

長寿医療研究開発費 平成25年度 総括研究報告

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

動物実験における遺伝子組換え動物 (Tg,KO,KI) や自然発症動物 (ミュータント) 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、系統保存 (配偶子凍結) も頻繁かつ積極的に行われている。主任研究者はこれまで、遺伝子組換え動物の作製、加齢・老化マウスのクリーン化 (病原性微生物除去) を進めていく中で認められた奇形や寿命の変化等の個体の表現型の変異に関して報告を行ってきた。しかしながら生殖工学技術 (体外受精、配偶子凍結) を用いた配偶子 (細胞) から個体レベルでの老化メカニズムの解析や凍結操作による動物の加齢に及ぼす影響については、人だけでなく動物実験による報告もほとんどなされていない。

近年、マウスの系統保存には、精子または胚 (体内のみではなく体外受精による胚 (受精卵) も含めて考える) の凍結保存が多く利用されている。精子、胚それぞれの凍結を行う上で、加齢に対する影響を検討するためには、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が必要である。そこで本研究では、凍結・融解により得たモデル動物 (遺伝子組換え、ミュータント) の融解配偶子 (精子) または融解胚を用いて繁殖させた個体から得られた出産率、離乳率、体重、生存日齢、外観観察、臓器重量等から、動物の特性等の遺伝・育種学的な解析を行うことで加齢に及ぼす影響について、細胞 (卵子) から個体レベルの網羅的な解析を目的としている。また合わせて血圧、体温測定等の生理学的な解析、および組織作製と病変観察等の病理学的解析、行動観察等についても合わせて行っている。加えて、近年、動物倫理、動物愛護の観点から、動物実験に関係する法律 (動物愛護管理法、カルタヘナ法) やガイドラインに基づいた適正な動物実験の実施が強く求められている。そのため主任研究者は、実験動物福祉 (Refinement: 苦痛の軽減) に配慮し、エンリッチメント等を用いた場合の加齢への影響および個体管理システムの開発を進めている。

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)

A. 研究目的

平成18年に改正された動物愛護管理法（動愛法）や厚生労働省基本指針、および平成25年度改正の実験動物飼養保管等基準による適正な動物実験を実施するには、「3R」すなわち、Reduction（使用数の削減）、Refinement（苦痛の軽減）、Replacement（置き換え）を取り込んだ動物に対する配慮が必要である。しかし、日本におけるRefinement（苦痛の軽減）を含む実験動物福祉に関する研究は、欧米諸国に比較すると相当遅れている。

加齢・老化研究において、発生工学技術を利用した体外受精による胚移植や配偶子（精子、胚）凍結操作が、動物個体の加齢に及ぼす影響については報告が全くない。ヒトの生殖医療では、体外受精による子どもへの健康影響（過度成長、発達障害）を疑う研究が進みつつあるが、患者数が少なく、懸念される健康影響が体外受精によるものなのか、生殖医療を受ける人の年齢や生活習慣などの影響なのかがわかっていない。発生工学技術を用いた場合受精方法だけでも、大きく分けて体内および体外の2種類があり、受精時間や発生速度だけでなく、形態学的な安定性（例、透明体の強度）も異なる。さらに、配偶子の凍結・融解操作が加わることにより、体内または体外の受精する場所の差が胚の生存率や出産率に大きく影響する可能性がある。

さらに実験動物福祉に配慮したエンリッチメント等を用いた飼育環境における動物の加齢変化だけでなく、個体やケージを含めた管理方法についても報告はなされていない。動物個体の識別には、耳パンチ法、入墨法、耳タグ法、ICタグ法、関節切除法等があり、それぞれの方法には幼若時の判別が難しい、タグの脱落（耳介の脱落）、画像診断装置（例、CT、MRI）に使用できない等々、様々な問題が挙げられる。特に遺伝子組換え動物の場合は、カルタヘナ法に準じた適正な個体管理が必要となる。

以上から、発生工学技術を利用して得られた動物個体について加齢・老化研究への有用性を確認するとともに、エンリッチメント等を用いた環境で飼育した動物の加齢変化の解析、および動物福祉に配慮した動物管理システムの開発を本研究の目的とした。

B. 研究方法

1. 老化・老年病モデル動物の系統選定と発生工学技術による個体作製について

実験には62系統（免疫関連：8系統、骨形成関連：6系統、認知症関連：7系統、加齢性難聴：5系統、老化促進モデル：4系統など）のマウスを使用した。老化モデル動物の中で、分担研究者（丸山）が11系統を選定し、遺伝子組換え動物の遺伝子診断の他、個体管理および老化レベルの解析を行った。

1) 胚の採取、体外受精、胚移植、胚凍結・融解

供試動物は、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,遺伝子組換え系統）から卵子を採取し体外受精を行った。4～6時間後に選別を行い、1細胞期胚の受精率を算出した。翌日、発生した2細胞期胚の受精率を算出後、未凍結群、

凍結群に分けて、未凍結群はレシピエントマウスに移植し、産仔数から出産率を算出した。一方、凍結胚は一時凍結保管容器に保管し、実験の際に融解（胚回収率、形態的正常胚率）と移植（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ウンドである AKR/K 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。

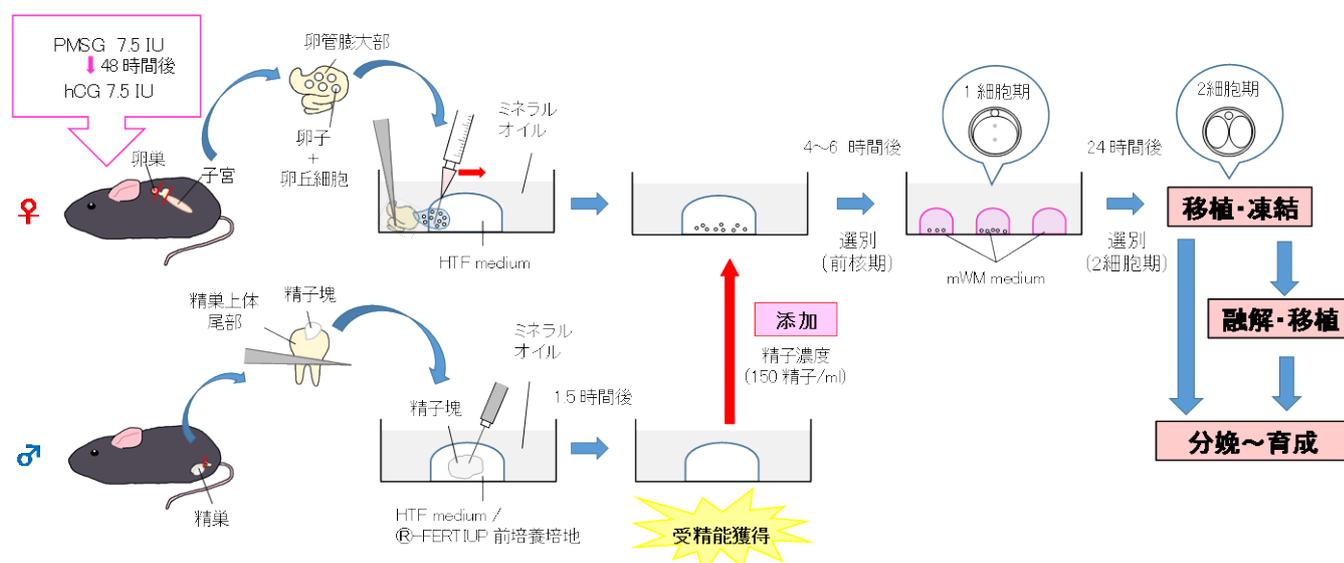


図1. 発生工学技術を用いた個体作製法（体外受精・胚移植・胚凍結）

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と検討を行いタグを開発した（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)

(倫理面への配慮)

本研究は動物愛護管理法、厚生労働省基本指針、日本学術会議ガイドライン、および独立行政法人国立長寿医療研究センター動物取扱規程に基づき、動物実験倫理委員会、実験動物管理委員会、遺伝子組換え安全委員会承認の上実施した。

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実験を実施した。

C. 研究結果

1. 老化・老年病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

1) 体外受精、出産結果

62 系統について体外受精を行った結果、受精率は 4~6 時間後で 64.9~97.0% (平均値±標準誤差: 87.0 ± 0.9)、24 時間後で 65.6~97.7% (87.1 ± 0.9)、出産率は 0.0~74.1% (40.4 ± 1.7)、離乳率は 0.0~100.0% (88.5 ± 2.7)であった (表1)。

また、体外受精を行った結果得られた全ての仔 (総離乳匹数: 1,613 匹) の雌雄比は、雄:雌=1.24:1.00 と雄の方がやや多い傾向にあった。

表1 老化・老年病モデルマウスにおける月齢毎の受精率、出産率および離乳率

月齢	系統数	受精率 (%)		出産率 (%)	離乳率 (%)
		4~6 時間後	24 時間後		
全体	62	87.0 ± 0.9	87.1 ± 0.9	40.4 ± 1.7 (n=61)	88.5 ± 2.7 (n=60)
2~3 ヶ月齢	6	89.1 ± 2.5	88.3 ± 3.6	35.7 ± 7.4	94.4 ± 1.5 (n=5)
4~11 ヶ月齢	47	87.1 ± 1.1	87.3 ± 1.1	39.6 ± 1.9 (n=46)	87.4 ± 3.3 (n=46)
12~16 ヶ月齢	9	84.7 ± 1.0	85.5 ± 1.0	47.8 ± 3.1	91.1 ± 5.6

2) 老化促進モデルマウス (SAM系統) を用いた体外受精

受精率は4~6 時間後で 71.4~96.9%、24 時間後で 76.5~100.0%、出産率は 11.1~40.9%、離乳率は0.0~100.0%であった。各系統とも受精率は比較的良好であったが、出産率や離乳率に若干のばらつきが系統ごとに認められた (表 2)。

表 2 老化促進モデルマウス (SAM 系統) における受精率, 出産率および離乳率

系統名	受精率 (%)		出産率 (%)	離乳率 (%)
	4~6 時間後	24 時間後		
AKR/K Slc	81.8	81.8	21.7*	100.0*
SAMR1/TaSlc	96.9	100.0	34.8	100.0
SAMP1/SkuSlc	91.7	89.9	21.7	60.0
SAMP8/TaSlc	79.4	88.0	40.9	100.0
SAMP10/TaSlc	71.4	83.3	11.1	0.0
SAMP10/TaSlc ^(2回目)	79.8	76.5	38.5	100.0

* 異常形態を示した胚を移植した結果, 得られた産仔数より算出

3) 胚凍結による融解・移植結果

4系統198個 (凍結チューブ4本) の胚を融解したところ、197個の回収(回収率: 96.7~100%)に対して、形態的正常胚数194個 (形態的正常胚率: 93.3~100%) が得られ、胚移植(178個)した。その結果、47匹が出産 (出産率: 7.7~68.8%) した。

4) 動物個体の特性調査

体外受精で得た個体については、遺伝子診断を行ったのち系統維持を行っている。また、遺伝子診断の結果から遺伝子の欠損や変異は認められなかった。何れの個体は、出産後1年程度の経過のため表現型にも大きな変化は発見されなかった。

2. 動物個体識別と管理システム

個体識別用タグをマウスの耳に装着した結果、外傷やタグの脱落は認められなかった。一方、バーコードのタグについて軽量化を進めたところ、バーコードが小さくなりリーダーの再現性が低下したため、メーカーと再度検討を進めている。

D. 考察と結論

1. 老化・老年病モデル動物の系統選定と発生工学技術による個体作製について

1) 胚の採取、体外受精、胚移植、胚凍結・融解

老化・老年病の遺伝子改変モデル動物を用いて体外受精した結果、雄の月齢に関わらず受精率や出産率に差は認められなかった。また、体外受精して得た個体、および胚凍結・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発見されていない。何れの個体は、出産後1年程度の経過のため表現型にも大きな変化は認められていないことから、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。

2) 老化促進モデルマウス (SAM系統) を用いた体外受精

老化・老年病の遺伝子改変モデル動物と自然発症老化促進モデル動物 (SAM) との体外受精による胚移植・出産結果を比較すると、SAMの全系統で出産率が低い傾向にあった。これまでの報告 (大塚, 1998) と同様に SAMR1、P1、P10 およびAKR においても 2 cell block 現象が生じている可能性が示唆された。

SAMP10 は他の 3 系統と比べると出産率、離乳率が顕著に低く、体外受精に適さない系統であることが示唆されたが、精子の前培養培地を変更することで出産率や離乳率の顕著な増加が認められたことから、培養液により受精に関わる卵子活性が変化した可能性がある。

SAM の 4 系統について体外受精を行った結果、SAMP10 は出産率および離乳率が他の系統と比較して明瞭に低い値を示した。一方自然交配を行った場合、SAMP1 では非常に高い確率で食殺が生じるため離乳匹数は少なくなり (Suzuki et al., 2004)、SAMP10 については産仔数および離乳匹数に他との差は見られないものの、雌の月齢が 5, 6 ヶ月を過ぎると妊娠しにくくなる (長寿研, 未発表データ)。また SAMR1、SAMP8 においては月齢に関係なく (5, 6ヶ月齢を過ぎても)、体外受精、自然交配ともに良好な結果が得られている (長寿研, 未発表データ)。

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ことから、今後は老化促進モデル動物であるSAMを中心として同じ月齢における SAMP10 と他の系統間で見られた妊娠率などの違いを考察するために、各系統の 5, 6 か月齢の個体を用いて卵巣などの組織形態学的な観察を行う。合わせて、グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G-6-PDH) の活性指標であると考えられているブリリアントクレシルブルーによる染色を行い、同月齢の各系統の雌が保持する卵の活性状態についても調査を行う予定である。

SAM の各系統の成長に伴い卵巣などの生殖器官において異なる促進老化を示す場合、それらが発生するメカニズムが明らかになれば、SAM は生殖医療研究において有用なモデル動物となる可能性が高い。

2. 動物個体識別と管理システム

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

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

3) 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

2. 学会発表

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)

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 27 年度の特許取得を目標に研究を進めている。