

図6

マウス肝炎ウイルスN蛋白遺伝子配列の比較 (1041-1120)

KX1	1041	GTATGAATTGCAGTATTCAGGTGCAATTAGATTTGATAGTACTCTCCAGGTTTTGAGACTATCATGAAAGTGTTGAATG	1120
KV306	1041	1120
KQKF3	1021C.....	1100
KQ6E	1041	1120
KQT2	1041	1120
Ku	1041	1120
O-Pr	1041A.....	1120
RI	1041GC...A.....G.....A.T.C.....C.....	1120
TY	1041GC...A.....G...G.....A.T.....T..	1120
A59	1041GC...A.....G.....A.T.....	1120
MHV3	1041GC...A.....G.....A.T.....	1120
DVIM	1041T.....T...A.....	1120
Nu67	1041A.T.....	1120
Y	1041GC...A.....G.....T.G.....	1120
TM5	1041	A.....GC...A.....G.....A.T.....	1120
MHVS	1041GC...A.....G.....A.T.....	1120
MHV1	1041A.....	1120
JHM	1041GC...A.....G.....A.T.....	1120
MHV2	1029	T.....A.C.....	1108

分担 研究報告書

輸送した過排卵処理雌マウス・偽妊娠雌マウスを用いた 体外受精および胚移植

分担研究者 中瀉直己 熊本大学動物資源開発研究センター 教授

研究要旨

外部業者に依託し、実験当日に当センターに搬入した過排卵処理マウスと偽妊娠雌マウスを用いて体外受精および胚移植を行った。体外受精率および移植成績は、当センターで同様の処理を行った過排卵処理マウス、偽妊娠雌マウスを用いたそれぞれの結果と比較して、何ら差は認められなかった。

A 研究目的

近年、病原微生物のクリーニングや遺伝子改変マウスの大量作出に体外受精-胚移植が盛んに応用されている。しかし、体外受精や胚移植を実施するためには、多数の卵子提供雌や胚を移植するための受容雌(偽妊娠)マウス、さらには精管結紮雄が必要であり、その飼育スペースの確保が問題となる。そこで、本研究では、過排卵処理および偽妊娠雌マウスの作製を外部業者に依託し、実験当日に当センターに搬入することにより体外受精および胚移植が可能か否かの検討を行った。

B 研究方法

使用動物：卵子提供用過排卵処理雌マウスには、C57BL/6J Jcl (9~11週齢)、胚移植用の受容雌には、Jcl:MCH(ICR) (10~18週齢)を用いた。

マウスの輸送：マウスは、九動株(佐賀県鳥栖市)にて、過排卵処理(妊馬血清性腺刺激ホルモンとヒト絨毛性性腺刺

激ホルモンを48時間間隔で腹腔内投与)したもの、あるいは精管結紮雄と交配させ、翌朝膣栓を確認したもの(受容雌)を直ちに熊本大学・動物資源開発研究センターへ輸送し、体外受精、あるいは胚移植に供した。なお、当センターで同様の処理を行ったマウスを対照区として用いた。

C 結果

輸送した過排卵処理マウスの排卵数およびそれら卵子を用いた体外受精率は、対照区と比較して何ら差を認めなかった。

また、輸送した受容雌を用いた移植胚の新生仔への発生率も対照区と同様の値であった。

D 考察

以上の結果から過排卵処理雌マウスや偽妊娠マウスを外部の業者より購入することで、飼育スペースが大幅に軽減することが可能となり、容易にかつ効率的な胚の作出、胚移植が可能と思われる。

E 結論

外部業者から過排卵処理マウスおよび偽妊娠雌マウスを購入することにより、極めて簡易な体外受精・胚移植システムを確立した。

F 研究発表

1 論文発表

1. K.Matsumoto, M.Anzai, N.Nakagata, K.Miyata, H.Kato, K.Saeki, Y. Hosoi and A.Iritani : Possible usage of the firefly luciferase gene as a gene expression marker in preimplantation embryos from transgenic mice. Mem. Research Inst. B.O.S.T. Kinki University. 2 : 11-18, 1999
2. 中瀧直己 : マウス胚・精子バンクの動向
バイオサイエンスとインダストリー、
57(12) : 34-35, 1999

2 学会発表

1. 熊本大学動物資源開発研究センターにおける胚バンクシステムについて
第45回日本実験動物学会、1999
中瀧直己、西川尊樹、土山修治、山田 源、
中村直子、野口和浩、久和 茂、浦野 徹、
大田美香、野口博光、山村研一
2. Mouse embryo bank system at the center for animal resources and development, Kumamoto University, Japan
ICLAS (ferasa) , 1999
N. Nakagata, T. Nishikawa,
S. Tsuchiyama, G. Yamada, N. Nakamura,

K. Noguchi, S. Kyuwa, T. Urano,
K. Yamamura

3. マウスにおける生殖工学技術の応用
受精着床学会、1999
西川尊樹、中瀧直己
4. 熊本大学動物資源開発研究センター・
マウス胚/精子バンクについて
第92回日本繁殖生物学会、1999
中瀧直己、西川尊樹、川野佳代、
中島竜之、下田 剛、山田 源、
中村直子、野口和浩、久和 茂、
浦野 徹、山村研一
5. 熊本大学動物資源開発研究センター・
マウス胚バンクについて
第128回日本獣医学会、1999
中瀧直己、西川尊樹、川野佳代、
中島竜之、下田 剛、山田 源、
中村直子、野口和浩、久和 茂、
浦野 徹、山村研一
6. Establishment of mouse embryo/sperm bank at the center for animal resources and development, Kumamoto University, Japan.
The 13th International MouseGenome Conference, 1999
Naomi Nakagata, Takaki Nishikawa, Tatsuyuki Nakashima, Kayo Kawano, Tsuyoshi Shimoda, Shuji Tsuchiyama, Gen Yamada, Naoko Nakamura, Kazuhiro Noguchi, Shigeru Kyuwa, Toru Urano, Ken-ichi Yamamura
7. マウスの生殖工学技術について
第16回九州実験動物研究会、1999
中瀧直己

8. 過排卵処理マウスの排卵数および体外受精率に及ぼす輸送の影響について
第16回九州実験動物研究会、1999
下田 剛、西川尊樹、中島竜之、川野佳代、土山修治、香山敬志、川内 勝、中瀧直己

9. 輸送したレシピエントを用いた胚移植成績
第16回九州実験動物研究会、1999
川野佳代、下田剛、土山修治、中島竜之、西川尊樹、香山敬志、川内 勝、中瀧直己

10. 遺伝子改変マウス精子とC57BL/6J卵子間での体外受精成績
第16回九州実験動物研究会、1999
中島竜之、西川尊樹、川野佳代、下田 剛、土山修治、中瀧直己

11. 体外受精による遺伝子改変マウスの大量作出
第16回九州実験動物研究会、1999
土山修治、下田剛、西川尊樹、中島竜之、川野佳代、山田 源、中瀧直己

12. マウス胚バンクシステムについて
第16回九州実験動物研究会、1999
西川尊樹、川野佳代、中島竜之、下田 剛、中村直子、中瀧直己

13. ノックアウトマウスを用いた歯の発生過程における遺伝子発現階層性
—Msx-1 knockout mouseを中心にして—
第16回九州実験動物研究会、1999
長谷川太郎、鈴木堅太郎、小松義広、神川真美、中村誠司、荻野由紀子
原口竜摩、一鬼 勉、中瀧直己、山田 源

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
分担研究報告書

胚および配偶子の遺伝的モニタリング技術の開発

分担研究者 加藤 秀樹 浜松医科大学医学部助教授・実験動物中央研究所研究員

研究要旨

昨年度まで行った基礎的研究では5種類のマイクロサテライトDNAマーカの検出に必要な胚数は桑実期胚の5個としていたが、今年度は、細胞期と胚数についてより詳細に検討した結果、8細胞期胚2個にまでその数を減じることができ、胚レベルでの遺伝検査の実用化を可能にした。

A. 研究目的

実験動物の胚および配偶子（卵子及び精子）の凍結は、ミュータント系統やトランスジェニックおよびノックアウト系統など、貴重な実験動物の遺伝資源の保存法として実用化の段階に入っている。

胚バンクの運用においては、胚、配偶子の取り違い事故などが予想されることから、本研究では個体へ還元することなく、胚の早期発生段階で系統を判別できる検査システムを確立するための基礎的研究を行った。

B. 研究方法

CB6F1マウスの精子および卵子をmT6培地で体外受精し、37℃、5% CO₂の条件下で培養した。2細胞期、8細胞期および桑実胚期への培養はmWM培地を持ちいて行った。

マウス15系統の系統識別が可能となる5種類のマイクロサテライトマーカ、D3Mit54、D5Mit18、D6Mit15、D7Mit77およびD8Mit50を我々のデータベースから選択した。PCRは、Research Genetics社より購入したプライマーを用いて行った。PCRプロダクトはアガロースゲルを用いて電気泳動し、エチジウムブロマイド染色を行って検出した。

C. 研究結果

1. 胚レベルでの遺伝検査に最適な細胞期と胚数の検討

我々が昨年度までに選んだ5種類のマイクロサテライトマーカで15種類のマウス近交系の識別が可能である。それらを調べるために必要な細胞期および胚数について、本年度は体外受精後54時間、すなわち8細胞期胚に焦点を絞ってより詳細に検討を加えた。

その結果、D3Mit54、D5Mit18、D6Mit15は1個で、また、D8Mit50は2個で検出可能であった。しかし、昨年度の結果では桑実期胚5個で検出されたD7Mit77について今回10個まで胚数を増やしたが検出できなかった。

2. 胚レベルでの遺伝検査法の実用化

実際に胚レベルで遺伝検査を行うとすると次のような手順になる。

まず、凍結胚を融解し、個体へ還元するために移植する。その一方で、融解胚の一部（1、2個）を8細胞期まで培養し、核DNAを抽出する。

次に、4、5種類のマイクロサテライトマーカについて常法に従ってPCRを行って調べ、対象としている胚の遺伝子型を決定し、系統の正しさを確認する。もし、違っている場合は出産を待たずに処分する。

D. 考察

本研究により、8細胞期胚1、2個で4種類のマイクロサテライトマーカを検出することができ、13近交系を識別できることが明らかになった。遺伝子導入動物については当該遺伝子（トランスジェンやノックアウトジェン）をPCRの一項目として追加して調べればよく、系統識別と導入遺伝子の検査を同時に行え、当初の研究目標を達成できた。

E. 結論

8細胞期胚2個で4種類のマイクロサテライトマーカを検出することができ、胚レベルでの遺伝検査が可能になった。{本研究は、実中研の六車香里、小田晃司および飼育技術研究室との共同研究として行われた。}

生殖工学技術を用いた迅速戻し交配に関する研究

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

遺伝子機能解析には、実験動物の遺伝的背景を揃える必要がある。しかし、戻し交配による遺伝的背景の均一化にはマウスでさえ 3 年の長期間を必要とする。そこで、我々は、この期間を短縮する目的で生殖工学技術を適用した。その結果 1 年間で 8 代の戻し交配に成功した。用いた方法は、幼若雌マウスの過剰排卵誘起、体外受精や胚移植などである。我々の研究室で作成した p53 KO マウスの遺伝的背景を、3 種類の近交系 (C57BL/6, BALB/c, C3H/HeN) にそれぞれ戻し交配した。この生殖工学技術の応用による 8 世代までの戻し交配に要した期間は、従来の自然交配法と比較しても、約 1 年と非常に短期間で完了する事ができた。

A. 研究目的

遺伝子の機能解析において有効なモデル動物となる標的遺伝子組み換えマウス (KO マウス) が多くの研究室で作成されている。この KO マウスは、その作成過程において、129 系統との交雑種となるため、脳などの機能すなわち記憶や行動等の高次機能の解析においては、その遺伝的背景を揃える必要がある。この遺伝的背景を揃えるための戻し交配は、従来は動物まかせの自然交配に頼るしか方法がなく、さらに 8 世代以上の戻し交配には、3 年以上の長期間を要する。

そこで本研究においては、我々が独自に作成した KO マウスの遺伝的背景を、動物まかせの自然交配ではなく、体外受精や胚移植などの生殖工学技術を駆使す

ることで短期間の戻し交配が可能か否かについて検討した。

B. 研究方法

KO マウスとして、癌抑制遺伝子である p53KO マウスを用いた。第一世代の作成は、各々の系統、すなわち C57BL/6, BALB/c, C3H/HeN の、3 系統の雌マウスを (株) 日本クレアから購入し、雄 p53 ホモ型欠損マウスと体外受精することで作成した。得られた第一世代の雌マウスは、生後 28 日目で PMSG-hCG で過剰排卵誘起し、(株) 日本クレアから購入した C57BL/6J, BALB/c, C3H/HeN の 3 系統の成熟雄を使用して、それぞれの体外受精に用いることで、次の第 2 世代の受精卵を作成した。得られた受精卵

の一部は、卵管への胚移植により個体に発生させ、第2世代の個体を作成した。また、余剰の胚は、凍結保存することにより、事故等による不測の事態に備えた。第2世代以降8世代目までは、得られた雌個体の遺伝子型をPCR法などにより迅速に決定し、同様に生後28日目で過剰排卵誘起し、購入した雄マウスを使用して順次戻し交配を行った。

C. 研究結果

C57BL/6J, C3H/HeN の系統では各世代における、排卵数 (C57BL/6J, 38 個/匹; C3H/HeN 29 個/匹)、体外受精成績 (C57BL/6J, 76%; C3H/HeN 88%) および移植成績 (C57BL/6J, 53%; C3H/HeN; 47%) は問題なく高い成績であった。また、8世代目が得られるの要した期間は、C57BL/6J で361日、C3H/HeN で362日であった。

BALB/c の系統では、排卵数は54個/匹と他の2系統と比較しても多く排卵したが、体外受精成績は、各世代で11~23%と低値であった。このため、得られた第7世代は、雌2:雄1となったため、次の第8世代の作成は、得られた雌2匹とBALB/c雄マウスとの自然交配法により作成した。また、第8世代を得るの要した期間は390日間であった。

D. 考察

従来BALB/c系統では、体外受精成績は、C57BL/6やC3H/HeNと比べて有

意に低い値をとることを経験してきた。この受精成績の低下が、第2世代目から観察されたことから、世代の進行に伴う近交退化ではなく、雄側の問題であると考えられる。しかし、第7世代目までは、他の2系統と同様に短期間で完了することができたので、最終的に短期間で完了したものと考えられる。

C57BL/6J, C3H/HeN の2系統においては、戻し交配の世代の進行にかかわらず排卵数、受精成績、および発生成績とも問題なく、各世代において十分な数の受精卵が得られ余剰な胚は、凍結保存する事で各世代の系統のバックアップとし不測の事故などにも十分対応することが可能であった。

戻し交配の実施に際して自然交配法では、莫大な時間を要する問題点だけでなく、世代を重ねる毎に繁殖能の低下等、すなわち近交退化の問題が、戻し交配を困難にしていた。しかし、生殖工学技術を用いた本研究においては、C57BL/6J, BALB/c, C3H/HeN の3系統で、排卵、受精、発生と問題のない成績が得られることが分かった。

E. 結論

マウスの戻し交配に、生殖工学技術を利用することは効果的であり、従来、莫大な時間を要する戻し交配を、約1年間と非常に短期間で完了することができた。また、C57BL/6J, C3H/HeN の2系統に関しては、各世代ごとに十分な受精卵を

作成することができたので、各世代毎に凍結保存胚を作成する事ができ、不測の事故にも対応することが可能である。このことから、生殖工学を効率よく利用することで、安全にかつ迅速に目的とする遺伝的背景のマウスを得ることが可能であることを証明した。

F. 研究発表

1.論文発表

Ikeda,M., Sugiyama,T., Suzuki,K., Moriya,T., Shibata,S., Katsuki,M., Allen,C.N. and Yoshioka,T. PLC β 4-independent Ca^{2+} rise via muscarinic receptors in the mouse suprachiasmatic nucleus. (1999) Neuroreport in press

Sugiyama,T., Hirono,M., Suzuki,K., Nakamura,Y., Aiba,A., Nakamura,K., Nakao,K., Katsuki,M. and Yoshioka,T. Localization of phospholipase C β isozymes in the mouse cerebellum. (1999) Biochem Biophys Res Commun 265 473-478

Naito,A., Azuma,S., Tanaka,S., Miyazaki,T., Takaki,S., Takatsu,K., Nakao,K., Nakamura,K., Katsuki,M., Yamamoto,T. and Inoue,J. Severe osteopetrosis,

defective interleukin-1 signalling and lymph node organogenesis in *TRAF6*-deficient mice.(1999) Genes to Cells 4 353-362

Nozawa,H., Oda,E., Nakao, K., Ishihara,M., Ueda,S., Yokochi,T., Ogasawara,K., Nakatsuru,Y., Shimizu,S., Ohira,Y., Hioki,K., Aizawa,S., Ishikawa,T., Katsuki,M., Muto,T., Taniguchi,T. and Tanaka,N.

Loss of the transcription factor IRF-1 affects tumor susceptibility in mice carrying Ha-*ras* transgene or nullizygosity for p53. (1999) Gene Dev 15 1240-5

Yamada,A., Fujita,K., Yokoi,T., Muto,S., Suzuki,A., Gondo,Y., Katsuki,M. and Kamataki,T. In vivo detection of mutations induced by Aflatoxin B₁ using human CYP3A7/HITEC hybrid mice. (1998) Biochem Biophys Res Commun 250 150-153

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

Yoshikawa,H., Taniguchi,S., Yamamura, H., Mori,S., Sugimoto,M., Miyado,K., Nakamura,K., Nakao,K., Katsuki,M., Shibata,N. and Takahashi,K. Mice lacking smooth muscle calponin display increased bone formation that is associated with enhancement of bone morphogenetic protein responses. (1998) *Gene to Cells* 3 685-695

Nomoto,S., Ootsuyama, A., Shioyama, Y., Katsuki,M., Kondo,S. and Norimura,T.The high susceptibility of heterozygous p53(+/-) mice to malformation after foetal irradiation is related to sub-competent apoptosis. (1998) *Int J Radiat Biol* 74 419-429

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 myelogenesis 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

Honda,H., Oda,H., Nakamoto,T., Honda,Z., Sakai,R., Suzuki,T., Saito,T., Nakamura,K., Nakao,K., Ishikawa,T., Katsuki,M., Yazaki,Y. and Hirai,H. Cardiovascular anomaly, impaired actin bundling and resistance to Src-induced transformation in mice lacking p130^{Cas}. (1998) *Nature Genetics* 19 361-365

G. 知的所有権の取得状況

平成 11 年度

- 1.特許取得
なし

平成 11 年度

- 2.実用新案登録
なし

平成 11 年度

- 3.その他
なし

研究要旨

マウス卵巣の凍結保存を行い、融解後卵巣嚢に移植した。雄との交配により非凍結卵巣移植の場合の半数の産子を得たが、移植卵巣からの産子の割合は非凍結卵巣の場合と変わらなかった。これにより卵巣凍結保存技術が、マウス系統の維持の技術として利用できることがわかった。

A. 研究目的

卵巣移植技術はマウスやラットの繁殖障害や疾病の発症、事故等による系統断絶の危険を回避する手段として受精卵移植技術や体外受精技術などとともに有効な方法である。また、卵巣が出生直後の新生児期にすでに成熟していることから、未成熟個体にも適用可能であることから、上述の技術に優る特質がある。しかし、移植のレシピエント動物はドナー動物と組織適合性抗原（MHC）が同じであることが必要であることや、技術の習熟が必要な点が短所として上げられる。

一方、この卵巣を凍結し長期間保存することができれば、マウスやらの系統が保存できることや従来の受精卵あるいは精子の凍結保存の補完技術として受精卵あるいは精子の採取が困難な場合に使用できる。

我々はこれまで性成熟期に発症する膜性糸球体腎炎モデル ICGN マウスを用いて、卵巣移植技術がこの系統の維持や生産にきわめて有効な方法であることを示したが、今回は卵巣凍結保存技術を改善し、疾患モデル動物や遺伝子操作動物の系統保存に利用できることを示すために、予備的な研究を開始した。

B. 研究方法

動物はドナー由来とレシピエント由来の産子の区別を容易にするために SV40 large T 抗原遺伝子を導入された C57BL/6 マウスを卵巣のドナーとして用い、レシピエントには C57BL/6 と DBA2 の F1 である BDF1 マウスを用いた。ドナーマウスから卵巣を傷つけない様に摘出し、M2 培地に入れ、1.4MDMSO を含む M2 培地に移した。凍結はいわゆる緩慢法にて行った。す

なわち直ちにプログラムフリーザー（FES SYSTEM 社製 Bio cool III-80）にセットし、0.5C/min で-7C まで冷却し 10 分間保持した。このときに植氷し、さらに 0.5C/min で-70C まで冷却した。その後、液体窒素へ浸し、保存した。融解は室温にて 5 分放置して行い、直ちに新鮮 M2 培地にて卵巣を洗浄した。

移植はまずレシピエント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。次に凍結融解した卵巣を定法に従って卵巣嚢に移植した。移植の成否は卵巣移植されたマウスに雄 C57BL/6 マウスを交配させ、産子を得るか否かで判定した。

C. 研究結果と考察

まず、対照として行った非凍結卵巣の移植は 3 匹のレシピエントマウスに移植し、24 匹の産子を得たが、そのうち 13 匹が遺伝子導入マウスであった。一方、凍結卵巣は 6 匹のレシピエントマウスに移植したが、やはり 24 匹の産子を得、そのうち 15 匹が遺伝子導入マウスであった。この結果、凍結保存されたマウス卵巣は移植により十分な機能を保持していること、出産効率は非凍結卵巣を移植した場合の約半分であること、そして移植卵巣からの産子の割合は非凍結卵巣からの場合と変わらないことが示された。

D. 結論

マウスの卵巣を液体窒素中で凍結保存し、融解後レシピエントの卵巣嚢に移植することにより、産子を得ることをしめた。卵巣凍結保存技術が実験小動物の系統保存技術として利用できることが示された。

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
分担研究報告書

マウスの卵母細胞および胚における水チャンネル遺伝子の発現

分担研究者 葛西 孫三郎 高知大学農学部教授

研究要旨

マウスの卵母細胞および胚における水チャンネルタンパク質であるアクアポリン（AQP）ファミリーのmRNAの発現について調べた。AQP3とAQP7は、第二成熟分裂中期の卵母細胞および4細胞期、桑実期、胚盤胞期の胚のいずれにおいても発現していたのに対し、AQP8とAQP9は胚盤胞期の胚でのみ発現していた。一方、AQP1、AQP2、AQP4、AQP5およびAQP6はいずれのステージにおいても発現していなかった。

A. 研究目的

哺乳動物の卵母細胞や胚の耐凍性は、動物種や発育ステージによって異なる。耐凍性には様々な要因が関与しており、細胞質の濃縮過程や耐凍剤の除去過程における体積変化も大きな要因である。体積変化には、細胞膜の水透過性が大きく関与しているが、その分子レベルの解析はなされていない。最近、哺乳動物細胞で水チャンネル遺伝子が次々と同定され、水チャンネルが様々な組織において細胞の内外への水の透過に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。本研究では、マウスの卵母細胞および種々の発育ステージの初期胚におけるAQPのmRNAの発現について調べた。

B. 研究方法

ICR系マウスから第二成熟分裂中期の卵母細胞および4細胞期、桑実期、胚盤胞期の胚を回収した。各細胞をPVA添加PBSでよく洗浄したのちtotalRNAを抽出し、オリゴd(t)プライマーを用いた逆転写反応によりそのcDNAを得た。そして、各AQPのcDNA配列をもとに作製したプライマーを用いてnested-PCRを行った。AQP1、AQP2、AQP4、AQP7およびAQP8に対するプライマーはマウスの配列から、AQP3、AQP5、AQP6およびAQP9のプライマーはラットの配列から設計した。

C. 研究結果

AQPはすべての発育段階の胚および卵母細胞で発現していたが、発現しているAQPの種類は発育段階によって異なっていた。すなわち、AQP3とAQP7は、卵母細胞および4細胞期、桑実期、胚盤胞期の胚のいずれにおいても発現していたのに対し、AQP8とAQP9は胚盤胞期の胚でのみ発現していた。一方、AQP1、AQP2、AQP4、AQP5およびAQP6はいずれのステージの細胞においても発現していなかった。

D. 考察

一般に、細胞膜を通じた水の透過は、脂質二重膜による拡散とチャンネルによる輸送が考えられる。本研究では、初めて哺乳動物卵子におけるAQPのmRNAの発現を明らかにした。今後は、タンパク質としてのAQPの発現量と実際の透過性との関連について明らかにする必要がある。

E. 結論

マウスの第二成熟分裂中期の卵母細胞および4細胞期、桑実期、胚盤胞期の胚のいずれにおいても、AQP3とAQP7のmRNAは発現していたのに対し、AQP8とAQP9のmRNAは胚盤胞期の胚でのみ発現していた。一方、AQP1、AQP2、AQP4、AQP5およびAQP6のmRNAはいずれのステージの細胞においても発現していなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

○Edashige K, Asano A, An TZ, Kasai M. Restoration of resistance to osmotic swelling of vitrified mouse embryos by short-term culture. *Cryobiology* 38, 273-280 (1999).

