

20030719

厚生労働科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

疾患関連遺伝子の機能解明のための実験動物研究資源の
基盤整備に関する研究

課題番号：H14-ゲノム-008

平成15年度 研究報告書

主任研究者：松田潤一郎
(国立感染症研究所)

平成16年3月

目 次

総括研究報告

- 疾患関連遺伝子の機能解明のための実験動物研究資源の基盤整備に関する研究・・・1
主任研究者 松田潤一郎 国立感染症研究所 獣医科学部 室長

分担研究報告

- 疾患モデル動物研究資源の維持管理、胚・配偶子等の保存に関する研究・・・5
松田潤一郎 国立感染症研究所 獣医科学部 室長

- 疾患関連遺伝子の機能解明のための実験動物研究資源の基盤整備に関する研究・・・8
葛西 孫三郎 高知大学農学部教授

- マウス卵巣の凍結保存法の検討・・・12
横山 峯介 三菱化学生命科学研究所マウスゲノム工学センター長

- 疾患関連遺伝子の機能解明のための実験動物研究資源の基盤整備に関する研究・・・15
中湯 直己 熊本大学生命資源研究・支援センター教授

- 卵巣内卵子の有効活用による新規生殖工学技術の開発・・・17
鈴木 淳郎 国立感染症研究所 獣医科学部 主任研究官

- 胚・配偶子保存のための新規生殖工学技術の開発改良・・・18
加倉 淳郎 理化学研究所 分子生物学部 分子生物学研究室長

- 精子細胞を用いた遺伝的品質検査法の開発および改良による抗体検出・・・21
加藤 秀樹 浜松医科大学医学部附属動物実験施設助教授

- 各種実験動物の血清抗体検査にELISA法による抗-H.V.J抗体検出・・・22
山田 靖子 国立感染症研究所 動物管理室長

- 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・30

- 文献・・33

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総括研究報告書

疾患関連遺伝子の機能解明のための実験動物研究資源の基盤整備に関する研究

主任研究者 松田潤一郎 国立感染症研究所獣医科学部 室長

研究要旨

本研究では、疾患モデル動物を中心とした実験動物研究資源の基盤整備を目的とし、各種実験動物の胚・配偶子等の保存、新規生殖工学技術の開発、遺伝学的及び微生物学的品質管理などに関する総合的研究を行った。（1）保存に関しては、①マストミス及びスナネズミの精子凍結保存が可能であり、スナネズミ凍結-融解精子の受精能が確認された。②マウス2細胞期胚を卵管ごと48時間保存する技術を開発した。③各週齢のマウス卵巣の凍結保存が可能であることと示した。④ラット精子の凍結保存については、近交系、ミュータントおよびトランスジェニックラットなどの精子の凍結保存が可能であり、人工授精により産子が得られることが明らかとなった。2）新規生殖工学技術として、①ガラス化保存卵巣由来卵子から胚盤胞が得られ、体外発育培養による胚の入手が可能であることがわかった。②試みた全ての実験系および系統のマウスで顕微授精により産子の作出に成功した。成体幹細胞から初めてクローン産子を作成したが、効率は低かった。（3）遺伝学的及び微生物学的品質管理については、①常法で凍結された保存精子の少量を用いてマイクロサテライト DNA マーカーの検出が可能であることを示した。②多くの実験動物種がHVJに対する感受性があることが示され、高感度検出系としてのELISA法を開発した。

分担研究者

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マウスゲノム工学センター長
中瀧直己	熊本大学動物資源開発研究センター教授
鈴木治	国立感染症研究所獣医科学部主任研究官
小倉淳郎	理化学研究所バイオリソースセンター室長
加藤秀樹	浜松医科大学医学部附属動物実験施設助教授
山田靖子	国立感染症研究所動物管理室室長

の開発、維持管理、胚・配偶子等の保存、供給、遺伝学的及び微生物学的品質管理などに関する総合的研究を行った。また本研究では、マウスのみならずスナネズミ、マストミスなど各種動物についても疾患モデルとして貴重であることから、研究対象として積極的に取り上げた。これらにより、ヒトの疾患関連遺伝子の機能が解明され、予防法、治療法、治療薬などの開発に結びつき、国民の健康、福祉の一層の向上に寄与することが期待される。

A. 研究目的

ヒトゲノム解析が急速に進展することにより、ゲノム情報に基づいた病気の発症機構の解明、治療法開発、予防医学などのゲノム医学、あるいは画期的な治療薬を開発するなどのゲノム創薬の発展が期待されている。これらを強力に推進するためには個体レベルの研究が必須であり、ヒトのモデルとなる疾患モデル動物を用いた研究が不可欠である。そこで本研究では、疾患モデル動物を中心として、ゲノム医学、ゲノム創薬などの研究にスムーズに有効に利用されるための実験動物研究資源の基盤整備を目的とし、実験動物研究資源

B. 研究方法

1) マストミス及びスナネズミ精子の凍結保存法の開発：凍結保存液として、マストミス精子は18%ラフィノース+0.7% Equex Stem+25%卵黄を、スナネズミ精子は18%ラフィノース+1% Equex Stem+20%卵黄を遠心処理したものをを用いた。融解精子の受精能を人工授精、体外受精等で検討した。（松田、協力研究者：明治大学太田昭彦）

2) 胚輸送法の開発：胚凍結技術を持たない施設からマウスを輸送する手段として、胚を卵管ごと送る方法を開発した。ICR系またはC57BL/6マウスの卵管を5℃、0℃、あるいは-5℃の、0~1.5 Mのシュクロースを含むPB1液で48時間保存したのち、体外と体内での発育能力をしらべた。一部の胚は、高知から熊本へ輸送して移植した。（葛西）

3) マウス卵巣凍結保存法の開発：マウス系統の新たな維持・保存法として卵巣の凍結保存技術を確認し、実用化を図るための検討を行った。2, 8, 11ならびに20週齢のGFP-Tg 雌から卵巣を摘出し、修正簡易ガラス化法で凍結保存した。融解した凍結卵巣は、レシピエント雌の卵巣嚢内に定法によって移植し、雄と自然交配して移植卵巣由来の産仔が得られるかを調べた。(横山)

4) ラット精子凍結保存法の開発：各種ラットの精巣上体精子を採取し、凍結保存を行った。融解後、運動精子の割合を顕微鏡下で調べ、運動精子率を出した。妊娠率、分娩率および一腹あたりの産子数に関しては、凍結融解後の精子を偽妊娠誘起したラット子宮内に注入することにより行った。(中潟)

5) 卵巣内卵子の有効活用に関する研究：卵胞発育培養系を用いて、ガラス化保存卵巣から卵巣移植を経ずに胚を得る方法について検討した。13日齢のB6D2F1雌マウスの卵巣をDAP213液を用いて液体窒素内にて保存後、解凍した。卵巣から卵胞を採取しEppigの方法で体外発育、体外成熟培養ののち、体外受精し、媒精後120時間まで培養した。(鈴木)

6) マウス顕微授精技術と核移植クローン術技術開発：マウスクローン作製は、除核卵子へドナー細胞核を注入あるいは電気融合により移植し、卵子のストロンチウムによる活性化後に胚培養および胚移植を行った。ウサギクローン作製はマウスと基本的に同じ方法であるが、除核は卵子の遠心による可視化、活性化はIP3により行った。(小倉)

7) 精子細胞を用いた遺伝的品質検査法の開発および改良：精子を材料とした遺伝的品質検査法の基礎的研究を行った。肝細胞および精子細胞の核DNAの精製については常法により、また、微量の精子細胞からは血球計算盤を用いてカウントし、適切な細胞数をエッペンドルフチューブに採った。PK加非イオン性界面活性剤(0.45%NP40, 0.45%TW20)の効果を検討した。(加藤)

8) 各種実験動物の血清抗体検査、ELISA法による抗HVJ抗体検出：各種小型齧歯類のHVJに対する感受性を確認すると共に、より高感度で簡便なELISA法により各種動物の抗HVJ抗体の検出を試みた。マストミス、スナネズミ、ハムスター、モルモットにHVJを経鼻感染し、4週後に血清を得た。感染血清または免疫血清を陽性コントロールとし、標識抗動物IgGおよびProtein Gを2次抗体としてELISAによる抗HVJ抗体の検出を行った。(山

田、協力研究者：感染研動物管理室 中山一栄、滝本一広)

(倫理面への配慮)

実験動物については、各施設に於ける実験動物委員会等の承認を得、適切な取り扱いを行った。

C. 研究結果

1) マストミス及びスナネズミ精子の凍結保存法の開発：凍結-融解マストミス精子の運動精子率は最大で25%に達し、活発な動きを示す多数の精子が得られたが、受精能を確認することはできなかった。一方、凍結-融解スナネズミ精子では運動精子率が25%以上を示し、体外受精系で受精能力のあることが確認された。

2) 胚輸送法の開発：胚は、0.8-0.9 Mのシュクロースを添加したPB1液に浸して、0-5°Cで保存するのが適している。C57BL/6マウスの胚を卵管ごと0°Cに冷蔵して48時間保存し、その間に高知から熊本まで輸送したのち移植した結果、高率に生存産子が産まれた。

3) マウス卵巣凍結保存法の開発：各週齢の雌から摘出した卵巣を凍結保存し、融解後に移植することによって、移植卵巣由来の産仔を安定した成績で得られることが確認された。しかし、対照群の新鮮卵巣の成績に比較すると効率が低かった。

4) ラット精子凍結保存法の開発：凍結融解後、調べた全ての系統の精子に運動性が確認された。また、それら融解精子を子宮内に注入したところ、一腹あたりの産子数には、多少、ばらつきが見られたものの(一腹あたりの産子数：2-7匹)、全ての系統で産子が得られた。

5) 卵巣内卵子の有効活用に関する研究：融解後30分静置した群で得られる卵子数は 210.7 ± 28.6 個(3回の平均±標準誤差)であり、卵子成熟率は $6.4 \pm 0.9\%$ であった。体外受精胚は胚盤胞へ $9.9 \pm 1.6\%$ が発生し、凍結卵巣由来卵胞の体外発育培養の有効性が確かめられた。

6) マウス顕微授精技術と核移植クローン術技術開発：試みた全ての実験系および系統のマウスで顕微授精により産子の作出に成功した。成体幹細胞から初めてクローン産子を作成したが、効率は低かった。始原生殖細胞からのクローン産子作出に初めて成功した。

7) 精子細胞を用いた遺伝的品質検査法の開発および改良：精子細胞から抽出した核DNAを定量したところPK処理1時間に比べ16時

間の方が約 2 倍の収量であった。核 DNA の調製における非イオン性界面活性剤の効果を調べたところ、非添加に比較して PCR プロダクトをバンドとしてより鮮明に検出することができた。

8) 各種実験動物の血清抗体検査、ELISA 法による抗 HVJ 抗体検出：ウサギ、モルモット、ハムスター、マストミスでは Protein G が二次抗体として最適であった。スナネズミではいずれの二次抗体でも特異抗体は検出できなかったが、CF 法により感受性が確認された。

D. 考察

マストミスの凍結-融解精子は活発な動きを示すにもかかわらず、今回は受精能力を確認できなかった。今後、卵子採取法や体外受精系の改良が必要であろう。一方、スナネズミ凍結-融解精子は、透明帯除去卵子を用いて受精能力を堪忍できた。今後、体外受精や人工授精の成功が期待される。

卵管ごと胚を輸送するには、保存液にシュクロースを添加すると、0℃あるいは-5℃における保存可能期間は大幅に延長され、胚は 48 時間保存後も高率に生存することができた。

マウス卵巣凍結については、生後 2, 8, 11 ならびに 20 週齢の各雌から摘出した卵巣を凍結し、融解後にレシピエント雌に移植することによって、移植卵巣由来の産仔を安定した成績で得られることが確認された。しかし、凍結を行わない新鮮卵巣を移植した対照群の成績に比較すると、産仔の得られる効率が低いことから、さらに検討が必要であることが示唆された。

ラット精子の凍結保存については、用いた全系統で精子の凍結保存が可能であったことから、今後、ミュータントを含む遺伝子改変ラットなどの系統保存に応用できる可能性が強く示唆された。

卵巣の凍結保存における卵胞卵子の生存性は、凍結方法もさることながら、解凍方法に強く依存していることがわかった。卵胞のステージによって耐凍能や耐凍剤の影響が異なることも知られており、卵巣移植を前提としたものとは、異なった視点で改良が必要であると考えられた。

クローンマウスを得るという実用面での改善は、ドナー細胞種と遺伝子型を選ぶことにより可能であった。解析用に多数のクローンマウスが必要になる場合には、極めて有効な方法である。ウサギクローンに関しては、卵子の正常な活性化が困難なため、この点で技

術的改善を試み、まだ効率は低いですが、胎仔を得ることに成功した。

精子を用いた遺伝的検査は、残った精子懸濁液を使って判定を行うことは十分可能であることが明らかになり、融解した凍結精子のうち体外受精などに使われたあとの残った精子懸濁液を用いて、マイクロサテライトマーカーの genotyping に使用し、由来系統を同定することが可能と考えられた。

マストミス、スナネズミは、ハムスター、モルモット、ウサギと同様に HVJ に対し感受性があることが示された。実験動物施設では、これら動物種が汚染源となる可能性があるため、マウス等と同様に定期的な検査が必要と考えられた。

E. 結論

本研究では、疾患モデル動物を中心とした実験動物研究資源の基盤整備を目的とし、各種実験動物の胚・配偶子等の保存、新規生殖工学技術の開発、遺伝学的及び微生物学的品質管理などに関する総合的研究を行った。

(1) 保存に関しては、①マストミスとスナネズミの精子凍結はラフィノースに卵黄と界面活性剤を添加した保存液によって可能であり、マストミス凍結-融解精子では受精能を確かめることが出来なかったが、スナネズミ凍結-融解精子は体外受精系で受精能力のあることが確かめられた。②0℃の 0.8 M シュクロース添加 PB1 液を用いることによって、遺伝子改変マウスの主要な系統である C57BL/6 マウスの 2 細胞期胚を卵管ごと 48 時間保存することができる。したがって、この間に国内輸送が可能である。③マウス卵巣の凍結保存に付いては、各週齢の雌から摘出して凍結保存された卵巣から、移植によって再現性のある成績で産仔の得られることが確認された。さらに成績の向上を図る必要があるが、近い将来に実用化が期待される。④ラット精子の凍結保存については、凍結保存成績は、必ずしも良好とは言えないが、クローズドコロニー、近交系、ミュータントおよびトランスジェニックラットにおいて、精子の凍結保存が可能であり、それら精子を用いた人工授精により産仔が得られることが明らかとなった。

(2) 新規生殖工学技術として、①凍結-融解卵巣から胚を得る方法を検討し、非常に低率ではあるが、ガラス化保存卵巣由来卵子から胚盤胞が得られ、体外発育培養による胚の入手が可能であることがわかった。しかし、体外成熟率が非常に低く、今後の改良を要する。

②マウス顕微授精実験から、顕微操作、胚の培養技術、胚移植技術が一定以上のレベルになれば、マウスバンク事業へ十分応用が可能であることを明らかにした。核移植クローン実験から、成体幹細胞ゲノムは必ずしも再プログラム化されやすくはないこと、生殖細胞ゲノムは完全に再プログラム化されうることを明らかにした。

(3) 遺伝学的及び微生物学的品質管理については、①精子懸濁液として凍結保存されているマウス系統の遺伝的品質を確認する方法として、精子レベルでの系統識別法に研究を行った結果、常法で凍結された保存精子(10 μ l)の1/20量を用いて5種類のマイクロサテライトマーカを検出することが可能になった。②今回検討した動物種はすべてHVJに対する感受性があることが示された。Protein Gを用いたELISA法は、マストミス、ハムスター、モルモット、ウサギの抗HVJ抗体を高感度に検出でき、これら動物種の血清抗体検査に有用であると思われた。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

別掲。

H. 知的所有権の取得状況

該当無し。

疾患モデル動物研究資源の維持管理、胚・配偶子等の保存、供給に関する研究

主任研究者 松田潤一郎 国立感染症研究所獣医科学部 室長

研究要旨

疾患モデルとして重要であるマストミス及びスナネズミの精子凍結保存法の開発を目的に、凍結-融解精子の受精能力の検討を行った。ラフィノースに卵黄と界面活性剤を添加した保存液によって、マストミスとスナネズミの精子凍結は可能であり、凍結-融解後、活発な動きを示す精子を得ることが出来た。マストミス凍結-融解精子は、体外受精系などでは受精能を確かめることが出来なかったが、スナネズミ凍結-融解精子は透明帯除去卵子を用いた体外受精系で、受精能力のあることが確かめられた。

A. 研究目的

マストミス (*Praomys coucha*) は、アフリカ原産の齧歯類で、腫瘍学や疫学において多用されている重要な実験動物である。また、多様な遺伝的変異が見られ、遺伝資源としても興味深い存在である。スナネズミ (*Meriones unguiculatus*) は、脳梗塞やてんかん、さらには寄生虫や細菌感染など多様な医学生物学研究に用いられている実験動物である。これら2種の動物は、疾患モデルとして重要であり、昨年度までに精子の凍結保存法について基礎的検討を行い、精子の運動性を指標に凍結保存液を開発した。本年度は、凍結融解した両種の精子の受精能力について検討した。

B. 研究方法

1) マストミス凍結-融解精子の受精能判定

動物は、MST、MCC、RI-7 の3近交系の4~8か月令成熟雄を用いた。凍結保存液は、今までの検討から凍結-融解後の運動精子率がもっとも良かった18%ラフィノース+0.7% Equex Stem+25%卵黄を用いた。融解は10秒間37℃温水中にて行った。凍結-融解精子の受精能の判定は、30~60日齢未成熟雌マストミスを用いた人工授精、ハムスターテスト、未成熟マストミスの体外成熟-透明帯除去卵子を用いた体外受精による。さらにレクチン染色により先体の形態的な変化を観察した。

2) スナネズミ凍結-融解精子の受精能判定

精子採取には、近交系スナネズミ MG-B (黒色) と MG-W (白色) の6~8か月令成熟雄を用い、雌は上記の2系統及び MGS/Sea の雌5~7週令を用いた。凍結保存液として、18%ラフィノース+1% Equex Stem+20% 卵黄を遠心処理したものを用いた。遠心処理により凍結時の精子観察を容易になった。凍結-融解精子の受精能の判定は、人工授精、ハムスターテスト、スナネズミ卵子 (卵丘細胞付き、卵丘細胞除去、透明帯除去の各卵子) を用いた体外受精により行った。

(倫理面への配慮)

実験動物については、実験動物委員会の承認を得、適切な取り扱いを行った。

C. 研究結果

凍結-融解マストミス精子の運動精子率は最大で25%に達し、活発な動きを示す多数の精子が得られたが、受精能判定に関しては、未成熟雌マストミスを用いた人工授精、ハムスターテスト、未成熟マストミスの体外成熟-透明帯除去卵子を用いた体外受精の全てで受精を確認することはできなかった。一方、LEL レクチン染色により凍結-融解精子の先体膜が正常 (intact) であるか否か (先体膜が障害を受けている、もしくは先体反応を起こしている) を明らかにすることができた。

スナネズミ精子では、凍結-融解により運動精子率が25%以上、そのうち半分以上がhyperactivation様の鞭打ち運動を示した。凍結-融解精子を用いた人工授精では受精卵は得られなかったが、ハムスターテスト、透明帯除去スナネズミ卵子を用いた体外受精により凍結-融解精子に受精能力のあることが確認された。とくに融解精子を遠心処理した後スイムアップしてくる精子を用いて、透明帯除去スナネズミ卵子による受精能判定で、50%程度の受精率が得られた。

D. 考察

マストミスの凍結-融解精子は、活発な動きを示すにもかかわらず、本研究においては受精能力を示すことは出来なかった。マストミスは性周期が明確でなく、卵子が簡単に得られないことや、再現性の高い体外受精系も確立されていないことから、今後、効率良く正常卵子を得る方法や体外受精系の開発が必要であろう。今回、LELレクチンが先体構造の観察に有効であることが判明したので、これを指標に凍結-融解精子の正常性などの検討が進むものと考えられる。

スナネズミ凍結-融解精子は運動精子率も高く、hyperactivation様の動きも活発に示し、遠心後のスイムアップにより特に運動性の良い精子を回収することが出来、透明帯除去卵子を用いて受精能力のあることが示された。今後、通常の卵丘細胞付きの卵子を用いた体外受精や人工授精の成功に向けて各種条件の検討が必要であろう。

E. 結論

ラフィノースに卵黄と界面活性剤を添加した保存液によって、マストミスとスナネズミの精子凍結は可能であり、凍結-融解後、活発な動きを示す精子を得ることが出来た。マストミス凍結-融解精子は、体外受精系などでは受精能を確かめることが出来なかったが、スナネズミ凍結-融解精子は透明帯除去卵子を用

いた体外受精系で、受精能力のあることが確かめられた。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

Koura M, Handa H, Noguchi Y, Takano K, Yamamoto Y, Matsuda J, Suzuki O. Sequence Analysis of cDNA Encoding Follicle-stimulating Hormone and Luteinizing Hormone Beta-subunits in the Mongolian Gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Gen Comp Endocr*, in press, 2004.

Noguchi A, Takekawa N, Einarsdottir T, Koura M, Noguchi Y, Takano K, Yamamoto Y, Matsuda J, Suzuki O. Chromosomal mapping and zygosity check of transgenes based on flanking genome sequences determined by genomic walking. *Exp Anim*, in press, 2004.

Matsuda J, Suzuki O, Oshima A, Yamamoto Y, Noguchi A, Takimoto K, Itoh M, Matsuzaki Y, Yasuda Y, Ogawa S, Sakata Y, Nanba E, Higaki K, Ogawa Y, Tominaga L, Ohno K, Iwasaki H, Watanabe H, Brady RO, Suzuki Y. Chemical chaperone therapy for brain pathology in GM1-gangliosidosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 15912-15917, 2003.

Miura S, Tsunoda N, Ikeda S, Kai Y, Ono M, Maruyama K, Takahashi M, Mochida K, Matsuda J, Lane MD, Ezaki O. Regulatory sequence elements of mouse GLUT4 gene expression in adipose tissues. *Biochem Biophys Res Commun*, 312: 277-84, 2003.

Ogonuki N, Mochida K, Inoue K, Matsuda J, Yamamoto Y, Takano K, Ogura A. Fertilization

of Oocytes and Birth of Normal Pups
Following Intracytoplasmic Injection with
Spermatids in Mastomys (*Praomys coucha*).
Biol. Reprod., 68: 1821-7, 2003.

2. 学会発表

小浦美奈子、平田淳也、高野薫、松原純子、
野口洋子、山本美江、鈴木治、太田昭彦、松
田潤一郎：スナネズミ精子の凍結保存法の検
討. 第50回日本実験動物学会総会、2003年5
月、さいたま市.

平田淳也、小浦美奈子、高野薫、松原純子、
野口洋子、山本美江、鈴木治、太田昭彦、松
田潤一郎：マストミス精子の凍結保存法の検
討. 第50回日本実験動物学会総会、2003年5
月、さいたま市.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し。

厚生労働科学研究費補助金(ヒトゲノム再生医療等研究事業)
分担研究報告書

疾患関連遺伝子の機能解明のための実験動物研究資源の基盤整備に関する研究

卵管ごと冷蔵保存したマウス胚の輸送

分担研究者 葛西 孫三郎 高知大学農学部教授

研究要旨

マウスを授受する簡便な方法として、2細胞期胚を卵管ごと冷蔵輸送することを想定し、適する条件について検討した。0°Cの0.8 M シュクロース添加 PB1 液を用いると、胚は48時間保存しても高率に胚盤胞まで発育した。ICR マウスの胚を卵管ごと同液で48時間保存すると、しばしば胚同士が付着がみられ、生存率も低下した。しかし、C57BL/6 マウスの胚は、卵管ごと保存後も生存率が高く、輸送したのち移植した結果、約50%が生存産子まで発育した。本法を用いることによって、簡便な胚の輸送が可能と思われる。

A. 研究目的

トランスジェニックや遺伝子ノックアウトの技術の普及にともなって、施設間でマウスを輸送する必要性が増大している。しかし、生体の授受には病原体による汚染の危険性があるため、凍結胚による授受が好ましい。しかし、この場合、発送する側にも胚凍結技術が不可欠で、また液体窒素で輸送するための高価で大型の容器も必要である。最近、マウス胚を卵管ごと4°CのPB1液に入れて輸送できることが示されたが(Kamimura et al., *Comp Med* 53:393, 2003)、保存可能期間は36時間であり、この方法の実用化のためには、2日間の保存が望まれる。一方、マウス桑実胚は、0.5-0.75 M シュクロースを添加した0°CのPB1液で保存すると、さらに長時間保存できることが知られている。そこで、冷蔵保存したマウス2細胞期胚の生存性におよぼす要因を検討し、さらに実際にマウス胚を卵管ごと輸送して、48時間冷蔵保存した胚の発育能力をしらべた。

B. 研究方法

ICR系またはC57BL/6の雌マウスにPMSGとhCG注射して過排卵を誘起し、同系の雄と交配させた。hCG注射の45時間後に2細胞期胚を含む卵管を採取した。一部の卵管は、熱したピンセットで両端を塞いだ。胚は、卵管から取り出したのち、または卵管

ごと、5°C、0°C、あるいは-5°Cの、0~1.5 Mのシュクロースを含むPB1液に入れてクライオチューブに保存した。48時間後に保存液をPB1液で希釈して胚または卵管を回収し、卵管からは胚を取り出した。回収した胚の一部は、0~2時間培養したのちガラス化凍結して融解した。胚の生存性は、割球の形態と体外培養後の胚盤胞への発育能力によってしらべた。また、一部のC57BL/6胚は、卵管ごと0°Cの0.8 M シュクロース添加PB1液に浸して、高知大学から熊本大学に輸送し、48時間後に回収した胚を受容雌の卵管内に移植して産子への発育能力をしらべた。(倫理面への配慮)

マウスは安楽な手法(頸椎脱臼法)で屠殺した。屠殺方法を含む実験計画は、高知大学農学部の動物実験委員会に申請し、承認を受けている。

C. 研究結果

卵管から取り出したICRマウスの胚を5°Cで48時間保存した場合には、保存液にシュクロースを含まない場合にも、一部の胚は胚盤胞まで発育した。しかし、5°Cにおいてはシュクロースの保護効果はほとんど見られなかった。胚を0°Cで保存した場合には、保存液に加えたシュクロース濃度が0~0.9 Mの区では、ほとんどすべての胚が正常な形態を有していた。しかし、胚盤胞への発育率は、

シュクロース濃度が 0.8-0.9 M の区で最も高く(82%)、0-0.25 M 区では 0%であった。保存温度を-5℃まで低下させると、生存率はわずかに高まった ($P>0.05$)。したがって、シュクロースを添加した保存液を用いて、より低温に保存することが好ましいと思われるが、輸送中の温度管理を考慮して、以下の実験では胚を 0℃に保存した。

ICR 胚を卵管ごと 0℃の 0.8 M シュクロース/PB1 液に保存した場合には、胚を取り出して保存すると、正常形態胚の割合は低下したが(62-80%)、そのうちの約 70%は胚盤胞まで発育した。シュクロース濃度を 0.5 M に低下させると正常形態胚の割合はやや増加したが(75-91%)、胚盤胞への発育率は大きく低下した(約 20%)。卵管ごと 0℃のシュクロース液に保存した ICR 胚は、胚同士が付着して歪む現象がしばしば見られた。しかし、保存前に卵管の両端を塞ぐと胚同士の付着は見られなかったことから、この現象はシュクロース液が卵管内に浸入するために生じるものと推測された。これに対して、C57BL/6 マウスでは、卵管を塞がない場合でも胚同士の付着は見られず、体外での発育率もやや高かった。

C57BL/6 胚を含む卵管を 0℃の 0.8 M シュクロース/PB1 液に浸して輸送し、48 時間後に胚を回収した結果、63%が 2 割球とも正常(2/2 胚)で、23%が 1 割球のみ正常(1/2 胚)であった。そのうち、計 175 個の 2/2 胚を 10 匹の受容雌に移植した結果、すべての雌が妊娠し、91 匹(52%)の生存産子が得られた。一方、33 個の 1/2 胚を 2 匹の受容雌に移植した結果、1 匹が出産した産子を食殺したため、生存産子は 3 匹(9%)しか得られなかった。しかし、31 個の 1/2 胚を、43 個の ICR の 2/2 胚(凍結胚)とともに 4 匹の受容雌に移植した結果、ICR 産子とともに、8 匹(26%)の B6 産子が得られた。

ICR 胚を用いて、卵管ごと 0℃で 48 時間保存した胚を回収したのち、直ちにあるいは 2 時間培養後に、EFS40 を用いたガラス化法で凍結保存した。融解した胚の体外での生存率は、2 時間培養後にガラス化した場合が有意に高く、56%が胚盤胞まで発育した。このことから、0.8 M シュクロース添加 PB1 液を

用いて卵管ごと冷蔵輸送した胚を、さらに凍結保存することができると思われる。

D. 考察

マウス 2 細胞期胚を等張な溶液で保存する場合には、0℃に比べて 5℃が適していると考えられる。しかし、保存液にシュクロースを添加すると、0℃あるいは-5℃における保存可能期間は大幅に延長され、胚は 48 時間保存後も高率に生存することができる。シュクロースの適する濃度は、0.8-0.9 M と考えられ、それより高くなると、形態を維持できない胚が増加することから、過度な収縮による傷害を受けるものと推測される。

胚を卵管ごと保存すると、胚を取り出して保存した場合に比べて、生存性が低下した。この理由は不明であるが、ICR マウスでは、シュクロースが卵管内に浸入することによって、胚(透明帯)が粘着性をおび、付着して歪むことが一因と考えられる。しかし C57BL/6 マウスでは、この現象が見られなかったが、これは、ICR より小型の C57BL/6 マウスでは、卵管が細いために、シュクロースが浸入しにくかったのかもしれない。

C57BL/6 マウスの胚を用いた輸送実験の結果から、0.8 M シュクロース/PB1 液を用いると、胚を卵管ごと 0℃で冷蔵輸送することによってマウスの授受が可能であり、また片側の割球のみ生存している胚でも産子まで発育できることがわかった。さらに、ICR 胚では冷蔵保存後に凍結保存できることから、現在、C57BL/6 胚を輸送後に凍結保存する実験を計画している。

E. 結論

0℃の 0.8 M シュクロース添加 PB1 液を用いることによって、遺伝子改変マウスの主要な系統である C57BL/6 マウスの 2 細胞期胚を卵管ごと 48 時間保存することができる。したがって、この間に国内輸送が可能である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

葛西孫三郎. 胚凍結保存. 「新しい生殖医療技術のガイドライン」改訂第2版、日本不妊学会編、金原出版、pp. 99-111, 2003.

Mukaida T, Kasai M. Cryobiology: Slow freezing and vitrification of embryos. In: A Laboratory Guide to the Mammalian Embryo (Gardner DK, Lane M, Watson A (eds), Oxford University Press, pp. 375-390, 2004.

Han MS, Niwa K, Kasai M. In vivo development of vitrified rat embryos: effects of timing and sites of transfer to recipient females. *Biology of Reproduction* 70, 425-429, 2004.

2. 学会発表

葛西孫三郎・川道真菜美・枝重圭祐・小川真美・中島竜之・中瀧直己. 卵管ごと低温保存したマウス胚の生存性に及ぼす諸要因. 第50回日本実験動物学会(大宮市). 2003. 5.

Tanaka M, Ichimaru N, Higashino Y, Kasai M, Kleinhans FW, Edashige K. Water and glycerol permeation in mouse morulae relies on water channels. 第2回国際COEシンポジウム・近畿大学(泉佐野市). P22, 2003. 9.

関信輔・Valdez Delgado Jr・葛西孫三郎・枝重圭祐. ゼブラフィッシュ卵子の低温生物学的特性. 第96回日本繁殖生物学会(帯広市). 2003. 9.

Valdez Delgado Jr・関信輔・葛西孫三郎・枝重圭祐. メダカ卵子の低温生物学的特性. 第96回日本繁殖生物学会(帯広市). 2003. 9.

葛西孫三郎. 卵子凍結保存の低温生物学. 第48回日本不妊学会・第21回日本受精着床学会・合同学術講演会 シンポジウム(東京). 2003. 10.

葛西孫三郎. 哺乳動物胚の耐凍性における種間差. 第18回日本生殖免疫学会 シンポジウム(山口市). 2003. 11.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

卵管ごと冷蔵保存したマウス胚の輸送

分担研究者 葛西 孫三郎 高知大学農学部教授

1. 研究目的

胚凍結技術を持たない施設からマウスを輸送する手段として、胚を卵管ごと送る手段が考えられるが、48 時間程度保存できることが好ましい。胚を卵管ごと冷蔵保存して輸送できる条件について検討し、保存と輸送が可能かしらべた。

2. 研究方法

ICR 系または C57BL/6 マウスの卵管を 5℃、0℃、あるいは-5℃の、0～1.5 M のシュクロースを含む PB1 液で 48 時間保存したのち、体外と体内での発育能力をしらべた。一部の胚は、高知から熊本へ輸送して移植した。

3. 結果と考察

胚は、0.8～0.9 M のシュクロースを添加した PB1 液でに浸して、0～-5℃で保存するのが適している。C57BL/6 マウスの胚を卵管ごと 0℃に冷蔵して 48 時間保存し、その間に高知から熊本まで輸送したのち移植した結果、高率に生存産子が産まれた。

4. 結論

0℃の 0.8 M シュクロース添加 PB1 液を用いることによって、遺伝子改変マウスの主要な系統である C57BL/6 マウスの 2細胞期胚を卵管ごと 48 時間保存することができる。したがって、この間に国内輸送が可能である。

マウス卵巣の凍結保存法の検討

分担研究者 横山峯介 三菱化学生命科学研究所マウスゲノム工学センター長

研究要旨

マウス系統の新たな維持・保存法としての卵巣の凍結保存技術を確立する研究の一環として、各種週齢雌から摘出した卵巣を修正簡易ガラス化法で凍結し、融解後にレシピエント雌に移植した。移植したいずれの実験群の卵巣からも産仔が得られたが、週齢の若い凍結卵巣を移植した個体の成績が良好であった。

A. 研究目的

卵巣移植は、何らかの原因で成熟期に達しても自然交配できないために繁殖障害を伴う雌個体から産仔を得る方法として従来から活用されてきた。我々はこれまでの研究によって、マウス初期胚の凍結保存に利用されている簡易ガラス化法を修正した方法によって、卵巣の凍結保存が可能であることを明らかにした(Migishima, F., et al., 2003)。そこで本研究では、マウス系統の新たな維持・保存法としての卵巣の凍結保存技術を確立し、実用化を図るための検討を行った。

B. 研究方法

卵巣を提供する雌としてはオワンクラゲ由来の緑色発光タンパク質 (GFP:green fluorescent protein) を全身に発現する遺伝的背景が C57BL/6 系のトランスジェニック(Tg)マウスを、卵巣移植を受けるレシピエント雌には野生型の C57BL/6 系マウスを使用した。卵巣は2, 8, 11ならびに20週齢の GFP-Tg 雌から摘出し、マウス初期胚の簡易ガラス化法を修正した方法によって凍結保存した(Migishima, F., et al., 2003)。凍結卵巣は液体窒素中に2日間以上保管した後に融解し、4-6週齢のレシピエント雌の卵巣嚢内に定法によって移植した。さらに、手術後4週間から雄と交配して、移植卵巣由来の GFP-Tg 系の産仔が得られるかを調べた。なお、凍結を行わない新鮮卵巣を移植する対照群もあわせて設定した。

C. 研究結果

凍結保存卵巣を移植して妊娠の成立、ならびに産仔の得られたレシピエント雌の成績は、65–80%とバラツキがみられたが週齢による相関は認められなかった。また、各週齢とも凍結卵巣由来の GFP-Tg 系の産仔が得られた。平均産仔数は3.4–5.2匹で、週齢の若い卵巣を移植した実験群の成績の方が高い傾向がみられた。また、これらは凍結を行わない新鮮卵巣を移植した対照群の成績に比較すると約3–5匹低いものであった。

D. 考察

生後2, 8, 11ならびに20週齢の各雌から摘出した卵巣を凍結し、融解後にレシピエント雌に移植することによって、移植卵巣由来の産仔を安定した成績で得られることが確認された。しかし、凍結を行わない新鮮卵巣を移植した対照群の成績に比較すると、産仔の得られる効率が低いことから、さらに検討が必要であることが示唆された。

E. 結論

各週齢の雌から摘出して凍結保存された卵巣から、移植によって再現性のある成績で産仔の得られることが確認された。さらに成績の向上を図る必要があるが、近い将来に実用化が期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Migishima, F., Oikawa, A., Kondo, S., Ema, H., Morita, Y., Nakauchi, H., Yokoyama, M., Song, S., Nishijima, M., Okabe, M. and Shinohara, N.: Full reconstitution of hematopoietic system by murine umbilical cord blood: Possible phenotypic difference between cord blood and bone marrow stem cells. *Transplantation*, 75:1820–1826, 2003.

2) Toyoda, M., Shirota, H., Nakajima, K., Kojima, M., Takahashi, M., Kubota, M., Suzuki-Migishima, R., Motegi, Y., Yokoyama, M. and Takeuchi, T.: *jumonji* downregulates cardiac cell proliferation by repressing *cyclin D1* expression. *Dev. Cell*. 5:85–97, 2003.

3) Yamamoto, M., Wada, N., Kitabatake, Y., Watanabe, D., Anzai, M., Yokoyama, M., Teranishi, Y. and Nakanishi, T.: Reversible suppression of glutamatergic neurotransmission of cerebellar granule cells in vivo by genetically manipulated expression of tetanus neurotoxin light chain. *J. Neurosci.*, 23:6759–6767, 2003.

4) Harada, T., Pineda, L. L., Nakano, A., Omura, K., Zhou, L., Iijima, M. and Yokoyama, M.: Ataxia and male sterility (AMS) mouse. A new genetic variant exhibiting degeneration and loss of cerebellar Purkinje cells and spermatogenic cells. *Pathol. Int.*, 53:382-389, 2003.

5) Masuki, S., Takeoka, M., Taniguchi, S., Yokoyama, M. and Nose, H.: Impaired arterial pressure regulation during exercise due to enhanced muscular vasodilatation in calponin knockout mice. *J. Physiol.*, 553:203-212, 2003.

6) 右島富士男・横山峯介・西島正博: ガラス化法による卵巣凍結保存の検討. 産婦人科の実際, 52:2379-2382, 2003.

7) 横山峯介: 胚バンク. バイオ・ゲノムを読む事典. (三菱総合研究所・三菱化学生命科学研究会 編著), 東洋経済新聞社, 東京, pp.211-213, 2004.

2. 学会発表

1) 右島富士男・横山峯介・西島正博: ガラス化法によるマウス卵巣凍結保存の検討. 第48回日本不妊学会総会, 2003年10月, 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

疾患関連遺伝子の機能解明のための実験動物研究資源の基盤整備に関する研究

分担研究者 熊本大学生命資源研究・支援センター 教授 中潟直己

研究要旨

Closed colonies 2系統、inbred 6系統、mutant 2系統および Transgenic 2系統の計 12 系統のラット精巣上体精子を凍結保存し (Nakatsukasa E. et al., 2001)、融解後、それら精子を用いて人工授精を行ったところ、全ての系統で産子が得られた。

A. 研究目的

マウス精子の凍結技術はほぼ確立され、遺伝子改変マウスの系統保存に応用されている。しかしながら、マウスに次ぐ実験動物であるラットにおいても、トランスジェニックなどの系統が増えてきたことから、精子の凍結保存技術の確立が望まれている。そこで、本実験では、Nakatsukasa らが報告した凍結法を用いて Closed colonies [Jcl:SD, Jcl:Wistar]、inbred [BN/Crj, F344/Ducrj, GK/Crib, LEW/Crj, Long-Evans and WKY/NCej]、mutant [Zitter and Tremor] および transgenic [human A-transferase and green fluorescent protein] ラット精子の凍結保存を試み、凍結融解後の運動精子率、妊娠率、分娩率および一腹あたりの産子数について検討をおこなった。

B. 研究方法

各種ラット 3 匹より精巣上体精子を採取し、凍結保存を行った。融解後、運動精子の割合を顕微鏡下で調べ、運動精子率を出した。妊娠率、分娩率および一腹あたりの産子数に関しては、凍結融解後の精子を偽妊娠誘起したラット子宮内に注入することにより行った。

C. 研究結果

凍結融解後、上記 12 系統全ての精子に運動性が確認された。また、それら融解精子を子宮内に注入したところ、一腹あたりの産子数には、多少、ばらつきが見られものの（一腹あたりの産子数：2-7 匹）、全ての系統で産子が得られた。

D. 考察

本実験結果より、用いた全系統で精子の凍結保存が可能であったことから、今後、ミュータントを含む遺伝子改変ラットなどの系統保存に応用できる可能性が強く示唆された。

E. 結論

凍結保存成績は、必ずしも良好とは言えないが、あらゆる系統のラットにおいて、精子の凍結保存が可能であることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Cryopreservation of spermatozoa from closed colonies, and inbred spontaneous mutant, and transgenic strains of rats.

Nakatsukasa E¹, Kashiwazaki N, Takizawa A, Shino M, Kitada K, Serikawa T, Hakamata Y, Kobayashi E, Takahashi R, Ueda M, Nakashima T, Nakagata N.

Com. Med. 53(6):639-41. 2003.

2. 学会発表

1) 第 49 回日本実験動物学会総会 (名古屋 2002/5/20~2002/5/22)

ラット精子の凍結保存

中務 胞¹、中島 竜之²、紫野 正雄¹、北田 一博³、芹川 忠夫³、柏崎 直巳¹、中瀬 直己²

(1 麻布大・獣医・動物繁殖、2 熊大・動物資源開発センター (CARD)、3 京大・院・動物実験)

2) The XVIIth International Workshop on Genetic Systems in the Rat (2002/10/8-11, Kyoto)

Cryopreservation of rat spermatozoa at -196°C.

Nakatsukasa E, Kashiwazaki N, Shino M, Kitada K, Serikawa T, Hakamata Y, Kobayashi E, Takahashi R, Nakashima T, Nakagata N.

講演要旨 42 ページ

3) GEM III : The 3rd Meeting on Pathology of Genetically Engineered Mice (2003/10/2-4, Kumamoto)

Cryopreservation of rat spermatozoa from closed colonies and inbred, spontaneous mutant and transgenic strains.

Ena Nakatsukasa

講演要旨 90 ページ

分担研究者研究報告書

卵巣内卵子の有効活用による新規生殖工学技術の開発

分担研究者 鈴木 治 国立感染症研究所 獣医科学部 主任研究官

卵巣、特に若齢時の卵巣には多量の卵子がある。この卵子の効率的な利用法は系統保存や生殖工学技術の開発・利用に大いに役立つものと考えられる。本研究では、本研究班の分担研究者である横山博士が昨年度開発した卵巣保存法を応用し、凍結保存した幼若マウス卵巣から卵巣移植を経ずに胚を得る方法について検討した。

A. 研究目的

Migishima et al. (2003) により、マウス系統保存法の一つとして卵巣ガラス化保存と卵巣移植を併用した産仔作出法の有用性が示された。しかし、仮親選択に比較的自由度がある胚移植に比べ、卵巣移植では移植免疫の点から仮親系統の制約が厳しい。そこで、本研究では卵胞発育培養系を用いて、ガラス化保存卵巣から卵巣移植を経ずに胚を得る方法について検討した。

B. 研究方法

Migishima et al. (2003) の方法で 13 日齢の B6D2F1 雌マウスの卵巣を DAP213 液を用いて液体窒素内にて保存後、解凍した。コラゲナーゼとピペッティングにより卵胞を単離し、5%FBS 添加 Waymouth 培地（発育培地）で、コラーゲンコート・ウェルインサート上にて 10 日間培養した（Eppig の方法による）。その後、体外成熟培養し、成熟卵子（＝卵核胞崩壊卵子）を ICR 成熟雄マウスの精巣上体精子を用いて MEM/BSA 培地にて体外受精し、KSOM/AA+BSA 培地にて媒精後 120 時間まで培養した。培養は全て、37℃、5% CO₂、5% O₂、90% N₂ の気相下で行った。1 回の実験には 2 匹分の卵巣を用い、3 回反復実験を行った。動物実験については国立感染症研究所動物実験指針に則って行なった。

C. 研究成果

融解後 5 分間発育培地内に静置した後コラゲナーゼ処理した群に比べ（103.7±20.1、実験 1 回当たり卵巣 2 匹分の平均±標準誤差）、30 分静置した群の方が得られる卵子数が多かった（210.7±28.6）。また、卵子成熟率も後者が高かった（3.0±1.3% vs. 6.4±0.9%）。30 分静置群の成熟卵子を体外受精・体外培養に供したところ、2 細胞期へ 61.7±7.3%、胚盤胞へ 9.9±1.6%が発生した。

