

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月8日現在

機関番号：84420  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21500398  
 研究課題名（和文） 卵巣凍結によるハムスター・スナネズミ・モルモット系統保存法の開発  
 研究課題名（英文）  
 Ovarian cryopreservation in Syrian hamsters, Mongolian gerbils, and guinea pigs.  
 研究代表者  
 鈴木 治 (SUZUKI OSAMU)  
 (独) 医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部, 主任研究員  
 研究者番号：70235935

## 研究成果の概要（和文）：

生物資源保存の重要性が指摘されているが、実験用齧歯類として重要なシリアンハムスター、スナネズミ、モルモットなどは胚・精子凍結保存が完備されていない。そこで卵巣を凍結保存することによる系統保存法の確立を試みた。シリアンハムスターではガラス化保存卵巣由来の産仔が得られたが、スナネズミとモルモットについては産仔が得られなかった。それらの動物種では移植免疫や手術手技を考慮する必要があると思われた。

## 研究成果の概要（英文）：

Preservation of biological resources became more important, but no method for embryo/sperm cryopreservation is well established in Syrian hamsters, Mongolian gerbils, or guinea pigs, which are often used in laboratories. In this study, I tried to establish a method for preservation of these species by ovarian cryopreservation. I obtained pups by orthotopic transfers of vitrified ovaries in Syrian hamsters, but not in gerbils or guinea pigs. Graft immunity and operating procedures need to be considered for ovarian transfers in these two species.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

## 研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：系統保存, 卵巣凍結, ハムスター, スナネズミ, モルモット

## 1. 研究開始当初の背景

医学・農学・生物学などの学術領域では、様々な実験動物が使用されている。昨今、生物資源保存の重要性が指摘され、マウス・ラットにおいては既に胚や精子の凍結技術が確立している。しかし、その他の実験用齧歯類

(具体的にはシリアンハムスター、スナネズミ、モルモット)では配偶子操作技術が未熟なため、胚や精子の凍結保存による系統保存は困難である。そこで胚や配偶子に代わる保存対象として、卵子が豊富に含まれる卵巣組織の活用を有望だと思われた。卵巣保存を軸

とした系統保存には卵巢凍結技術と卵巢移植技術の両者が必要である。卵巢移植については、古くから様々な動物種で試みられた歴史があるものの、マウス・ラット以外の実験用齧歯類についてはほとんど検討がなされておらず、実用段階にはなっていなかった。また、卵巢凍結法の適用例も、申請者がシリアンハムスター卵巢で試行した例しかなく、スナネズミ・モルモットについては全く報告がないのが現状であった。

## 2. 研究の目的

申請者が行ったシリアンハムスターの新鮮卵巢移植や凍結保存卵巢移植の知見を元に、シリアンハムスターにおける卵巢保存・卵巢移植技術の条件を詳細に検討して実用化を図ると共に、現時点で凍結保存による系統保存の方法が実用化されていないスナネズミ・モルモットへの応用を目指す。

## 3. 研究の方法

基本的には Migishima らのガラス化法を利用したマウス用の卵巢移植・凍結保存法を基礎として、ハムスター、スナネズミ、モルモットに応用することを試みた。

申請者がシリアンハムスターで低率ながら産仔を得た実績を踏まえて、まずシリアンハムスターの卵巢凍結保存法、および卵巢移植法の条件、例えば卵巢採取時のドナーの日齢や凍結保存時の卵巢のサイズ、卵巢移植時の麻酔法や止血法などを詳細に検討して実用化を試みた。しかるのちにハムスターの知見を基礎としてスナネズミ・モルモットへ応用を試みた。

卵巢の凍結保存は DAP213 液を用いたガラス化法を採用した。すなわち、卵巢を採取後、適宜細切し、1 M DMSO 液に浸漬後、クライオチューブに卵巢を移し、DAP213 液 (2M DMSO, 1M アセタミド, 3M プロピレングリコール) を加え、直接クライオチューブを液体窒素内に投入し、そのまま保存した。解凍の際にはクライオチューブに 0.25M スクロース液を加えた後、PB1 培地へ卵巢を写して洗浄後、Whitten 培地に移して卵巢移植まで氷冷した。卵巢移植は、動物種により卵巢近

傍の解剖学的構造が若干異なるため、手技は異なる (結果の項を参照)。移植卵巢由来の産仔が得られたかどうかは、後代検定 (産仔の毛色による判定) により確認した。

## 4. 研究成果

### 1) シリアンハムスター (H21 年度)

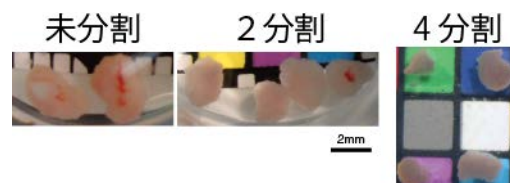


図 1 分割したシリアンハムスター卵巢

シリアンハムスターの系統保存法として配偶子よりも簡便な卵巢の凍結保存法を活用するべく操作手技の簡便化を検討した。卵巢採取時の週齢は、卵巢が小さく、かつ、搬送が必要な可能性などを考慮し、また個体としても扱いやすい離乳直後の 3 週齢が良いと思われた。融解卵巢の借腹雌への移植時の麻酔は、キシラジン・ケタミン注射による麻酔よりも麻酔深度調整が容易で導入および回復が非常に早いガス麻酔 (イソフルレン) が簡便かつ効果的であった。卵巢移植手術の卵巢囊切開時の出血軽減に用いる血管収縮剤としてはエピネフリン液よりもナファゾリン液が有効であった。凍結時の卵巢サイズの影響と疾患モデル動物への適用性を調べるため、心筋症モデル J2N-k 系 (毛色: 白色) と正常対照系統 J2N-n 系 (毛色: 白色) の 3 週齢個体の卵巢を、分割無し (長径約 3.5 mm, 短径約 2 mm), 2 分割 (長径約 2 mm, 短径約 1.5 mm), 4 分割 (長径約 1.5 mm, 短径約 1 mm) の 3 条件でそれぞれガラス化凍結保存した (図 1)。

過去の研究で 4 分割凍結卵巢にてすでに産仔が得られていることから、J2N-n 系由来の凍結卵巢のうち、分割無し卵巢と 2 分割卵巢を解凍し、それぞれ 3 個体と 6 個体の借腹雌 (Slc:Syrian, 毛色: 野生色) の卵巢囊内に移植した。術後回復したのち、J2N-n 系雄と交配して産仔の毛色試験を行ったところ、2 分割卵巢移植雌 (6 匹中 1 匹) で移植卵巢由来産仔が得られたことから、凍結保存時の卵巢サイズは、手間をかけて小さくする必要なく、2

分割程度、すなわち約2ミリ角以下にすればよいことがわかった。また、卵巣凍結保存は心筋症モデル J2N-k 系などの疾患モデルハムスターへも適用可能であることが確認できた。

