

## 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 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500386

研究課題名（和文） ヒト疾患モデルウサギの精子バンク構築に向けての関連技術の整備

研究課題名（英文） Technical maintenance to establish a rabbit sperm bank for 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

研究成果の概要（和文）：

我々は、ヒト疾患モデルウサギの精子バンク構築のために必須であるウサギ精子凍結保存手技、および凍結融解精子を用いた人工授精条件等に関する検討を行った。その結果、凍結保存溶液の改良、凍結条件の見直しを行うことにより凍結融解後の精子運動率を従来の方法より向上させることができた。また、実際に、我々が確立した方法を用いて、遺伝子改変ウサギ6系統について凍結精子による保存を実施した。

研究成果の概要（英文）：

We developed and improved protocols of rabbit semen cryopreservation and artificial insemination, these protocols are important to establish a rabbit sperm bank of human disease models. We completed cryopreservation of six genetically modified rabbits by frozen semen and made public information of these rabbits on the web site.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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（凍結保存）

キーワード：疾患モデル、遺伝子改変ウサギ

### 1. 研究開始当初の背景

我々はヒトの生活習慣病の疾患モデル動物としてのウサギの有用性、重要性に着目し、遺伝子導入(Tg)ウサギの開発技術の整備、ならびに実際にヒトの生活習慣病をターゲットとした疾患モデルとして Tg ウサギの開発を進めてきたこれまでに、9種類の遺伝子をそれぞれ導入した Tg ウサギの開発に成功し、このうち6系統の Tg ウサギを利用して得られた研究成果について、共同研究者とともに論文発表等を行なってきた。これら Tg ウサギをバイオリソースとして保存し、必要とす

る研究者への供給体制を整えるためには、ウサギの精子および胚の凍結保存技術と凍結保存された配偶子から個体を得るための技術の確立が必要である。しかし、これまでにウサギの精子・胚の凍結手技については、いくつかの方法が報告されてはいるものの、研究者により手技や成績がまちまちで、標準的な手法はいまだ確立されていなかった。今後、マウスではできない実験・研究にウサギの重要性が高まってくることが期待されることから、疾患モデルウサギのデータベース整備や系統保存のための精子・胚バンクの設立が

急務であると考えられる。国外では、家畜としての品種維持を目的にしたウサギの胚バンクがあるが、疾患モデルウサギを対象とした利用可能なウサギの精子もしくは胚バンクは存在していない。

## 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いる。そのため、これらの研究分野では、マウス以外の動物種の開発が望まれている。本研究では、これらの研究分野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に必要となる基盤技術の整備を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 新たな精子凍結保存溶液の開発と精子凍結条件検討：

これまでに報告されているウサギ精子凍結保存液について、凍結融解後の精子運動率を指標に比較検討する。また、精子の冷却速度、融解時の温度条件等について詳細な検討を行い、凍結・融解手順の改良、確立を行なう。さらに、これまで報告されている凍結保存液には、ニワトリの卵黄が含まれている。卵黄は、家畜の精子凍結の際も凍結保存液にしばしば加えられているが、品質が安定しない、微生物汚染の原因になる等の問題点を有している。そのため、前述の精子凍結条件の検討と平行して、卵黄を含まず、化学的に構成成分が明らかな新規の凍結保存液の開発も検討する。

### (2) 凍結精子を用いた人工授精の効率的な条件の検討：

凍結融解精子を用いた人工授精の効率的な条件について、凍結融解精子の腔内への注入数、精子注入と排卵誘発のための（ヒト絨毛性ゴナドトロピン）hCG 投与時間の調整等について、妊娠率と産仔数を指標として検討を行う。

### (3) 凍結精子の輸送条件の検討：

近年、マウスでは、凍結配偶子の輸送にドライシッパーを使用しない簡便な手段として、ドライアイスを使用した方法が利用されている。ウサギ凍結精子においてもドライアイスによる輸送が可能であれば、有用な手段となる。そこで、ウサギ凍結精子について、ドライアイス中の保存性について、ドライアイス中に保存された場合の融解後精子運動率の変化を経時的に検討する。

### (4) ヒト疾患モデルウサギの精子凍結による系統保存：

現在、系統維持中の Tg ウサギから精子を採取し、本研究課題で確立したウサギ精子凍結法を用いて凍結精子による系統保存を開始する。凍結保存を完了した系統については、データベース化し論文ならびにホームページに公表する。

## 4. 研究成果

### (1) 新たな精子凍結保存溶液の開発と精子凍結条件検討：

ウサギの精子凍結保存液については、いくつかの凍害防止剤を用いた方法が報告されている。いずれも凍結融解後に生存精子が得られること、人工授精後に産仔が得られることが報告されている。まず、これらの中からもっとも安定した成績を示す凍結保存液を確認するとともに、凍結融解後の精子運動率を指標に精子の冷却速度等について検討を進めた。その結果、卵黄アセトアミド溶液が最も安定した結果を示した。次に、卵黄アセトアミド溶液を用いて冷却速度の検討を実施した。冷却速度が遅くなるにしたがい凍結融解後の精子運動率は高い値を示す傾向が観察された。 $-0.8^{\circ}\text{C}/\text{min}$  よりも速い速度で冷却した場合、融解後の精子運動率は有意に低下した。また、凍結保存効率の向上として、ウサギ精子に Cholesterol-loaded cyclodextrin (CLC) を添加することで、凍結融解後の精子運動率が有意に上昇する事を確認した。さらに、CLC を添加した凍結融解精子を用いて人工授精後の卵の受精率（人工授精後 24 時間で評価）を検討したが、非添加群に比べて高い受精率を示した。

卵黄アセトアミド溶液に含まれる卵黄除去に関する検討で、我々は卵黄の代わりに大豆由来のレシチンを加えることで、凍結融解後の精子運動率について同等の成績が得られるという結果を得た。今後、レシチンを添加した凍結保存溶液を用いて凍結した精子を用いて人工授精を実施し、妊娠率、産仔数等について評価する予定である。

### (2) 凍結精子を用いた人工授精の効率的な条件の検討：

人工授精に用いる精子数を増やすことにより妊娠率、平均産子数ともに向上する傾向が観察された。人工授精に用いた精子数あたりの産子数で比較した場合、 $40 \times 10^6$  個の運動精子を用いたときが最も効率よく産子を得られることが示唆された。また、人工授精における精子注入とドナーウサギの排卵誘発時間について、人工授精後 5 時間と 10 時間で排卵させる群で比較検討を行ったが、両者で有意な差は認められなかった。

(3)凍結精子の輸送条件の検討：

凍結後、液体窒素からドライアイス中に移動し、2日間保存された後に融解した精子において人工授精に必要な数の運動精子が得られることが確認できた。今後、実際にドライアイスを用いた凍結精子の輸送を行い、融解後の精子から産子が得られるかについての検討を行う予定である。

(4)ヒト疾患モデルウサギの精子凍結による系統保存：

本研究期間内に我々の施設で維持している6系統すべてのTgウサギ系統について凍結精子の保存を実施することができた。これらのウサギ系統については、ホームページ上にて公表を行った。本研究により、ヒト疾患モデルウサギの精子バンク確立のための基盤技術の整備と実際に凍結精子による系統保存の実施を進める事ができたと考えられる。

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12件)

- ① 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.* 査読有り, 47: 53-57, 2013. DOI: 10.1258/la.2012.012097
- ② Wang, Y., Niimi, M., Nishijima, K., Yu, Y., Koike, T., Kitajima, S., Inoue, T., Waqar, A. B., Liu, E., Kohashi, M., Keyamura, Y., Yoshigawa, T., Zhang, J., Ma, L., Zha, X., Watanabe, T., Asada, A., Y. Chen, E. and Fan, J.: Human apolipoprotein AII protects against diet-induced atherosclerosis in transgenic rabbits. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 査読有り, 33: 224-231, 2013. DOI: 10.1161/ATVBAHA.112.300445
- ③ Chen, Y., Wang, Z., Zhang, G., Fan, W., Tao, Y., He, W., Zhao, S., Hung, B., Fan, J., Kitajima, S., Liu, E.: Genetic characterization of four wild species of Chinese marmots using microsatellite markers. *Biologia* 査読有り, 67(5): 1013-1017, 2012. DOI: 10.2478/s11756-012-0088-8
- ④ Nishijima, K., Saitoh, R., Tanaka, S., Ohsato-Suzuki, M., Ohno, T., Kitajima, S.: Life span of Common Marmoset (*Callithrix jacchus*) at CLEA Japan breeding colony. *Biogerontol.* 査読有り, 13(4): 439-443, 2012. DOI: 10.1007/s10522-012-9388-1
- ⑤ Maeda, T., Liu, E., Nishijima, K., Tanaka, M., Yamaguchi, S., Morimoto, M., Watanabe, T., Fan, J. and Kitajima, S.: Effect of the primary cooling rate on the motility and fertility of the frozen-thawed rabbit spermatozoa. *World Rabbit Sci.* 査読有り, 20: 65-70, 2012. DOI: 10.4995/wrs.2012.1080
- ⑥ Zhang, J., Ying Yu, Y., Nakamura, K., Tomonari Koike, T., Waqar, A. B., Zhang, X., Liu, E., Nishijima, K., Kitajima, S., Shiomi, M., Qi, Z., Yu, J., Graham, M. J., Crooke, R. M., Ishida, T., Hirata, K., Hurt-Camejo, E., Chen, Y. E., Fan, J.: Endothelial lipase mediates HDL levels in normal and hyperlipidemic rabbits. *J. Atheros. Thromb.* 査読有り, 19(3): 213-226, 2012. DOI: 10.5551/jat.11148
- ⑦ Kitajima, S., Maeda, T., Liu, E., Nishijima, K., Morimoto, M., Watanabe, T. and Fan, J.: Age is an important factor influence on the number of recovered eggs in superovulated rabbits: Analysis of our past 5 years data of 509 rabbits superovulated by FSH or PMSG. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.* 査読有り, 38(3): 169-174, 2011. [http://biomedicum.ut.ee/sjlas/38\\_3\\_169-174.pdf](http://biomedicum.ut.ee/sjlas/38_3_169-174.pdf)
- ⑧ Matsuda, S., Yamashita, A., Sato, Y., Kitajima, S., Koike, T., Sugita, C., Moriguchi-Goto, S., Hatakeyama, K., Takahashi, M., Koshimoto, C., Matsuura, Y., Iwakiri, T., Chen, Y. E., Fan, J. and Asada, Y.: Human C-reactive protein enhances thrombus formation after neointimal balloon injury in transgenic rabbits. *J. Thromb. Haemost.* 査読有り, 9: 201-208, 2011. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2010.04086.x
- ⑨ 北嶋修司, 西島和俊: ウサギ精子・胚の凍結保存とバイオリソース. *アニテックス*. 査読無し, 22(3): 32-37, 2010.
- ⑩ 範江林, 小池智也, 西島和俊, 北嶋修司: 医学研究における遺伝子改変ウサギの応用とその展望. *アニテックス*. 査読無し, 22(3): 11-15, 2010.
- ⑪ 西島和俊, 山口慎二, 森本正敏, 渡辺照男, 北嶋修司: 遺伝子改変ウサギの系統維持のための精子凍結保存の有用性に関

する検討:約 5.6 年間凍結保存された遺伝子組換えウサギ由来精子を用いた人工授精成績. 九州実験動物雑誌. 査読有り, 19: 35-39, 2010.

<http://www.miyazaki-med.ac.jp/AnimalCenter/11/26.html>

- ⑫ Ding, Y., Yamada, S., Wang, K. Y., Shimajiri, S., Guo, X., Tanimoto, A., Murata, Y., Kitajima, S., Watanabe, T., Izumi, H., Kohno, K., Sasaguri, Y.: Overexpression of peroxiredoxin 4 protects against high-dose streptozotocin-induced diabetes by suppressing oxidative stress and cytokines in transgenic mice. *Antioxid. Redox Signal.* 査読有り, 13(10): 1477-1490, 2010.  
DOI: 10.1089/ars.2010.3137
- [学会発表] (計 21 件)
- ① 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、筑波
- ② 王 瑤、新見 学、西島和俊、Ahmed Bilal Waqar、于 瑩、小池智也、北嶋修司、範江林、ヒトアポリポ蛋白 A-II は動脈硬化を抑制する:新しいトランスジェニックウサギモデルの開発及び応用、第 60 回日本実験動物学会総会、2013 年 5 月 15-17 日、筑波
- ③ 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、筑波
- ④ 田中麻衣、西島和俊、酒井悠輔、森本正敏、越本知大、渡辺照男、北嶋修司、Cholesterol-loaded cyclodextrin を添加したウサギ精子の凍結融解後の運動性、第 30 回九州実験動物研究会総会、2012 年 11 月 10-11 日、長崎
- ⑤ 北嶋修司、ウサギバイオリソース整備に向けての試み、公開シンポジウム「先進医療研究に貢献するウサギ疾患モデルの開発と動脈硬化の病態解明への応用」、2012 年 8 月 11 日、山梨
- ⑥ 西島和俊、増山律子、田中麻衣、森本正敏、渡辺照男、範江林、北嶋修司、ヒト C-反応性蛋白遺伝子導入ウサギの骨代謝、第 1 回ウサギバイオサイエンス研究会、2012 年 8 月 4 日、宮崎
- ⑦ Koike, T., Kitajima, S., Nishijima, K., Liu, E., Teruo Watanabe, T., Fan, J., Apolipoprotein A-II plays an important role in lipid metabolism, 第 1 回 日中合同ウサギバイオサイエンスフォーラム、

2012 年 8 月 4 日、宮崎

- ⑧ 山口慎二、西島和俊、森本正敏、渡辺照男、北嶋修司、ウサギ精子凍結融解後の運動率に及ぼす Cholesterol-loaded cyclodextrin 添加の影響、第 29 回九州実験動物研究会総会、2011 年 11 月 12 日、鹿児島
- ⑨ Nishijima, K., Yamada, Y., Tanaka, H., Kitajima, S., Yamaguchi, S., Morimoto, M., Tanaka, K., Nishida, Y., Assessment of energy expenditure in rabbit with doubly-labeled water method, The 4th International Meeting on Rabbit Biotechnology, July 30 - Jun 1, 2011, Budapest, Hungary
- ⑩ Koike, T., Kitajima, S., Nishijima, K., Liu, E., Watanabe, T., Fan, J., Apolipoprotein-AII plays an important role in lipid metabolism and atherosclerosis, The 4th International Meeting on Rabbit Biotechnology, July 30 - Jun 1, 2011, Budapest, Hungary
- ⑪ 西島和俊、山口慎二、森本正敏、渡辺照男、北嶋修司、Cholesterol loaded cyclodextrin の添加はウサギの凍結融解後精子の運動率を高める、第 58 回日本実験動物学会総会、2011 年 5 月 25-27 日、東京
- ⑫ Matsuda, S., Yamashita, A., Kitajima, S., Fan, J., Asada, Y., Human C-reactive Protein Enhances Thrombus Formation In Transgenic Rabbits, (Core 7. Vascular Disease: Biology and Clinical Science, Session Title: Sol Sherry Distinguished Lecture in Thrombosis: New Mechanisms and New Targets in Thrombosis, Abstract 12227), AHA Scientific Session Nov 13-17, 2010, Chicago, USA
- ⑬ 西島和俊、小池智也、山口慎二、森本正敏、渡辺照男、範江林、北嶋修司、ヒト apoAII 遺伝子導入ウサギの特性:ヒト家族性複合型高脂血症の新規モデル動物、第 28 回九州実験動物研究会総会、2010 年 10 月 23 日、福岡
- ⑭ 山口慎二、前田達弘、西島和俊、森本正敏、北嶋修司、ウサギ凍結精子を用いた人工授精成績の向上に関する検討、第 28 回九州実験動物研究会総会 2010 年 10 月 23 日、福岡
- ⑮ 松田幸久、稲垣秀晃、柴田淑子、北嶋修司、西島和俊、受精卵移植による秋田大型ウサギの SPF 化、第 4 回ウサギフォーラム、2010 年 7 月 24 日、秋田
- ⑯ 西島和俊、山口慎二、森本正敏、渡辺照男、北嶋修司、長期保存された遺伝子改変ウサギ凍結精子の受精能の検討、第 4 回

ウサギフォーラム、2010年7月24日、秋田

- ⑰ 松田俊太郎、山下 篤、北嶋修司、小池智也、範 江林、浅田祐士郎、ヒト C 反応性蛋白は心血管疾患における血栓形成に影響を与えるか? 遺伝子 改変ウサギを用いた動脈硬化性血栓形成の検討、第 4 回ウサギフォーラム、2010年7月24日、秋田
- ⑱ Matsuda, S., Kitajima, S., Koike, T., Fan, J. and Asada, J., Human C-reactive protein enhances thrombus formation in transgenic rabbits, The 42nd Annual Scientific Meeting of the Japanese Atherosclerosis Society, July 15-16, 2010, Gifu.
- ⑲ Koike, T., Kitajima, S., Yu, Y., Nishijima, K., Waqar, AB., Inoue, T., Wang, Y., Zhang, B., Kobayashi, J., Masatoshi, M., Saku, K., Watanabe, T. and Fan, J., Expression of Human ApoAII in Transgenic Rabbits Leads to Dyslipidemia -A New Model for Combined Hyperlipidemia, The 42nd Annual Scientific Meeting of the Japanese Atherosclerosis Society, July 15-16, 2010, Gifu.
- ⑳ 田中 慎、西島和俊、大野民生、北嶋修司、ウサギの大腿骨特性について、第 57 回日本実験動物学会総会、2010年5月14-16日、京都
- ㉑ 北嶋修司、西島和俊、劉 恩岐、小池智也、森本正敏、渡辺照男、範 江林、佐賀大学におけるヒト疾患モデルとしての遺伝子改変ウサギの開発と保存状況について、第 57 回日本実験動物学会総会 2010年5月14-16日、京都

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)  
○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

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

## 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：70284643

### (2) 研究分担者

西島 和俊 (NISHIJIMA KAZUTOSHI)

佐賀大学・総合分析実験センター・助教  
研究者番号：70435871  
(H24：連携研究者)

### (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：60272192