

# 第9回哺乳動物生殖工学研究会

プログラム・抄録集

会期：平成9年12月13日（土）  
午後1時00分～5時30分

会場：北里本館大会議室  
港区白金5-9-1 TEL 03-3444-6161

開会の辞

会長 横山峯介

座長 星 雅樹

1. マウス胚および配偶子の凍結保存 - 現状と展望  
横山峯介 (三菱化学生命科学研究所 生殖工学開発室)
2. Simple Vitrificationによるマウス胚の保存と利用  
中尾和貴 (東大医科研・獣医)
3. マウス精子の凍結保存  
中潟直己 (東大医科研・獣医)

座長 板垣 住明

4. Vitrificationによるラット初期胚の凍結保存  
多田昇弘 (大正製薬創薬研究所)
5. ラット胚の凍結保存とその応用  
高橋利一・平林真澄 (ワイエスニューテクノロジー研究所)
6. ウシ受精卵の凍結保存現状と展望  
浜野晴三 ((社)家畜改良事業団家畜バイテクセンター)

——— 総 会 ———

## マウス胚および配偶子の凍結保存－現状と展望

横山峯介（三菱化学生命研・生殖工学開発室）

トランスジェニックマウスやノックアウトマウス等の遺伝子操作動物を用いる実験系は、現在の広義の生物学に欠くことのできないものとなっており、遺伝子操作の施された新しい動物がつぎつぎと作出されている。また、これと同時に、このような動物（系統）が増加するにしたがって個体での維持は困難となり、初期胚や精子のかたちでの凍結保存することが不可欠となってきた。

一方、国内外の研究施設で作出された種々の遺伝子操作動物を、共通の遺伝子資源（その凍結胚や配偶子を含めて）として有効に利用しようとする動きもでてきた。しかし、現在利用されている凍結保存法は、それぞれの施設が独自の方法で行っているために、各施設間ではほとんど共通性がないのが現状であり、実際的な運用にあたっては種々の問題が提起されている。

今年度から、科学技術庁・振興調整費の下で、三菱化学生命科学研究所が中核機関となって、「胚バンクに関する研究プロジェクト」が5年間の計画でスタートした。この研究プロジェクトでは、マウス胚および配偶子の凍結保存技術の標準化と、技術の普及を中心的なテーマの一つとして採り上げている。今回は、このプロジェクトに関与している当事者の一人としての事情も踏まえ、マウス初期胚および配偶子の凍結保存の現状と今後の展望を考察してみたい。

# Simple vitrification によるマウス胚の保存と利用

中尾和貴

東京大学医科学研究所獣医学研究部

マウス胚の保存法としての緩慢法は優れた方法であるが、処理に多大な時間が必要であるため、現在のように発生工学の技術から得られる莫大な数の遺伝子組み換えマウスの系統保存に柔軟に対応するのは、非常に困難である。

一方我々の開発した simple vitrification 法は、ごく短時間で終了し特別な機器等を必要としない優れた方法である。そこで我々は昨年度から、主に東大医科研で維持されている、莫大な数になる遺伝子組み換えマウスの系統保存、さらには計画生産にも本保存法を用いて、非常に効果的に実施できたのでその詳細にいつて紹介する。さらに従来では多くの場合、系統保存にのみ利用されてきた保存胚を、より積極的にKOマウスやTgマウスを得るための手段として、利用することで成果をあげてきたので、ここで併せて紹介する。

## マウス精子の凍結保存

中潟直己

東京大学医科学研究所獣医学研究部

近年、マウス精子の凍結保存法が確立され、種々の系統に応用されている。特に、Tgマウスに関しては導入された遺伝子が、また、KOマウスにおいては、遺伝子の構造の一部が破壊されたその遺伝子が次世代に伝達されればよいことから、必ずしも胚で凍結する必要性はなく、精子の凍結でもこれらマウスの系統保存が可能である。また、この方法は野生ねずみ類の精子についても応用可能であり、現在、本法を用いて絶滅に瀕している小型野生動物の精子の凍結保存も行っている。

本日の講演では私たちがこれまでに行ってきたマウス精子の凍結保存について述べるとともに、小型野生ねずみ類の精子の凍結保存についても併せて紹介する。

## Vitrification によるラット初期胚の凍結保存

多田昇弘（大正製薬創薬研究所）

ラット胚の凍結保存は、現在プログラムフリーザー等を用いた緩慢凍結法が主流であるが、マウス胚凍結保存に比べ普及していないのが現状である。その原因として、1) ラット胚の1細胞期から胚盤胞期までの培養系が確立していない、2) ラット胚はマウス胚と比べ凍結-融解処置に対して感受性が高い（耐凍能が低い）、3) PMSG, hCG などの性腺刺激ホルモン投与による過排卵誘起法が確立していない、4) 大量に受精卵を得るために体外受精法が用いられるが、ラットはマウスに比べ安定性に欠ける等が考えられる。従って、ラット胚凍結保存のレベルを向上させるためには、凍結保存技術自体の基礎的な検討のみならず、上記の問題点を各々解決して行くことも必要である。

本講演では、我々が実施しているvitrification 法についてマウス胚を用いた基礎的検討を中心に解説するとともに、その応用例として疾患モデルラット初期胚の凍結保存について示す。

我々がラット胚の凍結保存に適用しているvitrification 法は、中潟の方法を若干修正したもので、保存液としてDPS液（2.75 M DMSO, 2.75 M propylene glycol, 1.0 M sucrose in PB1）を用いている。本法によって、Wistar系ラットでは、vitrification-warming 後70%以上の2細胞期胚が形態的に正常であった。また、これらの生存胚を移植したところ50%以上が産仔へと発生した。次いで、疾患モデルラットとしてbald（遺伝的脱毛症）、SHR-SP（脳卒中易発症）及びBB（インスリン依存性糖尿病）の各系統の初期胚について各々vitrification 法による凍結保存を試みた。その結果、Wistar系ラット胚とほぼ同様の成績が得られた。更に、融解後の胚由来産仔について遺伝的特性への影響を確認するために各々の疾患モデルラットが有する特性について調べたが、何ら変化は認められなかった。なお、我々は、トランスジェニックを含む種々の疾患モデルラットやマウスの胚をルーティンとして凍結保存している。通常、1系統あたり100-300個の2細胞期胚を凍結保存しており、その内、20-30個の

凍結胚を融解し、移植後に得られた産仔について遺伝的特性の変化の有無を確認している。

胚の凍結保存は、今や疾患モデル及びトランスジェニック動物の系統維持に必須の技術といえる。特に、ラットは、マウスより大型なので、収容スペース及びマンパワー等の削減の手段として極めて有効である。また、これに関連して、通常、トランスジェニックマウス、ラット作製には、1細胞期前核への外来性遺伝子のmicroinjection (MI) が適用されているが、このMIに凍結卵を用いることも可能である。凍結卵をMIに用いることによって、収容スペース等の削減に寄与するのみならず、凍結卵を適時、実験に供試することができるので、計画を立てやすく効率的である。特に、ラットの場合は、上述したように大量に受精卵を採取しにくいという難点があり、凍結卵によるMIは、かなりの利点がある。

## ラット胚の凍結保存とその応用

高橋利一・平林真澄

(ワイエスニューテクノロジー研究所)

胚の凍結保存は、遺伝形質の保存を目的に自然発症のミュータント動物や、トランスジェニック(Tg)動物に対して広く用いられている。また、凍結保存された胚は、単に個体発生に供するだけでなく、マイクロインジェクション(MI)や、キメラ動物の作製の材料としても応用されてきている。ラット胚の凍結保存においても、過去の研究から基礎的知見は得られており、修正二段階凍結法や、ガラス化法で、効率的な系統保存が成されている。我々は修正二段階凍結法を用いたTgラットの系統保存を行っており、その保存成績を紹介すると共に、凍結保存胚の応用として、ラット凍結前核期胚を用いてTg作出を試みたので合わせて報告する。

### 1) Tgラット2-細胞期胚の凍結保存

系統保存としての凍結保存では、安定的で高率な融解後の個体発生率が要求される。我々は修正二段階凍結法を用いた2-細胞期胚の凍結保存により2~4年間保存した胚でも、64~68%の個体発生率(産子数 / 移植胚数)を得ており、非凍結対照胚の個体発生率(69%)と同等の生存性を維持した。

### 2) ラット前核期胚の保存

凍結保存胚のMIへの応用のために、まずラット前核期胚の保存条件を検討した。ラット前核期胚を修正二段階凍結法およびDAP213を用いたガラス化法で保存し、個体発生率を比較した。個体発生率は修正二段階凍結法において50~60%とガ



ス化法に比べて有意( $P < 0.05$ )に高く、ラット前核期胚に適すると判断された。

### 3) ラット凍結前核期胚を利用した Tg ラットの作出

修正二段階凍結法により凍結保存したラット前核期胚に対して MI を行い、Tg ラットの作出を試みた。凍結融解後のラット前核期胚の注入後の生存率および個体発生率は、非凍結対照胚と同等であった。また、凍結保存胚あたりの Tg 作出効率 (3.05%) は、非凍結対照胚 (3.46%) と同等で、凍結前核期胚を用いた Tg 作出が実用的であることを確認した。

## ウシ受精卵の凍結保存現状と展望

浜野 晴三

(社)家畜改良事業団 家畜バイオテクセンター

単胎動物であるウシの受精卵移植の意義には、過剰排卵処理と人工授精との組み合わせにより優良個体の受精卵を一度に多数生産して、低能力個体の腹を借りて移植することにより、子畜を増産することや改良速度を向上する目的等があげられる。今日までの間に、受精卵移植技術は多くの改良が加えられてきており、とくに採取された受精卵を保存する技術は、優秀な遺伝資源の保存という観点や乳牛に見られるような受精卵の国際間での流通においても、重要不可欠な技術となっている。

受精卵移植技術が試験研究の範疇を越えて、農家（生産者）側の実用技術として本格的に取り組まれたのは、平成3年度の牛肉の輸入が自由化された時期からとも考えられるが、国内の受精卵移植の成果の状況を農林水産省の調査結果を基にみた場合、体内受精卵の移植による産子数の推移では年々移植頭数が増加していることがわかるものの、平成7年度に初めて供卵牛頭数を産子頭数が越えている状況が国内の受精卵移植の実態である（表1）。また、移植後の受胎率に関しては、新鮮卵移植の場合の受胎率が50～52%の範囲で安定している一方、凍結卵の移植では平成元年度の39%から7年度の46%と徐々に受胎率が向上しているものの、新鮮卵移植と同等の成績には至っていない（表2）。

ウシ受精卵の凍結保存技術は、段階的に凍害保護物質を平衡させて凍結し、融解後も段階的に凍害保護物質を除去して移植に供するステップワイズ法、凍害保護物質に直接受精卵を投入して平衡させた後に凍結し、融解後にストロー内で凍害保護物質を除去して移植に供するワンステップ法、人工授精と同様に融解後直ちに移植を行うダイレクト法（ゼロステップ法）と変遷してきており、現在ではダイレクト法が一般的に用いられている。一方、技術的な確立はまだなされていないが、ガラス化保存法の開発を移植実務と並行して行われている。

ここでは、体外受精卵を用いた凍結保存技術の変遷を基に、ウシにおける凍結保存技術の現状と展望を考察したい。

表 1. 牛体内受精卵移植による産子数等の推移

	元年度	2年度	3年度	4年度	5年度	6年度	7年度
供卵牛頭数	6.899	7.704	9.099	10.853	11.618	11.922	11.079
受卵牛頭数	15.788	19.865	26.613	32.811	36.876	37.744	40.742
産子頭数	4.884	5.912	7.163	8.818	10.230	11.010	11.322
(内双子)	(441組)	(462組)	(547組)	(601組)	(432組)	(597組)	(398組)

資料：農林水産省畜産局調べ

表 2. 牛体内受精卵移植の状態別受胎率の推移

	元年度	2年度	3年度	4年度	5年度	6年度	7年度
新鮮卵							
1卵移植	52	51	50	51	51	51	51
2卵移植	53	57	54	55	60	54	54
凍結卵							
1卵移植	39	41	41	43	42	43	46
2卵移植	49	46	51	54	50	54	50

資料：農林水産省畜産局調べ