第 35 回　動物生殖工学研究会

テーマ〈受精卵･胚の作製法 全員集合〉

プログラム・抄録集

平成２９年１２月２日（土）

川崎生命科学・環境研究センター（LiSE）　１階会議室

会場案内

川崎生命科学・環境研究センター（LiSE）　１階会議室
http://kawasaki-lise.jp/access.php

※注意※

会場を（公財）実験動物中央研究所の隣にある

川崎生命科学・環境研究センター

に変更しました。

＊来客用駐車場は利用できません。公共交通機関のご利用をお願いします＊

実中研へのアクセスもご参考ください。

https://www.ciea.or.jp/access.php

プログラム

９：３０～９：５５　受付

開会挨拶　会長：横山峯介

一般講演（発表時間一人 15 分：発表 10 分、質疑応答 5 分。
発表開始から 8 分と 10 分と 15 分にベルを鳴らします。）

１０：００～１０：４５　座長：竹尾 透

＊マウス　超過剰排卵　３題＊

１.マウス超過剰排卵誘起法の開発とその応用

〇椋木 歩、須賀原千明、竹尾 透、中潟直己

熊本大学 生命資源研究・支援センター （CARD）資源開発分野

２.DBA/2FG-pcy マウスにおける CARD HyperOva の効果

〇宮川あい、三小田伸之、坂口摩姫、川内 勝

九動株式会社

３.高度免疫不全 NOD/SCID/JAK3^{null} マウスに対する、超過剰排卵誘起法の効果

〇坂口摩姫[1,2]、三小田伸之[1]、宮川あい[1]、岡田誠治[2]

1)九動株式会社、2)熊本大学エイズ学研究センター

１０：４５～１１：１５　座長：安齋政幸

＊マウス　精子　２題＊

４.マウス精子の冷蔵保存に関する研究

〇吉本英高、桐木平小春、武氏志保里、竹尾 透、中潟直己

熊本大学 生命資源研究・支援センター（CARD）資源開発分野

５.マウス精子成熟における遺伝的背景の影響について

〇渡邊仁美、竹田理恵、廣田圭司、近藤 玄

京都大学 ウイルス・再生医科学研究所

１１：１５～１１：２５　休憩

１１：２５～１２：２５　　座長：宮地 均

＊マウス　業務　４題＊

６.動物実験施設におけるマウス SPF 化について

〇山根知恵美、庫本高志、浅野雅秀

京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設

７.CARD におけるマウスの体外受精法

〇 中牟田裕子、山下紀代子、近藤朋子、竹下由美、石田恵理、岩本まり、
高橋 郁、坂口香織、坂本 亘、中川佳子、土山修治、竹尾 透、中潟直己

熊本大学生命資源研究・支援センター（CARD）資源開発分野

８.北里大学医学部におけるマウスの体外受精とその成績

〇阿部真悟[1]、久保地誠司[1]、佐藤 貴文[1]、梶原 雄也[1]、高橋　晃[1]、佐藤　俊哉[2]、大久保 直[2]、東 貞宏[2]

1)北里大学医学部遺伝子高次機能解析センター、2)北里大学医学部実験動物学

９.生殖・発生工学技術を用いた研究支援

〇清成 寛[1,2]、井上健一[1]、阿部高也[1,2]、金子麻里[1,2]、繁田麻世[1]、白石亜紀[1]、佐藤美帆[1]、古田泰秀[1,2]

1)理研 CLST 生体モデル開発ユニット、2)生体ゲノム工学研究チーム

１２：２５～１２：３０　休憩およびランチョンセミナー準備

１２：３０～１２：５０　ランチョンセミナー

生殖工学関連試薬の品質保障について

〇三小田伸之　九動株式会社

先着１００名分の昼食（おにぎり３個＋麦茶）を用意する予定です。

１２：５０～１２：５５　休憩および総会準備

１２：５５～１３：１５　総会

１３：１５～１４：００　　座長：清成 寛

＊マウス　ゲノム編集　３題＊

10. CRISPR/Cas システムによるノックインマウス作製

〇宮地 均[1]、北野さつき[1]、伊藤克彦[2]、生田宏一[1]

1)京都大学ウイルス・再生医科学研究所、2)京都大学大学院医学研究科

11.CRISPR-Cas システムを用いたノックインマウス作製における
凍結受精卵培養時間の検討

〇中川佳子[1]、佐久間哲史[2]、西道教尚[3]、横崎泰之[3]、近藤朋子[1]、竹下由美[1]、
中牟田裕子[1]、石田恵理[1]、坂本亘[1]、土山修治[1]、竹尾透[1]、山本卓[2]、中潟直己[1]

1)熊本大学生命資源研究・支援センター（CARD）　資源開発分野

2)広島大学大学院理学研究科　数理分子生命理学専攻　分子遺伝子学研究室

3)広島大学保険管理センター インテグリン治療開発フロンティア研究室

12.CRISPR/Cas9 システムを用いたエレクトロポレーション法による
遺伝子改変マウスの作製

〇佐藤貴文[1],阿部真悟[1],久保地誠司[1],梶原雄也[1],佐藤俊哉[2],東貞 宏[2],大久保 直[2]

1)北里大学医学部遺伝子高次機能解析センター,2)北里大学医学部実験動物学

１４：００～１４：１０　休憩

１４：１０～１５：４０　　座長：中務 胞、日野千紘

＊ラット　６題＊

13.ラット受精卵の採取

〇江藤智生

公益財団法人実験動物中央研究所

14.再現性のあるラット体外受精法を目指して

〇金井富三夫[1]、多田昇弘[2]

1)順天堂大学　老研・遺伝子解析研、2)順天堂大学　疾患モデル研究センター

15.ラットの過排卵処理・体外受精について

〇日野　千紘

旭川医科大学　教育研究推進センター　動物実験技術支援部門

16.ラットにおける CARD IASe を用いた過排卵処理と体外受精・体内受精
および胚の凍結保存・移植
○中務　胞[1]、中潟　直己[2]、夏目　里恵[1]、﨑村　建司[1]
1)新潟大学 脳研究所 細胞神経生物学分野
2)熊本大学 生命資源研究・支援センター動物資源開発研究施設(CARD)・資源開発分野

17.ラットの過排卵および遺伝子改変
◯田中貴雄[1]、長谷川靖洋[2]、神田由紀[1]、本村翔[1]、三浦義記[1]
1)株式会社ケー・エー・シー　バイオサイエンス事業部　受託試験部
2)アスビオファーマ株式会社　創薬技術ファンクション

18.ラットのゲノム編集効率に及ぼす Cas9 nuclease のデリバリー方法の影響
◯後藤哲平[1]、余郷享子[1]、保地 眞一[2]、平林真澄[1]
1)生理学研究所、2)信州大学

１５：４０～１５：５０　休憩

１５：５０～１６：５０　　座長：外丸祐介、山城秀昭

19.野生アカネズミにおける抗インヒビン血清投与による過排卵誘起の検討
○目黒栞奈[1]、伊藤洵[1]、小松一樹[1]、大平拓也[1]、澤渡綾乃[2]、中潟直己[3]、
中田章史[4]、三浦富智[5]、山城秀昭[2]
1)新潟大院自然研、2)新潟大農、3)熊本大 CARD、4)北薬大薬、5)弘前大院保健

20.シリアン・ハムスター卵子の顕微授精（ICSI）：採卵時間と ICSI 後の前核形成と胚発生
◯堀内俊孝、大内茉湖、森下奈美
県立広島大学 大学院 総合学術研究科

21.スンクス凍結胚からの個体復元の試み
○後藤元人、高橋利一
公益財団法人 実験動物中央研究所 動物資源基盤技術センター

22.ウサギにおける効率的な受精卵作製の試み

◯松久葉一[1]、秋吉俊明[1]、松尾　完[1]、塩見雅志[2]、森本正敏[3]、北嶋修司[1]

1)佐賀大学総合分析実験センター、2)神戸大学医学部附属動物実験施設、

3)福岡女学院看護大学

１６：５０～１７：００　休憩

１７：００～１７：４５　　座長：外丸祐介、山城秀昭

23.コモンマーモセット生殖工学における効率化にむけた取り組み

◯黒滝　陽子[1]、佐々木　えりか[1,2]

1)実験動物中央研究所、2)慶應義塾大学

24.サル類の体外培養系受精卵の作製について

◯外丸祐介[1]、信清麻子[1]、岡本宗裕[2]

1)広島大学自然科学研究支援開発センター、2)京都大学霊長類研究所

25.ヒト ES 細胞から始原生殖細胞への分化誘導法

◯小林俊寛[1,2]、平林真澄[2]、Ramiro Alberio[3]、Azim M Surani[1]

