

新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

脳疾患モデルマウスの生殖工学技術を用いた
系統保存・生産システムの開発

研究代表者 後藤 元人¹⁾
研究分担者 笹岡 俊邦²⁾, 竹澤 久美子¹⁾, 保田 昌彦¹⁾, 横山 峯介¹⁾, 高橋 利一¹⁾

1) 公益財団法人 実験動物中央研究所、2) 新潟大学 脳研究所 生命科学リソース研究センター

研究要旨

マウスの過剰排卵処置は、eCG と hCG を投与し、おこなわれてきたが、最近では、eCG とインヒビン抗血清 (IAS) を共投与する超過排卵誘起 (IASe) が開発された。しかし、投与タイミングの柔軟性が低く、ルーチンワークの日程設定に制限があった。

本研究では、ICR マウスで投与量と投与間隔の影響を検討した。72 時間と 96 時間間隔で、高濃度の eCG 投与で排卵数が増加した。また 96 時間間隔の 0.1mL IAS と 10IU eCG の共投与で、最も排卵数が得られることを見出した。この最適濃度を、市販品の CARD HyperOva® を用い B6 マウスと NOG マウスでも検討した。72 時間と 96 時間間隔では、B6 マウスで 56.4 ± 5.3 個、 82.3 ± 13.9 個、NOG マウスで 79.4 ± 21.1 個、 102 ± 20.1 個の排卵数が得られ、有用性が証明された。また、各実験区の体外受精率、産子率は、常法の 48 時間間隔の eCG 5IU と同等の結果が得られた。結論として、ホルモン用量の最適化は、生殖技術チームのルーチン作業のスケジュール変更が可能であることが示された。

A. 研究目的

一般的にマウスの過剰排卵処置は、ホルモンを注入して人工的に排卵を誘発する重要な技術である。雌マウスに 5IU の eCG (equine chorionic gonadotrophin) 投与で卵巣内の多数の卵胞を発育させ、48 時間後に 5IU の hCG (Human chorionic gonadotrophin) 投与で卵子強制排卵させ、15 時間後に卵管より採卵がおこなわれている。この方法 (eCG-hCG) は、自然排卵数より 2~3 倍多く排卵数が得られ、初期の報告よりほとんど変わることなく、現在まで利用されている。eCG と hCG の間隔が 48 時間では、eCG 濃度は 5IU が最適濃度であり、高濃度になればなるほど、排卵は抑制されることが報告されている。最近、我々は 48 時間間隔で eCG とインヒビン抗血清 (IAS) を併用することで、多くの排卵が可能で超過排卵法 (IASe) を開発し

ました。若齢 (4 週齢) C57BL/6J マウスからは、約 100 個の受精卵を採取可能であり、また免疫不全 NOG を含む他系統でも効果があることを報告している。しかし、これまでのこれら過剰排卵処置では、作業の柔軟性が低く、ホルモンの投与時間が決まっているため、ルーチンワークのスケジュール設定に制限があり、週末や祝日でもホルモン投与が必要になる場合がある。

本研究では、ホルモン投与の作業スケジュールの改善を目的として、eCG あるいは IAS の投与量および hCG の投与間隔が排卵数、受精率および産子率に及ぼす影響を検討した。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

1. MCH (ICR) マウスにおけるホルモン投与間隔と投与量の検討

- A. 性成熟した ICR 雌マウスを用い 1、2、3、4、5 日のホルモン投与間隔と eCG 5IU, 10IU, 20IU, 40IU - hCG 5IU の投与量で、過剰排卵処置をおこない頸椎脱臼による安楽死後、採卵、排卵数を算出した。
- B. 性成熟した ICR 雌マウスを用い 4 日のホルモン投与間隔と IAS 0.01ml, 0.05ml, 0.1ml, 0.2ml 単独投与と IAS 0.1ml と eCG 5IU, 10IU, 20IU 共投与 - hCG 5IU の投与量で、過剰排卵処置をおこない、頸椎脱臼による安楽死後、採卵、排卵数、ICR 雄マウスとの体外受精により体外受精率、受精卵移植での産子率を算出した。

2. NOG マウスおよび C57BL/6 マウスの排卵卵子数および受精率、産子率に及ぼす IAS(0.1ml) + eCG(10IU)の検討

ICR で 3、4 日間隔の過剰排卵効果が最適のホルモン濃度 IAS 0.1ml+eCG 10IU 共投与条件で、12 週齢 NOG マウスと C57BL/6J マウスを用い 3、4 日間隔での過剰排卵効果による排卵数を検討した。また同系統雄マウスとの体外受精により体外受精率、受精卵移植での産子率も算出した。

3. NOG マウスおよび C57BL/6 マウスの排卵卵子数に及ぼす CARD HyperOva®の検討

汎用性を検討するため、IAS と eCG が IAS 0.1ml+eCG 3.75IU/0.2ml で混合されている市販品の CARD HyperOva®での 12 週齢 NOG マウスと 3 週齢 C57BL/6J マウスの 3、4 日間隔の過剰排卵効果による排卵数を検討した。また同系統雄マウスとの体外受精により体外受精率、受精卵移植での産子率も算出した。

