

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

疾患研究のための実験動物研究資源の基盤整備に関する総合的研究

課題番号： H17-ゲノム-011

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者：松田潤一郎

(独立行政法人医薬基盤研究所)

平成18年3月

目 次

総括研究報告

疾患研究のための実験動物研究資源の基盤整備に関する総合的研究・・・ 1

主任研究者 松田潤一郎

独立行政法人医薬基盤研究所 生物資源研究部 研究リーダー

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・・・ 5

松田潤一郎 独立行政法人医薬基盤研究所生物資源研究部 研究リーダー

ガラス化保存したマウス胚のドライアイスによる簡易輸送に関する基礎的研究・・・ 9

葛西孫三郎 高知大学農学部 教授

グローバルな凍結マウス胚の輸送に関する研究・・・ 13

中潟直己 熊本大学生命資源研究センター 教授

ラットにおける胚操作と卵巣の凍結保存・・・ 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

卵巣内卵子の有効活用による新規生殖工学技術の開発・・・ 19

鈴木治 独立行政法人医薬基盤研究所生物資源研究部 主任研究員

実験動物の系統保存および開発のための新規生殖工学技術の開発・・・ 21

小倉淳郎 理化学研究所バイオリソースセンター 室長

相同組換えマウスの効率的作製のための生殖細胞保存・人工授精法の開発・・・ 25

岡部勝 大阪大学遺伝情報実験センター 教授

コモンマーモセットのミトコンドリアDNAにおけるSNPs・・・ 29

加藤秀樹 浜松医科大学医学部附属動物実験施設 助教授

組換えLCM-NP抗原を用いたELISA法・・・ 30

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・・・ 40

文献・・・ 46

疾患研究のための実験動物研究資源の基盤整備に関する総合的研究

主任研究者 松田潤一郎 独立行政法人医薬基盤研究所 生物資源研究部 研究リーダー

研究要旨

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のため、実験動物研究資源の維持管理、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い、次のような成果を得た。

(1) 維持管理、胚・配偶子等の保存、供給に関しては、①疾患モデルマウスやスナネズミなどの特殊実験動物について、各系統・動物種の繁殖特性に応じた維持法の開発や発生工学を含むさまざまな手法を駆使して系統維持を行った。②マウス胚・精子の凍結保存システムを構築するとともに、マウス精子の形態的特徴と体外受精能との関連を明らかにした。③ガラス化保存胚のドライアイスによる簡便な輸送法開発を行った。④種々の方法で凍結したマウス胚を世界のマウスバンク間で輸送するシステムを確立した。⑤ラット胚の簡易ガラス化法により凍結保存、卵巣の凍結保存法の開発を行った。⑥シリアンハムスターの卵巣移植法の開発を行うとともに、過排卵誘起の分子的基础を検討するため、実験用ハムスター4種の性腺刺激ホルモンの配列決定を行った。⑦マウス顕微授精技術の応用で、組織あるいは全身凍結保存により精子・精子細胞が長期間保存可能であることがわかった。また、ウサギのES細胞の樹立、およびマウス卵巣由来莖膜細胞幹細胞の分離に成功した。⑧相同組換えマウスの効率的な作製法開発として、X-GFPマウスを用いることでES細胞由来の産仔を100%の確率で生むキメラマウスの作製に成功した。(2) 遺伝学的及び微生物学的品質管理については、①コモンマーモセット遺伝マーカー開発を行い、ミトコンドリアDNAのSNPsを検出した。②国内の実験動物施設で発生したリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)汚染検査を行い、組換えLCM-NPを抗原として用いたELISAと他の検査方法の比較検討を行い、その有用性や問題点を明らかにした。

本研究により疾患モデル動物資源バンクを長期的安定的に、また高度に支えるための基盤技術が一層進んだ。今後のバンク運営に応用されることで、ヒトゲノム研究に疾患モデル動物が大いに貢献し、ゲノム医学等の発展に資するものと期待される。

分担研究者

葛西孫三郎	高知大学農学部教授
中瀧直己	熊本大学動物資源開発研究センター教授
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
鈴木治	独立行政法人医薬基盤研究所生物資源研究部主任研究員
小倉淳郎	理化学研究所バイオリソースセンター室長
岡部勝	大阪大学微生物病研究所教授
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

が重要である。従って、貴重な疾患モデル動物が質の高い研究資源として確保され、研究者に供給される体制が長期的安定的に整備されることは、ゲノム医学等の発展に大いに寄与することが期待される。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科学的に支えるため、実験動物研究資源の維持管理、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う。本研究は、疾患モデル動物にターゲットを絞り、関連する国内の先端研究者が一堂に会し研究班を組織して行うのが特徴であり、他に類を見ない多様で総合的な研究を行う。これらの研究により、疾患モデル動物研究資源バンクの基盤整備が進み、ヒトゲノム研究における疾患モデル動物の利用が推進されることで医学・創薬の開発研究が進展し、ひいては国民の健康、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

ヒトゲノム研究に基づくゲノム医学、ゲノム創薬を強力に推進するためには、疾患モデル動物を用いて、個体での病気の発症機構の解明や、先進的な治療法、治療薬の開発研究を行うこと

B. 研究方法

1) 各種実験動物の系統維持・凍結保存等：

疾患モデルなどマウス 24 系統、スナネズミ 3 系統、マストミス 5 系統、ハムスター 1 系統について、傾斜飼育法、体外受精、顕微授精などを応用し系統維持を行った。マウスについては、おもに 2 細胞期胚を EFS30 によるガラス化保存、精巢上体精子は R18S3 を用いて凍結保存を行った。さらにスナネズミ精子の凍結保存法、マストミス雌前立腺の内分泌支配、マウス精子の形態と体外受精能の検討を行った。

2) ガラス化保存マウス胚のドライアイスによる輸送法開発：

エチレングリコールとスクロースと Ficoll PM70 を含む EFS 溶液を保存液として用いた。桑実胚を液体窒素でガラス化保存し、25°C の水に直接浸漬して融解するか、-20~-80°C の中間温度で 3 分あるいは 1-24 時間保持した後、25°C の水に浸漬して融解した。48 時間培養して拡大胚盤胞に発育したものを生存とした。また、高濃度のスクロースを含む保存液を用いて桑実胚をガラス化した後、-80°C で 24 時間保持し、同様にして生存率をしらべた。

3) グローバルな凍結マウス胚の輸送：

C57BL/6J あるいは遺伝子改変マウスの 2 細胞期胚を用い、各施設で採用している凍結法にて胚を凍結保存し、ジャクソン研究所⇄CARD、MRC⇄CARD およびカロリンスカ研究所⇄CARD 間で、ドライシッパーにより凍結胚の輸送を行った。続いて各施設で凍結胚を融解、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。

4) ラットにおける胚操作と卵巣の凍結保存：

ミュータント系統を交配し 2 細胞期胚を回収した。凍結は簡易ガラス化法により行い、融解した胚は、偽妊娠メスの卵管に移植した。生後 10 日齢の SD 系ラットの卵巣を簡易ガラス化法により凍結保存し、融解後、組織学的な観察に供した。

5) 卵巣内卵子の有効活用による新規生殖工学技術の開発：

幼若 (2 週齢) HAW 系雌シリアンハムスターの卵巣を 3 週齢の野生色シリアンハムスターへ移植した。その後、HAW 雄と交配し、得られた産子の毛色を調べることにより、移植卵巣の正着を判定した。性腺刺激ホルモンの cDNA 配列の決定は、ハムスター 4 種の下垂体から下垂体 cDNA を作成し、RACE 法と PCR 産物の直接配列決定法により行った。

6) 実験動物の系統保存および開発のための新規生殖工学技術の開発：

精巢・精巢上体簡易凍結法として精巢、精巢

上体あるいはマウス全身をそのまま凍結して精子・精子細胞を保存した。融解後のこれらの細胞を用いて産子を作出した。ウサギの ES 細胞の作出は、特に継代時の細胞へのダメージを最小限にすることに考慮した。新規組織特異的幹細胞の樹立のため、卵巣細胞の培養により、卵子を除いた体細胞のみが残るように培養を行った。

7) 相同組換えマウスの効率的作製法開発：

X 染色体に GFP 遺伝子を導入した雄マウスを野生型の雌と交配すると、ブラストシストの時期になると GFP 遺伝子をもつ雌性胚のみが緑色の蛍光を発する。実体顕微鏡で雌性胚を選別し ES 細胞 (雄) を打ち込みキメラマウスを作製した。このキメラマウスの精子からどのような産仔が生まれるかを観察した。

8) 遺伝的モニタリング：

新たな霊長類の実験動物として開発が進められているコモンマーモセットの遺伝的マーカーとして、ミトコンドリア DNA マーカーの開発を目的に、D-loop の DNA シークエンスを行った。

9) 微生物学的モニタリング：

国内の実験動物施設で発生したリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) 汚染時に採取された LCMV 自然感染マウス及び感染が疑われるマウスの LCMV 汚染検査を通じ、組換え LCM-NP を抗原として用いた ELISA と他の検査方法の結果を比較し、その有用性や問題点を検討した。

(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、動物愛護の精神に従い苦痛の軽減、使用動物数の削減などに配慮し適切な取り扱いを行った。

C. D. 研究結果と考察

1) 各種実験動物の系統維持・凍結保存等：

疾患モデルマウスやスナネズミなどの特殊実験動物は一般に繁殖困難なことが、各系統・動物種の繁殖特性に応じて発生工学を含むさまざまな手法を駆使して系統維持にほぼ成功し、マウスについては凍結保存システムを構築した。スナネズミ精子の凍結保存には、糖としてはラクトースは不相当と考えられた。マストミス雌前立腺は、アンドロジェンの支配を強く受けていること、高い 5- α reductase によってアンドロジェン活性の高い DHT に変換する独特なものであると考えられた。マウス精子の尾部の異常と大型の細胞質小滴を持つことが受精率を下げる要因となる可能性が示唆された。

2) ガラス化保存マウス胚のドライアイスによる輸送法開発：

冷却/融解過程で桑実胚の細胞内の水を非結晶状態に保つには、エチレングリコールを 30~40% (v/v) の間の比較的狭い範囲の濃度で使用しなければならないことがわかった。液体窒素で

ガラス化保存した後、 $-20\sim-80^{\circ}\text{C}$ で保持すると、保持直後に生存率は低下し、保持時間を延長すると生存率はさらに低下した。特に $-40\sim-60^{\circ}\text{C}$ で保持した場合に生存率の低下が顕著であった。スクロース濃度を高めた保存液では、ガラス化保存後に -80°C で24時間保持した後も生存率(80%)は高かった。

3) グローバルな凍結マウス胚の輸送:

種々の方法で凍結された胚をそれぞれの融解法で融解した結果、そのほとんどが回収され、形態的正常胚の割合に多少、ばらつきがあったものの(41~100%)、その19~67%が産子へ発生した。また、得られたすべての産子は、病原微生物学的にクリーンであったことから、種々の方法で凍結されたマウス胚のグローバルな輸送が可能となった。

4) ラットにおける胚操作と卵巣の凍結保存:

ミュータント3系統の2細胞期胚を凍結保存し、融解後に偽妊雌に移植した結果、産仔率が43%であり、新鮮胚に比べやや低い成績であり、方法の見直しや保存用培地の検討が必要と思われた。生後10日齢の卵巣凍結保存においては、細胞の収縮、細胞質内の空胞など、組織学的にダメージを受けていると考えられる卵母細胞が多数みられた。今後、凍結保存液の組成や処理操作など、さらなる検討が必要であると考えられた。

5) 卵巣内卵子の有効活用による新規生殖工学技術の開発:

シリアンハムスターの卵巣移植手術を11例行い、2匹が出産に至ったが、移植された卵巣由来の産仔は得られなかった。現在交配中の個体がいるものの、移植卵巣由来産仔を確実に得るには麻酔、止血など移植手技に更なる改良が必要かと思われた。性腺刺激ホルモンの共通 α サブユニット、FSH- β サブユニット、LH- β サブユニットが、ハムスター4種全てで決定でき、過排卵誘起に使用するホルモンの選択検討時に配列の相同性を利用可能となった。

6) 実験動物の系統保存および開発のための新規生殖工学技術の開発:

精巣・精巣上体および全身の凍結保存でも長期間精子が受精能を維持することが明らかになった。ウサギのES細胞を分化能を維持したまま10代以上継代できるようになった。莖膜細胞の幹細胞あるいは前駆細胞を分離した。

7) 相同組換えマウスの効率的な作製法開発:

雌性胚にES細胞を打ち込むことにより出来上がるマウスの精巣内では雌性由来の生殖細胞は発生できず、ES細胞由来の生殖細胞のみが発生し精子を形成した。このためこのようなキメラマウスから生まれる子供はすべてES細胞由来で、100% germline transmission が達成された。しかし不妊になるキメラも多く何らかの改善策

が必要であることがわかった。

8) 遺伝的モニタリング:

コモンマーモセットミトコンドリアD-loopの33箇所にSNPsが観察され、そのうち5箇所が制限酵素サイトであることが判明したことから、今後は、シーケンスに依らない制限酵素切断による多型検査、いわゆるRFLPs (restriction fragment length polymorphisms)について検討する予定である。

9) 微生物学的モニタリング:

LCMV lysate 抗原あるいは精製 LCMV 抗原を用いた ELISA で陽性であったマウス血清は、組換え LCM-NP 抗原での ELISA でも陽性で、抗 LCMV 抗体に対する反応性は同等であった。しかし、ELISA で陰性の血清が IFA で陽性の場合もあった。RT-PCR では全産子が陽性だったが、抗 LCMV 抗体が検出されたのは40%の産子のみであった。これは垂直感染による免疫寛容の為で、抗体検査と RT-PCR を合わせて行う必要があることが示された。

E. 結論

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のため、実験動物研究資源の維持管理、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下記のように行った。これにより疾患モデル動物資源バンクを長期的安定的に、また高度に支えるための基盤技術が一層進んだ。今後のバンク運営に応用されることで、ヒトゲノム研究に疾患モデル動物が大いに貢献し、ゲノム医学等の発展に資するものと期待される。

1) 各種実験動物の系統維持・凍結保存等:

ゲノム医学などに重要な疾患モデルマウスやスナネズミなどの特殊実験動物について、各系統・動物種の繁殖特性に応じて発生工学を含むさまざまな手法を駆使して系統維持を行うとともに、マウス胚・精子の凍結保存システムを構築した。あわせてスナネズミ精子凍結法の改良検討を行い、マストミスがアンドロジェン代謝・作用機序解明のユニークなモデル動物であることを示すとともに、マウス精子の形態的特徴と体外受精能との関連を明らかにした。

2) ガラス化保存マウス胚のドライアイスによる輸送法開発:

通常よりスクロース濃度を上げた保存液で桑実胚をガラス化保存すると、 -80°C で24時間保持できた。さらに詳細にガラス化保存液の組成を検討し、数日間保存できるようになれば、ガラス化保存胚のドライアイスによる簡便な輸送が可能になると考えられた。

3) グローバルな凍結マウス胚の輸送:

種々の方法で凍結したマウス 2 細胞期胚を世界の代表的なマウスバンク間での輸送するシステムを確立した。

4) ラットにおける胚操作と卵巣の凍結保存：

疾患モデルを含む複数のミュータントラットの 2 細胞期胚を、簡易ガラス化法により凍結保存し、産仔を得ることができた。卵巣の凍結保存では、凍結保存液の処理操作が凍結保存卵巣に及ぼす影響を組織学的に観察し、方法を開発・改良のための基礎データを得た。