○Edashige K, Sakamoto M, Kasai M. Expression of mRNAs of the aquaporin family in mouse oocytes and embryos. *Cryobiology* 40, in press (2000).

2. 学会発表

○坂本恵美・枝重圭祐・葛西孫三郎、マウスの胚および卵母細胞におけるアクアポリンファミリーのmRNAの発現、第92回日本繁殖生物学会、1999.9.

分担研究報告書

モルモット受精卵凍結保存法の開発

分担研究者 鈴木 治 国立感染症研究所獣医科学部研究室

研究要旨

モルモットは他の実験用げっ歯類に比べ非常に卵子・胚の研究が遅れている。特に過排卵技術が未解決であるうえ、胚移植技術も整備されていない。そこで本研究ではinhibin能動免疫による過排卵誘起法、および卵胞発育に重要なFSHリセプターの性質について検討した。さらに胚移植についても検討し、胚移植による産仔の作出が可能であることを確認した。

A. 研究目的

モルモットは実験用げっ歯類の中で唯一ヒトや家畜と同様な完全性周期を営む上、胎盤構造もヒトと類似しており、生殖実験モデルとして利用価値が高い動物であると考えられる。しかし、現時点では効果的な排卵誘起法が確立していないため、発生学的基礎が不十分である。それゆえ凍結保存法を開発するには、まず効率的採卵方法の開発が必要である。さらに、凍結胚の活用には個体作出技術が必須であるので、胚移植の条件についても検討した。

B. 研究方法

- 1) Slc:Hartley系成熟雌モルモットに組換え羊inhibin α -subunitを4週間間隔で3回投与することにより免疫した。その後、成熟雄と交配することにより黄体数および胚の状態を観察した。
- 2) Slc:Hartley系雄モルモットの精巣よりRNAを抽出し、RT-PCRを用いてFSHリセプターcDNAの一部を増殖し、その配列を決定した。
- 3) Slc:Hartley系モルモットの自然交配により8細胞期胚または胚盤胞を得、種々の時期の未経産雌の子宮に移植し、妊娠・分娩を観察した。

C. 研究結果

- 1) インヒビン免疫群 (n=5) は非免疫群 (n=5) に対し黄体数 (12.5 ± 3.0 vs. 4.6 ± 0.2)、採取胚数 (9.8 ± 1.9 vs. 3.4 ± 0.4)、および正常胚数 (7.8 ± 1.4 vs. 2.8 ± 0.8)が有意に高かった。
- 2) FSHリセプター cDNAの一部 (マウスで574番目に相当する部位から510塩基) の配列を決定した。
- 3) 8細胞期胚については匹に移植しても産仔は得られなかったが、胚盤胞の移植により5匹中3匹が妊娠し、1匹の分娩 (産仔1匹) を確認した (2匹は妊娠継続中)。

D. 考察

- 1) inhibinの能動免疫により、黄体数 (排卵数の指標)、採取胚数に有意な増加が見られ、しかも採取胚は形態的に正常であったことから、inhibin能動免疫はモルモットの課排卵法として有効であることが明らかとなった。
- 2) 外因性卵胞刺激ホルモンに対する感受性を担うと思われるFSHリセプターの一部の核酸配列を決定し、アミノ酸配列を他の種と比較したところ、マウス (80%) やラット (83%) よりもヒト (91%) に対する相同性の方が高く、排卵誘起法として以前報告したhMGが有効な理由の可能性が示唆された。
- 3) モルモットの胚移植により産仔を得ることができたが、効率など技術的に改良すべき点が残されているといえる。

E. 結論

新しい過排卵誘起法としてinhibinの能動免疫が有効であった。FSHリセプターのホモロジーから、馬由来よりもヒト由来のFSHの有効性が示唆された。さらに、胚の活用に必須な胚移植がモルモットでも示され、今後この技術を利用して、胚の活用がはかれるものと思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- O. Suzuki, S. Kurosawa, Y. Noguchi, Y. Yamamoto, K. Mochida, J. Matsuda, A. Ogura and T. Asano. Superovulation and embryo transfer in the guinea pig. *Theirogenology*, 53(1) 508, 2000
- Shi, F., Mochida, K., Ogura, A., Matsuda, J., Suzuki, O., Watanabe, G., Hutz, R. J., Tsonis, C. G., Suzuki, A. K. and Taya, K. Follicle selection in cyclic guinea pigs with active immunization against inhibin α -subunit. *Life Sciences*, in press, 2000

2. 学会発表

- 鈴木 治, John J. Eppig. マウス発育途上卵胞内卵子の発育能、第92回日本繁殖生物学会 1999年9月、仙台

1999 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 スナネズミにおける体外授精の方法を確立するために卵細胞質内精子注入法 (ICSI) による顕微授精を試みた。従来の成績に比べ飛躍的な 63% の受精率が得られ、形態的に正常な桑実胚および胚盤胞へと発育した。次に、遺伝子導入スナネズミ作出の可能性を調べるため、緑色蛍光蛋白遺伝子を初期胚に注入した。蛍光発現を示す桑実胚が得られ、今後は遺伝子導入実験への利用も可能であることが理解された。

A. 研究目的

スナネズミ (*Meriones unguiculatus*) は、各種病原体の実験感染モデルとして、また脳神経系疾患等のモデルとして多く用いられている。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、胚移植および体外授精について報告してきた。今回は、改良が必要と思われた体外授精について、顕微鏡下で直接卵子内に精子を導入する卵細胞質内精子注入法 (Intracytoplasmic Sperm Injection; 以下 ICSI) を試みたのでその成果と共に、スナネズミ初期胚への DNA 注入の成績について報告する。

B. 研究方法

<動物>野生色 (MON/Jms:(株)エスエルシー) および国立感染症研究所で繁殖維持している黒色被毛の、SPF 近交系スナネズミを用いた。<卵子、受精卵の採取および体外胚培養>主に 5-7 週齢の雌に PMSG と hCG を各 10 単位、48 時間間隔で投与後、受精卵の採取には金網床で飼育中の交尾経験雄と同居させ、翌朝膈栓を観察した (交配確認日を Day 1 とした)。卵子および受精卵は、卵管の膨大部を針先で切開することにより培養液中に回収した。胚の培養は M-16 液を用い、37°C、5%CO₂ のインキュベータ内に

て行った。

1) ICSI による体外授精：マウスでの方法 (1995 年、Y. Kimura et. al.) に準じて行った。精巢上体尾部の精子をホモジナイズにより尾部を外し、倒立顕微鏡下で内径約 5 μ m のガラス管に吸い込み、hCG 投与後 16-17 時間に採取した卵子の細胞質内に注入した。透明帯と細胞膜の通過はピエゾパルスを用いて瞬時に行った。

2) DNA の注入：ベータアクチンプロモーター・サイトメガロウイルスエンハンサー・緑色蛍光蛋白 (全長 3.18kb、以下 GFP) 遺伝子を、受精卵の雄性前核内、もしくは Day 2 および Day 3 の 2 細胞期胚の片側の細胞の核内へ倒立顕微鏡下で注入した。胚における導入遺伝子の発現は、FITC フィルターを用いて蛍光発色を観察することにより行った。

C. 研究結果

1) ICSI による体外授精：4 回にわたる実験から操作に用いた 128 個の卵子のうち、103 個 (80%) が生存、81 個 (63%) において雌雄両前核が観察され、受精が確認された。次に ICSI 操作後、偽妊娠雌の卵管内へ移植を行い、5 日後に卵管および子宮内より回収して、胚の発育状況を観察した。移植した 57 個の胚のうち 15 個 (26%) が回収され、7 個 (12%) が桑実期-胚盤胞へと発育していた。

2) DNA の注入：前核期胚への GFP 遺伝子の注入後、5 日間の培養で 11% (13/117)の胚に蛍光発現が見られたが、胚のほとんどは 2-4 細胞期で発育を停止していた。次に GFP を注入した胚を偽妊娠雌の卵管中に移植し、5 日後に回収したところ、回収した胚の 38% (28/74) が桑実期へ発育しており、そのうちの 25% (7/28) において蛍光発現が確認された。更に Day 2 および Day 3 の 2 細胞期胚への DNA 注入では操作胚のうちの 67% (33/61) 及び 77% (33/64) の胚が体外培養により桑実胚へ発育していたが、蛍光発現率はそれぞれ 3% (2/61) および 5% (3/64) であった。

D. 考察

スナネズミの体外授精について数例が報告されているが、どれも再現が困難であり、我々の昨年までの結果でも 2-7% の卵子に受精を認めたにとどまっていた。今回行った ICSI は、精子の受精能獲得までの過程が不要であり、困難だった透明帯の通過も物理的に行うために有効と考えられた。実際操作後生存した卵子の 79% に受精が認められ、飛躍的な成果が得られた。その後も胚移植で形態的に正常な桑実胚および胚盤胞へ発育することが確認されており、次の段階として、産仔を得るために実験を継続中である。

スナネズミにおいても、近年では染色体中の DNA 配列の解析がいくつかの実験室で行われていることもあり、初期胚への遺伝子導入を試みた。この実験の中で少なくとも胚での導入遺伝子の発現が確かめられ、遺伝子操作技術を用いたスナネズミの利用の可能性が示された。今後はマウス、ラット以外の実験用小動物として遺伝子機能の種差を探るなどのために応用できるかもしれない。本実験で用いた GFP 遺伝子は視覚的に容易に導入遺伝子の発現が確認できるため、その用途は広く、精子頭部の先体反応の経過を観察することも可能であろう。これはスナネズミ精子の受精能獲得の機構を調べる上で大きな一助になることが考えられる。

E. 結論

スナネズミの体外授精においては卵子細胞質内精子注入法による顕微授精が非常に有効であることが確かめられ、形態的に正常な桑実胚および胚盤胞が得られた。産仔の獲得のために引き続き実験を継続中である。また、スナネズミ初期胚への緑色蛍光蛋白遺伝子の注入によって、導入遺伝子の発現が桑実胚で確認されたことから、スナネズミの遺伝子操作実験への利用について可能性が示された。

F. 研究発表

学会発表

中平美穂、持田慶司、野口章、高野薫、山本美江、野口洋子、中山一栄、小倉淳郎、松田潤一郎：遺伝子導入スナネズミ作出の試み、第 47 回日本実験動物学会総会、2000 年 5 月、徳島市。

K. Mochida, J. Matsuda, R. H. Ponce, M. Nakahira, K. Takano, Y. Yamamoto, Y. Noguchi, and A. Ogura: *In vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection in the Mongolian gerbil. International Congress on Animal Reproduction. 2000 年 7 月、ストックホルム、スウェーデン。

J. Matsuda, K. Mochida, M. Nakahira, A. Noguchi, K. Takano, Y. Yamamoto, Y. Noguchi, K. Nakayama, O. Suzuki and A. Ogura: Green fluorescent protein expression in Mongolian gerbil embryos after DNA microinjection at the 1- and 2-cell stages. International Congress on Animal Reproduction. 2000 年 7 月、ストックホルム、スウェーデン。

(分担) 研究報告書

マウス胚の超急速凍結法の開発：
とくに凍結保存卵および胚の遺伝子操作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所室長

研究組織： 横山峯介・鈴木理可・茂手木淑子

(三菱化学生命科学研究所 生殖工学開発室)

研究要旨：実験操作が簡便な簡易ガラス化法を、より汎用性のある技術として広く応用するための検討の一環として、この簡易ガラス化法で凍結した前核期受精卵を遺伝子導入マウス作成実験の材料として使用できるか否かを検討した。その結果、前核期受精卵では凍結しないものと差のない値で遺伝子導入個体を作成できることが示された。また合わせて、卵細胞質内への精子注入実験の材料としての凍結未受精卵の利用を検討し、ほぼ目的とした結果を得ることができた。

A. 研究目的

マウス胚の凍結保存法は1972年に成功して以来、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様々な方法が開発されている。なかでも超急速ガラス化法は、凍結操作が簡便で、実験に要する時間も極めて短時間ですみ、これからの主流になるものと考えられる。このことからわれわれは、この超急速ガラス化法に改良を加え、さらに手軽で汎用性のある技術の確立を目指して検討を進めている。本研究では、これまで実施してきた簡易ガラス化法を各種実験に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前核期受精卵を使用して遺伝子導入マウスの作成を検討した。さらに、凍結融解した未受精卵を用いて卵細胞質内精子注入実験への利用の可能性を調べた。