## 2) スナネズミ (H22 年度)

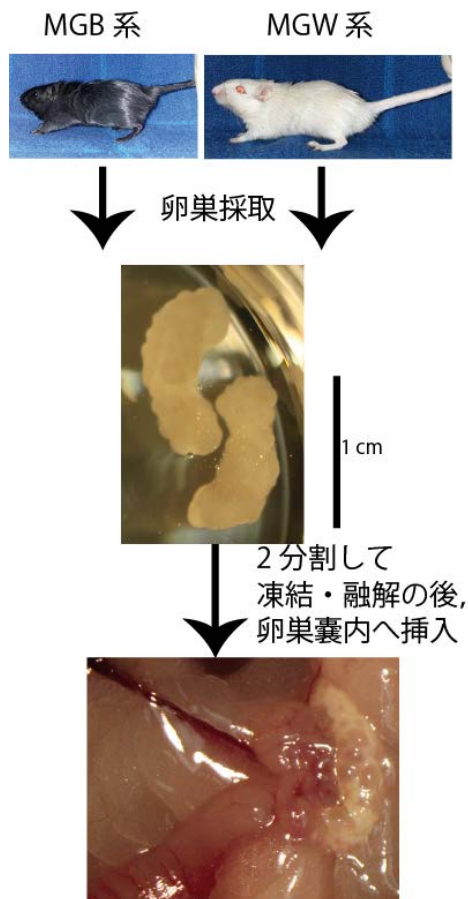


図 2 スナネズミ卵巣凍結・移植

スナネズミの卵巣凍結保存による系統保存法を確立するため、ハムスターで成功したガラス化保存法が使用可能かを検討した。毛色検定が可能なように被毛が白色 (MGW 系) と黒色 (MGB 系) スナネズミを使用した。凍結時の卵巣サイズは長径の半分の位置で 2 分割とし (図 2), DAP213 液によるガラス化法で液体窒素内にて凍結保存した。一方、卵巣嚢内への卵巣移植についてはスナネズミでは卵巣周囲脂肪が少ないうえに卵巣嚢が非常に脆弱という特徴があるため、ハサミではなく、高周波電気メスにより卵巣周囲脂肪と卵巣嚢を切開と同時に止血する方法をとった。また、卵巣が細長いため卵巣嚢に開けた穴を

広げずに卵巣を除去するのは困難なことから、借腹雌自身の卵巣は除去せずに卵巣嚢内の隙間に移植卵巣を滑り込ませる方式をとった。麻酔法はガス麻酔とした。凍結保存卵巣を融解後、MGW 系卵巣を MGB 系雌へ、また逆に MGB 系卵巣を MGW 系雌へ、それぞれ 3 個体ずつ計 6 匹の雌への卵巣移植を実施した。術後回復ののち、移植卵巣と同系統の雄と交配し、毛色検定を試みた。しかし、MGB 卵巣を移植した MGW 雌 1 匹が出産したのみで (毛色は野生色のため失敗)、他はペアリングがうまくいかず、出産には至らなかった。雄との喧嘩による死亡例が MGW 雌 (MGB 卵巣を移植) で 2 例見られたので、剖検したところ卵巣嚢内には借腹雌自身の卵巣とともに変性縮小した卵巣片が見られ、卵巣嚢内への卵巣の挿入・保持には成功しているものの、生着には失敗しているものと思われた。これらのことから、スナネズミ卵巣移植を成功させるには、移植免疫と、スナネズミの特徴であるペアリングの困難さ (一夫一婦制といわれ、組み合わせが難しい) の 2 点に配慮する必要があると思われた。

## 3) モルモット (H23 年度)

モルモットの卵巣凍結保存による系統保存法を確立するため、シリアンハムスターで成功したガラス化保存法が使用可能かを検討した。毛色検定が可能なように被毛が茶色 (Weiser-Maples 系) と白色 (Hartley 系) のモルモットを使用した。凍結用卵巣を Weiser-Maples 系 3 週齢雌より採取し、卵巣を長軸の半分の位置で 2 分割とし (図 3), DAP213 液によるガラス化法で液体窒素内にて凍結保存した。二週間後、8 週齢の Hartley 系雌を借腹雌として卵巣移植を行った。マウス・ハムスター・スナネズミなどの卵巣嚢 (卵巣を完全の覆う袋) とは異なり、モルモットはヒトと同様に卵管がラップ状になって卵巣を覆う形状をしているため卵管采の切開は不要だが、移植卵巣を固定するためには卵巣同士を結紮する必要がある。そこで、借腹雌の卵巣を高周波電気メスで止血しつつ半分切除し、その切断面に移植卵巣を密着させ、さらに糸で結紮するという手法を採った。麻酔法

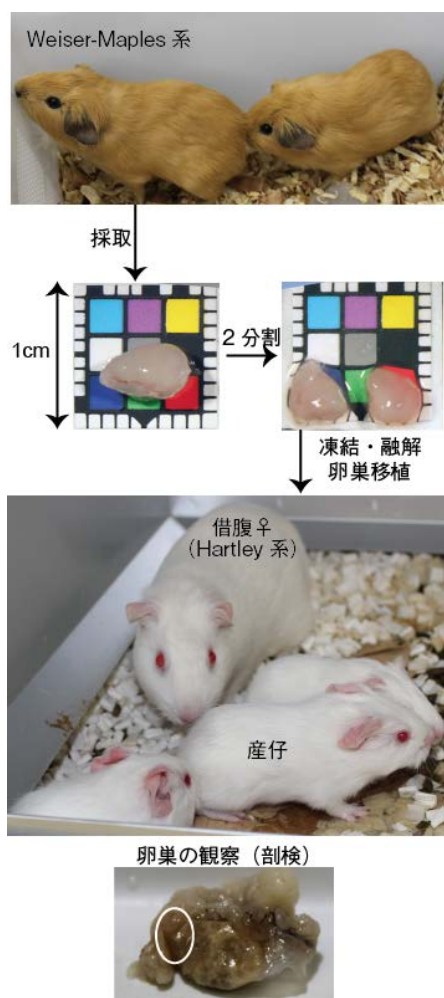


図 3 モルモットの卵巣凍結・移植

はガス麻酔とした。凍結保存卵巣を融解後、8匹の借腹雌の左右の卵巣へそれぞれ凍結保存卵巣（2分割卵巣を1つずつ）の移植を実施した。術後回復ののち、Hartley系雄（13週齢）と交配し、毛色検定を試みた。借腹雌8匹のうち、4匹が2産、4匹が1産し、合計で31匹の産仔が得られたが、毛色は全て白色で、移植卵巣由来で生まれるはずの薄茶の毛色を持つ産仔は得られなかった。剖検したところ、移植卵巣は借腹雌の卵巣に接着しており（写真の円内；ホルマリン固定後に観察）、萎縮等は見られなかったことから拒絶反応はなかったようだが、卵胞構造がなかったことから血管浸潤が不十分であると考えられた。卵管采への癒着もあり、これらのことからモルモット卵巣移植を成功させるには卵巣をうまく借腹雌の卵巣との密着面をさらに広くして血管浸潤を促進し、かつ、卵管采の癒着を防ぐ策を講じるべきと思われた。

## 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4件）

1. Okado H, Ohtaka-Maruyama C, Sugitani Y, Fukuda Y, Ishida R, Hirai S, Miwa A, Takahashi A, Aoki K, Mochida K, Suzuki O, Honda T, Nakajima K, Ogawa M, Terashima T, Matsuda J, Kawano H, Kasai M. The transcriptional repressor RP58 is crucial for cell-division patterning and neuronal survival in the developing cortex. *Dev Biol.* 査読有り, 2009, 331(2):140-151. DOI: [10.1016/j.ydbio.2009.04.030](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.04.030)
2. Suzuki O, Kanai T, Nishikawa T, Yamamoto Y, Noguchi A, Takimoto K, Koura K, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Tsuji S, Matsuda J. Adult onset cardiac dilatation in a transgenic mouse line with Gal $\beta$ 1,3GalNAc  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase II (ST3Gal-II) transgenes: a new model for dilated cardiomyopathy. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B.* 査読有り, 87(8):550-562, 2011. DOI: [10.2183/pjab.87.550](https://doi.org/10.2183/pjab.87.550)
3. Akiyama T, Suzuki O, Matsuda J, Aoki F. Dynamic replacement of histone H3 variants reprograms epigenetic marks in early mouse embryos. *PLoS Genet.*, 査読有り, 7(10):e1002279, 2011. DOI: [10.1371/journal.pgen.1002279](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002279)
4. Suzuki O, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Use of sample mixtures for standard curve creation in quantitative Western blots. *Exp. Anim.*, 査読有り, 60(2):193-196, 2011. DOI: [JST.JSTAGE/expanim/60.193](https://doi.org/10.1531/journal.pgen.1002279)

