

論文の内容の要旨

論文題目「Embryo vitrification for strain preservation of experimental animals
in medical research」

(医学研究に供する実験動物の系統保存の為の胚のガラス化保存)

学位申請者 江藤 智生

キーワード: ヒト疾患モデル, 実験動物, ガラス化保存, 系統保存, 初期胚の超低温保
存

実験動物のラットとマウスは、数多くのヒト疾患モデルが存在し、医学研究に使用されている。更に近年では、遺伝子改変技術により、がん・糖尿病・高血圧・神経モデル開発も積極的に行われている。これら多数の系統を動物個体の継代で系統維持すると、遺伝的変異や微生物汚染、天災等で系統断絶の恐れがある。そのため私は、医学の進歩や発展の為の研究開発に必要不可欠な、実験動物ラットとマウスの系統保存を目的として本研究を行った。系統保存には初期胚の超低温保存が望ましい。しかし、ラット初期胚の超低温保存技術は未だ確立しているとは言い難く、また系統保存に関するマウス初期胚の超低温保存の報告は確認出来ない。さらに動物種毎の保存法の変更は、作業現場の混乱が懸念される。これらを鑑み、まずラット初期胚の超低温保存を研究した。次に開発したガラス化保存法がマウスにも適応出来るか確認後、マウスの系統保存の研究を行った。

ラット初期胚のガラス化保存法の研究は、細胞への透過性が早く毒性が低い耐凍剤を添加した前処置液および、氷晶形成を阻害してガラス化し、フリーズ・フラクチャーが発生せず、加温後の細胞の膨張を抑えるガラス化液の開発から行った。次に開発した溶液を使用して、ラット2細胞期胚のガラス化保存を行い、加温後の胚の生存と胎子発生を確認した。マウスは、2細胞期胚をガラス化保存して生存と胚盤胞への体外発生を確認後、14系統の胚を使用して系統保存の可否を検査した。

ラット2細胞期胚への細胞透過性耐凍剤の透過速度測定と細胞毒性の検査結果から propylene glycol (PG) を選定し、基礎培地であるPB1に10%のPGを添加したP10を前処置液として開発した。ガラス化液は、ガラス化促進としてPG (10%) とEthylene glycol (30%) を、フリーズ・フラクチャー阻害にはPercoll (20%)、加温時の細胞膨張を抑制する為 Sucrose (3M) をPB1に添加したPEPeSを開発した。P10とPEPeSを用いたラット胚のガラス化保存後の生存率は高く安定し ($98.3 \pm 4.3\%$)、胎子発生率 (65.2%) は新鮮胚との間に有意差は無かった ($P > 0.01$)。更に、PGを細胞透過と細胞毒性が低いGlycerolに置換した前処置液とガラス化液を用いた実験区と (Gly区)、前処置を行わずにPEPeSでガラス化保存した区 (無処置区) を設けて同様にガラス化保存した。保存後の胚の生存率は、無処置

区で著しく低下し（63.9%）、胎子発生率はGly区（25.7%）と無処置区（0%）共にP10とPEPeSに比べ有意に低下した。実験結果より、前処置を行わないとガラス化液が良好であっても、胚の生存と胎子発生の低下が生じる事が分かった。さらに前処置の耐凍剤の細胞透過が遅いと（Gly区）、加温後の胚の生存率は高くても（87.4%）、胎子発生は低下することが分かった。本実験の結果、P10とPEPeSを使用した、ラット初期胚の超低温保存法が完成した。

マウス胚のガラス化保存後の生存率は高く安定し（ $98.1 \pm 1.9\%$ ）、体外発生率（93.5%）は新鮮胚との間に有意差は無かった（ $P > 0.01$ ）。マウス14系統のガラス化保存後の胚の生存率は92.8から99.2%で、系統間に有意な差は無かった（ $P > 0.01$ ）。体内発生率は、30.9から74.6%で、各系統の新鮮胚とガラス化保存胚の間の胎子発生率に有意差は無かった（ $P > 0.01$ ）。メス1匹から得られる平均胚数から作製される胎子数の期待値が、Inbredは2匹以上でOutbredは1匹以上であれば、系統保存が可能なが期待出来る。採卵メス1匹から得られる生存胎子数の期待値は、Inbredで2.9から16.4、Outbredは15.1で、何れの系統も本ガラス化保存法を使用すると、系統保存が可能であることが示唆された。

本研究の結果、ラット初期胚に適した超低温保存法が完成し、マウス2細胞期胚にも有効な事が分かった。また本方法は、マウスの系統保存が可能で有ることが分かり、現在はラットの系統保存を研究中である。実験動物の系統保存に関しては、1980年代にはすでに概念が提唱されているが、今まで実証した報告は確認出来なかった。そのため本研究は、医学研究に供するヒト疾患モデルの系統保存について、有効な提言になると考えられる。本研究で開発したガラス化保存法は、国内では実中研およびNBRP-Ratのリソースバンクに使用されており、海外では米国を中心に技術普及活動を行っている。また、ガラス化保存に用いるP10とPEPeSは、既に国内外で一般供給されている。現在私は、ヒト疾患モデル動物の収集・保存および供給を行う国際的なワーキングバンクを目指している。そして今後も継続して行う実験動物の生殖工学技術の研究開発を通して、医学の発展に寄与することが、私の最終的なテーマである。