

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14年度～16年度 総合研究報告書

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14年度～16年度 総合研究報告書

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

総合研究報告

- 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
- マウス胚の低温保存と低温生物学的特性…………… 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に関する検討…………… 15
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…………… 19
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…………… 24
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…………… 26
小倉淳郎 理化学研究所バイオリソースセンター 室長
- 胚・配偶子を用いた遺伝的品質検査法の開発および改良…………… 30
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法の確立…………… 32
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…………… 55
- 文献…………… 72

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）
総合研究報告書

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とスナネズミの精子凍結保存法を開発、改良し、マストミスの過排卵誘起法を開発した。②マウスの2細胞期胚を卵管ごと48時間保存する方法を開発し、マウス卵母細胞に水チャンネルを発現させることで耐凍性の向上に成功した。さらに、2細胞期胚の透過性等の特性に大きな偏差があることを明らかにした。③マウス卵巣凍結法を開発し、各週齢の雌から摘出した凍結卵巣から産仔が得られた。④マウスのデータベースの構築を行い、マウス生殖工学技術マニュアルCDを配布した。さらに、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、胚発生能獲得関連遺伝子の候補を見出した。ガラス化保存卵巣由来卵胞から胚盤胞が得られ、卵胞発育培養の有用性が示された。②マウスの顕微授精技術および核移植クローン技術を改善あるいは開発することにより、マウス系統の安定的な保存方法および簡便な輸送方法を確立した。（3）遺伝学的及び微生物学的品質管理については、①少数の胚および精子を用いたマイクロサテライトジェノタイプング法を開発した。②マストミス、スナネズミ、ハムスター、モルモット、ウサギについて、適切な二次抗体を選択することで、ウイルス、細菌の血清抗体検査をELISA法により実施可能であることが示唆された。

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

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) マストミス及びスナネズミ精子の凍結保存法の開発：マストミス及びスナネズミの精巣上体精子を用い、凍害保護剤としての各種糖、卵黄などの検討、凍結融解方法の検討を行い、融解精子の受精能を人工授精、体外受精等で検討するとともに、過排卵誘起法などを検討した。

（松田、協力研究者：明治大学太田昭彦）

2) マウス胚の低温保存と低温生物学的特性：マウスの簡便な授受のために、2細胞期胚を卵管ごと効率的に冷蔵保存する条件をしらべた。保存胚の生存性のばらつきの原因を明らかにするために、個々の2細胞期胚の細胞膜透過性をしらべた。また、透過性を支配するチャンネル発現の影響についても検討した。（葛西）

3) マウス卵巣の凍結保存に関する検討：マウス初期胚で実施されている簡易ガラス化法を修正した方法によって、各種週齢のGFP-Tgメスから摘出した卵巣を凍結保存した。融解した凍結

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

卵巣は、レシピエントメスの卵巣嚢内に定法によって移植し、オス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) 実験動物研究資源の基盤整備に関する研究: 熊本大学生命資源研究・支援センターで寄託・維持している遺伝子改変マウスのデータベースを構築した(CARD R-BASE)。マウス生殖工学技術マニュアル CD を作製した。レーザーによる透明帯穿孔卵作製システムを開発した。(中瀧)

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: Differential Display 法を用いて卵子の発生能が異なる 2 つの日齢のマウス卵巣由来卵子の発現比較による遺伝子検索を行った。さらに凍結保存マウス卵巣由来卵胞を発育培養した後、体外成熟、体外受精、体外培養を行い、胚発生率を観察するとともに胚移植による産仔作出を試みた。(鈴木)

6) 胚・配偶子保存のための新規生殖工学技術の開発: 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) 胚・配偶子を用いた遺伝的品質検査法の開発および改良: マウス初期胚と精子細胞からの核 DNA の精製は Proteinase K を含む 1xPCR reaction バッファー 10 μ l で行った。PCR における非イオン性界面活性剤(NP40 と Tween20)の効果の実験も行った。PCR は、5 種類のマイクロサテライトマーカーを対象に、常法により行った。(加藤)

8) 各種実験動物の血清抗体検査-ELISA 法の確立: 各種動物にワクシニアウイルス、センダイウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルスを接種して感染血清を得た。感染血清あるいは免疫血清を陽性コントロールとして ELISA を実施し、各種動物に最適な二次抗体について検討した。