〔学会発表〕（計25件）

1. Suzuki O, Ageyama N, Terao K. Accumulation of type VI collagen in cardiomyopathic monkey hearts. *Experimental Biology 2009, New Orleans, LA, USA*（実験生物学 2009, ニューオーリンズ, 2009年4月18日～22日）

2. **鈴木 治**、小浦美奈子、野口洋子、山田-内尾こずえ、松田潤一郎、高木博隆「心筋症シリアンハムスター (J2N系) の心臓における6型コラーゲンの増加」第56回日本実験動物学会総会、大宮、2009年5月14日-16日
3. 野口洋子、高野 薫、小浦美奈子、中村和臣、**鈴木 治**、松田潤一郎「低蛋白飼料投与によるEL てんかんモデルマウスの繁殖効率の改善(II)ー臓器重量、血液生化学値の検討」第56回日本実験動物学会総会、大宮、2009年5月14日-16日
4. **鈴木 治**、小浦美奈子、野口洋子、山田-内尾こずえ、松田潤一郎「マウス性腺刺激ホルモン受容体の系統間比較」第102回日本繁殖生物学会総会、奈良、2009年9月10日~12日
5. **Suzuki O**, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Increased collagen type VI content in the hearts of cardiomyopathic Syrian hamsters (J2N strain). 60th National Meeting of the American Association for Laboratory Animal Science, Denver, CO, USA (第60回アメリカ実験動物学会年次総会, デンバー, 2009年11月8日~12日)
6. **Suzuki O**, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Strain difference in luteinizing hormone receptor protein expression in mouse ovaries. 49th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, San Diego, CA, USA (第49回アメリカ細胞生物学会年次総会, サンディエゴ, 2009年12月5日~9日)
7. 小浦美奈子、野口洋子、**鈴木 治**、中村和臣、松田潤一郎「クローズドコロニーddYの中から発見された走行発作を伴うてんかん様の症状を呈するマウスについて」第104回関西実験動物研究会、京都、2009年12月11日
8. **Suzuki O**, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Improved superovulation induction in A/J mice based on the luteinizing hormone receptor protein expression pattern. 14th International Congress of Endocrinology, Kyoto, Japan. (第14回国際内分泌会議, 京都, 2010年3月26日~30日)
9. **Suzuki O**, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, and Matsuda J. Sequence analysis of type VI collagen subunits in cardiomyopathic hamster hearts. Experimental Biology 2010, Anaheim, CA, USA (実験生物学 2010, アナハイム, 2010年4月24日~28日)
10. **鈴木 治**、小浦美奈子、野口洋子、山田-内尾こずえ、松田潤一郎「マウス排卵誘起におけるhCGの血中動態」第57回日本実験動物学会総会、京都市、2010年5月12日~14日
11. **Suzuki O**, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, and Matsuda J. Heart miRNA cloning in cardiomyopathic (J2N-k) and normal (J2N-n) Syrian hamsters. GENETICS 2010: Model Organisms to Human Biology meeting, Boston, MA, USA (遺伝学 2010 ミーティング: モデル生物からヒト生物学へ, ボストン, 2010年6月12日~15日)
12. **鈴木 治**、小浦美奈子、野口洋子、山田-内尾こずえ、松田潤一郎「シリアンハムスター卵巣凍結保存における卵巣サイズの影響」第103回日本繁殖生物学会総会、十和田市、2010年9月2日~4日
13. 小浦美奈子、島かおる、中村和臣、野口洋子、**鈴木 治**、鈴木和男、亀岡洋祐、松田潤一郎. 急速進行性糸球体腎炎モデル SCG/ThpNkc マウスの繁殖及び腎炎の発症状況について. 第44回日本実験動物技術者協会総会、旭川 2010年9月3~4日.
14. 中村和臣, 小浦美奈子, 野口洋子, **鈴木 治**, 松田潤一郎. BALB/c 凍結胚における個体復元率の改善. 第44回日本実験動物技術者協会総会, 旭川, 2010年9月3日~4日
15. **Suzuki O**, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, and Matsuda J. O-GlcNAcylation of heart proteins in cardiomyopathic (J2N-k) and normal