D. 考察

卵巣の凍結保存における卵胞卵子の生存性は、凍結方法もさることながら、解凍方法に強く依存していることがわかった。文献的に卵胞のステージによって耐凍能や耐凍剤の影響が異なることも知られている。既に二次卵胞へ発育した卵胞の発育培養を前提とした卵巣凍結保存は、原始卵胞からの新たな卵胞発育も期待可能な卵巣移植を前提としたものとは、異なった視点で改良が必要であると考えられる。

E. 結論

非常に低率ではあるが、ガラス化保存卵巣由来卵子か

ら胚盤胞が得られ、体外発育培養による胚の入手が可能であることがわかった。しかし、体外成熟率が非常に低く、今後の改良を要する。現在、2 細胞期胚の移植実験により産仔への発育能を検討中である。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

- Noguchi A, Takekawa N, Einarsdottir T, Koura M, Noguchi Y, Takano K, Yamamoto Y, Matsuda J, and Suzuki O. Chromosomal mapping and zygosity check of transgenes based on flanking genome sequences determined by genomic walking. *Exp. Anim.* 2004 (in press).
- Koura M, Handa H, Noguchi Y, Takano K, Yamamoto Y, Matsuda J, and Suzuki O. Sequence analysis of cDNA encoding follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone β -subunits in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 2004, (in press).
- 野口 章, 鈴木 治, 小浦美奈子, 高野 薫, 野口 洋子, 山本美江, 松田潤一郎, 「シアル酸転移酵素遺伝子ホモ導入マウスに見られた拡張型心筋症」, 日本疾患モデル学会記録 19:31-37, 2003.
- Suzuki O, Hata T, Koura M, Noguchi Y, Takano K, Yamamoto Y, and Matsuda J. Search for genes involved in developmental competence in mouse oocytes using suppression subtractive hybridization. *Reprod. Fert. Dev.* 16:245-246, 2004.
- Suzuki O, Hata T, Koura M, Noguchi Y, Takano K, Yamamoto Y, and Matsuda J. Differential display analysis for genes relating to developmental competence of mouse oocytes. *Mol. Biol. Cell* 14:108a, 2003.

2) 学会発表

- 鈴木 治, 小浦美奈子, 野口洋子, 高野 薫, 山本美江, 松田潤一郎: ディファレンシャル・ディスプレイ法によるマウス卵子発生能獲得遺伝子の検索, 第 50 回日本実験動物学会総会, 大宮, 2003 年 5 月
- 鈴木 治, 小浦美奈子, 野口洋子, 高野 薫, 山本美江, 松田潤一郎, 幼若マウスの一過性卵胞成熟由来卵子を用いた胚発生能関与遺伝子の検索, 第 96 回日本繁殖生物学会大会, 帯広, 2003 年 9 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

胚・配偶子保存のための新規生殖工学技術の開発

分担研究者 小倉 淳郎 理化学研究所バイオリソースセンター室長

研究要旨

マウス系統の継代のための顕微授精技術と核移植クローン技術の開発を行った。顕微授精技術を各種マウス系統へ応用し、すべての実験例において産子を得ることに成功し、その有効性を確認できた。核移植クローンでは、新たに2種類の細胞種（始原生殖細胞と成体幹細胞）をドナーとして体細胞移植を実施し、これも正常産子を得ることに成功した。

A. 研究目的

顕微授精技術と核移植クローンに代表されるマウスの新規生殖工学技術は、基礎細胞生物学に貴重な情報をもたらすのみならず、品種改良、遺伝子保存、再生医療実験モデルとしての応用などの期待も高まっている。家畜で安定してクローン動物が作出され、次々とクローン技術の利用が進んでいるのに対し、マウスの生殖工学技術、特にクローン技術の開発は極めて遅れている。今年度は、顕微授精技術を各種マウス系統へ応用し、核移植クローンでは、新たに2種類の細胞種（始原生殖細胞と成体幹細胞）をドナーとして体細胞移植を実施した。

B. 研究方法

顕微授精：ピエゾマイクロマニピュレーターによる注入法により実施した。円形精子細胞を用いた顕微授精では、卵子を予めストロンチウムにより活性化を行った。

核移植クローン：除核卵子へドナー細胞核を注入あるいは電気融合により移植し、卵子のストロンチウムによる活性化後に胚培養および胚移植を行った。

（倫理面への配慮）

動物実験はすべて理化学研究所動物実験規則に準じて実施した。

C. 研究結果

1) 顕微授精技術のマウス系統保存への応用

以下のマウスへ応用し、顕微授精由来胚を胚移植し、産子の作出を試みた。

①挿入突然変異による精子形成不全マウス

用いた細胞：伸長精子細胞

顕微授精後受精卵子：194 個

分割卵子：106 個(54.6%)

産子：17 匹(16%, 17/106)

②海外からの凍結不良精子

用いた細胞：凍結精子（不動）

顕微授精後受精卵子：166 個

分割卵子：150 個(90.0%)

産子：28 匹(18.7%, 28/150)

③精細管内移植幹細胞由来精細胞

使用細胞：伸長精子細胞

顕微授精後受精卵子：138 個

分割卵子：116 個(84.1%)

産子：51 匹(44.0%, 51/116)

④卵丘細胞機能不全マウス

使用細胞：精子

顕微授精後受精卵子：6 個

分割卵子：6 個(100%)

産子：3 匹(50.0%, 3/6)

⑤自然繁殖不能リコンビナント近交系 (B6xDBA/2)

使用細胞：精子

産子：5 匹(13%, 5/39)

⑥精子形成不全ノックアウトマウス

使用細胞：伸長精子細胞

顕微授精後受精卵子：133 個

分割卵子：122 個(91.7%)

産子：33 匹(30.0%, 33/122)

⑦セルトリ細胞移植由来精細胞

使用細胞：伸長精子細胞

顕微授精後受精卵子：225 個

分割卵子：102 個(45.0%)

産子：4 匹(3.9%, 4/102)

2) 成体幹細胞を用いた核移植クローン

特異抗体を用いて選別した造血系幹細胞を用いて核移植クローンを行った。予想通り、G0 細胞のために 2-cell へ高率に発生したが、その後の発生低下が顕著であった。BrUTP 取り込み試験の結果、zygote clock は正常に働いて後期 1-cell における翻訳は開始されていることが明らかになった。胚移植の結果、1 種類の遺伝子型から 2 匹が生まれた。

3) 生殖細胞を用いた核移植クローン