(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) マストミス及びスナネズミ精子の凍結保存法の開発: 両種の精子凍結には、ラフィノースと卵黄に界面活性剤を添加した保存液が有効であり、保存液の遠心処理などでより良い成績が示された。凍結-融解マストミス精子の運動精子率は最大で 30%以上を示し、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。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) マウス胚の低温保存と低温生物学的特性: 胚を卵管ごと 0℃の 0.8M Suc/PB1 液で 48 時間保存し輸送した結果、移植後高率に産仔が得られた。個々の胚の透過係数等の値には 1.4-3 倍の偏差があった。卵子に AQP3 cRNA を注入すると、水透過性、グリセロール透過性、耐凍性が向上した。

3) マウス卵巣の凍結保存に関する検討: 各週齢のメス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。

4) 実験動物研究資源の基盤整備に関する研究: データベースの件数も増え、アクセス数やマウス供給件数も増加するものと考えられる。作製した CD を多数配布したことから、生殖工学技術の普及に大いに貢献するものと思われる。透明体穿孔卵子を用いることで、低受精能凍結精子の受精率が向上したことから、その他の低受精能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: 胚発生能獲得関連遺伝子の候補として HDGF など幾つかの遺伝子が見出された。ガラス化保存卵巣由来卵胞から胚盤胞が得られ、卵胞発育培養の有用性が示されたが、胚移植しても着床すらしなかったことから、さらに改良を要すると思われる。

6) 胚・配偶子保存のための新規生殖工学技術の開発: 顕微授精技術により、10 近交系で産子を得た。マウス雄性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、近交系から核移植由来 ES 細胞を樹立した。新規ドナー細胞(造血幹細胞、NKT 細胞、神経幹細胞、始原生殖細胞)からクローン産子を得た。

7) 胚・配偶子を用いた遺伝的品質検査法の開発および改良: 1 種類のマーカーの検出に必要な template DNA 量は、胚では 5 個、精子細胞では 1,500 個から得られた。精子細胞の DNA を用いて PCR を行う場合の非イオン活性剤の効果を確認された。低量の PCR プロダクトの検出には銀染色が有効であった。

8) 各種実験動物の血清抗体検査-ELISA 法の確立: ウサギ、モルモットでは ProteinG、マストミス、スナネズミでは抗ラット IgG 抗体が最適であった。ハムスターでは抗マウス、抗ハムスター IgG および ProteinG で同程度に良好な反応を示した。この ELISA 法はその他のウイルスや細菌の血清抗体検査への適用も期待される。

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、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。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マウスの2細胞期胚を卵管ごと48時間保存して輸送することが可能である。2細胞期胚の、透過性等の特性における大きな偏差は、耐凍性の違いと関係しているかもしれない。細胞にAQP3のcRNAを注入する手段は、細胞膜透過性の向上に役立つだろう。③各種週齢のメスから摘出した凍結卵巣から、移植によって凍結卵巣由来の産仔が得られることを確認した。この成果をもとに、各種系統の維持・保存の新しい手法として実用化されることが期待される。④熊本大学生命資源研究・支援センターに寄託されているマウスのデータベースの構築を行ったことにより、これらマウスの供給件数も飛躍的に増えつつある。作製したマウス生殖工学技術マニュアルCDの配布により、これら技術の普及に大いに貢献した。透明体穿孔卵子は、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判明した。

(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、胚発生能獲得関連遺伝子の候補として幾つかの遺伝子が見出された。ガラス化保存卵巣由来卵胞から胚盤胞が得られ、卵胞発育培養の有用性が示されたが、産仔作出には更に改良を要する。②マウスの顕微授精技術および核移植クローン技術を改善あるいは開発することにより、マウス系統の安定的な保存方法および簡便な輸送方法を確立することができた。

(3) 遺伝学的及び微生物学的品質管理については、①胚および精子を用いたマイクロサテライトジェノタイピング法について基礎的研究を行った。1種類のマーカーを検出するために最低必要な細胞数は8細胞期胚を用いた場合5個、精子の場合は1,500個であり、ジェノタイピングが可能であることが証明された。②マストミス、スナネズミ、ハムスター、モルモット、ウサギについても、適切な二次抗体を選択することで、ウイルス、細菌の血清抗体検査をELISA法により実施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

