

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16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松田潤一郎
(国立感染症研究所)

平成17年3月

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16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松田潤一郎
(国立感染症研究所)

平成17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、供給に関する研究 4
松田潤一郎 国立感染症研究所獣医科学部 室長
- マウス2細胞期胚の細胞膜透過性 7
葛西孫三郎 高知大学農学部 教授
- マウスの卵巣移植条件の検討 10
横山峯介 新潟大学脳研究所動物資源開発支援研究部門 教授
- 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 12
中瀧直己 熊本大学動物資源開発研究センター 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 14
鈴木治 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 15
小倉淳郎 理化学研究所バイオリソースセンター 室長
- コモンマーマーセットのマイクロサテライトマーカー開発研究 18
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：ELISA法による抗LCMV抗体検出 19
山田靖子 国立感染症研究所動物管理室 室長
- 研究成果の刊行に関する一覧表 30
- 文献 39

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疾患モデルとして重要であるマストミスの精子凍結保存法の改良と過排卵誘起法を開発した。②マウス２細胞期胚の割球の、体積、固形分含量、水透過性、エチレングリコール透過性などの低温生物学的特性値には、大きな偏差があることがわかった。③マウス卵巣を２分割して移植し産仔が得られた。④レーザーによる透明体穿孔卵子作出システムを開発した。（２）新規生殖工学技術として、①卵巣内卵子の有効活用を検討し、培養液組成の改良を行った。②精巣および精巣上体の丸ごとの凍結および保存が可能であり、顕微授精で産子を作成できることを示し、さらに体細胞核移植クローン技術がマウスバンク事業に有用であることを示した。（３）遺伝学的及び微生物学的品質管理については、①マーモセット集団を遺伝育種学的に管理する目的で指標となるマーカー開発を行った。②マストミス、スナネズミなど各種実験動物の血清抗体検査-ELISA法による抗LCMV抗体検出法を開発した。

分担研究者

| | |
|-------|----------------------------|
| 葛西孫三郎 | 高知大学農学部教授 |
| 横山峯介 | 新潟大学脳研究所動物資源 開発支援研究部門教授 |
| 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 室長 |

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。

B. 研究方法

1) マストミスにおける精子凍結保存法と過排卵誘起法の開発：マストミス精子凍結保存法の改良を試み、18%ラフィノース・0.7% Equex Stem・25%卵黄液を遠心処理した上清を凍結保存液として用いた。過排卵誘起は成熟個体を用い、まず hCG 投与による性周期の同期化を図り、その後 PMSG-hCG を投与した。（松田、協力研究者：明治大学太田昭彦）

2) マウス 2 細胞期胚の細胞膜透過性：個々の胚の耐凍性を検討する目的で、ICR 系マウスの 2 細胞期胚を、等張の PB1 液から高張なシュクロース添加 PB1 液またはエチレングリコール添加 PB1 液に移して相対的体積変化を測定した。それらの値から、割球の体積、固形分含量、水透過係数、エチレングリコール透過係数を算出した。（葛西）

3) マウスの卵巣移植条件の検討：マウス卵巣凍結保存に必須の卵巣の移植条件を検討するため、8, 11, 20, 30 ならびに 43 週齢の GFP-Tg メスから摘出した卵巣を、1 個そのままあるいは 2 分割して 4-6 週齢のレシピエントメスの卵巣嚢内に定法によって移植した。さらに、手術後 4 週間からオスと交配して、移植卵巣由来の GFP-Tg 系の産仔が得られるかを調べた。（横

山)

4) 透明帯穿孔卵子の作出システムの開発: 受精能の極めて低い C57BL/6 凍結精子の受精率を高めるため透明帯穿孔卵子の作出を試みた。卵丘細胞を除去した C57BL/6J 卵子を用い、透明帯の穿孔は、卵子を 0.5M シュークローズに入れ、卵細胞質を収縮させた後、透明帯にレーザーを照射することにより行った。透明帯穿孔卵子を作製後、融解した凍結 C57BL/6J 精子との間で体外受精を行った。(中潟)

5) 卵巣内卵子の有効活用による新規発生工学技術の開発: 卵巣ガラス化保存に卵胞発育培養を組み合わせて卵巣移植を経ずに胚を得る方法を改良するため、卵胞発育培養法の改変を行った。凍結保存マウス卵巣由来卵胞を 5%FBS, Ascorbic acid 2-O- α -Glucoside, Alanine-glutamine を添加した α -MEM 培地にて発育培養を行った後、体外成熟, 体外受精, 体外培養を行い、胚発生率を観察した。(鈴木)

6) 顕微授精技術と核移植クローン技術の開発: マウスバンク事業の発展に資するため、顕微授精技術の応用技術開発と体細胞核移植クローン技術の開発を行った。通常の方法により、ピエゾドライブマイクロマニピュレータを用いた顕微授精および体細胞核移植クローンを行った。(小倉)

7) コモンマーモセットのマイクロサテライトマーカー開発研究: コモンマーモセットの遺伝育種学的統御を目的としてマイクロサテライトマーカーの開発研究を行った。データベースに基づいてマーモセットの MS マーカー 200 種類を設計し、実験動物中央研究所で維持されている遠縁関係にあるマーモセット 5 個体の皮膚から核 DNA を精製し、PCR を行った。(加藤)

8) 各種実験動物の血清抗体検査-ELISA 法による抗 LCMV 抗体検出: マストミス、スナネズミの LCMV に対する感受性の検討、ELISA 法による各種小型齧歯類の抗 LCMV 抗体の検出を試みるため、各種実験動物に LCMV を腹腔感染して得た感染血清を陽性コントロールとし、標識抗動物 IgG、ProteinG を二次抗体として ELISA による抗 LCMV 抗体の検出を行った。また、LCM-NP 蛋白の筋肉内接種により得た免疫血清と感染血清との反応性を比較した。(山田、協力研究者: 感染研動物管理室 滝本一広、田原口元子)

(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. D. 研究結果と考察

1) マストミスにおける精子凍結保存法と過排卵誘起法の開発: 凍結液の遠心処理により悪影響を及ぼす卵黄固形物が取り除かれ、凍結-融解

マストミス精子の運動精子率が向上し、高い運動性を維持した精子が確認できた。過排卵誘起法の改良により比較的安定して多数 (平均 12.9 個) の卵子が得られた。

2) マウス 2 細胞期胚の細胞膜透過性: 個々の胚の最小値と最大値の間には、体積で 1.4 倍、固形分含量で 3 倍、水透過係数で 2.7 倍、エチレングリコール透過係数では 1.6 倍の偏差があった。遺伝的に均一なマウス初期胚においても、凍結保存に関する特性は胚ごとに大きく異なることが判明した。