5) 卵巣内卵子の有効活用による新規生殖工学技術の開発：

卵巣移植によるハムスター産仔の作出を試みたが、現時点では成功しておらず、更なる改良が必要だと思われる。一方、ハムスター4 種の性腺刺激ホルモンの配列情報は過排卵技術の分子の基礎として有用であろう。

6) 実験動物の系統保存および開発のための新規生殖工学技術の開発：

マウス顕微授精技術を用いることにより、組織あるいは全身凍結保存により精子・精子細胞が長期間保存可能であることがわかった。また、ウサギの ES 様細胞の樹立、およびマウス卵巣由来莖膜細胞幹細胞の分離に成功した。これらの成果は今後の実験動物の発生工学技術の基礎として、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。

7) 相同組換えマウスの効率的作製法開発：

X-GFP マウスを用いることで ES 細胞由来の産仔を 100% の確率で生むキメラマウスを作製できることが実証された。しかし雌の胚とのキメラで作製される雄マウスであるため、不妊になる確率も高かった。今後は ICSI 法などを利用したレスキュー法を併用することによってこの手技を実用化に持ってゆきたい。

8) 遺伝的モニタリング：

系統維持されているコモン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クラスターに関する基礎的研究を行った結果、ミトコンドリア DNA の SNPs が検出された。

9) 微生物学的モニタリング：

組換え LCM-NP 抗原での ELISA は一次スクリーニング検査としての有用性が高いと思われた。垂直感染による免疫寛容状態のマウスの LCMV 汚染検査をする場合、抗体検査と RT-PCR を合わせて行うべきであるが、数週間以上同居させた同マウスの抗体検査を適切に実施することで LCMV 汚染を確認できる可能性もあると思われた。

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

岡部勝：特許出願 2005-234258：栄養外胚葉細胞特異的遺伝子導入法，2005 年 8 月 12 日出願。

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 独立行政法人医薬基盤研究所 生物資源研究部 研究リーダー
研究協力者 太田昭彦 明治大学農学部 専任講師

研究要旨

ゲノム医学などに重要な疾患モデルマウスやスナネズミなどの特殊実験動物について、各系統・動物種の繁殖特性に応じて発生工学を含むさまざまな手法を駆使して系統維持を行うとともに、マウス胚・精子の凍結保存システムを構築した。あわせてスナネズミ精子凍結法の改良検討を行い、マストミスがアンドロジェン代謝・作用機序解明のユニークなモデル動物であることを示すとともに、マウス精子の形態的特徴と体外受精能との関連を明らかにした。これらの研究により、基盤研における疾患モデル研究資源バンクの基盤整備が進んだ。

A. 研究目的

疾患モデル動物を始めとした実験動物は、ヒトゲノムに基づくゲノム医学やゲノム創薬研究に不可欠の研究資源であり、研究者にスムーズに利用される必要がある。とくに疾患モデル動物は繁殖困難なこともあり、その系統維持、収集、保存、供給システムを確立することは、我が国の医学、医薬品等開発研究の基盤として大変重要である。そこで、本研究では、飼育繁殖の困難な疾患モデルマウスや各種実験動物（スナネズミ、マストミスなど）の繁殖学的特性解析を行い、効率の良い系統維持管理に応用し、マウス胚・精子の凍結保存システムの構築を進めた。さらにスナネズミ精子凍結法の改良検討を行い、マストミス雌に特徴的な良く発達した前立腺の内分泌支配についても検討した。マウスについては安定した体外受精系の開発を目指し、各種近交系マウスの体外受精率と精子の形態的特徴との関連について研究を行った。これらの研究により、基盤研における疾患モデル研究資源バンクの基盤整備が進み、ヒトゲノム研究における疾患モデル動物の利用が推進されることで医学・創薬の開発研究が発展し、ひいては国民の健康、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) 各種実験動物の系統維持・凍結保存

疾患モデルなどマウス 24 系統、スナネズミ 3 系統、マストミス 5 系統、ハムスター 1 系統について、国立感染症研究所から独立行政法人医薬基盤研究所へ生体で移動し、必要に応じて傾斜飼育法、体外受精、顕微授精などを応用し系統維持を行った。マウスについては、おもに 2 細胞期胚を EFS30 によるガラス

化保存、精巢上体精子は R18S3 を用いて凍結保存を行った。

2) スナネズミ精子の凍結保存法開発

新たに報告されたラット精子凍結液（8%ラクトース・0.7% Equex Stem・23%卵黄液を遠心処理した上清:L8E23）がスナネズミ精子凍結に有効か否かを、我々がスナネズミ精子用に開発した R18E20（18%ラフィノース・0.7% Equex Stem・20%卵黄液を遠心処理した上清）、およびマウス精子用保存液 R18S3（18%ラフィノース・3%スキムミルクを遠心処理した上清）と比較検討した。精巢上体尾部精子を用い、凍結-融解後、HTF に導入し培養 6 時間まで精子運動性を調べた。

3) マストミス雌前立腺の内分泌支配の解析（研究協力者：太田昭彦）

雌雄の成熟マストミスに、アンチアンドロジェンである酢酸オサテロン投与、5- α reductase 阻害剤の finasteride 投与、性腺摘出、副腎摘出を各々行った後、前立腺および他の生殖器重量、血中および前立腺内の各種アンドロジェン濃度について検討した。

4) マウス精子の形態と体外受精能

現在汎用されている 5 系統の近交系マウス（129/SvJ、C57BL/6J、BALB/cA、C3H/HeN および DAB/2J）における精子の形態的特徴を頭部、尾部、および細胞質小滴に分けて調べると共に、体外受精率との相関を調べた。さらに精巢と精巢上体における細胞質小滴のユビキチン化の状態を免疫組織化学とウェスタンブロットにより調べた。

（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、動物愛護の精神に従い苦痛の軽減、使用動物数の削減などに配慮し適切な取り扱いを行った。

C. 研究結果

1) 感染研から移動してきた前記動物について、輸送や環境変化のストレスにより繁殖成績が一時的に低下したが、一部を除き繁殖、系統維持をほぼ順調に行うことが出来た。繁殖不良の疾患モデルである ICGN (ネフローゼ) などについては、傾斜ケージ飼育法などを工夫して継代維持を進めることが出来た。継代困難のマウス2系統については、1系統は体外受精、他の1系統は精子の運動性が極端に悪いため顕微授精 (ICSI) を行い継代に成功した。スナネズミとマストミスについてはケージサイズの大規模化や継代ペアの選抜、入れ替えなどをすることで繁殖成績の改善が得られた。但し繁殖成績には系統差が大きく、胎児の過熟-難産 (スナネズミ MGW) や繁殖成績に大きな変動 (波) がある (マストミス MST) など繁殖特性に対応した系統維持を行った。マウス胚・精子の凍結保存システムを構築し、疾患モデルマウスの保存、外部からの凍結胚、精子での導入を開始することが出来た。

2) ラット精子凍結液 L8E23 を用いた場合、スナネズミ凍結融解精子の運動精子率は 1-3% 以下であり、マウス用 R18S3 の最大 15-20%、スナネズミ用 R18E20 の最大 20-25% に比べて極端に低かった。R18E20 の場合、hyperactivation 様の動きを示す精子の割合も 2 割程度を示し、最も良好であった。

3) 雌マストミスの総アンドロジェン濃度は 0.007ng/ml と雄の 2.472ng/ml に比べ著しく低かった。しかし、驚くべきことに、前立腺内の総アンドロジェン濃度は 18.3ng/g と雄の 16.7ng/g と同等の高い濃度を示した。また、雌雄とも血中の主なアンドロジェンは、テストステロン (T) であり、前立腺ではジヒドロテストステロン (DHT) であった。雌では、酢酸オサテロン、卵巣摘出または副腎摘出によって前立腺の重量が減少した。finasteride 投与によって雄では前立腺内の DHT は、65% 減少したのに対し雌においては 35% の減少にとどまった。

4) マウスの精子形態の特徴は、各系統によって異なっていた。また、体外受精を行った結果と精子形態の各パラメータ間の相関を算出したところ、尾部の異常および大型の細胞質小滴の存在が受精率と強い負の相関を示した。抗ユビキチン抗体の免疫染色では、どの部位の精子の細胞質小滴においても抗ユビキチン抗体陽性であり、とくに精巣上体頭部精子の細

胞質小滴で陽性反応が強い傾向が認められた。ウエスタンブロット解析では精子を得た部位特異的、系統特異的 (B6 と BDF1) なバンドパターンが確認された。

D. 考察

1) 疾患モデルマウスやスナネズミなどの特殊実験動物は一般に繁殖困難なことが多く、とくに輸送や環境変化のストレスにも弱い。今回、感染研 (東京) から基盤研 (大阪) への動物の移動に伴い、各系統・動物種の繁殖特性に応じて発生工学を含むさまざまな手法を駆使して系統維持にほぼ成功し、マウスについては凍結保存システムを構築した。特殊動物については飼育条件などさらなる検討が必要であり、また胚・精子の凍結保存技術や体外受精など発生工学技術の発展が望まれる。

2) スナネズミ精子の凍結保存には、糖としてはラクトースは不相当と考えられた。ラフィノースと卵黄をベースとした場合が最も良好であることが再確認された。今後、凍結精子由来の産仔を得るためには体外受精系や人工授精系の開発が必要である。

3) マストミス雌前立腺は、アンドロジェンの支配を強く受けていること、その産生源は卵巣、副腎両者に由来することが示された。また雌前立腺においては低濃度の血中アンドロジェンを効率よく取込み、高い 5- α reductase によってアンドロジェン活性の高い DHT に変換することによって、前立腺を発達・維持させるという独特なものであると考えられた。

4) マウス精子の形態的特徴、すなわち尾部の異常と大型の細胞質小滴を持つことが受精率を下げる要因となる可能性が示唆された。精子蛋白のユビキチン化状態に系統差が示され、細胞質小滴除去機構との関連の解明が今後の課題である。

E. 結論

ゲノム医学などに重要な疾患モデルマウスやスナネズミなどの特殊実験動物について、各系統・動物種の繁殖特性に応じて発生工学を含むさまざまな手法を駆使して系統維持し、マウスについては凍結保存システムの構築を行った。スナネズミ精子の凍結保存には、ラフィノースと卵黄をベースとした場合が最も良好であることが再確認された。マストミス雌前立腺における内分泌支配機序は雄前立腺または雌の他の副性器における内分泌支配機序とも異なる独特なもので、アンドロジェン代

謝・作用機序解明のユニークなモデルであると考えられた。マウス精子の形態的特徴、すなわち尾部の異常と大型の細胞質小滴を持つことが受精率を下げる要因となる可能性が示唆され、また精子蛋白のユビキチン化状態の系統差が示された。これらの研究により、基盤研における疾患モデル研究資源バンクの基盤整備が進んだ。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

Cho A-R, Uchio-Yamada K, Torigai T, Miyamoto T, Miyoshi I, Matsuda J, Kurosawa T, Kon Y, Asano A, Sasaki N, Agui T. Deficiency of the tensin2 gene in the ICGN mouse, an animal model for congenital nephrotic syndrome. *Mammalian Genome*, in press, 2006.

Okada T, Ishii Y, Masujin K, Yasoshima A, Matsuda J, Ogura A, Nakayama H, Kunieda T, Doi K. The critical roles of serum/glucocorticoid regulated kinase 3 (SGK3) in the hair follicle morphogenesis and homeostasis: the allelic difference provides novel insights into hair follicle biology. *American Journal of Pathology*, in press, 2006.

Noguchi Y, Takano K, Koura M, Uchio-Yamada K, Matsuda J, Suzuki O. Sequence analysis of cDNA encoding rabbit follicle-stimulating hormone beta-subunit precursor protein. *Gen. Comp. Endocrinol.*, in press, 2006.

Hasegawa H, Sawa H, Lewis M, Orba Y, Sheehy N, Yamamoto Y, Ichinohe T, Tsunetsugu-Yokota Y, Katano H, Takahashi H, Matsuda J, Sata T, Kurata T, Nagashima K, Hall WW. Development of Thymus-Derived T-cell Leukemia/Lymphoma in Mice Transgenic for the Tax gene of Human T-Lymphotropic Virus Type-I (HTLV-I). *Nature Medicine*, in press, 2006.

Sekita Y, Wagatsuma H, Irie M, Kobayashi S, Kohda K, Matsuda J, Yokoyama M, Ogura A, Schuster-Gossler K, Gossler A, Ishino F, Kaneko-Ishino T. Aberrant regulation of imprinted gene expression in *Gtl2^{lacZ}* mice. *Cytogenet Genome Res*, in press, 2006.

Suzuki O, Hata T, Takekawa N, Koura M, Takano K, Yamamoto Y, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Transgene insertion pattern analysis using genomic walking in a transgenic mouse line. *Exp Anim*, 55(1):65-

69, 2006.

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*, 70:464-70, 2005.

2. 学会発表

鈴木治、秦朋子、竹川奈穂、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. ゲノムウォーキングによる遺伝子導入動物の導入遺伝子挿入形式の解析. 第52回日本実験動物学会総会、2005年5月、東京.

河合康洋、秦朋子、鈴木治、松田潤一郎. 各近交系マウスにおける精巢上体精子の形態が体外受精におよぼす影響. 第52回日本実験動物学会総会、2005年5月、東京.

山本美江、鈴木治、秦朋子、竹川奈穂、山田-内尾こずえ、高野薫、小浦美奈子、野口洋子、石野智子、松田潤一郎、佐藤勝紀. *Meg1/Grb10* 遺伝子導入マウスの糖尿病発症に関する血漿成分の動態解析. 第52回日本実験動物学会総会、2005年5月、東京.

Ayumi Takamura, Katsumi Higaki, Junichiro Matsuda, Yoshiyuki Suzuki and Eiji Nanba. Impairment of Trk receptor-mediated signaling in GM1-gangliosidosis mouse brain. 第78回日本生化学会大会、2005年10月、神戸.

一ノ宮悟史、渡辺浩史、松田潤一郎、丸山貴美子、戸田寛子、岩崎博之、黒澤美枝子、飯田真己、小川誠一郎、鈴木義之: 遺伝子組換えGM1-ガングリオシドーシスモデルマウスの神経学的評価. 第48回日本先天代謝異常学会総会、2005年11月、熊本.

鈴木義之、渡辺浩史、一ノ宮悟史、松田潤一郎、飯田真己. GM1-ガングリオシドーシスモデルマウスを用いた新しい治療法の開発(シンポジウム「神経疾患モデル動物—神経疾患解析・治療法開発の重要性と現状—」). 第22回日本疾患モデル学会総会、2005年11月、伊香保.

Kawai Y, Hata T, Suzuki O, Matsuda J. RELATIONSHIPS BETWEEN SPERM MORPHOLOGY AND IN VITRO FERTILIZATION ABILITY IN MICE. 38th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, Quebec, Canada, July 2005.

Suzuki O, Hata T, Takekawa N, Koura M, Takano K, Yamamoto Y, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. EFFECT OF

ASCORBIC ACID 2-O- α -GLUCOSIDE AND ALANYL-GLUTAMINE ON IN VITRO GROWTH CULTURE OF PREANTRAL FOLLICLES FROM CRYOPRESERVED MOUSE OVARIES. 38th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, Quebec, Canada, July 2005.

Suzuki O, Koura M, Takano K, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Insertion pattern analysis of transgenes in a transgenic mouse line by genomic walking. 55th Annual Meeting The American Society of Human Genetics, Salt Lake City, USA, October 2005.

Suzuki O, Koura M, Noguchi Y, Takano K, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Characterization of the Luteinizing Hormone beta-Subunit Precursor Protein cDNA in the Rabbit. 45th Annual Meeting The American Society for Cell Biology, San Francisco, USA, December 2005.

Suzuki O, Koura M, Noguchi Y, Takano K, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Sequence comparison of the pituitary gonadotropin subunit precursor proteins of the Syrian, Armenian, and Chinese hamsters. Genetic Analysis: Model Organisms to Human Biology, A Genetics Society of America Meeting. San Diego, USA, January 2006.

Suzuki Y, Matsuda J, Nanba E, Ohno K, Itoh M, Ogawa S, Iida M, Tabe M. A new molecular therapy for lysosomal storage diseases. 6th European Pediatric Neurology Society Congress, Gothenburg, Sweden, September 2005.

Suzuki Y, Ichinomiya S, Watanabe H, Iwasaki H, Maruyama K, Toda H, Kurosawa M, Matsuda J. Neurological examination of genetically engineered GM1-gangliosidosis model mice. The 32nd Annual Conference British Paediatric Neurology Association, Bristol, UK, January 2006.

Schümann J, Facciotti F, Matsuda J, Lobel P, Mori L, De Libero G. Lysosomal β -galactosidase and the lipid transfer protein Niemann-Pick C2 independently contribute to the development of invariant V α 14 NKT cells by different mechanisms. the Annual Congress of the Swiss Society for Allergology and Immunology, Zurich, Switzerland, March 2006.

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「疾患研究のための実験動物研究資源の基盤整備に関する総合的研究」班研究事業）分担研究報告書

ガラス化保存したマウス胚のドライアイスによる簡易輸送に関する基礎的研究

分担研究者 葛西孫三郎 高知大学農学部教授

研究要旨

ガラス化保存したマウス胚の輸送の簡便化と低コスト化のために、ドライアイスによる輸送が可能なマウス胚のガラス化保存法の開発を試みた。まず、スクロース (0.5 M) と Ficoll PM70 (30%) を含む PB1 液に 20-50% (v/v) になるようエチレングリコールを添加した EFS 液を保存液とし、マウス桑実胚を液体窒素で保存後、 $-20\sim-80^{\circ}\text{C}$ で一定時間保持した後に融解して生存性をしらべた。30-40%のエチレングリコールを含む EFS 液を用いた場合、 -80°C で3分間保持しても生存率は高かったが、保持時間を延長すると大きく低下した。そこで、よりスクロース濃度の高い保存液をもちいたところ、 -80°C で24時間保持しても生存率(80%)は高かった。さらに保存液の組成を詳細に検討して、ガラス化保存胚を -80°C で数日間保持することが可能になれば、ドライアイスによる輸送が可能になると考えられる。

A. 研究目的

遺伝的疾患モデル動物の保存には、胚の凍結保存が非常に有効である。近年、簡便で短時間で操作できるガラス化法が哺乳動物胚の凍結保存の主流となってきている。しかし、サンプルをドライアイス (-80°C) の温度まで加温すると胚は死滅する。そのため、ガラス化保存胚の輸送には、従来の緩慢凍結法で保存した培養細胞などのようにドライアイスで冷媒として用いることができず、液体窒素でサンプルを冷却するドライシッパーと呼ばれる特殊な容器が必要である。胚の輸送が簡便なガラス化保存法が望まれている。

ガラス化保存胚をドライアイスの温度まで加温した場合に死滅する原因としては、細胞内氷晶形成による傷害と細胞透過性耐凍剤の化学的毒性による傷害が候補として挙げられる。

そこで本研究では、細胞透過性耐凍剤として毒性の低いエチレングリコールをベースとし、細胞非透過性耐凍剤をして Ficoll

PM70 とスクロースを含むガラス化溶液（以下 EFS 液）を用い、まずガラス化保存に適切なエチレングリコールの濃度をしらべた。次にガラス化保存後にドライアイスの温度で保持した場合に起こる傷害の原因について考察した。さらに、それをもとに保存液の成分の割合を変更することで、 -80°C でも長時間保持できるガラス化法の開発を試みた。

B. 研究方法

過排卵処理をした ICR 系マウスの子宮から桑実胚を回収し、コンパクションしているもののみ実験に使用した。細胞透過性耐凍剤としてエチレングリコール、細胞非透過性耐凍剤として Ficoll PM70 とスクロースを含む PB1 液を保存液とし、様々な濃度のこれら 3 つの物質を含む保存液を作成した。桑実胚を 25°C の保存液に 30-120 秒間処理し、精子凍結保存用のストローに充填し、液体窒素でガラス化した。そして、直接 25°C の水に浸漬するか、あるいは $-20\sim$

80°Cで3分間、1時間あるいは24時間保持したのちに25°Cの水に浸漬して融解した。そして、胚を速やかに25°Cの0.5 Mスクロース添加 PB1 液に移して5分間希釈し、PB1 液で洗浄した。炭酸ガスインキュベータ (5% CO₂/95% 空気) 内で37°C、48時間培養し、拡大胚盤胞にまで発育したものを生存とした。

[実験1] 適切なエチレングリコールの濃度

ガラス化保存に適切なエチレングリコール濃度をしらべるために、0.5 M スクロースと30% (w/v) Ficoll PM70 を含む PB1 液に20~50% (v/v) のエチレングリコールを添加した EFS 液 (25°C) で桑実胚を30-120秒間処理した後に、ストローに充填し、液体窒素でガラス化保存した。そして、直接25°Cの水に浸漬して融解し、生存率をしらべた。

[実験2] ガラス化保存後、-20~-80°Cで保持した胚の生存性

ドライアイスを冷却剤とした場合の胚の保持可能な時間をしらべるために、実験1と同様の方法で桑実胚をガラス化保存した。そして、-20~-80°Cで3分間、1時間あるいは24時間保持した。25°Cの水に浸漬して融解し、生存率をしらべた。

[実験3] 高濃度のスクロースを含む保存液を用いてガラス化保存後、-80°Cで保持した胚の生存性

細胞をより脱水すれば、-80°Cで保持している間の細胞内氷晶形成を防ぐとともに、細胞内のエチレングリコール量を減らして、その毒性の影響を小さくすることが可能になると考えられる。そこで、スクロース濃度の高いガラス化保存液を作成し、その効果を調べた。

スクロース濃度を高めた保存液 (25°C) で桑実胚を処理した後に、ストローに充填し、

ガラス化保存した。そして、-80°Cで3分、1時間あるいは3日間保持した。25°Cの水に浸漬して融解し、生存率をしらべた。

(倫理面への配慮)

使用したすべてのマウスは、頸椎脱臼により安楽死させてから使用した。本研究は、高知大学農学部動物実験委員会より承認を受けている。

C. 研究結果

[実験1] 適切なエチレングリコールの濃度

液体窒素で保存後、直接25°Cの水に浸漬して急速に融解した場合、30-40%のエチレングリコールを含む EFS 液では高い生存率が得られた。しかし、20%あるいは50%エチレングリコールを含む EFS 液では生存率は低かった。細胞内氷晶形成を防ぐためには30%以上の濃度のエチレングリコールが必要であると考えられた。一方、50%エチレングリコールでは、エチレングリコールの化学的毒性による傷害を受けたと考えられた。ガラス化保存に適したエチレングリコール濃度は、30-40%ぐらいで、比較的狭い範囲であることが分かった。

