇号） 抄

（施行期日）

第一条 この法律（第二条及び第三条を除く。）は、平成十三年一月六日から施行する。

附 則 （平成十五年五月三〇日法律第五五号） 抄

（施行期日）

第一条 この法律は、公布の日から起算して三月を超えない範囲内において政令で定める日から施行する。ただし、次の各号に掲げる規定は、当該各号に定める日から施行する。

- 一 第四条並びに附則第九条、第十条（食品安全基本法（平成十五年法律第四十八号）第二十二条に規定する食品安全委員会（以下この条及び附則第十条において「食品安全委員会」という。）に係る部分を除く。）、第十二条、第十三条及び第二十九条の規定 公布の日

二 附則第十条（食品安全委員会に係る部分に限る。）の規定 食品安全基本法の施行の日

三 第二条（次号に掲げる改正規定を除く。）、第六条（次号に掲げる改正規定を除く。）、第八条（次号に掲げる改正規定を除く。）及び第十条並びに附則第二条から第五条まで、第八条、第十六条から第十八条まで、第二十一条から第二十六条まで、第三十一条、第三十三条及び第三十五条の規定 公布の日から起算して九月を超えない範囲内において政令で定める日

四 第二条中食品衛生法第十九条の改正規定（「第十七条第一項」を「第二十八条第一項」に改める部分を除く。）、第六条中と畜場法第十九条の改正規定及び第八条中食鳥処理の事業の規制及び食鳥検査に関する法律第三十九条の改正規定 平成十六年四月一日

（衛生管理責任者及び作業衛生責任者に関する経過措置）

第六条 この法律の施行の際現にと畜場の衛生管理の業務に従事している者その他その者に準ずるものとして厚生労働省令で定める者であつて、平成九年四月一日以降において三年以上と畜場の衛生管理の業務に従事した経験を有するものは、この法律の施行の日から三年間は、第五条の規定による改正後のと畜場法（次条において「新と畜場法」という。）第七条第五項の規定にかかわらず、同条第一項に規定する衛生管理責任者となることができる。

第七条 この法律の施行の際現に獣畜のとさつ又は解体の業務に従事している者その他その者に準ずるものとして厚生労働省令で定める者であつて、平成九年四月一日以降において三年以上獣畜のとさつ又は解体の業務に従事した経験を有するものは、この法律の施行の日から三年間は、新と畜場法第十条第二項において準用する新と畜場法第七条第五項の規定にかかわらず、新と畜場法第十条第一項に規定する作業衛生責任者となることができる。

（処分、手続等に関する経過措置）

第九条 この法律（附則第一条各号に掲げる規定については、当該各規定。附則第十二条において同じ。）の施行前に改正前のそれぞれの法律（これに基づく命令を含む。以下この条において同じ。）の規定によつてした処分、手続その他の行為であつて、改正後のそれぞれの法律の規定に相当の規定があるものは、この附則に別段の定めがあるものを除き、改正後のそれぞれの法律の相当の規定によつてしたものとみなす。

（国民の意見の聴取等）

第十条 厚生労働大臣は、この法律の施行の前においても、第一条の規定による改正後の食品衛生法第十三条の二第一項に規定する指針を定めようとするとき、及び同法第十三条の三第一項に規定する輸入食品監視指導計画を定めようとするときは、その趣旨、内容その他の必要な事項を公表し、広く国民の意見を求めることができる。

2 厚生労働大臣は、この法律の施行の前においても、第九条の規定による改正後の食品衛生法及び栄養改善法の一部を改正する法律附則第二条の二第一項の規定により添加物の名称を既存添加物名簿から削除しようとするときは、その趣旨、内容その他の必要な事項を公表し、広く国民の意見を求め、又は食品安全委員会若しくは薬事・食品衛生審議会の意見を聴くことができる。

3 厚生労働大臣は、附則第一条第三号に掲げる規定の施行の前においても、次に掲げる場合には、その趣旨、内容その他の必要な事項を公表し、広く国民の意見を求め、又は食品安全委員会の意見を聴くことができる。

一 新食品衛生法第九条第一項の厚生労働省令を定めようとするとき。

二 第六条の規定による改正後のと畜場法第六条、第九条並びに第十四条第六項第二号及び第三号の厚生労働省令並びに同条第七項の政令を定めようとするとき。

三 第八条の規定による改正後の食鳥処理の事業の規制及び食鳥検査に関する法律第十五条第四項第二号及び第三号並びに同条第六項の厚生労働省令を定めようとするとき。

4 厚生労働大臣は、附則第一条第五号に掲げる規定の施行の前においても、第三条の規定による改正後の食品衛生法第十一条第三項の規定により人の健康を損なうおそれのないことが明らかである物質及び人の健康を損なうおそれのない量を定めようとするときは、その趣旨、内容その他の必要な事項を公表し、広く国民の意見を求め、又は食品安全委員会若しくは薬事・食品衛生審議会の意見を聴くことができる。

（施行前の準備）

第十一条 新食品衛生法第三十三条第一項の規定による登録、新食品衛生法第二十五条第二項及び第二十六条第六項の規定による手数料の額の認可並びに新食品衛生法第三十七条第一項の規定による業務規程の認可並びに新食品衛生法第四十八条第六項第三号及び第四号の規定による登録並びに第八条の規定による改正後の食鳥処理の事業の規制及び食鳥検査に関する法律第十二条第五項第三号及び第四号の規定による登録の手続は、附則第一条第三号に掲げる規定の施行の前においても行うことができる。

（罰則に関する経過措置）

第十二条 この法律の施行前にした行為に対する罰則の適用については、なお従前の例による。

（政令への委任）

第十三条 この附則に規定するもののほか、この法律の施行に伴い必要な経過措置は、政令で定める。

（検討）

第十四条 政府は、この法律の施行後五年を経過した場合において、この法律の施行の状況を勘案し、必要があると認めるときは、この法律の規定について検討を加え、その結果に基づいて必要な措置を講ずるものとする。

附 則 （平成一九年六月二七日法律第九六号） 抄

（施行期日）

第一条 この法律は、公布の日から起算して六月を超えない範囲内において政令で定める日から施行する。

と畜場法施行令

（昭和二十八年八月二十五日政令第二百十六号）

最終改正：平成一五年一二月一〇日政令第五〇五号

内閣は、と畜場法（昭和二十八年法律第百十四号）第四条第一項、第九条第一項第五号、第十条第五項及び第十五条第三項の規定に基き、この政令を制定する。

（一般と畜場の構造設備の基準）

第一条 と畜場法（以下「法」という。）第五条第一項の規定による一般と畜場の構造設備の基準は、次のとおりとする。

- 一 係留所、生体検査所、処理室、冷却設備、検査室、消毒所、隔離所及び汚物処理設備並びに当該と畜場内において食肉（食用に供する内臓を含む。第五号において同じ。）の取引が行われ、かつ、都道府県知事（保健所を設置する市にあつては、市長。以下同じ。）が特に必要があると認めた場合には、取引室を有すること。
- 二 係留所には、生後一年以上の牛及び馬については一頭ごとに、その他の獣畜については適宜に、これを係留し、又は収容することができる区画が設けられており、かつ、その床は、不浸透性材料（石、コンクリートその他血液及び汚水が浸透しないものをいう。以下同じ。）で築造され、これに適当なこうばいと排水溝が設けられていること。
- 三 生体検査所は、次の要件を備えること。
 - イ 床は、不浸透性材料で築造されていること。
 - ロ 獣畜の計量及び保定に必要な設備が設けられていること。
 - ハ 法第十四条第一項の検査の事務に従事する者の手指及びその者が使用する器具の洗浄又は消毒に必要な設備が設けられていること。
- 四 処理室は、次の要件を備えること。
 - イ と室、病畜と室、内臓取扱室及び外皮取扱室に区画され、各室に、直接処理室外に通ずる出入口が設けられていること。
 - ロ 床は、不浸透性材料で築造され、これに適当なこうばいと排水溝が設けられていること。
 - ハ 内壁は、不浸透性材料で築造されている場合を除き、床面から少なくとも一・二メートルまで、不浸透性材料で腰張りされていること。
 - ニ 十分に換気及び採光のできる窓が設けられていること。
 - ホ 内臓検査台、内臓処理台、内臓運搬具、と肉懸ちよう器及び計量器が備えられていること。
 - ヘ 獣畜のとさつ又は解体を行う者及び法第十四条第二項又は第三項の検査の事務に従事する者の手指並びにこれらの者が使用する器具の洗浄又は消毒に必要な設備が設けられていること。
 - ト 洗浄又は消毒に必要な設備は、法第九条に規定する措置及び第八条第二項に規定する措置を講ずるために必要な数が適当な位置に設けられていること。
 - チ 洗浄又は消毒に必要な温湯を十分に供給することのできる給湯設備が設けられていること。
 - リ 飲用に適する水を十分に供給することのできる給水設備が設けられていること。
- 五 冷却設備は、食肉を十分に冷却することのできるものであること。
- 六 検査室には、検査台その他検査に必要な器具が備えられ、かつ、給水設備が設けられていること。
- 七 消毒所には、獣畜の部分等であつて、ウイルスを伝染させるおそれがあると認められるものの消毒に必要な設備が設けられ、かつ、その床は、不浸透性材料で築造されていること。
- 八 隔離所には、隔離された獣畜の汚物及び汚水を消毒することのできる設備が設けられており、かつ、その床は、不浸透性材料で築造されていること。
- 九 汚物処理設備は、次の要件を備えること。
 - イ 汚物だめ並びに血液及び汚水の処理設備を有すること。ただし、血液及び汚水を終末処理場のある下水道に直接流出させると畜場にあつては、血液及び汚水の処理設備を設けないことができる。
 - ロ 汚物だめは、処理室及び取引室から適当な距離を有し、かつ、不浸透性材料で築造され、適当な覆いが設けられていること。
 - ハ 血液及び汚水の処理設備は、処理室及び取引室から適当な距離を有し、かつ、血液及び汚水の浄化装置を有する

こと。

十 取引室は、次の要件を備えること。

イ 床は、不浸透性材料で築造され、これに適当なこうばいと排水溝が設けられていること。

ロ 内壁は、不浸透性材料で築造されている場合を除き、床面から少なくとも一・二メートルまで、不浸透性材料で腰張りされていること。

ハ 十分に換気及び採光のできる窓が設けられていること。

ニ と肉懸ちよう器及びハンガーレールが備えられていること。

ホ 飲用に適する水を十分に供給することのできる給水設備が設けられていること。

十一 その他都道府県（保健所を設置する市にあつては、市。以下同じ。）が条例で定める構造設備を有すること。

（簡易と畜場の構造設備の基準）

第二条 法第五条第一項の規定による簡易と畜場の構造設備の基準は、次のとおりとする。

一 処理室、検査所、消毒所及び汚物処理設備並びに生体検査及び隔離を行うために必要な敷地を有すること。

二 処理室は、次の要件を備えること。

イ 内臓及び外皮をそれぞれ各別に取り扱うことができるように、適当な区画が設けられていること。

ロ 床は、不浸透性材料で築造され、これに適当なこうばいと排水溝が設けられていること。

ハ 十分に換気及び採光のできる窓が設けられていること。

ニ 内臓検査台、と肉懸ちよう器及び計量器が備えられていること。

ホ 飲用に適する水を十分に供給することのできる給水設備が設けられていること。

三 検査所には、検査台及び給水設備が設けられていること。

四 消毒所には、消毒に必要な設備が設けられており、かつ、その床は、不浸透性材料で築造されていること。

五 汚物処理設備は、次の要件を備えること。

イ 汚物だめ並びに汚水だめ又は血液及び汚水の処理設備を有すること。ただし、血液及び汚水を終末処理場のある下水道に直接流出させると畜場にあつては、汚水だめ並びに血液及び汚水の処理設備を設けないことができる。

ロ 汚物だめ及び汚水だめは、処理室から適当な距離を有し、かつ、不浸透性材料で築造され、適当な覆いが設けられていること。

ハ 血液及び汚水の処理設備は、処理室から適当な距離を有し、かつ、血液及び汚水の浄化装置を有すること。

（作業衛生責任者について準用する法の規定の読替え）

第三条 法第十条第二項において作業衛生責任者について法第七条第二項から第六項までの規定及び法第八条の規定を準用する場合におけるこれらの規定に係る技術的読替えは、次の表のとおりとする。

読み替える法の規定 読み替えられる字句 読み替える字句

第七条第二項 と畜場の衛生管理に関して 獣畜のとさつ又は解体の衛生管理に関して

当該と畜場の衛生管理 当該と畜場の獣畜のとさつ又は解体

当該と畜場の構造設備を管理し、その他当該と畜場 その他当該と畜場の獣畜のとさつ又は解体

第七条第三項 と畜場の衛生管理に関して 獣畜のとさつ又は解体の衛生管理に関して

当該と畜場の衛生管理 当該と畜場の獣畜のとさつ又は解体の衛生管理

と畜場の設置者又は管理者 と畜業者等

第七条第四項 と畜場の設置者又は管理者 と畜業者等

第七条第五項第三号 と畜場の衛生管理 獣畜のとさつ又は解体

第七条第六項 と畜場の管理者 と畜業者等

第八条 と畜場の管理者 と畜業者等

第八条第二号 前条第二項 第十条第二項の規定により読み替えて準用する前条第二項

（と畜場以外の場所で獣畜をとさつすることができる場合）

第四条 法第十三条第一項第四号の規定により、と畜場以外の場所において、食用に供する目的で獣畜をとさつすることができるのは、次に掲げる場合とする。

一 災害その他の事故により、と畜場が滅失し、又はその設備がき損し、と畜場以外の場所においてとさつすることがやむを得ない場合

二 離島であるため、その他土地の状況により、と畜場以外の場所においてとさつすることがやむを得ない場合であつて、かつ、都道府県知事が指定した地域において、又は都道府県知事の許可を受けて獣畜をとさつする場合

（と畜場外への持出しの禁止の特例）

第五条 法第十四条第三項第二号の政令で定めるときは、次のとおりとする。

一 法第十条第三項第二号の厚生労働省令で定める疾病の有無についての同項本文に規定する検査（次号及び第三号において「解体後検査」という。）を行う場合において、都道府県知事の許可を得て皮革の原料として牛の皮を持ち出すとき。

二 解体後検査を行う場合において、都道府県知事の許可を得て牛の改良増殖（学術研究の用に供する場合を含む。）の目的のために牛の卵巣を持ち出すとき。

三 解体後検査を行う場合において、都道府県知事の許可を得て獣畜の肉、内臓、血液、骨又は皮（以下この号か

ら第五号までにおいて「獣畜の肉等」という。)の所有者又は管理者が焼却するために獣畜の肉等の全部又は一部を持ち出すとき。

四 食品衛生監視員が食品衛生法(昭和二十二年法律第二百三十三号)第二十八条第一項の規定により獣畜の肉等の一部を取去るとき。

五 家畜防疫官又は家畜防疫員が家畜伝染病予防法(昭和二十六年法律第六十六号)第五十一条第一項の規定により獣畜の肉等の一部を採取し、又は集取して持ち出すとき。

2 前項第一号から第三号までの許可の基準については、厚生労働省令で定める。

3 第一項第一号から第三号までの許可には、公衆衛生上必要な限度において条件を付することができる。

(都道府県知事及び厚生労働大臣によると畜検査)