3) マウスの卵巣移植条件の検討: 各実験群とも卵巣移植を行ったレシピエントメスのすべてで妊娠が成立し、GFP-Tg 系の産仔が得られた。また、卵巣を 2 分割して移植しても、再現性のある成績で産仔の得られることが確認された。今後、2 分割した卵巣を用いて凍結保存を行い、その有効性を確認する必要がある。

4) 透明帯穿孔卵子の作出システムの開発: 透明帯穿孔卵子と受精能の低い凍結 C57BL/6J 精子との間で体外受精を行ったところ、その受精率が飛躍的に向上したことから、本透明帯穿孔卵子作製システムで作製した透明帯穿孔卵子は、今後、受精能の低いさまざまな精子への応用が期待される。

5) 卵巣内卵子の有効活用による新規発生工学技術の開発: 培養液組成の改変により、ガラス化保存卵巣由来卵子の体外成熟率や胚盤胞形成率に有意な向上が見られた。しかし、得られた 2 細胞期胚や胚盤胞を偽妊娠雌へ移植しても着床すらないため、今後更に改良を要すると考えられる。

6) 顕微授精技術と核移植クローン技術の開発: 顕微授精技術を応用することにより、マウス遺伝子 (配偶子) を簡易に凍結そして運搬する技術を開発し、正常産子を得た。また、近交系から系統保存用の核移植由来 ES 細胞を樹立した。あらたに 2 種類の体細胞 (NKT 細胞および神経幹細胞) から正常産子を得た。

7) コモンマーモセットのマイクロサテライトマーカー開発研究: 200 クローンのうち、PCR を行ってバンドの確認できたものが 167 個 (83.5%)、バンドの確認できなかったものが 33 個 (16.5%) であった。さらに、バンドが確認できた 167 個のうち、多型の確認できたものが 89 個 (53.3%) であった。この多型率は、近交系マウス群で観察されている率に匹敵した。

8) 各種実験動物の血清抗体検査-ELISA 法による抗 LCMV 抗体検出: 抗 LCMV 抗体の検出に対し、マウスでは抗マウス IgG、マストミス、スナネズミでは抗ラット IgG が最適であった。ハムスターでは抗マウス IgG が抗ハムスター IgG より強い反応を示した。LCM-NP 免疫血清は全動物種で感染血清と同等以上の反応を示した。

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疾患モデルとして重要であるマストミスの精子凍結保存法の改良を行い、凍結保存液の遠心処理が有効であり、凍結-融解後、高い運動性を維持した精子が確認できた。また、マストミス成熟個体を用いた過排卵誘起法を開発した。②マウス2細胞期胚の割球の、体積、固形分含量、水透過性、エチレングリコール透過性などの低温生物学的特性値には、大きな偏差があることがわかった。これらの偏差は遺伝的なばらつき以外の要因も関与していると思われる。③各週齢のメスから採取された卵巣を2分割して移植しても、再現性のある成績で産仔の得られることが確認された。成熟個体から採取した卵巣の凍結保存に実用化が期待される。

④レーザーによる透明体穿孔卵子作出システムは、作製作業が容易である、大量作製が可能であるなどさまざまな特長があり、これにより作製された透明体穿孔卵子を用いることで、受精能の低い C57BL/6 凍結精子の受精率を飛躍的に向上させることが可能であった。

(2) 新規生殖工学技術として、①卵巣内卵子の有効活用を検討し、培養液組成の改変により、ガラス化保存卵巣由来卵子の体外成熟率や胚盤胞形成率に有意な向上が見られた。しかし、得られた2細胞期胚や胚盤胞を偽妊娠雌へ移植しても着床すらしないため、今後更に改良を要すると考えられた。②精巣および精巣上体の丸ごとの凍結および保存が可能であり、産子を作成できることを示した。また、途絶の危機にある近交系からも雌雄 ntES 細胞を樹立できた。また、NKT 細胞がこれまでに報告された成体体細胞で最も良好なクローン効率をもたらす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財団法人実験動物中央研究所で維持されてきているマーモセット集団を遺伝育種学的に管理する目的で指標となるマーカー開発を行い、マイクロサテライトジェノタイピングが可能となった。②今回検討した動物種はすべて LCMV に対し感受性を示した。抗ラット IgG はマストミス、スナネズミで高感度に抗 LCMV 抗体を検出でき、他の血清抗体検査にも有用であると思われる。LCM-NP 蛋白免疫血清は陽性コントロールとして使用可能であることが示唆された。

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

マストミス精子凍結保存法の改良を試み、18%ラフィノース・0.7% Equex Stem・25%卵黄液を遠心処理した上清を凍結保存液として用いることで、凍結融解精子の運動率の向上が実現できた。マストミス過排卵誘起については、従来の未成熟個体ではなく成熟個体を用い、まず hCG 投与による性周期の同期化を図り、その後に PMSG-hCG を投与する改良法によって効率良く計画的に過排卵誘起することができた。

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。そこで貴重な遺伝資源の保存の一環として、昨年度までにマストミス精子の凍結保存法の開発を行ってきた。しかし、凍結融解精子の受精能力を確認するまでには至っていないため、今年度は、凍結保存法の改良を行うとともに、受精能判定に用いるための卵子を効率良く得るための過排卵誘起法の開発を目指した。

B. 研究方法

1) マストミス精子凍結保存法の改良

マストミスは、国立感染症研究所で飼育、継代されている、MCC (シャモア色)、MST (野生色)、RI-7 (シャモア色)、RI-M (野生色) の近交系 4 系統の 4~8 か月齢成熟雄を用いた。凍結保存液は、糖類として 18%ラフィノースもしくは 12%トレハロースをベースとし最終的に 0.7% Equex Stem・25%卵黄となるように作製し、そのまま用いるものと遠心処理 (13,000g, 90 分) の上清を用いるものの計 4 種類を検討した。精巣上体精子をこれらの液を用いて凍結・融解し、培養 4 時間までの運動精子率を調べた。