[実験2] ガラス化保存後、-20~-80°Cで保持した胚の生存性

20-40%のエチレングリコールを含む EFS 液でガラス化後、-80°Cで3分間あるいは1時間保持した場合は、40%エチレングリコールを含む EFS 液を用いた場合の生存率は高かったが、20-30%含む EFS 液では低かった。保持時間を24時間に延長すると、いずれの場合も多くが死滅した。-40~-60°Cで3分間保存すると、40%エチレングリコールを含む EFS 液では生存率は比較的高かったが、20-30%エチレングリコールを含む EFS 液では生存率は大きく低下した。1時間保持すると、いずれの場合もすべての

胚が死滅した。-20℃で保持した場合は、20%エチレングリコールを含む EFS 液の場合は3分間保持した後はすべての胚が死滅したが、30-40%エチレングリコールを含む EFS では1時間保持しても比較的生存率は高かった。

融解後の胚の形態から、-40~-60℃で保持して死滅した胚の多くは、細胞内氷晶形成により傷害を受けたことが示唆された。

また、生存率の低下は各温度で保持して3分後からすでに観察され、時間と共にさらに低下することから、各保持温度に移した後にごく短い間に傷害を受けるだけでなく、比較的長い時間をかけて傷害を受けるがわかった。

[実験3]高濃度のスクロースを含む保存液を用いてガラス化保存後、-80℃で保持した胚の生存性

ガラス化保存後、-80℃で24時間保持しても生存率(80%)はあまり低下しなかった。しかし、3日後にはすべての胚が死滅した。スクロース濃度が高く、細胞をより脱水できる保存液を用いることで、ガラス化保存後に胚を-80℃で丸1日保存することができることがわかった。

D. 考察

エチレングリコールをベースとしたスクロースと Ficoll PM70 を含む EFS 液は、マウス胚のガラス化保存に非常に有効な保存液である。しかしながら、ドライアイスの温度である-80℃で保存すると、3分間で生存率が低下しはじめ、24時間以内に死滅した(実験2)。また、-40~-60℃で保持して死滅した胚の融解後の形態から、一部の胚の死滅には細胞内氷晶形成による傷害が関与していることがわかった。

胚の冷却時の細胞内氷晶形成を抑制する方法としては、細胞透過性耐凍剤の細胞内への浸透を高めることが考えられる。しかしながら、エチレングリコールは比較的毒

性の低い耐凍剤ではあるが、通常ガラス化保存に使われている40%(v/v)より高い濃度では化学的毒性により傷害を受けてしまう(実験1)。よって、保存液のエチレングリコール濃度を上げることは困難であると考えられた。そこで、細胞非透過性耐凍剤として使用しているスクロース濃度を上げて脱水を促進することにした。スクロース濃度を高めた保存液でガラス化保存した後、-80℃で24時間保持しても、高い生存率が得られた(実験3)。しかしながら、国内での輸送に最低限必要と考えられる3日間の間-80℃で保持すると、すべての胚が死滅した。エチレングリコールの化学的毒性による傷害が関与しているのかもしれない。今後、さらに保存液の組成を詳細に検討し、保持可能期間を延長する必要がある。

E. 結論

通常よりスクロース濃度を上げた保存液を用いてマウス桑実胚をガラス化保存すると、-80℃で24時間保持しても約80%の桑実胚が生存した。さらに詳細に保存液の組成を検討し、数日間保存できるようになれば、ガラス化保存胚のドライアイスによる簡便な輸送が可能になると考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Valdez D.M., Miyamoto A., Hara T., Edashige K., Kasai M. Sensitivity to chilling of medaka (*Oryzias latipes*) embryos at various developmental stages. *Theriogenology*, 64 (1), 112-122, 2005.
2. Valdez D.M., 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 (1), 93-102, 2005.
3. Pedro P.B., Yokoyama E., Zhu S.E., Yoshida N., Valdez D.M., Tanaka M., Edashige E., Kasai M. Permeability of mouse oocytes and embryos at various developmental stages to five cryoprotectants. *Journal of Reproduction and Development*, 51 (2), 235-246, 2005.
 4. Edashige K., Tanaka M., Ichimaru N., Ota S., Yazawa K., Higashino Y., Sakamoto M., Yamaji Y., Kuwano T., Valdez D.M., Kleinhans F.W., Kasai M. Channel-dependent permeation of water and glycerol in mouse morulae. *Biology of Reproduction*, (in press).

2. 学会発表

1. Involvement of aquaporin-3 in the permeation by water and glycerol of mouse morulae. Edashige K., Tanaka M., Ichimaru N., Higashino Y., Sakamoto M., Yazawa K., Kuwano T., Yamaji Y., Valdez D.M., Kasai M. 42nd meeting of the Society for Cryobiology July 25, 2005, Minneapolis, MN, U.S.A.
2. Water- and cryoprotectant-permeability of zebrafish oocytes and its artificial enhancement. Seki S., Kouya T., Valdez D.M., Hara T., Kasai M., Edashige K. 42nd meeting of the Society for Cryobiology July 27, 2005, Minneapolis, MN, U.S.A.
3. メダカ卵子の凍結保存の試み 原隆夫、Valdez M. Delgado Jr.、宮本明、葛西孫三郎、枝重圭祐 第98回日本繁殖生物学会大会 2005年9月 静岡
4. マウス桑実胚における aquaporin 3 に依存した水および耐凍剤の透過 太田悟史、田中光信、葛西孫三郎、枝重圭祐 第98回日本繁殖生物学会大会 2005年9月 静岡
5. ゼブラフィッシュ卵子の体外成熟 関信輔、神谷俊光、葛西孫三郎、枝重圭祐 第98回日本繁殖生物学会大会 2005年9月 静岡
6. ブタ体外受精胚における拡大胚盤胞期での膜透過性の向上 矢澤健一、菊地和弘、小沢学、木

- 村隼人、三宅正史、葛西孫三郎、枝重圭祐 第98回日本繁殖生物学会大会 2005年9月 静岡
7. ゼブラフィッシュ卵子の水および耐凍剤に対する透過性 神谷俊光、関信輔、葛西孫三郎、枝重圭祐 第98回日本繁殖生物学会大会 2005年9月 静岡
 8. Cryopreservation of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos. Valdez D.M., Saida N., Hara T., Kasai M., Edashige K. 第98回日本繁殖生物学会大会 2005年9月 静岡

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

グローバルな凍結マウス胚の輸送に関する研究
熊本大学生命資源研究・支援センター 動物資源開発部門（CARD）教授 中瀬直己

研究要旨

米国のジャクソン研究所、英国のMRCおよびスウェーデンのカロリンスカ研究所と熊本大学生命資源研究・支援センター動物資源開発部門（CARD）との間で、凍結胚の授受を行い、お互いの施設に輸送された凍結胚から産子が得られるか否かについて検討を行った。上記、4施設において、輸送された凍結胚の少なくとも一部は、受容雌への移植により正常な産子へ発生した。

A. 研究目的

近年、様々な目的で遺伝子改変マウスの授受が世界的に行われている。しかしながら、生きたマウス個体での授受は、病原微生物学的観点あるいはカルタヘナ議定書などの法的規制の問題から、困難な状況になりつつある。そこで、本実験では、世界の代表的なマウスバンクである米国のジャクソン研究所、英国のMRCおよびスウェーデンのカロリンスカ研究所とCARDとの間で凍結胚の授受を行い、お互いの施設に輸送された凍結胚から産子が得られるか否かについて検討を行った。

B. 研究方法

実験には、C57BL/6Jあるいは遺伝子改変マウスの2細胞期胚を用い、各施設で採用している凍結法にて胚を凍結保存し（ジャクソン研究所：緩慢凍結法、2段階凍結法、MRC：2段階凍結法、カロリンスカ研究所：緩慢凍結法、CARD：簡易ガラス化法）、ジャクソン研究所⇔CARD、MRC⇔CARDおよびカロリンスカ研究所⇔CARD間で、ドライシッパーにより凍結胚の輸送を行った。輸送は、フェデックスあるいはワールドクーリエ社に依頼することにより行った。続いて各施設で凍結胚を融解後、形態的に正常な胚を受容雌の卵管へ移植し、産子への発生について検討した。なお、融解法は、あらかじめ、凍結胚を輸送する施設へ郵送した。

