

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

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・研究した。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。

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）および厚生労働省基本指針による適正な動物実験を実施するには、「3R」すなわち、Reduction（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）に含まれる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、配偶子（精

子、胚)凍結操作を加えた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。発生工学技術の中の受精方法だけでも、体内および体外によ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、配偶子の凍結保存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、関節切除法等がある。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指導されている。

以上から、発生工学技術を利用し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こと、エンリッチメント等を用いた加齢変化の解析、動物福祉に配慮した動物管理システムを開発することが必要である。

B. 研究方法

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部尾部から精子、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。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) 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。

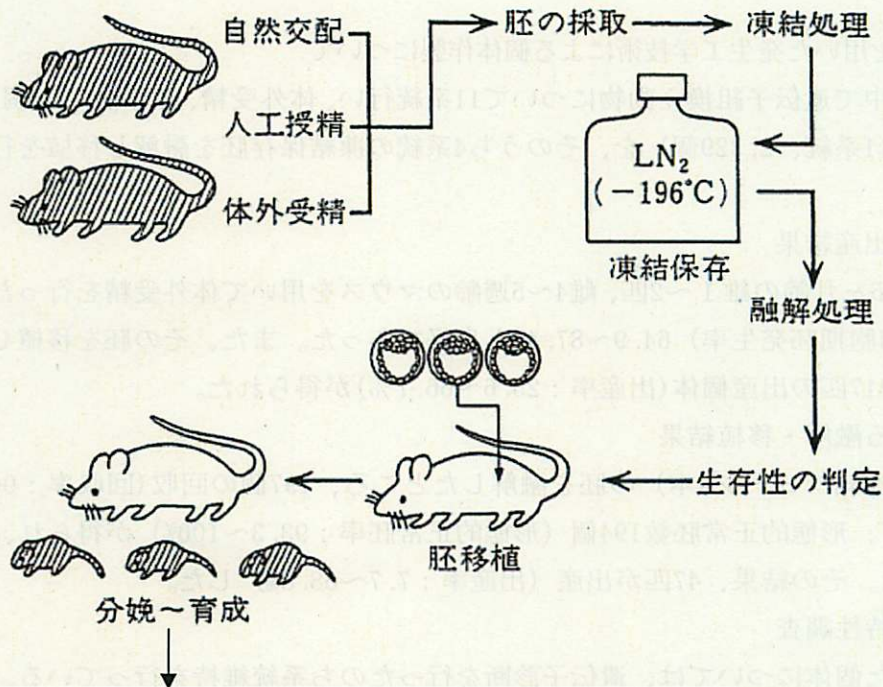


図 1. 個体・組織レベルの解析、動物管理システムの開発

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)。

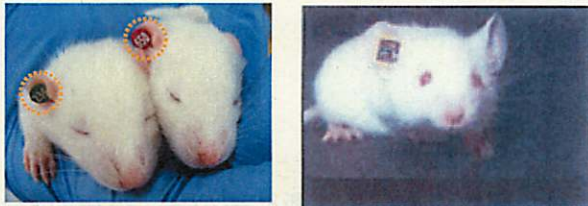


図 2 耳タグ法 (左:番号タグ、右:バーコードタグ)

(倫理面への配慮)

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

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11系統行い、体外受精、胚移植（765個）、胚の凍結保存（11系統、2,329個）を、そのうち4系統の凍結保存胚を融解し移植を行った。

1) 体外受精、出産結果

実験には、3～5ヶ月齢の雄1～2匹、雌4～5週齢のマウスを用いて体外受精を行った結果、受精率（2細胞期胚発生率）64.9～87.4%と良好であった。また、その胚を移植したところ、11系統317匹の出産個体（出産率：25.6～66.7%）が得られた。

2) 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。

3) 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。

2. 動物個体識別と管理システム

番号およびバーコードを併用したタグの作製を業者に依頼している。（共同開発）

動物飼育室内で管理システムの運用（個体情報の出入力、個体識別）ができるように、タブレット端末の利用及び動作確認を行った。

D. 考察と結論

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、出産後1年経過していないこともあり、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

なし

2. 学会発表

なし

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。