2) マストミス過排卵誘起法の開発

動物は、上記 4 系統と MKS (野性色：日本 SLC) の 3~8 か月齢成熟雌を用いた。過排卵誘

起法として、PMSG を 5~10IU/匹、48 時間後に hCG を 5~10IU/匹腹腔内注射する従来法と、hCG を 10iu/匹、24 時間後に PMSG を 20iu/匹、その 48 時間後に hCG を 20iu/匹投与する改良法を用い、最後の hCG 投与 17-18 時間後に排卵数を調べた。

(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、4 群のうちラフィノース・遠心有りが最も成績が良く (融解 15 分後、32.9% ; 4 時間後、15.4%)、とくに培養 4 時間後では遠心処置をしたものでは高い運動性を維持した精子が確認できたが、遠心処置をしなかったものでは高い運動性を維持した精子は確認できず、固形物が結合した精子が多数見られた。

過排卵誘起法の開発については、従来法 (5.5 個) と比較して、改良法 (12.9 個) では平均採卵数が多い傾向があり、10 個以上の卵が得られた個体の割合 (18 匹中 9 匹) も、これまで検討されてきた他の方法と比較して最も成績が良かった。また、改良法では体重による採卵数の偏りが見られ、35~45g の範囲で良い成績が得られた (平均 11.9-18.0 個)。

D. 考察

マストミス精子凍結保存液の耐凍剤としての糖について、今回、その高い親水性から耐凍保護剤としての作用が期待されるトレハロースについて検討したところ、かなり良い成績が得られたものの、最も良い成績が得られたのはラフィノースを用いた場合であった。さらに凍結保存液を遠心処理することによって、精子の生存性に悪影響を及ぼしていると考えられる卵黄固形成分の除去を行ったところ、運動精子率を向上させることが出来た。

マストミス過排卵誘起法では、従来は未成熟個体を用いることが多く、過排卵誘起率が低い点が問題であった。今回、成熟個体を用い、さらに最初に hCG 投与による性周期の同期化を図り、その後に PMSG-hCG を投与することにより比較的効率良く卵胞発育-排卵を誘起することができた。また予備実験では、本法で過排卵誘起したマストミスの人工授精で受精卵が得られていることから、排卵卵子は受精能力があり正常であると考えられる。本法によりマストミスにおいて、正常卵子を計画的に、比較的安定して得ることが出来るようになり、人工授精や体外受精系の開発、凍結融解精子の受精能検定などへの応用が進むものと期待される。

E. 結論

マストミス精子凍結保存法の改良を試み、18%ラフィノース・0.7% Equex Stem・25%卵黄液を遠心処理した上清を凍結保存液として用いることで、凍結融解精子の運動率の向上が実現できた。マストミス過排卵誘起については、従来の未成熟個体ではなく成熟個体を用い、まず hCG 投与による性周期の同期化を図り、その後に PMSG-hCG を投与する改良法によって効率良く計画的に過排卵誘起することができた。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

向井一真、平田淳也、増田圭基、小浦美奈子、鈴木 治、高野 薫、野口洋子、山本美江、松田潤一郎、太田昭彦 「マストミス精子の凍結保存法の検討」 J. Reproduction Engineering, 7 Suppl: 296-302, 2005.

Mochida K, Wakayama T, Takano, Noguchi Y, Yamamoto Y, Suzuki O, Matsuda J, Ogura A. Birth of Offspring after Transfer of Mongolian Gerbil (*Meriones unguiculatus*) Embryos Cryopreserved by Vitrification. Mol Reprod Dev, Mol Reprod Dev, 70:464-70, 2005.

Uchio-Yamada K, Manabe N, Goto Y, Anann S, Yamamoto Y, Takano K, Ogura A, Matsuda J. Decreased expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinase in the kidneys of hereditary nephrotic (ICGN) mice. J Vet Med Sci. 67:35-41, 2005.

Masujin K, Okada T, Tsuji T, Ishii Y, Takano K, Matsuda J, Ogura A, Kunieda T. A Mutation in the Serum and Glucocorticoid-Inducible Kinase-Like Kinase (Sgkl) Gene is Associated with Defective Hair Growth in Mice. DNA Research, 11: 371-379, 2004.

Kamei Y, Miura S, Suzuki M, Kai Y, Mizukami J, Taniguchi T, Mochida K, Hata T, Matsuda J, Aburatani H, Nishino I, Ezaki O. Skeletal muscle FOXO1 (FKHR)-transgenic mice have less skeletal muscle mass, down-regulated type I (slow twitch / red muscle) fiber genes, and impaired glycemic control. J Biol Chem, 279: 41114-23, 2004.

Takano K, Koura M, Noguchi Y, Yamamoto Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J, Suzuki O. Sequence analysis of cDNA encoding follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone β subunits in the Mastomys (*Praomys coucha*). Gen Comp Endocr, 138:281-286, 2004.

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, 136: 406-410, 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*, 53: 103-111, 2004.

2. 学会発表

小浦美奈子、半田寛子、高野 薫、松原純子、秦朋子、野口洋子、山本美江、山田一内尾こずえ、鈴木 治、松田潤一郎：スナネズミ精子の凍結保存法の検討 II. 体外受精系における受精能力の確認. 第51回日本実験動物学会総会、2004年5月、長崎.

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

マウス 2 細胞期胚の細胞膜透過性

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 2 細胞期胚を、25℃の等張の PB1 液から高張なシュクロース添加 PB1 液またはエチレングリコール添加 PB1 液に移して、タイムラプスビデオで撮影し、その画像から相対的体積変化を測定した。それらの値から、個々の胚の割球の体積、固形分含量、水透過係数、エチレングリコール透過係数を算出した結果、透明帯の影響を除いた場合でも、体積で 1.4 倍、固形分含量で 3 倍、水透過性で 2.7 倍、エチレングリコール透過性では 1.6 倍の偏差があることがわかった。このような大きな偏差は、耐凍性のばらつきと関係していると思われる。

A. 研究目的

凍結保存した胚は、水分の流出や耐凍剤の透過が不十分なために起こる細胞内氷晶、耐凍剤への長時間暴露による耐凍剤毒性、耐凍剤を除去する際の浸透圧的膨張などの傷害を受ける可能性がある。これらの傷害を避けるためには、水と耐凍剤が胚の内外へ速やかに移動することが重要である。複数の胚を同じ方法で凍結保存しても、生存する胚もあれば死滅する胚もある。これは、胚の体積、固形分含量、水透過性、耐凍剤透過性など、水と耐凍剤の移動に関係する特性が胚ごとに異なるためかもしれない。そこで、マウス 2 細胞期胚を用いて、これらの特性が個々の胚でどの程度異なるのかについてしらべた。

B. 研究方法

ICR 系雌マウスを、無処理のままあるいは過排卵誘起したのちに同系の雄と交配させ、2 日目に卵管から 2 細胞期胚を採取した。過排卵処理して採取した一部の胚は、ピペッティング操作によって透明帯を取り除いた。25℃の室温下で、等張の PB1 液 (290 mOsm/kg) 中で胚を 1 個ずつマイクロマニピュレータにセットしたホールディングピペットで保定し、カバーピペットを用いて、順次、500

mOsm/kg のシュクロース添加 PB1 液、800 mOsm/kg のシュクロース添加 PB1 液、等張の PB1 液、およびエチレングリコール添加 PB1 液 (1,760 mOsm/kg) に移した。各溶液中での胚の画像をタイムラプスビデオで撮影し、割球の断面積を経時的に測定して相対的体積変化を算出した。最初の PB1 液中での体積 (μm^3) と、2 種類のシュクロース液に浸した 5 分後の体積から、固形分含量 (V_b 値) を算出した。また、two-parameter-formalism の理論に基づいて、500 mOsm/kg シュクロース液とエチレングリコール液中での 5 分間の相対的体積変化の曲線から、それぞれ水透過係数 (L_p 値: $\mu\text{m}/\text{min}/\text{atm}$) とエチレングリコール透過係数 (P_{EG} 値: cm/min) を算定した。

(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

自然交配によって採取した胚 ($n=16$) の体積は $66.1 \pm 6.7 \times 10^3$ ($54.8 \sim 78.0 \times 10^3$)、 V_b 値は 0.19 ± 0.07 ($0.09 \sim 0.30$)、 L_p 値は 1.11 ± 0.35 ($0.71 \sim 1.97$)、

P_{EG} 値 ($n=18$) は $0.96 \pm 0.32 \times 10^{-3}$ ($0.37 \sim 1.60 \times 10^{-3}$) であった。一方、過排卵を誘起して採取した胚 ($n=30$) の体積は $72.7 \pm 11.1 \times 10^3$ ($54.5 \sim 91.6 \times 10^3$) で、自然交配で得られた胚より有意に大きかった。 V_b 値は 0.19 ± 0.05 ($0.11 \sim 0.28$) で差がなかったが、 L_p 値は 0.83 ± 0.26 ($0.34 \sim 1.39$)、 P_{EG} 値 ($n=12$) は $0.70 \pm 0.30 \times 10^{-3}$ ($0.34 \sim 1.47 \times 10^{-3}$) で、いずれも自然交配で得られた胚の値に比べて有意に低かった。

2細胞期胚の割球は透明帯に押し付けられて扁平に歪んでいるものが多かった。そこで、より正確な値を知るために、過排卵誘起して得た胚を用い、透明帯を除去した割球 ($n=29$) について各値を調べた。しかしそれでも、 L_p 値と P_{EG} 値を算定した際に、理論的に予測された体積変化の曲線から大きくそれる胚がみられた。そこで、それらの胚を除き、より理論値とフィットしていた 22 個の胚について各値を分析した。その結果、体積は $82.9 \pm 6.7 \times 10^3$ ($68.5 \sim 96.5 \times 10^3$) で、実際には透明帯が付着した状態で算定した体積より約 14% 大きいことがわかった。また、 V_b 値は 0.11 ± 0.03 ($0.05 \sim 0.15$) で、より小さい値であった。 L_p 値は 0.98 ± 0.23 ($0.55 \sim 1.47$)、 P_{EG} 値 ($n=12$) は $0.90 \pm 0.15 \times 10^{-3}$ ($0.74 \sim 1.18 \times 10^{-3}$) で、透明帯が付着した状態で測定した値よりやや高かったが、両値の間に相関関係はほとんどみられなかった ($n=9$, $R^2=0.17$)。

D. 考察

本実験の結果、理論的に予測された体積変化を示した透明帯除去胚においても、個々の胚の最小値と最大値の間には、体積で 1.4 倍、 V_b 値で 3 倍、 L_p 値で 2.7 倍、 P_{EG} 値では 1.6 倍の偏差があることがわかった。このように、遺伝的にほぼ均一と考えられるマウスの初期胚においても、凍結保存に関する特性は、個々の胚で大きく異なることが明らかとなった。桑実胚では、より遺伝的変異の少ない近交系の F1 胚においても、同様の偏差があることが判明している。従って、透過性等のばらつきは、遺伝的変異以外の要因が大きいと推測される。このことが凍結保存した胚の生存性に影響を与えてい

るものと思われる。

マウス胚では、発育が進むにつれてエチレングリコール透過性が上昇し、桑実胚では非常に高くなることが知られている。これは、割球のコンパクションと関係あるのではないかと考え、2細胞期胚に人為的にコンパクションを誘起して透過性を測定する実験を行った結果、透過性に差異はみられなかった。したがって、2細胞期胚における透過性のばらつきは、胚の発生速度 (コンパクション) とは関係がないものと推測される。

水透過係数とエチレングリコール透過係数の間に相関がみられなかったことは、水と耐凍剤が異なる経路で透過していることを示唆しているが、その経路の解明は今後の課題である。

E. 結論

透明帯を除去したマウス 2細胞期胚の割球について、種々の低温生物学的特性値についてしらべた結果、体積で 1.4 倍、固形分含量で 3 倍、水透過性で 2.7 倍、エチレングリコール透過性では 1.6 倍の偏差があることがわかった。このような大きな偏差は、耐凍性のばらつきと関係していると思われる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Mukaida T, Kasai M. Vitrification of human embryos (Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shohan Z, eds), Taylors & Francis, London, pp. 281-289, 2004.

Kasai M, Mukaida T. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. Reproductive BioMedicine Online 9, 164-170, 2004.

葛西孫三郎. 卵子の凍結保存. 「生殖補助医療マニュアル」産婦人科の世界、春季増刊号 pp. 198-205, 2004.

Valdez Jr DM, Miyamoto A, Hara T, Seki S, Kasai M, Edashige K.

Water- and cryoprotectant-permeability of mature and immature oocytes in the medaka (*Oryzias latipes*). *Cryobiology* 50, 93-102, 2005.

葛西孫三郎. 凍結の原理. エンブリオロジストのための ART 必須ラボマニュアル (荒木康久、佐藤和文編)、医歯薬出版、東京、pp. 309-314, 2005.

葛西孫三郎. 生殖系列細胞の保存. 生殖補助医療胚培養士講習会テキスト (石島芳郎、菅原七郎、豊田裕編)、近代出版、東京、pp. 39-47, 2005 (印刷中).

Valdez Jr DM, Miyamoto A, Hara T, Edashige K, Kasai M. Sensitivity to chilling of medaka (*Oryzias latipes*) embryos at various developmental stages. *Theriogenology*, in press, 2005.

Mochida K, Ohkawa M, Inoue K, Valdez Jr DM, Kasai M, Ogura A. Birth of mice after in vitro fertilization using sperm transported within epididymis at refrigerated temperatures. *Theriogenology*, in press, 2005.

Pedro PB, Yokoyama E, Zhu SE, Yoshida N, Valdez Jr DM, Tanaka M, Edashige K, Kasai M. Permeability of mouse oocytes and embryos at various developmental stages to five cryoprotectants. *Journal of Reproduction and Development*, in press, 2005.

2. 学会発表

加藤英生・高梨伊知郎・酒井清高・久保田誠寛・中山和彦・葛西孫三郎. ガラス化保存したウシ性判別胚の庭先融解・移植による受胎性と分娩状況. 第 103 回日本畜産学会 (府中市). 2004. 3.

那須恵・枝重圭祐・葛西孫三郎. マウス 2 細胞期胚の細胞膜透過性. 第 45 回日本哺乳動物卵子学会 (大津市). 2004. 5.

淵脇恩美・小川真美・中島竜之・中潟直己・枝重圭祐・葛西孫三郎. 卵管ごと冷蔵保存したマウス胚の輸送. 第 45 回日本哺乳動物卵子学会 (大津市). 2004. 5.

桑野竜永・那須恵・枝重圭祐・葛西孫三郎. マウス初期胚におけるコンパクションと膜透過性. 第 97 回日本繁殖生物学会 (東広島市). 2004. 9.

矢澤健一・木村隼人・三宅正史・田中光信・葛西孫三郎・枝重圭祐. ブタ胚盤胞における水および耐凍剤の透過性の向上. 第 97 回日本繁殖生物学会 (東広島市). 2004. 9.

Valdez Jr DM・宮本明・原隆夫・枝重圭祐・葛西孫三郎. メダカ卵子の低温感受性. 第 97 回日本繁殖生物学会 (東広島市). 2004. 9.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

マウスの卵巣移植条件の検討

分担研究者 横山峯介 新潟大学脳研究所動物資源開発支援研究部門・教授

研究要旨

マウス卵巣移植における移植卵巣の条件を検討するために、8週齢から43週齢の各メスから摘出した卵巣を、1個そのままの状態あるいは2分割してレシピエントメスに移植した。いずれの週齢ならびに実験群からも移植卵巣由来の産仔が得られた。なお、2分割卵巣を移植した個体の成績がわずかに低い傾向がみられた。

A．研究目的

卵巣移植は、繁殖障害を伴うメスの個体から産仔を得る方法として極めて有用な技術である。我々はこれまでの研究によって、簡易ガラス化法によってマウス卵巣の凍結保存が可能であることを明らかにした。本研究では、マウス卵巣の凍結保存技術の実用化を図ることを目的に、その技術基盤となる卵巣の移植条件を検討した。

B．研究方法

卵巣を提供するメス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メスには野生型のC57BL/6系マウスを使用した。卵巣は8, 11, 20, 30ならびに43週齢のGFP-Tgメスから摘出し、1個そのままあるいは2分割して4～6週齢のレシピエントメスの卵巣嚢内に定法によって移植した。さらに、手術後4週間からオスと交配して、移植卵巣由来のGFP-Tg系の産仔が得られるかを調べた。

C．研究結果

各実験群とも卵巣移植を行ったレシピエントメスのすべてで妊娠が成立し、GFP-Tg系の産仔が得られた。卵巣を2分割して移植した実験群では、最も高週齢の43週群で

産仔数が1個そのまま群の約半数であったが、その他の週齢の2分割実験群ではわずかに低い成績であり、効率的な産仔生産が可能であった。

D．考察

各週齢のメスから採取された卵巣を2分割して移植しても、再現性のある成績で産仔の得られることが確認された。成熟メス個体から採取した卵巣を凍結する際には、1個そのままではサイズが大きすぎるのでいくつか分割して処理する必要があるため、今後、2分割した卵巣を用いた凍結保存を行い、その有効性を確認する必要がある。

E．結論

各週齢のメスから採取された卵巣を2分割して移植しても、再現性のある成績で産仔の得られることが確認された。成熟個体から採取した卵巣の凍結保存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

Takiguchi-Hayashi, K., Sekiguchi, M., Ashigaki, S., Takamatsu, M., Hasegawa, H., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Nakanishi, T. and Tanabe, Y.: Generation of reelin-positive marginal zone cells from the caudomedial wall of telencephalic vesicles. *J. Neurosci.*, 24:2286-2295, 2004.

Takahashi, M., Kojima, M., Nakajima, K., Kubota, M., Suzuki-Migishima, R., Motegi, Y., Yokoyama, M. and Takeuchi, T.: Cardiac abnormalities cause early lethality of *jumonji* mutant mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 324:1319-1323, 2004.

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 中瀧直己

研究要旨

融解後、受精能が低い凍結マウス精子の受精率を高めるための技術として、レーザーによる透明帯穿孔卵子の作製システムを開発した。このシステムにより作出された透明体穿孔卵子と受精能の低い C57BL/6J 凍結マウス精子間で体外受精を行ったところ、受精率が飛躍的に向上した。また、得られた 2 細胞期胚の少なくとも一部は、受容雌への移植により産子へ発生した。

A. 研究目的

現在、遺伝子改変マウスのバックグラウンドは、約 80% が C57BL/6 系統である。しかしながら、C57BL/6 系統の凍結精子の受精能は、極めて低く、約 10% 程度であるため、新規保存液の開発が望まれているが、良好な保存液の開発は、未だ、行われていないのが現状である。そこで、本実験では、卵子側からのアプローチとして、透明帯穿孔卵子を作出、それら卵子と C57BL/6 凍結精子との間で体外受精を行い、受精率が向上するか否かの検討を行った。

B. 研究方法

実験には、過排卵処理を施した C57BL/6J (12 週齢) の成熟雌マウスより採取し、卵丘細胞を除去した卵子を用いた。透明帯の穿孔は、卵子を 0.5M シュークロースに入れ、卵細胞質を収縮させた後、卵細胞の最も広い部分の透明帯にレーザーを照射することにより行った (出力 350mW、0.65mS の照射を行い、直径約 12 μ の穿孔を行った)。透明体穿孔卵子を作製後、融解した凍結 C57BL/6J 精子との間で体外受精を行った。続いて、2 細胞期へ発生した胚の一部を受容雌の卵管へ移植し、産子への発生について検討を行った。

C. 研究結果

卵丘細胞を除去した計 530 個の卵子への穿孔を行ったところ、その 99% (525 個) が生存した。その内、129 個を C57BL/6 凍結精子を用いて体外受精を行った結果、その 70% に当たる 90 個が 2 細胞期へ発生した。

また、その一部を受容雌の卵管に移植したところ、約 30% が産子へ発生した (27/89)。なお、それら産子は形態的にまったく正常であり、何ら異常は認められなかった。

D. 考察

レーザー照射で作出した透明体穿孔卵子と受精能の低い C57BL/6 凍結精子間で体外受精を行うことにより、受精率が飛躍的に向上したことから、本透明帯穿孔卵子作製システムで作製した透明体穿孔卵子は、今後、受精能の低い凍結精子のみならず、運動性の不良な新鮮精子への適用など、その応用範囲がさらに広がるものと思われる。

E. 結論

本透明体穿孔卵子作出システムは、作製作業が容易である、大量作製が可能、穴の大きさが均一、成功率が極めて高いなどの特長があり、これにより作製された透明体穿孔卵子を用いることで、受精能の低い C57BL/6 凍結精子の受精率を飛躍的に向上させることが可能となった。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ito K, Hirao A, Arai F, Matsuoka S, Takubo K, Hamaguchi I, Nomiyama K, Hosokawa K, Sakurada K, Nakagata N, Ikeda Y, Mak TW, Suda T.: Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. Nature. 431(7011):997-1002. 2004
- 2) Nitta Y, Yoshida K, Satoh K, Senba K, Nakagata N, Peters J, Cattanach BM. Spontaneous and Radiation-induced Leukemogenesis of the Mouse Small Eye Mutant, Pax6(Sey3H). J. Radiat. Res. (Tokyo). 45(2): 245-251. 2004.
- 3) Suzuki K, Yoshimoto N, Shimoda K, Sakamoto W, Ide Y, Kaneko T, Nakashima T, Hayasaka I, Nakagata N. Cytoplasmic dysmorphisms in metaphase II chimpanzee oocytes. Reprod Biomed Online. 9(1):54-58. 2004.
- 4) Nishizono H, Shioda M, Takeo T, Irie T, Nakagata N. Decrease of fertilizing ability of mouse spermatozoa after freezing and thawing is related to cellular injury. Biol Reprod. 71(3):973-978. 2004.
- 5) Nitta Y, Yoshida K, Nakagata N, Harada T, Ishizaki F, Nitta K, Torii M. Effects of a hemizygous deletion of mouse chromosome 2 on the hematopoietic and intestinal tumorigenesis. J Toxicol Pathol 17:105-112, 2004

2. 学会発表

- 1) 中潟直己: 遺伝子改変マウスの胚・精子バンクシステム 北陸実験動物研究会第8回総会・第22回研究会、2004.5.8、金沢
- 2) 中潟直己: 熊大 CARD における生殖工学技術研修について 第51回日本実験動物学会総会、2004.5、長崎
- 3) 山村綾子、柳田朋子、竹市美和子、井手幸恵、小川真美、金子武人、中潟直己: 10年間凍結保存されたマウス精子の受精能の検討 第51回日本実験動物学会総会、2004.5、長崎
- 4) 井手幸恵、山村綾子、小川真美、柳田朋子、竹市美和子、中島竜之、金子武人、中村直子、吉住正等美、浦野 徹、中潟直己: 種々の凍結法による凍結マウス胚の融解後の成績について 第51回日本実験動物学会総会、2004.5、長崎
- 5) 小川真美、山村綾子、柳田朋子、井手幸恵、竹市美和子、中島竜之、金子武人、城石俊彦、中潟直己: JF1/Ms の過排卵処理におけるホルモン濃度と週齢の検討 第51回日本実験動物学会総会、2004.5、長崎
- 6) 柳 美穂、坂本亘、中島竜之、小原めぐみ、清原友美、井上聖也、中潟直己: 透明帯穿孔卵子を用いたマウス凍結融解精子の体外受精成績について 第51回日本実験動物学会総会、2004.5、長崎
- 7) 金子武人、山村綾子、小川真美、井手幸恵、柳田朋子、竹市美和子、中島竜之、中潟直己: 遺伝子改変雄マウスを用いた体外受精と得られた胚の凍結保存および移植成績 第45回日本哺乳動物卵子学会、2004.5、大津

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

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、昨年度検討した凍結保存幼若マウス卵巣の卵胞発育培養を応用した胚作成法の改良を試み、卵胞発育培養条件の改変によって胚盤胞形成率の向上が達成できたが、依然として胚移植による産仔作出には至らなかった。

A. 研究目的

昨年度、卵巣ガラス化保存に卵胞発育培養を組み合わせることで卵巣移植を経ずに胚を得る方法を検討した結果、ごく少数ながら胚盤胞を得ることができた。しかし、より効率の良い胚作成、そして生存産仔の作出には更に改良を要する。そこで本年度は卵胞発育培養法の改変を行い、胚作成の効率化と産仔作出を試みた。

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、昨年度報告した 30 分静置法により解凍した。コラゲナーゼとピペティングにより卵胞を単離し、昨年度用いた 5%FBS 添加 Waymouth 培地に替えて、5%FBS 添加 α -MEM 培地 (MEM) 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。さらに Ascorbic acid 2-O- α -Glucoside (A α G) と Alanyl-glutamine (AlaGln) を添加した培養群 (MEM+A α G+AlaGln) も設定した。その後、EGF 添加培地にて体外成熟培養し、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°C、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、3~5 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

昨年度の条件で得られた卵子数 (210.7 \pm 28.6, 実験 1 回当たり卵巣 2 匹分の平均 \pm 標準誤差, n=3) と今回設定した 2 つの条件 (MEM 群と MEM+A α G+AlaGln 群) では採卵数に差はなかったが (238.0 \pm 22.3, n=3 および 249.6 \pm 17.9, n=5)、卵子成熟率は有意に高かった (昨年度: 6.4 \pm 0.9%、MEM: 18.6 \pm 0.8; MEM+A α G+AlaGln: 40.6 \pm 6.6%)。MEM+A α G+AlaGln 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 54.9 \pm 5.9%、2 細胞から胚盤胞へ 29.6 \pm 6.5% が発生し、昨年度実績よりも胚盤胞形成率が有意に高かった (昨年度: 15.9 \pm 0.8%)。しかし、得られた 2 細胞期胚 (101 個) や桑実胚+胚盤胞 (32 個) を偽妊娠雌へ移植しても着床すらしなかった。

D. 考察

卵巣の凍結保存における卵胞卵子の生存性は、昨年度示したように解凍方法に強く依存することに加えて、培養液の組成にも強く影響を受けることがわかった。今回、ビタミン C 様物質とグルタミン様物質の添加により卵子

の体外成熟率が向上したことから、培養時の卵子卵丘細胞複合体への酸化ストレスが卵子の性状を悪化させる一因であることが示唆された。しかし、酸化ストレスの軽減を行なっても生存産仔が得られないことから、卵巣のガラス化保存においては、多様な凍害が卵子に生じている可能性が考えられた。

E. 結論

培養液組成の改変により、ガラス化保存卵巣由来卵子の体外成熟率や胚盤胞形成率に有意な向上が見られた。しかし、得られた 2 細胞期胚や胚盤胞を偽妊娠雌へ移植しても着床すらしないため、今後更に改良を要すると考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

- Takano K, Koura M, Noguchi Y, Yamamoto Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J, Suzuki O. Sequence analysis of cDNA encoding follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone β -subunits in the Mastomys (*Praomys coucha*). *Gen Comp Endocrinol* 138: 281-286, 2004.

2) 学会発表

- 鈴木 治、秦 朋子、小浦美奈子、高野 薫、山本美江、野口洋子、山田-内尾こずえ、松田潤一郎、右島富士男、横山峯介: ガラス化保存卵巣より得た卵胞の体外発育培養法の検討, 第51日本実験動物学会総会, 長崎, 2004年5月
- O. Suzuki, T Hata, N Takekawa, M Koura, K Takano, Y Yamamoto, Y Noguchi, K Uchio-Yamada, J Matsuda, In vitro growth culture of preantral follicles from mouse ovaries cryopreserved using vitrification, 37th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, Vancouver, Canada, 2004年8月
- O. Suzuki, M. Koura, Y. Noguchi, K. Takano, K. Uchio-Yamada, Y. Yamamoto, and J. Matsuda, Characterization of the follicle stimulating hormone β -subunit precursor protein cDNA in the rabbit, 44th annual meeting of the American Society for Cell Biology, Washington D.C., USA, 2004年12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。精巣および精巣上体の簡易凍結保存と顕微授精技術を組み合わせることにより、極めて容易にマウス雄性遺伝子の運搬を行えることを明らかにした。核移植クローンでは、途絶が危ぶまれる系統マウスの胸部線維芽細胞から核移植由来ES細胞の作出に成功した。また、新たに4種類の細胞種（神経幹細胞、間葉系幹細胞、helper T細胞、NKT細胞）をドナーとして体細胞移植を実施し、神経幹細胞およびNKT細胞から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、1) マウスバンクや研究者間のマウス系統の提供を容易にするための精巣・精巣上体簡易凍結法と顕微授精技術を組み合わせによる産子作出、2) 途絶が危ぶまれる系統からの体細胞核移植由来ES細胞（ntES細胞）の作出、および3) 新規細胞種によるクローン作出を試みた。

B. 研究方法

1) 精巣・精巣上体簡易凍結法と顕微授精技術を組み合わせによる産子作出: ICR 雄マウスより精巣と精巣上体尾部を摘出し、そのまま組織ごと凍結チューブに入れた。以下の凍結方法を試みた。A: 凍結チューブを凍結用コンテナへ納めてから-80℃ディープフリーザー中で凍結（約-1℃/分で冷却）、B: Aの後LN2で保存、C: コンテナなしで-80℃ディープフリーザー中で凍結、D: LN2に直接投入し、凍結保存。それぞれ1週間から1ヶ月間保存を行った。融解は凍結チューブを室温水に漬けることにより行った。融解後、常法に従い精子あるいは精巣細胞を分離した。融解後の雄性生殖細胞は正立顕微鏡下で形態観察およびトリパンブルー染色による生存の確認を行った。その後、マウス未受精卵へ顕微注入を行い、胚の体外発生および胚移植後の産子への発生を検討した。
2) および3) 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。ntES細胞の実施は、体細胞核移植由来胚盤胞より通常の方法により実施した。ES細胞作出のコントロールとして、体外受精由来胚盤胞（C57BL/6、B6D2F1 x B6D2F1、B6D2F1 x 129/Sv）そして卵丘細胞核移植由来胚盤胞（B6D2F1）を用いた。系統保存実験用のES細胞は、CXDD-P（リコンビナント近交系-自然繁殖停止）の雌個体より胸骨付近線維芽細胞を用いて電気融合法による核移植を行い、得られた胚盤胞より作出を試みた。

（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) 精巣・精巣上体簡易凍結法と顕微授精技術を組み合わせによる産子作出:

凍結融解後の細胞生存率は11-25%であった。精巣精子および円形精子細胞の顕微授精では、D区以外で産子が得られた。精巣上体精子を用いた顕微授精では、C区以外で産子が得られたが、精巣精子や円形精細胞と比べ、着床しないレシピエントが多くみられた。海外から同様の方法で凍結したB6系統由来のサンプルをドライアイス便で受け取り、顕微授精を行った結果、凍結精巣由来精子細胞から産子が得られた。

2) 途絶が危ぶまれる系統からの体細胞核移植由来ES細胞（ntES細胞）の作出:

コントロールの胚盤胞からは安定してES細胞が樹立できた。すなわち、体外受精胚盤胞から3.5-50%、そして核移植胚盤胞から20%の効率でES細胞が得られ、その作出技術が安定していることを確認できた。CXDD-P系統の線維芽細胞を用いた核移植は融合率が73.7%（112/152）であり、培養胚あたり47.4%（72/152）が胚盤胞へ発生した。100個の胚盤胞を用いて、5株のES細胞（雌4株、

雄1株)を樹立した。

3) 新規細胞種によるクローン作出:

雄(B6x129)F1 系統より分離あるいは樹立した神経幹細胞、間葉系幹細胞、helper T細胞、NKT細胞を用いて、核移植クローンを行った。その結果、神経幹細胞およびNKT細胞は再構築胚の半数以上が胚移植可能な4-cell以降へ発生し、胚移植後に健康な産子を得ることができた。特にNKT細胞は、70%がmorula/blastocystへ発生し、ES細胞も容易に樹立することができた。

D. 考察

マウスゲノムプロジェクトの進展および胚操作技術の改良と共に、遺伝子改変マウスが作出されてきている。その一部は完全な不妊あるいは不妊傾向のある系統である。また、凍結技術の不備により、融解後の精子が完全不動となり、体外受精による産子の作出が不可能な場合も多い。これらは顕微授精などの生殖補助技術により継代が必要である。前年度までに、近交系であっても産子を作成することに問題が無いことを明らかにした。このマウス系統の授受の際に最も障害になるのが、凍結胚および精子の液体窒素中での輸送である。そこで今年度は、顕微授精技術の補助により、これらのマウス遺伝子(配偶子)を簡易に凍結そして運搬する技術を開発した。その結果、精巣上体および精巣を丸ごと-80°Cで凍結するという超簡便凍結で良好な結果を得た。これは1)複雑な精子採取や凍結の技術を必要とせず、2)液体窒素でなくドライアイスでマウス系統の授受ができるという大きなメリットを保つ。今回は特に、雄B6精巣を英国からドライアイス中で輸送し、そこから産子を得ることで、この方法の安定性および有効性を確認することができた。

本研究のもう一つの課題である、体細胞核移植クローン技術は、マウスで成功はしているものの、世界中のいずれの研究室においても安定した成績は得られていない。特にドナー細胞としてF1交雑系を使わなければ産子が得られないという点は、安定したマウスバンク事業を進める上で極めて大きな欠点である。そこで今年度は、Wakayamaraが発表したように、体細胞核移植胚を胚移植するのではなく、いったんES細胞化して系統を保存する方法の応用を試みた。その結果、理研BRCで系統途絶が確定していた近交系統より雌雄のES細胞の樹立に成功した。今後、これらの雌雄ES細胞より系統の再興が可能であるか確認をする予定である。

これまでマウス体細胞核移植クローンは、卵丘細胞、セルトリ細胞、線維芽細胞のみが主なドナー細胞であったため、よりクローンをしやすい体細胞を探索する必要があった。そこで今年度は新たに5種類のドナー細胞を用いた。極めて意外な

結果であったが、NKT細胞クローンから体外および体内の胚発生とも最も良好な成績を得た。NKT細胞は、他のリンパ球同様にDNAの再構成が終了しており、これまでのリンパ球クローンの報告から、効率が悪いことが予想されていた。昨年度発表したように、その幹細胞である造血幹細胞は逆に効率が悪く、細胞の分化度とクローンの効率には相関関係がないことが示された。今後は、クローンの効率が何によって決定されるのか、様々な条件下でのクローン実験を行い、調べる必要がある。

E. 結論

マウス顕微授精技術を用いることにより、精巣および精巣上体の丸ごとの凍結および保存が可能であり、産子を作成できることが示された。また、途絶の危機にある近交系からも雌雄ntES細胞を樹立できた。また、NKT細胞がこれまでに報告された成体体細胞で最も良好なクローン効率をもたらすことを明らかにした。これらの成果は今後のマウスバンク事業の安定的および発展的運営に大きな基盤技術になると期待される。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohgane, J., Wakayama, T., Senda, S., Yamazaki, Y., Inoue, K., Ogura, A., Marh, J., Tanaka, S., Yanagimachi, R., and Shiota, K. The Sall3 locus is an epigenetic hotspot of aberrant DNA methylation associated with placentomegaly of cloned mice. *Genes Cells*, 9: 253-60, 2004.
- 2) Miki, H., Inoue, K., Ogonuki, N., Mochida, K., Nagashima, H., Baba, T., and Ogura, A. Cytoplasmic Asters are Required for Progression past the First Cell Cycle in Cloned Mouse Embryos. *Biol. Reprod.* 71:2022-2028, 2004.
- 3) Mochida, K., Ohkawa, M., Inoue, K., Valdez Jr, D. M., Kasai, M., and Ogura, A. Birth of mice after in vitro fertilization using C57BL/6 sperm transported within epididymides at refrigerated temperatures. *Theriogenology*, (in press).
- 4) Mochida, K., Wakayama, T., Takano, K., Noguchi, Y., Yamamoto, Y., Suzuki, O., Matsuda, J., and Ogura, A. Birth of offspring after transfer of Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) embryos cryopreserved by vitrification. *Mol. Reprod. Dev.*, 70: 464-470, 2005.
- 5) Chuma, S., Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, K., Ogonuki, N., Miki, H., Toyokuni, S., Hosokawa, M., Nakatsuji, N., Ogura, A., and Shinohara, T.

Spermatogenesis from epiblast and primordial germ cells following transplantation into postnatal mouse testis. *Development*, 132: 117-122, 2004.

6) Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, M., Lee, J., Yoshimoto, M., Ogonuki, N., Miki, H., Baba, S., Kato, T., Kazuki, Y., Toyokuni, S., Oshimura, M., Heike, T., Nakahata, T., Ishino, F., Ogura, A., and Shinohara, T. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell*, 119: 1001-1012, 2004.

7) Kanatsu-Shinohara, M., Miki, H., Inoue, K., Ogonuki, N., Toyokuni, S., Ogura, A., and Shinohara, T. Long-term culture of mouse male germline stem cells under serum- or feeder-free conditions. *Biol. Reprod.*, (in press).

8) Miki, H., Inoue, K., Kohda, T., Honda, A., Ogonuki, N., Yuzuriha, M., Mise, N., Matsui, Y., Baba, T., Abe, K., Ishino, F., and Ogura, A.: Birth of Mice Produced by Germ Cell Nuclear Transfer. *Genesis* 41: 81-86, 2005.

2. 学会発表

Inoue, K., Noda, S., Ogonuki, N., Miki, H., Kim, JM., Aoki, F., Miyoshi, M., Ogura, A. Inefficient development of embryos cloned from hematopoietic stem cells. The 37th Annual Meeting of SSR. August 2004, Vancouver, Canada.