

白を大量生産しようとするものである。その理由として、ウサギはウシやヒツジに比し繁殖期間が短く、飼育環境整備が容易でありどこでも簡単に飼育できる。また、授乳期のメスウサギは、蛋白成分に富む乳汁を毎日200ml分泌し、年に4~7回の妊娠が可能のため、高価な蛋白質や生理活性物質を生産する低コストの“動物工場”としての実用化が期待されている。現在まで、ウサギの乳汁で生産された治療用の蛋白質は10数種類が報告されており、臨床応用まで実現したのがオランダのPharming社が製造するヒト α グルコシダーゼである。アムステルダム市には α グルコシダーゼ欠損による糖原蓄積症の小児患者が6人いる。この病気は、肝臓や、腎臓、心臓、骨格筋などに大量のグリコーゲンが蓄積し、心不全により死亡する遺伝病であるが、これまで有効な治療法がなかった。アムステルダム大学とPharming社との共同開発で、Tgウサギの乳汁から精製した α グルコシダーゼを患児に投与したところ、全員の症状が改善したという(図2)⁴⁾。従って、今後も、Tgウサギがヒトの疾患の治療を目的とした活性物質の生産に大きく寄与するものと期待される。

3. Tgウサギの展望について

ウサギのユニークな生理的特徴を利用して、これまでにマウスでは研究できなかった疾患の治療と診断法の開発がさらに進展していくことを確信している。とくに新薬の開発に膨大な経費を投入している製薬会社はその点をよく認識していると感じている。たとえ、マウスではよく効いている薬剤でも、やはり臨床試験の実施を行なう前に、ウサギなどのモデルでの試験が必要ではという指摘がしばしば聞かれるようになった。しかし、ウサギ実験がマウスより多くの飼育スペースとコストを必要とすることが現実問題として残されているため、Tgウサギの作製・系統維持、研究者への

無償提供などを円滑に行なうためには、ウサギバイオリソースの充実が必要となってくる。現在、山梨大学、神戸大学、佐賀大学を中心として世界初の日本ウサギバイオリソースセンターの実現を目指している。

Tgウサギの開発・利用をさらに発展させるには、当面、いくつかのハードルを越えなければならない。その点について私の持論を述べたい。まず、ウサギのノックアウトモデルがいつ成功できるのかという問題が残っている。ウサギのES細胞樹立の試みはすでに15年以上経過しているが、未だ、キメラを作ることのできるウサギES細胞は開発できていない。そのほかの代替法として、核移植によるクローンウサギの作製やRNAiによるノックダウンウサギの作製がいくつかの施設で試みられたが、いずれも実用化まで至っていないのが現状である。ノックアウトウサギを作製できるもっとも有望な方法は最近、京都大学(芹川ら)でノックアウトラット作製に用いられたZinc Finger Nucleases (ZFN) 法であろう⁵⁾。近い将来、ZFN法によるノックアウトウサギの成功が期待されている。もう一つの課題は、遺伝子改変ウサギの作製に必要なゲノム遺伝子情報の充実である。アメリカが主導しているウサギゲノムの解読は、現在までに2回の読み取りが終了しているが、すべてのゲノム情報の解読が早期に完了し、Web上に公開されることが強く求められる。また、基礎医学研究に必須となる抗体やELISAキットも、ウサギに使用できるものを今後さらに充実させる必要がある。これらの問題を踏まえて、昨年に初めて出版された[Rabbit Biotechnology: Rabbit genomics, transgenesis, cloning and models, 2009, Springer]⁶⁾ という本を是非一度参照していただきたい。

参考文献：

- 1) Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE, Jr., Wall RJ,

- Bolt DJ, Ebert KM, Palmiter RD, Brinster RL. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*. 1985;**315**:680-683.
- 2) 渡辺照男. 疾患モデルとしてのトランスジェニックウサギの開発. *Labio*. 2006;**21**:56-60.
 - 3) 範江林. 遺伝子改変ウサギ・モデルの現状と展望. アニテックス. 2003;**15**:61-66.
 - 4) Van den Hout JM, Kamphoven JH, Winkel LP, Arts WF, De Klerk JB, Loonen MC, Vulto AG, Cromme-Dijkhuis A, Weisglas-Kuperus N, Hop W, Van Hirtum H, Van Diggelen OP, Boer M, Kroos MA, Van Doorn PA, Van der Voort E, Sibbles B, Van Corven EJ, Brakenhoff JP, Van Hove J, Smeitink JA, de Jong G, Reuser AJ, Van der Ploeg AT. Long-term intravenous treatment of Pompe disease with recombinant human alpha-glucosidase from milk. *Pediatrics*. 2004;**113**:e448-457.
 - 5) Mashimo T, Takizawa A, Voigt B, Yoshimi K, Hiai H, Kuramoto T, Serikawa T. Generation of knockout rats with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using zinc-finger nucleases. *PLoS One*. **5**:e8870.
 - 6) Houdebine L, Fan J. *Rabbit Biotechnology: Rabbit genomics, transgenesis, cloning and models*: Springer; 2009.

