

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

疾患モデル動物の作製、保存、輸送に有用なゲノム編集および生殖工学技術の開発

研究代表者 竹尾 透¹⁾

研究分担者 中尾 聡宏¹⁾, 山鹿 優真¹⁾, 中川 佳子¹⁾, 中潟 直己²⁾, 笹岡 俊邦³⁾

1) 熊本大学生命資源研究・支援センター資源開発分野 2) 熊本大学生命資源研究・支援センター生殖工学共同研究分野 3) 新潟大学脳研究所動物資源開発研究分野

研究要旨

精子の冷蔵輸送技術は、研究施設間におけるラットの輸送法として利用されている。ラット精子を冷蔵輸送することで、微生物学的汚染、輸送中における動物の逃亡や死亡、動物福祉に関するリスクを回避できる。これまでに私たちは、精子冷蔵保存液に添加したジメチルスルホキシドとケルセチンが、ラット精子の冷蔵保存に有効であることを報告した。しかしながら、24時間以上冷蔵保存したラット精子では、受精率が低下するという課題があった。そこで本研究では、体外受精培地においてコレステロールアクセプターとして作用するウシ血清アルブミン (BSA) に注目し、ラット冷蔵精子の受精能に及ぼす影響を検討した。その結果、高濃度 BSA をラット冷蔵精子に処理することで、受精率が向上することを明らかにした。本知見は、ラット冷蔵精子の受精能向上に高濃度 BSA が有効であることを示し、本技術を応用することでラット精子の冷蔵輸送システムの構築が可能になる。

A. 研究目的

遺伝子改変ラットは、疾患モデル動物として生命科学において有用である。遺伝子改変ラットの研究施設間の輸送では、精子の冷蔵輸送が利用できる。ラット精子の冷蔵輸送技術を利用することで、微生物学的汚染、動物の逃亡や死亡、動物福祉に関するリスクを回避することができる。

一方で、ラット精子では、24時間以上、冷蔵保存することにより受精能が低下することが課題であった。そこで本研究では、ラット冷蔵精子における受精能低下を改善するために、ウシ血清アルブミン (BSA) に着目して体外受精培地の改良を試みた。

まず、冷蔵保存したラット精子の運動能および受精能に対する BSA の用量依存的効果を調べた。また、冷蔵精子を用いた体外受精により得られた受精卵に関して、胚移植により産子への発生能を評価した。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

精子は SD 系統の雄ラット (11-15 週齢) から、卵子は SD 系統の雌ラット (5-6 週齢) から採取した。Cr1: CD (SD) 雄ラット (>13 週齢) を精管結紮雄、Cr1: CD (SD) 雌ラット (10-12 週齢) を胚移植用のレシピエントとして使用した。動物の飼育環境は、22°C±2°C、12 時間の明暗サイクル (7:00-19:00)、餌と水は自由摂取であった。本実験は、熊本大学動物実験委員会の承認を得て実施した (ID: A2021-025)。

精子の冷蔵保存では、雄ラットから採取した精巣上体尾部を冷蔵保存液 (ジメチルスルフォキシドとケルセチンを含む Lifer) 中で冷蔵保存 (4°C) した。冷蔵保存後、精巣上体尾部を洗浄し、精子塊を mHTF 中で培養した。体外受精では、各濃度の BSA (0-60 mg/mL) を含む mHTF を使用した。卵子の採取では、幼若雌ラットに 30 IU のウマ絨毛性ゴナドトロピンおよび 30 IU のヒト絨毛性ゴナドトロピンにより過剰排卵誘起処置を行

い、卵管膨大部より卵子を採取した。卵子・卵丘複合体は、精子を含む体外受精培地に導入して培養した。その後、受精卵を観察し、受精率を評価した。胚移植では、経卵管壁卵管内胚移植法により、受精卵をレシピエント雌マウスに移植後、22-23 日後に産子数を評価した。

統計解析では、Prism ソフトウェア・バージョン 8 (GraphPad) を用いて、パーセンテージデータを逆アークサイン変換して統計解析を行った。

C. 研究結果

40 mg/mL BSA を添加した体外受精培地は、0 あるいは 4 mg/mL BSA 群と比較して高い受精率を示した。また、96 時間冷蔵保存したラット精子においても、高濃度 BSA (40 mg/mL) により受精率が改善された。

高濃度 BSA (40 mg/mL) を用いた体外受精から得られた受精卵は、胚移植により産子へと発生することを確認した。

D. 考察

本研究では、体外受精培地に高濃度 BSA (40 mg/mL) を添加することにより、冷蔵保存したラット精子の受精率が向上することを明らかにした。また、本体外受精法により得られた受精卵は、胚移植により正常に産子へと発生した。

精子の冷蔵保存技術は、冷蔵温度下で簡便に試料を輸送し、体外受精により受精卵の作製が可能であるため、研究施設間の輸送を最も簡便に実施できる方法である。本研究により、体外受精培地に高濃度 BSA を用いることで、長期間冷蔵保存したラット精子からも受精卵を作製できるようになった。精子の保存可能期間の延長は、地理的に輸送可能な施設を決定するため、非常に重要である。今後も、ラット精子の国際輸送を実現するために、冷蔵精子の保存可能期間の延長に取り組む予定である。

E. 結論

高濃度 BSA を用いた体外受精法を用いることで、冷蔵保存したラット精子から高い受精率が得られるようになった。本技術は、ラットにおける精子の冷蔵輸送技術の向上に寄与し、生命科学研究における遺伝子改変ラットの新たな輸送システ

ムの構築に有用である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamaga K, Nakao S, Mikoda N, Sztein JM, Nakagata N, Takeo T. High-concentration bovine serum albumin enhances fertilization ability of cold-stored rat sperm. J Reprod Dev. 2024 Apr 4;70(2):131-137. doi: 10.1262/jrd.2023-085. Epub 2024 Mar 1. PMID: 38432992; PMCID: PMC11017099.

2. 学会発表

1. 山鹿 優真, 中尾 聡宏, 三小田 伸之, 中潟 直己, 竹尾 透, BSA 濃度の最適化によるラット冷蔵精子の受精率向上、第 70 回日本実験動物学会、筑波、2023 年 5 月 24 日

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし