

平成10年度
厚生科学研究費補助金事業
研究報告書

ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業
実験動物の胚・精子の保存方法及びそれらの品質保証
技術開発等に関する研究 (H10-ゲノム-036)

国立感染症研究所
浅野敏彦

厚生科学研究費補助金(ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業)
総括研究報告書

実験動物の胚・精子の保存方法及びそれらの品質保証技術開発等に関する研究

主任研究者 浅野敏彦 国立感染症研究所動物管理室 室長

研究要旨 本研究の目的は厚生行政に寄与するための厚生科学研究に利用される実験動物有効利用の為に実験動物胚・配偶子の凍結保存、保存される胚・配偶子の品質保証の為に技術開発を行うことにある。すでに大略の技術開発がなされているマウス・ラットにあっては、効率の向上を目的とし、マウス・ラット以外の動物種(マストミスとスナネズミ)にあっては、胚凍結保存のための基礎研究をおこなった。また、遺伝子改変動物においては、改変された遺伝子保存のために精子凍結保存技術の開発を行った。一方、これら凍結保存された胚・配偶子の品質保証技術に関しては、保存胚の取り違い事故、あるいは汚染動物からの胚採取や胚採取時の汚染事故の可能性を考慮し、高感度で簡便なモニタリング技術の開発に努めた。

分担研究者 小倉淳郎 国立感染症研究所獣医科学部 主任研究官、松田潤一郎 国立感染症研究所獣医科学部 主任研究官、葛西孫三郎 高知大学農学部 教授、横山峯介 三菱化学生命科学研究所 室長、笠井憲雪 東北大学医学部 教授、勝木元也 東京大学医科学研究所 教授、中瀧直巳 熊本大学動物資源開発研究センター 教授、松崎哲也 国立精神神経センター 神経研究所 室長、加藤秀樹 浜松医科大学医学部 助教授、山田靖子 国立感染症研究所動物管理室 主任研究官

A. 研究目的 研究資源特に実験動物の活用と有効利用を目的とした胚バンクの設立に向けて、実験動物胚及び精子の採取・凍結保存・貯蔵・融解・移植技術の開発・改良、並びに胚・精子の品質保証をするための微生物学および遺伝学的モニタリング方法の開発・改良を目的とする。

米国のジャックソン研究所をはじめとして、幾つかの研究機関では実験動物の保存方法として、胚を凍結し液体窒素中に保存する方法をすでに活用している。しかしながら、凍結胚を融解移植するには胚を凍結した条件により異なる方法を用いる必要がある。また、現在胚凍結保存が実用的なレベルに達しているのはマウスのみであり、他の有用な実験動物の保存は依然として、生きた動物を繁殖することによっている。近年、莫大な系統が作出されている遺伝子導入動物、あるいはいわゆるノックアウト動物に関しても、これら変異動物の作出に成功し研究に利用した後系統を淘汰するのではなく、保存し有効利用を図ることは大切である。また、これら変異動物の変異した形質のみを保存するので

あれば、精子を保存することでその目的を果たすことが出来る。

実験動物の微生物学的、遺伝学的モニタリング技術はすでに実用の域に達しており、ほぼすべての実験動物施設ではこれらのモニタリング成績をもとに施設への導入の可否を決定している。しかしながら、胚や精子では現在適用されているモニタリング技術を応用することは出来ない。より高感度な技術が必要とされる。

以上のようなことから、マウス・ラットにおいては、凍結保存技術の改良、精子保存方法の開発、体外受精技術の開発を目的とした。マウス・ラット以外の実験動物としては、ゴールデンハムスター、スナネズミ、マストミスを用い、体外培養方法の開発、胚凍結方法の開発、胚移植方法の開発を目的とした。胚の遺伝学的モニタリングに関しては、個体に戻すことなく、胚そのものでモニタリングする方法の開発を目的とした。微生物学的モニタリングに関しては、マウス肝炎ウイルス(MHV)を用いて、ごく微量の材料からMHV遺伝子検出方法の開発を目的とした。さらには将来胚バンクが設立された場合に備えて、疾患モデルマウス胚の凍結保存を昨年度に引き続き継続した。

B. 研究方法

1. おおよそ技術は完成しているが、実用化に向けての技術改良と開発に関する研究(マウス・ラットがこれに相当する)

①超急速凍結保存法の開発：昨年度に報告した方法でマウス胚を超急速凍結した。得られた凍結胚の有用性を検討するために、ES細胞とのキメラマウスを作成しノックアウトマウスの作出を試みた。ES細胞の相同組換えは定法に従い行

った。キメラマウスの作出は集合キメラマウスと注入キメラマウスの二つの方法で行った。

②マウス精子の凍結保存法の検討：精巣上体尾部精子を採取し、耐凍剤を含む保存液に入れ、液体窒素中に保存した。保存精子は融解後生存率を調べ、体外受精、体外培養、胚移植を行い産仔までの発育率を調べた。また、凍結保存精子の融解後の体外培養並びに個体への発生についてのマウス系統差を調べた。

③ラット体外受精の検討：PMSG+hCG処理による過排卵誘起を行い、未受精卵を採取した。一方、精子は精巣上体尾部より採取し、受精能獲得を行った後体外受精に供した。

④卵巣移植法の検討：繁殖成績がきわめて悪い膜性糸球体腎炎モデルマウス(ICGN)の卵巣をICRマウスの卵巣嚢内に移植し、妊娠率・産仔数を検討した。

2. 胚凍結保存技術が開発されていない動物種における技術開発

①マストミス：PMSG+hCG処理により過排卵誘起を行い、未受精卵を採取した。一方、円形精子細胞は精細管よりピペッティングにより回収し、電気融合法あるいは注入法により顕微受精を行った。卵子の活性化は電気刺激とSrCl₂の併用であった。顕微受精の後、体外培養並びに超急速凍結保存に供した。また一部の受精卵を雌マストミスに移植した。

②スナネズミ：受精卵はPMSG+hCG処理雌スナネズミを雄と交配させ、陰栓を確認した雌から採取した。得た受精卵の一部を超急速凍結保存した。胚移植は精管結紮した雄と交配した雌スナネズミに得られた受精卵を移植した。体外受精に関しては、精巣上体尾部より採取した精子の受精能を透明体除去ハムスター卵子と媒精することにより調べた。

3. マウス胚の凍結保存：国立精神・神経センターで維持している疾患モデルマウスの胚凍結保存を昨年度に引き続き行った。また、熊本大学動物資源開発研究センターでも遺伝子改変動物胚の凍結保存を行った。

4. 品質保証に関する研究

①遺伝学的モニタリングに関する研究：2細胞期、8細胞期、桑実胚期の胚をそれぞれ1、5、10個ずつを実験に供した。マイクロサテライト5種類を選別し、プライマーを用いて定法によりPCRを行った。PCRプロダクトはアガロースゲル電気泳動により検出した。

②微生物学的モニタリングに関する研究：MHV汚染が認められたマウスを胚移植により清浄化した。その際、卵管・卵巣および糞便よりRT-

nested PCR法を用いてMHV遺伝子の検出を試みた。

C.D.結果と考察

胚凍結保存は実験動物の系統保存にきわめて有効であることは今更議論するまでもないであろう。しかしながら、この技術が普及するには、簡便で効率よい技術が必要とされる。この研究班ではマウス胚の凍結保存に関しては、超急速凍結保存法が胚バンクで適用する保存法としては適していることを明らかにしてきた。今回、超急速凍結保存した凍結胚とES細胞とでキメラマウスを作り、ノックアウトマウスの作出を試みたところ未凍結胚を用いた成績と何ら遜色のない成績が得られた。このことは実験動物の系統保存以外にも凍結胚を利用できる可能性が示唆された。キメラマウスの作出に集合キメラ法と注入キメラ法の二種類を用いたが、いずれの方法ともにキメラマウスが得られ、生殖系列への遺伝子の伝達が確認された。(横山)

精子の保存は、遺伝子改変動物において改変した遺伝子を保存するといった点で意味がある。現在数多くの遺伝子改変動物が作出されており、これらの動物を用いた研究が終了した時点で、動物を淘汰するのではなく何らかの方法で保存しておくことはきわめて有意義であり、その保存方法に精子保存がある。家畜においては精子の保存は実用化されているにも関わらず、実験動物においては胚凍結技術の発展と比べるとかなり遅れている。体外受精技術や胚移植技術はすでに実用化の段階に入っているが、精子の場合は耐凍剤を含む保存液の検討が必要である。今回、単糖類、二糖類、三糖類を蒸留水で希釈した保存液を用いて精子を凍結保存し、その後融解し体外受精を行い、さらに胚移植した。単糖類では生存精子はいなかったが、二糖類では12%、三糖類では18%の濃度で高い生存率が得られ、体外受精すると高率に受精し、移植後には産仔にまで発育することが出来た。このことは、マウス精子の凍結保存液では、浸透圧が重要で、細胞非透過性の糖類を含む0.40 Osmol程度の浸透圧の溶液が適していることを示唆している(葛西)。凍結保存した精子の体外受精、個体への発生について系統差を検討したところ、C57BL/6Jで明らかな受精率の低下が観察された。受精後の発生成績には大きな差は認められなかった。卵子透明帯に穴を開けて受精させたところ、受精率の改善が認められたことから、C57BL/6J精子は凍結保存過程において精子が透明帯を通過する能力に損傷を受けていることが示唆された。C57BL/6Jは遺伝子改変動物に多く使われており、本系統の凍結保存法の再検討が必要であろう(勝木)。

ラットの卵子や精子はマウスに比較して弱く、また受精能獲得の時間が長いため長時間の培養が必要となる。さらに体外受精法はマウスと比べて効率が悪い。しかしながら、ラットでの遺伝子改変動物作成やモデルラットの胚保存には、体外受精は必須の技術である。過排卵誘起では平均22個の卵が採取されたが、体外受精による受精率は平均31%であった。しかしながら、群によるばらつきが大きく、安定した成績とは言い難い。今後安定した受精と受精率の向上が必要である（笠井）。

マストミスはアフリカ産の小型齧歯類であり、ラッサ熱のキャリアーとして報告されている。昨年度までで体外培養、胚凍結保存、胚移植の方法は確立されたが、胚を採取する方法が確立されていない。通常体外受精は受け付けられないし、精子注入法も実用的ではない。そこで円形精子細胞を用いた顕微受精を試みた。ピエゾマニピュレーターを用いた細胞質内注入法で約90%の受精率を得た。73%が生存しそのすべてが2細胞期へ発生した。その一部を培養した結果80時間後には15%が胚盤胞へ発生した。残りの胚を超急速凍結保存した。融解後マストミス卵管へ移植したが、産仔は得られなかった。マストミス円形精子細胞を用いることで、体外で良好な発生をする胚を得られた。今後例数を増やして、発生率の向上と凍結保存法の開発を行う予定である（小倉）。

スナネズミ胚を採取後、レシピエントスナネズミに移植したところ半数以上が妊娠し、移植した総胚数の48%および11%が個体へと発育した。2細胞期胚を超急速凍結保存後融解した。100%正常であり、培養により23%が桑実胚へ達した。また、融解胚を移植したところ、2%~15%の移植胚が新生仔へと発育した（松田）。

マウス胚の凍結保存：国立精神・神経センター神経研究所において新たにダウン症モデルマウス、Fabry病モデル、腎系球体不全マウスの胚凍結保存を行い、計20系統から5,501個の2細胞期胚が保存された（松崎）。一方、熊本大学動物資源開発研究センターにおいては、25系統約10,000個の胚を保存した（中潟）。

胚バンクにおいては、胚・配偶子の取り違い事故などが起こることが予想される。個体へ還元すると遺伝学的なモニタリング技術を確立することは胚バンクにおいては最も必要な技術である。一個のマイクロサテライトマーカーを検出する最少胚数は2細胞期胚では10個、8細胞期胚では5個、桑実期胚では1個でプロダクトが検出できた。しかしながら、系統の識別に必要な5種類のマーカーを検出するには、桑実期胚で少なくとも5個を必要とすることが判った。

さらに改良して必要胚数を少なくする必要がある（加藤）。

胚が何らかの感染症に汚染されていた場合、実験動物管理区に汚染が拡大することは明らかである。現在、子宮内での汚染が判っている病原体にマイコプラズマがある。また、胚採取の際の事故により胚が汚染する可能性は0ではない。従って、個体に戻す前に微生物学的なモニターを行う技術の開発は遺伝学的モニタリングと同様に必要な技術である。個体のモニタリングのように抗体検査を行うことは胚の場合不可能であり、病原体そのものを検出する必要がある。受精卵移植によりMHV汚染を除去する際のPCRの有用性を確かめた。汚染コロニーより胚を採取した。胚を採取した雌マウスの卵管、卵巣ではMHV遺伝子は検出されなかった。また、里親と新生仔からもMHV遺伝子は陰性であった。今後、胚そのものからMHV遺伝子を検出する方法の確立を目指す。そしてさらに可能性の高い病原体について検討を行う予定である（山田）。

E. 結論

厚生科学研究に利用される実験動物の保存あるいは分譲に、マウス胚を超急速凍結法により凍結保存することが有用であることが判った。一方、精子の凍結保存においては凍結保護材として二糖類あるいは三糖類を用いることが有効であることが判ったが、マウスの系統により精子に何らかの傷害を与えていることが示唆された。ラットにおいては、マウスほどの成績は得られていない。安定した効率のよい方法の開発が急務である。マストミスやスナネズミのように、新たに開発された実験動物種では胚採取、凍結・融解、体外培養、移植の各ステージにおいて解決しなければならない問題が多く困難を極めたが、マストミスでは円形精子細胞を卵に注入する方法で受精卵を得ることに成功し、この受精卵が正常に発育することを確かめた。またスナネズミにあつては、受精卵を移植することで産仔を得ることに成功したが、この受精卵を凍結し融解後移植した場合は産仔を得ることが出来なかった。保存胚の品質保証は、保存中の事故等による取り違いあるいは汚染の予防のためにも確立しておく必要がある。遺伝学的な保証に関しては、マウス系統を識別するのに必要な5つのサテライトマーカーを検出するには桑実期胚5個が必要であることが判った。今後さらに感度を上げて、1/2個の胚で検出できれば残りの1/2個は保存胚として貯蔵出来る。一方、微生物学的な保証に関しては、個体でモニターするように抗体検査を行うわけには行かない。病原体そのものあるいは病原体遺伝子の検出が求められる。今回R T-nested PCR法を用いること

でその可能性が示唆された。

F. 研究発表

1.論文発表

- 1) Sugihara,K., Nakatsuji,N., Nakamura,K., Nakao,K., Hashimoto,R., Otani,H., Sakagami,H., Kondo,H., Nozawa,S., Aiba,A. and Katsuki,M.
Rac1 is required for the fomation of three germ layers during gastrulation. (1998)*Oncogene* 17 3427-3433
- 2) Kimura,M., Sato,M., Akatsuka,A., Saito,S., Ando,K., Yokoyama,M. and and Katsuki,M.
Overexpression of a minor component of myelin basic protein isoform (17.2kDa) can restore myelogenesis in transgenic shiverer mice.(1998)
Brain Res 785 245-252
- 3) Nakao,K., Nakagata,K. and Katsuki,M.
Production of chimeric mice from cryopreserved blastocysts.(1998)*J Exp Anim* 47 167-171
- 4) T. Mukaida, S. Wada, K. Takahashi, P.B. Pedro, T.Z. An, and M. Kasai, Vitriification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell embryos. *Hum. Reprod.*, 13, 2874-2879 (1998).
- 5) T.Z. An, S. Wada, K. Edashige, T. Sakurai, and M. Kasai, Viable spermatozoa can be recovered from refrigerated mice up to 7 days after death.*Cryobiology*, 38, in press (1999).
- 6) T.Z. An, K. Ikegami, K. Edashige, T. Sakurai, and M. Kasai, Freeze preservation of spermatozoa recovered from male mice that had been refrigerated after death. *J. Reprod. Dev.*, 45, in press (1999).
- 7) K. Edashige, A. Asano, T.Z. An, and M. Kasai, Restoration of resistance to osmotic swelling of vitrified mouse embryos by short-term culture. *Cryobiology*, in press (1999)
- 8) M.Okamoto, N.Nakagata, O.Ueda, N.Kamada N.Kamada and H.Suzuki: Cryopreservation of gene disrupted mouse spermatozoa. *J.Mamma. Ova Res.* 15 : 77 - 80, 1998
- 9) 中瀧直己：マウス胚および配偶子の凍結保存とその応用：実験動物ニュース、47：131-138, 1998
- 10) 中瀧直己：マウスにおける生殖工学技術九州実験動物学会雑誌、14：3-7, 1998
- 11) Matsuzaki T., Saito M., Sakai A., Matsumoto T., Ganzorig S., and Maeda Y.
Rearing of plateau pika(*Ochotonadaurica*) captured in Mongolia. *Exp. Anim.* 47(3), 203-206, 1998.
- 12) Takimoto, K., Nakayama, K., Yabe, M., Ami, Y., Yamada, Y. K., Tamura, S., Suzuki, Y., Asano, T., and Saito, M. (1998) : Contamination of mouse-adapted influenza virus with sendai virus. *Exp. Animl.*, 47, 137-140.
- 13) Yamada, Y. K., Takimoto, K., Yabe, M., and Taguchi, F. (1998) : Requirement of proteolytic cleavage of the murine coronavirus MHV-2 spike protein for fusion activity. *Coronaviruses and Arteriviruses*, Edited by L. Enjuanes, S. G. Siddell and W. Spaan, pp. 89-93, Plenum Press, New York.
- 14) Ohtsuka, N., Yamada, Y. K., and Taguchi, F. (1998) : Differential receptor-functionality of the two distinct receptor proteins for mouse hepatitis virus. *Coronaviruses and Arteriviruses*, Edited by L. Enjuanes, S. G. Siddell and W. Spaan, pp. 77-80, Plenum Press, New York.
- 15) Yamada, Y. K., Yabe, M., Takimoto, K., Nakayama, K., and Saitoh, M. (1998): Application of nested polymerase chain reaction to detection of mouse hepatitis virus in fecal specimens during a natural outbreak in an immunodeficient mouse colony. *Exp. Anim.*, 47, 261-264.
- 16) Rothman, A. L., Yamada, Y., Jameson, J., Cruz, J., West, K., Green, S., and Ennis, F. A. (1998): Assessment of human CD4+ and CD8+ T lymphocyte responses in experimental viral vaccine studies. *Preclinical and Clinical Development of New Vaccines*, Edited by S. Plotkin, F. Brown and F. Horaud, vol 95, pp. 95-104, *Developments in Biological Stadardization*, Basel, Karger.
- 17) Ogura, A., Inoue, K., and Matsuda, J. Spermatic nuclei can support full term development after premature chromosome condensation within mature oocytes. *Hum. Reprod.*, (in press) 1999.
- 18) Usui, N., Ogura, A., and Yanagimachi, R. Morphological modifications in hamster spermatogenic cell nuclei incorporated into homologous oocytes by electrofusion. *Mol. Reprod. Dev.*, 23:66-73, 1999.
- 19) Ogura, A. and Yanagimachi, R. Microinsemination using spermatogenic cells in mammals. In: *Male Sterility for Motility Disorders.*, edited by Hamamah, S. Heidelberg, Germany:Springer-Verlag, 1998, (in press).
- 20) Ogura, A. Fertilizing ability of spermatogenic cells in mammals. In: *Reproductive Biology Update*, edited by Miyamoto, H. and Manabe, N. Kyoto, Japan:Shoukadoh Booksellers, 1998, p.199-205.
- 21) Mochida, K., Matsuda, J., Noguchi, Y., Yamamoto, Y., Nakayama, K., Takano, K., Suzuki, O., and Ogura, A. Birth of pups by transfer of mastomys embryos cryopreserved by vitrification.. *Biol. Reprod.*, 58: Abs.348, 1998.
- 22) Ogura, A., Suzuki, O., Tanemura, K., Mochida, K., Kobayashi, Y., and Matsuda, J. Development of normal mice from metaphase I

oocytes fertilized with primary spermatocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 5611-5615, 1998.

23) 加藤秀樹 マウス、ラットの遺伝子地図、アニテックス、Vol. 10 (2): 67-74

2. 学会発表

1) 中尾和貴、中瀧直己、勝木元也

凍結透明帯除去8細胞期胚とES細胞との集合キメラの作成

第45回日本実験動物学会総会、松本 (1998、5/28-30)

2) Aiba, A., Manabe, T., Ichise, T., Yamada, A. and Katsuki, M.

Regulation of synaptic plasticity by H-Ras.

第21回日本分子生物学会、横浜 (1998、12/16-19)

3) 杉原一廣、中辻憲夫、中村健司、中尾和貴、橋本龍樹、大谷浩、坂上洋行、近藤尚武、野澤志郎、饗場篤、勝木元也

Rac1欠損による原始線条体形成不全

第21回日本分子生物学会、横浜 (1998、12/16-19)

4) 砂原昭一、中村健司、中尾和貴、権藤洋一、勝木元也

インプリンティング遺伝子 U2afbp-rs の欠損マウスの解析

第21回日本分子生物学会、横浜 (1998、12/16-19)

5) 市瀬広武、山田篤、中尾和貴、中村健司、饗場篤、勝木元也

ras 群遺伝子の機能重複

第21回日本分子生物学会、横浜 (1998、12/16-19)

6) 砂原昭一、中村健司、中尾和貴、権藤洋一、勝木元也

インプリンティング遺伝子 U2afbp-rs の欠損マウスの解析

第21回日本分子生物学会、横浜 (1998、12/16-19)

7) 市瀬多恵子、狩野方伸、橋本浩一、柳原大、中尾和貴、重本隆一、勝木元也、饗場篤

小脳長期抑圧の運動学習における役割

第21回日本分子生物学会、横浜 (1998、12/16-19)

8) M. Kasai, : Vitrification of embryos in various mammalian species, International Workshop on Comparative Gamete and Embryo Cryopreservation, Atlanta, USA, 1998.3.

9) 葛西孫三郎, : 卵子および胚の凍結保存, 第17回日本アンドロロジー学会 シンポジウム 配偶子凍結保存技術の進展, 1998.7.

10) 安鉄洙・岩切通公・枝重圭祐・桜井孝

志・葛西孫三郎, : 凍結保存したマウス精子の生存性に及ぼす諸要因, 第91回日本繁殖生物学会, 1998.8.

6) T.Z. An, S. Wada, K. Edashige, T. Sakurai, M. Kasai, Viability of spermatozoa collected from male mouse carcasses kept at various temperatures, Theriogenology 51, 161 (1999)

7) 中瀧直己、中尾和貴、勝木元也

ドライアイスによる凍結マウス精子の輸送方法の検討

第45回日本実験動物学会、1998

8) 中尾和貴、中瀧直己、勝木元也

凍結透明帯除去8細胞期胚とES細胞との集合キメラの作成

第45回日本実験動物学会、1998

9) 中瀧直己

実験動物・野生動物精子の凍結保存

日本アンドロロジー学会第17回学術大会、1998

10) 中瀧直己

マウス精子の凍結保存

大阪大学蛋白質研究所セミナー、1998

11) 松崎哲也、田谷順子. : 実験動物としての開発: ナキウサギの繁殖生理. 「ナキウサギの生理学的特性 高地・寒冷適応モデル動物としての実験動物化をめざして」 第76回日本生理学会大会 (長崎). 平成11年3月30日.

12) 渋谷誠二、若山吉弘、鬼本宏明、江袋進、斎藤宗雄、松崎哲也. : 筋ジストロフィーハムスター心筋微細構造の比較検討 (第2報) 第39回日本神経学会総会 (京都). 平成10年5月20日.

13) 中江良子、Peter J. Stoward、松崎 哲也. : Localization of succinate and lactate dehydrogenase activities in mdxskeletal muscle fibres. 第40回歯科基礎医学会総会 (名古屋) 平成10年10月18日.

14) 松崎哲也、松崎香苗、早坂久美、三好敏保. : スンクス(Suncus murinus) の人工受精の試み. 第30回成長談話会 (伊勢崎) 平成10年11月1日

15) 笠井憲雪

第32回日本実験動物技術者協会総会 (1998年)

16) 笠井憲雪

平成10年度日本実験動物技術者協会東北支部総会

17) 山田靖子、矢部美機子: マウス肝炎ウイルス流行株の性状及び構成蛋白の遺伝子解析. 第45回日本実験動物学会、平成10年5月、松本.

18) 山田靖子、矢部美機子、田口文広: マウスコロナウイルスS蛋白のアミノ酸置換による

病原性の変化について。第 46 回日本ウイルス学会、平成 10 年 10 月、東京。

19) 持田慶司、松田潤一郎、山本美江、野口洋子、黒沢重利、小倉淳郎：マストミス胚の移植とガラス化法による凍結保存

第 45 回日本実験動物学会、1998 年 5 月、大宮。

20) Mochida, K., Wakayama, T., Nakayama, K., Takano, K., Noguchi, Y., Yamamoto, Y., Suzuki, O., Ogura, A. and Matsuda, J.:

Successful cryopreservation of Mongolian gerbil embryos by vitrification.

International Embryo Transfer Society

Annual Meeting. 1999 年 1 月、ケベックシティ、カナダ。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

1998年度
分担研究報告書

小動物の受精卵・胚・精子の保存方法及びモニタリング技術開発等に関する研究

分担研究者 小倉 淳郎 国立予防衛生研究所獣医科学部 主任研究官

研究要旨 マストミス胚を体外で効率的に構築するために、円形精子細胞による顕微授精を試みた。すべての受精卵が分割し、15% が胚盤胞へ発達した。これにより、安定してマストミス胚を供給できる体制が確立した。

本研究は、マストミス(Praomys coucha)およびゴールデンハムスター (Mesocricetus auratus)の胚および配偶子の保存維持に関する基盤技術の整備及び確立を目的としたものである。今年度は主に、マストミスについて研究を進め、一定の成果を得たので報告する。

A. 研究目的

マストミス (Praomys coucha) は、アフリカ産の小型齧歯類である。すでに我々は、マストミスのSPF化、過排卵処理、体外胚培養、胚凍結保存、胚移植の技術を確認した。しかし、この動物は、過排卵後の体内および体外での受精率が低く、発生学実験に用いるための胚を多く得る方法がないのが欠点である。当初、卵細胞質内精子注入法 (ICSI) を試みたが、精子頭部が大きいため卵子へのダメージが大きく、実用的でなかった。そこで今回、円形精子細胞を用いた顕微授精を試みた。

B. 研究方法

実験には、8-16週齢雌および12-40週齢雄を使用した。過排卵処理は、常法通り、PMSG - hCG を48時間間隔で各 10 IU 腹腔内投与した。hCG後15-18時間で成熟卵子を採取し、卵丘細胞を除去後、実験に用いた。卵子および胚の培養液には、CZB 液を用いた。精細胞は既報のとおり精細管よりピペッティングにより回

収した。マストミス円形精子細胞は、直径 13-15 mmとマウスのものよりもやや大型であった。電気融合法を用いた場合の受精率 (≒融合率) は40-60%、ピエゾマイクロマニピュレーターを用いた細胞質内注入法の場合の受精率 (≒生存率) は約90%であり、以後の実験は細胞質内注入法を用いた。マストミス円形精子細胞は、マウスのもと同様、卵子活性化能を持たないため、人為的活性化が必要であった。活性化のための最適条件 (ほぼすべての卵子が2時間以内に前核期に発生) は、電気刺激(2500 V/cm、10 μsec、300 mM mannitol + 1.7 mM Ca²⁺液中) と SrCl₂ (10 mM、Ca²⁺-free CZB中、45分)の併用であった。活性化処理45分後 (Telophase II) に円形精子細胞を119個の卵子へ注入した。87個 (73%) が生存し、そのすべて (100%) が2細胞期へ発生した。27個をそのまま37°C 5% CO₂ 条件下で培養した結果、活性化処理80時間後に4個 (15%) が胚盤胞へ発生した。2細胞期胚48個は、そのままあるいはEFS液によるガラス化保存融解後に妊娠1日目の雌マストミス4匹の卵管へ移植したが、産子は得られなかった (1匹は妊娠継続せず)。以上のように、円形精子細胞を用いることにより、体外で良好な発生をするマストミス受精卵を得られることが明らかになった。今後、胚移植数を増やし、受精卵の

正常性を検討する予定である。

F. 研究発表

- 1) Ogura, A., Inoue, K., and Matsuda, J. Spermatid nuclei can support full term development after premature chromosome condensation within mature oocytes. *Hum. Reprod.*, (in press) 1999.
- 2) Usui, N., Ogura, A., and Yanagimachi, R. Morphological modifications in hamster spermatogenic cell nuclei incorporated into homologous oocytes by electrofusion. *Mol. Reprod. Dev.*, 23: 66-73, 1999.
- 3) Ogura, A. and Yanagimachi, R. Microinsemination using spermatogenic cells in mammals. In: *Male Sterility for Motility Disorders.*, edited by Hamamah, S. Heidelberg, Germany:Springer-Verlag, 1998, (in press).
- 4) Ogura, A. Fertilizing ability of spermatogenic cells in mammals. In: *Reproductive Biology Update*, edited by Miyamoto, H. and Manabe, N. Kyoto, Japan:Shoukadoh Booksellers, 1998, p. 199-205.
- 5) Mochida, K., Matsuda, J., Noguchi, Y., Yamamoto, Y., Nakayama, K., Takano, K., Suzuki, O., and Ogura, A. Birth of pups by transfer of mastomys embryos cryopreserved by vitrification.. *Biol. Reprod.*, 58: Abs.348, 1998.
- 6) Ogura, A., Suzuki, O., Tanemura, K., Mochida, K., Kobayashi, Y., and Matsuda, J. Development of normal mice from metaphase I oocytes fertilized with primary spermatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 5611-5615, 1998.

2. 学会発表

マストミス胚の移植とガラス化法による凍結保存：持田慶司、松田潤一郎、山本美江、野口洋子、黒沢重利、小倉淳郎。第45回日本実験動物学会、1998年5月、大宮。

1998 年度
分担研究報告書

スナネズミ胚等の凍結保存技術の開発

分担研究者 松田潤一郎 国立感染症研究所獣医科学部 主任研究官

研究要旨 汎用性の高い胚移植の方法が開発され、ガラス化保存した 2 細胞期から胚盤胞期までのいずれの時期の胚も融解後の移植で正常な仔へ発育することが確かめられた。ガラス化保存および移植には胚盤胞が最も適していた。また、修正を加えた HTF 液を用いることで、体外受精由来の受精卵を 2-7%の率で得ることが出来た。今後は体外培養液および耐凍剤の改良と体外受精法の更なる検討が必要である。

A. 研究目的

スナネズミ (*Meriones unguiculatus*) は、*Helicobacter pylori* や *Echinococcus multilocularis* などの各種病原体の実験感染モデルとして、また癲癇や脳梗塞など脳神経系疾患のモデルとして有用であるが、その繁殖および発生に関わる実験的知見は少ない。私達は、スナネズミ胚等の凍結保存技術を開発することを目的に、今までに過排卵誘起、人工授精、精子の凍結保存、胚のガラス化保存および移植について試みたが、今回は汎用性のある胚移植法、胚のガラス化保存の有効性、体外受精法について検討した。

B. 研究方法

＜動物＞野生色 (MGS/Sea:(株)成和実験動物) および国立感染症研究所で繁殖維持している黒色の、SPF 近交系スナネズミを用いた。＜胚の採取＞5-7 週齢の雌に PMSG と hCG を各 10 単位、48 時間間隔で投与後、金網床で飼育中の交尾経験雄と同居させ、翌朝膣栓を観察した。2 細胞期から胚盤胞期の各時期の胚を卵管もしくは子宮から採取し、以下の実験に供した。

1) 胚移植方法の検討：胚移植のレシピエントを 2 通りの方法で作出した。無処置群として、未経産の雌を精管結紮した交尾経験雄と最長で 5 日間同居させ、毎朝膣栓の観察を行った。ホルモン処置群として、過排卵処置を施した未経産雌

を精管結紮した交尾経験雄と一晚同居させて翌朝膣栓を観察した。これらの方法で膣栓を確認した日を Day 1 とし、採卵によって得た Day 2 と Day 6 の胚をそれぞれ Day 1 と Day 5 のレシピエントの卵管内もしくは子宮内へ移植を試みた。

2) ガラス化保存に適した胚の発生段階の検討：ガラス化保存は、Ethylene glycol, Ficoll, Sucrose による EFS20 液および EFS40 液を耐凍剤として用い、それぞれに 2 分間および 30 秒浸漬の後液体窒素中に保存して行った。融解は水浴により、Sucrose-PB 1 液中で胚を回収後、M16 液を用いた培養実験もしくは移植実験に供した。

3) 体外受精の試み：精巣上体尾部から採取したスナネズミ精子を HTF 培養液および Brinster 培養液を用いてそれぞれ 3, 6, 9, 12 時間後の精子の運動能について調べた。次に 0.05% Trypsin 処理で透明帯を除去したゴールデンハムスター卵子との媒精によりスナネズミ精子の受精能を調べた。更に 0.05% Pronase E 処理で透明帯を除去したスナネズミ卵子および無処置のスナネズミ卵子を用いて体外受精を試み、培養液を含む諸条件の検討を行った。

C. 研究結果

1) 胚移植方法の検討：無処置で作出したレシピエントに採卵直後の Day 6 および Day 2 の胚を移植したところ、5 匹中

5匹、7匹中3匹がそれぞれ分娩し、移植した総胚数の48%および11%が出生仔へと発育した。また、ホルモン処置により作出したレシピエントへの上記と同時期の胚の移植で5匹中5匹、8匹中4匹がそれぞれ分娩し、移植した総胚数の18%および8%が出生仔へと発育した。

2) ガラス化保存に適した胚の発生段階の検討: Day 2 に採取した2細胞期胚をガラス化保存後、融解、回収したところ形態的に100%(39/39)正常で、培養により23%(9/39)が桑実期へ達したが、対象群は86%(31/36)と有意差が認められた。同様にDay 3 からDay 6 に採取した胚をガラス化保存し融解した場合は、87-100%の胚が形態的に正常であった。その後、培養実験に供したDay 3 およびDay 4 の胚は桑実期までの発育において対象群との差は認められなかった。次にDay 2, Day 3, Day 5, Day 6 のガラス化保存した胚を融解後移植したところ、それぞれ3%(4/123), 2%(2/130), 5%(4/87), 15%(17/110)の移植胚が出生仔へと発育した。

3) 体外受精の試み: スナネズミの精巢上体尾部から採取した精子をHTF液およびm-Brinster液を用いて前培養し、3時間おきに精子の運動能を観察したところ、いずれの液でも6時間後に最も高率で精子にハイパーアクチベーションが見られた。次にスナネズミ精子を6時間の前培養の後に透明帯を除去したハムスター卵子およびスナネズミ卵子と媒精したところ、58%および43%の卵子に精子の侵入が見られた。無処理のスナネズミ卵子との媒精では、2倍濃度のカルシウムを含むHTF液にHypotaurineを添加した培養液を用いた時に7%(4/59)の率で受精が確認されたが、他の培養液ではこれ以下の低率もしくは受精しなかった。

D. 考察

スナネズミ胚の移植の成功例は唯一報告されているが、後分娩発情で妊娠した雌の卵管を結紮した後に胚を導入する方法であり、分娩後すぐに妊娠した雌が必要になることと、2度の手術を行う手間のためにその作業は困難であった。雌雄の

組み合わせの考慮と金網床の使用による我々の行ったレシピエントの作出法は、汎用性の高いものであり、更にホルモン投与を行うことで移植日を予定することが可能となった。また、ガラス化保存した2細胞期から胚盤胞期までのどの時期の胚も、正常な仔へ発育することが証明されたが、時期により発育率が低いことから、スナネズミの体外培養に適した培養液を検討する必要があると考える。特に1細胞期からの培養と、胚盤胞期への発育を促すことが今後の課題となる。体外受精は同じ条件設定でも再現が困難であり、受精率は低かった。精子もしくは卵子の体外環境に対する感受性が高いものと考えられた。

E. 結論

スナネズミ胚の移植には胚盤胞(Day 6)を1日偽妊娠日齢の若いレシピエントの子宮内に導入する方法が良く、移植胚の48%が出生仔へと発育した。また、採卵日に合わせるためにホルモン処理をしてレシピエントを作出することも可能となった。ガラス化保存はDay 3-6の胚において、融解後の培養で対象群と同様の発育を示した。これらの胚を移植することによりいずれの時期の胚も正常な仔へ発育したが、胚盤胞が最良の成績を示し、移植胚の15%が出生仔として得られた。また、精巢上体尾部から採取した精子を用いて体外受精を行い受精卵を得ることに成功したが、受精率は2-7%と低いため、今後の改良が期待される。