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有効な保存、供給法開発の一環として、ラフィノース・卵黄・界面活性剤からなる凍結保存液液をもちいた精子凍結保存法を開発した。凍結-融解スナネズミ精子は透明帯除去卵子による体外受精系で受精能が確認できた。凍結-融解マストミス精子の受精能は確認できなかったが、今まで困難であった過排卵誘起法の改良に成功し、今後、凍結-融解精子の受精能検定への応用が期待される

A. 研究目的

疾患モデル動物としては、マウスやラットが多数用いられているが、他種の実験動物についても貴重な疾患モデル動物が存在し、それぞれの特徴を生かして利用されている。現在、国立感染症研究所では、マストミス (*Praomys coucha*) とスナネズミ (*Meriones unguiculatus*) の近交系をそれぞれ5系統、維持している。マストミスは、アフリカ原産で齧歯目ネズミ科に属し、感染症、腫瘍、毒性などの研究に用いられている。スナネズミは中国東北部原産で齧歯目キヌゲネズミ科に属し、脳梗塞、てんかん、寄生虫や細菌感染などの研究に用いられている。これら2種の動物は、疾患モデルとして重要であり、貴重な遺伝資源の保存の一環として、マストミスおよびスナネズミ精子の凍結保存法の開発を行った。

B. 研究方法

1) マストミス精子凍結保存法の開発

動物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系統マストミスの4~8か月齢成熟雄を用いた。凍結保存液は、18%ラフィノース・0.7% Equex Stem・25%卵黄を遠心処理 (13,000g、90分) し上清を用いた。精巣上体尾部を切開し注射針にて精子塊を採取し、凍結保存液 50

μ 1中に希釈、数分浮遊させた後、精子用ストローに封入し、液体窒素気相下で5分間静置後、液体窒素に投入し凍結保存した。融解は10秒間37℃温水中にて行い、融解した精子液1 μ lを200 μ lのHEPES添加修正WhittinghamメEDIUMに導入し、37℃にて運動精子率と運動性を観察した。あわせて、過排卵誘起法の改良を目指し、3~8か月齢成熟雌を用い、hCGを10iu/匹、24時間後にPMSGを20iu/匹、その48時間後にhCGを20iu/匹投与し、最後のhCG投与17-18時間後に排卵数を調べた。

2) スナネズミ精子凍結保存法の開発

動物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。精巣上体精子の採取、凍結法などはマストミスの方法に準じ、凍結保存液は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。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

1) マストミス精子凍結保存法の開発

本凍結液を用いることで凍結-融解マストミス精子の運動精子率は、融解 15 分後に 32.9%、4 時間後には 15.4%を示し、活発な動きを示す多数の精子が得られた。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。

過排卵誘起法の開発については、本改良法によって平均 12.9 個を得ることが出来るようになり従来に比べ計画的な採卵が可能となった。

2) スナネズミ精子凍結保存法の開発

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

マストミス及びスナネズミの精子凍結には、糖としてはマウス精子と同様に 18%ラフィノースが有効であり、さらに卵黄と界面活性剤である Equex Stem を加えることで運動精子率の向上と、hyperactivation 様の活発な動きを示す精子の割合が増えた。

マストミス精子については凍結液の遠心処理により、運動精子率の向上が認められた。しかし、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。一方、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ために凍結融解精子の受精判定が困難である。そこで、成熟個体を用いた過排卵法の改良を試み、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るようになった。

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

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有効な保存、供給法開発の一環として、ラフィノース・卵黄・界面活性剤からなる凍結保存液液をもちいた精子凍結保存法を開発した。凍結-融解スナネズミ精子は透明帯除去卵子による体外受精系で受精能が確認できた。凍結-融解マストミス精子の受精能は確認できなかったが、今まで困難であった過排卵誘起法の改良に成功し、今後、凍結-融解精子の受精能検定への応用が期待される。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

Higuchi T, Aiba Y, Nomura T, Matsuda J, Mochida K, Suzuki M, Kikutani H, Honjo T, Nishioka K, Tsubata T.: Cutting Edge: Ectopic expression of CD40 ligand on B cells induces lupus-like autoimmune disease. *J Immunol*, 2002, 168:9-12.

Suzuki O, Mochida K, Yamamoto Y, Noguchi Y, Takano K, Matsuda J, Ogura A.: Comparison of glycoprotein hormone α -subunits of

laboratory animals. *Mol Reprod Dev*, 2002, 62:335-42.

Suzuki O, Koura M, Noguchi Y, Takano K, Yamamoto Y, Matsuda J.: Optimization of superovulation induction by human menopausal gonadotropin in guinea pigs based on follicular waves and FSH-receptor homologies. *Mol Reprod Dev*, 2003, 64:219-225.

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.

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.

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.

2. 学会発表

持田慶司、松田潤一郎、高野薫、鈴木治、山本美江、野口洋子、小浦美奈子、中山一栄、越後貫成美、井上貴美子、小倉淳郎：近交系マウス初期胚の最適な凍結保存法の検討（緩慢法とガラス化法の比較）、第49回日本実験動物学会総会、2002年5月、名古屋。

鈴木 治、持田慶司、高野薫、野口洋子、山本美江、松田潤一郎、小倉淳郎：第一波卵胞発育における B6D2F1 マウス卵子の発生能獲得、第49回日本実験動物学会総会、2002年5月、名古屋。

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。

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

マウス胚の低温保存と低温生物学的特性

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℃の0.8 M シュクロース添加 PBI 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。C57BL/6 マウスの胚を卵管ごと同液で48時間冷蔵保存して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。さらに、輸送後にガラス化凍結した胚も移植後産子に発育した。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。

しかし、同じ方法で胚を処理しても、生存している胚もあれば死滅するものもある。その原因を明らかにするために、個々のマウス2細胞期胚の低温生物学的特性を調べた。ICR系マウスの2細胞期胚を、25℃の等張のPBI液から高張なシュクロース添加PBI液またはエチレングリコール添加PBI液に移したときの相対的体積変化から、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、低温保存後の生存性のばらつきと関係していると思われる。

胚の保存と細胞膜透過性には重要な関係があると思われる。膜透過性を人為的に高める目的で、グリセロール透過性の極めて低いマウス卵母細胞に、水やグリセロールを透過させるチャンネルであるアクアポリン(AQP)3のcRNA、(対照区では水)を注入したのち成熟させた。AQP3 cRNAを注入した卵子は、対照卵子に比べて、水透過性とグリセロール透過性が著しく上昇し、グリセロールをベースとしたガラス化溶液で凍結しても、生存できるようになった。また、生存卵子は受精・発生能力を保持していた。AQP cRNAの注入は、耐凍剤透過性を改善する有効な手段になると思われる。

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℃のPBI液に入れて輸送で

きることを示されたが(Kamimura et al., 2003, *Comp Med* 53: 393)、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(48時間)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℃のPBI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(Kasai, 1986, *J In Vitro Fertil Embryo Transfer*, 3: 10)。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

保存した胚の生存性とさらに凍結保存後の生存性をしらべた。

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。

保存胚の生存性と細胞膜透過性には重要な関係があると思われる。近年、水や耐凍剤の透過に水チャンネル（アクアポリン；AQP）が関与していることが明らかにされた。従って、卵子や胚に、これらの水チャンネルを人為的に発現させれば、耐凍性を高めることができるかもしれない。そこで、グリセロール透過性の低いマウス卵母細胞をモデルとして用い、AQP3 の cRNA を卵細胞に注入することによって、AQP を一時に大量発現させて水透過性や耐凍剤透過性を上昇させ、グリセロールを用いて凍結保存できるようになるかどうかをしらべた。

B. 研究方法

「実験 1」

ICR 系または C57BL/6 系のマウスから 2 細胞期胚を含む卵管を採取した。胚は、卵管から取り出したのち、または卵管ごと、5℃、0℃、あるいは-5℃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℃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。

「実験 2」

ICR 系雌マウスから 2 細胞期胚を採取した。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_0 値) を算出した。また、two-parameter-formalism の理論 (Kleinhans, 1998, Cryobiology 37, 271) に基づいて、水と耐凍剤の移動をシミュレートし、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。

「実験 3」

ラット腎臓から RNA を抽出し、ラット AQP3 の DNA 配列をもとに作成したプライマーを用いて RT-PCR により、完全長の AQP3 の cDNA を得た。SP64T ベクターに cDNA を組み込み、制限酵素で切断してから、*in vitro* で SP6 RNA ポリメラーゼを用いて cap を付加した cRNA を合成した。PMSG を投与した ICR 系雌マウスの卵巣から卵核胞期の卵母細胞を回収し、ピペッティングで卵丘細胞を除去した。卵母細胞に、AQP3 cRNA あるいは対照として水を約 20 μl ずつ注入した。cRNA 注入卵子は 12 時間成熟培養し

た後、極体の放出が見られた卵子を実験に用いた。卵母細胞の水透過性と耐凍剤透過性を調べるために、卵母細胞を 25℃ の 10%グリセロール添加 PB1 液に浸して 10 分間撮影し、相対的体積変化から Lp 値とグリセロール透過係数 (Pgly) を算定した。次に、マウス卵母細胞の透過性が極めて低いグリセロールを耐凍剤に用いて、AQP3 cRNA 注入卵子を凍結保存できるかどうかをしらべた。cRNA 注入後成熟させた卵母細胞を、25℃で 10%グリセロール/PB1 液と、20% グリセロールを含む GFS20 で前処理後、40%グリセロールを含む GFS40 に導入し、液体窒素中に浸してガラス化保存した。卵子は融解後 1~3 時間培養し、形態が正常なものを生存とした。一部の試験では、個々の卵子について 10%グリセロール/PB1 液での前処理中の体積変化を測定し、Lp 値と Pgly 値を求めた。さらに、凍結融解後に生存した AQP3 cRNA 注入卵子の受精能を調べるために、融解した卵子の透明帯を除去したのち体外受精させた。

(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、高知大学農学部動物実験委員会に申請し、承認を受けた。

C. 結果と考察

「実験 1」

卵管から取り出した ICR マウスの 2 細胞期胚を 5℃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、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℃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。

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。

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、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。また、C57/BL6 胚では、輸送後に凍結保存・移植した結果、26%が産子に発育した。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ことが明らかとなった。

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。

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、冷蔵輸送した胚を凍結保存することもできることから、幅広い利用方法が可能であろう。

「実験 2」

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 ($n = 9, R^2 = 0.17$)。

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、遺伝的には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。

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、その経路の解明については今後の課題である。

「実験 3」

マウス卵母細胞を 10% グリセロール/PBI 液に浸すと、水を注入した卵子は元の体積の約 35% までゆっくり収縮してその後ほとんど体積が回復しなかったのに対し、AQP3 cRNA を注入した卵子は、約 50% まで急速に収縮した後、10 分間でほぼ元の体積まで回復した。この体積変化から算出された cRNA 注入卵子の L_p 値 (3.1) と P_{gly} 値 (0.0037) は、いずれも対照区の卵子の値 (それぞれ 0.9 および 0.00008) と比べて著しく高かった。水を注入した対照区の卵子は、凍結融解後全く生存しなかったのに対し、cRNA を注入した卵子は約 70% が生存した。しかし、 L_p と P_{gly} の値は個々の卵子で大きく異なり、両値の高い卵子で生存率が高かった。凍結融解した cRNA 注入卵子を体外受精させた結果、媒精 24 時間後に約 30% が 2 細胞に分裂した。また、媒精 6 時間後に固定してしらべた結果、約 40% の卵子が受精していた。これらの値は、凍結保存しなかった水注入卵子の値と比べて有意な差はなかった。さらに、一部の 2 細胞期胚は、移植後産子に発育した。

マウス卵母細胞内では、AQP3 や AQP7 の mRNA が発現していることが明らかにされている。しかし、対照として水を注入したマウス卵子の L_p 値が低かったこと、およびマウス卵母細胞の透過性の

温度依存係数が高いことが報告されていることから、マウス卵母細胞の水の透過は、チャンネルではなく脂質二重膜を介した単純拡散に大きく依存していると推測される。従って、AQP のタンパクとしての発現量はかなり少ないものと考えられる。2細胞期胚の体積変化は卵母細胞と同様であることから、2細胞期胚の透過性も同様にチャンネルに依存していないと推測される。一方、AQP3 cRNA を注入した卵子では、Lp と Pgly の値は個々の卵子で大きく異なっており、AQP の発現量も異なると考えられる。しかし、Lp や Pgly の値と凍結保存後の生存率との間には相関がみられることから、水や耐凍剤を透過するチャンネルを人為的に発現させることにより、耐凍性を向上させることが可能であることが明らかとなった。