C. 研究結果

1. MCH(ICR) マウスにおけるホルモン投与間隔と投与量の検討

1、2、3、4、5 日のホルモン投与間隔と eCG 5IU, 10IU, 20IU, 40IU - hCG 5IU の投与量を ICR マウスで検討した。一般的な 2 日間隔の eCG 5IU 投与では、約 25 個の排卵がみられた。2 日間隔では、eCG 濃度が高くなるにつれて排卵数は減少した。同様に、1 日間隔では eCG 5IU が 20 個で最も多く、eCG 濃度が高くなるにつれて排卵数は減少した。しかし、3 日間隔では eCG 20 IU で 33 個、40 IU で 25 個と eCG 濃度が高いほど排卵数が最も多かった。4 日間隔では、高 eCG 濃度で同様に排卵数が多く、eCG 20 IU で 22 個、40 IU で 30 個であった。5 日間隔では、どの濃度の eCG でも排卵はほとんどなかった。4 日間隔で抗インヒビン血清

(IAS) の濃度を調べたところ、0.05ml と 0.1ml では 30 個以上の排卵があったが、0.01ml と 0.2ml ではほとんど排卵がなかった。排卵数が多くなる抗インヒビン血清 (IAS) 0.1ml と eCG 濃度の組み合わせを検討した。その結果、eCG 5 IU、10 IU、20 IU とともに 40 個以上の排卵が認められた。排卵された卵子の体外受精率、胚盤胞期胚への体外発育率には各条件で差はなかった。また、1 匹の雌個体から作出可能な個体数の生産指数は、一般的な 2 日間隔の eCG 5 IU で 10.6 匹に対して、eCG 10 IU+IAS 0.1ml の 4 日間隔では 25.5 匹と倍以上増加することがわかった。

2. NOG マウスおよび C57BL/6 マウスの排卵卵子数および受精率、産子率に及ぼす IAS(0.1ml) + eCG(10IU)の検討

ICR で 3、4 日間隔の過剰排卵効果が最適のホルモン濃度 IAS 0.1ml+eCG 10IU を NOG マウスと C57BL/6J マウスの 3、4 日間隔で検討した。

NOG マウスでは、排卵数が 3 日間隔で 66.5 ± 16.5 個、4 日間隔で 89.3 ± 15.0 個と高値であった。しかし、過剰排卵匹数は、3 日間隔で 6 匹中 6 匹と効果があったが、4 日間隔で 6 匹中 3 匹しか排卵せず、効果がなかった。受精率ならびに産子率は、どちらも問題なく正常だった。

C57BL/6J マウスでは、排卵数が 3 日間隔で 48.7 ± 14.5 個、4 日間隔で 66.6 ± 8.6 個と高値であった。また、過剰排卵匹数は、3 日間隔で 6 匹中 6 匹、4 日間隔で 6 匹中 5 匹と効果があった。受精率ならびに産子率は、どちらも問題なく正常だった。また、1 匹の雌個体から作出可能な個体数の生産指数は、3 日間隔の NOG で 18.5 匹、B6 で 19.6 匹。4 日間隔の NOG で 15.4 匹、B6 で 16.7 匹。NOG マウスならびに C57BL/6 マウスの 4 日間隔投与過剰排卵卵子からも個体作出が可能であった。

3. NOG マウスおよび C57BL/6 マウスの排卵卵子数に及ぼす CARD HyperOva®の検討

汎用性を検討するため、IAS と eCG が IAS 0.1ml+eCG 3.75IU/0.2ml で混合されている市販品の CARD HyperOva®での NOG と C57BL/6J マウスの 3、4 日間隔の過剰排卵効果を検討した。

NOG マウスでは、排卵数が一般的な 2 日間隔の eCG 5IU で 18.3 個、0.1ml 投与で 67.5 個、0.2ml 投与で 40.0 個と 0.1ml 投与が高値を示した。3 日間隔の 0.1ml 投与で 73.8 個、0.2ml 投与で 79.4 個。4 日間隔の 0.1ml 投与で 28.0 個、0.2ml 投与で 102.0 個と 3、4 日間隔でも 4 日の 0.1ml 投与を除き高値で排卵した。また、過剰排卵匹数も、4 日間隔の 0.1ml で 6 匹中 3 匹しか排卵せず、効

果がなかったが、他の区はほぼ排卵効果があった。受精率は 85%以上と高値を示したが、産子率は、4 日間隔の 0.2ml で 26.2%と他よりは低値を示した。また、1 匹の雌個体から作出可能な個体数の生産指数は、3 日間隔で 17.3 匹、4 日間隔で 16.1 匹と、CARD HyperOva®を用いても 4 日間隔の 0.2ml 投与で正常に産子が作出できることを証明した。

C57BL/6J マウスでは、排卵数が、3 日間隔の 0.1ml 投与で 56.4 個、0.2ml 投与で 50.8 個。4 日間隔の 0.1ml 投与で 25.7 個、0.2ml 投与で 82.3 個と 3, 4 日間隔でも 4 日の 0.1ml 投与を除き高値で排卵した。また、過剰排卵匹数も、全区で排卵効果があった。受精率は 80%以上と高値を示し、産子率も 3, 4 日間隔とも 40%前後と正常だった。また、1 匹の雌個体から作出可能な個体数の生産指数は、3 日間隔で 10.2 匹、4 日間隔で 28.0 匹と、CARD HyperOva®を用いても 4 日間隔の 0.2ml 投与で正常に産子が作出できることを証明した。

特に 4 日間隔の 0.2ml での排卵数は、NOG で 102 個、B6 で 82.3 個と各系統で一番高値を示すことがわかった。

D. 考察

これまでの既報のように eCG-hCG の投与間隔が 48 時間では、eCG は 5IU で排卵数は高値を示し、10, 20, 40IU と濃度依存的に排卵数は低下すると報告されている。しかし、本研究で我々は eCG-hCG 投与間隔が 72, 96 時間間隔では、eCG 濃度が高濃度の 20IU や 40IU の方が排卵数は高値を示すことを見出した。また、96 時間間隔の IAS 単独投与では、0.1ml で 44.5 個排卵と高値を示した。さらに IAS 0.1 mL と eCG 併用では 5IU, 10IU, 20IU とも、50 個弱と高値を示したが、中でも IAS 0.1mL +eCG 10IU の条件が 51.3 個と最も高値を示すことを見出した。さらにこれら排卵卵子由来受精卵が正常に産子に発生することも示した。

高濃度 eCG 投与が、72, 96 時間間隔で高排卵を促すのは、eCG による作用の一つである過剰排卵作用が高濃度では投与時に効き、成熟卵胞が強制排卵され、48 時間では間に合わないが、72, 96 時間間隔での卵胞の発育が促進し、次の hCG 処理でより多くの排卵数が得られると考えられる。

抗インヒビン血清 (IAS) は、雌生体内のインヒビンを中和することで FSH の分泌を過剰に促進し、同時に eCG を投与することで多数の卵胞を発育させることができる。

我々は投与間隔延長にこの IAS を併用することで更なる過剰排卵効果を発揮できることを証明した。MCH(ICR)マウスでは投与間隔 96 時間で、排卵数は 51.3 個と高値を示した。次に我々は、主要系統である C57BL/6J(B6)マウスと重度免疫

不全である NOG マウスを用い、上記最適条件を検討した。結果、投与間隔 72 時間と 96 時間で、B6 マウスではそれぞれ排卵数は 48.7 個と 66.6 個、NOG マウスではそれぞれ排卵数は 66.5 個と 89.3 個と高値を示した。この条件が、B6 マウスや NOG マウスにおいても有用であることを示した。しかし、上記の eCG-hCG 投与間隔 72 時間と 96 時間の最適過剰排卵処置濃度の eCG 10 IU と IAS 0.1ml は、市販品ではなく、別途購入による作成が必要である。そこで、汎用性を考え、IAS を含んでいる CARD HyperOva®での条件も検討した。CARD HyperOva®は、0.2ml で eCG 3.75 IU と IAS 0.1ml 含有している。CARD HyperOva®での B6 マウスの最適週齢 4 週齢、NOG マウスの最適週齢 12 週齢の報告があるので、投与間隔 72 時間と 96 時間を検討した。結果、B6 では、72 時間間隔では 0.1ml 投与で 56.4 個、96 時間間隔では 0.2ml 投与で高値を示した。NOG では、48 時間間隔では 0.1ml 投与で 67.5 個、72 時間間隔では 0.1ml, 0.2ml 投与どちらも 70 個以上、96 時間間隔では 0.2ml 投与で 102 個高値を示し、投与間隔による最適濃度を示した。また、これら条件で採卵した卵子由来の受精卵から正常に個体が作出できることも示した。以上の結果から、72, 96 時間間隔の本過剰排卵誘起法を用いることで、ICR マウス、B6 マウス、NOG マウスのホルモン投与の作業スケジュールの変更が可能であることが示された。

E. 結論

我々は eCG-hCG 投与間隔が 72, 96 時間間隔で IAS 0.1 mL と eCG 10IU 共投与で多くの排卵卵子を採取できることを見出した。さらにこの最適濃度は、NOG ならびに C57BL/6 マウスでも効果的だった。そこで IAS を含む市販品の CARD HyperOva®を用い NOG マウスと B6 マウスで検討し、96 時間間隔では、NOG マウスは 102±20.1 個、B6 マウスは 82.3±13.9 個の排卵数が得られ、有用性が証明された。また、これら条件で採卵した卵子由来の受精卵から正常に個体が作出できることも示した。以上の結果から、72, 96 時間間隔の本過剰排卵誘起法を用いることで、ICR マウス、B6 マウス、NOG マウスのホルモン投与の作業スケジュールの変更が可能であることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

特になし

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし