

配偶子凍結が加齢に及ぼす影響と動物福祉に配慮した個体管理システムの開発
(24-14)

主任研究者 小木曾 昇 国立長寿医療研究センター 実験動物管理室 (室長)

研究要旨

3年間全体について

発生工学技術を利用した配偶子（精子、胚）凍結が動物の加齢に及ぼす影響について、遺伝・育種学、生理学を駆使した個体レベルの解析から病理学を中心とした組織レベルの解析までを網羅的に調査・研究する。加えて、近年、動物倫理、動物愛護の観点から最も重要とされる実験動物福祉に配慮したエンリッチメント等を用いた加齢変化の究明と個体管理システムの開発を行う。

配偶子の凍結保存には、精子と胚（体内のみではなく体外受精による受精卵も含めて考える）が考えられており、それぞれの場合での検討を配偶子を調整するタイミングも考慮しつつ、時間軸にそった調査を行うことで加齢に対する影響を解析する。具体的には配偶子の凍結、あるいは胚移植する際の融解により得たモデル動物（遺伝子組換え、ミュータント）を用いて、繁殖させることで、遺伝・育種学的には出産率、離乳率をはじめ、体重、生存日齢、外観観察、臓器重量、動物の特性等、生理学的に血圧、体温測定等、病理学的に組織作製と病変観察等を行い加齢に及ぼす影響について解析する。一方、実験動物福祉に配慮した飼育環境の開発・改善については、種々のエンリッチメントや床敷材（営巣用）を導入して加齢変化を究明するだけでなく、動物個体やケージ識別等を含めた個体管理システムの開発を目指していく。

平成26年度について

発生工学技術を利用した配偶子（精子、胚）凍結から蘇生した個体について、遺伝・育種学、生理学を駆使した個体レベルの解析から病理学を中心とした組織レベルの解析までを網羅的に調査・研究した。加えて、エンリッチメント等を用いた加齢変化の究明と個体管理システムの開発を行った。

モデル動物を用いた体外受精、胚の凍結や融解、胚移植については常法に従って行った。その結果、受精率は良好であったものの、胚の凍結の有無に関わらず胚移植した個体の出産匹数では系統差が顕著に認められた。得られた個体については現在、加齢に伴う動物の特性等を調査している。一部のマウス系統では、体外受精で得た個体の寿命が

自然交配で得た個体よりも延びていることがわかった。

動物個体やケージ識別等を含めた個体管理システムでは、個体識別及び個体管理の双方を兼ね備える個体識別用のタグを検討し、試作品の作製を進めた結果、個体管理データベースとなるシステムは完成し実用試験を開始した。

主任研究者

小木曾 昇 国立長寿医療研究センター 実験動物管理室 (室長)

分担研究者

丸山 光生 国立長寿医療研究センター 老化機構研究部 (部長)

研究期間 平成24年4月1日～平成27年3月31日

A. 研究目的

近年、ヒトの高齢化が社会問題となりつつあるなか、高齢出産を含めた生殖医療（体外受精、卵子凍結保存）のあり方がここ最近クローズアップされている。

ヒト個体加齢による卵（卵子）の機能低下に関する科学的な情報の集積は今後の生殖医学の発展にも急務であるが、加齢による変化を形態的、機能的に検討した報告は実験動物レベルも含めて非常に極めて少なく、ヒトにおいてはほとんど存在しない。

また昨今、生殖医療で生まれる子どもは、年々増加傾向にあり（2010年 24万2千件、2万8千人、日本産婦人科学会報告）、生殖医療による子どもの健康影響を疑う研究が進んでいる。多いのは『ゲノムインプリンティング異常症』であり、小児癌である「ベックウイズ・ヴィーデマン症候群（BWS）」、胃腸障害や肥大型心筋症などを合併とする「シルバー・ラッセル症候群（SRS）」、肥満による糖尿病や精神遅延を発症する「ブラウダー・ウイリー症候群（PWS）」が報告されている。しかし、生殖医療とゲノムインプリンティング異常症との関係を否定する報告も出ている。この関連を明らかにするには、より大きな規模での長期にわたる研究、すなわち生殖医療で生まれた子の健康を追跡調査する必要があるが日本にはこの仕組みがない。

動物実験における遺伝子組換え動物（Tg, KO, KI）を用いた実験は、医学・ライフサイエンス研究には必要不可欠であり、年々遺伝子組換え動物が作製されるとともに、保存（配偶子凍結）も頻繁かつ積極的に行われている。老化の基礎研究においても遺伝子組換え動物は、認知症（アルツハイマー病含む）の発症メカニズムや治療（例、創薬開発）の他、細胞や遺伝子レベルでの老化メカニズムの解析が多く進められている。しかし、動物実験においては、生殖工学技術を用いた卵子（細胞）から個体レベルでの老化メカニズムの解

析を主とした報告が全くない。

本研究では、老化（モデル）動物を用いた配偶子（卵子）の老化から個体の加齢に伴う広範囲な老化メカニズムについて生殖工学的的手法（体外受精、配偶子凍結保存）を利用して分子生物学、生理学、形態学および育種学的に網羅的に解析を進める。

申請者は、生殖工学技術を用いた加齢・老化マウスのクリーン化（病原性微生物除去）を行う中で、体外受精培養液による受精率の変化、細胞分裂の停止（2 cell blocking）、蘇生した個体の変異について経験し報告を行ってきたが、培養液の組成や培養環境による影響が細胞周期や増殖に関わる遺伝子発現に変化が発生すると推察した。

B. 研究方法

3年間全体について

1. モデル動物を用いた発生工学技術による個体作製について

モデル動物の中で、遺伝子組換え動物については、分担研究者（丸山）が11系統を選定した。

1) 胚の採取、体外受精、胚移植、胚凍結・融解

実験には、8~64週齢の遺伝子組換え動物の雄マウスの精巣上体尾部から精子、および過排卵処理（PMSG,hCG）した5~32週齢の雌マウス（C57BL/6J,C57BL/6N,ICR,老化促進マウス（SAM）遺伝子組換え系統）から卵子を採取し体外受精を行った。翌日、発生した2細胞期胚の受精率を算出した。その2細胞期胚を未凍結群と凍結群に分けて、未凍結群はレシピエントマウスに移植（出産率）し、一方、凍結群は融解（胚回収率、形態的正常胚率）し移植（出産率）を行った。それぞれの手法については常法に従って行った（図1）。

2) 老化促進モデルマウス（SAM系統）を用いた体外受精

老化促進モデルマウスであるSAM系統（SAMR1/TaSlc, SAMP1/SkuSlc, SAMP8/TaSlc, SAMP10/TaSlc）およびそのバックグランドであるAKR/Nの体外受精を上記と同様の手法を用いて行い、受精率（4~6時間後および24時間後）、出産率および離乳率を算出した。なお実験には雌雄とも同じ系統のマウスを使用し、雄は2~3ヶ月齢の個体を、雌については5~7週齢の個体を用いた。SAMP10については、上記の方法で体外受精を行った結果、出産率および離乳率が著しく低い値を示したため、精子前培養培地をFERTIUP®-前培養培地に変更して2回目の体外受精を行った。

3) 動物個体の特性調査

出産した個体を用いて、経時的に体重の測定、個体の外観観察、個体の繁殖について週齢に伴い解析した。

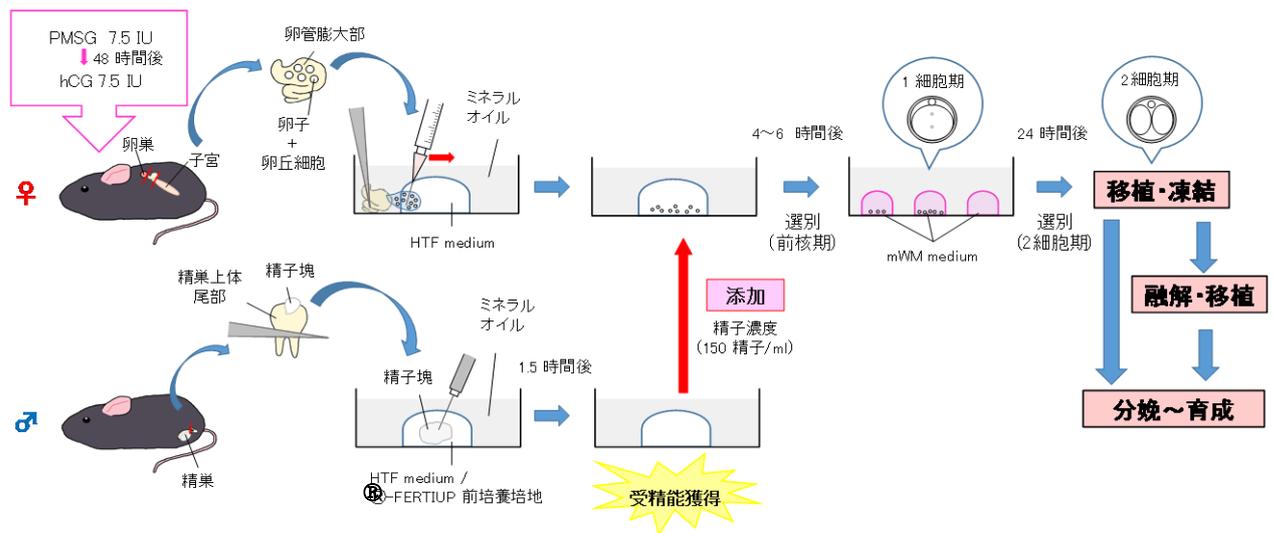


図 1. 発生工学技術を用いた個体作製法（体外受精・胚移植・胚凍結）

2. 動物個体識別と個体管理システム

動物個体を識別するための材質、重量、耐久性等について、実験動物関連器材メーカーの識別機器について検討を行った（図 2）。また、実際にそのタグをマウス個体に装着し、外傷やタグの脱落等について経過観察を行った。個体識別用のリーダーには、タブレット端末（iPad）を用いた。

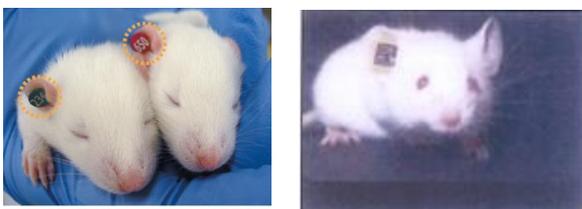


図 2 耳タグ法（左:番号タグ、右:バーコードタグ）

平成 26 年度について

発生工学的手法によって得た動物個体の特性調査（体重測定、行動や症状を含めた外観観察等）を行った。また、動物個体管理システムについては、個体管理データベースの内容等を業者と共同で作業を進めた。

（倫理面への配慮）

3 年間全体について（平成 26 年度含む）

主任研究者を含むすべての研究に関わる動物実験実施者に関しては、実験動物の福祉を順守し、動物愛護上の配慮を踏まえ、的確に管理を行った。さらに一部、実験動物の使

用、及び処分に関しても苦痛の軽減等、倫理上の問題はすべて、国立大学法人動物実験施設協議会指針等に基づき、また、遺伝子改変動物の扱いについてはカルタヘナ法を遵守した適切な拡散防止措置も施した上で、当該研究施設の倫理委員会で承認を受けた後に各研究機関が定めた動物実験ガイドラインに則って実施した。

C. 研究結果

3年間全体について

1) 老化モデル動物を用いた発生工学技術による個体作製とその特性について

62 系統の老化・老年病モデルマウスについて生殖工学的手法を用いて個体作製(受精率、出産率、離乳率を算出)した他、2 系統に奇形が発見されたこと、遺伝子診断による遺伝子の欠損は認められなかったこと等、昨年度までに報告した。現在もこれらの変異が生殖工学過程または系統特性、飼育環境要因によるものなのか解析を行っている。

また、老化促進モデルマウス (SAMR1, P1, P8, P10) や老齢マウス (C57BL/6N, 29 ヶ月齢) についても体外受精および受精卵移植を行った結果を報告した。SAM 系マウス 4 系統の体外受精率は、培養液の種類や組成により 1 細胞期の受精率(発生の進み方)に大きなばらつきが認められつつも結果は良好であった(71.4-96.9%)が、その後の出産率は極めて低く(11.1-40.9%)、細胞分裂の停止(2 cell blocking)の影響が示唆された。一方、老齢マウスでは体外受精率、出産率、離乳率の低下はともに認められなかった。

老化促進モデルマウス (SAMR1, P1, P8, P10) を用いて生殖工学手法によって得た個体(実験群)と自然交配による個体(コントロール群)の生存日齢を比較したところ、P8 マウス(雌雄)およびP10 マウス(雄)において生存日齢に差が認められた

P8 マウス 実験群：♂ 307 ± 44.6 日、♀ 263 ± 39.6 日、コントロール群：♂ 380 ± 72.1 日、♀ 370 ± 76.4 日)

P10 マウス 実験群：420 日 (n=1)、コントロール群：252 \pm 89.8 日 (n=8)

また、同様に C57BL/6N マウス(実験群)とエイジングファーム(ブリーダーから4週齢で購入し、24ヶ月齢まで長期飼育しているマウス)との生存日齢(約19ヶ月齢の時点)を比較したところ、前者の生存率が95%でありエイジングファームより約20%の高値を示した。従来の動物実験による研究報告では、体外培養による化学的(培養液の組成)にも物理的(ガラスキャピラリーによる受精卵の移し替え等による衝撃)にも体内培養と比較すると受精卵の発生速度や生存率に影響(体外培養成績が劣る)している。ヒトの生殖医療において、体外操作(体外受精、顕微授精)により、正常卵子(体内受精)と比較して、ミトコンドリア機能、細胞周期、卵子活性に関連する遺伝子に変異が生じることが複数報告されている(ゲノムインプリンティング異常など)。今回の結果では予想していた結果と異なるものであり、卵子レベルでの解析(老化に関係する遺伝子を中心)を進める計画である。

2) 配偶子凍結融解と動物個体の特性

マウスのクリーン化(病原性微生物除去)を進める中で8系統の凍結受精卵を融解・移植し、約100匹の産仔を得た(前年度報告済み)。そこで、遺伝子改変マウスや自然発症マウスより、Ziz2TgマウスやSAMマウス(R1, P1, P8, P10)、C57BL/6Nマウスの6系統に絞り、時間軸にそった調査を行うことで加齢に対する表現型や生存率などの影響について現在も解析を進めている。

3) 動物福祉に配慮した個体管理システムの開発

動物個体識別用のタグを試作し、タグのサイズや軽量化、さらに読み取り(スキャナー)装置について検討を進めた。通常、QRコードの読み取りには専用のスキャナーとパソコンを使用するが、動物飼育室に設備するには粉塵や薬物(消毒薬)、落下等の問題があることから、最小限の機器にするだけでなく、多くの利用者が使用することから汎用性のある機器、設備機器の経費削減を考慮する必要がある。

従来の金属タグ(重量0.19g)に対して新規開発タグ(重量0.11g)が完成した。また、新規タグをマウスの耳介に装着し、脱落やタグ装着によるストレスに起因する行動異常等は発見されなかった。そのタグはマウスの耳介に装着してから1年程度経過のため、マウス個体の状態(体重、生存日数、行動等)を継続して観察しているが、現在のところ個体の異常等は発見されていない。

一方、動物の個体以外のケージや飼育ラックの識別、匹数等の情報をパソコン及び携帯端末(タブレット)を利用した一元個体管理システムの構築を進めたところ、ネットワークやソフトのプログラミングの必要があり、新規申請時の最終年に当たる本年に外注委託を計画したが研究予算により断念した。

今後、開発した耳タグは本目的以外にも脱走や行方不明の個体の検索にも応用できる。また、動物飼育者の人員不足や人件費削減の理由から近い将来、動物の飼育管理(動物観察、ケージ交換等)の自動化も考えられており、企業との共同研究を進めているところである。従って、耳タグの管理システムは、動物管理の基本となるもので非常に有用であり、数年後の特許取得に向けてさらなる開発を進めているところである。

平成26年度について

老化促進モデルマウス(SAMR1, P1, P8, P10)では、SAMP8マウス(雌雄)およびP10マウス(雄)において体外受精で得た個体の寿命の延長が認められた。組織学的検索として、脳、腎臓、精巣、卵巣等では、自然交配による個体と比較して顕著な所見は見られなかった。

また、C57BL/6Nマウスでは、生後19ヶ月齢においてエイジングファームより生存率が約20%の高値を示した。

動物個体管理システムについては、個体番号、生年月日、実験処置、交配記録等の個体管理データベースを構築し、パソコン上の試験的な運用を始めるとともにタブレット端末

を用いた飼育室の個体管理について検討を進めている。また、引き続き個体のタグの開発を進めた。

D. 考察と結論

3年間全体について（平成26年度含む）

体外受精して得た個体、胚凍結・融解して得た個体の遺伝子診断結果から、現在のところ遺伝子の欠損や変異は認められなかったが、系統により寿命の変化も認められたことから、継続して解析する必要があるだけでなく、未受精卵の保存の問題と同様に配偶子の凍結、あるいは受精卵の保存に関しても加齢軸における変化も今後検討していく必要があると考えた。

配偶子（精子、卵子）の老化と個体の加齢・老化の因果関係も特に報告されていない理由から個体レベルを中心に検討していきたい。

遺伝子組換え動物以外にも老化促進モデル動物（例、SAMマウス）を用いて発生工学技術を応用し、時間軸にそった調査を行うことで加齢に対する影響を解析していく予定である。

動物個体識別と個体管理を併用したシステムは未だに市販されていないことから、このシステムが開発されることにより、特に遺伝子組換え動物の適正な飼育管理、個体識別と個体管理ができることは非常に有用であると考えられる。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

平成24年度

1) 加藤恒雄, 小林英治, 小木曾昇, 笠井憲雪

東日本大震災から学ぶこと（東北大学医学部附属動物実験施設の例）,
静岡実験動物研究会報告 Vol. 38 No. 1:4-7 2012

2) 小木曾昇, 上條信一

（特集）実験動物施設における省エネ化と効果的な保守管理法

実験動物技術, 47(2); 81-82, 2012

平成25年度

1) 小木曾昇

遺伝子組換え生物等の規制法等の法令遵守に対する取り組みの実際
実験動物技術, 48(1); 31-36, 2013

平成26年度

- 1) 小木曾昇, 高野聡美, 六車香織
国立長寿医療研究センター研究所新実験動物施設棟の紹介
岡山実験動物研究会会報, 30, 42-45, 2014
- 2) 加藤秀樹, 小木曾昇 「遺伝的モニタリング」
実験動物技術, 49(2), 81-82, 2014

2. 学会発表

平成24年度

なし

平成25年度

- 1) 小木曾昇、加藤秀樹
シンポジウムVII 遺伝子組換え生物等の規制法等の法令遵守のための管理の実際
第60回日本実験動物学会総会, 2013年5月15-17日(つくば)
- 2) 小木曾昇、尾前哲也、高野聡美
国立長寿医療研究センター新実験動物施設棟の概要紹介
第60回日本実験動物学会総会、2013年5月15-17日(つくば)
- 3) 小木曾昇、高野聡美、六車香織、佐藤江美、早川朋子、丸山光生
国立長寿研における老化モデル動物を用いたクリーン化について
日本実験動物技術者協会第47回総会、2013年9月27-28日(岡山)

平成26年度

- 1) 小木曾昇, 高野聡美, 六車香織
国立長寿研における PCR を用いた微生物モニタリング検査導入に関する検討 ―現場における3Rsへの貢献―
日本実験動物科学技術さっぽろ(第61回日本実験動物学会総会, 第48回日本実験動物技術者協会総会), 2014年5月14-17日(札幌)
- 2) 高野聡美, 小木曾昇, 六車香織
新実験動物施設棟における耐震対策について ―耐震器具の有用性と安全性―
日本実験動物科学技術さっぽろ(第61回日本実験動物学会総会, 第48回日本実験動物技術者協会総会) 2014年5月14-17日(札幌)
- 3) 尾前哲也, 小木曾昇, 高野聡美, 六車香織
加齢動物育成のための動物福祉に配慮した飼育環境の整備 ―長期飼育に適した床敷き材の検討―
日本実験動物科学技術さっぽろ(第61回日本実験動物学会総会, 第48回日本実験動物技術者協会総会) 2014年5月14-17日(札幌)
- 4) 小木曾昇, 高野聡美, 六車香織
老化モデル動物を用いたマウスクリーン化と生殖医療研究への有用性
日本実験動物科学技術さっぽろ(第61回日本実験動物学会総会, 第48回日本実験動物技術者協会総会) 2014年5月14-17日(札幌)

物技術者協会総会) 2014年5月14-17日(札幌)

5) 小木曾昇

実験動物施設における環境制御へのあらたなる挑戦, 光触媒技術の導入による衛生管理等への有用性—老化・老年病モデル動物の長期飼育を例にして—

日本実験動物科学技術さっぽろ(第61回日本実験動物学会総会、第48回日本実験動物技術者協会総会) ランチョンセミナー, 2014年5月14-17日(札幌)

6) 小木曾昇, 高野聡美, 山口一路, 六車香織, 早川朋子, 丸山光生

老化・老年病モデル動物を用いたマウス SPF 化, 第37回日本基礎老化学会大会, 2014年6月26-27日(大府)

7) 小木曾昇, 高野聡美, 山口一路, 富田耕平, 六車香織

光触媒技術導入による実験動物施設の環境衛生管理—老化・老年病モデル動物における適正な飼育環境をめざして—

第85回東海実験動物研究会, 2014年8月30日(名古屋)

8) Ogiso N, Takano S, Yamaguchi K, Muguruma K

Effect of Aging about Ontogeny from Early Development Through the Introduction of Reproductive Engineering in Aging Model Mice

AFLAS CONGRESS 2014, November 11 and 12, 2014, Kuala Lumpur, Malaysia

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

動物福祉に配慮した個体管理システムは、平成28年度の特許取得を目標に研究を進めている。