

第14回哺乳動物生殖工学研究会

プログラム・抄録集

会期：平成14年12月7日（土）

午後1時00分～5時30分

場所：北里本館大会議室

港区白金5-9-1

特別講演

野生齧歯類の維持・保存について

土屋 公幸

(東京農業大学農学部畜産学科野生動物学研究室)

一般講演

1. マウス凍結配偶子を用いたICSI
東 貞宏(北里大医)
2. 凍結融解マウス精子の受精系におけるICSIならびにZIPを併用した体外受精の比較
川瀬洋介(中外医科学研)
3. ハムスター精巢上体精子の凍結保存法の試み
奥田泰士(麻布大獣医)
4. マウス卵巣の凍結保存法の開発
右島富士男(北里大医)
5. CDB における変異マウス作製支援
宮地 均(理研・神戸)
6. 新動物実験施設紹介と動物実験支援グループの現状報告
後藤元人(京大ウイルス研)

壇 会

野生齧歯類の維持・保存について

土屋公幸

東京農業大学農学部畜産学科野生動物学研究室

実験動物としてのネズミ類は、一般に広く使われているマウス、ラット、モルモットを始めとして、ハムスター類、スナネズミ、コトラットなどが良く知られている。演者はアカネズミの細胞遺伝学的な研究から、世界中からアカネズミ類を採集・飼育して研究してきたが、その仲間のセズジネズミが流行性出血熱病研究に必要なことから、実験動物としての開発・供給を始めた。その後、野生ハツカネズミを始め多岐の野生ネズミ類を採集・飼育するようになり、それら多様なネズミ類を飼育下で維持繁殖させるための飼育法や特性の開発を行ってきた。現在、40種ほどのネズミ類を飼育維持し、共同研究者に無償で分与しているが、これらの中から従来の実験動物には無い新しい特性を有する種類が発見され、研究に供されている。今回は、飼育中のネズミ類を画像で示し、それらの飼育法、特性などを解説する。

マウス凍結配偶子を用いた ICSI

東 貞宏
北里大学 医学部

三菱化学生命科学研究所において2年間科学技術振興調整費「遺伝子資源保存のための生殖工学技術の開発」の助成を受け、配偶子操作による遺伝子改変技術を担当し、卵細胞質内精子注入法 (ICSI) による遺伝子導入を行ってきました。この振興調整費は技術の標準化・人材育成および新たな遺伝子改変技術の開発改良を目指したものであり、人材の育成と新規遺伝子改変を同時並行的に行ってまいりましたので、その結果を中心に時間を追ってお話いたします。

人材育成ということで、新卒の初めての体外受精では培地のキット化(アンプル化)*により、安定的な結果が得られ人的要因は殆ど感じられない高い受精率を最初から得ることができた。しかし、卵子を培養用の培地に導入するための洗浄には長時間を要するため B6C3F1 卵子を用いた場合には顕著な胚盤胞への発生の低下は現れないが、ICR 卵子では明らかに胚盤胞への発生率の低下が観られた。続く、ガラス化凍結でも、キット化保存液を使用することにより、若干不安定さはあるものの殆どの場合、高い生存率を得ることが可能であった。

2ヶ月間で体外受精、胚培養、胚の凍結融解および胚移植等の生殖工学の基盤となる技術を経験した後、ピエゾマイクロマニピュレーター[®]の操作に入り、安定的に ICSI による受精卵が得られるまでに6ヶ月を要し、胚移植による産仔まで発生する2細胞期胚が得られるまでにさらに6ヶ月を要した。その間にも生殖工学の基盤技術のトレーニングを平行して続け、また採卵、精子の採取など複雑な作業と同時にマニピュレーター[®]の操作は困難であったため凍結融解精子と凍結融解未受精卵を ICSI の材料として使用し始めた。まだまだ、安定した ICSI による受精卵の作成はなかなか軌道に乗らなかったが、ある程度産仔に発生する受精卵を得ることが可能になってきた1年4ヶ月経った時点で遺伝子導入を図り、最終的に eGFP を発現するマウスを作成するに至った。これらの結果から考えて生殖工学技術のある程度の技術を習得するには少なくとも2年の歳月を有するものと思われる。

* (株)ダイアヤトロンより市販。

凍結融解マウス精子の受精系における ICSI ならびに ZIP を併用した体外受精の比較
Comparison of fertility between intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and in vitro fertilization (IVF) with a partial zona pellucida incision by using a piezo-micromanipulator (ZIP) in cryopreserved inbred mouse spermatozoa

○川瀬洋介¹・寺社下浩一¹・鈴木宏志²
Yosuke Kawase¹・Kou-ichi Jishage¹・Hiroshi Suzuki²

¹橋中外医科学研究所 薬理・病態研究センター
²帯広畜産大学 原虫病研究センター

¹Pharmacology & Pathology Research Center, Chugai Research Institute for Medical Science, Inc.