特集

トランスレーショナルリサーチに 貢献するウサギ

ウサギ精子・胚の凍結保存とバイオリソース

北嶋 修司, 西島 和俊

佐賀大学総合分析実験センター・生物資源開発部門

1. はじめに

一般に、バイオリソース（生物遺伝資源）とは、「研究開発のための材料として用いられる生物系統、集団、組織、細胞、DNA、さらにはそれから産み出される情報」として認識されている¹⁾。実験動物学の分野では、マウス、ラット、ウサギ等の実験動物そのものがバイオリソースである。近年では、遺伝子組換え技術の発展により、遺伝子機能の解明やヒト疾患モデル動物として、毎年数多くの遺伝子改変動物が開発されている。そのため、実験動物の系統数は、急速な数で増加しているものと想像される。これら世界中で開発された実験動物系統をバイオリソースとして有効に活用していくためには、系統保存ならびに保存系統に関する情報管理（データベース化）等を統括的に行なうバイオリソース事業の整備とその推進が重要となってくると考えられる。我が国では、2002年より文部科学省により実験動植物やES細胞などの幹細胞、各種生物の遺伝子材料等のうち、国が戦略的に整備することが重要なものについて、体系的な収集・保存・提供等を行なうための体制を整備するための事業として「ナショナルバイオリソースプロジェクト（National BioResource Project, NBRP）」が開始された（NBRP情報公開サイト：<http://www.nbrp.jp/index.jsp>）。現在、実験動物のうち哺乳類では、マウス、ラットおよ

びニホンザルがNBRPに採択されており、順調な成果があげられている。残念ながら、本稿のテーマであるウサギはNBRPには採択されていないが、近年、医学生物学研究に有用な自然発症モデルや遺伝子改変ウサギ等の開発が進んでおり、今後、バイオリソースとして整備が進められることが望まれる。

バイオリソースとしての実験動物系統の保存には、それぞれの動物種毎に適した保存方法を確立する必要があると考えられる。そのため、実験動物学に携わる研究者にとって、各種実験動物の系統保存やその関連技術の開発、確立等も重要な研究課題のひとつである。筆者らの施設では、実験動物としてのウサギの特徴に着目し、その特徴を生かしたヒト疾患モデルとしての遺伝子改変ウサギの開発を行なうとともに、作出した遺伝子改変ウサギについてバイオリソースとして維持・保存するための研究を進めてきた。本稿では、バイオリソースとしてのウサギの凍結精子・胚による系統保存について概説したい。

2. バイオリソースとしてのウサギ

実験動物としてのウサギの大きな特徴のひとつとして、脂質代謝系がヒトに非常に類似しているという点が挙げられる^{2,3)}。このため、ウサギは、脂質代謝や動脈硬化といった研究分野では、なく

てはならない実験動物種である。事実、1985年のノーベル賞（生理学・医学賞）で、BrownとGoldsteinら受賞した「コレステロール代謝とその関与する疾患の研究」に渡辺家族性高脂血症（Watanabe heritable hyperlipidemic, WHHL）ウサギが多大な貢献をしたことはよく知られるところである。WHHLウサギは、神戸大学の故渡辺嘉雄博士らにより開発された自然発症モデル動物であり、低比重リポ蛋白（Low density lipoprotein, LDL）レセプターの異常に起因する高コレステロール血症が特徴である⁹⁾。また、近年では、こうした自然発症モデル以外にも遺伝子組換え技術を利用して、ヒト疾患モデルあるいは動物工場として様々な遺伝子改変ウサギが開発されている。ヒト疾患モデルとしては、脂質代謝や動脈硬化に関連するリポ蛋白や酵素の遺伝子を導入したトランスジェニック（Tg）ウサギが多く報告されている⁹⁾。その他にも、心疾患や炎症、眼疾患等の疾患モデルとなるTgウサギも開発されている⁹⁾。動物工場は、遺伝子組換え技術により、有用な蛋白質や生理活性物質を動物の乳汁中に産生させる方法であり、乳汁中に産生された目的物質を精製、回収することで大量かつ安価に生産することが可能となる。例えば、現在、培養細胞等を用いて生産されている医薬品を動物工場で産生させる事により生産コストを削減することができる。世界で初めての動物工場による医薬品は、GTC Biotherapeutics社による遺伝子改変ヤギを使って生産されたヒトアンチトロンビンIIIであり、2006年にヨーロッパで認可されている。動物工場では、乳汁中に目的のタンパク質を産生させることからウシやヤギ等の乳量の多い動物種が適していると考えられる。ウサギは、ウシやヤギと比較して1頭当りの乳量は少ないものの、乳汁中の蛋白濃度が高度であること、性成熟期間が4～5ヵ月と短期間であること、実験室内での飼育管理が容易であること等か

ら小規模生産、短期開発に適した動物種として利用価値が高いと考えられている。

このように、近年では、医学生物学研究や医薬品の開発を目的に多くのウサギ系統が開発・確立されている。しかし、これらの系統は、個々の開発者により独自に維持・保存されているのが現状で、統括的な収集・保存・提供等を目的としたウサギのバイオリソースセンターはないようである。ただし、ウサギを家畜として利用することの多いヨーロッパでは、研究資源というよりも家畜としての品種保存を目的に凍結胚による保存が実施されている。例えば、フランスのThe French National Cryobank (<http://www.cryobanque.org/>)では、1999年からウシ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、家禽等の品種保存を実施しているが、この中にはウサギも含まれており、いくつかのウサギ品種が凍結胚で保存されている。しかし、あくまでも産業家畜としての意味合いが強く、研究用としての保存を目的としたものではない。

3. ウサギ精子・胚による凍結保存

実験動物の系統保存を行なう方法として、個体で維持する方法と凍結精子・胚で保存する方法が挙げられる。個体で維持する場合は、飼育スペースの確保と毎日の飼育管理業務、また、品質を維持するための定期的な微生物学的ならびに遺伝学的モニタリング等の実施が必要不可欠であり、これらに関連する労力と費用が発生する。いっぽう、凍結精子・胚で保存する場合、保管のための液体窒素コンテナと定期的な液体窒素の補充が必要であるが、個体での維持に比較すると少ない手間とコストで長期間安定して維持することが可能である。ウサギの系統保存を行なう場合、ウサギは身体が大きいことから個体での維持には広い飼育スペースが必要となる。また、ウサギは近交系でないことから近交退化を防ぐために、ある程度大き

