

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06026

研究課題名（和文）胚移植レシピエントのための新規アルビノ近交系マウスの開発

研究課題名（英文）Development of new albino inbred strain mice for embryo-transfer recipient

## 研究代表者

橋本 憲佳（Hashimoto, Noriyoshi）

金沢大学・学際科学実験センター・准教授

研究者番号：50242524

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：胚移植のためのレシピエントマウスにはICR系統を用いるが、小規模自家生産できず、肥満により使用期間が限られる。これらの欠点を補うため、多産で哺育能力に優れた近交系由来のレシピエントマウスを開発した。アルビノ近交系のKSマウスは、胚移植後帝王切開を要する事がほとんどなく、作業の省力化と使用動物数の削減が可能であった。遺伝子改変マウスの作出で多用されるC57BL/6系統の凍結融解受精卵を卵管内移植した時の離乳率は、採卵後凍結せずに直接移植した場合の成績と比べても低下しておらず、胚移植用レシピエントマウスとしての優位性を示した。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子改変マウスを作成するには、受精卵を偽妊娠させた受容雌マウス（レシピエント）に移植して産仔を得る必要がある。レシピエントに使用されるICR系統は遺伝的に均一ではないことから、肥満により使用期間が短いことや、帝王切開して里親に哺育させることが多いなど、大規模なコロニーを維持する必要がある。そこで作業効率の向上を目指し、小規模に自家繁殖して効率よく使用できるレシピエントとして、アルビノ近交系のKSマウスを開発した。KS系統を用いれば小規模に胚移植を行えるので、遺伝子改変マウスを用いる研究の普及に加え、動物使用数削減にも貢献できる。

研究成果の概要（英文）：As a recipient mouse for embryo transfer, it is common to use the ICR strain. The ICR strain cannot be produced in-house on a small scale, and its period of use is limited due to obesity. We have developed inbred-derived recipient mice to replace the closed colony ICR strain. Albino inbred KS mice rarely required cesarean section after embryo transfer, which made it possible to save labor and reduce the number of animals used. The weaning rate when frozen and thawed fertilized eggs of the C57BL/6 strain, which are often used in the production of genetically modified mice, was transplanted intraeductally did not decrease compared to the results when directly transplanted without freezing after egg collection. These show the excellent properties of KS mice as embryo transfer recipient mice.

研究分野：実験動物学

キーワード：レシピエント 胚移植 近交系

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

マウスの発生工学技術において、精子や卵子の取り扱い技術の発展はめざましく、経験の浅い施設においても技術導入が容易になっている。一方、胚移植用レシピエントマウスに関しては、多産を指標に選抜されたクローズドコロニーである ICR 系統が事実上の標準となっている。しかしながら、遺伝的特性上、購入に頼らざるを得ないだけでなく、過度の肥満により使用期間が短く、また膣栓確認しても移植に適さない個体が散見され、帝王切開を要する率が高い等の問題がある。

腫瘍の可移植性向上を目的として行った複数免疫欠損遺伝子導入マウスの開発において、免疫欠損遺伝子を持たない同一遺伝背景マウスとして、KS マウスを樹立していた。一般に、劣性免疫欠損遺伝形質を示すヌード遺伝子をホモで導入すると、雌個体の乳腺は発達せず授乳能力を失うが、KS 背景では授乳能力良好となり、ヌード遺伝子ホモ同士での交配による生産が可能となる。この授乳能力獲得は、胚移植におけるレシピエントマウスの能力向上に資するものであり、哺育能力良好な近交系マウスをレシピエントマウスとすることができれば、従来は購入に頼らざるを得なかったレシピエントマウスを自家生産して安定供給することが可能になる。

### 2. 研究の目的

近交系は、クローズドコロニーや交雑系と比較して、産仔数が少ない、体躯が小さい、ストレスに弱い、気質が穏やかではないなどの遺伝的特性から、レシピエントマウスとしての利便性が考慮されることは殆どなかった。授乳能力の向上を指標に選抜した KSN ヌードマウスから独自に樹立したアルビノ近交系の KS マウスは、体躯が比較的大きいが過度の脂肪蓄積は無く、多産で ICR に匹敵する生産性と哺育能力があり、気性も非常に穏やかであり扱いやすいなどの特徴がある。そこで ICR 系統の欠点を補う近交系由来のレシピエントマウスとしての能力を検証するとともに、使用に際しての条件検討を行って、小規模施設においても実用可能な発生工学支援技術の基盤を整備する。これにより胚移植のための安定かつ高効率なレシピエントマウスを自家生産して供給する技術を提供し、発生工学技術のさらなる普及を推進することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) KS マウスの自然交配による繁殖成績

KS マウスの雄 1 匹に対して、雌マウスを 2~3 匹同居させるハーレム方式の自家繁殖を行った。妊娠を確認した雌マウスはケージを分けて一匹飼いとし、離乳後に繁殖ケージに戻した。離乳は出産後 4 週間後で行い、離乳時の体重を記録して耳パンチにより個体識別し、1 ケージ 5 匹以内で育成した。

#### (2) 精管結紮雄と偽妊娠マウスの作成

5~6 週齢のオスを三種混合麻酔による麻酔下で下腹部を小切開し、精管を 5~7mm 程度切除して閉腹し、偽妊娠マウス作成用の精管結紮雄とした。8~9 週齢時に一匹飼いとし、膣口の目視検査により選別した発情期雌との交配により偽妊娠マウスを作成した。

#### (3) 2 細胞期卵の卵管内移植

2 細胞期卵の卵管内移植は、熊本大学 CARD の中潟らの方法に準拠した。予め PMSG/hCG のホルモン処理により過剰排卵させた C57BL/6J マウスの 2 細胞期卵を中潟法により凍結したものを融解して移植に用いた。移植時の週齢、体重、移植卵数を記録し、妊娠したマウスは、妊娠後期に一匹飼いとして自然分娩するまでの日数、産子数、28 日齢での離乳数、離乳時体重を記録した。

#### (4) レシピエントマウスの週齢による移植成績の検証

半年齢までの育成により、雌マウスに過度の皮下脂肪や内臓脂肪の蓄積は全く見られなかったため、移植時週齢による成績の比較を行った。25~26 週齢の雌マウスに対してはリタイヤ動物削減を試みるため、ホイットン効果による発情期の同調を期待し、交配 3 日前に雄ケージの床敷きを雌ケージに投入して全数を交配に用いた。

#### (5) 移植卵数による移植成績の検証

ICR への卵管内移植では、通常、卵管片方に 7~8 個、左右合わせて 14~16 個の 2 細胞期卵を移植するが、KS マウスでの至適条件検討のため、左右合わせて 6, 10, 14, 20 個の 2 細胞期卵を移植して成績を比較した。

#### (6) BALB/c 系統受精卵の移植成績

日常の胚操作支援業務においては、129xB6 系統や C57BL/6 系統を背景とする受精卵の移植に対して、BALB/c 系統の遺伝背景の受精卵移植では導入遺伝子の有無に寄らず成績が低下することを経験している。そこで、KS マウスをレシピエントとして BALB/c 系統卵を移植した場合の成績を検証した。移植時週齢は 16 週齢までとし、移植卵数は左右合計 10 個または 14 個とした。

#### (7) 新鮮卵と凍結融解卵の比較

受精卵の凍結保存は、マウスの系統保存に有効な手段であるだけでなく、飼育スペースの削減や災害時のバックアップとして重要な手段となっているが、凍結融解によるダメージにより新鮮卵の移植よりも成績が低下する場合があるので、過排卵処理して採卵後、直ちに移植した場合の成績と比較した。新鮮卵の移植には 12~16 週齢の KS 雌マウスを用い、左右合計 14 個の C57BL/6J マウスの受精卵移植を行った。

#### (8) KS 系統の里親マウスとしての検証

KS マウスを里親として使用した時の成績を検証した。レシピエント作成の前日に目視により選別した発情雌を交配し、出産後営巣・哺育していることを確認し、C57BL/6J マウスの受精卵を移植して出産または帝王切開した産仔と KS マウスの産仔を全交換した。

### 4. 研究成果

#### (1) KS マウスの自然交配による繁殖成績

KS マウスの自然交配による平均産仔数は 9 匹以上あり、10 匹を越える場合もほぼすべての産仔が離乳に至った。平均離乳時体重(25-31 日齢)は雌 15.9g、雄 17.5g と比較的大型なアルビノ近交系で、性格も非常に温厚で取り扱いやすい。また、ICR 系統のような過度の肥満は呈さず、検証した 26 週齢までに肥満が原因でレシピエントマウスとして使用できなくなることはなかった。

#### (2) 精管結紮雄と偽妊娠マウスの作成

精管結紮した雄の KS マウスと目視で選別した発情期の雌の KS マウスを交配したときの膣栓形成率は 8 割を越えた。したがって一匹飼いにした精管結紮雄マウスを多数維持する必要がなく、飼育スペースの削減が可能であった。

#### (3) 2 細胞期卵の卵管内移植

膣栓形成を確認したマウスで、卵管膨大部の形成が不十分なものも殆ど見られなかった。凍結保存した C57BL/6 マウスの 2 細胞期卵を融解して卵管内移植したときの妊娠率も非常に高く、85% 以上の個体が自然分娩した。16 週齢までのレシピエントマウスに凍結融解卵を 10~14 個移植したときの移植卵数に対する離乳匹数は平均 29% であった。ただし、KS マウスに 2 細胞期胚を移植後、正常に自然分娩するまでの平均妊娠期間は約 20 日と一日遅れる傾向にあった。帝王切開を行う際には、ICR 系統をレシピエントとする場合よりも一日遅くする必要があることに注意が必要である。尚、21 日目に自然分娩した場合には離乳率がやや低下し、22 日目以降では自然分娩して産仔が生存したケースは殆どなかった。

少ない匹数の交配により膣栓形成した偽妊娠マウスが確実に得られ、別に里親用雌マウスを準備する必要がほぼないことから、ICR 系統の欠点がなく、作業の省力化と、使用動物数の削減が可能な胚移植用レシピエントマウスとして使用できることが示唆された。

#### (4) レシピエントマウスの週齢による移植成績の検証

肥満により使用期間が限られる ICR 系統に対して、KS マウスの使用可能期間を検討したところ、16 週齢までの標準プロトコルに比べて 17-19 週齢までの成績は変わらず、20-22 週齢でも標準の約 6 割の離乳率を維持した。ただ、オスの床敷きを雌のケージに入れることによるホイットン効果を利用したレシピエント作成効率を検討したところ、KS マウスの膣栓形成率は飛躍的に向上するものの卵管膨大部の形成不良個体が高率に出現したため、ホイットン効果によるリタイヤ動物数の削減には、さらなる条件検証が必要と思われた。

#### (5) 移植卵数による移植成績の検証

次に移植する受精卵の数を減らした場合の移植卵数に対する離乳率低下について検討したところ、左右の卵管への計 6 個の移植群では、最も成績の良かった左右合計 10-14 個の移植群に対して 6 割ほどに低下したものの、凍結融解などで移植する受精卵数が十分に確保できない場合においても、受精卵移植が可能であることが分かった。

#### (6) BALB/c 系統受精卵の移植成績

ICR 系統をレシピエントとする通常の方法では移植成績が C57BL/6 系より劣る BALB/c 系統の受精卵を移植した所、ICR 系統をレシピエントとしたとき同様、C57BL/6 系統の受精卵を移植した場合に比べて離乳率は半減した。受精卵数が十分に確保されるならば大きな支障とはならないも

のの、検討の余地が残る結果となった。

(7) 新鮮卵と凍結融解卵の比較

凍結融解を経た受精卵の移植では新鮮卵の移植より移植成績が劣ることを多く経験するが、KS マウスをレシピントとして C57BL/6 系統の凍結融解受精卵を移植した時の離乳率は、採卵後凍結せずに直接移植した場合の成績と比べても低下しなかったので、KS マウスの胚移植用レシピントマウスとしての優位性を示すものと思われた。

(8) KS 系統の里親マウスとしての検証

里親自身の産仔を営巣・哺育していることを確認した上で、出産後 1~2 日後に全ての産仔を除き、移植産仔を里子として哺育させたところ、90%以上が離乳に至った。KS マウスへの受精卵移植で帝王切開に至ることは稀ではあるが、KS マウスは、里親マウスとしても高い能力を有するものと思われる。

今後は、少ないながら自然分娩による出産に至らない場合の救済方法や出産後の離乳率を更に向上させるための検討や、BALB/c 系統卵などの移植成績が低い場合の成績向上を模索する必要が認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 橋本憲佳, 中村由季子, 井之上幸範
2. 発表標題 胚移植レシピエントのための新規アルビノ近交系マウスの開発
3. 学会等名 第65回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------