E. 結論

1. 0°C 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。また輸送した胚を凍結保存することも可能である。
2. 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の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、耐凍性の違いと関係していると思われる。
3. マウス卵母細胞に AQP3 の cRNA を注入して発現させることにより、細胞膜の水透過性とグリセロール透過性を向上させ、さらに卵子の耐凍性も向上させることができた。また AQP3 cRNA を発現させた卵子は、凍結融解後も受精・発生能を有していた。AQP の cRNA を注入する手段は、細胞の耐凍性を改善するのに有効であると考えられる。

F. 健康危険情報
該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Kasai M, Ito K, Edashige K. Morphological appearance of the cryopreserved mouse blastocyst as a tool to identify the type of cryoinjury. *Human Reproduction* 17 (7): 1863-1874, 2002.
- 葛西孫三郎. 生殖医療における凍結技術. *Hormone Frontier in Gynecology* 9 (2): 183-188, 2002.
- 葛西孫三郎・枝重圭祐. 卵細胞と初期胚の凍結保存. *産婦人科の世界* 54 (6): 593-601, 2002.
- Edashige K, Yamaji Y, Kleinhans FW, Kasai M. Artificial expression of aquaporin-3 improves the survival of mouse oocytes after cryopreservation. *Biology of Reproduction* 68 (1): 87-94, 2003.
- Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T, Wada S, Oka C, Kasai M, Takahashi K. Vitrification of human blastocysts using cryoloops: clinical outcome of 223 cycles. *Human Reproduction* 18 (2): 384-391, 2003.
- Han MS, Niwa K, Kasai M. Vitrification of rat embryos at various developmental stages. *Theriogenology*. 59 (8): 1851-1863, 2003.
- 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、東京, pp. 99-111, 2003.
- Mukaida T, Takahashi K, Kasai M. Blastocyst cryopreservation: Ultrarapid vitrification using cryoloop technique. *Reproductive BioMedicine Online* 6 (2), 221-225, 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, New York,

- 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.
- Mukaida T, Kasai M. Vitrification of human embryos (Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shohan Z, eds), *Taylor & 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: 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
- Edashige K, Ichimaru N, Higashino Y, Kasai M, Kleinhans FW. Water permeation in mouse morulae relies on water channels. 39th Annual Meeting of the Society for Cryobiology (Colorado, USA), 2002. 7.
- 山地洋平・葛西孫三郎・枝重圭祐. 水チャンネルを発現させたマウス卵子の凍結融解後の受精・発生能. 第95回日本繁殖生物学会 (盛岡市). 2002. 9.
- 関信輔・山地洋平・Valdez Delgado Jr・枝重圭祐・葛西孫三郎. 水チャンネルの人為的発現によるゼブラフィッシュ胚の水と耐凍剤に対する透過性向上. 第95回日本繁殖生物学会 (盛岡市). 2002. 9.
- Mukaida T, Wada S, Tomiyama T, Oka C, Takahashi K, Kasai M. Clinical outcome after transfer of human blastocysts (BLs) vitrified on day 5 and on day 6 with a cryoloop technique. 58th Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine (Seattle, USA). 2002. 10.
- 葛西孫三郎. 胚凍結保存と低温生物学. 第11回 (中国) 動物繁殖学術検討会 (昆明). 2002. 11.
- 葛西孫三郎. 胚の凍結保存: 基礎から最新まで. 第9回臨床エンブリオロジスト研究会 (浜松市) 2003. 1.
- 田中光信・山地洋平・市丸奈津子・葛西孫三郎・枝重圭祐. マウス卵子および桑実胚における水チャンネルの発現. 第101回日本畜産学会 (つくば市). 2003. 3.
- 加藤英生・中山和彦・酒井清高・久保田誠寛・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. 第101回日本畜産学会 (つくば市). 2003. 3.
- 葛西孫三郎・川道真菜美・枝重圭祐・小川真美・中島竜之・中潟直己. 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.
- 持田慶司・葛西孫三郎・小倉惇郎. 低温輸送した精巣上体尾部から採取したマウス精子の耐凍性と受精能. 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・朱士恩・枝重圭祐. 凍結保存したマウス拡大胚盤胞の移植後の発育. 第 52 回関西畜学会 (徳島市) 2003. 10.
- 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.
- 越本知大・Cozy L・葛西孫三郎・枝重圭祐・篠原明男・Pultz MA. キョウソヤドリコバチ (*Nasonia vitripennis*) 受精卵の凍結保存へのアプローチ. 第 21 回九州実験動物研究会総会 (大分県). 2003. 11.
- 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トと膜透過性. 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. プ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

マウス卵巣の凍結保存に関する検討

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ことを目的に研究を実施した。各種週齢メスから摘出した卵巣を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。各実験群とも移植卵巣由来の産仔が効率よく得られることが明らかになった。

A．研究目的

卵巣移植は、何らかの異常を有するために性成熟前に死亡したり、性成熟に達しても交尾行動をとれないために繁殖障害を呈するメスの個体から産仔を得る方法として有用である。マウスにおいては、これまでに多くの突然変異個体が見つけたされ、また近年はいろいろな人為的操作によって様々な遺伝子操作マウスがつぎつぎと作出されている。これらの系統を保存するために現在は、初期胚ならびに精子の凍結保存が実用化されて大きな成果を挙げている。本研究では、系統保存の新たな方法としての卵巣凍結法を検討した。

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発光タンパク(GFP: Green fluorescent Protein)を全身に発現する遺伝的背景が C57BL/6 系統のトランスジェニックマウスを使用した。卵巣の凍結保存は、マウス初期胚で実施されている簡易ガラス化法を修正して行った。すなわち、2, 8, 11ならびに 20 週齢のメスから摘出した卵巣を mW 培地で洗浄し、室温下で 1 M DMSO 溶液に 5 分間浸した後、クライオチューブ内の 0℃ DAP213 保存液に移してさらに 5 分間処理後に液体窒素中 (-196℃) に投入した。融解は液体窒素タンクからクライオチューブを取り出して約 2 分間室温に静置し、さらに 37℃ シュークローズ溶液を加えて行った。回収した卵巣は、あらかじめ

卵巣の一部を摘出した4週齢のC57BL/6の野生型メスの卵巣嚢内に移植した。これらのメスは4週間後からオスと交配した。得られた産仔はUV照射を行ってGFPの発現で移植卵巣由来であるかを判定した。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メスの成績は、50～80%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

これまで報告されているマウス卵巣の凍結保存は、プログラムフリーザーを使用して2～3時間かけて緩やかに冷却する緩慢凍結法で実施されたものがほとんどであった。本実験によって、マウス初期胚で実施されている簡易ガラス化法を修正した方法で、卵巣の凍結保存が可能であることが示された。なお、雌性生殖器官である卵巣は、卵子を生産することと、性ホルモンを産生する2つの役目を担っており、凍結保存の処理はこの2つの機能を失わせないかたちで行わなければならない。このことを考慮して、移植を受ける野生型C57BL/6メスの卵巣を一部残して、排卵とホルモン産生が正常に行われるように配慮した。しかし、移植した凍結保存卵巣も正常の機能を発揮することが確認できたので、移植を受けるメスの卵巣摘出を完全に行っても、問題ないことが示唆された。

E. 結論

操作が極めて簡便なガラス化法で、マウス卵巣の凍結保存が効能であることを実証した。また、各週齢のメス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。この成果をもとに、さらに検討を進めることによって、各種系統の維持・保存の新しい手法として実用化されることが期待される。

F . 健康危険情報

特になし

G . 研究発表

1 . 論文発表

1) Migishima, F., Suzuki-Migishima, R., Song, S., Kuramochi, T., Azuma, S., Nishijima, M. and Yokoyama, M.: Successful cryopreservation of mouse ovaries by vitrification. *Biol. Reprod.*, 68:881-887, 2003.

2) Kobayashi, M., Ishiguro, K., Katoh-Fukui, Y., Yokoyama, M., and Fujita, C. S.: Phosphorylation state of tau in the hippocampus of apolipoprotein E4 and E3 knock-in mice. *Neuroreport*, 14:699-702, 2003.

3) 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.

4) 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.

5) 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.

6) 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.

7) Masuki, S., Takeoka, M., Taniguchi, S., Yokoyama, M. and Nose, H.: Impaired arterial pressure regulation during exercise due to enhanced muscular vasodilatation in calponin