²National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

【目的】

マウス精子の凍結保存は、遺伝子改変マウスの系統保存に汎用されつつあるが、C57BL/6J や BALB/c などの近交系に由来する精子における凍結融解後の受精率は極めて低いことが課題となっている。最近、我々は、この問題の克服にはピエゾマイクロマニピュレーターを用いた透明帯部分切開術(ZIP)を併用した体外受精が有効であることを報告した(Kawase *et al.*, 2002)。また、近交系の ICSI の成功についても報告している(Kawase *et al.*, 2001)。本実験では、受精卵子のより効率的な生産の観点から、BALB/cA Jcl ならびに C57BL/6J Jcl マウス凍結融解精子の受精系における、これら assisted reproductive technology (ART)の有効性を比較検討した。

【材料および方法】

精子は成熟雄マウスの精巣上体尾部から採取し、Nakagata & Takeshima の方法(1993)に従い凍結融解を行った。卵子は、成熟雌マウスに過排卵処理を施し、hCG 投与後約 15 時間に採取して、ヒアルロニダーゼ処理によって卵丘細胞の除去を行った。ZIP は、既法(Kawase *et al.*, 2002)に従って行った。つまり、内径約 5 μ m のガラスピペットの先端(blunt-end)を透明帯に軽く触れ、piezo のパルス(speed: 1, intensity: 2)を与えながらピペットを移動させることにより、 $\pi r / 6 \mu$ m の長さの切開を加えた。体外受精は、凍結精子を融解後 TYH 培地で約 0.5 時間インキュベートを行い、この精子懸濁液に ZIP を施した卵子

を移すことによって行った。媒精後 4~5 時間後に、卵子を 100 μ M EDTA 添加 Whitten's 培地に移し換え、媒精後 24 時間における 2 細胞期胚への発生を観察した。ICSI は Kimura & Yanagimachi の方法 (1995) に従って行った。操作は HEPES-buffered Whitten's 培地内で行い、操作中は顕微鏡のステージを約 18°C に冷却した。翌日、2 細胞期胚への発生を観察した。なお、対照として、卵丘細胞を除去していない未操作の卵子を体外受精に供試した。

【結果および考察】

凍結融解精子を用いた ICSI ならびに ZIP を併用した体外受精による 2 細胞期胚への発生率は、BALB/cA ではそれぞれ操作卵子数の 52% および 68% であった。また、C57BL/6J では 43% および 63% であり、両系統ともに ZIP を併用した体外受精の方が ICSI よりも有意に高い成績 ($P < 0.01$) であった。なお、通常の体外受精による 2 細胞期への発生率は BALB/cA、C57BL/6J でそれぞれ 19% および 0% であった。また、操作性の比較を行ったところ、100 個の卵子を処理するのに ICSI では約 200 分要するのに対し、ZIP を併用した体外受精では約 60 分であった。以上、低運動能を呈する凍結融解精子の受精系への ZIP の併用は極めて有効であり、生産性を向上させるものと考えられた。

【文献】

Kawase, Y., Iwata, T., Ueda, O., Kamada, N., Tachibe, T., Aoki, Y., Jishage, K. and Suzuki, H. (2002): Biol. Reprod., 66, 381-385.

Kawase, Y., Iwata, T., Toyoda, Y., Wakayama, T., Yanagimachi, R. and Suzuki, H. (2001): Mol. Reprod. Dev., 60, 74-78.

Nakagata N, and Takeshima T. (1993): Exp Anim 1993; 42:317-320.

Kimura, Y. and Yanagimachi, R. (1995): Biol. Reprod., 52, 709-720.

ハムスター精巣上体精子の凍結保存法の試み

○奥田 泰士・猪股 智夫¹・紫野 正雄・柏崎 直巳
麻布大学 獣医学部 動物繁殖学研究室・実験動物学研究室¹

【目的】ハムスターは、腫瘍学や免疫学の研究などにもちいられる重要な実験動物である。そこで我々は、ハムスター精子凍結保存法の開発に着手した。ハムスターの精子は、精子頭部形状や尾部の長さがラット精子に非常に類似していることから、まず我々のグループが開発したラット精子凍結保存法を適用し凍結を試みたが、融解後に運動する精子をえることができなかった。そこで、精子凍結希釈液に添加する凍害保護物質の検討をおこない、凍害保護効果の認められたacetamide (ACT)とlactamide (LCT)についてさらに検討した。

【方法】ハムスター精巣上体尾部を室温下で 35 mmシャーレに入った 23% egg yolk, 8% lactose 精子凍結一次希釈液中で細切した。この35 mm シャーレのまま 15°Cインキュベーター内にて30分間放置し、さらに5°Cのインキュベーター内にて30分間放置して冷却した。次いで 1.5 Mおよび2.0 M のACTもしくはLCTを含む精子凍結二次希釈液を等量加え、0.5 mlプラスチックストローに封入した。ストローは液体窒素液面から 4 cm 離して10分間予備凍結した後、液体窒素中に投下して凍結した。凍結精子の融解は37°Cの温水中でおこない、融解後ただちに運動精子率を調べた。

【結果】凍結融解直後の運動精子率は、1.5M ACT区で $7.0 \pm 2.6\%$ 、1.5M LCT区で $8.0 \pm 2.6\%$ 、また2.0M ACT区で、 $8.2 \pm 3.8\%$ 、2.0M LCT区 $14.0 \pm 6.1\%$ であった。ACT区では、融解直後の運動精子率はその添加濃度による差は認められなかった。しかしLCTとの凍結では、2.0M LCT区は1.5M LCT区 と比較して有意に ($p < 0.01$) 運動精子率が高かった。

以上の結果から、ハムスター精巣上体精子の凍結において、精子凍結希釈液中の 2.0M lactamide は、1.5M acetamide, 2.0M acetamideおよび1.5M lactamideと比較し、精子に対してより高い凍害保護効果を有することが明らかになった。

マウス卵巣の凍結保存法の開発

右島富士男
北里大学 医学部

組織の凍結保存は組織内の細胞が生存することおよび形態学的構造を維持することが必要最低条件となる。緩慢凍結法はプログラムフリーザーを用いて自由水を脱水し、組織中の細胞内の氷晶形成を防ぐため、細胞外マトリックスに氷晶形成を行わせ組織内構造および機能のある程度犠牲にし、全体としてどれだけ正常組織構造を維持させうるかが成否のかぎとなる。

一方、ガラス化法による組織の凍結保存は凍結操作において氷晶形成を行わないため、組織構造を維持することにおいては緩慢凍結法よりすぐれていると考えられる。しかし、細胞に対しての毒性はガラス化凍結保護剤が緩慢凍結法のものと比較し高いと考えられ、さらに組織内に残された凍結保護剤の影響は、未受精卵や受精卵に対しての影響より量的にそして時間的に大きいと考えられる。したがって、凍結組織の融解時にいかに凍結保護剤を除去するか、また毒性の少ない凍結保護剤を使用するかが重要となる。さらに組織の体積の増加に伴って組織内外の温度変化の影響が組織融解時に形成される氷晶の形成(devitrification)の頻度を増加させてしまうため、現在のところ凍結可能となる組織の体積には限りがある。

一方、生殖工学および生殖医療におけるガラス化法を用いた凍結保存の技術は革命的なものであったことは周知の事実である。卵巣のガラス化凍結保存においても例外ではない。

今回、われわれはN. Nakagataがマウス初期胚用として開発したDAP213を用い、ガラス化法によりマウス卵巣の凍結保存に成功したので報告したい。

CDB における変異マウス作製支援

○宮地 均・中尾和貴
理研、発生・再生科学総合研究センター
変異マウス開発チーム

理化学研究所、神戸研究所、発生・再生科学総合研究センター(CDB)は、高齢化社会に対応するため、動物における発生・再生システムの解明および、細胞治療・組織再生などの再生医療を促進するための、基礎的・モデル的研究を行う研究所として設置された。このセンターにおいて、我々変異マウス開発チームは「先端技術支援・開発プログラム」として、他のチームを支援し、発生・再生現象の基礎科学の多彩な研究と、再生医学につながる技術基盤の開発・支援を行っている。具体的には、マウスにおける発生・生殖工学の技術開発を行い、発生・再生研究に有益な変異マウスを開発している。今の所、各研究者よりマウス遺伝子配列情報の提供を受け、ターゲティングベクター作製からキメラマウス作製までのすべてを、本チームで一貫して行う体制づくりをめざしている。また、キメラマウスから体外受精により表現型解析に必要なヘテロ変異マウスコロニーの速やかな準備、トランスジェニックマウスの作製、マウス胚の凍結保存、動物の Welfare に配慮した飼育管理なども行っている。

昨年(2001年)7月に動物飼育施設の一部稼働による仮オープンを経て2002年8月から本格的に始動した、Animal Facilityの紹介と、我々のチームが行っている変異マウス作製における技術支援を紹介する。

新動物実験施設紹介と動物実験支援グループの現況報告

○後藤元人・渡辺仁美・山田秀一
京都大学ウイルス研究所

京都大学ウイルス研究所・再生医科学研究所ならびに遺伝子研究施設合同の共同動物実験施設が完成し、去る 11 月 12 日に竣工式が行われた。この施設は地下 1 階、地上 5 階建ての総床面積 3700 平米で、内 1620 平米が動物飼育室、750 平米の共同研究室、1330 平米の施設維持管理室からなっている。動物飼育室は 16 室(2-3階が 6 室、4階が 4 室)で、マウス専用の SPF 施設である。各飼育室には 6 台の自動給水可能なクリーンラックが敷設され、各ラックには 42 個のケージが収容可能である。すべて大ケージで 10 匹収容したとすると本施設の動物収容総数は約 40000 匹となる。

この施設には動物飼育に携る人への細かな配慮が施されているとともにバリア施設維持の為、人の作業内容、導線、微生物グレードにも大変熟考されている、また研究者にも使いやすい工夫が各所に施されている。

今回は本施設の紹介と、我々が行っている動物実験支援業務(遺伝子改変動物作製、マウス系統保存、微生物クリーニング等)及び細々に行っている研究活動の一端である C57Bl/6 Sperm 凍結保存法の検討と、**TAT-Cre** 融合タンパクを用いてのコンディショナル TG マウスの作製をご紹介します。