C. 研究結果

種々の方法で凍結された胚を各施設でそれぞれの融解法で融解した結果、そのほとんどが回収され、形態的に正常胚の割合に多少、ばらつきがあったものの（41～100%）、その19～67%が産子へ発生した。また、得られたすべての産子は、病原微生物学的にクリーンであった。

D. 考察

種々の方法で凍結されたマウス胚のグローバルな輸送が可能となった。本実験では、3種の方法で凍結された胚を用いたが、凍結法が必ずしも標準化されていなくとも、それぞれの融解法を各施設でマスターしておけば、輸送された凍結胚からの産子の作出が可能であることが明らかとなった。

E. 結論

種々の方法で凍結したマウス2細胞期胚を世界の代表的なマウスバンク間、すなわち、ジャクソン研究所⇔CARD、MRC⇔CARDおよびカロリンスカ研究所⇔CARD間での輸送するシステムを確立した。特に、現在、CARDでは、ジャクソン研究所からのマウスの購入をすべて凍結胚により行っており、輸送された凍結胚から多くの産子が得られている。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kaneko T, Nakagata N: Relation between storage temperature and fertilizing ability of freeze-dried mouse spermatozoa. Comp Med. 55: 140-144. 2005.
- 2) Sakamoto W, Kaneko T, Nakagata N: Use of frozen-thawed oocytes for efficient production of normal offspring from cryopreserved mouse spermatozoa showing low fertility. Comp Med. 55: 136-139. 2005.

- 3) Yoshimoto N, Shimoda K, Mori Y, Honda R, Okamura H, Ide Y, Nakashima T, Nakagata, N., Torii R, Yoshikawa Y, Hayasaka I.: Ovarian follicular Development stimulated by leuprorelin acetate plus human menopausal gonadotropin in chimpanzees. J Med Primatol. 34: 73-85, 2005
- 4) Taniwaki T, Haruna K, Nakamura H, Sekimoto T, Oike Y, Imaizumi T, Saito F, Muta M, Soejima Y, Utoh A, Nakagata N, Araki M, Yamamura K, Araki K.: Characterization of an exchangeable gene trap using pU-17 carrying a stop codon-beta geo cassette. Dev Growth Differ. 47: 163-172, 2005
- 5) Oike Y, Akao M, Yasunaga K, Yamauchi T, Morisada T, Ito Y, Urano T, Kimura Y, Kubota Y, Maekawa H, Miyamoto T, Miyata K, Matsumoto, S, Sakai J, Nakagata N, Takeya M, Koseki H, Ogawa Y, Kadowaki T, Suda T.: Angiopoietin-related growth factor antagonizes obesity and insulin resistance. Nat Med. 11: 400-408 2005
2. 学会発表
- 1) 土山修治, 中瀧直己: 簡易ガラス化法による遺伝子改変マウス卵巣の凍結保存—凍結ドナー卵巣の週齢の検討— 第50回日本不妊学会総会・学術講演会、2005. 11、熊本
- 2) 竹尾 透, 西園啓文, 齊田 勝, 中瀧直己: 入倉 充, 入江徹美 マウス凍結精子の受精能賦活剤としてのCyclodextrin 誘導体の有効性評価 第23回シクロデキストリンシンポジウム 2005. 9、神戸
- 3) 柳 美穂, 中島竜之, 金子武人, 中瀧直己 透明帯穿孔卵子を用いたマウス凍結精子の体外受精成績 第23回受精着床学会総会・学術講演会 2005. 8、大阪
- 4) Takehito Kaneko, Ayako Yamamura, Yukie Ide, Mami Ogawa, Tomoko Yanagita, Naomi Nakagata: Fertilization ability of mouse spermatozoa cryopreserved for over 10 years. 38th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction (SSR) 2005. 7 ケベック
- 5) 中瀧直己: B6 精子の凍結保存 第46回日本哺乳動物卵子学会 2005. 5 青森
- 6) 金子武人, 坂本亘, 中瀧直己: 低受精能マウス凍結精子からの産子作製における凍結未受精卵子の利用 第46回日本哺乳動物卵子学会 2005. 5 八戸
- 7) 井手幸恵, 小川真美, 柳田朋子, 福本紀代子, 川辺敏晃, 町田宏美, 土山修治, 金子武人, 中瀧直己: CARD と Jackson 研究所との様々な取り組みについて 第52回日本実験動物学会総会、2005. 5、東京
- 8) 柳田朋子, 小川真美, 井手幸恵, 福本紀代子, 川辺敏晃, 町田宏美, 土山修治, 中村直子, 吉住正等美, 金子武人, 加藤秀樹, 山崎由紀子, 浦野徹, 中瀧直己: 熊本大学・CARD 「マウス胚/精子バンク」に保存されている凍結胚の品質管理について 第52回日本実験動物学会総会、2005. 5、東京
- 9) 金子武人, 中瀧直己: フリーズドライマウス精子の保存温度と受精能の関係 第52回日本実験動物学会総会、2005. 5、東京
- 10) 小川真美, 淵脇恩美, Delgado M. Valdez Jr. 柳田朋子, 井手幸恵, 福本紀代子, 町田宏美, 川辺敏晃, 金子武人, 葛西孫三郎, 中瀧直己: 低温輸送した卵管から得られたマウス胚の凍結融解後の発生について 第52回日本実験動物学会総会、2005. 5、東京
- 11) 土山修治, 加藤秀樹, 山崎由紀子, 金子武人, 中瀧直己: CARD R-BASE の IMSR (the International Mouse Strain Resource) への参加—世界へ向けたマウス供給体制について—第52回日本実験動物学会総会、2005. 5、東京
- 12) 川辺敏晃, 井手幸恵, 小川真美, 柳田朋子, 福本紀代子, 町田宏美, 土山修治, 金子武人, 中瀧直己 マウス過排卵処理に用いるホルモン剤の保存温度および期間の検討 第52回日本実験動物学会総会、2005. 5、東京
- 13) 町田宏美, 井手幸恵, 柳田朋子, 福本紀代子, 小川真美, 川辺敏晃, 土山修治, 金子武人, 中瀧直己: 体外受精時の単為発生卵の出現頻度とそれら卵子の体外での発生について 第52回日本実験動物学会総会、2005. 5、東京
- 14) 中島竜之, 中務 胞, 金子武人, 中瀧直己: ラットの人工授精に関する研究 第52回日本実験動物学会総会、2005. 5、東京
- 15) 福本紀代子, 井手幸恵, 柳田朋子, 町田宏美, 小川真美, 川辺敏晃, 土山修治, 金子武人, 中瀧直己: 生殖工学技術研修会受講者のその後の技術習得状況について 第52回日本実験動物学会総会、2005. 5、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

ラットにおける胚操作と卵巣の凍結保存

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
研究協力者 藤澤 信義 新潟大学脳研究所動物資源開発支援研究部門 助手

研究要旨

ラットの生殖工学技術の改良と新規技術の開発を目的に、初期胚の凍結保存・融解・移植による産仔の作出、ならびに簡易ガラス化法を用いた卵巣の凍結保存について検討した。疾患モデルを含む複数のミュータントラットの2細胞期胚を、簡易ガラス化法により凍結保存後、融解胚を偽妊娠メスの卵管内に移植し、産仔を得た。また、凍結保存液の処理操作が凍結保存卵巣に及ぼす影響を組織学的に観察し、今後の方法改良のための基礎データを得た。