1)ケンブリッジ大学 ガードン研究所、

2)自然科学研究機構 生理学研究所 行動・代謝分子解析センター、

3)ノッティンガム大学

閉会挨拶　　副会長：浜野晴三

１８：００～２１：００　懇親会

会場：(公財) 実験動物中央研究所　１階・レクチャールーム

1.マウス超過剰排卵誘起法の開発とその応用

○椋木 歩、須賀原千明、竹尾 透、中潟直己
熊本大学生命資源研究・支援センター（CARD）資源開発分野

実験用マウスは、生命科学研究において遺伝子機能の解明やヒト疾患の克服に貢献する重要な研究資源である。生殖工学技術は、効率的なマウスの作製、保存および輸送に使用され、研究資源の有効利用において必要不可欠な技術になっている。生殖工学技術において、大量に採取可能である精子に比べ、卵子は１個体から得られる数が限られているため、多くの卵子獲得を可能にする過剰排卵誘起法の開発が重要な研究課題となっている。近年、私たちは卵巣内の顆粒膜細胞から分泌され、脳下垂体からの卵胞刺激ホルモン（follicle stimulating hormone; FSH）の分泌を抑制するインヒビンに着目し、インヒビンに対する中和抗体（Inhibin antiserum; IAS）と外因性卵胞刺激ホルモンであるウマ絨毛性性腺刺激ホルモン（eCG）を同時投与することで１匹から大量の卵子を得る技術（超過剰排卵誘起法）の開発に成功した。超過剰排卵誘起法は、少数のマウス個体からの効率的な繁殖や卵子ドナーとして使用する雌マウスの個体数を減らすことが可能であることから、実用性が高いだけではなく、動物愛護の観点からも望ましい技術である。本研究では、本技術を活用した雌性遺伝資源である卵子の効率的な凍結保存法の開発を目指し、超過剰排卵由来卵子のガラス化/加温後の生存率、体外受精における受精率、胚移植後の産子への発生率を評価した。卵子および精子は、C57BL/6J 系統の幼若雌および成熟雄マウスから採取した。卵子は、eCG あるいは IAS と eCG の混合溶液（IASe）を投与した後、48 時間後にヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG）を投与し採取した。続いて、卵丘細胞を除去した後、簡易ガラス化法にて卵子を凍結保存した。卵子を加温後、生存率を評価した後に、各濃度（0-1.0 mM）の N-acetyl-L-cysteine（NAC）を含有した受精培地に卵子を導入し、体外受精にて受精能を評価した。得られた２細胞期胚は、体外培養およびレシピエントへ移植を行うことで、その発生能を評価した。IASe 投与区において、排卵卵子数および凍結可能卵子数は、eCG 単独投与区のそれらに比べ、有意に増加した。また、凍結保存した卵子の生存率は、eCG 由来卵子と同等であった。さらに、体外受精における受精率は、NAC により上昇した。また、体外受精により作製された２細胞期胚は、胚盤胞期胚あるいは産子へと発生した。以上の結果から、超過剰排卵誘起法由来卵子は、簡易ガラス化法による凍結保存が可能であり、遺伝子改変マウスの雌性遺伝資源の効率的な保存とそれら凍結卵子を用いた臨機応変な体外受精へ利用できることが示された。

2.DBA/2FG-pcy マウスにおける CARD HyperOva の効果

〇宮川　あい、三小田　伸之、坂口　摩姫、川内　勝
九動株式会社

【目的】DBA/2FG-pcy マウス(以下、PCY マウス)は多発性嚢胞腎症を自然発症するミュータントマウスである。以前我々は、自然交配による出産効率と胚移植による出産効率を比較検討し、胚移植による生産効率が高いこと、また、intact 胚における産仔発生率は、凍結胚と比較して、高値を示したことを報告した。近年、超過剰排卵誘発剤(CARD HyperOva®)を使用し、1 匹のマウスから 100 個以上の卵子が得られる方法が確立された。（Takeo and Nakagata,PLoS ONE,2015）そこで PCY マウスにおける CARD HyperOva®の効果を検討した。

【方法】PCY 雌マウス 4 週齢、10 週齢、19 週齢に CARD HyperOva®を 0.2ml 投与し、その後約 48 時間後に hCG（ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン）を 0.2ml 投与した。一方、PMSG（妊馬血清性性腺刺激ホルモン）を PCY 雌マウス 4 週齢、10 週齢、19 週齢に 0.2ml 投与し、その後約 48 時間後に hCG を 0.2ml 投与した。hCG 投与して 15-17 時間後に CARD MEDIUM®（高性能体外受精用培地）、FERTIUP®（マウス精子前培養培地）を用いて体外受精を施し、24 時間後、2 細胞期胚を得て、それぞれの体外受精率を算出した。また、今回は PCY 雌マウス 4 週齢、19 週齢の intact 胚の胚移植を行った。

【結果および考察】PCY 雌マウス 4、10、19 週齢において CARD HyperOva®投与群の平均排卵数は、PMSG 投与群の平均排卵数より有意な増加を示した。また、PCY 雌マウス 4 週齢において CARD HyperOva®投与群の体外受精率は PMSG 投与群の体外受精率より低値を示した。10 週齢、19 週齢において CARD HyperOva®投与群の体外受精率は PMSG 投与群の体外受精率と同等であった。さらに、4 週齢と 19 週齢より得られた 2 細胞期胚をそれぞれ胚移植したところ、両週齢において CARD HyperOva®投与群の 2 細胞期胚の産仔発生率は PMSG 投与群の 2 細胞期胚の産仔発生率と同等であった。今後、他の系統および週齢で比較し、CARD HyperOva®の効果を検討していく予定である。

3.高度免疫不全NOD/SCID/JAK3^{null} マウスに対する、超過剰排卵誘起法の効果

○坂口　摩姫[1,2]、三小田　伸之[1]、宮川　あい[1]、岡田　誠治[2]
1）九動株式会社、2）熊本大学エイズ学研究センター

【目的】NOD/Scid/JAK3^{null}（NOJ）マウスは、JAK3欠損マウスにNOD/SCIDマウスを10世代交配して作製された系統であり、従来の免疫不全動物よりも免疫機能が低下している高度免疫不全動物である。このNOJマウスは、ヒトに特異的な感染症の研究や、癌研究などヒト疾患研究に使用されているが、自然交配による繁殖効率が低く、繁殖が困難であった。しかし、体外受精および胚移植により、繁殖効率を改善することができた。近年、超過剰排卵誘起法において多くの卵子を得られることが明らかとなっていることから(Takeo and Nakagata , PLOS ONE, 2015)、本研究では、超過剰排卵誘起法を用いることで、排卵数を増やし、凍結保存に適しているかを確認することで、更に高度免疫不全動物の繁殖効率を上げることを目的とした。

【方法】ビニールアイソレーター中で生産されたNOJ雌マウス10-12週齢を用い、超過剰排卵誘起剤(CARD HyperOva®）投与群、7.5IUの妊馬血清性性腺刺激ホルモン(PMSG)投与群を設けた。両群共48時間後に7.5IUヒト繊毛性性腺刺激ホルモン(hCG)を投与した。hCG投与から15-17時間後に、安楽死させた雌マウスから採取した卵子をCARD MEDIUM®高性能体外受精用培地中に導入した。一方、精子は、NOJ雄マウス10-15週齢の精巣上体尾部から採取し、FERTIUP®マウス精子前培養培地中で1時間前培養後、卵子を含む体外受精培地中に導入した。翌日、排卵数および受精率を算出した。得られた2細胞期胚は、高度免疫不全対応偽妊娠ICRマウスに胚移植を行い、両群での比較を行った。更に、凍結および融解処置を施した2細胞期胚を用いた胚移植法での両群での産仔発生率の比較と、凍結および融解処置を施さない2細胞期胚(intact胚)を用いた場合の両群での産仔発生率の比較も行った。

【結果および考察】超過剰排卵誘起剤を用いることで、PMSG投与群に比べ、多くの2細胞期胚を得ることができた。産仔発生率は、両群で同等程度であった。また、intact胚および凍結胚の産仔発生率の比較においても、ほとんど差は見られなかった。これより、超過剰排卵誘起法を用いることでNOJマウスを含む高度免疫不全動物を更に効率的に作出することが可能であると考えられた。

4. マウス精子の冷蔵保存に関する研究

○吉本英高、桐木平小春、武氏志保里、竹尾 透、中潟直己
熊本大学 生命資源研究・支援センター (CARD) 資源開発分野

【目的】精子の冷蔵保存技術は、遺伝子改変マウスの生体輸送に替わる簡便な輸送法として応用が期待されている。マウス精子は、低温保存 (4°C) に対して感受性が高く、その受精能は保存時間の延長に伴って急激に低下する。近年、私達は、マウス冷蔵精子に methyl-β-cyclodextrin (MBCD) を処理することで、生体膜流動性を増加させ、冷蔵精子の受精能が向上することを報告した (Yoshimoto *et al*., ***Biol Reprod***., 2017)。一方で、冷蔵精子の国際輸送を想定した場合、輸送中のトラブルや通関の遅延などの理由で輸送時間が延長することが懸念され、保存可能期間の更なる延長が求められている。そこで本研究では、精子の長期生存を可能にする新規冷蔵保存液の開発を目的として、低温保護作用を有する quercetin 及びその溶剤である dimethyl sulfoxide (DMSO) に着目し、冷蔵精子の受精能、運動能、及び産子への発生能に及ぼす影響を検討した。さらに、quercetin 及び DMSO が、冷蔵精子におけるミトコンドリア膜電位の正常性 (ミトコンドリア活性)、受精能獲得時に起こるタンパク質リン酸化に及ぼす影響を検討した。

【方法】精子及び卵子は、C57BL/6 マウスの成熟雄及び雌マウスから採取した。雄マウスから採取した精巣上体尾部を各種冷蔵保存液 (Lifor、DMSO 含有 Lifor または quercetin 及び DMSO 含有 Lifor) 中で 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 または 11 日間冷蔵保存した。続いて、冷蔵保存した精巣上体尾部から採取した精子を、MBCD を含有した精子前培養培地 (Toyoda Yokoyama Hoshi medium, TYH) 中で前培養した。一方、卵子は雌マウスから採取し、reduced glutathione を含有した体外受精培地 (modified human tubal fluid, mHTF) 中に導入後、前培養した冷蔵精子と共培養した。媒精の翌日、二細胞期へ発生した胚をレシピエントマウスに移植した。冷蔵精子の運動性は、精子運動能解析装置 (HTM-IVOS) を用いて解析した。また、冷蔵精子のミトコンドリア活性は、JC-1 染色にて評価した。さらに、冷蔵精子のタンパク質リン酸化を、western blot 法にて評価した。

【結果】quercetin 及び DMSO は冷蔵精子の運動能及び受精能を 10 日間以上に渡り、高率に保持させることが可能であった。また、quercetin 及び DMSO 処理した冷蔵精子から得られた２細胞期胚は、正常な産子に発生した。さらに、quercetin 及び DMSO は、前培養に伴う精子ミトコンドリア活性の低下を抑制するとともに、冷蔵精子におけるタンパク質リン酸化を促進した。

【考察】以上、quercetin 及び DMSO の保護効果により、冷蔵精子の受精能及び運動能を高率に保持させることに成功した。さらに、冷蔵精子における quercetin 及び DMSO の強力な冷蔵保護作用は、精子中片部のミトコンドリアに対する quercetin の保護作用が影響していることが示唆された。本知見は、遺伝子改変マウスの国際輸送における技術的障壁を克服し、遺伝子改変マウス研究の国際的な支援に貢献するものである (Yoshimoto et al., ***Biol Reprod***., iox144, https://doi.org/10.1093/biolre/iox144)。

5.マウス精子成熟における遺伝的背景の影響について

○渡邊　仁美、竹田　理恵、廣田　圭司、近藤　玄
（京都大学　ウイルス・再生医科学研究所）

哺乳類精子は射出直後には受精能を持たないが、段階的な精子成熟過程を経ることで受精能を獲得することが知られている。先行研究において受精能獲得過程にある精子の膜表面では GPI アンカー型タンパク質（GPI-AP)遊離とラフトの局在変化が連動して起こり、これが受精に重要な反応であることを見出した。本研究では、実験用近交系マウスで妊孕性に差がある C57BL/6 系統と BALB/c 系統に着目し、2 系統間の精子受精能獲得過程における分子挙動を比較し、受精能との相関を検討した。**【材料と方法】** １）受精能獲得誘導による GPI-AP 遊離の観察：精子受精能獲得の誘導物質である Methyl-β-cyclodextrin を培養液に加え、EGFP-GPI 遊離の観察を行った。２）精子受精能獲得誘導に伴うラフトの動きの観察:同精子を蛍光標識したコレラトキシン B フラグメントにより染色し、GM1 の挙動を観察した。３）精子奇形率の測定。４）先体反応の観察:Izumo1 の免疫染色を行い、先体反応の進行を観察した。５）精子膜からのコレステロール遊離の測定： filipin で精子を染色し、FACS を用いて、コレステロール遊離の観察を行った。６）体外受精率と産仔率の測定。７）同一場での受精能の比較:両系統の精子を様々な比率で混合して体外受精を行い、偽妊娠マウスに全ての受精卵を移植し、得られた産仔の眼色から両系統精子の優位性とその度合を測定した。８）体内における GPI-AP 遊離とラフトの動きの観察：BALB/c Tg 雄マウスを野生型雌マウスと交配し、卵透明帯に接着した精子の GPI-AP 遊離の有無とラフトの挙動を観察した。**【結果】**<u>GPI-AP 遊離</u>：両系統ともに GPI-AP 遊離が同じ程度に見られ、有意な差はなかった。<u>ラフトの局在変化</u>：C57BL/6 では、ラフトの局在変化が見られたが、BALB/c はほぼ見られず、統計学的有意差が認められた。<u>奇形精子</u>：C57BL/6 の奇形精子率は 3.5%であったが、BALB/c 系統の奇形精子率は 21%であり、統計学的有意差がみられた。<u>先体反応</u>：両系統間で有意な差は見られなかった。<u>コレステロール遊離</u>：両系統間で、コレステロール遊離に有意な差は見られなかった。<u>体外受精率</u>:C57BL/6 の体外受精率は 80.5%であったが、BALB/c 系統では 39.3%であり、統計学的有意差がみられた。<u>同一場での受精能の比較</u>：両系統精子の受精能の違いを詳細に比較するため、同一の体外受精培養液に両系統精子を混合して体外受精を行なった。その結果、BALB/c 精子を C57BL/6 に対して９倍量加えないと同等以上の受精が成立しないことがわかった。<u>雌体内での BALB/c　精子の GPI-AP 遊離およびラフトの動きの局在変化</u>：　C57BL/6 精子は、90%以上の精子が EGFP-GPI 遊離と GM1 分布が頭部全体型を示した。BALB/c では、90%近くの精子で GPI-AP 遊離が見られたが、ラフト局在変化は 17.9%の精子でしか認められなかった。**【考察】**本研究で、我々は新たに、両系統間で受精能獲得過程でのラフトの可動性の違いを見出し、この現象と体外受精能との相関を示唆した。

6. 動物実験施設におけるマウス SPF 化について

○山根　知恵美、庫本　高志、浅野　雅秀
（京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設）

【目的】当施設は、年間利用者延べ約 10 万人、マウスの SPF 領域最大収容数 14,600 ケージで、医学研究科内の約 60 講座の共同利用研究施設として利用されている。施設内の研究支援として、利用者の依頼により、国内外の研究機関から導入される実験用マウスの微生物学的クリーニング（SPF 化）を行っている。当施設のマウス SPF 化業務は、2006 年に受講した「実験動物関係教職員高度技術研修」（熊本大学主催）を基に行っており、本発表では、過去 6 年間（2011 年 4 月～2017 年 3 月）における SPF 化の詳細と実績について紹介する。

【方法】SPF 化は、生体、凍結胚、あるいは凍結精子を用いて行った。生体を用いた SPF 化の手順は、マウスの受入れに始まり、ホルモン処置後、主に体外受精による受精卵作製を行い、2 細胞期胚をレシピエントの卵管へ胚移植、妊娠、出産、哺乳、離乳を経て、微生物検査後の引き渡しで完了する。また、凍結胚・凍結精子を用いた SPF 化は、施設ごとに胚・精子の凍結方法が異なるので、全ての依頼について胚・精子の融解プロトコールを入手して、そのプロトコールに沿って融解を行った。凍結胚は、融解後その日のうちにレシピエントの卵管へ胚移植を行った。凍結精子は、融解後、体外受精による受精卵作製を行い、翌日、2 細胞期でレシピエントの卵管へ胚移植を行った。その後は、生体の場合と同様である。微生物検査は、レシピエントを学外の機関で検査することによって行った。このような SPF 化の作業は、施設内で微生物汚染事故が発生した場合や産子を得ることが困難なマウスの繁殖に対しても同様に実施した。

【結果と考察】過去 6 年間の SPF 化の実績は 860 件であり、その内訳は、生体 629 件（73%）、凍結胚 189 件（22%）凍結精子 42 件（5%）であった。生体での体外受精率は平均 87%、その産仔率は平均 48%、凍結胚の融解率は平均 81%、その産仔率は平均 30%、また、凍結精子の体外受精率は平均 68%、その産仔率は平均 58%であった。実施期間については、生体を用いた SPF 化は平均 72 日、凍結胚からの SPF 化は平均 61 日、凍結精子からの SPF 化は平均 67 日であった。特に微生物汚染事故の場合には、実験の中断を短期間で終えられるようスピードが求められた。このような要望に応えることは、最大の研究支援であると同時に、自らの技術の質を高めることに繋がった。

7.CARDにおけるマウスの体外受精法

○ 中牟田裕子、山下紀代子、近藤朋子、竹下由美、石田恵理、岩本まり、
高橋 郁、坂口香織、坂本 亘、中川佳子、土山修治、竹尾 透、中潟直己
熊本大学生命資源研究・支援センター（CARD）資源開発分野

生殖工学技術は、遺伝子改変マウス研究の効率化に極めて有用であり、これまでに当センターマウスバンクにおいて、遺伝子改変マウスを中心に約2,500系統について体外受精を行なってきた。体外受精にはさまざまな種類の精子を使用しており、当センターでは新鮮精子、冷蔵精子、凍結精子および海外から送られてくる凍結精子を使用し、様々な依頼に応じて胚作製を行なっている。また、最近では抗インヒビン抗体を使用した超過剰排卵誘起法を用いて体外受精を行い、効率的に受精卵を作製している。
そこで本発表では当センターで行なっている種々の体外受精法について紹介する。

【新鮮精子を用いた体外受精】
eCGもしくはIASe(inhibin antiserum +eCG)とhCGにより過排卵処理を行なった雌マウスの卵管膨大部から卵子卵丘複合体を採取し、CARD MEDIUMマウス体外受精用培地中に導入する。一方、精子は、雄マウスの精巣上体尾部から採取し、採取した精子をFERTIUP®マウス精子前培養培地中で1時間前培養し、卵子卵丘複合体を含む体外受精培地中に導入する。

【冷蔵精子を用いた体外受精】
冷蔵保存・輸送された精巣上体尾部から精子を採取し、採取した精子をFERTIUP®マウス精子前培養培地中で1時間前培養する。その後、卵子卵丘複合体を含む体外受精培地中に導入する。

【凍結精子を用いた体外受精】
FERTIUP®マウス精子凍結保存液を用いて凍結された精子ストローを 37℃の恒温槽中に10 分間静置することで融解、精子懸濁液を FERTIUP®マウス精子前培養培地のドロップに添加し、30分前培養後、卵子卵丘複合体を含む体外受精培地中に導入する。

【CARDレスキュー法を用いた体外受精】
本法は、主に海外から送られてくる凍結精子を対象に実施している。すなわち、凍結精子を含む凍結ストローもしくはチューブを37℃の恒温槽中に10分間静置することで融解し、精子懸濁液を 1.5mL チューブに導入、mHTF をゆっくりと加えた後に遠心を行う(300G, 5min)。続いて、上清を除去後、チューブ内にFERTIUP®マウス精子前培養培地を70μL添加、軽くピペッティングした後、FERTIUP®マウス精子前培養培地のドロップに添加し、30分間前培養する。その後、CARD MEDIUMマウス体外受精用培地中で60分間前培養した卵子を前培養した精子懸濁液のドロップに導入することにより、媒精を行なう。

なお、各体外受精法で得られたデータについては、当日の発表で詳細に報告する。

8.北里大学医学部におけるマウスの体外受精とその成績

◯阿部真悟[1],久保地誠司[1],佐藤貴文[1],梶原 雄也[1],高橋 晃[1],
佐藤俊哉[2],大久保 直[2],東 貞宏[2]
1)北里大学医学部遺伝子高次機能解析センター,2)北里大学医学部実験動物学

【背景】北里大学医学部付属遺伝子高次機能解析センター（センター）では，他施設で作られたトランスジェニック動物やノックアウト動物等の SPF エリアへの導入は例外なく体外受精-胚移植により行なっている．また系統保存のための胚の凍結保存を行う際にも体外受精を行なって受精卵を作り 2 細胞期で凍結保存している．今回我々は，施設開設時から施設の業務として行なってきた体外受精とその成績を報告する．

【方法】当センターでは定法に従い体外受精を行なっている．培地を覆うためのミネラルオイルは Whitten 培地で前もって洗浄したものを用い，体外受精には TYH 培地，受精卵の培養には Whitten 培地を自作して使用している．培地の準備は，体外受精の前日に融解し，BSA を添加後，200μl ずつ分注，ミネラルオイルで覆いインキュベーター内に静置．実際の体外受精は，実験当日，12 週齢以上の雄マウスの精巣上体尾部より精子を採取し，TYH 培地で 1.5～2 時間前培養，倒立顕微鏡で生存率を確認，血球計算盤で精子数を算出し，懸濁液の添加量を決める．過排卵処理は基本的に PMSG と hCG 5～7.5 IU を 48 時間間隔で投与し hCG 投与後，15～16 時間に採卵している．また昨年度より C57BL/6 系統や使用可能な雌の数が少ない体外受精の場合，CARD HyperOva®を使用している．授精は，最終精子濃度が 150 sperm/μl になるように受精用 TYH 培地に精子懸濁液を添加して行っている．主にバックグラウンド系統が C57BL の場合，採卵と受精の場となる TYH 培地については，dish 作製時にカルシウム濃度を２倍に増やしている．精子添加後 4～6 時間に Whitten 培地で卵子の洗浄を行い，倒立顕微鏡で受精を判定．翌日，2 細胞期へ発生した胚を卵管移植または凍結保存している．

【結果】2004 年 1 月～2017 年 7 月までに依頼を受けた体外受精は 321 件，そのうち受精卵が得られなかったのは運動精子の得られなかった 1 例であった．概ね，行なった体外受精で動物の施設への導入ができ，うち 211 件（65%）で 80%以上の受精率が得られた．また，供試した卵子の総数は 180,322 個で，受精卵は 148,140 個(81,6%)，多精子受精卵は 3,410 個(2,4%)であった．昨年度より使用した HyperOva®により C57/BL 系統から得られる卵子の数は，それまでの PMSG-hCG 処理による１個体当たり 17.7 が，35.6 個と格段に多く HyperOva®が非常に有用であることが確認できた．

9.生殖・発生工学技術を用いた研究支援

○清成 寛[1,2]、井上健一[1]、阿部高也[1,2]、金子麻里[1,2]、
繁田麻世[1]、白石亜紀[1]、佐藤美帆[1]、古田泰秀[1,2]
1)理研 CLST 生体モデル開発ユニット、2)生体ゲノム工学研究チーム

我々はこれまで生殖・発生工学技術を駆使したマウスの研究支援を行ってきた。体外受精によるマウス系統保存、生産、クリーニングに始まり、国内外のアカデミックな研究者を対象とした遺伝子改変マウスの作製支援を広く展開し、これまでに 2,000 系統以上の遺伝子改変マウスを作製した。

この支援活動を通して、高い生殖細胞分化能をもつ C57BL/6 由来の ES 細胞の樹立、及び本 ES 細胞を用いた遺伝子改変マウス作製を一般化する事ができ、更には当該 ES 細胞の特性を利用した新たな表現型解析方法を開発した。

また、近年遺伝子改変マウスの新たな作製手法として急速な発展を遂げている CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集についても着手しており、遺伝子破壊や point mutation などはもちろん、ノックインについても良好な結果が得られている。

本研究会においては、これまでの我々の研究支援活動について紹介すると共に、ゲノム編集による遺伝子改変マウス作製法など、技術基盤開発についても併せて紹介する。

ランチョンセミナー

生殖工学関連試薬の品質保障について

〇三小田　伸之
九動株式会社　技術開発部

［要旨］
弊社では、2000 年より生殖工学に使用される試薬を製造、販売しております。弊社が行っております品質保証項目について御紹介させていただきます。

［内容］
マウスに関する生殖工学関連試薬を製造および販売するにあたり、次の 2 点に注力して、品質保証を行っております。
１．生殖工学に供与する試薬の性能保証に関する検査
２．微生物学的検査

［試薬一覧］
上記試験を、以下の試薬について行っております。
mHTF 培地、KSOM 培地、1M DMSO 培地、DAP213 培地、0.25M Sucrose 培地、
FERTIUP マウス精子凍結保存液、FERTIUP マウス精子前培養培地、
CARD MEDIUM マウス体外受精用培地、CARD HyperOva マウス過剰排卵剤

以上

10.CRISPR/Cas システムによるノックインマウス作製

〇宮地　均[1]、北野さつき[1]、伊藤克彦[2]、生田宏一[1]
1）京都大学ウイルス・再生医科学研究所、2）京都大学大学院医学研究科

CRISPR/Cas9 システムはマウスを始め他の種においても多くの成果を上げており、ゲノム編集技術の主流となっている。

これまで我々は、京都大学ウイルス・再生医科学研究所附属感染症モデル研究センターのサービスとして、CRISPR/Cas9 システムを用いて、遺伝子編集マウスの作製を行ってきた。RNA や Cas9 タンパクを用いる方法も行なっているが、今は主に Mashiko ら（2013）（伊川研）の方法に準じて実施している。具体的には Addgene から入手したプラスミド px330 に標的配列を挿入し、最終濃度 5ng/uL または 10ng/uL に調製し環状でマウス受精卵の前核に倒立顕微鏡下でインジェクションを行なっている。この方法で標的部位ゲノムの単純欠損を持つマウスは、効率良く作製する事が可能であった。また、同時に合成塩基配列をインジェクションする事で、２−３塩基の置換（アミノ酸の点変異）を持つマウスも、比較的効率良く作製する事が可能であった。一方、数十塩基配列を標的部位にノックインさせたマウスは、上記に比べ頻度が低い傾向にあるが、作製可能であった。しかし、数キロベースの塩基配列を、標的部位にノックインさせる事はかなり難しい状況であった。

最近、我々はようやく数キロベースの塩基配列を、標的部位にノックインさせる事に成功した。まだ成功例は少ないが、今回の紹介が、ゲノム編集マウス作製の参考になれば幸いである。

11.CRISPR-Cas システムを用いたノックインマウス作製における凍結受精卵培養時間の検討

〇中川佳子[1]、佐久間哲史[2]、西道教尚[3]、横崎泰之[3]、近藤朋子[1]、竹下由美[1]、中牟田裕子[1]、石田恵理[1]、坂本亘[1]、土山修治[1]、竹尾透[1]、山本卓[2]、中潟直己[1]

1)熊本大学生命資源研究・支援センター（CARD） 資源開発分野

2)広島大学大学院理学研究科　数理分子生命理学専攻　分子遺伝子学研究室

3) 広島大学保険管理センター インテグリン治療開発フロンティア研究室

【目的】遺伝子改変マウスを利用した研究は世界中で行われており、効率的な遺伝子改変マウスの作製は、各研究機関において重要な課題である。私たちは、超過剰排卵誘起法、体外受精、受精卵の凍結保存などの生殖工学技術とゲノム編集技術を用いることにより、効率的な遺伝子改変マウスの作製が可能であることを報告した(Nakagawa *et al.*, 2016)。しかしながら、ノックインマウスの作製効率は、ノックアウトマウスの作製効率ほど高率ではなく、ノックインマウスの作製効率を改善することは主要な課題であった。そこで、本研究では、凍結受精卵の加温後の培養時間がノックインマウス作製効率に及ぼす影響について調べた。

【方法】CRISPR-Cas システムと 1 本鎖オリゴヌクレオチドおよび PITCh (Precise Integration into Target Chromosome) システムを用いたノックインマウスの作製を試みた。体外受精後、凍結保存した受精卵を加温、培養後、異なるタイミングでマイクロインジェクションを行い、ノックインマウスの作製効率が異なるか否かを検討した。

【結果と考察】マイクロインジェクションを行うまでの受精卵の培養時間を変えることにより、ノックインマウスの作製効率に差異が生じた。そのため、本研究は、ノックインマウスを作製する際の有用な知見を提供できると考える。

12.CRISPR/Cas9 システムを用いたエレクトロポレーション法による遺伝子改変マウスの作製

○佐藤貴文[1],阿部真悟[1],久保地誠司[1],梶原雄也[1],佐藤俊哉[2],東 貞宏[2],大久保 直[2]
1)北里大学医学部遺伝子高次機能解析センター,2)北里大学医学部実験動物学

【目的】近年，ゲノム編集技術の開発が急加速で進展している．なかでも，CRISPR／Cas9 システムはとても簡便な方法であり，さらに高効率にゲノム編集を成功させる手法として多様な基盤に適用され，遺伝子改変マウスの作製にも応用されている．実際のゲノム編集動物の作製は，マウス前核期卵子へマイクロインジェクション法または，エレクトロポレーション法により guideRNA (gRNA)と Cas9 mRNA，あるいは Cas9 protein の混合溶液を導入して行われている．我々は主に，一度に大量の前核期卵子を操作できるエレクトロポレーション法を用いて，簡易で，且つ効率的なマウスのゲノム編集動物の作製方法を検討し若干の知見が得られたのでその結果を報告する．

【方法】実験には，変異が導入されると四肢の形成異常を示す Fgf10 に対する gRNA と Cas9 mRNA または Cas9 protein を使用した．エレクトロポレーションは，CUY EDITⅡ（BEX 製）を用い，30V;3msec ON-97msec OFF×7 にパルス条件を固定して行なった．実験 1 は、ICR 同士で自然交配した卵子に gRNA 100ng／μl と Cas9 mRNA 200ng／μl を同時に添加した混合溶液でエレクトロポレーションを行なった．実験 2 は，体外受精後 DAP213 で凍結した B6C3F1 卵子を融解後 3 時間に gRNA 200ng／μl と Cas9 mRNA を 100ng／μl で混合した溶液により印加実験を行なった．実験 3 では、Cas9 を mRNA から protein に置き換えて，体外受精-凍結融解した B6C3F1 と C57BL/6 の卵子に gRNA 100ng／μl と Cas9 protein 100ng／μl で実験を行なった．実験 4 では，gRNA と Cas9 protein の希釈や印加時の溶液を実験 1～3 で用いた Opti-MEM から Whitten-HEPES に替えて体外受精-凍結融解由来の C57BL/6 卵子で実験を行なった．卵子の生存率の観察は，エレクトロポレーション操作後 1～2 時間 Whitten 培地で培養してから行なった．その後は，2 細胞期まで培養して卵管に移植し，14 日に胎仔を採取して，四肢形成異常個体の有無を観察した．

【結果】gRNA と Cas9 mRNA を用いた結果は，実験 1 の ICR 自然交配未凍結卵子で生存率 87／95（91.6%），四肢形成異常個体の割合は，5／19（26.3%）であった．また，実験 2 の体外受精-凍結融解 B6C3F1 卵子では，生存率 56／116（48.3%）で、四肢形成異常個体の割合は 2／12（16.7%）．Cas9 を mRNA から protein に置き換えた以降の結果は，実験 3 の体外受精-凍結融解 B6C3F1 と C57BL/6 で，それぞれ生存率 291／310(93.9%)と 99／112（88.4%），四肢形成不全個体の出現率 64／124（51.6%）と 28／32（87.5%）であった.実験 4 で、エレクトロポレーション溶液を Opti-MEM から Whitten-HEPES に替えて行なった体外受精-凍結融解 C57BL/6J 卵子の結果は，生存率が 57／57（100%），四肢形成不全個体率は 9／10（90%）であった．

13. ラット受精卵の採取

〇江藤智生
公益財団法人実験動物中央研究所

私たちは、ラット受精卵の採取に関する技術を、主に系統保存に使用しています。系統保存の目的は、保存した受精卵を個体復元し、系統維持をおこなうコロニーを再構築することです。しかしながら、形態学的に正常と観察される受精卵が多く採取できたとしても、超低温保存・胚移植を経て維持コロニーが復帰出来なければ、採取した受精卵の価値は大幅に薄れてしまいます。

実中研のラット生殖工学技術は、1990 年代に系統保存を開始し、2000 年代初頭には NBRP-Rat のサブ機関として複数系統の保存をおこない、現在に至っています。ラットは、生殖工学に対する系統差が著しく、複数系統に対する公知の報告が限られています。かつ、限られたメスの数で確実に系統保存に用いる 2 細胞期胚を採取したい為、多くの系統は自然交配・卵管灌流で採取しています。また、過剰排卵や体外受精に対しては、幾つかの系統では実践または実験的におこなっています。

系統保存を目的とした 2 細胞期胚の採取は、系統維持への復帰を視野に入れておこなっています。そのため今回の報告では、複数系統から採取した 2 細胞期胚が、超低温後に、また胚移植後にどの様な結果を示したかも紹介致します。また、実験材料を目的とした発生ステージの違う受精卵の採取も紹介致します。

ラットは、医学・薬学・生物学を始めとする複数の学問で使用されてきたため、現在でも多くの系統が存在します。対して、複数系統に対する生殖工学技術の施行結果の報告はあまり多くはありません。本報告を通じて、少しでも皆様の実務・研究の参考になりましたら幸いです。

14.再現性のあるラット体外受精法を目指して

○金井富三夫[1]、多田昇弘[2]
1)順天堂大学　老研・遺伝子解析研、2)順天堂大学　疾患モデル研究センター

【目的】近年の技術革新により Tg、KO ラットは数多く作出され、系統保存の必要性は高い。一連の保存作業に体外受精は不可欠でありながら、ラットの体外受精は、最初の報告から半世紀近く経過してなお、マウスと比べると依然普及していない。その理由の一つに、再現性の低さが挙げられる。我々は、体外受精改善の要因として、精子の取扱に着目し、精子に対して、侵襲の少ない体外受精法を考案したので報告する。さらに体外受精培地中に存在する BSA の品質が、再現性に大きく影響することも併せて報告する。

【方法】精子は、性成熟した 10 週齢以上の雄性 Wistar ラット(Crlj:WI)を吸入麻酔下または炭酸ガスによる安楽死後、無菌的に精巣上体尾部を取り出し、尾部細管の一部(約 5mm)を、PCR チューブを沈めた体外受精培養液 mR1ECM+BSA 中に投入し、30 分間培養した。卵子は、4 週齢雌性 Wistar ラット(Crlj:WI)に、性腺刺激ホルモン(PMSG,hCG)腹腔内投与し、過排卵を誘起させ、hCG 投与 14 時間後に頚椎脱臼による安楽死後、無菌的に卵管を取りだし、mR1ECM+BSA 中に移した後、卵管膨大部より卵塊を採取した。卵塊の入った培養液に、精子が侵入した PCR チューブを浸漬し、チューブから放出される精子と媒精した(Tube 群)。その後、10 時間培養した後、卵子を体外培養液 mR1ECM+PVA に移し、受精を確認し、さらに胚盤胞期までの発生を確認した。対照群として、定法の 400μℓ Drop(mR1ECM+BSA)を設けた(Drop 群)。また BSA の評価は、製造元およびロットの異なる BSA ついて、受精率、発生率に加え、タンパク質分子量の分布、質量分析計による解析、並びに検出された脂肪酸による精子の形態変化についての検討を行った。

【結果および考察】精子の運動性、受精率共に Drop 群と比較して Tube 群が良好な値を示した。胚盤胞への発生は、両群間で差が見られなかった。一方、BSA の評価では、一部のロットについて明らかな受精率の低下と、各種解析項目でも異質な結果を認めた。その要因の一つと思われる脂肪酸について検討したところ、受精率が改善されることがわかった。以上の結果により、ラットにおける体外受精は、精子の適切な取り扱いが受精成績を左右することがわかった。また、受精培地に必要不可欠な BSA の品質が、精子の形態に影響し、受精を抑制することが認められた。このことは、BSA の品質がラットの体外受精に影響を与えており、特に脂肪酸の構成成分が重要な要因であることが推察される。

15. ラットの過排卵処理・体外受精について

○日野　千紘
旭川医科大学　教育研究推進センター　動物実験技術支援部門

【背景】マウス生殖工学技術は広く普及し、多くの動物施設で業務として確立されているが、一方でラット生殖工学技術はほとんどの施設で導入されていない。その理由としては、遺伝子改変ラットの作製はこれまで盛んに行われておらず、生殖工学技術の需要が低かったことがあげられる。しかし近年のゲノム編集技術の発展で、簡易的に遺伝子改変ラットの作製が可能となり、作製された系統の保存などで、ラット生殖工学技術の需要は高まりつつある。当施設では数年前よりラット生殖工学技術を導入するため、種々の検討を行っており、現在業務として運用している。今回のテーマ＜受精卵・胚の作製法＞に沿って、当施設で行った過排卵処理と体外受精の検討結果を中心に報告する。

【方法】まず、従来5時間とされていたラット体外受精の精子前培養時間を、1時間に短縮した報告（Aoto *et al.*, Transgenic Res, 2011）を基に一部改変して、業務時間内に収まる体外受精プロトコールを組み立てた。夕方、雌ラットに PMSG(30IU/100～200g)を腹腔内投与し、48 時間後に同量の hCG を腹腔内投与して過排卵処理を施した。hCG 投与の翌日、9:00 に雄ラットから採精し、15 分～1 時間の精子前培養時間をもうけた後、過排卵処理した雌ラットから採卵し、最終濃度 45,000 精子/100μl となるように媒精した。媒精約 6 時間後に卵子を洗浄し、翌日 14：00 以降に 2 細胞期胚を選別した。このプロトコールで、Wistar を用いて体外受精率が安定する条件を検討した。採卵過程における各処理時間を、1）安楽殺から卵管を摘出するまでの時間、2）卵管膨大部から卵子を受精用培地に導入するまでの時間、3）卵子の培地への導入から媒精するまでの時間に分けて、それぞれが受精率に与える影響を調べた。得られた条件で、当施設の保有する各系統（Wistar 2 系統、SD 1 系統、F344 1 系統）を用いて過排卵処理、体外受精をおこない、系統ごとの排卵数と受精率を調べた。

【結果・考察】過排卵処理の結果、Wistar、SD 系統は多少排卵数にばらつきがみられたものの過排卵処理の効果が認められたが、F344 系統は安定した効果がみられなかった。Wistar を用いた体外受精において、採卵過程の各処理時間を 1）安楽殺から卵管を摘出まで 1 分以内、2）卵管膨大部から卵子を受精用培地に導入するまで 3 分以内に収めると 90%以上の受精率が得られた。3）卵子の培地への導入から媒精するまでは、1 時間経過しても受精率に影響はなかった。これらは当施設で保有している各系統においても同様の結果が得られた。今後は、F344 系統において安定した排卵数を確保することが課題である。

16. ラットにおける CARD IASe を用いた過排卵処理と体外受精・体内受精および胚の凍結保存・移植

○中務　胞[1]、中潟　直己[2]、夏目　里恵[1]、﨑村　建司[1]
1)新潟大学 脳研究所 細胞神経生物学分野
2)熊本大学 生命資源研究・支援センター動物資源開発研究施設(CARD)・資源開発分野

【目的】
近年ゲノム編集技術の開発により、遺伝子改変ラット作製が比較的容易に行えるようになった。しかし、これは受精卵が得られることを前提としたうえでの話である。ラットは系統により従来の妊馬血清性腺刺激ホルモン(PMSG)とヒト絨毛性ゴナトロピン(hCG)による過剰排卵誘起法では採卵が困難であり、有効な過剰排卵誘起法が確立されていない。また、従来法にて過剰排卵誘起が可能な系統においても、系統維持、保存および他施設への提供にも安定した過剰排卵法の確立が望まれている。そこで、我々はマウスの超過剰排卵誘起処置剤として知られている CARD IASe を用いて幼若ラット(SD、Wistar)へ過剰排卵誘起を試みた。

【方法】
4 週齢の雌ラットの腹腔内に PMSG を 15IU/匹投与した区(コントロール区)と CARD IASe を 400μL/匹区(試験区)を設け、48 時間後に hCG を 15IU 投与し、翌日体外受精にて受精卵を作製した(IVF 区)。また、同条件にて過剰排卵誘起処置後、雄ラットと同居させ、自然交配後、受精卵の回収も行い(自然交配区)、排卵匹数、総排卵子数、受精卵数を調べた。さらに、得られた受精卵は凍結融解後、偽妊娠誘起を行った、レシピエントラットの卵管へ移植し、産仔への発生も確認した。

【結果および考察】
コントロール区と比較し、試験区にて多くの受精卵が得られた。特に IVF 区では、コントロール区で 10 匹の雌より 204 個の受精卵が得られたのに対し、試験区では同数の雌より 450 個の受精卵を得ることができた。妊娠率および産仔数ともに自然交配区が IVF 区よりも高い傾向がみられたが、両区ともに産仔を得ることができた。さらに、本研究と同様に、PMSG では過剰排卵処置が困難な BN ラットを用いて過剰排卵処置を行ったところ、CARD IASe 区にて多くの受精卵が得られることが明らかになった。本結果は遺伝子改変ラット作製のみならず、様々なラット系統維持のための凍結受精卵保存にも貢献できうる過剰排卵誘起法であると考えられる。

17. ラットの過排卵および遺伝子改変

○田中貴雄[1]、長谷川靖洋[2]、神田由紀[1]、本村翔[1]、三浦義記[1]
1) 株式会社ケー・エー・シー　バイオサイエンス事業部　受託試験部
2) アスビオファーマ株式会社　創薬技術ファンクション

CRISPR/Cas9 を代表とするゲノム編集技術の進出により、ES 細胞なしでノックアウト動物、ノックイン動物の作製が容易な時代に入った。ES 細胞が不要なため、これまで実用的な ES 細胞の樹立が困難であったラットにおいても、効率的なノックアウト動物、ノックイン動物の作製が可能となった。一方で、ラットにおいては安定した受精卵作製方法が確立されているとは言い難く、今後の発展が期待される分野である。

今回、我々はラットの凍結胚作製のための受精卵（２細胞期胚）採取において、従来の方法である PMSG/hCG 投与による過排卵処置と、新規の HyperOva/hCG 投与による超過排卵処置を行い、得られた受精卵数を比較した。その結果、従来の過排卵処置では、1 匹あたり平均 5 個程度であったのに対し、弱週齢の個体を用いた新規超過排卵法では１匹あたり平均 27 個の受精卵を得ることができた。

また、それぞれの過排卵処置により得られた２細胞期胚を凍結保存後、融解し、個体復元を行った結果、どちらの方法で過排卵処置した２細胞期胚も問題なく個体に復元できることも確かめた。

次に、ゲノム編集の簡便化のためにラットの凍結前核期胚を作成し、それを融解し、ゲノム編集ツール（Cas9 mRNA, guide RNA）をマイクロインジェクション後に胚移植を行った。その結果、非凍結胚と比べると凍結胚の個体復元率は 50%と落ちるが、ゲノム編集は問題なく起こっていることが確認されたので紹介する。

18.ラットのゲノム編集効率に及ぼす Cas9 nuclease のデリバリー方法の影響

○後藤 哲平[1]、余郷 享子[1]、保地 眞一[2]、平林 真澄[1]
1)生理学研究所、2)信州大学

原核生物の獲得免疫システムをもとに開発されたゲノム編集ツール「CRISPR/Cas9 システム」によって、効率的かつ容易に遺伝子機能を欠失させた個体が作出可能となった。ゲノム配列を指定する guide RNA、並びにそれと複合体を形成する Cas9 nuclease を前核に注入するだけでゲノム変異を導入できる同システムは急速に普及したが、細胞毎に塩基の欠損・挿入のタイプがモザイクになるといった問題点もある。本研究では、ラットゲノムの編集作業において Cas9 nuclease のデリバリー法 (プラスミド DNA、mRNA、またはタンパク質) が変異導入細胞のモザイク発生に影響するか、調べた。

過排卵誘起した Crlj:WI 雌ラットを同系雄と交配後に前核期卵を採取し、*Foxn1* 遺伝子をターゲットにした guide RNA と Cas9 nuclease を前核へと注入した。このとき Cas9 nuclease は、オールインワンベクターpX330、mRNA、Nuclease タンパク質のいずれかの形によってデリバリーした。前核注入翌日の午前中に偽妊娠雌の卵管へ移植し、3 日後に子宮から胚盤胞を回収した。そして個々の胚盤胞の PCR 産物を TA クローニングし、シーケンス解析を行った。胚盤胞あたり TA クローニングした 10 クローンの解析で、10 クローン全てが野生型 (野生型)、4〜6 クローンが変異型で残りが野生型 (ヘテロ型)、4〜6 クローンが変異型 A で残りが変異型 B (ヘミホモ型)、10 クローン全てが同一変異型 (ホモ型)、それ以外 (モザイク型) のいずれかに分類した。

「胚盤胞発生率」はプラスミド DNA 群、mRNA 群、タンパク質群でそれぞれ、5% (4/80)、47% (48/103)、14% (11/76) と差が認められたが、「PCR 増幅成功率」はそれぞれ、100% (4/4)、83% (40/48)、100% (11/11) と高かった。遺伝子型解析の結果、「*Foxn1* 変異導入成功率」はプラスミド DNA 群、mRNA 群、タンパク質群でそれぞれ、100% (4/4)、75% (30/40)、100% (11/11) であり、「モザイク型胚盤胞率」はそれぞれ、75% (3/4)、60% (18/30)、9% (1/11) だった。以上の結果より、モザイク個体を極力減らし、前核注入によって効率的に変異導入ラット個体を作製するには、Cas9 nuclease をタンパク質の形でデリバリーするのがもっとも有効であった。

19. 野生アカネズミにおける抗インヒビン血清投与による過排卵誘起の検討

○目黒栞奈[1]　伊藤洵[1]　小松一樹[1]　大平拓也[1]　澤渡綾乃[2]
中潟直己[3]　中田章史[4]　三浦富智[5]　山城秀昭[2]
1）新潟大院自然研　2）新潟大農　3）熊本大 CARD　4）北薬大薬　5）弘前大院保健

【目的】近年、野生アカネズミは、遺伝的多様性が維持されている新たなバイオリソースとしての有用性が期待されている。しかし、季節繁殖性の特徴を有する野生アカネズミにおいて、特に過排卵誘起処理法から体外受精（IVF）技術は未だ確立されていない。そこで本研究では、野生アカネズミにおける IASe（抗インヒビン血清 + eCG）投与による過排卵誘起処理法、IVF 後の 2 細胞期胚への発生、および胚体外培養用(IVC) 培地の検討を行った。

【方法】野生アカネズミは、新潟県角田山にてシャーマントラップを用いて捕獲した。非繁殖期および繁殖期の雌個体に eCG、ActivinB、および IASe を投与し、その後 hCG を投与して過排卵誘起処理を行い、17 時間あるいは 24 時間後に採卵した。IVF として、繁殖期の野生雄アカネズミの新鮮あるいは凍結精子を用いて行い、2 細胞期までの胚の発生率を評価した。IVC 培地は、KSOM、低 NaCl-KSOM、妊娠アカネズミ由来血清添加 KSOM（血清添加 KSOM)、および HiGROW OVIT（扶桑薬品）の培地を検討した。

【結果】非繁殖期の雌個体に過排卵誘起処理を行った場合、eCG 区および ActivinB 区では排卵が誘起されなかったが、IASe 区では 7 個前後と有意に卵子を得ることができた。一方、繁殖期においても eCG 区および ActivinB 区の採卵数は 1 個前後に対し、IASe 区では 11～14 個の卵子を採卵することができた。IASe 処理にて採卵した卵子に IVF を施した結果、KSOM 培地と比較して低 NaCl-KSOM 培地では 2 細胞期胚までの発生率が高くなる傾向があり、さらに血清添加 KSOM 培地および HiGROW OVIT 培地では、それらの値が有意に高くなる結果が認められた。

以上、IASe は、野生アカネズミの過排卵誘起に対して効果的であり、繁殖期だけでなく非繁殖期においても採卵可能であることが明らかにされた。加えて、IASe 処理によって得られた非繁殖期の卵子は、凍結精子を用いた IVF においても 2 細胞期胚まで発生することが示された。さらに IVF 後に血清添加 KOSM 培地、および HiGROW OVIT 培地を用いることで、2 細胞期胚への発生率が向上することが明らかとなった。引き続き、野生アカネズミにおける体外受精胚発生の向上を目指し、IVC 培地の改良を検討する予定である。

20. シリアン・ハムスター卵子の顕微授精（ICSI）：採卵時間と ICSI 後の前核形成と胚発生

Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in Syrian hamster: Effect of time of oocyte collection after hCG injection on pronuclear formation and embryo development

○堀内俊孝、大内茉湖、森下奈美（県立広島大学 大学院 総合学術研究科）
Toshitaka Horiuchi, Mako Oouchi, Nami Morishita

2002 年に我々の研究室の Yamauchi がシリアン・ハムスター卵子の ICSI のよる産仔作出を世界で最初に成功した。その後，2004 年に Haigo が円形精子細胞注入法（ROSI），2011 年に Muneto が凍結乾燥精子の ICSI による産仔作出に成功した。しかし，発生率は低く，技術の安定化や簡易化，また基本技術の確立が必要である。今回は，ハムスターICSI 技術を紹介するとともに，ハムスターICSI における採卵時間の影響を検討した。

ハムスター胚の操作や胚発生では，蛍光灯等から光の影響を受けるため，消灯した部屋で，小さいライトを点灯し，実体顕微鏡，マニピュレーションを行う倒立顕微鏡も赤色光下での胚操作や ICSI を行った。

過剰排卵処理した雌ハムスターから，hCG 投与後 15， 17， 19 時間に排卵卵子を採取し，ヒアルロニダーゼによって卵丘細胞を除去し ICSI を行った。ICSI 後 6 時間の雌雄両前核（2PN）率は各 97.8，45.3，39.7%，一方で，1 前核（1PN）率は各 2.2，55.3，60.3%となり，15 時間区と比べ，17，19 時間区で有意に高くなった。ICSI 後の 2 細胞期率は各 83.0， 68.1， 34.5%，桑実胚＋胚盤胞率は各 34.0， 18.4， 0%となり，17， 19 時間区で有意に低下した。

また，hCG 投与後 15 時間で排卵卵子を採取し，体外で 0， 2， 4 時間培養したのちに ICSI を行うと，正常受精（2PN）率は各 100，67.5，51.2%，2 細胞期率は各 86.5，77.5，58.5%，桑実胚＋胚盤胞率は各 37.8，32.5，7.3%となり，4 時間培養区で低下した。

以上から，排卵時間が遅くなると，ハムスター卵子は自発的活性化が起きやすく，雌雄両前核の正常な前核形成が不全となった。このことは，ハムスターICSI においては，雌雄両前核形成のタイミングが一致することが重要である。

21. スンクス凍結胚からの個体復元の試み

○後藤 元人、高橋 利一
公益財団法人 実験動物中央研究所 動物資源基盤技術センター

【目的】スンクス(*Suncus murinus*)は、和名をジャコウネズミというが、食虫目トガリネズミ科、ジネズミ亜科、ジャコウネズミ属に属しており、1980 年代から日本で実験動物化がなされている。特筆すべき特徴として、嘔吐することが知られており、嘔吐反応に関する研究、制吐剤の開発等に幅広く利用されている。公益財団法人実験動物中央研究所ではこれまで選抜育種により嘔吐高感受性 Jic:SUN-Her および低感受性 Jic:SUN-Ler のクローズドコロニー系統を確立し、生産・供給を行なってきた。本研究ではこれら系統の遺伝資源保存を目的として受精卵凍結保存ならびに凍結保存胚からの個体復元を試みた。

【方法】受精卵採取は成熟 Jic:SUN-Her を用い自然交配で、同居開始より 2 日後に卵管灌流により 4 細胞期胚を採取し行なった。交配率向上のために餌には動物性蛋白を豊富に含む餌をサプリメントとして加えた。胚の凍結方法は実中研で開発されたガラス化保存法(CIEA 法)を用いた。加温後の胚は生存の確認を行ない、胚移植は hCG 投与による偽妊娠誘起法(井上らの方法)を用いて、産仔への発生を調べた。

【結果】交配率は高蛋白餌を加えた方が向上した。自然交配での平均採卵数は雌 1 匹当たり 2.9 個であった。凍結胚において、加温後の回収率は 100%であったが、形態学的正常胚の割合は平均 84%(33～100%)であった。卵管胚移植の結果、凍結胚から産仔を作出することが出来た。

22. ウサギにおける効率的な受精卵作製の試み

〇松久葉一[1]、秋吉俊明[1]、松尾　完[1]、塩見雅志[2]、森本正敏[3]、北嶋修司[1]
1）佐賀大学総合分析実験センター、2）神戸大学医学部附属動物実験施設、
3）福岡女学院看護大学

演者らは、これまでヒト疾患モデルとしてトランスジェニックウサギの開発を行ってきた。近年では、ゲノム編集技術の発展により、これまでマウス以外で困難であったノックアウト動物の作製がウサギでも可能になってきた。これら遺伝子改変ウサギの作製や凍結胚による系統保存などには多くの受精卵（胚）が必要であり、動物福祉や経済的な観点から、より効率的な受精卵の作成手技の確立が望まれる。

一般に、ウサギにおける過排卵誘起では、妊馬血清性ゴナドトロピン（PMSG）　25～200U の単回投与、もしくは卵胞刺激ホルモン（FSH）　0.5AU を 12 時間間隔で 6 回投与後に雄との交配（PMSG もしくは FSH の投与開始日を 1 日目とすると 4 日目）と同時にヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG）を投与する方法がよく行われている。これまでの我々の成績[1)]では、4～5 月齢のウサギ（Slc:JW/CSK）における FSH での平均卵子回収数は一匹当たり平均 47 個（n=129）、PMSG（150U）で 34 個（n=129）であった。これまでは 4 月齢以降の個体を用いて採卵を実施していたが、最近、3 月齢程度のさらに若い個体に過排卵処置を行うことで 200 個以上卵子が採れることを経験しており、現在、ウサギにおける効率的な受精卵作製の試みとして、若齢ウサギに過排卵処置を行った際の採卵数等について検討を進めている。また、近年では抗インヒビン抗体による超過排卵誘起法がマウスで報告されており、他の動物種においてもその有用性が期待される。これについてもウサギにおける CARD　IASe を用いた過排卵処置の効果について検討を開始したところである。いずれもまだ予備評価の段階であるが、これまでの我々の試みの現状について報告したい。

1) Kitajima, S., Maeda, T., Liu, E., Nishijima, K., Morimoto, M., Watanabe, T. and Fan, J.: Factors influencing the number of eggs recovered from rabbits superovulated with FSH or PMSG: Analysis of 5 years of data from 509 rabbits. ***Scand. J. Lab. Anim. Sci.*** 38(3): 169-174, 2011.

23. コモンマーモセット生殖工学における効率化にむけた取り組み

○黒滝　陽子[1]、佐々木　えりか[1,2]
1)実験動物中央研究所、2)慶應義塾大学

小型で取り扱いが容易なコモンマーモセットは、非ヒト霊長類であることからヒト疾患モデルとして多くの研究に使用されている。しかしながら薬剤誘導や物理的処置によるモデル作成には限界があるため、幅広いヒト疾患モデルに対応することが期待される遺伝子改変マーモセットの作出が望まれている。当研究所においても、年々遺伝子改変マーモセット作出項目が増えているため、遺伝子改変動物の作出効率を上げるために生殖工学の様々な改善をおこなっている。

購入したコモンマーモセットは病死や安楽死をするまで殺処分することはなく、長期間をともにする実験のパートナーである。実験使用前から、常に体重を目安とした健康維持をおこない、実験区分を変更して実験利用とお休みを交えて維持しているため、飼育員における動物ケアは実験と並行して大変重要である。採卵においては安定して卵が得られるマウスと異なり、ヒトのように個々のホルモン感受性の相違があるため統一したホルモン刺激では十分な卵は得られない場合がある。そのため、採卵実績における卵巣刺激の変更をおこなっているが、一長一短であり様々な課題を抱えている。また、霊長類の実験では、動物福祉の考えから 3R の実践が強く意識されているため、当所のマーモセットの生殖工学技術においても様々な取り組みをおこないつつ、受精卵をより効率的に作成する方法を常に模索している。本発表ではこれらの取り組みの一部について、現状と今後の課題を紹介する。

24. サル類の体外培養系受精卵の作製について

〇外丸祐介[1]、信清麻子[1]、岡本宗裕[2]
1)広島大学自然科学研究支援開発センター、2)京都大学霊長類研究所

サル類はヒトに近縁であることから、生理機能においても数多くの共通性を有している。この点は実験動物としての優位点であり、特に高次脳機能や感染症・免疫の研究において極めて有用なモデル動物となっている。この中でもマーモセットは小型で扱い易く比較的繁殖性が高いこと、また遺伝子組換え技術の応用も進んでいる等の理由から実験動物化が進んでいる。我々はこのようなサル類について、実験動物としての有用性と個体作製における利便性を高めるため、生殖工学技術の開発・改良に取り組んでいる。当初は、マーモセットにおける体外培養系受精卵からの個体作製に至る一連の生殖工学基盤技術（卵巣刺激処置、卵胞卵子の採取・成熟培養、体外受精・培養、受精卵移植など）の確立・効率化に取り組んできた。更に近年ではこれらの技術を基盤としてクローン技術等の遺伝的相同個体の作製技術の適用を検討するとともに、ニホンザルへの応用を進めている。この一方で、生殖工学技術が高度に適用されているマウス・ラットと比べ、サル類における各技術の処置やその効率は大きく異なる。その１つとしては、卵子を得るための行程・処置が個体の性周期に大きく依存する点である。すなわち、雌個体への卵巣刺激処置（性線刺激ホルモン投与）を開始する為には、血中ホルモンレベルの測定により性周期を把握して、発情休止期の初期にある雌個体を選抜もしくは同時期へ誘導する必要がある。また、卵胞の成長を促す為に数日間（7～10 日程度）持続的に卵胞刺激ホルモンを投与した後に卵巣卵胞より卵子を採取することができるが、その効果は個体差が大きい。同時に、同一個体からの繰返し採卵を実施する場合も多い為、外科的処置の技術と倫理の両面への対応・配慮が必要とされる。その他の体外受精・培養系の技術についても、改良が進む一方で実務レベルにおいては改善の余地が残されており、その現状を紹介する。

25. ヒト ES 細胞から始原生殖細胞への分化誘導法

○小林 俊寛[1,2]、平林 真澄[2]、Ramiro Alberio[3]、Azim M Surani[1]
1)ケンブリッジ大学 ガードン研究所、
2)自然科学研究機構 生理学研究所 行動・代謝分子解析センター、
3)ノッティンガム大学

すべての生殖細胞の元となる始原生殖細胞は、哺乳類の胚発生初期に生じ、ダイナミックなエピゲノムの変化や、性分化を経て、精子・卵子へと分化し、受精を通じて次世代に遺伝情報を伝える。マウスでは遺伝子改変動物を用いた解析によりその発生機構が詳細に明らかにされてきており、その発生に関わるシグナルや重要な転写因子群が数多く同定されてきた。さらにその発生過程を *in vitro* で再構築することにより、マウス ES 細胞や iPS 細胞といった多能性幹細胞から機能的な始原生殖細胞の分化誘導することも可能になり、近年ではそこから支持細胞との共培養や培養条件の最適化により、成熟した卵子や、精子幹細胞を作り出すことに成功している。これにより、生殖細胞の発生過程を段階的かつ大規模に *in vitro* で解明することが可能となった。

一方で、ヒトでは、始原生殖細胞が生じる着床直後の胚を用いた解析が倫理的・実質的に困難であるため、その発生機構は長らく謎に包まれてきた。モデル動物としてのマウスはその解明にヒントをもたらす一方、ヒトを含むそれ以外の種と比べ、始原生殖細胞が出現する時期の初期胚の発生様式が大きく異なることが知られ、両者の間で違いがあることも示唆されていた。さらに近年のヒト胎児より集められた始原生殖細胞を用いた遺伝子発現解析から、始原生殖細胞の分化に必要な転写因子群も両者で異なり、そのメカニズムの解明には新たなモデルが求められていた。

そこで本研究会では、これまで謎に包まれていたヒトの初期発生とその過程における始原生殖細胞の発生機構を知るために我々が開発してきたヒト多能性幹細胞から始原生殖細胞への分化誘導法を紹介したい。この方法は、ヒトの初期発生における細胞の段階的な分化過程を再現することが可能なため、生殖細胞だけでなく様々な細胞への運命決定機構を明らかにするために有用であると思われる。また同じような発生様式をとるサルにも適用可能で、将来的に発生・生殖工学的なツールとしても応用できることが期待される。

お知らせ

第３６回動物生殖工学研究会（シンポジウム）

期　日　平成３０年（予定）

場　所　つくば

第３７回動物生殖工学研究会

期　日　平成３０年１２月（予定）

場　所　北里大学　白金キャンパス