B. 材料および方法

実験に使用する前核期受精卵は、性腺刺激ホルモン(PMSG-hCG)の処理によって過排卵誘起したB6C3F1メスを同系オスと交配し、交尾の確認されたものをhCG投与後約18時間に殺処分して卵管膨大部から採取した。また未受精卵は、同様にホルモン処理したメスをhCG投与後約16時間に殺処分して卵管膨大部から採取した。これらの卵の凍結は、これまで検討してきた簡易ガラス化法で行った。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液に卵を入れて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 シュークローズ濃度PB1液を加えて凍害保護剤を希釈し、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た。さらに修正whitten培養液で3回洗浄して形態的な観察を行い、正常と判定されたものを遺伝子導入マウス作成実験に使用した。なお、培養および凍結融解の実験にはガラスアンプルに封入することによって長期保存を可能にした培養液および凍結保存液を使用した。

遺伝子導入マウスを作成するための前核期受精卵は、前述の方法で凍結して一定期間保存後に融解したものを使用した。なお、この他に未凍結のものを対照として使用した。受精卵へのDNA溶液の注入は、マイクロマニピュレーターに接続したガラスマイクロピペットにより雄前核へ顕微注入する方法で行った。操作卵は約20時間培養を行い、2細胞期に発生したものを偽妊娠を誘起したレシピエントメス(偽妊娠第1日目)の卵管に移

植した。

また、卵細胞質内精子注入に使用する未受精卵も凍結融解したものと、コントロールとしての未凍結のものを使用した。未受精卵への精子の注入はKimura & Yanagimachi (1995)の方法に準じた。すなわち、ピエゾ装置を装着したマイクロマニピュレーターに接続したガラスマイクロピペットに精子を吸引し、注意深く細胞質内に顕微注入した。これらの操作卵は培養を行い、前核形成の有無と2細胞期胚への発生を調べた。

C. 研究成果

1) 凍結保存した前核期受精卵による遺伝子導入マウスの作成：簡易ガラス化法により凍結・融解した前核期受精卵は、90%以上が形態的に正常なものとして回収され、DNA注入の実験に使用することができた。また、遺伝子導入マウスの作成では、凍結保存した未受精卵を使用して5種類の遺伝子ベクターを導入したが、いずれでも操作卵に対して約3%の値で遺伝子導入個体が得られた。この成績はコントロールとした未凍結胚を使用して得られた値と遜色のないものであった。

2) 凍結保存した未受精卵への精子注入：前核期受精卵と同様の方法で凍結・融解した未受精卵は、90%以上が形態的に正常なものとして回収され、精子注入実験に使用できた。細胞質内に精子を注入した未受精卵は、顕微操作後に64%(203/315)が生存し、さらに培養により53%(108/203)に前核形成が確認され、その内の76%(82/108)が2細胞期胚へと発生した。この成績はコントロールとした未凍結未受精卵を使用して得られた値と比較すると、顕微操作後の生存性には差がないものの、前核形成および2細胞期胚への発生率は実験によってばらつきがみられ、全体では約10~20%低い値であった。

D. 考察

今回の検討により、簡易ガラス化法で凍結保存した前核期受精卵および未受精卵のいずれも融解したものを実験材料として利用できることが示された。しかし、細胞質内精子注入実験の材料として凍結保存した未受精卵を使用した際の値は、コントロールとした未凍結卵子よりも低いものであった。この原因は、我々の研究室における顕微操作（細胞質内精子注入実験）がまだ完全なものとして確立していないためと推察している。しかし、技術的な改良を行うことにより、遺伝子導入マウスの作成を含めた各種の実験材料としての有効利用が期待できる。

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、凍結胚を遺伝子導入マウス作成実験の材料として使用した。その結果、凍結・融解胚を使用して効率的に目的とする遺伝子導入マウスの作成が可能であることが示された。また、未受精卵の細胞質内への精子注入実験の材料としても凍結保存した未受精卵の利用で可能であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表（総説）

1) 横山峯介：マウス胚の凍結保存. 実験医学別冊. 新訂 新遺伝子工学ハンドブック. pp.263-267, 1999.

2. 論文発表（原著）

1) Matsumoto, M., Iwamasa, K., Rennert, P., Yamada, T., Suzuki, R., Matsushima, A., Okabe, M., Fujita, S. & Yokoyama, M.: Involvement of distinct cellular compartments in the abnormal lymphoid organogenesis in lymphotoxin- α -deficient mice and alymphoplasia (aly) mice define by the chimeric analysis. J.Immunol., 163:1584-1591, 1999.

3. 学会発表

1) 安齋政幸・江藤智生・安藤麻菜美・鈴木理可・竹下綾・茂手木淑子・横山峯介・中

潟直己・中尾和貴・勝木元也：マウス体外受精・体外培養用培地および胚・精子凍結保存液のアンプル封入によるキット化. 第46回日本実験動物学会総会、市川市、1999年5月.

G. 知的所有権の取得状況
なし

分担研究報告書

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

研究要旨

貴重な実験材料として医学研究等への利用がさらに増大すると考えられる疾患モデルマウス胚を凍結保存することにより、効率的な遺伝資源の保管とこれらモデルマウスの安定供給を目的とし、本研究を実施した。遺伝子改変動物を含む計30系統について緩慢凍結法により凍結保存した。またこれら凍結胚を融解・移植し個体再生を行ったところ良好な個体再生結果が得られたことから、凍結保存状況が良好であることが確認された。

分担研究者 高橋 明男
国立精神・神経センター
神経研究所
実験動物管理室 室長

A. 研究目的

疾患モデルマウス（以下、疾患マウス）は医学・生物学領域における生体機能および疾病原因の解明、治療方法の検討等の研究において貴重な実験材料である。さらに近年、遺伝子改変動物の作製が一般化するにつれて人為的に遺伝子操作された疾患マウスが激増することとなり、そのためこれらを維持・繁殖するための飼育スペース、労力およびコストの激増をも招いている。一方、遺伝子資源としての疾患マウスは事故等により、一旦系統が途絶してしまえば同一系統の復活はほぼ不可能である。

このような現状に対応するため、本研究は、これら貴重な遺伝資源である疾患マウスを主な対象として、液体窒素中での効率

的・安定的な凍結保存および凍結胚からの円滑な個体再生を行うことを目的として実施した。

B. 研究方法

1. 疾患モデルマウスからの胚採取

1) 過排卵処置

胚供与雌マウス（以下、ドナーマウス）の腹腔内へ PMSG を投与し、その 48 時間後に hCG を投与して過排卵を惹起した。

なお、自然交配による受精卵採取の場合は、hCG 投与直後に雄マウスと同居させて交配を行い、体外受精（以下、IVF）を実施する場合は、雄マウスとの交配は実施せず、翌日

午前中に胚採取を行った。

2) 胚採取

体外受精を実施する場合は過排卵処理を行った全てのドナーマウスについて、また自然交配を行ったマウスについては、交配翌日の朝にドナーマウスにおける膣栓の有無を確認し、膣栓の存在により交配が確認されたドナーマウスについて胚採取を実施した。

ドナーマウスを頸椎脱臼により安楽死した後、腹部切開により卵管を摘出した。摘出卵管を PB1 溶液で灌流して得られた卵塊を、さらにヒアルロニダーゼ溶液で処理し (IVF の場合は実施しなかった)、未受精卵または受精卵を採取した。未受精卵についてはさらに 3) IVF を行い、自然交配により得られた受精卵については 4) 培養を行った後に凍結を実施した。

3) IVF

胚採取に先立ち、成熟雄マウスを安楽死処分した後摘出した精巣上体の尾部を解剖針で切開し、精子塊を HTF 培地へ懸濁させ、CO₂ インキュベーター内で 1 時間培養した。

最終的な精子濃度が 200/1 μ l となるように調整した精子懸濁液を上記で採取した未受精卵の入ったドロップへ入れ、翌日まで一晩 CO₂ インキュベーター内で媒精を行った。

4) 培養

IVF または自然交配により得られた受精卵を 37°C、5%CO₂ の環境に

維持した CO₂ インキュベーター内で一晩培養した。培養期間終了後、実体顕微鏡下で形態的に正常な 2 細胞期胚のみを選別し、凍結保存胚とした。

5) 凍結保存 (緩慢凍結法)

得られた胚を PB1 で 3 回洗浄した後、PB1 100 μ l 及び 2M DMSO 50 μ l を入れたクライオチューブへチューブ 1 本当たり 30~40 個となるよう胚を移した。これらチューブにさらに 2M DMSO 50 μ l を加え 4°C で 10 分間静置した。

次いでチューブを 0°C にしたプログラムフリーザーに移し、-7°C まで 0.5°C/min. の速度で冷却した。さらに -7°C に達した時点で、液体窒素気相中で冷却した有柄針を保存液の液面に近づけ植氷 (Seeding) を行った。

植氷実施後は -50°C まで 0.5°C/min. の速度で、-50°C 到達後は -70°C まで 1.0°C/min. の速度で冷却を行った。

最後に、-70°C まで冷却したチューブをケーンにセットし、液体窒素タンクの液相中に浸漬して保存した。

6) 融解操作

液体窒素中のチューブを取り出し、室温に静置した (10°C/min. の温度上昇)。保存液が完全に融解した時点から 2 分間隔で 100、100、200 μ l 容量の PB1 をチューブに添加した。チューブから胚を回収し、PB1 で 3 回洗浄した後さらに mW 培養液で 3 回洗浄してから CO₂ インキュベータ

ー (5%CO₂、37°C) で 30 分間保持した。

30 分経過後に実体顕微鏡下で形態的な選別を行い、正常な 2 細胞期胚を移植用胚とした。

7) 移植

前日に雄マウスと同居させ、翌日膣栓により交配が確認できたマウス (以下、レシピエント) をペントバルビタール腹腔内投与により麻酔し、背側切開部より卵巣、卵管および子宮の一部を体外へ露出させた。実体顕微鏡下において卵巣嚢を切開し、露出した卵管采へマイクロピペットを挿入し、正常 2 細胞期胚を卵管内へ注入・移植した。移植後は露出臓器を腹腔内へ戻し、腹壁筋層および皮膚を縫合した。レシピエントは麻酔から覚醒するまで保温灯下におくことで体温の保持を図り、覚醒後は飼育室へ戻して、通常飼育を行った。

8) 出産・哺育・離乳

移植後 19 日目までに出産したレシピエントでは、そのまま離乳時期まで哺育を行わせた。20 日目までに出産しなかったレシピエントについては、常法に従い帝王切開で産児を摘出し、別に準備した里親マウスにつけて哺育させた。

なお、離乳は出産後 3~4 週間を目安とし、離乳にまで至った個体数を最終的な個体再生成績とした。

(倫理面への配慮)

大部分の実験操作は適切な安楽死処分に実施され、胚移植については麻酔処置に

よる苦痛の軽減、保温器具による体温維持に最大限配慮した。移植後のマウスについても毎日その状態を観察し、異常の無い事を確認した。

なお、これらの実験手技は全て、実験実施に先立ち国立精神・神経センター 神経研究所 倫理問題検討委員会の審査を受け、承認された内容のみを実施した。

C. 研究結果

本研究による疾患マウス胚の凍結保存を実施するに当たり、従来の緩慢凍結法による当施設での凍結胚保存に問題が無いか否かを検証する目的のため、既に凍結保存後 1~5 年を経過した凍結胚について融解、個体再生を試みた結果を表 1 に示す。融解後の回収率は 93.8~100.0%、回収胚に対する形態正常 2 細胞期胚の比率は 77.5~92.9%であり、最終的に凍結胚数に対する正常 2 細胞期胚数の比率は 75.0~91.0%であった。また、これら融解した 2 細胞期胚をレシピエントマウスに移植し得られた産児数の移植胚数に対する比率は 16.7~48.1%であったが、IQI、mdx-nu 系統を除けば概ね 30%前後かこれ以上の成績であった。融解胚数に対する最終的な離乳率についてはレシピエントマウスによる喰殺が見られた IQI、C4W、nmd 系統を除き、14.3~37.5%であった。

緩慢凍結法による凍結保存技術の検証結果を受け、疾患モデルマウスについて 2 細胞期胚の凍結保存を試みた (表 2.1、2.2)。過排卵処置による排卵数は 4.5~34.5 個と系統差が見られた。また、採取した 1 細胞期胚数に対する形態的に正常な 2 細胞期胚