- (J2N-n) Syrian hamsters. 60th National Meeting of the American Association for Laboratory Animal Science, Atlanta, GA, USA (第 61 回アメリカ実験動物学会年次総会, アトランタ, 2010 年 10 月 10 日～14 日)
16. **Suzuki O**, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Elevated *O*-GlcNAcylation of heart proteins in cardiomyopathic transgenic mice with St3gal2 transgene. 49th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, Philadelphia, PA, USA (第 50 回アメリカ細胞生物学会年次総会, フィラデルフィア, 2010 年 12 月 11 日～15 日)
  17. **Suzuki O**, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, and Matsuda J. Effect of ovarian size on the viability of cryopreserved Syrian hamster ovaries. 37th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Orland, FL, USA. (第 37 回国際胚移植学会年次総会, オーランド, 2011 年 1 月 8 日～12 日)。
  18. **Suzuki O**, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J, Elevated *O*-GlcNAcylation of ATP synthase  $\beta$  subunits in cardiomyopathic hearts in Syrian hamsters, Experimental Biology 2011, Washington, DC, USA (実験生物学 2011, ワシントン DC, 2011 年 4 月 9 日～13 日)。
  19. **鈴木 治**, 小浦 美奈子, 野口 洋子, 山田-内尾 こずえ, 松田 潤一郎, シアル酸転移酵素過剰発現マウスの心筋症様心臓における Calreticulin の増加, 第 58 回日本実験動物学会総会, 東京, 2011 年 5 月 25 日～27 日。
  20. **Suzuki O**, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J, Sequence analysis of the ovarian Kiss1 cDNA in the Mongolian gerbil and Syrian hamster, ENDO 2011: The 93rd Annual Meeting & Expo, Boston, Massachusetts, USA (アメリカ内分泌学会, ボストン, 2011 年 6 月 4 日～7 日)。
  21. **鈴木 治**, 小浦 美奈子, 野口 洋子, 山田-内尾 こずえ, 松田 潤一郎, 雄への dehydroepiandrosterone 徐放剤投与がマウス体外受精へ及ぼす影響, 第 104 回日本繁殖生物学会大会, 盛岡, 2011 年 9 月 15 日～17 日。
  22. **Suzuki O**, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J, Increase of calreticulin in hearts of cardiomyopathic mice with sialyltransferase transgenes, 2011 AALAS National Meeting, San Diego, California, USA (第 62 回アメリカ実験動物学会年次総会, サンディエゴ, 2011 年 10 月 2 日～6 日)。
  23. **Suzuki O**, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J, Effects of dehydroepiandrosterone on androgen receptor protein expression in testes and epididymides in two strains of mice, 2011 annual meeting of the American Society for Cell Biology, Denver, Colorado, USA (第 51 回アメリカ細胞生物学会年次総会, 2011 年 12 月 3 日～7 日)。
  24. **鈴木 治**, 小浦 美奈子, 野口 洋子, 山田-内尾 こずえ, 松田 潤一郎, 拡張型心筋症の動物モデル 2 種 (マウスとハムスター) における心臓カルシニューリンの発現比較, 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011 年 12 月 13 日～16 日。
  25. **Suzuki O**, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J, Effects of dehydroepiandrosterone on sperm fertilizability in vitro and testicular gene expression, 38th Annual Conference of the IETS, Phoenix, Arizona, USA. (第 38 回国際胚移植学会年次総会, フェニックス, 2012 年 1 月 7 日～10 日)。

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

鈴木 治 (SUZUKI OSAMU)

(独) 医薬基盤研究所・難病疾患資源研究部・主任研究員

研究者番号：70235935