F. 研究発表

学会発表

Mochida, K., Wakayama, T., Nakayama, K., Takano, K., Noguchi, Y., Yamamoto, Y., Suzuki, O., Ogura, A. and Matsuda, J.: Successful cryopreservation of Mongolian gerbil embryos by vitrification. International Embryo Transfer Society Annual Meeting. 1999年1月、ケベックシティ、カナダ。

凍結保存したマウス精子の生存性に影響を及ぼす諸要因

分担研究者 葛西 孫三郎 高知大学農学部教授

研究要旨

種々の糖類と高分子物質を用いてマウス精子を凍結保存し、融解後の生存性をしらべた結果、保存液の浸透圧が生存性を維持する重要な要因であり、約0.4 Osmol の浸透圧の、二糖類あるいは三糖類の水溶液が高い保護効果を有することが明らかとなった。特に、17%ラフィノースと10%メトリザマイドを添加した液が有効であった。

A. 研究目的

マウス精子の凍結保存が可能となり、遺伝子改変マウスの保存手段として期待されている。しかし、精子の耐凍性は系統差が大きく、保存法の改善が望まれている。現在、マウス精子の耐凍剤にはラフィノースとスキムミルクが用いられており、細胞透過性物質は不要とされている。そこで、マウス精子の耐凍メカニズムを明らかにすることによって、より優れた保存法を見出すことを試みた。

B. 研究方法

性成熟したICR系雄マウスから精巣上体尾部を取り出し、25℃又は0～4℃で切断した後、種々の耐凍剤を含む保存液（100μl）に入れた。2～4分後に精巣上体尾部を取り除き、精子懸濁液を15μlずつストロー内に封入して10分間液体窒素蒸気で冷却した後、液体窒素中に保存した。融解は、液体窒素から取り出したストローを30℃水中に浸して行い、水中で20秒あるいは10分間保持した。精子懸濁液をM16液で希釈し、加温板上で3～5分間保持した後、血球計算板を用いて、室温の顕微鏡下で前進運動している精子の割合を調べた。生存率の高い実験区の精子は、希釈後に排卵卵子と体外受精し、体外培養と胚移植によって、2細胞期胚、胚盤胞、および産子までの発育率をしらべた。

C. 研究結果

単糖類（ガラクトース、グルコース）を純水で希釈した保存液で凍結・融解した精子は、6%の濃度の低温処理区で極めてわずかの生存精子が観察されたが、全体では、いずれの条件でもほとんど生存していなかった。二糖類（ジスクロース、トレハロース）では12%、三糖類（ラフィノース、メレジットース）では18%の濃度で、それぞれ高い生存率が得られた。処理温度は4～6℃より25℃が適していた。融解後の保持時間は20秒から10分間に延長しても、

生存率は改善されなかった。4種類の二、三糖類について至適濃度を詳細に調べると、いずれも約0.40 Osmolの浸透圧の濃度で高い生存率が得られた。次に、10%の高分子（スキムミルク、BSA、フィコール、PVP）を含む、浸透圧0.40 Osmol（NaClで調整）の水溶液で凍結すると、精子はほとんど生存していなかった。しかし、分子量約800の物質（メトリザマイド、ナイコデンツ）では、低率ながら生存していた。特に、17%ラフィノースと10%メトリザマイドを含む保存液（0.40 Osmol）では、従来の凍結方法を上回る生存率が得られた。この溶液で凍結融解した精子で卵子に体外受精すると高率に受精し、移植後には産子まで発育することができた。

D. 考察

単糖類に保護効果がみられなかったのは、分子量が小さいために細胞内に透過した可能性がある。従って、二糖類や三糖類の効果は、細胞外の浸透圧を高め、脱水を促すことで精子を生存させるものと推測される。

E. 結論

マウス精子の凍結保存液では、浸透圧が重要で、細胞非透過性の糖類を含む0.40 Osmol程度の浸透圧の溶液が適している。特に、17%ラフィノースと10%メトリザマイドを添加した液が有効である。

F. 研究発表

1. 論文発表

○T. Mukaida, S. Wada, K. Takahashi, P.B. Pedro, T.Z. An, and M. Kasai, Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell embryos. Hum. Reprod., 13, 2874-2879 (1998).

○T.Z. An, S. Wada, K. Edashige, T.

Sakurai, and M. Kasai, Viable spermatozoa can be recovered from refrigerated mice up to 7 days after death. *Cryobiology*, 38, in press (1999).

○T.Z. An, K. Ikegami, K. Edashige, T. Sakurai, and M. Kasai, Freeze preservation of spermatozoa recovered from male mice that had been refrigerated after death. *J. Reprod. Dev.*, 45, in press (1999).

○K. Edashige, A. Asano, T.Z. An, and M. Kasai, Restoration of resistance to osmotic swelling of vitrified mouse embryos by short-term culture. *Cryobiology*, in press (1999)

2. 学会発表

○M. Kasai, Vitrification of embryos in various mammalian species, International Workshop on Comparative Gamete and Embryo Cryopreservation, Atlanta, USA, 1998.3.

○葛西孫三郎, 卵子および胚の凍結保存, 第17回日本アンドロロジー学会 シンポジウム "配偶子凍結保存技術の進展", 1998.7.

○安鉄洙・岩切通公・枝重圭祐・桜井孝志・葛西孫三郎, 凍結保存したマウス精子の生存性に及ぼす諸要因, 第91回日本繁殖生物学会, 1998.8.

○T.Z. An, S. Wada, K. Edashige, T. Sakurai, M. Kasai, Viability of spermatozoa collected from male mouse carcasses kept at various temperatures, *Theriogenology* 51, 161, (1999)

(分担) 研究報告書

マウス胚の超急速凍結法の開発：
とくに凍結保存胚のキメラマウス作成への応用

分担研究者： 横山峯介・三菱化学生命科学研究室室長

研究組織： 横山峯介・鈴木理可・茂手木淑子・中原陽子
福井由宇子
(三菱化学生命科学研究室 生殖工学開発室)

研究要旨：実験操作を極めて短時間で行える簡易ガラス化法を、より汎用性のある技術として改良し、広く応用するための検討の一環として、この方法で凍結した胚をキメラマウス作成実験の材料に使用した。その結果、未凍結胚と差のない値でキメラ個体を作成できることが明らかとなった。

A. 研究目的

マウス胚の凍結保存法には、緩慢凍結・融解法、修正緩慢凍結法あるいは超急速ガラス化法などがある。なかでも超急速ガラス化法は、凍結操作に要する時間が数分と極めて短時間ですむこと、プログラムフリーザー等の特別な装置を必要としないこと、などの長所がある。このことからわれわれは、この超急速ガラス化法にさらに改良を加え、手軽で汎用性のある技術の確立を目指している。本研究では、種々のかたちで応用するための検討の一環として、凍結胚を使用して相同組み換えで遺伝子を導入したES細胞との間でキメラマウスを作成した。さらに得られたキメラマウスを交配してノックアウト個体の作成を検討した。

B. 材料および方法

性腺刺激ホルモン(PMSG-hCG)の処理によって過排卵誘起したC57BL/6メスを同

系統あるいはC57BL/10系オスと交配し、8細胞期を採取した。

胚の凍結・融解は、これまで検討してきた簡易ガラス化法に準じて行った。すなわち、クライオチューブ内の0℃に冷却した1M DMSO濃度のPB1液に胚を入れて5分間置き、これにDAP 213保存液(PB1液に最終濃度が2M DMSO, 1Mアセトアミド, 3Mポリエチレングリコールとなるように添加)を加えた。さらに5分間後にチューブをケーンにセットし、速やかに液体窒素中に浸漬した。融解は、液体窒素タンク中から取り出したチューブを室温に置き、自然融解させた。融解後に同温の2.0mlの0.3M sucrose濃度PB1液を加えて凍害保護剤を希釈した。その後チューブの内容液をシャーレに移して実体顕微鏡下で胚を回収し、修正whitten(mW)培養液で3回洗浄して形態的な観察を行った。正常と判定されたものは、後述のキメラマウス作成に使用した。

ES細胞(E14TG2a)はエレクトロポレーションによりターゲティングベクターを導入し、選択薬剤処理の後にクローニングを行い、相同組換えクローンをスクリーニングした。この間、フィーダー細胞はまったく使用せずに培養を行った。

凍結融解した胚とES細胞とのキメラの作成は2種類の方法によって行った。すなわち、集合キメラマウスは、酸性タイロイド液(SIGMA T1788)の処理で透明帯を除去した8細胞期胚2個の間にES細胞を挟み込み20時間培養を行い、単一な集合胚として発生した胚を、偽妊娠を誘起したレシピエントメス(偽妊娠第3日目)の子宮に移植して得た。もう一方の注入キメラマウスは、凍結融解した8細胞期胚を約20時間して胚盤胞期に発生したものを材料とした。この胚盤胞期の胚の腔内に、トリプシン処理により単離したES細胞10~15個を顕微操作によって注入し、これをレシピエントメスの子宮に移植した。

C. 研究成果

簡易ガラス化法により凍結・融解した8細胞期胚は、90%以上が形態的に正常なものとして回収され、キメラ作成実験に使用することができた。

キメラマウスの作成では、5種類の遺伝子ベクターを導入したES細胞を使用した。集合法および注入法のいずれでもキメラ個体を得られた。そのうち集合法で作成されたキメラ個体からは2遺伝子で、また、注入法で作成された個体からは3遺伝子で生殖系列への伝達を確認され、それぞれの遺伝子を破壊したノックアウトマウスを得られた。この成績はコントロール群である未凍結胚を使用し

成績と比較してもなんら遜色のない値であった。

D. 考察

今回の検討により、簡易ガラス化法で凍結しておいた8細胞期胚を必要に応じて融解し、効率的に実験材料として利用できることが明らかとなった。

また、この方法で凍結した胚を、集合キメラマウスあるいは注入キメラマウスを作成する際の材料として使用できることが明らかとなり、各種のノックアウトマウスを効率的に作成できることが示唆された。なお、キメラマウスの作成効率については、われわれが実施している新鮮未凍結胚を使用した成績に比べても大きな差はなかった。このことから、今後キメラマウスの作成を含めて、各種の実験材料としての有効利用が期待される。

E. 結論

マウス初期胚の凍結技術を体系化して広く普及させる一環として、実験操作が簡便な簡易ガラス化法を検討し、凍結胚をノックアウトマウス作成実験の材料として使用した。その結果、凍結・融解胚と遺伝子ベクターを導入したES細胞との間で集合キメラマウスおよび注入キメラマウスの作成が効率的に可能であることが明らかとなった。また、このキメラ個体を野性型個体と交配してノックアウト個体を作成できることが示され、凍結保存胚の有効が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

1) 鈴木理可・中原陽子・茂手木淑子・福井由宇子・横山峯介：フィーダー細胞を必要としないES細胞株(E14TG2a)を用いたキメラマウスの作成. 第45回日物学会総会、松本市1998年5月.

2) 鈴木理可・中原陽子・茂手木淑子・福井由宇子・横山峯介：フィーダー細胞を必要としないES細胞株(E14TG2a)を用いたキメラマウスの作成. 第21回日本分子生物学会年会横浜市、1998年12月.

G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生省科学研究補助金
(ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業)
分担研究報告書

ラット体外受精法と疾患モデルマウスの卵巣移植法に関する研究

笠井憲雪 東北大学医学部教授

実験動物系統維持のための基礎研究として、ラット体外受精法とマウス卵巣移植法について検討を行った。ラットの体外受精の成功率は約31%とマウスに比較して低かった。一方、疾患モデルマウスの正常マウスへの卵巣移植により、自然交配よりも高率に繁殖できた。

1. ラット体外受精法について

A.研究目的

ラットの卵子や精子はマウスに比較して弱く、さらに受精能獲得の時間が長いと、長期の培養が必要である。このためラットの体外受精法はマウスのそれと比較して効率が悪い。しかし、ラットでの遺伝子操作やモデルラットの受精卵保存などのために、体外受精は必須の技術である。そこで、まず体外受精法の基本的な技術法を試みた。

B.研究方法

ラットは3～5週齢のWister Imamichi(WI)、およびSDを、培養液はHTFおよびmKRBを用いた。メスに50時間間隔で15IUのPMSおよびhCGを投与し、翌日卵管膨大部から未受精卵を回収し、0.3%ヒアルロニダーゼで卵丘細胞の除去をおこなった。オスの精巣上体尾部から精子を採取し、精子濃度 10^6 /mlに調整し、5時間培養し受精能獲得を行った。その後未受精卵を受精用培養液に移し、受精を行った。

C.研究結果と考察

ラットの排卵数はWIでは69%、SDでは72%であり、1頭当たりの平均排卵数はいずれも22個であった。これらの成績は十分な値であった。体外受精率は平均31%であり、実験群によるデータのバラツキが大きく、今後安定した受精と、更なる受精率の向上を目指して受精条件の改善が必要と思われた。

2. 疾患モデルマウスの卵巣移植法について

A.研究目的

膜性糸球体腎炎モデルICGNマウスは、雌雄ともに幼弱期から発症するため繁殖成績が著しく低

く、供給や系統維持に困難を伴うため、卵巣移植技術を応用し繁殖効率の改善を試みた。

B.研究方法

動物はICGNマウスのほか正常マウスICRを用いた。移植法は、まずレシーピエントICRマウスの卵巣後部の脂肪層から卵巣嚢を切開し、卵巣を除去した。次にドナーのICGNマウスから卵巣を傷つけない様に摘出しレシーピエントマウスの卵巣嚢に移植した。その後卵巣移植されたマウスに雄ICGNマウスを交配させ、産子を得た。繁殖成績は感染症研究所の自然繁殖群データと比較した。

C.研究結果と考察

まず分娩回数に伴う妊娠率は2産目までは全雌親が妊娠したが、3産目は30～40%減少した。次に移植群は11匹の雌が29回の分娩をし、合計204匹出産し、その内146匹が離乳した(離乳率は約70%)。雌親1匹当たりの産仔数は17～20匹であった。自然繁殖群に比べ分娩回数、雌親1匹当たりの産仔数ともに約2倍であった。離乳数も雌親1匹当たり13～16匹と約1.3倍から1.7倍であった。リッターサイズは自然繁殖と変わらなかった。以上の結果より卵巣移植技術は、膜性糸球体腎炎モデルマウス(ICGN)の様な繁殖障害を伴う疾患モデルマウスなどの生産性向上におおいに役に立つ事が示された。

学会発表

第32回日本実験動物技術者協会総会(1998年)

平成10年度日本実験動物技術者協会東北支部総会

1998年度
分担研究報告書

小動物の受精卵・胚・精子の保存方法及びモニタリング技術開発等に関する研究

分担研究者 勝木元也 東京大学医科学研究所 教授

研究要旨 マウス精子の凍結保存法の開発を目的として、3種の近交系の精子を凍結保存し、体外受精ならびに個体への発生について系統差を検討した。その結果、使用した総ての系統において、受精後の発生成績は良好であったが、C57BL/6Jで明らかに受精率の低下が観察された。また、この原因を検討するため、透明帯に孔を開ける処理をした卵を使用して、体外受精を実施したところ、受精率が改善されたことから、凍結保存の過程において精子が透明帯を通過する能力に傷害を受けているものと考えられた。以上のことから、凍結精子の復活能力には系統差があり、今後C57BL/6Jについて凍結保存法から検討し直す必要がある。

A. 研究目的

発生工学の技術により、多くの遺伝子操作マウスが作成され、遺伝子機能の解析や、ヒト疾患モデル動物として利用されている。この遺伝子操作マウスは、今後さらに多くの種類が作成されるものと予想される。これら、莫大な数にのぼる遺伝子操作マウスの系統保存を効率良く実施するには、配偶子、特に精子を用いて保存することが効果的と考えられる。しかし、現在報告されている精子の凍結保存法は、マウスの系統により、凍結保存後の受精率に差が見られる。そこで、本研究では、効率的な精子の保存法の開発を目的として、はじめにマウスにおける各種系統の精子を保存し、融解後体外受精をすることで系統差を観察した。また、現在運動性の悪い精子での受精率の改善を目的として、卵子の透明帯を処理する方法の一つであるZona Drilling法が、凍結保存した精子の受精率改善に効果的か否かについて検討した。

B. 研究方法

C57BL/6J、C3H/HeN、BALB/cByJの3種類の近交系と交雑系としてBDF1からそれぞれ精子を採取し凍結保存した。精子の凍結保存法は中濁の方法に準じた。すなわち、採取した精子は、それぞれ100 μ lの精子凍結保存液(3% skim milk, 18% raffinose)に移し、室温で約5分間かけて十分に拡散させた。次に、0.25mlのプラスチックストローに、十分に拡散した精子を20 μ lずつ注入し、両端を密閉し、液体窒素の気相下で約5~10分間冷却処理後、液体窒素中に浸漬し保存した。凍結保存した各種系統の精子は、液体窒素中で一定期間保存した後融解し、同系統の雌マウスから採取した卵子と体外受精するこ

とで受精能を検討した。得られた受精卵は、偽妊娠雌マウスの子宮に移植することで個体にまで発生させた。また、Zona Drilling法(ZD)の検討として、C57BL/6J雌マウスから採取した卵子の一部を、ピエゾ装置を使用して透明帯に約10 μ mの穴を開けた。ZDした卵子は、凍結保存したC57BL/6Jの精子と体外受精をすることで、受精成績を観察するとともに、得られた受精卵は移植により個体への発生能を観察した。

C. 研究結果

各系統の精子の融解後の受精成績は、C57BL/6Jで16.4%、C3H/HeNで71.0%、BALB/cByJで41.6%、BDF1で94.0%であった。また受精した胚の移植による個体への発生成績は、いずれの系統においても良好であった(50%以上)。次に、C57BL/6Jの凍結精子において、ZDした卵子との体外受精の成績は、未処理の卵子を使用した結果と比較して良好であり、2匹の雄マウスから、作成した凍結精子での体外受精の成績は、それぞれZD 29.0%；未処理6.5%、ZD 61.9%；未処理11.6%であった。また、ZDして作成した受精卵の移植による個体への発生成績は、52.0%と45.0%であった。

D. 考察

使用した全ての系統において、受精後の発生成績は良好であった。このことから、凍結保存した精子を用いて作成した受精卵の発生能に問題はなく個体に発生することから、精子の凍結保存過程が受精後の発生におよぼす影響はないものと考えられる。また、C3H/HeNとBDF1の凍結精子を使用した結果は、受精成績、発生成績とも良好であり、凍結保存した精子は、系統保

存ならびに計画生産に十分使用可能である。また、BALB/cByJの結果は40%と低率であったが、対照区である未凍結保存の精子を使用した結果(約38%)と比較しても差がないことから、凍結保存の影響ではなくBALB/cByJ系統の性質と考えられる。また、C57BL/6J系統は非常に受精率が低かったが、ZD処理により明らかに受精成績が改善されたことから、ZD処理は凍結保存の影響のため低下した受精成績を改善するのに有効な手段の一つと考えられる。しかし、この方法は大量の卵の処理には有効ではない。C57BL/6Jについては、透明帯を突破する能力が凍結によって低下するものと考えられることから、第一に、凍結保存法によって、タンパク質分解酵素が失活する可能性を考え、それに対する対策を検討すること。第二に、個別の卵に対する透明帯処理ではなく、大量処理の方法を検討すること。が必要であると考えられた。

E. 結論

現在マウスにおいて利用されている精子の凍結保存法は、交雑系および近交系の一部の系統については、有効な方法であるが、遺伝子操作に広く使用されているC57BL/6Jの精子の凍結融解後の受精成績は、非常に低く、まだまだ改善しなければ実用的ではない。また、この低い受精成績の改善法として、透明帯を処理することも有効な手段の一つと考えられるが、今後莫大な数に上ると予想される遺伝子操作マウスに十分に対応するためには、やはり、凍結保存法を検討することで、受精成績を改善する必要があると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Sugihara, K., Nakatsuji, N., Nakamura, K., Nakao, K., Hashimoto, R., Otani, H., Sakagami, H., Kondo, H., Nozawa, S., Aiba, A. and Katsuki, M.
Rac1 is required for the formation of three germ layers during gastrulation. (1998)
Oncogene 17 3427-3433

Kimura, M., Sato, M., Akatsuka, A., Saito, S., Ando, K., Yokoyama, M. and Katsuki, M.
Overexpression of a minor component of myelin basic protein isoform (17.2kDa) can restore myelination in transgenic shiverer mice. (1998)
Brain Res 785 245-252

Nakao, K., Nakagata, K. and Katsuki, M.

Production of chimeric mice from cryopreserved blastocysts. (1998)
J Exp Anim 47 167-171

2. 学会発表

中尾和貴、中瀬直巳、勝木元也
凍結透明帯除去 8 細胞期胚とES細胞との集合キメラの作成
第45回日本実験動物学会総会、松本 (1998、5/28-30)

Aiba, A., Manabe, T., Ichise, T., Yamada, A. and Katsuki, M.
Regulation of synaptic plasticity by H-Ras.
第21回日本分子生物学会、横浜 (1998、12/16-19)

杉原一廣、中辻憲夫、中村健司、中尾和貴、橋本龍樹、大谷浩、坂上洋行、近藤尚武、野澤志郎、饗場篤、勝木元也
Rac1欠損による原始線条体形成不全
第21回日本分子生物学会、横浜 (1998、12/16-19)

砂原昭一、中村健司、中尾和貴、権藤洋一、勝木元也
インプリンティング遺伝子 U2afb p-rs の欠損マウスの解析
第21回日本分子生物学会、横浜 (1998、12/16-19)

市瀬広武、山田篤、中尾和貴、中村健司、饗場篤、勝木元也
ras 群遺伝子の機能重複
第21回日本分子生物学会、横浜 (1998、12/16-19)

砂原昭一、中村健司、中尾和貴、権藤洋一、勝木元也
インプリンティング遺伝子 U2afb p-rs の欠損マウスの解析
第21回日本分子生物学会、横浜 (1998、12/16-19)

市瀬多恵子、狩野方伸、橋本浩一、柳原大、中尾和貴、重本隆一、勝木元也、饗場篤
小脳長期抑圧の運動学習における役割
第21回日本分子生物学会、横浜 (1998、12/16-19)

G. 知的所有権の取得状況

1.特許取得
なし

2.実用新案登録
なし

3.その他
なし