第六条 法第十四条第五項の政令で定める疾病は、伝達性海綿状脳症のうち牛、めん羊及び山羊に係るものとする。

2 都道府県知事が法第十四条第五項の規定により行う事務は、次のとおりとする。

一 前項に規定する疾病の有無についての法第十四条第一項及び第二項(同条第四項において準用する場合を含む。)の規定による検査

二 前項に規定する疾病のうち厚生労働省令で定めるものの有無についての法第十四条第三項(同条第四項において準用する場合を含む。次項において同じ。)の規定による検査のうち、確認検査(疾病にかかっていることを確認するために高度な方法により行う検査をいう。以下同じ。)を実施する必要があるものを発見するために簡易な方法により行う検査

3 厚生労働大臣が法第十四条第五項の規定により行う事務は、第一項に規定する疾病の有無についての法第十四条第三項の規定による検査(前項第二号の厚生労働省令で定める疾病の有無についての検査にあつては、確認検査に限る。)とする。

4 前二項の規定にかかわらず、確認検査(当該確認検査の結果の判断に係る部分を除く。以下この項において同じ。)を適確に実施するに足りる技術的能力を有すると厚生労働大臣が認める都道府県においては、前項の規定により厚生労働大臣が行うこととされている確認検査を都道府県知事が行うことができる。

(検査の申請)

第七条 法第十四条の規定による検査を受けようとする者は、厚生労働省令で定める事項を記載した申請書を都道府県知事に提出しなければならない。

(検査の方法)

第八条 法第十四条の規定による検査は、望診、検温、触診、解剖検査、顕微鏡検査その他の必要な方法により行うものとする。

2 前項の検査の事務に従事する者は、清潔な器具を用い、必要に応じ、手指、器具等の洗浄又は消毒を行い、その他公衆衛生上必要な措置を講じなければならない。

(検印)

第九条 都道府県知事は、法第十四条第三項の規定による検査を行ったとき(同条第五項の規定により都道府県知事及び厚生労働大臣が検査を行ったときを含む。)は、厚生労働省令で定めるところにより、検査に合格した肉、内臓及び皮に検印を押さなければならない。

(と畜検査員の資格)

第十条 法第十九条第一項に規定すると畜検査員は、獣医師でなければならない。

附 則 抄

(施行期日)

1 この政令は、公布の日から施行する。

(屠畜取締の費用負担に関する件の廃止)

2 屠畜取締の費用負担に関する件(明治三十九年勅令第百七十二号)は、廃止する。

附 則 (昭和四五年六月一〇日政令第一七六号)

この政令は、公布の日から施行する。

附 則 (昭和四六年六月一七日政令第一八八号) 抄

(施行期日)

1 この政令は、昭和四十六年六月二十四日から施行する。

附 則 (昭和五九年三月一六日政令第三二号) 抄

- 1 この政令は、昭和五十九年四月一日から施行する。
- 2 この政令の施行の際現に改正前のと畜場法施行令（以下「旧令」という。）第一条に規定する構造設備の基準に適合している一般と畜場であつて、その所在地が保健所を設置する市にあるものについては、昭和六十年三月三十一日までは、改正後のと畜場法施行令（以下「新令」という。）第一条の規定は、適用しない。この場合において、旧令第一条の規定は、なおその効力を有する。
- 3 この政令の施行前に旧令第三条第二号の規定により都道府県知事がした許可（当該許可に係る場所が保健所を設置する市にある場合に限る。）は、新令第三条第二号の規定により保健所を設置する市の長がした許可とみなす。

附 則 （昭和六〇年七月一二日政令第二二五号） 抄

- 1 この政令は、公布の日から施行する。

附 則 （平成九年一一月一二日政令第三二六号）

（施行期日）

- 1 この政令は、平成十年四月一日から施行する。ただし、第一条第四号ホ及び第二条第二号ニの改正規定は、公布の日から施行する。

（経過措置）

- 2 この政令の施行の際現に改正前の第一条に規定する構造設備の基準に適合している一般と畜場であつて、牛又は馬のとさつ又は解体を行うものについては平成十二年三月三十一日まで、豚、めん羊又は山羊のとさつ又は解体を行うものについては平成十四年三月三十一日までは、改正後の第一条の規定は、適用しない。この場合において、改正前の第一条の規定は、なおその効力を有する。

附 則 （平成一二年六月七日政令第三〇九号） 抄

（施行期日）

- 1 この政令は、内閣法の一部を改正する法律（平成十一年法律第八十八号）の施行の日（平成十三年一月六日）から施行する。

附 則 （平成一四年一一月七日政令第三二九号） 抄

（施行期日）

第一条 この政令は、平成十五年四月一日から施行する。

（罰則に関する経過措置）

第三条 この政令の施行前にした行為に対する罰則の適用については、なお従前の例による。

附 則 （平成一五年五月三〇日政令第二三七号）

この政令は、公布の日から施行する。

附 則 （平成一五年八月一日政令第三五〇号） 抄

（施行期日）

第一条 この政令は、食品衛生法等の一部を改正する法律の施行の日（平成十五年八月二十九日）から施行する。

附 則 （平成一五年一二月一〇日政令第五〇五号） 抄

（施行期日）

第一条 この政令は、食品衛生法等の一部を改正する法律（以下「改正法」という。）附則第一条第三号に掲げる規定の施行の日（平成十六年二月二十七日）から施行する。

と畜場法施行規則

（昭和二十八年九月二十八日厚生省令第四十四号）

最終改正：平成二一年三月二五日厚生労働省令第四四号

と畜場法（昭和二十八年法律第百十四号）第三条第二項 及び第三項、第九条第一項第一号並びにと畜場法施行令（昭和二十八年政令第二百十六号）第四条、第五条及び第六条の規定に基き、並びに同法を実施するため、と畜場

法施行規則を次のように定める。

(と畜場設置の申請書の記載事項)

第一条 と畜場法(昭和二十八年法律第百十四号。以下「法」という。)第四条第二項の規定により申請書に記載すべき事項は、同条同項に規定する事項のほか、次のとおりとする。

- 一 申請者の住所、氏名及び生年月日(法人にあつては、その名称、主たる事務所の所在地、代表者の氏名及び定款又は寄附行為の写)
- 二 と畜場の名称及び所在地
- 三 一般と畜場、簡易と畜場の区別
- 四 処理する獣畜の種類及びその一日当りの頭数
- 五 当該と畜場において食肉の取引を行おうとする場合は、その概要
- 2 前項の申請書には、当該と畜場の管理及び業務運営の概要を記載した業務規定又はこれに準ずる事項を記載した書類を添附しなければならない。

(と畜場の変更についての届出事項)

第二条 法第四条第三項の規定により届け出るべき事項は、同条同項に規定する事項のほか、前条第一項各号(第三号を除く。)に掲げる事項及び同条第二項の添附書類に記載した事項のうち主な事項とする。

(と畜場の衛生管理)

第三条 法第六条の厚生労働省令で定める基準は、次のとおりとする。

- 一 清掃を適切に行い、衛生上支障のないように管理すること。
- 二 整理整頓を行い、不必要な物品等を置かないこと。
- 三 床、内壁、天井、窓又は扉等に破損又は故障等があるときは、速やかに補修又は修理を行うこと。
- 四 汚臭及び過度の湿気を除くよう十分に換気すること。
- 五 採光又は照明装置により必要な照度を確保すること。
- 六 換気設備を設置している場合は、当該設備の維持管理を適切に行うこと。
- 七 給水設備等の衛生管理は、次に掲げるところにより行うこと。
- イ 水道法(昭和三十二年法律第百七十七号)に規定する水道事業及び専用水道により供給される水以外の水を使用する場合は、一年に一回以上(災害等により水源等が汚染され、水質が変化しおそれがある場合は、その都度)水質検査を行い、その結果を証する書類を検査の日から一年間保存すること。また、その結果、飲用不適となつたときは、直ちに都道府県知事(保健所を設置する市にあつては、市長。以下同じ。)の指示を受け、適切な措置を講じること。
- ロ 消毒装置又は浄水装置を設置している場合は、当該装置が正常に作動していることを毎日確認すること。この場合において、確認した日、確認の結果、確認した者その他必要な記録を確認の日から一年間保存すること。
- ハ 貯水槽を使用する場合は、定期的に点検及び清掃を行うこと。
- 八 冷蔵設備を設置している場合は、枝肉(獣畜をとさつした後、頭部、前後肢及び尾を切断し、第七条第五号、第六号及び第七号の処理を行つた物をいう。以下同じ。)又は食用に供する内臓が摂氏十度以下となるよう当該設備の維持管理を適切に行うこと。この場合において、冷蔵設備内の温度の測定は、作業開始前に一回、及び作業時間内に一回以上行い、測定した日時、温度、測定者その他必要な記録を測定の日から一年間保存すること。
- 九 法第十四条第三項の検査で保留された枝肉は、その他の枝肉と区別して衛生的に管理すること。
- 十 係留所及び生体検査所の衛生管理は、次に掲げるところにより行うこと。
- イ 適宜、獣畜のふん便等を適切に処理し、洗浄すること。
- ロ 体表に多量のふん便等が付着している獣畜は、洗浄すること。
- 十一 外皮取扱室は、清潔を保持すること。
- 十二 汚物だめ並びに血液及び汚水の処理設備を設置している場合は、当該設備の維持管理を適切に行うこと。また、当該施設から生じる汚泥等は、衛生上支障のないように処理すること。この場合において、処理を行つた日、処理方法、処理を行つた者その他必要な記録を処理の日から一年間保存すること。
- 十三 排水溝は、固形物の流出を防ぎ、かつ、排水がよく行われるように清掃し、破損した場合は速やかに補修すること。
- 十四 と畜場内の洗浄消毒は、次に掲げるところにより行うこと。
- イ 血液又は脂肪等が付着している部分の洗浄は、温湯を使用すること。
- ロ 作業終了後の洗浄は、洗浄剤を使用すること。
- ハ イ及びロ以外の洗浄は、十分な量の水、温湯又は洗浄剤を使用すること。
- ニ 消毒は、摂氏八十度以上の温湯又は消毒剤を使用すること。
- 十五 機械器具の衛生管理は、次に掲げるところにより行うこと。
- イ 機械器具は、作業終了後洗浄し、又は消毒すること。
- ロ 獣畜のとさつ又は解体に使用するナイフ、動力付はく皮ナイフ、のこぎり、結さつ器その他のとたい(獣畜をとさつした物であつて、枝肉以外のものをいう。以下同じ。)又は枝肉に直接接触する機械器具の消毒は、摂氏八十度以上の温湯を使用すること。
- ハ 機械器具及び分解したこれらの部品は、それぞれ所定の場所に衛生的に保管すること。

- ニ 機械器具は、定期的に点検し、故障又は破損等があるときは、速やかに修理又は補修を行い、常時適正に使用できるよう整備すること。
- ホ 温度計、圧力計及び流量計等の計器類は定期的にその精度を点検し、故障又は異常等があるときは、速やかに修理等を行うこと。
- 十六 不可食部分等の衛生管理は、次に掲げるところにより行うこと。
 - イ 不可食部分（別表第一に掲げる部分を除く。）、第十六条第三号の規定により廃棄された物、同条第四号の規定により廃棄された物、別表第一に掲げる部分及びその他の廃棄物は、その種別を表示した専用容器に収納し、処理室外に搬出し、及び焼却炉で焼却すること等により衛生上支障のないように処理すること。この場合において、同条第四号の規定により廃棄された物及び別表第一に掲げる部分の処理については、処理を行つた日、処理の方法、処理を行つた者その他必要な記録を処理の日から一年間保存すること。
 - ロ イの容器は、作業終了後所定の場所において洗浄消毒すること。
- 十七 ねずみ、昆虫等の防除は、次に掲げるところにより行うこと。
 - イ 防そ・防虫設備のない窓及び出入口を開放状態で放置しないこと。
 - ロ 防そ・防虫網その他の防そ・防虫設備の機能を点検し、必要に応じ、補修等を行うこと。
- ハ 処理室内に搬入される容器等による昆虫等の侵入を防ぐよう荷受け時に点検し、不用となつた容器等は速やかに処理室外に搬出し、及び焼却炉で焼却すること等により衛生上支障のないように処理すること。
- ニ 定期的に駆除作業を行うこと。この場合において、駆除を行つた日、駆除の方法、駆除を行つた者その他必要な記録を駆除を行つた日から一年間保存すること。
- 十八 手洗い設備には、手洗いに必要な洗浄消毒液を備え、常時使用できるようにすること。
- 十九 便所は、清潔に保ち、定期的に消毒を行うこと。
- 二十 清掃用器材は、所定の場所に保管すること。
- 二十一 洗浄剤及び消毒剤並びに殺そ剤及び殺虫剤その他の薬剤の取扱いは、次に掲げるところにより行うこと。
 - イ 処理室及び枝肉等を保管する場所以外の所定の場所に保管すること。
 - ロ 目的に応じた薬剤を適正な方法により使用すること。
 - ハ 薬剤によるといふ並びに枝肉及び食用に供する内臓の汚染を防止すること。
- ニ 洗浄剤及び消毒剤等の容器を新たに開封した場合にあつては、開封した日、開封した薬剤の名称、開封した者その他必要な記録を開封の日から一年間保存すること。
- ホ 殺そ剤及び殺虫剤等を使用した場合にあつては、使用日、使用した薬剤の名称、使用量、使用者その他必要な記録を使用の日から一年間保存すること。
- 二十二 前各号の措置が適切に実施されるよう次に掲げるところにより管理すること。
 - イ 適正かつ計画的に実施するため必要な事項を記載した文書を作成すること。
 - ロ 法第七条第一項の衛生管理責任者（以下「衛生管理責任者」という。）に、イの文書に基づき適切に実施されていることを確認させること。ただし、同項の規定によりと畜場の管理者又は設置者が衛生管理責任者となつていないと畜場にあつては、自ら確認の業務を行うこと。
- 2 衛生管理責任者は、前項第二十二号ロの確認の結果をと畜場の設置者又は管理者に対して報告すること。ただし、法第七条第一項の規定によりと畜場の管理者又は設置者が衛生管理責任者となつていない場合は、この限りでない。
- 3 別表第一に掲げる部分についての第一項第十六号イの適用については、同号イ中「焼却炉で焼却すること等」とあるのは、「牛海綿状脳症対策特別措置法（平成十四年法律第七十号）第七条第二項ただし書に該当する場合を除き、焼却炉で焼却すること」とする。

（衛生管理責任者の資格要件）

第四条 法第七条第五項第三号に規定する学校教育法（昭和二十二年法律第二十六号）第五十七条に規定する者と同等以上の学力があると認められる者は、次のとおりとする。

- 一 旧国民学校令（昭和十六年勅令第四百四十八号）による国民学校の高等科を修了した者
- 二 旧中等学校令（昭和十八年勅令第三十六号）による中等学校の二年の課程を終わった者
- 三 旧師範教育令（昭和十八年勅令第九十九号）による附属中学校又は附属高等女学校の第二学年を修了した者
- 四 旧盲学校及聾啞学校令（大正十二年勅令第三百七十五号）によるろうあ学校の中等部第二学年を修了した者
- 五 旧高等学校令（大正七年勅令第三百八十九号）による高等学校尋常科の第二学年を修了した者
- 六 旧青年学校令（昭和十四年勅令第二百五十四号）による青年学校の普通科の課程を修了した者
- 七 内地以外の地域における学校の生徒、児童、卒業者等の他の学校へ入学及び転学に関する規程（昭和十八年文部省令第六十三号）第一条から第三条まで及び第七条の規定により国民学校の高等科を修了した者、中等学校の二年の課程を終わった者又は第五号に掲げる者との同一の取扱いを受ける者
- 八 旧海員養成所官制（昭和十四年勅令第四百五十八号）による海員養成所を卒業した者
- 九 前各号に掲げる者のほか、厚生労働大臣が衛生管理責任者の資格に関し学校教育法第五十七条に規定する者と同等以上の学力を有すると認定した者

（衛生管理責任者に関する届出事項）

第五条 法第七条第六項の厚生労働省令で定める事項は、次のとおりとする。

- 一 届出者の氏名又は名称及び住所並びに法人にあつては、その代表者の氏名

- 二 と畜場の名称及び所在地
 - 三 衛生管理責任者の氏名、住所及び生年月日
 - 四 衛生管理責任者が法第七条第五項各号のいずれかに該当する旨
 - 五 衛生管理責任者を置いた年月日又は変更した年月日
- 2 前項の届出には、衛生管理責任者が法第七条第五項各号のいずれかに該当することを証する書面を添えなければならない。

(衛生管理責任者の講習会の課程)

第六条 法第七条第七項の厚生労働省令で定める講習会の課程は、次に掲げる要件のすべてに適合するものでなければならない。

- 一 別表第二の上欄に掲げる科目を同表の下欄に掲げる時間数教授し、講習会を三日間以上開催するものであること。
- 二 講師は、学校教育法に基づく大学において別表第二の上欄に掲げる科目に相当する学科を担当している者、国若しくは都道府県、保健所を設置する市若しくは特別区において食品衛生行政若しくは食品衛生に関する試験業務に従事している者又はこれらの者と同等の知識及び経験を有すると認められる者であること。
- 三 学校教育法に基づく中学校若しくはこれに準ずる学校を卒業した者若しくは中等教育学校の前期課程を修了した者又は第四条各号に掲げる者で、と畜場の衛生管理の業務に三年以上従事した者であることを受講資格とするものであること。
- 四 受講者に対し、講習会の終了に当たり試験その他の方法により課程修了の認定を適切に行うものであること。

(と畜業者等の講ずべき衛生措置)

第七条 法第九条の厚生労働省令で定める基準は、次のとおりとする。

- 一 処理室においては、獣畜の血液及び消化管の内容物等を適切に処理し、当該処理室を洗浄すること。この場合において、洗浄水の飛散によるといふ並びに枝肉及び食用に供する内臓の汚染を防ぐこと。
- 二 獣畜のとさつ又は解体に当たり手袋を使用する場合は、獣畜に直接接触する部分が繊維製品その他洗浄消毒することが困難な製品でないものを使用すること。
- 三 牛、めん羊及び山羊のとさつに当たつては、ピッシング（ワイヤーその他これに類する器具を用いて脳及びせき髄を破壊することをいう。）を行わないこと。
- 四 放血等は、次に掲げるところにより行うこと。
 - イ 放血された血液による生体及びほかのとたいの汚染を防ぐこと。
 - ロ 牛、めん羊及び山羊にあつては、放血後において消化管の内容物が漏出しないよう食道を第一胃の近くで結さつし、又は閉そくさせること。
 - ハ 手指（手袋を使用する場合にあつては、当該手袋。以下この項において同じ。）が放血された血液等により汚染された場合は、その都度洗浄剤を用いて洗浄すること。
 - ニ とたいに直接接触するナイフ、結さつ器その他の機械器具については、一頭を処理するごとに（外皮に接触すること等により汚染された場合は、その都度。以下次号及び第五号において同じ。）摂氏八十三度以上の温湯を用いて洗浄消毒すること。
- 五 頭部の処理を行う場合においては、次に掲げるところにより行うこと。
 - イ 角は、切断部の付近に外皮が残ることによる汚染を防ぐため、外皮と共に除去すること。
 - ロ はく皮された頭部は、外皮並びに床及び内壁等に接触することによる汚染を防ぐこと。
 - ハ はく皮された頭部の洗浄に当たつては、洗浄水の飛散によるほかのとたいの汚染を防ぐこと。
 - ニ 手指が外皮等により汚染された場合は、その都度洗浄剤を用いて洗浄すること。
 - ホ とたいに直接接触するナイフ、のこぎりその他の機械器具については、一頭を処理するごとに摂氏八十三度以上の温湯を用いて洗浄消毒すること。
- 六 とたいのはく皮は、次に掲げるところにより行うこと。
 - イ 獣毛等による汚染を防ぐため、必要な最少限度の切開をした後、ナイフを消毒し、ナイフの刃を手前に向け、皮を内側から外側に切開すること。
 - ロ はく皮された部分は、外皮による汚染を防ぐこと。
 - ハ はく皮された部分が外皮により汚染された場合においては、汚染された部位を完全に切り取ること。
 - ニ 牛、めん羊及び山羊の肛門周囲の処理に当たつては、消化管の内容物が漏出しないよう直腸を肛門の近くで結さつするとともに、肛門部によるとたいの汚染を防ぐこと。
 - ホ はく皮された部分が消化管の内容物により汚染された場合においては、迅速に他の部位への汚染を防ぐとともに、汚染された部位を完全に切り取ること。
 - ヘ 手指が外皮等により汚染された場合は、その都度洗浄剤を用いて洗浄すること。
 - ト とたいに直接接触するナイフ、動力付はく皮ナイフ、結さつ器その他の機械器具については、一頭を処理するごとに摂氏八十三度以上の温湯を用いて洗浄消毒すること。
- 七 乳房を切除する場合においては、次に掲げるところにより行うこと。
 - イ 乳房の内容物が漏出しないよう行うこと。
 - ロ はく皮された部分が乳房の内容物により汚染された場合においては、迅速に他の部位への汚染を防ぐとともに、汚染された部位を完全に切り取ること。

- ハ 手指が乳房の内容物等により汚染された場合は、その都度洗浄剤を用いて洗浄すること。
- ニ とたいに直接接触するナイフその他の機械器具については、一頭を処理するごとに（乳房の内容物等に汚染された場合は、その都度）摂氏八十三度以上の温湯を用いて洗浄消毒すること。
- ハ 内臓の摘出は、次に掲げるところにより行うこと。
- イ とたいが消化管の内容物により汚染されないよう適切に行うこと。
- ロ 内臓が床及び内壁並びに長靴等に接触することによる汚染を防ぐこと。
- ハ はく皮された部分が消化管の内容物により汚染された場合においては、迅速に他の部位への汚染を防ぐとともに、汚染された部位を完全に切り取ること。
- ニ 手指が消化管の内容物等により汚染された場合は、その都度洗浄剤を用いて洗浄すること。
- ホ とたいに直接接触するナイフ、のこぎりその他の機械器具については、一頭を処理するごとに（消化管の内容物等に汚染された場合は、その都度）摂氏八十三度以上の温湯を用いて洗浄消毒すること。
- 九 背割り（枝肉を脊柱に沿って左右に切断する処理をいう。）は、次に掲げるところにより行うこと。
- イ 枝肉が床若しくは内壁、長靴又は昇降台等に接触することによる汚染を防ぐこと。
- ロ 使用するのこぎりについては、一頭を処理するごとに摂氏八十三度以上の温湯を用いて洗浄消毒すること。
- 十 枝肉の洗浄は、次に掲げるところにより行うこと。
- イ 洗浄の前に獣毛又は消化管の内容物等による汚染の有無を確認し、これらによる汚染があつた場合は、汚染された部位を完全に切り取ること。
- ロ 十分な水量を用いて行うこと。
- ハ 洗浄水の飛散による枝肉の汚染を防ぐこと。
- ニ 洗浄水の水切りを十分に行うこと。
- 十一 枝肉及び食用に供する内臓は、床及び内壁等に接触しないよう取り扱うこと。
- 十二 内臓の処理は、次に掲げるところにより行うこと。
- イ 消化管は、消化管の内容物によるその他の臓器の汚染を防ぐよう区分して処理すること。
- ロ 食用に供する内臓が床及び内壁等に接触することによる汚染を防ぐこと。
- ハ 消化管の処理に当たっては、消化管の内容物による汚染を防ぐよう消化管の内容物を除去するとともに、当該消化管を十分に洗浄すること。
- ニ 内臓処理台等が消化管の内容物により汚染された場合は、その都度洗浄消毒すること。
- 十三 枝肉又は食用に供する内臓は、摂氏十度以下となるよう冷却すること。
- 十四 法第十四条第三項の検査で保留された枝肉は、ほかの枝肉と区別して保管すること。
- 十五 外皮は、枝肉又は食用に供する内臓に接触しないよう保管すること。
- 十六 別表第一に掲げる部分は、当該部分による枝肉及び食用に供する内臓の汚染を防ぐよう処理すること。
- 2 と畜業者等は、前項各号の措置が適切に実施されるよう、次の各号に掲げるところにより管理すること。
 - 一 適正かつ計画的に実施するため必要な事項を記載した文書を作成すること。
 - 二 法第十条第一項の作業衛生責任者（以下「作業衛生責任者」という。）に、前号の文書に基づき適切に実施されていることを確認させること。ただし、同項の規定によりと畜業者等が自ら作業衛生責任者となつていると畜場にあつては、自ら確認の業務を行うこと。
- 3 作業衛生責任者（法第十条第一項の規定によりと畜業者が自ら作業衛生責任者となつていると畜場にあつては、と畜業者等）は、獣畜のとさつ又は解体を行う者に対して、獣畜の衛生的なとさつ又は解体の方法についての教育に努めなければならない。

（作業衛生責任者への準用）

第八条 第四条から第六条までの規定は、作業衛生責任者について準用する。この場合において、第五条第一項第四号及び同条第二項中「法第七条第五項各号」とあるのは、「法第十条第二項の規定により読み替えて準用される法第七条第五項各号」と読み替えるものとする。

（食肉を取り扱う営業の範囲）

第九条 法第十三条第一項第一号に規定する食肉を取り扱う営業は、同号に規定するもののほか、次に掲げるとおりとする。

- 一 食肉処理業
- 二 食肉製品製造業
- 三 飲食店営業
- 四 そうざい製造業

（自家用とさつの届出）

第十条 法第十三条第一項第一号の規定による届出は、次の事項について行わなければならない。

- 一 届出者の住所、氏名、生年月日及び職業
- 二 とさつしようとする年月日時
- 三 とさつしようとする場所及びその周囲の概要
- 四 とさつしようとする獣畜の種類、性別、年齢（不明のときは、推定年齢）、特徴及び重量
- 五 食用に供しようとする者の範囲

六 自己及び同居者以外の者の食用に供しようとするときは、その旨及び量

(法第十四条第三項第二号に規定する疾病)

第十一条 法第十四条第三項第二号の厚生労働省令で定める疾病は、伝達性海綿状脳症のうち牛に係るものとする。

(と畜場外への持出しの許可の基準)

第十二条 と畜場法施行令(昭和二十八年政令第二百十六号。以下「令」という。)第五条第一項第一号の許可の基準は、次のとおりとする。

一 解体後検査(令第五条第一項第一号に規定する「解体後検査」をいう。以下同じ。)が終了するまでの間、持ち出された牛の皮がいずれの牛から得られたものであるかを識別するための措置が適切に講じられていること。
二 解体後検査が終了するまでの間、持ち出された牛の皮の紛失を防止するための措置が適切に講じられていること。
三 持ち出された牛の皮の保存(塩蔵により行うものを含む。以下この項において同じ。)を行う施設が、化製場等に関する法律(昭和三十二年法律第四十号)第一条第二項に規定する化製場又は同法第八条に規定する獣畜の皮の貯蔵の施設であつて、解体後検査が終了するまでの間、当該牛の皮を適切に保存しておくことができるものであること。

四 牛の皮が持ち出されると畜場の管理者(と畜場の管理者がいないと畜場にあつては、と畜場の設置者。以下この条において同じ。)により、当該牛の皮を持ち出した者の氏名又は名称及び連絡先、当該牛の皮の保存を行う施設の名称及び連絡先その他管理体制の確保のため必要な情報を適切に記録するための措置が講じられていること。

五 持ち出された牛の皮の保存を行う施設において、当該牛の皮を持ち出した者の氏名又は名称及び連絡先、当該牛の皮が持ち出されると畜場の名称及び連絡先その他管理体制の確保のため必要な情報を適切に記録するための措置が講じられていること。

2 令第五条第一項第二号の許可の基準は、次のとおりとする。

一 解体後検査が終了するまでの間、持ち出された牛の卵巣がいずれの牛から得られたものであるかを識別するための措置が適切に講じられていること。

二 解体後検査が終了するまでの間、持ち出された牛の卵巣の紛失を防止するための措置が適切に講じられていること。

三 持ち出された牛の卵巣の保存を行う施設が、家畜改良増殖法(昭和二十五年法律第二百九号)に規定する家畜人工授精所、独立行政法人家畜改良センター又は牛の改良増殖に係る研究を行う機関であつて、解体後検査が終了するまでの間、当該牛の卵巣を適切に保存しておくことができるものであること。

四 牛の卵巣が持ち出されると畜場の管理者により、当該牛の卵巣を持ち出した者の氏名又は名称及び連絡先、当該牛の卵巣の保存を行う施設の名称及び連絡先その他管理体制の確保のため必要な情報を適切に記録するための措置が講じられていること。

五 持ち出された牛の卵巣の保存を行う施設において、当該牛の卵巣を持ち出した者の氏名又は名称及び連絡先、当該牛の卵巣が持ち出されると畜場の名称及び連絡先その他管理体制の確保のため必要な情報を適切に記録するための措置が講じられていること。

3 令第五条第一項第三号の許可の基準は、次のとおりとする。

一 獣畜の肉等(令第五条第一項第三号に規定する「獣畜の肉等」をいう。以下同じ。)の焼却を行う施設が、廃棄物の処理及び清掃に関する法律(昭和四十五年法律第三十七号)の規定に基づき獣畜の肉等の焼却を適切に行うことができる施設であること。

二 獣畜の肉等が持ち出されると畜場の管理者により、当該獣畜の肉等を持ち出した者の氏名又は名称及び連絡先、当該獣畜の肉等の焼却を行う施設の名称及び連絡先その他管理体制の確保のため必要な情報を適切に記録するための措置が講じられていること。

三 獣畜の肉等が持ち出されると畜場の管理者により、当該獣畜の肉等が焼却されたことについて、これを証明する書類を添えて都道府県知事に報告する体制が整備されていること。

(都道府県知事が簡易な検査を実施する疾病)

第十三条 令第六条第二項第二号の厚生労働省令で定める疾病は、伝達性海綿状脳症のうち牛、めん羊及び山羊に係るものとする。

(検査すべき疾病又は異常の範囲)

第十四条 法第十四条第六項第二号又は第三号に規定する疾病又は異常は、別表第三のとおりとする。

(検査申請書の記載事項)

第十五条 令第七条の規定により申請書に記載すべき事項は、次のとおりとする。

一 申請者の住所、氏名及び生年月日(法人にあつては、その名称、主たる事務所の所在地及び代表者の氏名)

二 とさつしようとする年月日(法第十三条第一項第二号又は第三号の規定によりとさつした獣畜を解体しようとする場合にあつては、解体しようとする年月日)

三 検査を受けようとする獣畜の種類、性別、品種、年令(不明のときは、推定年令)、特徴及び産地

四 検査を受けようとする獣畜の病歴に関する情報

- 五 検査を受けようとする獣畜に係る動物用医薬品その他これに類するものの使用の状況
- 六 法第十三条第一項第二号又は第三号の規定によりとさつした獣畜を解体しようとする場合に於ては、当該獣畜をと畜場以外の場所でとさつした理由、日時及び場所
- 2 令第七条の申請書が、法第十三条第一項第三号の規定によりとさつした獣畜を解体しようとする場合における法第十四条第二項及び第三項の規定による検査に係るものであるときは、次の各号に掲げる事項を記載した死亡診断書又は死体検案書を当該申請書に添えなければならない。
- 一 診断又は検案の年月日時
 - 二 死亡年月日時（不明のときは、推定年月日時）
 - 三 獣畜の種類、性別、年齢（不明のときは、推定年齢）及び特徴
 - 四 病名及び主要症状（死体検案書に於ては、主要症状にかえて死体の状態）
 - 五 診断又は検案した獣医師の住所及び氏名

（検査の結果に基づく措置）

- 第十六条 法第十六条の規定に基づく措置は、次の各号に掲げる場合に於て、当該各号に掲げる措置によるものとする。
- 一 法第十四条第一項の規定による検査を行なつた場合において獣畜が別表第四に掲げる疾病にかかり、又は異常があると認めるとき とさつの禁止
 - 二 法第十四条第二項の規定による検査を行なつた場合において獣畜が別表第四に掲げる疾病にかかり、又は異常があると認めるとき 解体の禁止
 - 三 法第十四条第三項の規定による検査を行なつた場合において獣畜が別表第五の上欄に掲げる疾病にかかり、又は異常があると認めるとき
別表第五の下欄に掲げる部分について廃棄その他食用に供されることを防止するために必要な措置
 - 四 獣畜が法第十四条第六項各号に掲げる疾病のうち伝染性の疾病にかかり、又は異常があり、病気を伝染させるおそれがあると認めるとき 当該獣畜の隔離、当該獣畜の肉、内臓その他の部分の消毒、病気に汚染され又は汚染されたおそれのある処理室その他の場所又は物件の消毒その他病気の伝染を防止するために必要な措置

（検印）

- 第十七条 令第九条の規定により検印を押す場合は、別表第六により、獣畜の種類に於て、様式第一号の検印を押さなければならない。

（と畜検査員の証票）

- 第十八条 法第十七条第二項の規定により、当該職員が携帯しなければならない証票は、様式第二号によるものとする。

附 則

（施行期日）

- 1 この省令は、公布の日から施行する。

（屠場法施行規則等の廃止）

- 2 屠場法施行規則（明治三十九年内務省令第十六号）及び屠場ノ構造設備標準（明治三十九年内務省令第十七号）は、廃止する。

附 則 （昭和四二年一〇月二日厚生省令第四四号） 抄

（施行期日）

- 1 この省令は、公布の日から施行する。

附 則 （昭和四七年四月一七日厚生省令第一二号）

この省令は、昭和四十七年七月一日から施行する。ただし、第五条に一項を加える改正規定は、同年十月一日から施行する。

附 則 （昭和四八年一二月八日厚生省令第五四号）

この省令は、昭和四十八年十二月十日から施行する。

附 則 （昭和五九年三月二日厚生省令第一四号） 抄

- 1 この省令は、昭和五十九年四月一日から施行する。

- 2 と畜場法施行令（昭和二十八年政令第二百十六号）第六条に規定する検印の様式については、昭和五十九年九月三十日までは、なお従前の例によることができる。

- 3 この省令の施行の際現にと畜検査員が携帯する証票は、この省令による改正後の様式による証票とみなす。

附 則 （昭和五九年一二月一九日厚生省令第五八号）

この省令は、昭和六十年二月一日から施行する。

附 則 （平成元年三月二四日厚生省令第一〇号） 抄

- 1 この省令は、公布の日から施行する。
- 2 この省令の施行の際この省令による改正前の様式（以下「旧様式」という。）により使用されている書類は、この省令による改正後の様式によるものとみなす。
- 3 この省令の施行の際現にある旧様式による用紙及び板については、当分の間、これを取り繕って使用することができる。
- 4 この省令による改正後の省令の規定にかかわらず、この省令により改正された規定であって改正後の様式により記載することが適当でないものについては、当分の間、なお従前の例による。

附 則 （平成八年四月二六日厚生省令第二八号）

この省令は、平成八年四月二十七日から施行する。

附 則 （平成八年一二月二五日厚生省令第七三号）

- 1 この省令は、平成九年四月一日から施行する。
- 2 改正後の第二条の二第一項第二十二号及び第二項並びに第二条の三第一項第三号ロ、第二項及び第三項の規定は、平成十年三月三十一日までは、適用しない。
- 3 改正後の第二条の二第一項第十四号イ及びニ並びに第十五号ロ並びに第二条の三第一項第二号、第三号ハ及びニ、第四号イ、ニ及びホ、第五号ヘ及びト、第六号ハ及びニ、第七号ニ及びホ並びに第八号ロの規定（牛及び馬のとさつ又は解体を行う場合に限る。）は、平成十二年三月三十一日までは、適用しない。
- 4 改正後の第二条の二第一項第十四号イ及びニ並びに第十五号ロ並びに第二条の三第一項第二号、第三号イ、ハ及びニ、第四号イ、ニ及びホ、第五号ヘ及びト、第六号ハ及びニ、第七号ニ及びホ並びに第八号ロの規定（豚、めん羊及び山羊のとさつ又は解体を行う場合に限る。）並びに同条第十二号（豚、めん羊及び山羊の枝肉に係る部分に限る。）の規定は、平成十四年三月三十一日までは、適用しない。

附 則 （平成一〇年七月六日厚生省令第六八号）

この省令は、公布の日から施行する。

附 則 （平成一三年一〇月一七日厚生労働省令第二〇九号）

（施行期日）

- 1 この省令は、平成十三年十月十八日から施行する。

（経過措置）

- 2 この省令の施行の日から一年を経過する日までの間における別表第一の規定の適用については、同表中「頭部（舌及び頬肉を除く。）」とあるのは、「脳、眼」とする。

附 則 （平成一四年七月一日厚生労働省令第八九号） 抄

（施行期日）

第一条 この省令は、法の施行の日（平成十四年七月四日）から施行する。

附 則 （平成一五年五月三〇日厚生労働省令第九九号）

この省令は、公布の日から施行する。

附 則 （平成一五年八月二九日厚生労働省令第一三三号） 抄

（施行期日）

第一条 この省令は、食品衛生法等の一部を改正する法律（以下「改正法」という。）の施行の日（平成十五年八月二十九日）から施行する。

附 則 （平成一六年二月六日厚生労働省令第一二号） 抄

（施行期日）

第一条 この省令は、食品衛生法等の一部を改正する法律（以下「改正法」という。）附則第一条第三号に掲げる規定の施行の日（平成十六年二月二十七日）から施行する。

附 則 （平成一七年七月一日厚生労働省令第一一一号）

この省令は、平成十七年十月一日から施行する。

附 則 （平成一九年一二月二五日厚生労働省令第一五二号）

この省令は、平成十九年十二月二十六日から施行する。

附 則 （平成二一年三月二五日厚生労働省令第四四号）

この省令は、平成二十一年四月一日から施行する。

別表第一 （第三条、第七条関係）

牛の頭部（舌及び頬肉を除く。）、せき髄及び回腸（盲腸との接続部分から二メートルまでの部分に限る。）並びにめん羊及び山羊の扁桃、脾臓、小腸及び大腸（これらに付随するリンパ節を含む。）並びにめん羊及び山羊（月齢が満十二月以上のものに限る。）の頭部（舌、頬肉及び扁桃を除く。）、せき髄及び胎盤

別表第二 （第六条関係）

科目	時間数
公衆衛生概論	四時間以上
と畜関係法令	四時間以上
家畜解剖・生理学	二時間以上
家畜内科・病理学	六時間以上
食肉衛生学	六時間以上
関連法令	二時間以上

別表第三 （第十四条、第十六条関係）

Q熱、悪性水腫、白血病、リステリア症、痘病、膿毒症、敗血症、尿毒症、黄疸、水腫、腫瘍、旋毛虫病その他の寄生虫病、中毒諸症、放線菌病、ブドウ菌腫、熱性諸症、外傷、炎症、変性、萎縮、奇形、臓器の異常な形、大きさ、硬さ、色又はにおい、注射反応（生物学的製剤により著しい反応を呈しているものに限る。）及び潤滑油又は炎性産物等による汚染

別表第四 （第十六条関係）

牛疫、牛肺疫、口蹄疫、流行性脳炎、狂犬病、水胞性口炎、リフトバレー熱、炭疽、出血性敗血症、ブルセラ病、結核病、ヨーネ病、ピロプラズマ病、アナプラズマ病、伝達性海綿状脳症、鼻疽、馬伝染性貧血、アフリカ馬疫、豚コレラ、アフリカ豚コレラ、豚水胞病、ブルータンク、アカバネ病、悪性カタル熱、チュウザン病、ランピースキン病、牛ウイルス性下痢・粘膜病、牛伝染性鼻気管炎、牛白血病、アイノウイルス感染症、イバラキ病、牛丘疹性口炎、牛流行熱、類鼻疽、破傷風、気腫疽、レプトスピラ症、サルモネラ症、牛カンピロバクター症、トリパノソーマ病、トリコモナス病、ネオスポラ症、牛バエ幼虫症、ニバウイルス感染症、馬インフルエンザ、馬ウイルス性動脈炎、馬鼻肺炎、馬モルビリウイルス肺炎、馬痘、野兎病、馬伝染性子宮炎、馬パラチフス、仮性皮疽、小反芻疫、伝染性膿疱性皮膚炎、ナイロビ羊病、羊痘、マエディ・ビスナ、伝染性無乳症、流行性羊流産、トキシプラズマ病、疥癬、山羊痘、山羊関節炎・脳脊髄炎、山羊伝染性胸膜肺炎、オーエスキー病、伝染性胃腸炎、豚エンテロウイルス性脳脊髄炎、豚繁殖・呼吸障害症候群、豚水疱疹、豚流行性下痢、萎縮性鼻炎、豚丹毒、豚赤痢、Q熱、悪性水腫、白血病、リステリア症、痘病、膿毒症、敗血症、尿毒症、黄疸（高度のものに限る。）、水腫（高度のものに限る。）、腫瘍（肉、臓器、骨又はリンパ節に多数発生しているものに限る。）、旋毛虫病、有鉤囊虫症、無鉤囊虫症（全身にまん延しているものに限る。）、中毒諸症（人体に有害のおそれがあるものに限る。）、熱性諸症（著しい高熱を呈しているものに限る。）、注射反応（生物学的製剤により著しい反応を呈しているものに限る。）及び潤滑油又は炎性産物等による汚染（全身が汚染されたものに限る。）

別表第五 （第十六条関係）

疾病又は異常	部分
別表第四に掲げる疾病	当該獣畜の肉、内臓その他の部分の全部
黄疸（病変が肉又は臓器の一部に局限されているものに限る。）	当該病変部分及び血液
水腫（病変が肉又は臓器の一部に局限されているものに限る。）	当該病変部分及び血液
腫瘍（病変が肉、臓器、骨又はリンパ節の一部に局限されているものに限る。）	当該病変部分及び血液
寄生虫病（旋毛虫病、有鉤囊虫症及び無鉤囊虫症（全身にまん延しているものに限る。）を除く。）	寄生虫を分離できない部分及び住肉胞子虫症にあつては血液
放線菌病	当該病変部分及び血液

ブドウ菌腫	当該病変部分及び血液
外傷	当該病変部分
炎症	当該病変部分及び炎性産物により汚染された部分並びに多発生化膿性の炎症にあつては血液
変性	当該病変部分
萎縮	当該病変部分
奇形	著しい当該病変部分
臓器の異常な形、大きさ、硬さ、色又はにおい（臓器の一部に局限されているものに限る。）	当該異常部分に係る臓器
潤滑油又は炎性産物等による汚染（全身が汚染されたものを除く。）	当該汚染部分に係る肉、臓器、骨及び皮

別表第六 （第十七条関係）

獣畜の種類	検印を押さなければならない部分
牛、馬、めん羊及び山羊	(肉) 背 (外部) (内臓) 心臓、肺臓、肝臓、胃又は腸のうちいずれかの部位 (皮) 尾根 (内側)。ただし、食用に供しないことが明らかな場合は、押すことを要しない。
豚	(肉) 背 (外部)。ただし、湯はぎ法により処理した場合は、当該部位の皮に押すこと。 (内臓) 心臓、肺臓、肝臓、胃又は腸のうちいずれかの部位 (皮) 尾根 (内側)。ただし、湯はぎ法により処理した場合又は食用に供しないことが明らかな場合は、押すことを要しない。

様式第一号 （第十七条関係）

様式第二号 （第十八条関係）

「電子政府の総合窓口 エイーガブ」より
<http://law.e-gov.go.jp/cgi-bin/idxsearch.cgi>

本技術レポートから転載・複製を行う場合は、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所の許可を得て下さい。

技術レポート 9号
牛における核移植胚作出と胚の品質評価のための
マニュアル

発行日 2011年3月11日

発行 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構

畜産草地研究所

<http://nilgs.naro.affrc.go.jp/>

〒305-0901 茨城県つくば市池の台2

Tel 029-838-8600 (代表)

編集 渡邊伸也