表1 ウサギ精子および胚の凍結保存の比較

比較項目	精子	胚
凍結保存手技	報告あり	報告あり (桑実期胚)
採取方法	容易 (人工腔による射出精液)	煩雑 (過排卵処置後, 卵管or子宮灌流)
保存方法	液体窒素中	液体窒素中
個体を得る方法	容易 (人工授精)	煩雑 (卵管もしくは子宮内への胚移植)
凍結にかかる費用	低	高

なコロニーで維持する必要がある。これらのことを考慮すると、凍結精子・胚による保存は、ウサギにおいてもっとも効率的で有用な方法であると考えられる。すでにマウス・ラットでは、凍結胚で保存する方法が広く一般的に行なわれている。しかし、そのためには、その動物種で精子・胚の凍結技術や保存された精子もしくは胚から個体を得るために必要な生殖工学等の関連技術が確立されていること、また、それらの技術を習得していること等が必須となってくる。

ウサギ精子・胚の凍結保存に関しては、古くから多くの報告があるものの、それぞれの研究者が様々なプロトコルで進めているのが現状であり、その成績もまちまちで、標準的な手技が確立されているとは言い難い。しかし、少なくとも技術的にはウサギの精子ならびに胚を凍結保存することは可能であると言える。では、精子と胚による凍結保存を比較した場合、どちらがよいであろうか？表1にそれぞれウサギの精子と胚による凍結保存の比較についてまとめてみた。

まず、凍結用の精子・胚の採取について比較すると、精子の場合、人工腔を用いて採取することが容易であり、同じ雄ウサギから非侵襲的に繰り返し採取することも可能である。いっぽう、胚の場合、一般的に効率的に胚を採取するため、胚採取に先立ちホルモン処置による過排卵処置を行なう必要がある。さらに、胚の採取は、ウサギの安

楽死後あるいは麻酔下で卵管もしくは子宮灌流により採取しなければならない。したがって、胚の場合、採取までの準備や採取の方法が煩雑で精子採取に比べて技術的にも難しいと思われる。次に、凍結保存された精子・胚から個体を得る方法について比較すると、凍結精子では、融解後の精子を用いて直接人工授精を行なうことで産仔を得ることができる。いっぽう、凍結胚では、融解後の胚を麻酔下で雌ウサギの卵管もしくは子宮内に移植手術を行なう必要がある。また、胚移植を行なう雌ウサギは、凍結保存時の胚の発生ステージと同期化させるため、事前にホルモン注射もしくは精管結紮雄と交配し、偽妊娠の状態を誘起しておかなければならない。したがって、凍結胚から産仔を得る場合も、凍結精子と比較すると煩雑で、技術的にも難しいと思われる。以上のことを考え合わせると、ウサギでは、凍結精子による保存が技術的にも容易、コスト的にも安価であり、非常に利用価値が高いということが示唆される。

しかし、凍結精子もしくは胚での保存を実施する際、保存する系統の遺伝形質がどのように伝達されるかという点に注意する必要がある。例えば、先に紹介したWHHLウサギは、LDLレセプター変異の劣勢遺伝である。この場合、WHHLウサギの雄から採取した精子を凍結保存し、保存された凍結精子から個体を得る際に、野生型の雌ウサギに人工授精を行なえば、得られる産仔は、LDLレセ

プターの遺伝子型に関してはヘテロ型となる。したがって、LDLレセプター変異がホモ型の子孫を得るためには、もう一度ヘテロ型同士で交配する必要がある。ウサギの性成熟には約半年ほどかかることから、保存した凍結精子からホモ型個体のウサギコロニーを再構築するには1年以上かかってしまうことになる。このような場合、凍結精子よりも凍結胚で保存した方がウサギコロニーの再構築の時間短縮には有利であると考えられる。目的の遺伝子型がホモ型の胚を凍結保存することにより、胚移植後にホモ型の産仔を得ることができると考えられる。さらに、目的の表現型が単一遺伝子ではなく多遺伝子によって支配されているような場合も、系統保存には、凍結精子ではなく凍結胚による保

存もしくは個体によるコロニー維持が適していると考えられる。

これに対し、外来遺伝子を導入して作出したTgウサギでは、導入された外来遺伝子の次世代への伝達に着目すれば十分であることから、凍結精子による保存で十分その目的を達することができると思われる。したがって、凍結精子による保存は、Tgウサギの系統の保存には、非常に適した方法であると考えられる。実際、筆者らの施設では、これまでに開発したTgウサギについて凍結精子での維持・保存を進めている。現在、佐賀大学総合分析実験センターで維持・保存しているTgウサギ系統を表2に示した。表に挙げたウサギ系統は、すでに凍結精子による保存を完了している。

表2 佐賀大学で維持・保存しているトランスジェニックウサギ系統

導入遺伝子	病態モデル	文献
Human apo (a)	脂質代謝, 動脈硬化	Fan J. <i>et al.</i> (1999), <i>Biochem Biophys Res Commun</i> , 255 :639-644. Fan J. <i>et al.</i> (2000), <i>J Lipid Res</i> , 41 :1004-1012. Fan J. <i>et al.</i> (2001), <i>Arterioscler Thromb Vasc Biol</i> , 21 :88-94. Ichikawa T. <i>et al.</i> (2002), <i>Am J Pathol</i> , 160 :227-236. Sun H. <i>et al.</i> (2002), <i>J Biol Chem</i> , 277 :47486-47492. Kitajima S. <i>et al.</i> (2007), <i>Atherosclerosis</i> , 193 :269-276.
Human apoAII	脂質代謝, 動脈硬化	Koike T. <i>et al.</i> (2009), <i>Arterioscler Thromb Vasc Biol</i> , 29 :2047-2053.
Human LPL	脂質代謝, 動脈硬化 肥満	Fan J. <i>et al.</i> (2001), <i>J Biol Chem</i> , 276 :40071-40079. Koike T. <i>et al.</i> (2004), <i>J Biol Chem</i> , 279 :7521-7529. Ichikawa T. <i>et al.</i> (2004), <i>Lab Invest</i> , 84 :715-726. Kitajima S. <i>et al.</i> (2004), <i>Diabetologia</i> , 47 :1202-1209. Liu E. <i>et al.</i> (2005), <i>Metabolism</i> , 54 :132-138. Ichikawa T. <i>et al.</i> (2005), <i>Atherosclerosis</i> , 179 :87-95. Koike T. <i>et al.</i> (2005), <i>Cardiovasc Res</i> , 65 :524-534.
Human CRP	動脈硬化 炎症	Koike T. <i>et al.</i> (2009), <i>Circulation</i> , 120 :2088-2094.
Human MMP-12	動脈硬化 炎症	Fan J. <i>et al.</i> (2004), <i>Transgenic Res</i> , 13 :261-269. Wang W. <i>et al.</i> (2004), <i>Am J Pathol</i> , 165 :1375-1383. Liang J. <i>et al.</i> (2006), <i>Circulation</i> , 113 :1993-2001. Yamada S. <i>et al.</i> (2008), <i>Am J Pathol</i> , 172 :1419-1429.
Human VEGF	肝内血管腫 (Kasabach-Merritt症候群) 糸球体腎炎	Kitajima S. <i>et al.</i> (2005), <i>Lab Invest</i> , 85 :1517-1527. Liu E. <i>et al.</i> (2007), <i>J Am Soc Nephrol</i> , 18 :2094-2104.

LPL, Lipoprotein Lipase; CRP, C-reactive Protein; MMP-12, Macrophage Metalloproteinase-12; VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor.

これらのTgウサギの分与や、この他に、現在開発中の遺伝子改変ウサギ等に関しては筆者らの施設のホームページを参照して頂きたい (<http://www.animal.med.saga-u.ac.jp/>)。次に筆者らの施設の例として、ウサギ精子の凍結保存について言及したい。

4. ウサギ精子の凍結保存

一般に、精子をそのまま凍結しても融解後の生存率は極めて悪い。そのため、精液を適切な凍害保護剤を加えた保存溶液で希釈した後に凍結する方法がとられている。また、精子の急速な冷却も凍結融解後の生存性を低下させることが知られている(低温ショック)。そこで、精子を室温から4~5℃まで、一旦、ゆっくりと冷却した後、凍結操作を行なう方法が行なわれている。しかし、これらの手順は、動物種によって大きく異なる。これまで、ウサギの精子に対する凍害防止剤として、グリセロール、エチレングリコール、ジメチルスルホキシド(DMSO)およびアミド類等が報告されている⁵⁾。グリセロールは、ウシ等の家畜においてもっとも一般的な凍害保護剤として知られているが、ウサギでは凍結融解後の精子を用いた人工授精の成績は低く、効果的な凍害保護剤ではないとされている。筆者らは、これまで報告されている上記の凍害保護剤の比較検討の結果から、アセトアミドが凍結融解後の精子運動率でもっとも安定した成績を示すことを観察しており、凍害保護剤としてアセトアミドを使用してウサギ精子の凍結保存を進めている。近年、Kashiwazaki⁶⁾からも凍害保護剤として、それぞれ1.0 Mのグリセロール、ラクトアミド、アセトアミドおよびDMSOを比較検討した結果、日本白色種ウサギにおける精子の凍害保護剤として、ラクトアミドとアセトアミドが効果的であったと報告している。

筆者らの施設における精子凍結の成績を紹介す

ると、先に表2にしたTgウサギについては、それぞれ世代毎に精子をストローで凍結保存しており、現在、本数にして約1,000本を保存している。これらの凍結精子の融解後の精子運動率は、 $34.5 \pm 9.4\%$ である(凍結時に1本を融解して精子運動率を確認している)。また、これまでの凍結精子を用いた人工授精の成績は、妊娠率70.1%、平均産仔数 4.4 ± 2.7 匹($n=77$)である。ちなみに、新鮮精子を用いた人工授精の成績は、妊娠率77.3%、平均産仔数 6.0 ± 2.7 匹($n=172$)である。ただし、新鮮精子の場合は、雌ウサギ1匹当たり 10×10^6 個の運動精子を用いて人工授精を行なっているが、凍結精子の場合は、融解後に、 $20 \sim 40 \times 10^6$ 個の運動精子を用いて人工授精を実施している。新鮮精子と比較すると成績(効率)は低いものの、系統を保存する目的には十分に有用であると考えられる。

この他にも、精子凍結技術は、系統維持・保存のためだけではなく生体に代わる輸送手段としても利用できる。もちろん、凍結精子だけではなく凍結胚による輸送も有用であると考えられる。生体での輸送は、輸送中の温湿度や飲水の管理などが必要な上、輸送中の動物へのストレスや逃亡、死亡といった事故が懸念される。しかし、生体の輸送に代わって凍結精子・胚で輸送を行なえば、これらの輸送時に懸念される問題や事故の発生防止になるだけでなく、輸送コストの削減にもつながる。実際に、筆者らは、2005年に補体成分C6欠損ウサギをドイツのJohanes-Gutenberg大学から導入する際に、生体の輸送ではなく凍結精子による輸送を実施した⁷⁾。その際、輸送された凍結精子を融解して5匹の日本白色種ウサギの雌に人工授精したところ、4匹が妊娠し、全部で11匹の産仔を得ることに成功している。

5. おわりに

これからも医学生物学研究のために様々な疾患モデル動物等が作製され、多くの研究成果がもたらされることが期待される。現在、実験動物として広く用いられているマウスでは適さない研究分野もあり、マウスにかわる実験動物種の開発が切望されている。ウサギもその中の動物種の一つである。今後、医学生物学研究や医薬品開発への益々の利用に向けて、ウサギのゲノム解析、遺伝子組換え技術、精子・胚の凍結保存等の関連技術の進展・確立、統括的なバイオリース事業の整備等が望まれる。

参考文献

- 1) 科学技術・学術審議会 他：バイオリソース整備戦略のための報告書（平成18年6月28日）
- 2) 塩見雅志, 伊藤 隆：高脂血症・動脈硬化に関する研究におけるWHHLウサギを用いた研究の貢献. アニテックス, **15**: 11-14, 2003.
- 3) Fan, J. and Watanabe, T.: Transgenic rabbits as therapeutic protein bioreactors and human disease models. *Pharmacol. & Therapeutics*, **99**: 261-282, 2003.
- 4) Shiomi, M. and Ito, T.: The Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) rabbit, its characteristics and history of development: A tribute to the late Dr. Yoshio Watanabe. *Atherosclerosis*, **207**: 1-7, 2009.
- 5) Mocé, E. and Vicente, JS.: Rabbit sperm cryopreservation: A review. *Anim. Reprod. Sci.*, **110**: 1-24, 2009.
- 6) Kashiwazaki, N., Okuda, Y., Seita, Y. *et al.*: Comparison of glycerol, lactamide, acetamide and dimethylsulfoxide as cryoprotectants of Japanese white rabbit spermatozoa. *J. Reprod. & Develop.*, **52**: 511-516, 2006.
- 7) Liu, E., Kitajima, S., Wiese, E. *et al.*: Re-establishment of complement C6-deficient rabbit colony by cryopreserved sperm transported from abroad. *Exp. Anim.*, **56**: 167-171, 2007.

原 著

遺伝子改変ウサギの系統維持のための精子凍結保存の有用性に関する検討： 約5.6年間凍結保存された遺伝子組換えウサギ由来精子を用いた人工授精成績

Examination of utility of sperm cryopreservation for preservation of transgenic rabbit lines: Fertility performance of transgenic rabbit's sperm cryopreserved for 5.6 years

西島 和俊¹⁾, 山口 慎二¹⁾, 森本 正敏²⁾, 渡辺 照男¹⁾, 北嶋 修司¹⁾

Kazutoshi NISHIJIMA¹⁾, Shinji YAMAGUCHI¹⁾, Masatoshi MORIMOTO²⁾,
Teruo WATANABE¹⁾, Shuji KITAJIMA¹⁾

(Received 3 September 2010 / Accepted 10 September 2010)

Summary

Sperm cryopreservation should be the most efficient way to preserve transgenic (Tg) rabbit lines, since rabbit semen is easily collectable. Though the frozen sperm is assumed to be maintained in liquid nitrogen almost permanently, the reliability of a long-term cryopreservation has not been examined in rabbits. In this study, we determined the fertilization ability of long-preserved (5.6 years) sperm derived from human lipoprotein lipase (hLPL)-Tg rabbit. Motility of frozen and thawed was 36.3%, which was not significantly different from that when the same sperm was thawed immediately after frozen (41.7%). Five virgin female Japanese white rabbits were inseminated artificially (20×10^6 sperms/head) with the thawed long-preserved sperm. As a result, the pregnancy rate was 60.0%, the mean litter size was 5.3 and the weaning rate was 93.8%. When fresh semen from the same male hLPL-Tg rabbit was inseminated artificially (10×10^6 sperms/head), the pregnancy rate was 62.5%, the mean litter size was 7.2 and the weaning rate was 75.8%. The result indicated that Tg rabbit sperm cryopreserved for 5.6 years had fertilization ability, and sperm cryopreservation would be an adequate method for preservation of Tg rabbit lines.

緒 言

近年の遺伝子工学, 発生工学の発達により, 多くの遺伝子改変動物が作製され医学, 生物学の分野における研究に広く用いられている。このような中, 作製された遺伝子改変動物をバイオリソースとして維持・保存する必要性が高まっている。ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) ではライフサイエンス研究に有用なバイオリソースの整備を目的とし, マウス・ラットを始めニホンザルから植物, 微生物に至るまで様々な生物が収集・保存されている (<http://www.nbrp.jp/>)。さらに,

バイオリソースの質の向上を目指し, 保存技術の改良やゲノム解析などによるバイオリソースの付加価値向上など時代の要請に応えた整備が進められている。

佐賀大学では, ヒト病態モデル動物としての遺伝子改変 (Tg) ウサギを開発すると共に, その維持・保存に取り組んできた^[14]。ウサギは, コレステロールエステル転送蛋白活性をもち, 血中の主要なリポ蛋白は低比重リポ蛋白であるなど脂質代謝系がヒトに近く, 動脈硬化に対して感受性を有することから^[13]当該分野の研究には不可欠な実験動物である。これまでのところ, ウサギ

¹⁾ 佐賀大学総合分析実験センター 生物資源開発部門
〒849-8501 佐賀市鍋島5-1-1

²⁾ 熊本保健科学大学リハビリテーション学科
〒861-5598 熊本市和泉町325番地

¹⁾ Division of Biological Resources and Development, Analysis Research Center for Experimental Sciences, Saga University, 5-1-1 Nabeshima, Saga 849-8501, Japan

²⁾ Department of Rehabilitation, Kumamoto Health Science University, 325 Izumimachi, Kumamoto 861-5598, Japan

はNBRPには採用されていないが、今後、ES細胞やiPS細胞の樹立、Zinc-Finger Nuclease技術^[3]の応用など、ウサギにおける遺伝子工学技術が発展すれば、さらに有用なモデルとなり得るため、バイオリソースとしてその系統保存も重要性が増すと考えられる。

動物の保存方法としては、個体による系統維持のほか、凍結胚・凍結精子による保存が行われている^[7]。保存方法は動物の種や使用目的、設備、経費等を考慮して選択する必要がある。ウサギはマウスやラットに比較して大型であることから、個体による系統維持には飼育スペースやコストがかかるため、凍結胚や凍結精子による系統保存が効率的である。ウサギでは、射出精液の採取や人工授精が容易に行えることから、精子凍結による保存が簡便かつ経済的であると考えられる^[4, 14]。そのため、我々はこれまでに開発したTgウサギの系統について、主に凍結精子による系統維持を進めてきた。一般に、液体窒素中の凍結精子は半永久的に保存できるとされるが、ウサギにおいて、長期にわたる精子凍結保存の信頼性については検討されていない。そこで、Tgウサギの系統保存のための精子凍結保存の有用性を検討する目的で、佐賀大学において長期保存中のTgウサギ1系統の凍結精子について、融解後の精子運動率、人工授精後の妊娠率、産仔数などを指標とした受精能、さらに導入遺伝子、表現型の次世代への伝達について検討を行った。

材料および方法

本実験は、すべて佐賀大学動物実験安全管理規則に則って行われた。

1. 動物

6月齢の未經産メス日本白色種ウサギ(JW/CSK, 日本SLC, 浜松)5匹を使用した。ウサギは温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 15\%$ 、照明時間が明期12時間(8:00~20:00)暗期12時間(20:00~8:00)の飼育室で水洗架台にて飼育した。ウサギにはCRB-1(日本クレア, 東京)を一日当たり120g、給餌した(出産予定日1週間前から離乳時までは自由摂取とした)。飲水は自動給水装置により水道水を自由に摂取させた。

2. 凍結精子

当施設で凍結後、液体窒素中に約5.6年間保存しているヒトリボ蛋白リパーゼ(hLPL)Tgウサギ(遺伝子型, hLPL: +/0)^[1, 6]由来の凍結精子を使用した。以下に精子凍結時のプロトコルを記す。

- 1) 人工膈を用いて精液を採取。
- 2) 200xgで15分間遠心分離を行い、精子数が 600×10^6

個/mlとなるように上清を除去後、Egg-Yolk Hepes extender (EYH, 125 mM Glucose, 105 mM Lactose, 91 mM Raffinose, 10 mM HEPES, 6% Acetamide, 20% Egg-yolk, 1000 U/ml Streptomycin, 1000 U/ml Penicillin G, pH: 7.2)で6倍に希釈。

- 3) クールサーモユニットCTU-N(タイテック, 埼玉)を用いて精子を 25°C から 5°C まで $-0.2^\circ\text{C}/\text{min}$ の速度で冷却した後、精子を0.5mlのプラスチックストロー(富士平工業, 東京)に充填。
- 4) 精液を充填したストローを 4°C に設定した冷蔵庫に30分間静置。
- 5) 精液入りストローを液体窒素蒸気中に移して15分間静置した後、液体窒素に浸漬して凍結。

3. 人工授精および凍結精子の受精能の評価

凍結保存されていた精子は、液体窒素中からとり出したストローを 37°C の温湯に30秒間浸漬することにより融解した。融解後、改良ノイバウエル血球計算盤を用いて、不動精子数および総精子数を計測し、運動精子数および精子運動率を、以下の計算式により算出した。

$$\text{運動精子数} = \text{総精子数} - \text{不動精子数}$$

$$\text{精子運動率}(\%) = \frac{\text{運動精子数}}{\text{総精子数}} \times 100$$

融解後の精子を運動精子数で 40×10^6 個/mlとなるようにトリス・クエン酸・グルコース緩衝液(313.79 mM Trizma base, 103.07 mM Citric acid, 33.3 mM Glucose, Kanamycin 80 mg/L)で調整後、ガラスピペットを用いて、 20×10^6 個/0.5mlの精子をメスウサギの膈内に注入した。精子注入後、排卵を誘起するため1匹当たり5.0Uのヒト絨毛性ゴナドトロピン(あすか製薬, 東京)を耳静脈から静脈内注射した。凍結精子の受精能の評価として、人工授精後の妊娠率、平均産仔数、離乳率を算出した。

4. 導入遺伝子の伝達と表現型の評価

離乳時に仔ウサギの組織片からゲノムDNAを抽出し、hLPL遺伝子に特異的なプライマーを用いてPCRを行い、導入遺伝子が伝達されたか否かを確認した。

人工授精により得られたウサギが16週齢になった時点で、16時間の絶食の後に耳動脈より採血した。血清中のトリグリセライド(TG)値をTG測定キット(和光純薬工業, 大阪)を使用して測定し、Tgおよびnon-Tg(対照)ウサギと比較した。

5. 統計解析

妊娠率と離乳率についてはFisher's exact testを用

いて、平均産仔数、ならびに血中TG値については Student's *t*-testを用いてそれぞれ有意差検定を行った。

結果

人工授精に使用した精子の凍結前の運動率は90.0%、凍結直後に融解した際の運動率は41.7%であった。約5.6年凍結保存された後に融解した精子の運動率は36.3%であり、凍結直後に融解した時の運動率に比較して顕著な低下は見られなかった(表1)。