A. 研究目的

ラットでは過排卵誘起や体外受精の成績に系統差がみられるなど、生殖工学技術の普及・実用化という点で、いくつかの課題を残している。一方、卵巣移植は、繁殖障害を伴うメスの個体から産仔を得るための有用な方法であるが、ラットにおいては凍結保存卵巣移植による成功例はなく、実用可能な技術の開発が望まれている。我々はこれまでに、マウスにおいてガラス化法による卵巣の凍結保存が可能であり、凍結卵巣由来の産仔を再現性のある成績で得ることを実証した。本研究では、ラットにおける生殖工学技術の改良と新規技術の開発を目的に、

(1) 初期胚の凍結保存・融解・移植による産仔の作出、ならびに(2) 簡易ガ

ラス化法を用いたラット卵巣の凍結保存について基礎的検討を行った。

B. 研究方法

(1) 初期胚の凍結保存と卵管内移植

クローズドコロニー由来であるミュータント系統を自然交配して、膣スメア中に精子が観察された日の翌日午後に卵管を灌流して2細胞期胚を回収し、簡易ガラス化法により凍結保存を行った。5 μ L の1M DMSO 濃度のPB1 培地を入れた凍結チューブ中で0 $^{\circ}$ C 1分、さらにDAP213 を95 μ L 添加し、1分後に液体窒素中に浸漬・凍結した。融解した胚は、精管結紮SD系オスと交配した同系偽妊娠メスの両側あるいは片側卵管に移植し、産仔への発生を観察した。なお、

一部の胚は凍結せずに移植した。卵管灌流とインキュベータ内での胚の保管には PB1 培地を用いた。一部の系統については性周期を確認せずに、性腺刺激ホルモン処理による過排卵誘起を試みた。すなわち、PMSG(150 IU/Kg)腹腔内投与 48 時間後に hCG(75 IU/Kg)を腹腔内投与し、同系オスと一晩同居させ、翌日午後には卵管を灌流した。移植時に卵管采を露出させるために、卵巢のうを切開する際は、エピネフリンの滴下による血管収縮処理に加え、パイポーラによる凝固(止血処理)を数例に併用した。これらの操作の基本は、実験動物中央研究所のグループらの方法に準拠して行った。

(2) 凍結卵巢の組織学的評価 — DAP213 処理時間の検討

ガラス化液 DAP213 処理時間の影響を検討するため、生後 10 日齢の SD 系ラットの卵巢を簡易ガラス化法により凍結保存した。すなわち、1M DMSO 濃度 PB1 培地で室温 5 分、2 回前処理したのち、同液 5 μ L を入れた凍結チューブで 0 $^{\circ}$ C、10 分間保持した。DAP213 を 95 μ L 添加し、処理時間を 0、10、30、60 分の 4 群に分けて液体窒素中に浸漬した。対照には、凍結しない新鮮卵巢を固定したのを用い、左右の卵巢を 1 チューブに入れた。7 日間凍結保存した卵巢を、37 $^{\circ}$ C に加温した 0.25M Sucrose 濃度 PB1 培地で融解し、mWM 培地中で 37 $^{\circ}$ C、1 時間培養したのち、10%ホルマリン溶液で固定した。常法によりパ

ラフィン切片を作製し、組織学的観察に供した。

C. 研究結果

(1) 胚の移植成績

ミュータント 3 系統 (Wistar 由来 1 系統、SD 由来 2 系統) の 2 細胞期胚を合計 306 個(84~133)凍結保存した。SD 由来の 2 系統(A、B)は過排卵処理せず、自然交配・自然排卵した卵を採取した。A 系と B 系の平均排卵数と受精率は、それぞれ 11.1 個と 9.2 個、91.2%と 83.9%であり、比較的良好な成績であった。Wistar 由来の C 系は平均排卵数が 9.1 と、他の 2 系統と大差なかったが、未受精卵や変性卵の割合が高く、受精率も 67.9%と低かった。C 系メスの半数に、PMSG 150IU/Kg と hCG 75IU/Kg の 48 時間間隔投与による過排卵処理を施したが、平均排卵数は未処理メス群と変わりなく、最も多い排卵数は 35 個であり、ホルモンに対する反応性が低かった。精管結紮オスと交配した 7 匹の偽妊娠メスに A、B 2 系統の合計 90 個(凍結胚 60,新鮮胚 30)の胚(平均 12 個/匹)を移植した結果、6 匹が分娩し、合計 39 匹(平均 6.5 匹)の産仔を得た。産仔数は凍結胚由来 21 匹に対して、新鮮胚由来 18 匹であった。

(2) 凍結・融解卵巢の組織学的観察

生後 10 日齢の卵巢においては、DAP213 処理時間に関わらず、細胞の収縮、細胞質内の空胞など、組織学的にダメージを受けていると考えられる卵母

細胞が多数みられ、凍結保存液の処理操作による明確な効果は確認できなかった。

D. 考察

新鮮胚に比較して凍結胚の移植成績が劣る結果となったが、凍結・融解によるダメージが主たる要因と考えられ、方法の見直しや保存用培地の検討が必要と思われた。移植数に対する産仔数の割合が低かった(43%)原因としては、胚の採取(融解)から移植終了までに時間がかかりすぎたことが考えられる。特に、凍結保存した場合は、融解時に正常と判定した胚が移植時点で、形態的異常をきたしているというケースが比較的高頻度にみられた。今後は手技の精度を上げるとともに、系統毎の問題点を整理・改善することにより、産仔作成効率を向上させることが重要である。また、移植時の出血を最小限にすることは、卵管采の確認を容易にするのみならず、卵巣や卵管への影響を軽減する効果も期待される。パイポラを使用した場合、出血をほとんど抑えることが可能であり、その有効性が示唆された。凍結卵巣の組織学的観察では、比較的発育の進んだ卵胞の卵母細胞に萎縮や空胞などの所見がみられ、必ずしも良好な保存状態ではなかったが、未発達卵胞が移植後に発育を開始する可能性もあり、さらなる検討が必要である。

E. 結論

疾患モデルを含む複数のミュータントラットの2細胞期胚を、簡易ガラス化法

により凍結保存後、融解胚を偽妊娠メスの卵管内に移植し、産仔を得た。受精卵を採取しにくい系統が存在することから、ラット資源の基盤整備を推進するためには、早急に効率的な過排卵誘起法と体外受精法を開発・改良する必要がある。また、メスの繁殖障害を伴う系統に対しては、卵巣の凍結保存・移植が有効であり、さらに実用化に向けた検討を進める。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1) 論文発表

① Okazuka K, Wakabayashi Y, Kashihara M, Inoue J, Sato T, Yokoyama M, Aizawa S, Aizawa Y, Mishima Y and Kominami R. : p53 prevents maturation of T cell development to the immature CD4-CD8+ stage in Bcl11b-/- mice. Biochem. Biophys. Res. Commun., 328:545-549, 2005.

② Shiura, H., Miyoshi, N., Konishi, A., Wakisaka-Saito, N., Suzuki, R., Muguruma, K., Kohda, T., Wakana, S., Yokoyama, M., Ishino, F. and Kaneko-Ishino, T.: Meg1/Grb10 overexpression causes postnatal growth retardation and insulin resistance via negative modulation of the IGF1R and IR cascades. Biochem.

Biophys. Res. Commun., 329:909-916, 2005.

③ Ono, R., Nakamura, K., Inoue, K., Naruse, M., Usami, T., Wakisaka-Saito, N., Hino, T., Suzuki-Migishima, R., Ogonuki, N., Miki, H., Ogura, A., Yokoyama, M., Kaneko-Ishino, T. and Ishino, F.: Deletion of Peg10, an imprinted gene acquired from a retrotransposon, causes early embryonic lethality. Nat. Genet., 38:101-106.2006.

2) 学会発表

①横山峯介：マウス凍結胚保存卵巣からの産仔の作成。(シンポジウム)．第46回日本哺乳動物卵子学会. 2005年5月

②日野敏昭・高部美穂・右島理可・横山峯介：様々な糖類によるマウス精子の凍結保存. 第46回日本哺乳動物卵子学会. 2005年5月

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし