

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430091

研究課題名(和文) 疾患モデルウサギの系統保存のための胚凍結技術の確立と凍結胚による系統保存の実施

研究課題名(英文) Establishment of freezing method of rabbit embryos for cryopreservation of laboratory rabbits as human disease models

研究代表者

北嶋 修司 (KITAJIMA, Shuji)

佐賀大学・総合分析実験センター・准教授

研究者番号：70284643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、凍結精子や凍結胚による実験動物の系統保存は、ヒト疾患モデル動物の系統保存、生物資源としての活用に重要な技術となってきた。本研究では、ウサギ桑実期胚をEFS液とクライオトップを用いて凍結することにより、凍結融解後の胚の胚盤胞への発生率は、未凍結の胚と同等の成績が得られることを見出した。また、内視鏡を用いた胚移植手技の確立などヒト疾患モデルとしてのウサギの系統保存に必要な関連技術の整備を行うことができた。

研究成果の概要(英文)：In recent years, cryopreservation by spermatozoa and embryos become an important technique to preserve strains of the laboratory animals as human disease models. In this study, we found that rabbit morula stage embryos vitrified by combination of FES (Ficoll and ethylene glycol in sucrose buffer) and special device (Cryotop) shown good in vitro development rate equally to that of non-freezing embryos. In addition to establishment of cryopreservation method in rabbit embryos, we could do endoscopic embryo transfer technique which is also necessary to preserve useful laboratory rabbit strains as human disease models.

研究分野：実験動物学

キーワード：凍結保存 バイオリソース ウサギ 疾患モデル

## 1. 研究開始当初の背景

マウス・ラットでは、すでに精子や胚による凍結保存技術が確立されており、バイオリソースセンターの拠点形成とセンターによる寄託、保存、提供事業が実施されている。いっぽう、ウサギにおいて、国外では家畜としての品種維持を目的にウサギの胚バンクが存在するが、国内外に実験動物を対象とした利用可能な疾患モデルウサギの精子バンクもしくは胚バンクは存在しなかった。ウサギ精子バンク、胚バンクの設立のためには、ウサギにおける精子凍結、胚凍結技術の確立が必須である。ウサギの精子・胚の凍結手技については、いくつかの方法が報告されているものの、研究者により手技や成績がまちまちで、標準的な手法は確立されていなかった。

## 2. 研究の目的

マウスは、実験動物として広く用いられている動物種であるが、近年、動脈硬化や糖尿病の病態がヒトと異なることが指摘されており、これらの研究分野ではマウス以外の疾患モデル動物の開発が望まれている。本研究は、動脈硬化や糖尿病といった生活習慣病において有用であると期待されているウサギについて、多くの研究者がバイオリソースとして活用できるよう、ヒト疾患モデルウサギの系統保存、供給のための拠点形成を目標とし、そのために必要となる基盤技術の整備として、ウサギにおける胚凍結手技ならびにその関連技術の開発・確立をおこなう。

## 3. 研究の方法

### (1)新規凍結保存液の開発と胚凍結条件の検討

これまでに凍結保存液として報告されているエチレングリコール、フィコール、DMSOの混合液について比較検討を行うとともに新規凍結保存液の探索・開発を行った。

ウサギ配偶子の凍結保存における不凍タンパク質 (Antifreeze protein, AFP) の効果について

AFP は、低温環境に適応した魚類や植物、昆虫、キノコ、微生物等から、発見された物質で、凍結過程で AFP を添加することにより、凍結融解後の精子運動率および胚発生率が改善されることがヒツジ、マウスで報告されている。しかし、ウサギの配偶子の凍結保存における AFP の効果に関する報告は見当たらないことから、ウサギ精子および胚の凍結保存における AFP の効果について検討した。雄の日本白色種 (JW) ウサギから精子を採取し、

AFP を添加した 4 群 (0.1  $\mu\text{g/ml}$ 、1  $\mu\text{g/ml}$ 、10  $\mu\text{g/ml}$ 、100  $\mu\text{g/ml}$ ) と対照群に分割した。精液を凍結保護剤で希釈して室温から 5 に冷却した後、精子凍結保存用ストローに封入した。ストローを液体窒素蒸気中に静置して凍結し、実験に使用するまで液体窒素中で保存した。凍結融解後の精子運動率を計測し、AFP 群と対照群で比較した。次に、雌 JW ウサギから桑実胚を採取し、AFP を添加した 3 群 (100 ng/ml、500 ng/ml、1000 ng/ml) と対照群に分割した。胚を凍結保護液に浸漬後、胚凍結保存用ストローに毛細管現象により吸い込ませ、液体窒素中で凍結した。凍結胚を凍結保護希釈液で融解し、72 時間培養後の胚盤胞への発生率を AFP 群と対照群とで比較した。

### 凍結保存液とデバイスの組み合わせについて

これまでウサギ胚の凍結保存液によく用いられていたエチレングリコールと DMSO (EDS 液)、エチレングリコールとフィコール (EFS 液) を主体とした 2 種類の凍結液と 3 種類のデバイス (ストロー、セルスリーパー、クライオトップ) を用いてウサギ桑実胚を凍結し、融解後の胚生存率と胚盤胞形成率について比較検討を行った。次に、クライオトップを用いて従来のストローでは困難な初期胚 (4~8 細胞期胚) の凍結を試みた。最後に、EFS 液・クライオトップで凍結された桑実胚を仮親へ移植し、凍結融解胚の個体への発生能を確認した。

### (2)内視鏡を用いた胚採取、胚移植技術の確立

通常、胚採取、胚移植においては麻酔下で正中もしくは側腹部を切開し外科的に採取、移植を行う。切開を行うと手術後癒着が生じる場合が多く、ドナーおよびレシピエントともに 1 回しか実験に使用できない場合が多い。そこで、低侵襲で癒着を生じにくい方法として、内視鏡手術による胚採取、胚移植手技の確立を行った。これにより、胚採取にあたり動物を安楽死せずに繰り返し採取する事が可能、また、低侵襲により胚移植手術後のストレスが軽減し、妊娠率の向上等が期待できる。これらの検討は、動物使用数削減、動物への苦痛軽減など動物福祉にも貢献する。

ヒト関節用内視鏡システム (オリンパス社製) を使用した。麻酔下で腹腔内に内視鏡を挿入し、卵管を確認、操作鉗子を用いて卵管采に灌流用のチューブを挿入した。子宮口より別のチューブを挿入し、卵管采より灌流液を注入し、子宮口側のチューブより回収するを試みた。胚移植を行う場合は、内視鏡で卵

管采を確認後、卵管采内から移植用のガラス管を挿入し、ごく少量の培養液とともに胚を注入した。

#### 4. 研究成果

##### (1)新規凍結保存液の開発と胚凍結条件の検討

ウサギ配偶子の凍結保存における AFP の効果について不凍タンパクの効果

精子運動率においては、AFP 群と対照群で有意な差は見られなかったが、高速運動精子の割合は、AFP を 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  添加した群で対照群に比べ有意に高い値を示した ( $p < 0.05$ )。

胚盤胞への発生率は、AFP を 500  $\text{ng}/\text{ml}$  添加した群で対照群に比べ有意に高く ( $p < 0.05$ ) AFP を 1000  $\text{ng}/\text{ml}$  添加した群で対照群に比べ有意に低い値を示した ( $p < 0.01$ )。

以上のことから、ウサギにおいて、適正濃度の AFP の添加は、凍結融解後の高速運動精子の割合および胚の生存率を高めることが明らかになった。これらの結果から、AFP の添加は、精子および胚の凍結保存成績の向上につながる可能性が示唆された。

##### 凍結保存液とデバイスの組み合わせについて

凍結保存液とデバイスの組み合わせでは、EFS 液とクライオトップの組み合わせが最も良好な成績を示し、培養 72 時間後の胚盤胞形成率において、対照区 (未凍結) との間に有意差は認められなかった。初期胚の凍結においては、凍結融解後の胚生存率は 4~8 細胞期胚ともに高い値を示し、有意な差は認められなかった。しかし、その後の培養で、4 細胞期胚では、胚盤胞形成は観察されなかった。8 細胞期では、EFS 液を用いた場合、培養 72 時間後に対照区の 85.7% に比較して有意に低い値であったが、62.1% の胚盤胞形成率を示した。凍結融解胚の個体への発生の確認では、凍結融解後の桑実胚 42 個を 3 匹の仮親へ移植した結果、3 匹の仮親が妊娠し、10 匹の産仔が得られた。

##### (2)内視鏡を用いた胚採取、胚移植技術の確立

内視鏡を用いた胚移植の手順について確立できた。これまでの腹部切開での手術による方法と比較すると短時間での実施が可能であり、低侵襲であることから術後の影響もほとんどないと考えられた。今後、これまでの腹部切開での移植方法との比較 (妊娠率、平均産仔数等) について比較検討を実施して

いく予定である。内視鏡による胚移植では、ウサギに対する侵襲が低くストレスの低減などから妊娠率の向上が期待できると思われる。いっぽう、内視鏡下での胚採取方法については、再現性が悪く、残念ながら、実験期間内に再現性のよい手技を確立することができなかった。今後も、さらに検討を継続していく予定である。

以上、凍結保存液に不凍タンパク質 (AFP) を添加することにより、凍結融解後の胚の発生率が向上することを見出した。(論文) ただし、添加する AFP の濃度には至適濃度が存在し、AFP を高濃度で展開した場合は、無添加の対照群よりも凍結融解後の発生率は低下した。また、凍結保存液とデバイスの組み合わせについての検討では、凍結保存液にこれまでウサギでよく用いられていた EDS 液よりも EFS 液を主体とした凍結保存液とクライオトップの組み合わせで凍結した場合、融解後の胚発生率が劇的に向上する事を見出した(論文投稿準備中)。今回の検討からは、EFS 液とクライオトップを用いた凍結法は、ウサギ胚 (桑実胚) の凍結保存に有用な方法になることが示唆された。ウサギ初期胚の凍結保存については、さらなる条件検討が必要と考えられる。

これまで、我々はヒト疾患モデルウサギの系統保存、供給のための拠点形成を目標にウサギ精子の凍結保存に関する検討を進めてきた。実際に、ウサギ精子の凍結保存技術を確立し、我々が開発した遺伝子改変ウサギ系統については凍結精子による保存を実施している。しかし、疾患モデルウサギの系統保存を考えた場合、凍結精子だけではなく凍結胚による保存技術の確立も必須である。本研究で、バイオリソースとしてのウサギ系統保存に必要な基盤技術の基本的な整備を行うことができたと考える。現在、本研究により確立できた手技をもとに、有用な疾患モデルウサギ系統の凍結胚による保存を進めている。しかし、ウサギは、性成熟に時間がかかる、胚の準備は高コストになる等が問題点である。過排卵処置の条件検討や体外受精手技の確立など高効率なウサギの胚作成技術の検討、確立が今後の重要な課題であると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 9 件)

Fan, J., Kitajima, S., Watanabe, T., Xuc, J., Zhang, J., Liu, E., Chen, Y.E. : Rabbit models for the study of human atherosclerosis: From pathophysiological mechanisms to

translational medicine. Pharmacology & Therapeutics 146: 104-119, 2015. 査読あり

DOI:

10.1016/j.pharmthera.2014.09.009

Nishijima, K., Kitajima, S., Koshimoto, C., Morimoto, M., Watanabe, T., Fan, J., Matsuda, Y.: Motility and fertility of rabbit sperm cryopreserved using soybean lecithin as an alternative to egg yolk. Theriogenology 84: 1172-1175, 2015. 査読あり

DOI:

10.1016/j.theriogenology.2015.06.018

Nishijima, K., Tanaka, M., Sakai, Y., Koshimoto, C., Morimoto, M., Watanabe, T., Fan, J., Kitajima, S.: Effects of type III antifreeze protein on sperm and embryo cryopreservation in rabbit. Cryobiology 69: 22-25, 2014. 査読あり

DOI:

10.1016/j.cryobiol.2014.04.014

Nishijima, K., Yamaguchi, S., Tanaka, M., Sakai, Y., Koshimoto, C., Morimoto, M., Watanabe, T., Fan, J., Kitajima, S.: Effects of cholesterol-loaded cyclodextrins on the rate and the quality of motility in frozen and thawed rabbit sperm. Exp. Anim. 63(2): 149-154, 2014. 査読あり

DOI: 10.1538/expanim.63.149

Nishijima, K., Liu, E., Yamaguchi, S., Tanaka, M., Morimoto, M., Watanabe, T., Fan, J. and Kitajima, S.: Delaying embryo development by storing at 4 °C for synchronization to recipients in microinjection technique in rabbits. Lab. Anim. 47: 53-57, 2013. 査読あり

DOI: 10.1258/la.2012.012097

[学会発表] (計 14 件)

松久葉一、秋吉俊明、新見 学、森本正敏、範 江林、北嶋修司 .ウサギ胚凍結におけるデバイスおよび凍結液の比較検討 . 第 63 回日本実験動物学会 2016 年 5 月 18-20 日、ミューザ川崎新フォニーホール(神奈川県・川崎市)

秋吉俊明、松久葉一、江里口理嘉、森本正敏、北嶋修司 .クライオトップを用いたウサギ桑実胚の凍結における凍結保存液の検討 . 第 33 回九州実験動物研究会総会 . 2015 年 11 月 7 日、九州大学(福岡県・福岡市)

北嶋修司、西島和俊、森本正敏、渡辺照男、範 江林 .佐賀大学における遺伝子改変ウ

サギの開発と凍結精子による保存状況 .第 3 回ウサギバイオサイエンス研究会 .2014 年 8 月 2 日、山梨大学(山梨県・甲府市)

西島和俊、秋吉俊明、森本正敏、渡辺照男、範 江林、北嶋修司 .大豆レシチンを用いたウサギ精子の凍結法検討 .第 3 回ウサギバイオサイエンス研究会 .2014 年 8 月 2 日、山梨大学(山梨県・甲府市)

北嶋修司、西島和俊 .遺伝子改変ウサギの開発と維持-医学研究への利用. JALAM シンポジウム .2013 年 5 月 14 日、つくば国際会議場(茨城県・つくば市)

西島和俊、田中麻衣、酒井悠輔、越本知大、森本正敏、渡辺照男、範 江林、北嶋修司 .ウサギの精子および胚凍結における不凍タンパク質の効果 .第 60 回日本実験動物学会総会 2013 年 5 月 15-17 日、つくば国際会議場(茨城県・つくば市)

[その他]

ホームページ等

佐賀大学総合分析実験センター・生物資源開発部門(研究活動の紹介)

<http://www.animal.med.saga-u.ac.jp/index.php?id=2>

当センターで維持している遺伝子改変ウサギ

<http://www.animal.med.saga-u.ac.jp/index.php?id=13>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

北嶋 修司 (KITAJIMA, Shuji)

佐賀大学・総合分析実験センター・准教授  
研究者番号: 7 0 2 8 4 6 4 3

### (2)研究分担者

西島 和俊 (NISHIJIMA, Kazutoshi)

秋田大学・バイオサイエンス教育研究センター・准教授

研究者番号: 7 0 4 3 5 8 7 4

松久 葉一 (MATSUHISA, Fumikazu)

佐賀大学・総合分析実験センター・助教  
研究者番号: 2 0 7 5 4 2 5 3

### (3)連携研究者

範 江林 (FAN, Jianglin)

山梨大学・医学工学総合研究部・教授

研究者番号: 6 0 2 7 2 1 9 2

松田 幸久 (MATSUDA, Yukihiisa)

秋田大学・バイオサイエンス教育研究センター・准教授

研究者番号：50157327