表1 ヒトLPL-Tgウサギの精子運動率の比較

	精子運動率 (%)
新鮮精子 (凍結前)	90.0
凍結融解精子	
凍結直後	41.7
5.6年間保存後	36.8

人工授精を実施したメスウサギ5匹のうち3匹が出産し(妊娠率, 60.0%), 合計16匹(平均産仔数, 5.3 ± 0.9 匹)の仔ウサギが得られた。出生した仔ウサギのうち、15匹が離乳(離乳率, 93.8%)した(表2)。今回使用した精子を供与したオスhLPL-Tgウサギ生存時の新鮮精子を用いた人工授精成績(10 x 10⁶個/匹で実施)は、妊娠率が62.5%、平均産仔数が 7.2 ± 0.5 匹、離乳率が75.8%であった(表2)。

離乳時の仔ウサギの性別はオス10匹とメス5匹であった。PCRによる遺伝子解析の結果、オスでは5匹がTgで5匹がnon-Tg、メスでは2匹がTgで3匹がnon-Tgで表2 ヒトLPL-Tgウサギの人工授精成績

	注入精子数 (x10 ⁶ 個/匹)	交配メス (匹)	妊娠率 (%)	平均産仔数 ¹⁾ (匹)	離乳率 (%)	性比 ²⁾	
						オス	メス
新鮮精子	10	8	62.5	7.2 ± 0.5	75.8	17/25	8/25
凍結精子 (5.6年間保存)	20	5	60.0	5.3 ± 0.9	93.8	10/15	5/15

1) 数値は mean ± SE

2) 離乳時のオスもしくはメスの匹数/離乳時の総匹数

表3 ヒトLPL-Tgウサギの血中トリグリセライド(TG)値

	オス		メス	
	匹数	TG (mg/dL) ¹⁾	匹数	TG (mg/dL) ¹⁾
hLPL (-/0)	5	34.5 ± 5.3	2	36.1 ± 2.5
hLPL (+/0)	5	$7.1 \pm 1.6^*$	3	10.9 ± 2.2

¹⁾ 数値は mean ± SE

*: $p < 0.01$ vs hLPL (-/0)

あった(表3)。これらのウサギの血清中TGの平均値はTgウサギのオスが 7.1 ± 1.6 mg/dL、メスが 10.9 ± 2.2 mg/dLであり、non-Tgウサギのオス 34.5 ± 5.3 mg/dL、メス 36.1 ± 2.5 mg/dLに比べ明らかな低値を示した(表3)。

考察

精子の凍結保存は、種や系統の保存のために様々な動物で行われているが^[7]、種や系統により適した精子の凍結方法が異なることが明らかになっている^[8-11]。実験動物において、マウスでは標準的な精子凍結法が確立されて専用試薬が市販されているのに対し^[11]、ウサギでは未だ標準的な方法が存在せず、研究者により様々なプロトコルが存在する^[8,14]。ヒト疾患モデル動物など貴重な系統を凍結精子で維持する場合、最も重要な点は保存期間中に精子の生存率や受精能が低下することなく長期間安定的に保存できるということである。一般に、液体窒素での保存期間は半永久的といわれているが、検証的な研究は少ない。ヒトでは28年間凍結保存された精子で受胎したことが実証されているが^[2]、ウサギにおいて長期間凍結保存された精子の受精について検討した報告は見当たらない。本研究により、我々が用いたプロトコルで凍結保存したウサギ精子は、約5.6年間保存した後も受精能を保持していたことが確認された。凍結精子と新鮮精子の受精能については、人工授精に用いた精子の量が異なるため直接比較することは出来ないが、新鮮精子(10 x 10⁶個/匹)に対し、今回の凍結融解後の精子数を2倍(20 x 10⁶個/匹)用いた際の人工授精の成績は、平均産仔数が低い傾向にあったものの、妊娠率、平均産仔数、離乳率いずれにおいても有意な差は認められな

かった。

凍結精子によるTgウサギの系統保存においては、凍結精子の受精能に加え、得られた産仔に導入遺伝子が伝達され、表現系が維持されることも重要である。LPLは、食事由来のカイロミクロンや肝臓で合成された超低比重リポ蛋白といったTGに富みリポ蛋白中のTGを遊離脂肪酸とグリセロールに加水分解する酵素である。このため、hLPL-TgウサギではLPL活性の亢進にともない表現型として著しい低TG血症を示す^[1,6]。本研究において、凍結融解後の精子から人工授精で得られたhLPL-Tgウサギの血清中TG濃度は、同腹のnon-Tgウサギに比べて有意に低い値を示した(表3)。これは、Tgウサギで導入遺伝子が伝達されるとともに導入された遺伝子が発現し、産生されたLPLが活性を維持していることを示していると考えられる。

凍結胚では目的遺伝子をホモ接合体で保存できるのが利点であるが、胚の採取や融解後の移植には技術的な修練が必要である^[4,5]。一方、凍結精子では、精子の採取や人工授精の手技は比較的容易であるが^[4]、凍結保存された精子から個体を得るためには他のウサギ由来の卵子と受精させる必要があることから、目的遺伝子をヘテロ接合体の状態ではしか保存できない。しかし、Tgウサギの場合、導入された外来遺伝子はヘミ接合体の状態でも効果を示すことから、必ずしも導入遺伝子をホモ接合体の状態でも保持する必要はない。また、ウサギは近交系でないことから、出来るだけ遺伝子背景を揃える目的で、しばしば同腹のウサギを同一の実験に用いることがあるが、この際には交配に用いる親の遺伝子型がヘミもしくはヘテロ接合体である方がむしろ有利である。なぜなら、遺伝子型がヘミ接合体のTgウサギを用いて野生型ウサギと交配を行うことで、Tgとnon-Tgの仔ウサギが1:1で得られると期待されるからである。これらのことから、Tgウサギでは、凍結精子による系統の保存が最も効率的であると考えられる。

本検討より、我々が用いたプロトコールで凍結保存したウサギ精子は、少なくとも約5.6年間は液体窒素中に安定的に保存可能であることが明らかとなった。Tgウサギの系統保存には、凍結精子の保存が有用であると考えられることから、今後、バイオリソースとしてのTgウサギの系統保存・供与などの基盤体制の整備に向け、ウサギ精子の凍結保存におけるより長期保存の信頼性の確認、ウサギの品種・系統による最適な凍結方法の開発、凍結融解後の精子を用いた効率的な人工授精の条件の確立などの検討を進めて行く必要がある。

謝 辞

本研究は、科学研究費補助金(基盤研究C、課題番号22500386)を受けて実施した。

引用文献

- [1] Araki, M., Fan, J., Challah, M., Bensadoun, A., Yamada, N., Honda, K., and Watanabe, T. (2000). Transgenic rabbits expressing human lipoprotein lipase. *Cytotechnology*, **33**, 93-99.
- [2] Feldschuh, J., Brassel, J., Durso, N., and Levine, A. (2005). Successful sperm storage for 28 years. *Fertil. Steril.*, **84**, 1017.
- [3] Geurts, A.M., Cost, G.J., Freyvert, Y., Zeitler, B., Miller, J.C., Choi, V.M., Jenkins, S.S., Wood, A., Cui, X., Meng, X., Vincent, A., Lam, S., Michalkiewicz, M., Schilling, R., Foeckler, J., Kalloway, S., Weiler, H., Ménoret, S., Anegon, I., Davis, G.D., Zhang, L., Rebar, E.J., Gregory, P.D., Urnov, F.D., Jacob, H.J., and Buelow, R. (2009). Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science*, **325**, 433.
- [4] Kitajima, S. (2009) Improvement of Rabbit Production. *In* Rabbit Biotechnology: Rabbit genomics, transgenesis, cloning and models, pp 3-12, Houdebine, L.M., and Fan, J. (edit), Springer, New York.
- [5] Kitajima, S., Liu, E., and Fan, J. (2009). Rabbit Transgenesis. *In* Rabbit Biotechnology: Rabbit genomics, transgenesis, cloning and models, pp 37-48, Houdebine, L.M., and Fan, J. (edit), Springer, New York.
- [6] Liu, E., Kitajima, S., Higaki, Y., Morimoto, M., Sun, H., Watanabe, T., Yamada, N., and Fan, J. (2005). High lipoprotein lipase activity increases insulin sensitivity in transgenic rabbits. *Metabolism*, **54**, 132-138.
- [7] Mazur, P., Leibo, S.P., and Seidel, G.E. Jr. (2007). Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future directions. *Biol. Reprod.*, **78**, 2-12.
- [8] Mocé, E., and Vicente, J.S. (2009). Rabbit sperm cryopreservation: a review. *Anim. Reprod. Sci.*, **110**, 1-24.
- [9] Nakatsukasa, E., Kashiwazaki, N., Takizawa, A.,

- Shino, M., Kitada, K., Serikawa, T., Hakamata, Y., Kobayashi, E., Takahashi, R., Ueda, M., Nakashima, T., and Nakagata, N. (2003). Cryopreservation of spermatozoa from closed colonies, and inbred, spontaneous mutant, and transgenic strains of rats. *Comp. Med.*, **53**, 639-641.
- [10] Rath, D., Bathgate, R., Rodriguez-Martinez, H., Roca, J., Strzezek, J., and Waberski, D. (2009). Recent advances in boar semen cryopreservation. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.*, **66**, 51-66.
- [11] Shaw, J.M., and Nakagata, N. (2002). Cryopreservation of transgenic mouse lines. *Methods Mol. Biol.*, **180**, 207-228.
- [12] Yanni, A.E. (2004). The laboratory rabbit: an animal model of atherosclerosis research. *Lab. Anim.*, **38**, 246-256.
- [13] 塩見 雅志, 伊藤 隆. (2003). 高脂血症・動脈硬化に関する研究におけるWHHLウサギを用いた研究の貢献. *アニテックス*, **15**, 11-14.
- [14] 北嶋修司, 西島和俊. (2010) ウサギ精子・胚の凍結保存とバイオリソース. *アニテックス*, **22**, 32-37.

要 約

ウサギは射出精液の採取および人工授精が容易に行えることなどから、凍結精子による系統保存が最も効率的であると考えられるが、長期にわたるウサギ精子の凍結保存の信頼性については検討されていない。そこで、本研究では、我々の施設で長期保存中の遺伝子改変 (Tg) ウサギ由来の凍結精子の受精能について検討を行った。約5.6年間凍結保存されていたTgウサギ1系統の凍結精子を融解し、運動精子数、精子運動率を計測後、運動精子 20×10^6 個/匹を未経産の日本白色種メスウサギ5匹に人工授精した。融解後の精子の運動率は36.3%で、同サンプルを凍結後ただちに融解した際の運動率 (41.7%) に比較して顕著な低下は見られなかった。人工授精した5匹のうち3匹が出産し、妊娠率は60.0%、平均産仔数は5.3匹、離乳率は93.8%であった。同じオスTgウサギの新鮮精子を人工授精 (10×10^6 個/匹) した場合の成績は、妊娠率62.5%、平均産仔数7.2匹、離乳率は75.8%であった。凍結融解精子を用いた人工授精では平均産仔数がやや少なかったが、約5.6年間液体窒素中に凍結保存された精子は良好な受精能を維持していることが確認された。また、導入遺伝子および表現型の子孫への伝達も確認されたことと合わせて、精子凍結保存はTgウサギの系統保存に有用な方法であると考えられた。

