

ホンドハタネズミにおける生殖補助技術確立に関する研究

(Study for establishment of assisted reproductive technologies  
in Japanese field vole, *Microtus montebelli*)

影山敦子

ホンドハタネズミにおける生殖補助技術確立に関する研究

(Study for establishment of assisted reproductive technologies  
in Japanese field vole, *Microtus montebelli*)

影 山 敦 子

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科

(指導教員：牛 島 仁)

平成28年6月

## 目次

第1章 緒論	1
第2章 ホンドハタネズミ精子凍結保存および人工授精	
第1節 緒言	4
第2節 マウス精子の凍結保存法の適用とその最適化	8
第3節 新鮮および凍結-融解精子を用いた人工授精による産仔作出	36
第3章 ホンドハタネズミにおける新規過剰排卵法の確立	
第1節 緒言	54
第2節 各種過剰排卵誘起法が採取卵母細胞数に及ぼす影響	57
第4章 ホンドハタネズミ体内受精胚の体外発生および非外科的胚盤胞移植	
第1節 緒言	71
第2節 体内受精由来前核期および前期2細胞期胚の発生に適した培地の検討	73
第3節 体内受精由来胚盤胞の非外科的子宮内移植による産仔作出	88
第5章 ホンドハタネズミの外科手術時に用いる麻酔薬の検討	
第1節 緒言	97
第2節 各麻酔薬が雌雄の麻酔スコアに及ぼす影響	99
第3節 麻酔薬の反復投与が雌の麻酔スコアに及ぼす影響	113

第6章	ホンドハタネズミにおける体外受精, 体外発生および体外受精由来 産仔の作出	
第1節	緒言	123
第2節	新鮮および凍結-融解精子を用いた体外受精	125
第3節	体外受精胚の発生培地の検討および体外受精胚由来の産仔の作出	132
第4節	種々の麻酔薬および胚移植時間が体外受精由来胚の産仔数に 及ぼす影響	146
第7章	ホンドハタネズミにおける顕微授精および顕微授精由来産仔の作出	
第1節	緒言	156
第2節	新鮮あるいは凍結-融解精子を用いた顕微授精および顕微授精由来 産仔の作出	158
第8章	総括	167
	謝辞	171
	引用文献	172

## 第1章 緒論

マウスやラットなどの実験動物は遺伝的背景が明瞭であり、生殖活動様式を含む様々な特徴も広く調べられているため、新規系統樹立や遺伝子改変動物作製に利用されやすい。また、実験動物を用いた動物実験で得られた知見はヒトへの応用研究に役立つが、得られた結果がそのまま適用できない場合も多い。このため、従来の実験動物とは異なる特徴をもつ実験動物の新規開発は、研究領域を広げるとともに、新たな生物学的知見の発掘につながる。

本研究の対象となるハタネズミ (*Microtus*) 属は、脊椎動物門、哺乳綱、齧歯目、真鼠亜目、ネズミ科、キヌゲネズミ亜科、ハタネズミ属に属しており（国際自然保護連合レッドリスト: the International Union for Conservation of Nature Red List: IUCN, 2015）寒帯から温帯まで世界中に広く分布し、多くの種は農業上の利用価値のない、あるいは人間の居住による変動を受けていない土地の地中で孔道生活を営んでいる（渡辺, 1962; 川村と池田, 1935）。また世界各地（北半球のみ）に全64種生息し、本属のうち10種 (*M. bavaricus*, *M. oaxacensis*, *M. umbrosus*, *M. breweri*, *M. kikuchii*, *M. quasiater*, *M. cabraerae*, *M. sachalinesis*, *M. guatemalensis*, *M. schelkovnikovi*) が、絶滅危惧種として記載されている（IUCN, 2015）。

特徴として、ハタネズミ属は複胃を有する草食性小型げっ歯類であり（Kudo and Oki, 1984）、種間で染色体数が異なる（Mazurok et al., 2001）。このことから中・大型草食動物の消化・代謝調節あるいは種分化・種分布研究モデルとしての有用性が期待されている（Tougard et al., 2008）。また哺乳類において3%にも満たない一夫一妻性を示す種も存在することから、ヒト配偶システムの社会的行動（Carter et al., 1995; Aragona and Wang, 2004; Ledford, 2008）あるいは脳内機構研究のモデルとして利用されている（Pitkow et al., 2001; Ross et al., 2009; McGraw and Young, 2010）。さらに、本属の大白歯は歯根が形成されないため、再生医学分野における歯の再生モデル（Tummer and Thesleff, 2003）としても研究利用されている。近年では、プレーリーハタネズミ

(*Microtus ochrogaster*) において人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells: iPS) 細胞樹立 (Manoli et al., 2012) あるいはトランスジェニック動物作製 (Donaldson et al., 2009; Keebaugh et al., 2012) など, 新たなハタネズミ研究が展開されている。さらに, 伝達性海綿状脳症への感受性の高さからプリオン病研究モデル (Carlson et al., 2015) としても注目されている。

現時点において, ハタネズミ属における生殖様式に関しては未解明な部分が多く, 生殖細胞の保存や個体再生に関わる生殖補助技術 (assisted reproductive technologies: ARTs) の開発もほとんど進んでいない。ARTsが応用されている報告に関しては, ホンドハタネズミの新鮮精子由来体外受精卵からの産仔作出 (Wakayama et al., 1996), 楊子ハタネズミ精子の凍結保存の試み (Liu et al., 2006) およびプレーリーハタネズミ体内受精胚の体外培養および体外受精の確立 (Horie et al., 2015) にとどまっている。一方, 実験動物としての広範囲な利用を想定した場合, 供試動物の安定供給が必要不可欠となる。このことから, ハタネズミ生殖細胞の凍結保存, 人工授精, 体外受精および胚移植といったARTsの確立が望まれている。また絶滅危惧種の保全研究においては, 外観が美しい, あるいは人間社会や生活の役に立つ動物種が研究対象となりやすくなる一方で, 小型動物種は研究対象になりにくい傾向がある (Small, 2012a, b)。このことから, ハタネズミ属におけるより一層の研究活動は, 学術研究領域の新規開拓および生物学への貢献だけでなく, 生物多様性の保全にも役立つと考えられる。

前述の実験動物としての動物供給および種の保存を考慮した場合, ARTsは重要である。ARTs開発は, 20世紀初頭に哺乳類受精機構が解析され始めてから現在まで急速に進んでいる (Yanagimachi, 2012)。ARTsには, 過剰排卵, 生殖細胞の凍結保存, 人工授精, 体外受精, 顕微授精および胚移植などが含まれ, 現在では家畜および実験動物においてARTsを利用した産仔作出が可能となっており, これらはキメラおよびクローン動物の作出にも必要とされる基盤技術である。一方, 野生動物を対象としたARTsに関する研究は, 1970年代頃から活発に行われるようになり (Watson, 1979), 1980年代に

入ると積極的に取り組まれるようになった (Seager, 1983; 楠田, 2003)。このことから、各種ARTsは、膨大な数にのぼる希少動物種の保存を進めていくうえでも、必要不可欠な技術であるとともに (毛利と星, 2006) , 効率良く機能するよう様々な動物種に合わせて技術改変していく必要性もある。

本研究では、ハタネズミ属の中でも長年研究が進められており、繁殖特性についてある程度解明されているホンドハタネズミに着目した。ホンドハタネズミの繁殖特性は、交尾排卵動物であり、発情周期は不明瞭のために観察できない。また妊娠期間は21日を示し、一腹産仔数は1~8匹の範囲で、出産できるが平均4匹である (Kudo and Oki, 1982)。さらに、長年の飼育経験から交配時の雌雄間の相性や哺育能力の個体差なども見受けられるため、ホンドハタネズミの繁殖効率は一般的なマウスと比較した場合良好でないと考えられる。以上のことから、ホンドハタネズミにおいてARTsを確立し、安定した繁殖が可能となれば他のハタネズミへの応用が十分に期待できると考えた。

そこで、第一にホンドハタネズミ精子の凍結保存法について検討し、この凍結精子を利用して第2章では人工授精による産仔作出を試みた。第3章では様々な週齢での安定した卵母細胞供給のためにホンドハタネズミにおける新規過剰排卵法を検討した。第4章では体外受精および顕微授精胚の体外培養条件を検討し、非外科的胚盤胞移植による産仔作出を試みた。第5章では外科手術時に用いる麻酔薬を検討し、麻酔薬の反復投与が雌個体に与える影響を検討した。第6章では体外受精による産仔作出、さらに第7章では顕微授精による産仔作出についてそれぞれ検討し、ホンドハタネズミにおける効率的な動物供給法および種の保存法の確立を目指した。

## 第2章 ホンドハタネズミ精子凍結保存および人工授精

### 第1節 緒言

ハタネズミ属を含めた多様で貴重な遺伝的資源の損失を防ぐことは重要な課題であり、そのための遺伝子資源の保全技術の1つとして精子凍結保存があげられる。精子凍結保存は、精子を液体窒素中で保管することにより、精子の運動性を保持したまま半永久的に精子DNAの保存を可能とする技術である。さらに、実際の動物を繁殖させて飼育維持することに比べ、使用期限に制限されず、維持費・労力・スペースが削減できるなど多くの利点が挙げられる (Takahashi and Liu, 2010)。近年の地震や洪水など自然災害が多く発生し、飼育施設が被害を被ることを考慮しても必要な技術である。精子凍結保存を用いて実際に種の保存を確立するためには、精子機能の保護が重要となる。つまり、成熟卵母細胞と受精させて産仔を得るといった一連の過程を正常に引き起こすための機能である。配偶子におけるDNA損傷が様々な生殖異常、自然流産や先天性異常、遺伝病およびガン発生率の増加といった結果を導くことが報告されており (Hassold et al., 1984; Jacobs et al., 1989; Cattanach et al., 1995)、精子DNA完全性の保護は非常に重要である。しかし体細胞と異なり、精子は自身にDNA修復機構をもたないため (Ono and Okada, 1977)、凍結保存によって精子DNAに損傷が生じた場合、受精できない、もしくは受精できても生まれてきた子孫に上述のような悪い影響を及ぼすかもしれない。過去、ヒト (Aravindan et al., 1997)、ウシ (Ballachey et al., 1987; Sailer et al., 1996)、ブタ (Evenson et al., 1994)、ウマ (Kenney et al., 1995)、およびマウス (Evenson et al., 1980) においてクロマチン構造と精子DNA完全性の異常は、環境要因、特に精子の低温保存によって生じた細胞損傷の結果であることが、アルカリコメットアッセイ法や精子クロマチン構造分析法などにより確認されている。このため、凍結保存による精子DNAの損傷レベルを検査することも手法確立のために必要である。



単一ゲル電気泳動法であるアルカリコメットアッセイ法は、DNA一本鎖破断を検出できる。損傷したDNAは核から流出して、ゲル内を陽極へと移動し、一定方向に流れる尾部をもつ“コメット”として現れる。対照的に、DNA損傷をしていないものは“コメット”でない無傷核として現れる (Hughes et al., 1996, 1997)。他のDNA損傷分析と比較して本技術が有利な点は、単一細胞を分析できる能力とそのために細胞集団間の不均一性を研究できること、DNA修復活動が簡単に分析できること、反応性がよく、単純で安価であること、また非常にわずかな細胞群の分析にも使用できるので、臨床材料にも対応できることである (Haines et al., 1998)。

一方、凍結保存法の効果を評価する場合、凍結-融解後に精子の運動性や生存性を調べることが必須となるが、他に凍結-融解精子の卵活性化能を調べることも有意義である。この手段としては、体外受精および顕微授精法が挙げられる。体外受精法を用いた検査は“ハムスターテスト”と知られており、ヒト不妊治療、特に男性側要因の検査において広く利用されてきた (Yanagimachi et al., 1976)。しかしながら、“ハムスターテスト”に用いられる精子には正常な運動性を有することが必須条件となるため、非運動性あるいは低運動性ではあるが精子の卵活性化能やDNAに問題がない場合、適切な検査方法にはならない。これに対して近年、体外受精法に代わる検査法として利用されているのが、顕微授精法である (Dozortsev et al., 1995)。顕微授精法では、運動性がなくとも人為的に卵細胞質内へ精子を導入できるという利点の他、正常に受精できない様々な異常精子の検査にも応用できる。さらに、Kimura and Yanagimachi (1995) がピエゾ装置により、マウス顕微授精の効率を大幅に向上させたことで、前述のような精子検査にマウス卵母細胞と顕微授精法を組み合わせるようになってきた。マウス卵母細胞を用いた顕微授精法が確立される以前、ハムスター卵母細胞を用いた顕微授精によって精子検査が行われてきた。しかし、ハムスター卵母細胞は注入刺激自体で活性化するとともに、顕微授精では体外環境にさらされる時間も体外受精に比べて長く、この結果、光感受性が高いハムスター卵母細胞に悪影響を及ぼし、処理後の培養において強力な体外発生停止が起こる (Bavister, 1995; Yamauchi et al.,

2002)。一方、マウス卵母細胞は注入刺激自体での活性化率が低いこと、また培地の改良により体外発生停止が起こりにくく、第一有糸分裂中期での細胞遺伝学的解析が詳細にできることがハムスター卵母細胞と異なる (Yamauchi et al., 2002)。これらのことから、精子が元来もつ卵活性化能を検査するにあたり、マウス卵母細胞と顕微授精法を組み合わせた検査方法は有効である。

精子の卵活性化能検査には精子と同種動物の卵母細胞を用いることが望ましいが、野生・希少動物において研究に適した良質な卵母細胞の採取は困難である。特に絶滅に瀕した野生動物では卵母細胞を屠体から採取しなければならず、採取できる頻度も極めて低い。採取できたとしても体外環境にさらされることによる卵母細胞の品質低下、受精に最適な卵母細胞が得られないなどの問題が生じる。このことから凍結保存法を用いずに卵母細胞と精子を適時受精させることは非常に困難である。さらに、種によって耐低温や耐凍性なども大きく異なるため、凍結保存法が十分に吟味されていないと貴重な生殖細胞を採取できたとしても保存できない。この観点から、本研究におけるホンダハタネズミ精子の凍結保存検討は、他のハタネズミ属あるいはげっ歯類に対しても潜在的な応用性をもつかもしい。一方、マウス卵母細胞は異種精子を容易に受け入れることから、卵母細胞の採取が困難な動物種においてはマウス卵母細胞を用いた異種間顕微授精法が利用されている；ニタリクジラ (Watanabe et al., 2007)、アカゲザル (Li et al., 2007)、カニクイザル (Ogonuki et al., 1998)、ヒト (Watanabe, 2003; Dozortsev et al., 1995)。

一般的に哺乳類精子を凍結する場合、凍結容器としてチューブあるいはストローが用いられる。本研究室では長年マウスおよびハタネズミ精子における凍結保存にはチューブを用いてきた。一方、ヒトあるいはウシなどの精子凍結保存には主にストローが用いられている (Di et al., 2012; Hu et al., 2010)。凍結容器にチューブを用いる長所として、前凍結までの操作が簡便であること、多量の精子懸濁液を保存できることがあげられる。短所として、十分な保管スペースが必要である、融解時のピペット操作が多くなることがあげられる (ピペット操作は精子に物理的損傷を与え、運動性およ

び生存性を低下させる)。別法として、凍結容器にストローを用いた精子凍結保存法があげられ (Hu et al., 2010) , 長所として、チューブに比べて保存時に省スペースで済む、融解時のピペット操作回数を低減できるという点があげられ、短所として、1本のストローで凍結保存可能な精液量が限られる、充填作業が複雑であるという点があげられる。一方、マウスにおいてチューブあるいはストローを用いた精子凍結保存の場合、運動性および受精率に有意差はみられなかったという報告がある (Hasegawa et al., 2012) 。これらのことを考慮して目的に合わせて凍結容器を選択すれば、動物の利用性が向上するかもしれない。

精子凍結保存法の最終的検証のためには産仔を作出する必要がある。凍結-融解精子を用いた産仔作出方法として、第一に人工授精があげられる。人工授精は、体外受精-卵管 (子宮) 内胚移植と比べて人為的操作が少ない産仔作出法であり、卵巢嚢内、卵管内あるいは子宮内精子移植法、および子宮頸管経由法があげられる。外科的人工授精として、卵巢被膜内精子移植法 (Sato and Kimura, 2001) , 卵管内精子移植法

(Nakagata, 1992) , および子宮内精子移植法 (Nakatukasa et al., 2001) があり、非外科的な子宮頸管経由法に比べて少ない精子数で実施でき、トランスジェニックマウスおよびノックアウトマウスなどの得られる精子数の少ない系統に有効である。一方で高度な技術 (手術) 力を必要とする (Sato et al., 2004) 。これに対して子宮頸管経由法は、比較的多くの精子 ( $3 \times 10^6$ 個/50  $\mu$ l) を必要とするが (竹島と豊田, 1977) , 開腹手術を必要としないため、レシピエントへの負担を軽減できる (Stone et al., 2015) 。故に、子宮頸管経由法を用いた人工授精は、凍結精子の個体発生への貢献を調べる有効な手段の一つである。

本章では、第一にマウス精子の凍結法がホンドハタネズミ精子の凍結保存に適用できるか否かを検討した。第二に、凍結保存における凍結容器の違いが精子性状に及ぼす影響を調べた。第三に、子宮頸管経由法を用いて、新鮮あるいは凍結-融解精子を子宮角に移植して産仔作出を試みた。

## 第2節 マウス精子の凍結保存法の適用とその最適化

本節では、マウスの精子凍結保存法がホンドハタネズミ精子の凍結保存にも適用できるか否か検討するために、運動性、生存性、奇形率、DNA損傷レベルおよび卵活性化能について評価した。また、凍結保存における凍結容器の違いが精子性状に及ぼす影響を運動性、生存性および受精率で評価した。

### 材料および方法

#### 動物倫理

すべての動物実験は、“動物実験の適正な実施に向けたガイドライン（2006年：日本学術会議）”に従って実施された。また本実験計画は、日本獣医生命科学大学動物実験委員会の承認を受けている（承認番号：平成22年；10-20，平成23年；11-32, 74, 75, 平成24年；12-22, 48, 75, 平成25年；13-77, 78, 100, 平成26年；26K-10, 13, 14, 26S-21, 平成27年；27K-6, 29, 30, 31, 27S-42）。

#### 飼育条件

動物を無窓動物舎内で飼育し、繁殖に影響を与えないように細心の注意を払った。環境を一定に保つために舎内の温度（ $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ）および湿度（ $50 \pm 5\%$ ）をエアークンディショナーにより調節した。照明には蛍光灯を用い、自動タイマーにより午前7時～午後9時までの14時間照明（14L: 10D）とした。飼育にはポレオレフィン性透明プラスチックケージ（TPX, 日本クレア株式会社，東京，日本）を使用し、縦18.2 cm × 横26 cm × 深さ12.8 cmおよび縦22.5 cm × 横33.8 cm × 深さ14.0 cmの2種類のケージを収容匹数に応じて用い、各々のケージ収容匹数を1～2匹あるいは3～5匹とした。

床敷にはウッドチップ（ソフトチップ，三協ラボサービス株式会社，東京，日本）を用い、原則週に1回，オートクレーブで滅菌したケージとともに交換した。例外とし

て、分娩前後の一定期間についてはケージ交換せず、床敷の一部交換にとどめた。ケージを床敷交換時に洗浄し、20%尿石除去剤（サンアライエース、大阪、日本）で尿石除去後、水洗してオートクレーブで滅菌した。舎内清掃を毎日行った。

繁殖のために、性成熟に達し、近親でない繁殖用雌および繁殖用雄を1匹ずつ選び、雄のケージに雌を移動させて交配した。産仔を生後21～23日（出生日を0日とする）で親から離し、雌雄を分けて飼育した。肛門と外陰部の距離の短いものを雌、長いものを雄として雌雄判別した。

飼料には、動物園用固形飼料ZCペレット（草食動物用；オリエンタル酵母工業会社、東京、日本）およびハイキューブ（東京むさし農業協同組合、東京、日本）を常時給与し、自由摂取とした。飼料組成は次に示す通りである。動物園用固形飼料ZCペレットは水分6.75%、粗蛋白質17.4%、粗脂肪2.68%、粗繊維11.03%および灰分7.4%であった。ハイキューブは水分8.08%、粗蛋白質13.7%、粗脂肪1.73%、粗繊維21.81%および灰分9.1%であった。飲水については、給水ビン（TPX, 日本クレア株式会社）を用いた自由飲水とし、週に2回新鮮なものに交換した。

#### 供試動物

1978年11月に野生種より作出された本学獣医生理化学教室（現獣医化学教室）のコロニーより入手した雌雄各3匹（野生色）、および1980年5月に農林水産省家畜衛生試験場研究第一部実験動物研究室のコロニーから雌11匹（白色）および雄4匹（白色）を入手し、総計21匹を祖先として当研究室において無作為に交配させ、飼育および維持してきたものの子孫である。

本実験では、9～27週齢の雄ホンダハタネズミ（*Microtus montebelli*）および対照区（手法）として12～17週齢の雄B6D2F<sub>1</sub>マウス（C57BL/6 × DBA/2; 日本クレア）をそれぞれ5匹を採精に用いた。また、卵活性化能検査に使用するマウスの体内成熟卵母細胞を7～11週齢の雌B6D2F<sub>1</sub>マウスから採取した。

## 試薬および培地

精子濃度調整用培地にはHEPES緩衝Chatot-Ziomek-Bavister (H-CZB, 表1) 液を用いた。採卵後の卵丘細胞除去には0.1%ウシ精巣由来ヒアルロニダーゼ (H-4272, type IV, SIGMA, MO, USA) を添加したH-CZB液を用い, 卵母細胞の培養には5 mg/mlのウシ血清アルブミン (A6003-5G, bovine serum albumin; BSA, fatty acid free, SIGMA) を添加したhuman tubal fluid (HTF, 表1) を用いた。なお, 本研究で用いたHEPES緩衝液には, 0.1%ポリビニルアルコール (polyvinyl alcohol; PVA, SIGMA) を添加した。

## 精子凍結保護剤 (Cryoprotectant agent: CPA)

CPA溶液を米国Jackson研究所による方法 (Sztejn et al., 2000) に修正を加えて準備した。4.5 gのスキムミルク (Difco™; Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA) を75 mlの超純水に溶解後, 2本の50 ml遠沈管 (labcon, CA, USA) に等量分注した。次に, 10 °C, 15,000 × gで90分間遠心分離し, 上清50 mlをパスツールピペット (IWAKI, 東京, 日本) で採取した。その後, 30 mlの超純水と18 gのD[+]ラフィノース5水和物 (30001-15, D[+]-Raffinose; ナカライテスク, 京都, 日本) を加えて, 最終量100 mlに調整し, ラフィノースが溶解されるまで30~35°Cのホットスターラー上で混合した。得られた溶液を孔径0.22 μmのシリンジフィルター (PES; Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) でろ過し, 8 mlの凍結チューブ (アシスト, 東京, 日本) に6 mlずつ分注した。分注後, 溶液を-20°Cで凍結保存し, 使用する際に37°Cのウォーターバス (TM-1, ASONE, 東京, 日本) 内で融解した。

表1 各種培地の組成表

成分	H-CZB	HTF	H-HTF	DPBS(-)	DPBS(-)- PVA
	mM	mM	mM	g/L	g/L
NaCl	81.62	101.6	101.6	8	8
KCl	4.83	4.69	4.69	0.2	0.2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	—	—	—	1.15	1.15
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.18	0.37	0.37	0.2	0.2
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.18	0.20	0.20	—	—
NaHCO <sub>3</sub>	5.00	25.0	5.0	—	—
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.70	2.04	2.04	—	—
Na <sub>2</sub> -EDTA·2H <sub>2</sub> O	0.10	—	—	—	—
L-Glutamine	1.00	—	—	—	—
Na-lactate	28.00	21.4	21.4	—	—
(60% syrup)					
Na-pyruvate	0.27	0.33	0.33	—	—
Glucose	5.55	2.78	2.78	—	—
Gentamicine	50 µg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml	—	—
Phenol red	0.5 mg/ml	0.5 mg/ml	0.5 mg/ml	—	—
HEPES-Na	20.00	—	—	—	—
HEPES	—	—	20.00	—	—
BSA	—	5 mg/ml	—	—	—
PVA	1 mg/ml (0.1%)	—	1 mg/ml (0.1%)	—	1 mg/ml (0.1%)

## 精子の採取

供試動物を頸椎脱臼により安楽死後、摘出した両側の精巣上部尾部を採取して37°Cに加温した2 mlのCPA溶液中に移動し、付着した血液および脂肪を取り除くために洗浄した。洗浄後、組織を1mlのCPA溶液中に移し、再び洗浄した。その後、1.1mlのCPA溶液を含むペトリディッシュ (NO. 1008; FALCON, NJ, USA) に移し、眼科剪刀を用いて精巣上部尾部に10ヶ所の切込みを入れた。次にペトリディッシュをCO<sub>2</sub>インキュベータ (100%湿潤, 5% [v/v] CO<sub>2</sub>, 95%大気, 37°Cおよび飽和湿度の条件下) 内に15分間静置した。静置後、極細ピンセットを用いて精巣上部尾部をペトリディッシュから静かに除去した。

## 精子の凍結および融解

### a) 凍結チューブ

CPA溶液中の精子濃度を均一にするため静かに混合し、200  $\mu$ lの広径チップ (PT-003, イナ・オプティカ, 大阪, 日本) を用いて速やかに5本の凍結チューブ (Cryogenic vial, 2.0 ml, NALGENE, NY, USA) に100  $\mu$ lずつ分注した。次に、凍結チューブをあらかじめ-120°Cの液体窒素蒸気で満たした凍結装置内ラックに10分間静置した (液体窒素表面からの距離1.5 cm)。その後凍結装置内の液体窒素に直接投入し、ケーンに装着後-196°Cの液体窒素タンク内に移動させて凍結した。未凍結の精子懸濁液200  $\mu$ lを新鮮精子対照区として後述の各検査に用いた。上述の精子サンプルを液体窒素タンク内で少なくとも1週間保管した。

実験に使用する際、凍結チューブを取り出して30秒間空気中で保持した後、37°Cの温水層に1分間浸して急速融解した。融解後速やかに、HTFを含むマイクロチューブ (A. 150X; アシスト) に精子懸濁液を移し、インキュベーター内で15分間培養した。培養後、凍結-融解精子を新鮮精子対照区と同様に各検査に用いた (後述)。また凍結-融解精子については1個体につき、それぞれ3回実験を繰り返した。



## b) 凍結ストロー

CPA溶液中の精子濃度を均一にするため静かに混合し、加温板（FHP-450S; 東京硝子機器, 東京, 日本）上に置いたディッシュ（IWAKI 60 mm/Non-treated dish）に200  $\mu$ lの広径チップ（PT-003, イナ・オプティカ）を用いて25  $\mu$ lの精子懸濁液小滴を1ストローにつき4個作製した。その小滴をストロー操作作用シリンジを用いて0.25 ml凍結ストロー（PETG sperm straw 0.25 ml, Cryo Bio System, Saint ouen sur-iton, France）中に50  $\mu$ lのHTF, 30  $\mu$ lの空気吸引後に, 25  $\mu$ l  $\times$  4カラム（合計100  $\mu$ l）の精子懸濁液および20  $\mu$ lの空気を交互に吸引して綿栓にHTFが到達したところで, シーラー（家田貿易株式会社, 東京, 日本）で封入した。これを1匹あたり4本作製し, あらかじめ $-120^{\circ}\text{C}$ の液体窒素蒸気で満たした凍結装置内ラックに10分間静置した（液体窒素表面からの距離4 cm）。その後, 凍結装置内の液体窒素に直接投入し, 液体窒素内でゴブレットに移した。ゴブレットに収納後,  $-196^{\circ}\text{C}$ の液体窒素タンク内に移動させて凍結した。上述の精子サンプルを液体窒素タンク内で少なくとも1週間保管した。

実験に使用する際, 凍結ストローを液体窒素タンクから取り出して5秒間空気中で保持した後, チューブ精子と同様の方法に従って, 融解および前培養した。

## マウス卵母細胞の準備

雌マウスに妊馬血清性性腺刺激ホルモン（PMSG; セロトロピン, あすか製薬株式会社, 東京, 日本）を5 IU, 48時間後にヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（hCG; ゴナドトロピン, あすか製薬株式会社）5 IUをそれぞれ腹腔内投与して過剰排卵を誘起した。hCG投与13~14時間後に過剰排卵させた雌マウスを頸椎脱臼により安楽死させて卵管を摘出し, 細胞培養用流動パラフィン（軽質; ナカライテスク）内で卵管膨大部を開裂し, 卵母細胞-卵丘細胞複合体を採取した。次に, 0.01%ヒアルロニダーゼ添加H-CZB液中で3分間処理後, ピペッティングにより卵丘細胞を除去した。卵丘細胞を除去した卵母細胞をHTF中で洗浄後, 流動パラフィンで覆ったHTFの小滴内で実験に用いるまでイ

ンキュベータ内で保持した。準備した卵母細胞をhCG投与20時間までに使用した。

#### 精子注入用ピペットの作製

精子注入用ピペットにはホウケイ酸ガラスキャピラリー管 (GC-100T-10, HARVARD APPARATUS, KENT, USA) を用い、マイクロピペットプラー (P-97; Suttur Instruments, Novato, CA, USA) でガラス管を引き伸ばし、なだらかなテーパーをつけた。プラープログラムにはNo. 16 (heat: 800, pull: 50, velocity: 120, time: 200) を用いた。次にマイクロフォージ (MF-900; Narishige Instrument, 東京, 日本) を用い、精子注入用ピペット先端をガラスボールに接触させ、heatレベル20以内で静電気によって先端が平らになるように切断した。その後heatレベルを上昇させ、約10度の傾斜をつけた。先端の外径が最大8.5  $\mu\text{m}$ までのものを本実験に使用した。

#### 精子検査

新鮮精子および凍結-融解精子サンプルを以下の各項目について検査した。1回の実験において300個の精子を数えた。

##### a) 新鮮精子の形態

0.5 mlマイクロチューブ内で精子浮遊液30  $\mu\text{l}$ と0.25%グルタルアルデヒド (和光純薬工業株式会社, 大阪, 日本) 含有0.1% PVAを含むリン酸緩衝液 (DPBS(-)-PVA, pH 7.4, 表1) 30  $\mu\text{l}$ をピペットで静かに混合した。混合後、精子-固定液混合液を脱脂スライドガラス上に30  $\mu\text{l}$ 滴下し、カバーガラスで伸展した後に風乾させた。風乾後、スライドガラスを軽く水洗し、緩衝ギムザ液 (表2) 中で1.5時間染色した。染色後、再び水洗して風乾させたのち、標本を微分干渉型正立顕微鏡 (BX50, Olympus, 東京, 日本) 下で観察した (400倍)。正常精子あるいは形態異常のある精子に分類して、異常精子率を算出した。図1bを正常精子と判断し、b以外のc~fを奇形精子と判断した (図1)。

表2 ギムザ染色液の組成

成分	ml
ギムザ染色液 <sup>1</sup>	3
蒸留水	35
M/10 Sorensen リン酸緩衝液	2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	33.36 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	33.46 mM

<sup>1</sup>ギムザ染色液；1.0924.0100, 日本メルク株式会社, 東京, 日本.

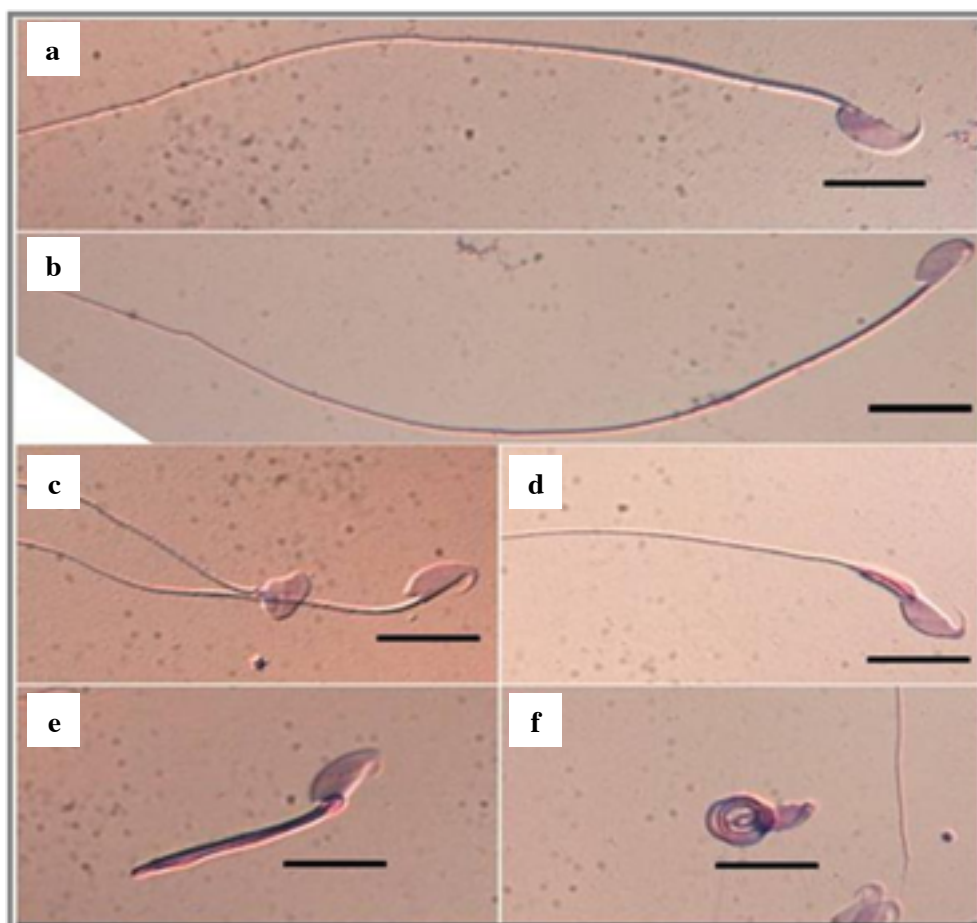


図1 ホンドハタネズミ精子の形態

マウス(a)およびハタネズミ(b~f)精子の形態。(a)マウス正常精子，(b)ハタネズミ正常精子，(c)頭部異常，(d)頸部異常，(e)中片部-尾部異常，(f)中片部-尾部異常。各図中の黒線は，10 μm.

#### b) 精子の総運動性

光学顕微鏡下で総運動性を観察した（400倍）。最も活発に運動しているものを“+++”，活発な前進運動をしているものを“++”，微弱だが前進運動をしているものを“+”，前進運動はしていないがその場で動いているものを“±”，全く動いていないものを“-”と評価し，“-”以外のものを総運動性として算出した。

#### c) 精子の生存性

0.5 mlマイクロチューブ内で精子浮遊液25  $\mu$ lとエオシン・ニグロシン液（表3）25  $\mu$ lをピペットで静かに混合した。混合後，精子-染色液混合液を脱脂スライドガラス上に25  $\mu$ l滴下し，カバーガラスで均一に伸ばして風乾させ，直ちに光学顕微鏡下で観察した（400倍）。精子頭部全体あるいは頭部の中でも後帽部が赤く染色されたものを死滅精子（図2a）とし，後帽部あるいは頭部全体が無色のものを生存精子（図2b）とした。

#### d) 精子DNAの損傷レベル

Li MWら（2007）の用いたアルカリコメットアッセイ法にいくつかの修正を加えて精子DNAの損傷レベルを検査した。通常融点アガロース（凝固温度36°C，溶解温度88°C; ビーエム機器株式会社，東京，日本）と低融点アガロース（凝固温度28°C，溶解温度65°C; LIFE TECHNOLOGIES™, USA）をそれぞれ0.5%濃度になるようにCa<sup>++</sup>，Mg<sup>+</sup>およびPVA不含DPBS（表1）に加え，煮沸溶解した。0.5%の通常融点アガロース20  $\mu$ lを全面フロストスライドガラス（S5110; 松浪硝子工業株式会社，大阪，日本）に滴下し，カバーガラス（24 × 24 mm）で伸展-風乾した。1 × 10<sup>7</sup>個/mlの精子濃度になるようにHEPES緩衝human tubal fluid（H-HTF，表1）で希釈した精子懸濁液12  $\mu$ lと0.5%の低融点アガロース108  $\mu$ lをそれぞれ静かに混合（37°C）し，精子濃度を1 × 10<sup>6</sup>個/mlに調整した精子-アガロース混合液を準備した。次に0.5%の通常融点アガロースゲルで覆わ

表3 エオシン・ニグロシン染色液の組成

成分	g/100 ml
NaCl*	0.84
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O*	0.178
Eosin Y (和光)	1.0
Nigrosine (和光)	1.0

\* 混合液をpH 7.4に調整する.

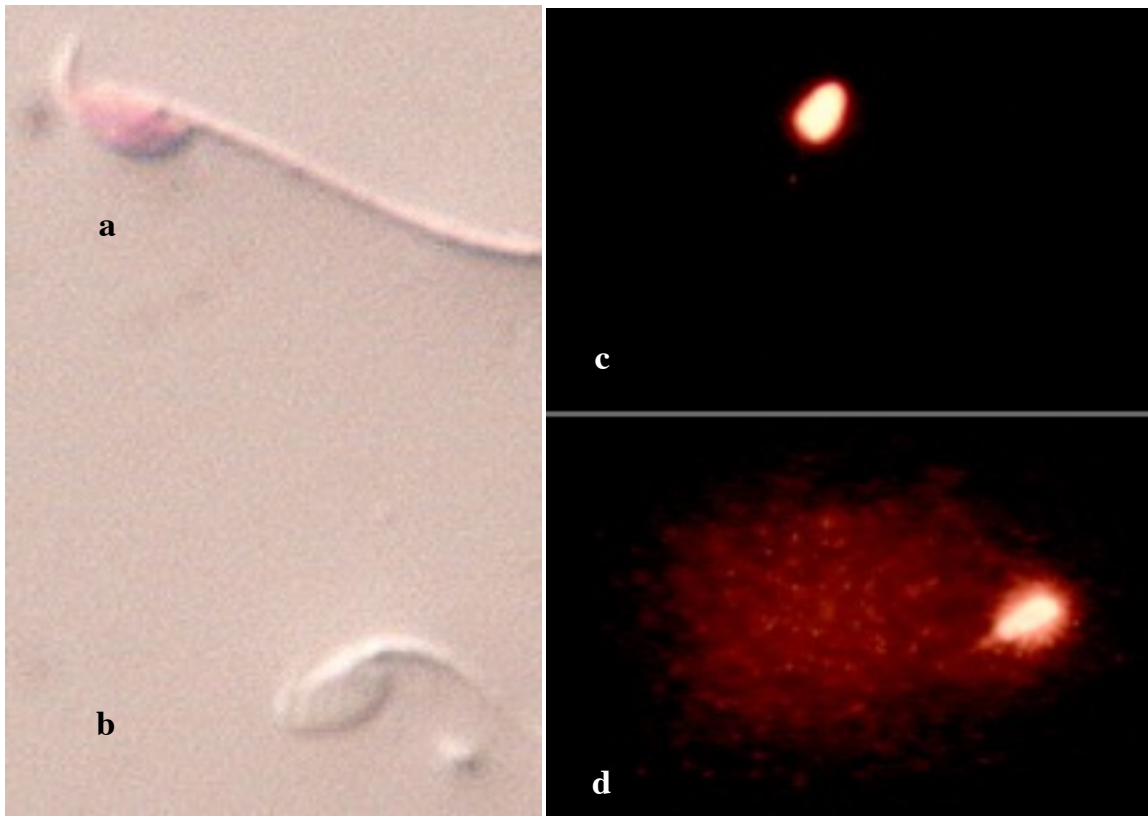


図2 ホンドハタネズミ凍結-融解精子の生存性およびDNA損傷レベル

(a,b) エオシン・ニグロシン染色, (c,d) アルカリコメットアッセイ. (a) 死滅精子, (b) 生存精子, (c) 正常精子, (d) 損傷精子

れたスライドガラスに2ヶ所，精子-アガロース混合液を25  $\mu\text{l}$ ずつ滴下し，カバーガラスで覆った。スライドガラスを4°Cで10分間維持し，アガロースがゲル化したのち，カバーガラスをピンセットで丁寧に取り除いた。次に35  $\mu\text{l}$ の0.5%低融点アガロースをそれぞれのアガロースゲル上に加え，カバーガラスで覆って同様にゲル化させた。その後カバーガラスを静かに取り除き，スライドガラスを溶解バッファー（2.5 M NaCl, 100 mM 2Na-EDTA, 10 mM Trizma-base, 1% sodium N-lauroyl sarcosinate [和光]，pH 10.0, 1% Triton X-100 [和光]）中で暗所，4°Cで1時間処理した。処理後，溶解バッファー900  $\mu\text{l}$ にプロテイナーゼK（160-14001, 2 mg/ml [和光]）を100  $\mu\text{l}$ 溶解した混合液（最終濃度0.2 mg/ml）を50  $\mu\text{l}$ 添加し，暗所，37°Cで20時間処理した。次にスライドガラスを溶解バッファー中で洗浄してプロテイナーゼKを取り除き，アルカリ電気泳動バッファー（300 mM NaOH, 10 mM 2Na-EDTA）を満たした水平電気泳動器（FA-8426; 株式会社マリソル，東京，日本）内で暗所，20分間静置した。その後，15 V, 180 mAで20分間電気泳動した。泳動後スライドガラスを中和バッファー（0.4 M Tris-HCl, pH 7.5）中に置き，暗所で15分間中和した。次に20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ のエチジウムブロミド（547-00101; 和光）を15  $\mu\text{l}$ 添加してDNA染色し，カバーガラスで覆った。標本を蛍光正立顕微鏡（BX50, OLYMPUS）下で観察し（400倍），電気泳動によって陽極側に流れたDNA断片を持つ精子を“コメット”として損傷精子（図2d）に分類し，そうでないものを正常精子（図2c）として計測した。

#### e) 精子の卵活性化能の評価

顕微授精に必要な操作およびピエゾマイクロマニピレーターのセッティングにはYoshida and Perry（2007）の報告を参考にした。顕微注入には運動性の認められた精子を使用した。注入に選択した精子を精子浮遊液10% PVP（polyvinyl pyrrolidone K90, MP Biomedicals, France）ドロップから分離用ドロップに移動させ，吸引-排出を2～3回繰り返して精子注入用ピペット内から凍結保護剤を除去した。また同時に，精子頸部にパ



ルスA (SPEED=1~4, INTENSION=1~4) を負荷して頭部と尾部を分離し、注入用ピペット内に精子頭部のみを吸引した。

ピエゾ装置 (EMM-7150UD, プライムテック株式会社, 茨城, 日本) を備えた位相差倒立顕微鏡 (IX73, OLYMPUS, 東京, 日本), 10倍の接眼レンズおよび20倍の対物レンズを用いて (合計200倍), 卵母細胞および卵母細胞保持用ピペットの内径両方に焦点が合うように設定した。卵母細胞内の第II減数分裂中期の紡錘体が12時あるいは6時の位置になるように, 保持用ピペットで卵母細胞の透明帯および一部細胞質を吸引保持した。注入用ピペット側に囲卵腔が最大になるように保持する方向を選択した。紡錘体が顕微鏡下で目視できない場合は, インキュベータ内に戻し, 時間をおいて紡錘体が確認できるようになってから再び使用した。注入用ピペットの先端および卵細胞膜に焦点を合わせ, 注入操作した。まず, 注入用ピペット先端を透明帯に接触後, パルスAを負荷し, 透明帯を貫通させた。注入用ピペットの透明帯貫通後, 注入用ピペット内の透明帯断片を排出し, 精子頭部を注入用ピペット先端に移動させた。その後, 保持用ピペット側に向かって注入用ピペットを前進させ, 卵母細胞直径の約95%の位置でパルスB (SPEED=1, INTENSION=1~2) を負荷し, 卵母細胞膜に極小の穴を開けた。

マウス卵母細胞では注入操作後, 25~37°Cで細胞膜の修復が促進されて溶解が生じやすいため (Kimura and Yanagimachi, 1995), 顕微操作完了後, 室温 (約23°C) 下暗所に注入した卵母細胞を2分間静置し, 卵母細胞膜を緩やかに回復させた。30分以内に10~15個の卵母細胞の顕微操作および膜修復処理を完了させた。その後, HTF中で3回洗浄し, インキュベータ内で4.5時間培養した。

培養後, 卵母細胞を2.5%グルタルアルデヒド溶液 (和光純薬工業株式会社) 中でリンスし, 4%パラホルムアルデヒド (電子顕微鏡用; ナカライテスク) 含有DPBS(-)-PVA中で一晩固定した。固定後, 4ヶ所にワセリンを滴下したスライドガラス上に卵母細胞をホールマウントしてカバーガラスで覆った。ホールマウント後, 標本を100%アルコールで洗浄し, 0.25%アセトラクモイド (ラクモイド: 1g, 酢酸: 50

ml, さらに45%酢酸で2倍希釈 [保存液] 後に, 超純水で5倍希釈して使用) で染色後, 酢酸-グリセロール (グリセリン: 酢酸: 超純水=1: 1: 3) で余分な染料を除去してマニユキアで封入した。封入後, 微分干渉式正立顕微鏡下で卵母細胞の核相を観察した。本研究では, 以下の3つの条件を満たした卵母細胞が観察された場合, 注入した精子が卵活性化能を保有していると定義した; 1) 第II減数分裂中期からの脱出が確認された卵母細胞, 2) 第2極体の放出が認められた卵母細胞, および3) 雌雄前核を形成した卵母細胞。

## 実験計画

実験1) マウス精子の凍結保存法がホンドハタネズミ精子の凍結に及ぼす影響

上述の方法を用いて凍結-融解後の精子性状および卵活性化を評価した。

実験2) 凍結保存における凍結容器の違いが精子性状に及ぼす影響

実験①の結果より, マウス精子の凍結保存法がハタネズミ精子にも応用できることが明らかになった。そこで, 凍結容器としてチューブ (対照区) およびストローを用いた凍結-融解後の精子性状を評価した。本実験では, 32~42週齢雄ホンドハタネズミ4匹から上述の方法で精子を採取し, 凍結-融解および精子検査した。3~34週齢雌ホンドハタネズミ4匹から体内成熟卵母細胞を第3章の方法で採取し, 第6章の方法を用いて体外受精 (後述) および受精率を検査した。

## 統計処理

実験1) マウス精子の凍結保存法がホンドハタネズミ精子の凍結に及ぼす影響

得られたすべてのデータについてExcelアドインソフトStatcel 3 (オーエムエス出版, 埼玉, 日本) を用いて統計処理した。新鮮精子および凍結-融解精子の検査を1個体につき, それぞれ1回および3回以上繰り返した。各動物種内の処理間の検定には $\chi^2$ 検定を用い, 割合 (%) を角度変換して処理した。危険率5%未満の場合に差が有意である

と判定した。

#### 実験2) 凍結保存における凍結容器の違いが精子性状に及ぼす影響

新鮮精子および凍結-融解精子の検査を1個体につき、それぞれ1回および3回以上繰り返した。精子性状検査の各処理間の検定において割合(%)を角度変換後に一元配置分散分析し、処理間に有意差が認められた場合、Tukey-Kramer法を用いて多重比較検定した。体外受精については $\chi^2$ 検定を用いた。危険率5%未満の場合に差が有意であると判定した。

## 結果

実験1) マウス精子の凍結保存法がホンドハタネズミ精子の凍結に及ぼす影響

### a) 新鮮精子の形態

ホンドハタネズミの新鮮精子奇形率は、平均3.5% (53/1500) であった (表4)。

### b) 精子の総運動性

ホンドハタネズミの新鮮精子 (79%) と凍結-融解精子 (67%) を比較したところ、有意差は認められなかったが、凍結-融解精子において運動性が低下する傾向が見られた (図3)。

### c) 精子の生存性

ホンドハタネズミ精子の生存性について、新鮮精子で87% (1310/1500) であったが、凍結-融解精子では67% (3612/5400) と有意に生存性が低下した (図4,  $P < 0.05$ )。

### d) 精子DNAの損傷レベル

ホンドハタネズミ精子のDNA損傷レベルについて、新鮮精子は2.0% (30/1500) , 凍結-融解精子は2.5% (135/5400) と有意差は認められなかったが、凍結-融解後においてDNA損傷レベルが上昇する傾向がみられた (図5)。

### e) 精子の卵活性化能の評価

ホンドハタネズミの新鮮あるいは凍結-融解精子をマウス成熟卵母細胞に注入したところ、新鮮および凍結-融解ともに減数分裂再開率は100%と高い値であった (表5)。また減数分裂を再開したすべての卵母細胞が、雌雄前核を形成した。精子未注入 (対照) 区において減数分裂を再開した卵母細胞の割合は4.5% (7/156) と低率であり、減数分裂の再開は注入操作ではなく注入された精子によって誘起されたことが示された

表4 ホンドハタネズミにおける精子奇形率

動物種 (n=5)	奇形精子数	奇形率(%) <sup>1</sup>
ホンドハタネズミ	53/1500	3.5 ± 1.0
マウス (B6D2F <sub>1</sub> )	39/1943	2.0 ± 0.7

<sup>1</sup>平均値 ± 標準誤差.

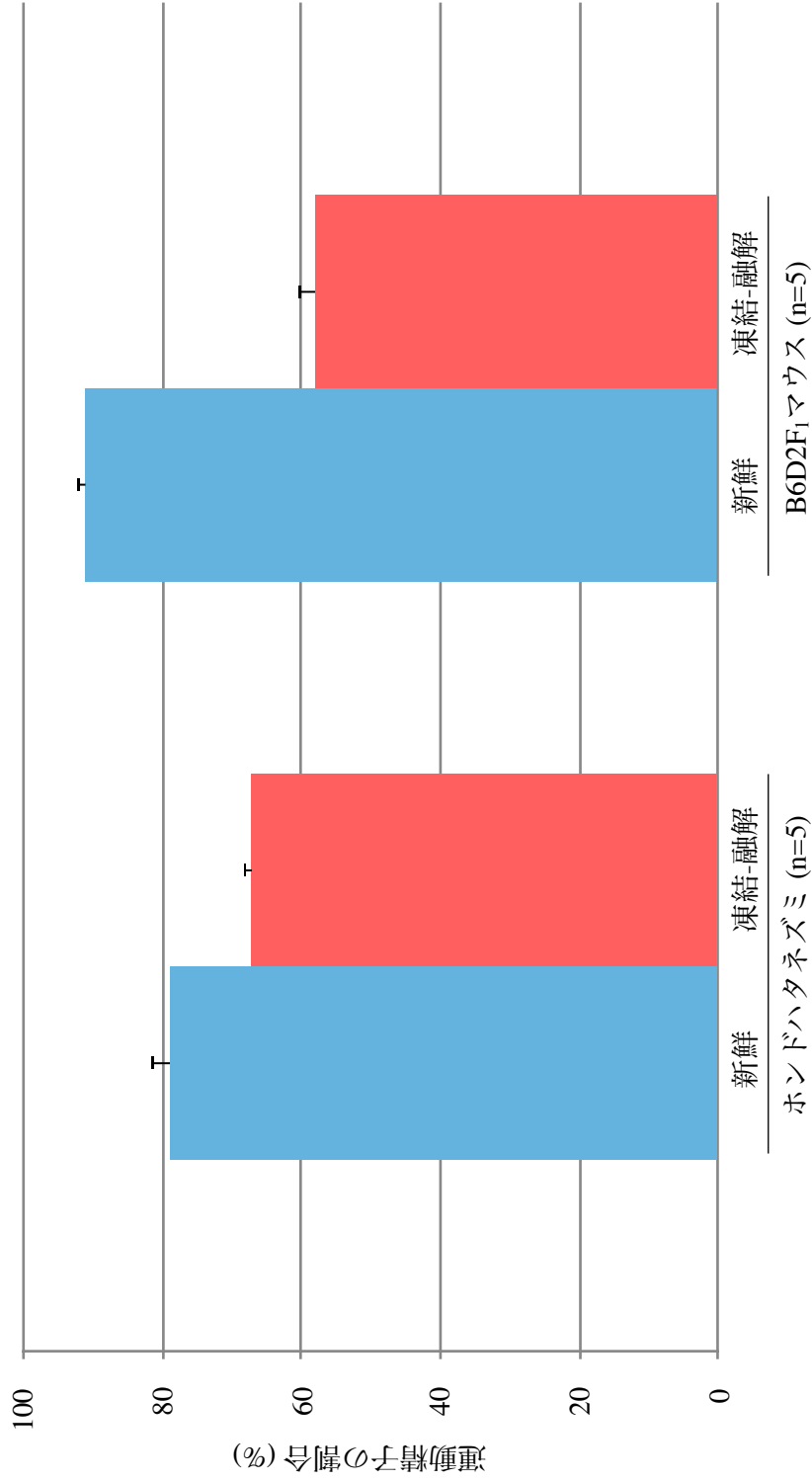


図3 新鮮および凍結-融解ホンドハタネズミ精子の総運動性  
 新鮮および凍結-融解精子について、それぞれ1回および3回以上の実験を繰り返した。“\_”以外の運動性のある精子を総運動性 (+++, ++, +, ±) として算出した。棒グラフの表記は平均値±標準誤差で示している。

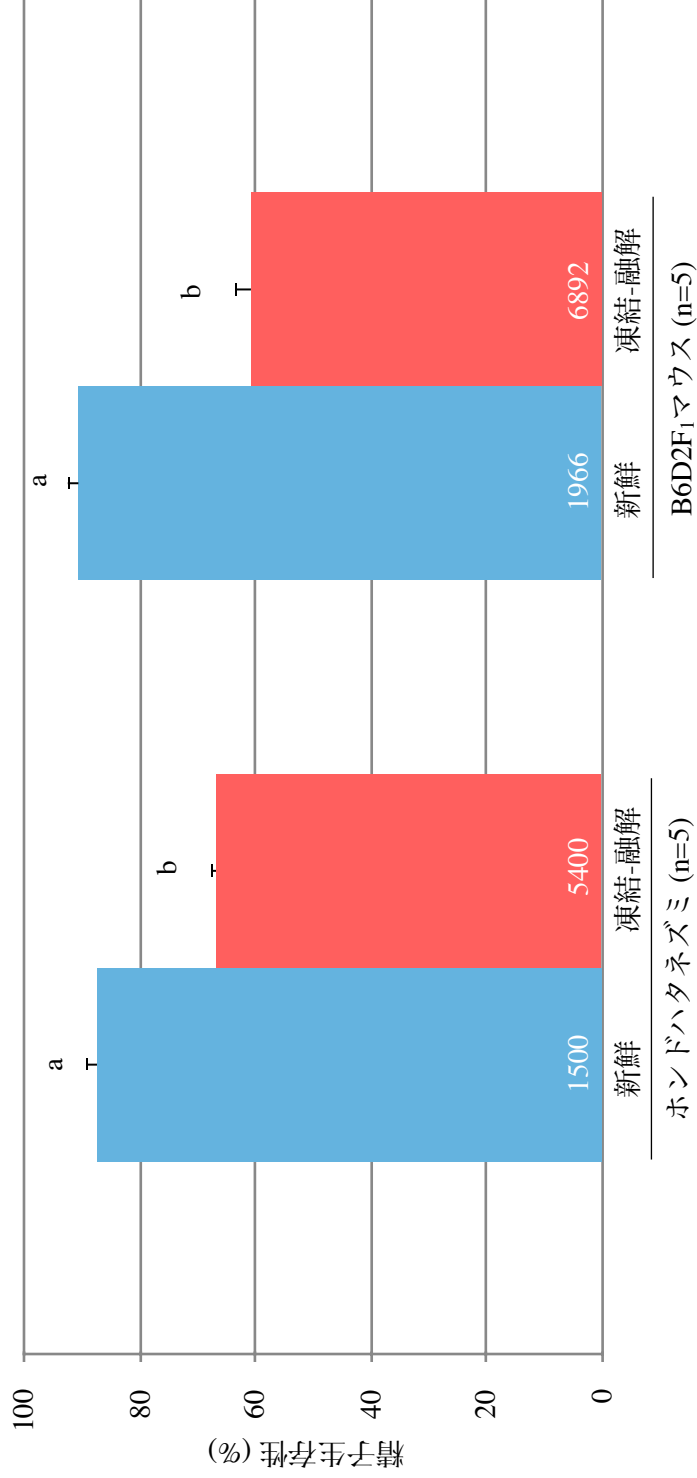


図4 新鮮および凍結-融解ホンドハタネズミ精子の生存性：エオシン・ニグロシン染色  
 新鮮および凍結-融解精子について、それぞれ1回および3回以上の実験を繰り返した。棒グラフの表記は平均値 ± 標準誤差で、下側の数値は検査精子数を示している。a, b: 各動物種内で異なる添文字をもつものに有意差が認められた (P<0.05)。

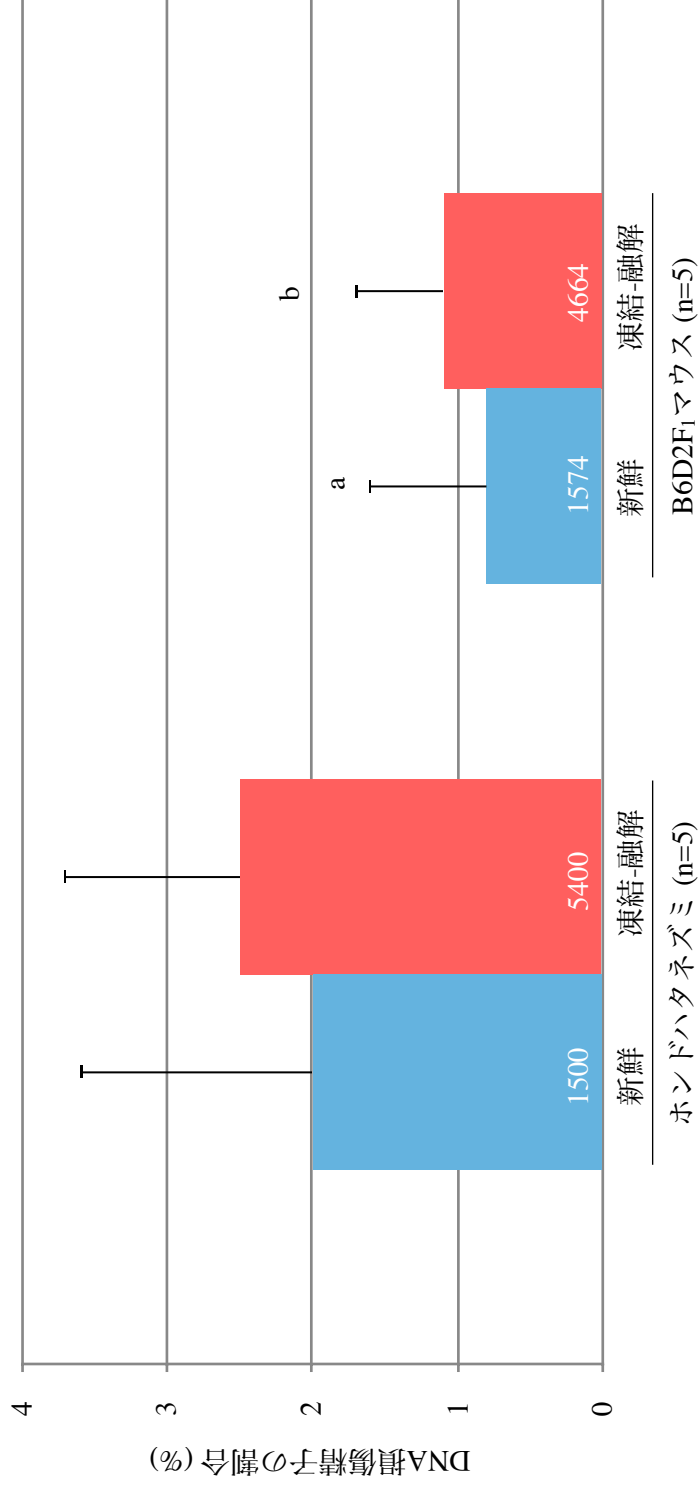


図5 新鮮および凍結-融解ホンドハタネズミ精子のDNA損傷レベル：アルカリコメットアッセイ法  
 新鮮および凍結-融解精子について、それぞれ1回および3回以上の実験を繰り返した。棒グラフの表  
 記は平均値 ± 標準誤差で、下側の数値は検査精子数を示している。a, b：各動物種内で異なる添文字  
 をもつものに有意差が認められた (P<0.05)。



表5 ホンドハタネズミの凍結-融解精子の卵活性化能の評価

動物種	精子処理 <sup>2</sup>	検査卵母細胞数	減数分裂再開卵母細胞数(%)	雌雄前核形成卵母細胞数(%) <sup>3</sup>	その他(%) <sup>4</sup>
ホンドハタネズミ	新鮮	37	37 (100.0)	37 (100.0)	0 (0.0)
(n=5)	凍結-融解	163	163 (100.0)	163 (100.0)	0 (0.0)
マウス (B6D2F <sub>1</sub> )	新鮮	83	79 ( 95.2)	79 ( 95.2)	3 (3.6)
(n=5)	凍結-融解	151	148 ( 98.0)	148 ( 98.0)	2 (1.3)
対照区 <sup>1</sup>	-	156	7 ( 4.5)	-	5 (3.2)

<sup>1</sup>精子を用いずに注入操作した。

<sup>2</sup>新鮮および凍結-融解精子について、それぞれ1回および3回以上実験を繰り返した。

<sup>3</sup>正常な核構成 (1雌前核, 1雄前核) を有していた卵母細胞を含む。

<sup>4</sup>断片化, 単位発生および1極体雌雄前核を形成した卵母細胞を含む。

(表5)。

## 実験2) 凍結保存における凍結容器の違いが精子性状に及ぼす影響

ホンドハタネズミ精子の運動性は、新鮮区において81%，ストロー区およびチューブ区においてそれぞれ71%および74%であり、新鮮区と凍結区（ストロー区およびチューブ区）間において有意差はみられなかった（図6）。ストロー区とチューブ区間にも有意な差はみられなかった。

精子生存性については、新鮮区では78%（938/1200）であり、ストロー区およびチューブ区では67%（1608/2400）および74%（1773/2400）であった。チューブ区において有意に生存性が低下した（図7， $P<0.05$ ）。

ホンドハタネズミの凍結-融解精子を用いた体外受精において、正常受精率はストロー区では82.8%，チューブ区では74.1%であり、有意な差はみられなかった（表6）。

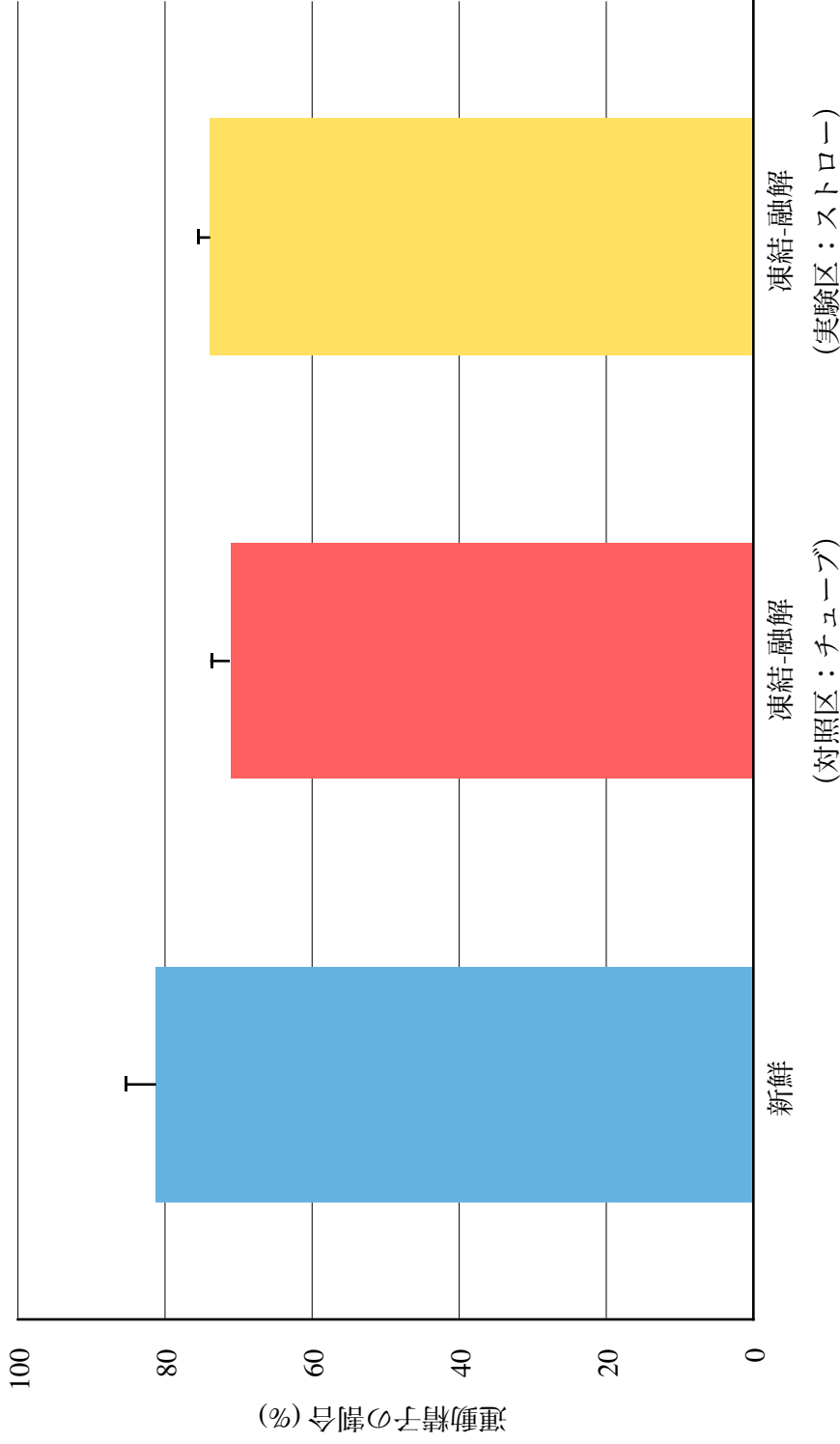


図6 異なる凍結容器が凍結-融解後のホンドタナズミ精子の運動性に及ぼす影響  
 新鮮および凍結-融解精子について、4匹の個体を使用し、それぞれ1回および3回以上の実験を繰り返した。“\_”以外の運動性のある精子を総運動性 (+++, ++, +, ±) として算出した。棒グラフの表記は平均値 ± 標準誤差で示している。

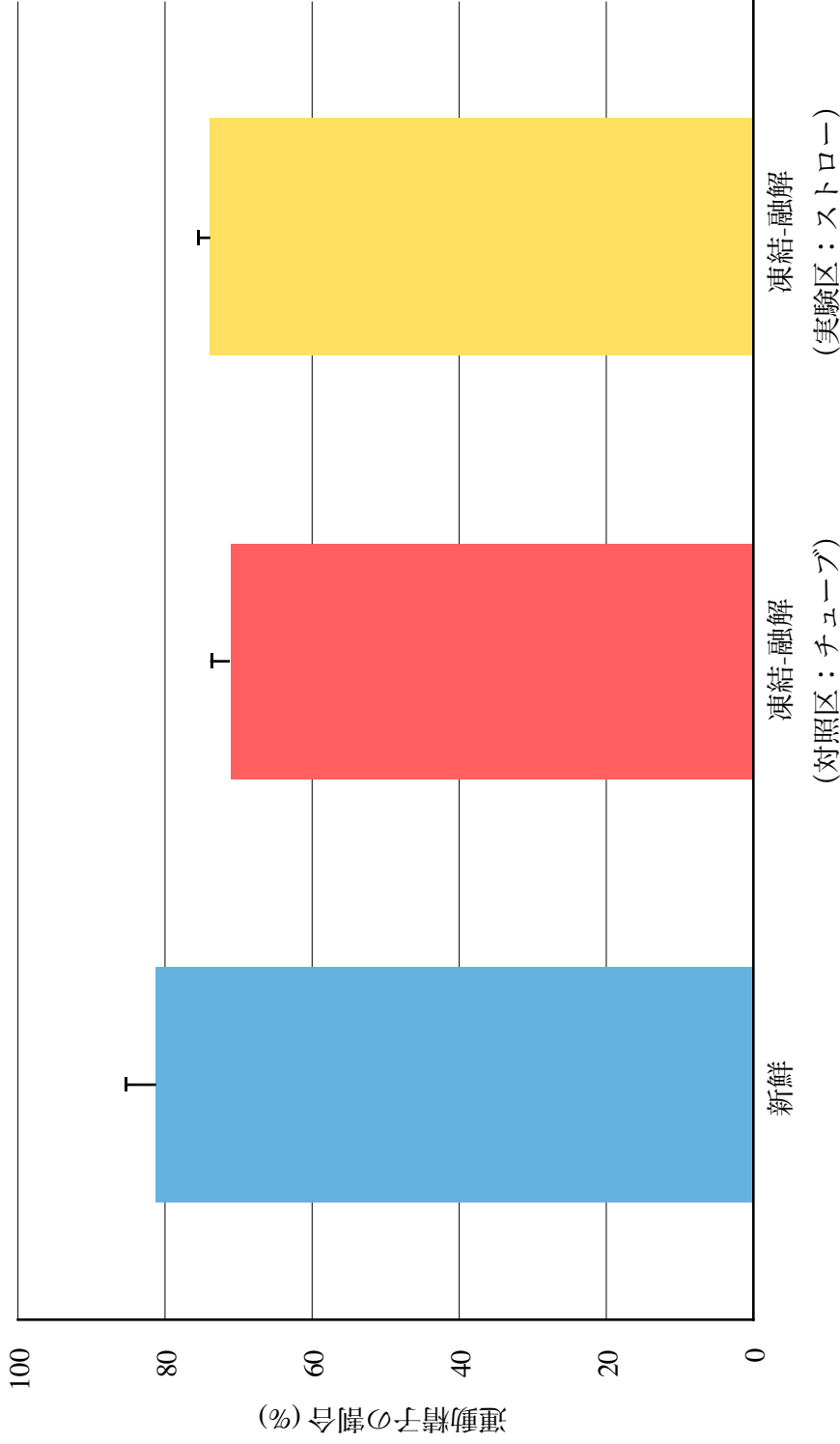


図6 異なる凍結容器が凍結-融解後のホンドハタネズミ精子の運動性に及ぼす影響  
 新鮮および凍結-融解精子について、4匹の個体を使用し、それぞれ1回および3回以上の実験を繰り返した。“-”以外の運動性のある精子を総運動性 (+++, ++, +, ±) として算出した。棒グラフの表記は平均値 ± 標準誤差で示している。

表6 異なる凍結容器が凍結-融解後のホンダタネズミ精子の体外受精率に及ぼす影響

凍結容器	検査卵母細胞数 <sup>1</sup>	正常受精 (%) <sup>2</sup>	異常受精 (%) <sup>3</sup>	MII (%) <sup>4</sup>
チューブ (対照区)	27	20 (74.1)	3 (11.1)	4 (14.8)
ストロー (実験区)	29	24 (82.8)	2 ( 6.9)	3 (10.3)

<sup>1</sup>検査卵母細胞数は、媒精3時間後に単為発生および断片化を除いた卵母細胞数とした。

<sup>2</sup>正常受精には、第III減数分裂後期、2極体1雌前核1膨化精子頭部および2極体1雌前核1雄前核を含む。

<sup>3</sup>1極体2雌前核1雄前核および多精子受精を含む。

<sup>4</sup>第III減数分裂中期を示す。

## 考察

人間活動による自然破壊や地球温暖化に起因して多くの種が絶滅の危機に瀕しており、生物多様性が失われつつある (IUCN)。このような絶滅の危機に瀕している種の遺伝子資源を保全するにあたり、配偶子 (特に哺乳類) の凍結保存技術が有効となる。1952年に Polge and Rowson により、グリセリンの凍害防止効果が発見され、凍結保存されたウシ精液の受胎成績が報告された。これ以降、緩慢凍結法は米国やカナダにおいて比較的早くから実用化された。その後、ストロー法や錠剤化法が開発されて以来、世界中で精子の凍結保存が実用化に至った。ウシ以外の動物では、ウマ (Vieira et al., 2012), ブタ (Gómez-Fernández et al., 2012) およびヒツジ (Quan et al., 2012) などで精子凍結保存方法が報告されているが、ブタやヒツジにおける凍結-融解精子を用いた人工授精では、新鮮精液に比べて有意に低い受胎率であるという問題もあり、動物種ごとに精子凍結保存法を改良する必要があると考えられる。マウスにおける精子凍結保存方法は1990年代から発表されるようになり、現在まで改良されてきた。近年、フリーズドライ精子の3ヶ月の室温保存 (Kaneko and Nakagata, 2005) あるいは3年間の冷蔵保存 (Kaneko and Serikawa, 2012) に成功するなど、様々な方法の凍結保存法が報告されている。現在マウスにおいて広く用いられている方法は、ラフィノースとスキムミルクで構成した凍結保護剤を用いた凍結保存方法である (Takeshima et al., 1991)。

本実験では、従来のマウス凍結保存法がホンドハタネズミ精子にも応用できるか否かを精子性状検査により評価した。ホンドハタネズミの精子運動性については、凍結-融解後に低下したが、対照区 (マウス精子) も同様に凍結-融解後に低下していることから、精子運動性は十分に保存されていると考えられる。しかし、人工授精や体外受精を用いて産仔が作出できない場合、ラットやウシなどの卵黄を含む凍結保護剤を検討する必要があるかもしれない。ホンドハタネズミ精子の生存性については、凍結-融解後に有意に低下したが、対照区も同様に有意に低下したことから、生存性にも問題はないと考えられた。DNA損傷レベルについては、新鮮および凍結-融解間で有意差は

認められなかったが、DNA損傷率が上昇する傾向がみられ、対照区との比較においてもホンドハタネズミ精子が高い値を示した。しかしながら、本研究でのホンドハタネズミ精子のDNA損傷レベルはわずかな値であり、受精して子孫への遺伝的損傷が伝達される可能性は低いと考えられる。さらに、ホンドハタネズミ精子の卵活性化能に関して、新鮮および凍結-融解後ともに減数分裂再開率は高い割合を示したことから、凍結-融解後もホンドハタネズミ精子は卵活性化能を十分に維持していることが示された。

次に、ホンドハタネズミ精子の凍結保存における2種類の凍結容器が、精子運動性、生存性および受精率に及ぼす影響について検討した。その結果、凍結チューブおよびストロー間の運動性および受精率に有意差は認められなかったが、生存性において有意差が認められた。Hasegawaら（2012）による凍結ストローおよびチューブを用いて精子を凍結保存した結果において、凍結チューブでの精子運動性は、凍結ストローの精子運動性に及ばなかった。融解操作においては、凍結ストローおよびチューブ間に有意差はみられず、精子の運動性および生存性は、融解操作よりも凍結操作が大きく影響することが報告された。また受精率においては、凍結チューブを用いて凍結した精子と凍結ストローを用いて凍結した精子における有意差はみられなかった。生存性には有意差がみられたものの運動性および受精率に有意な差はなかったことから、本研究結果は前述の報告と一致するとともに、マウスで広く用いられている精子凍結保存技術がホンドハタネズミにも適用できることを示し、さらに目的に応じて凍結方法を選択できることを示している。

### 第3節 新鮮あるいは凍結-融解精子を用いた人工授精による産仔作出

本節では、精子凍結保存法の最終的な検証を行うために、子宮頸管経由法を用いて産仔作出を試みた。

#### 材料および方法

##### 供試動物

第2章第2節と同様に飼育した。実験1)では、13~14週齢の未経産雌ホンダハタネズミ2匹および12~62週齢の経産雌ホンダハタネズミ12匹をレシピエントとして、9~44週齢の繁殖能が確認された雄ホンダハタネズミ7匹を採精に用いた。実験2)では、11~29週齢の雌ホンダハタネズミ24匹をレシピエントおよび16~21週齢の繁殖能が確認された雄ホンダハタネズミ4匹を採精に用いた。また、実験1)および2)において、不妊交尾排卵を促すための精管結紮雄を9~92週齢の繁殖能が確認された雄ホンダハタネズミ10匹から作製した。

##### 精子の採取および凍結保存

第2章第2節と同様の方法で精子採取および凍結保存した。精子融解については、液体窒素タンクから凍結チューブを取り出し、30秒間空気中で保持した後、37°Cのウォーターバス内で1分間急速融解した。融解後、すみやかに400  $\mu$ lのH-HTFを含むマイクロチューブに200  $\mu$ l精子懸濁液を加え、37°Cのウォーターバス内で10分間培養した。培養後、精子濃度を調整するために遠心分離機（マイクロ冷却遠心機 KUBOTA3740; ローターNo. KUBOTA AF-2724, 株式会社久保田製作所, 東京, 日本）を用いて、室温, 400  $\times$  g, 10分間の条件で遠心分離した。遠心分離後、ピペットチップを用いて400  $\mu$ lの上澄みを静かに除去した。上清除去後、ピペッティングにより精子を再懸濁させた200  $\mu$ lの懸濁液から精子濃度を測定した。新鮮あるいは凍結-融解した



精子懸濁液の精子濃度を血球計算盤により測定し、 $2 \times 10^6$ 個/20  $\mu$ lになるようにH-HTFを添加した。添加-攪拌後、第2章第2節と同様の方法で精子運動性を検査し、後述の人工授精に用いた。

#### 精管結紮雄の作製

0.9%生理食塩水で10倍希釈した10%ペントバルビタールナトリウム（ソムノペンチル；共立製薬株式会社，東京，日本）を40 mg/kgの用量で雄ホンダハタネズミの腹腔内に投与し，麻酔後，腹部皮毛をバリカンにより術野の約3倍剃った。ホンダハタネズミの頭が上になるように仰向けに寝かせ，0.1%ヒビテン液（5%ヒビテン液を蒸留水で希釈，大日本住友製薬，大阪，日本）で術野を消毒後，陰茎の上部正中の皮膚を縦に約1 cm，筋層を約0.5 cm切開後，精巣周囲に付着する脂肪塊を掴みながら精巣および精管を体外に露出させた。精巣上部尾部の精管2ヶ所を電気メス（South Pointe Surgical Supply, Inc., FL, USA）を用いて焼灼し，約0.5～1 cmの精管を取り除いて速やかに精巣および精管を腹腔内に戻した。対側も同様に処理後，筋層を縫合糸（絹製縫合糸；3号，株式会社シラカワ，東京，日本）で1針縫合し，クリップ（REFLEX SKIN CLOSURE SYSTEM; 9 mm, Cell Point Scientific, Inc., Gaithersburg, MD, USA）で皮膚が開かないよう固定した。縫合後，0.9%生理食塩水で10倍希釈したブプレノルフィン（レペタン；大塚製薬株式会社，東京，日本）を0.05 mg/kgの用量で筋肉内投与した。その後，覚醒を確認するまでホンダハタネズミをキムタオルで包み，加温板上のケージ内で保温した。動物がキムタオルから出てきた場合に覚醒したとみなし，ケージ内にて通常飼育した。術後，最低10日間経過した精管結紮雄を繁殖能のある雌ホンダハタネズミと交配させ，不妊であることを3回確認した雄を実験に用いた。

## 非外科的人工授精：子宮頸管経由法

人工授精スケジュールを図8に示す。雌ホンドハタネズミにPMSGを30 IU投与し、PMSG投与46～48時間後にhCGを30 IU投与して過剰排卵を誘起した。hCG投与後、雌ハタネズミを精管結紮雄と同居させることにより不妊交尾排卵を促した。交尾行動を確認後、1時間以上同居を継続させた。精子運動性検査終了後および交尾確認4～6時間後に濃度を $2 \times 10^6$ 個/20  $\mu$ lに調整した精子懸濁液を子宮頸管経由法により直接子宮角内に移植した。この際、外子宮口を見やすくするために耳鏡（先端直径3 mm×後端直径×7 mm×長さ14 mm）を用い、肉眼で外子宮口に注入器を挿入して精子（20  $\mu$ l/子宮角）を移植した。注入器として、1 mlテルモシリンジ（ツベルクリン用、ガンマ線滅菌済；テルモ株式会社、東京、日本）と22 Gのテルモノンベベル注射針（テルモ株式会社）を用いた。偽妊娠20～21日後に新生仔数を記録し（出産0日目）、出産2日目に新生仔重量の計測および雌雄判別を行った。また、出産日前に動物に異変が認められた場合あるいは予定日に出産しなかった場合は、帝王切開にて胎仔を摘出した。摘出後、胎仔数、胎仔および胎盤重量を記録し、帝王切開前日あるいは当日に出産した雌を里親とした。

## 実験計画

### 実験1) 新鮮および凍結-融解精子を用いた人工授精による産仔作出

前述の通りに人工授精した。

### 実験2) 凍結-融解精子を用いた人工授精による産仔数改善

実験計画（人工授精スケジュールを図9に示す。）

実験区I：凍結-融解後のhypotaurine処理が人工授精後の産仔数に及ぼす影響

精子処理に用いたH-HTFに1 mM hypotaurine（SIGMA）を添加し、第2章第3節と同様の方法で人工授精した。なお、精子移植時間（交尾確認4～6時間後）は変更していない。

		-2日	0日	0.25日	7日	14日	21日
過剰排卵誘起	PMSG投与 14:00		hCG投与 12:00				
偽妊娠雌の作製			精管結紮雄 との交尾確認 12:00～14:00	人工授精 16:00～18:00	体重測定	体重測定	出産予定

図8 人工授精スケジュール

	-2日	0日	0.25日	0.5日	7日	14日	21日
過剰排卵誘起	PMSG投与 14:00	hCG投与 12:00					
偽妊娠雌の作製		精管結紮雄との交尾確認 12:00~14:00	人工授精I + hypotaaurine 16:00~18:00	人工授精II 19:00~21:00 人工授精III + hypotaaurine 19:00~21:00	体重測定	体重測定	出産予定

図9 Hypotaaurine添加および精子移植時間を変更した人工授精スケジュール

実験区II：交尾後の異なるタイミングでの凍結-融解精子移植が産仔数に及ぼす影響  
hCG投与および交尾確認後7～9時間で、第2章第3節と同様の方法で人工授精した。

実験区III：Hypotaaurine処理および異なるタイミングでの凍結-融解精子移植が産仔数  
に及ぼす影響

上述の実験区IおよびIIの条件を組合わせ、前述と同様の方法で人工授精した。

#### 統計処理

実験1) では、精子運動性の割合について第2章第2節と同様の手法を用いて統計分析した。また、新鮮精子、凍結-融解および自然交配区間の産仔体重の比較には一元配置分散分析し、実験区間に有意差が認められた場合、Tukey-Kramer法を用いて多重範囲検定した。危険率5%未満で統計学的有意性が認められると判断した。

実験2) では、Hypotaaurine無処理および精子移植時間を変更しなかった区を対照区とし、妊娠率、出産率、産仔数および生存産仔率の割合 (%) について、 $\chi^2$ 検定を用いて対照区と比較した。産仔数および平均産仔数については一元配置分散分析法を用い、区間に有意差が認められた場合、Tukey-Kramer法を用いて多重範囲検定した。危険率5%未満で統計学的有意性が認められると判断した。

## 結果

### 実験1) 新鮮および凍結-融解精子を用いた人工授精による産仔作出

#### 精子運動性

新鮮区および凍結-融解区間に有意差は認められなかった(図10)。新鮮精子(n=4)の運動性は平均83%、凍結-融解精子(n=3)の運動性は平均72%であり、新鮮精子と比較して運動性が低下する傾向を示した。

#### ホンドハタネズミの凍結-融解精子を用いた人工授精

新鮮および凍結-融解区ともに未経産あるいは経産に関係なく産仔作出は可能であり(表7)、産仔の形態および繁殖能は正常であった(図11:新鮮精子由来産仔)。凍結-融解区において、妊娠率、産仔数および平均産仔数が新鮮精子よりも低下した。また、自然交配区と比べて、凍結-融解区では妊娠率、産仔数、平均産仔数および生存産仔率が低下した。出産率はいずれの区においても100%であった。

#### ホンドハタネズミの人工授精由来産仔の体重および雌雄割合

産仔体重において、新鮮区( $3.1 \pm 0.2$  g)、凍結-融解区( $3.9 \pm 0.2$  g)および自然交配区( $3.6 \pm 0.1$  g)間で有意な差は認められなかった(表8)。雌雄割合は、新鮮精子で雌43.3%および雄56.7%、凍結-融解精子で雌50.0%および雄50.0%、自然交配では雌56.3%および雄43.7%であった。

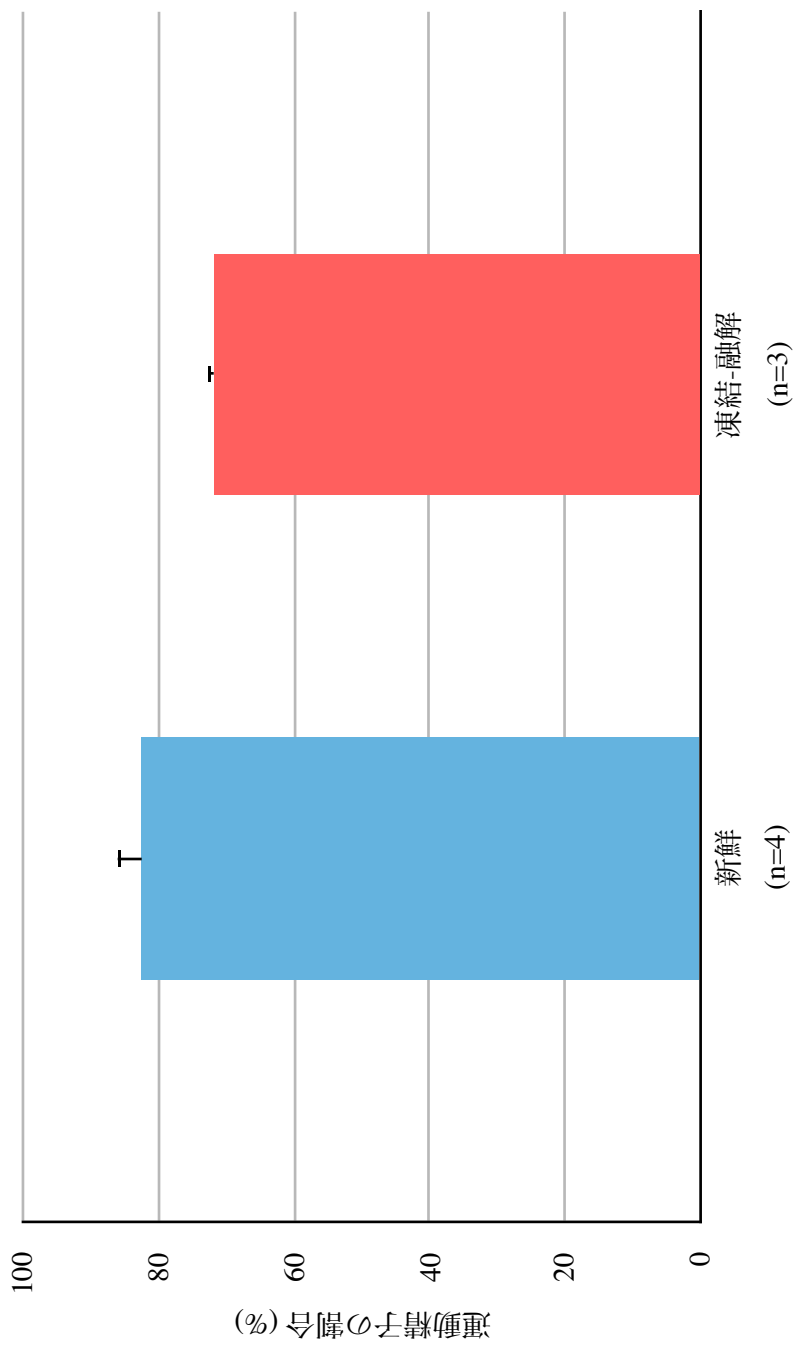


図10 人工授精に用いた新鮮および凍結-融解ホンドハタタネズミ精子の総運動性  
 “-”以外の運動性のある精子を総運動性 (+++、++、+、±) として算出した。棒グラフの  
 表記は平均値 ± 標準誤差で示している。

表7 ホンドハタネズミにおける人工授精後の妊娠率，出産率，産仔数および生存産仔率

移植した 精子の種類	出産経験	レシピエント 数	妊娠率 (%) <sup>1)</sup>		出産率 (%) <sup>2)</sup>		平均産仔数 ± 標準誤差	生存産仔率 (%) <sup>2)</sup>
			レシピエント 数	妊娠動物数 /レシピエント数	出産動物数 /妊娠動物数	産仔数		
新鮮	未経産	1	1/1 (100.0)	1/1 (100.0)	1/1 (100.0)	6	6/6 (100.0)	
	経産	5	5/5 (100.0)	5/5 (100.0)	5/5 (100.0)	37	26/37 ( 70.3)	
新鮮区小計	—	6	6/6 (100.0)	6/6 (100.0)	6/6 (100.0)	43	32/43 ( 74.4)	
凍結-融解	未経産	1	1/1 (100.0)	1/1 (100.0)	1/1 (100.0)	2	2/2 (100.0)	
	経産	7	2/7 ( 28.6)	2/2 (100.0)	2/2 (100.0)	3	2/3 ( 66.7)	
凍結-融解区小計	—	8	3/8 ( 37.5)	3/3 (100.0)	3/3 (100.0)	5	4/5 ( 80.0)	
自然交配 <sup>3)</sup>		9	7/9 ( 77.8)	7/7 (100.0)	7/7 (100.0)	33	33/33 (100.0)	

<sup>1)</sup>人工授精14日目の体重測定での腹部の膨らみおよび体重増加で判断した。

<sup>2)</sup>生存以外の産仔は食殺により判定不明。

<sup>3)</sup>2012年6月1日～8日までに出産した個体およびその産仔の記録とした。





図11 新鮮精子を用いた人工授精によるホンダハタネズミの産仔

表8 ホンドハタネズミにおける人工授精あるいは自然交配由来産仔の  
体重および性別

移植した 精子の種類	検査 産仔数	産仔体重 (g) <sup>1</sup>	性別 <sup>1</sup>	
		平均値 ± 標準誤差	雌 (%)	雄 (%)
新鮮	30	3.1 ± 0.2	13 (43.3)	17 (56.7)
凍結-融解	4	3.9 ± 0.2	2 (50.0)	2 (50.0)
自然交配	16	3.6 ± 0.1	9 (56.3)	7 (43.7)

<sup>1</sup>出産日を0日として2日目に測定.

<sup>2</sup>2012年6月1日～8日までに出産した母個体のうち、3個体のみ調べた.

## 実験2) 凍結-融解精子を用いた人工授精による産仔数改善

各項目において、いずれの実験区間でも有意な差は認められなかった（表9）。精子移植時間が交尾後4～6時間でのhypotaaurine処理および無処理区を比較した場合、hypotaaurine処理区において妊娠率は低下するが、平均産仔数および生存産仔率は上昇傾向を示し、hypotaaurine処理は産仔数を改善する傾向を示した。hypotaaurine無処理の場合、精子移植時間変更（交尾後7～9時間）区を未変更（交尾後4～6時間）区と比較すると、妊娠率、産仔数および生存産仔率が上昇傾向を示し、産仔数が改善された。移植時間変更-hypotaaurine処理区を移植時間未変更-hypotaaurine無処理区と比較すると、妊娠率、産仔数および生存産仔率が上昇傾向を示し、産仔数が改善された。移植時間を変更した場合のhypotaaurine処理および未処理を比較すると、両区とも妊娠率、平均産仔数および生存産仔率は同等であり、hypotaaurine処理に関係なく精子移植時間を交尾後7～9時間に変更することで産仔数が改善されることが示された。また、産仔の形態および繁殖能は正常であった（図12：凍結-融解精子由来産仔）。

## ホンダハタネズミの人工授精由来産仔の体重および雌雄割合

産仔体重において移植時間未変更-hypotaaurine無処理区（ $3.9 \pm 0.2$  g）と比較すると、hypotaaurine処理区（ $2.2 \pm 0.1$  g）で有意に産仔重量が低下した（表10,  $P < 0.05$ ）。また雌雄割合は移植時間未変更-hypotaaurine処理区で雌33.3%および雄66.7%であり、移植時間変更-hypotaaurine無処理区で雌31.6%および雄68.4%、移植時間変更-hypotaaurine処理区では雌43.8%および雄56.3%であった。

表9 Hypotaurine処理および異なるタイミングでの凍結-融解精子移植が産仔数に及ぼす影響

処理	妊娠率 (%) <sup>2</sup>		出産率 (%)		生存産仔率 (%) <sup>3</sup>		
	レシピエント数	妊娠動物数 / レシピエント数	出産動物数 / 妊娠動物数	平均産仔数 ± 標準誤差	生存産仔数 / 産仔数	生存産仔数	
移植時間 <sup>1</sup>	hypotaurine						
4～6hrs	-	8	3/8 (37.5)	3/3 (100.0)	5	1.7 ± 0.3	4/5 ( 80.0)
4～6hrs	+	8	2/8 (25.0)	1/2 ( 50.0)	6	6	6/6 (100.0)
7～9hrs	-	8	5/8 (62.5)	5/5 (100.0)	27	5.4 ± 1.2	26/27 ( 96.3)
7～9hrs	+	8	4/8 (50.0)	4/4 (100.0)	28	7.0 ± 3.0	23/28 ( 82.1)

<sup>1</sup>交尾確認後の時間.

<sup>2</sup>人工授精14日目の体重測定での腹部の膨らみおよび体重増加で判断.

<sup>3</sup>生存以外の産仔は食殺により判定不明.



図12 凍結-融解精子を用いた人工授精によるホンドハタネズミの産仔

表10 Hypotaurine処理および異なるタイミングでの凍結-融解精子移植由来産仔の  
体重および性別

処理		検査 産仔数	産仔重量 (g) <sup>1</sup> 平均値 ± 標準誤差	性別 <sup>1</sup>	
移植 時間 <sup>1</sup>	1 mM hypotaurine			雌 (%)	雄 (%)
4～6hrs	—	4	3.9 ± 0.2 <sup>a</sup>	2 (50.0)	2 (50.0)
4～6hrs	+	6	2.2 ± 0.1 <sup>b</sup>	2 (33.3)	4 (66.7)
7～9hrs	—	19	3.2 ± 0.1 <sup>a,b</sup>	6 (31.6)	13 (68.4)
7～9hrs	+	16	3.4 ± 0.3 <sup>a,b</sup>	7 (43.8)	9 (56.3)

<sup>1</sup>出産日を0日として2日目に測定.

a,b同じ列内における異なる添文字は有意差あり (P<0.05).

## 考察

前節の実験において、ホンドハタネズミ精子の凍結保存法が確立されたと考えられるが、最終的な手法確立を目指すためには、凍結-融解精子由来産仔を作出する必要がある。産仔作出には多数の方法が挙げられるが、実験目的を考慮すれば人工授精技術は人為的操作が少なく、もっとも簡便な方法である。

ホンドハタネズミにおける子宮頸管経由法について、新鮮精子では6例中6例(100%)が受胎し、産仔数の平均値は7.2匹と高い受胎率および産仔数を示した。この結果は、自然交配由来産仔数(4.7匹)と比較すると、自然交配を上回る産仔を得られた。このことから、ホンドハタネズミにおいて子宮頸管経由法による人工授精が適用できることが実証された。一方、新鮮精子では生存産仔数の割合が低く、凍結-融解精子では受胎例数および産仔数が低かったため、それぞれに合わせた改善が必要である。

新鮮区での原因としては、死産あるいは出産直後の食殺が多かったためと考えられる。ホンドハタネズミの自然交配における産仔数の範囲は1~8匹(Kudo and Oki, 1982)であり、本研究においても平均4.7匹であったことから、新鮮区の産仔数が多過ぎたことによりレシピエントの体内で死亡した、あるいは過多胎によるストレスにより出産後の食殺が生じたと考えられる。この多産の原因としては、確実に排卵を促すためのPMSG処理により卵巢内の卵胞が多く発達し、hCG投与および交尾刺激により、排卵数が上昇したために胎仔数が増加したと考えられる。今後の改善としては、投与するホルモン量によって排卵卵子数を制御することで、自然交配と同程度の生存産仔数が得られると推測された。

凍結-融解精子および子宮頸管経由法によって人工授精した場合、8例中3例(37.5%)が受胎し、平均1.7匹の産仔を得られたが、新鮮区および自然交配と比べて低下した。この主な原因としては、精子移植後、受精までに運動性の高い精子が生存できなかったために受精率が低下したかもしれない。ホンドハタネズミの排卵時間は交尾後12~13時間で起こると報告されている(Wakayama et al., 1994)。本実験での精子

移植時間を交尾確認4～6時間後に設定していることから、移植後の精子は少なくとも6時間以上は生存していなければならない。凍結精子での低い産仔数を考えると、排卵までに十分な運動性が維持されていなかったかもしれない。これらのことから自然交配と同程度の産仔を得るために、1) 精子移植時間を排卵時間に近づける、あるいは2) 移植精子の運動性を向上させることが産仔数改善の手立てになると推測された。

このことを論証するために、1) 精子運動性を向上させる物質を培地に添加する、あるいは2) 推定排卵時間直前に精子移植することで、凍結-融解精子由来産仔数の改善を試みた。まず、精子運動性向上を目的に使用したのは、taurine前駆物質であるhypotaurineであった。Taurineは哺乳類においてシステインの主要酸化生成物であり、硫酸化合物の形で存在するβ-アミノ酸である（中野と荒木, 1999）ほか、生体内においては浸透圧維持、カルシウムイオン変動、GABA、Cl<sup>-</sup>チャンネルあるいはアドレナリン性受容体への相互作用を介して膜の安定化などに関与している（Huxtable, 1992）。Taurine/hypotaurineは卵管液中の遊離アミノ酸の主な構成成分として同定され、*in vivo*での受精にも効率的に関与していると考えられており、マウスでは実に卵管液の41%を占める(毛利と星, 2006)。Taurineの生理的役割はhypotaurineによって代替でき、*in vitro*での精子に対する効果はtaurineの3倍高いとされる（Leibfried and Bavister, 1981）。精子に対するhypotaurineの効果は、アドレナリン性の受容体を介していると考えられており（Leibfried and Bavister, 1981, 1982）、*in vivo*および*in vitro*での運動性や生存性を保持する上で最も有効なβ-アミノ酸である（Morton and Bavister, 1974; Bavister et al., 1979; Meizel et al., 1980; Leibfried and Bavister, 1981, 1982; Boatman et al., 1990）。さらに精子運動性への効果として、重炭酸イオンを補助因子としてカルシウムイオンを上昇させ、その結果ハイパーアクチベーションを誘起していると考えられている（Boatman, 1990）。

本実験において、精子移植時間変更前のhypotaurine処理区とhypotaurine無処理区（対照区）を比較したところ、hypotaurine処理区において妊娠率が低下し、産仔重量も有



意に低下した。この原因として、本質的に凍結-融解精子の運動性および生存期間が新鮮精子に比べて低いことに加えて、hypotaurine処理により精子運動性が短時間で急激に上昇したために、排卵時に十分に運動している精子がほとんど存在していなかったかもしれない。産仔重量の違いに関して、産仔数が多かったため、レシピエントが上手く哺育できなかつたと考えられた。次に精子移植時間を交尾後7~9時間に修正してhypotaurine無処理あるいは処理した場合、それぞれの妊娠率および産仔数が上昇した。特に、hypotaurine添加の有無に関わらず生存産仔率は82.1%~96.3%と高い値を示し、自然交配の生存産仔率（100%）に類似していた。この結果は、移植時間を推定排卵時間直前に設定したことで、排卵時に十分な運動性をもつ精子が多く維持されたことを示唆している。

以上の結果は、1) ホンドハタネズミ精子の凍結保存にマウスでの手法を十分に応用できること、および2) 推定排卵時間直前での人工授精により、産仔数が改善されることを証明している。

### 第3章 ホンドハタネズミにおける新規過剰排卵法の確立

#### 第1節 緒言

一般的な実験動物だけでなく、ハタネズミ属においても多くの高品質卵母細胞の供給は基礎生殖学研究および応用研究を進める上で重要である。これを達成するための有効な方法が過剰排卵法である。げっ歯類における性腺刺激ホルモンを利用した過剰排卵に関する研究は古くからなされており、1940年代まで遡る。1941年にBurdickらは、成熟未経産、経産あるいは未成熟雌マウスにヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（hCG）を1 IU単一皮下投与することによって、投与18～20時間後に輸卵管内に卵母細胞を見出すことを報告した。さらに成熟雌マウスを用いて下垂体性、妊馬血清性および妊婦尿性の3種の性腺刺激ホルモンについて、それぞれの排卵誘起能を比較することにより、これらホルモンの生物学的検定法として利用しうることを明らかにした（Burdick et al., 1943）。同年、35～40日齢の幼若マウスにあらかじめ妊馬血清性性腺刺激ホルモン（PMSG）1 IUを投与しておき、その47時間後に1 IUのhCG投与によって排卵誘起が試みられた（Ladman, 1953）。その後、この方法により排卵した卵母細胞は受精能を有することが確認された（Runner and Gates, 1954）。ラットについては、1936年に膈開口以前の幼若ラットにPMSGを単独投与して排卵誘起されることが最初に報告された（Cole, 1936）。一方、日本ではBurdickら（1941）の方法に従い、成熟マウスおよびラットについてもhCGを用い、その投与量および排卵検出の最適時間が検討された（江藤ら, 1955）。この結果、マウスおよびラット共に投与時間から採卵までの時間は20時間が適当であり、マウスでは1/2 MU (Mouse Unit; 1 MUは約3 IU; 1.5 IU) 投与した場合、排卵反応が得られた検査個体は全体の60%、ラットでは、5 MU (15 IU) 投与で60%あるいは10 MU (30 IU) 投与で100%であった（江藤ら, 1958）。さらに、ラットにおいて21日齢の幼若雌に10～20 IUのPMSGを投与して未熟な卵胞を発達させ、PMSG投与56時間後にhCGあるいは黄体形成ホルモン（LH）を投与し、排卵が誘起さ

れることが確認された (Zarrow et al., 1958)。

笹本と村上 (1959) は, Burdickら (1941) および江藤ら (1955) の手法に従い, 体重が7.0~10.0 gの幼若マウスを用いてZarrowら (1958) の方法を追試した。この結果, PMSG 10 IU皮下投与後24時間以内にhCGを投与しても排卵は起こらないこと, PMSG 10 IU皮下投与後48時間から96時間以内にhCGを2あるいは3 IU皮下投与すると排卵が誘起され, PMSG投与後72時間前後がもっとも排卵しやすい状態であったことが報告された。さらに, 成熟マウスを用いて種々の濃度のhCGを投与後20~24時間で排卵の有無を調べた結果, 成熟マウスでは発情周期の回帰が不規則であり, 卵巣の発育状態もまちまちであることから排卵誘起作用の研究には適当でないと考えられ, 体重が6.0~10.0 gの幼若マウスについて研究がなされた (笹本, 1970)。この結果, PMSG 2.5 IU投与54~56時間後にhCGを投与することが過剰排卵誘起に適していると報告された。1979年には, PMSG 5 IUおよびhCG 5 IUを5週齢のマウス (JCL-ICR) に投与し, 最多採卵数42個, 採卵数範囲1~33個という報告がある (佐藤と石橋, 1979)。このころまでには, 現在一般的に用いられているマウスの過剰排卵誘起法が確立されていたと推測される。

このように, マウスおよびラットにおける過剰排卵誘起に関する報告が多く蓄積されてきたにも関わらず, 交尾排卵型動物であるハタネズミ属では, その繁殖成績については報告されているものの (Goto et al., 1977, 1978; Kudo and Oki, 1982), 性腺刺激ホルモン投与による過剰排卵誘起法に関する知見はほとんど報告されていない。

Keebaughら (2012) は, プレーリーハタネズミの過剰排卵誘起について, 雌の週齢が過剰排卵にとって重要であり, 若齢雌の使用が有効であることを報告した。例えば, 4~5週齢雌では排卵を誘起できないが, 6~11週齢雌 ( $14.0 \pm 1.4$ 個) は12~20週齢雌 ( $4.0 \pm 1.6$ 個) と比較して多くの排卵卵子が得られた。過剰排卵法は多数の同期化された卵母細胞あるいは胚を獲得できるが, 過剰排卵処理の有効性には種差がある。現在, 性腺刺激ホルモン投与に基づく過剰排卵誘起は, マウス (Zarrow and Wilson, 1961),

ラット (Wilson and Zarrow, 1962) , ウサギ (Adams, 1953) , ヒツジ (Armstrong et al., 1983) , ブタ (Deneke and Day, 1973) およびウシ (Avery et al., 1962) といった種において広く用いられている。げっ歯類におけるPMSGおよびhCGの組合せはラット (Kito et al., 2010; Taketsuru and Kaneko, 2013) , シリアンハムスター (Wang et al., 2009) , シベリアンハムスター (Lee et al., 2005) , シロアシマウス (Lasserre et al., 2000) およびトゲマウス (Pasco et al., 2012) を含む多くの実験動物の過剰排卵を誘起するのに用いられている。一方で, これらのホルモンはチャイニーズハムスター (Roldan et al., 1987) , オーストラリアマウスおよびアルジェリアマウス (Martín-Coello et al., 2008) のような種では, 過剰排卵を誘起しないことが報告されている。このように, 過剰排卵処理への動物種の感受性は様々であり, 種特異性に応じて処理条件を最適化する必要がある。本章ではすべての週齢において卵母細胞の安定供給を目指す目的で, ホンドハタネズミでの新規過剰排卵法を検討した。

## 第2節 各種過剰排卵誘起法が採取卵母細胞数に及ぼす影響

本節では、卵母細胞の安定供給のためにホンドハタネズミに適した過剰排卵誘起法を検討した。まず、PMSGおよびhCGの組み合わせによる過剰排卵誘起法を検討した。次に、内因性LH分泌を促進する交尾刺激あるいは性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)を利用した過剰排卵誘起法を検討した。

### 材料および方法

#### 供試動物

第2章第2節と同様に飼育した。本実験では、19～406日齢(2.7～58週齢)の雌ホンドハタネズミ86匹から体内成熟卵母細胞を採取した。また不妊交尾排卵を促すため、9～28週齢の繁殖能が確認された雄ホンドハタネズミ15匹から精管結紮雄を作製した。

#### 精管結紮雄の作製

第2章第3節と同様の方法で作製した。

#### 培地および試薬

採卵用培地にはH-CZB液を用いた。採卵後に第2章第2節と同様の培地にて卵丘細胞を除去した。

#### ホンドハタネズミ卵母細胞の採取

雌ホンドハタネズミに種々の濃度のPMSG(後述)を腹腔内投与し、その48時間後に30 IUのhCG、交尾刺激あるいはGnRHで処理して過剰排卵を誘起した。第2章第2節と同様の方法あるいは時計皿上で、200  $\mu$ lのH-CZBで卵管灌流することにより卵母細胞-卵丘細胞複合体を採取した。その後、第2章第2節と同様の方法で卵母細胞を採取した。

## 核相の評価

卵丘細胞を除去した卵母細胞を第2章第2節と同様の方法で固定-染色-封入した。封入後、微分干渉式正立顕微鏡下で卵母細胞の核相を観察した。本研究では、第一極体が観察された場合、第II減数分裂中期の卵母細胞と定義した。

## 実験計画

### 実験1) PMSGおよびhCGの組み合わせによる過剰排卵誘起

雌ホンドハタネズミを腔開口前（19～29日齢）および腔開口後（30日齢以上）の2つのグループに分けた。極端な個体差による結果への影響を避けるため、25～29日齢で採卵する動物に限り採卵前日夜の体重が $20 \pm 2$  gであるものを用いた。雌ホンドハタネズミにPMSGをそれぞれ0, 7.5あるいは30 IUを投与し、その48時間後にWakayamaら（1996）の濃度を参考にして30 IUのhCGを腹腔内投与して過剰排卵を誘起した。

PMSGを0 IUのグループには、対照区として0.9%生理食塩水を投与した。卵母細胞採取後、ただちに卵巣および子宮を取り出し、それぞれの臓器に付着する脂肪と血液をPBS中で取り除いた後、電子天秤を用いて重量を測定した。子宮重量については子宮頸まで摘出したものを計測した。

### 実験2) 精管結紮雄ホンドハタネズミを用いた交尾刺激による過剰排卵誘起

ホンドハタネズミは交尾排卵動物であることから、精管結紮雄を用いた交尾刺激が効果的に排卵を誘起できるか否かを検討した。実験1)において卵巣重量の上昇が観察されたことより、PMSG投与が卵胞発育を促進することが明らかとなった。そこで、雌ホンドハタネズミに過剰排卵を誘起する2つの異なる処理を施した；1) 30 IUのPMSG投与48時間後に30 IUのhCGを腹腔内投与し、その後すぐに精管結紮雄と交尾、2) 同量のPMSG投与48時間後に精管結紮雄と交尾させた。交尾あるいは腔栓を確認したものののみ実験に使用した。対照区として、30 IUのPMSGおよびhCGを用いて過剰排卵を誘起させた。

### 実験3) 性腺刺激ホルモン放出ホルモンアゴニスト (GnRH<sub>a</sub>) による過剰排卵誘起

GnRHは10個のアミノ酸からなる単一ポリペプチドであり、内因性の卵胞刺激ホルモン (FSH) および黄体ホルモン (LH) の合成および分泌を促進するホルモンである。GnRHは種間で類似したポリペプチド構造を示すことから、GnRHが内因性LH放出を促進し、過剰排卵を誘起できることが予測された。天然のホルモンに比べてその類似体 (または作用体) はレセプターとの親和性が高く、強い生理活性が得られるため (西澤, 2013), GnRH作用体 (agonist) を用いた。GnRH agonist (GnRH<sub>a</sub>: ブセレリン酢酸塩; 40 µg/10 ml; 共立製薬株式会社, 東京, 日本) およびPVP (PVP K-30; molecular weight 40,000, 和光純薬工業株式会社) を使用し, 10 mlのGnRH<sub>a</sub>溶液に2 gのPVPを添加して調整した (20% PVP-GnRH<sub>a</sub>)。実験では, PMSG投与48時間後に体重測定して投与量を算出し, 20% PVP-GnRH<sub>a</sub>を頸部皮下に投与した。検討した投与濃度は, 15, 30, 45および60 µg/kgであった。投与には1 mlのシリンジに23~25ゲージの注射針 (テルモ株式会社) を装着したものをを用いた。

### 統計処理

実験1) において, 7.5 IUおよび30 IUのPMSG投与間での排卵数および卵巢/子宮重量の比較にはスチューデントのt検定により分析した。排卵したホンダハタネズミ数および核相の割合 (%) を $\chi^2$ 検定により分析した。実験2) および3) において, 排卵数を一元配置分散分析し, 実験区間に有意差が認められた場合, Tukey-Kramer法を用いて多重範囲検定した。危険率5%未満で統計的有意性が認められると判断した。

## 結果

### 実験1) PMSGおよびhCGの組み合わせによる過剰排卵誘起

雌ホンダハタネズミに様々な濃度のPMSGおよび30 IUのhCGで処理し、その10～11時間後に卵母細胞を採取した(図13A)。19～29日齢において、PMSG 30 IU区での排卵数は7.5 IU区よりも有意に高かった(表11,  $22.5 \pm 2.6$ 個および $2.9 \pm 0.3$ 個,  $P < 0.05$ )。MII率は、7.5 IUおよび30 IU区間で有意な差は認められなかった(図13B)。30～138日齢において、PMSG濃度依存的に平均卵母細胞数は上昇したが、有意な差はみられなかった。PMSG 7.5 IU区のMII率は30 IU区よりも有意に高かった(72.4%および47.3%,  $P < 0.05$ )。30 IUのPMSGを用いた場合、排卵数は上昇し、膣開口前個体の雌は膣開口後個体の雌よりも多くの卵母細胞を排卵した。19～29日齢において、PMSG 30 IU区の卵巢重量は7.5 IU区の卵巢重量よりも有意に高かった(表12,  $P < 0.05$ )。30～138日齢においては、濃度間で有意な差はなかった。卵巢重量の上昇はすべての週齢でPMSG濃度依存的であったが、子宮重量には有意差がみられなかった。

### 実験2) 精管結紮雄ホンダハタネズミを用いた交尾刺激による過剰排卵誘起

30日齢以上の個体においてより効率的に排卵を誘起するために、PMSG投与48時間後の雌ホンダハタネズミにhCG-交尾刺激あるいは交尾刺激単独で過剰排卵誘起を試みた(図13 C)。hCG-交尾刺激区での平均排卵数は、対照区と同等であった(表13, それぞれ $6.8 \pm 0.8$ 個および $6.9 \pm 2.3$ 個)。各処理間で有意差はみられなかったが、交尾刺激単独区において最も高い平均採卵数を示した。hCG-交尾刺激および交尾刺激単独でのMII率は、対照区よりも有意に高かった(97.6%, 97.4% および 47.3%,  $P < 0.05$ ; 図13 D)。



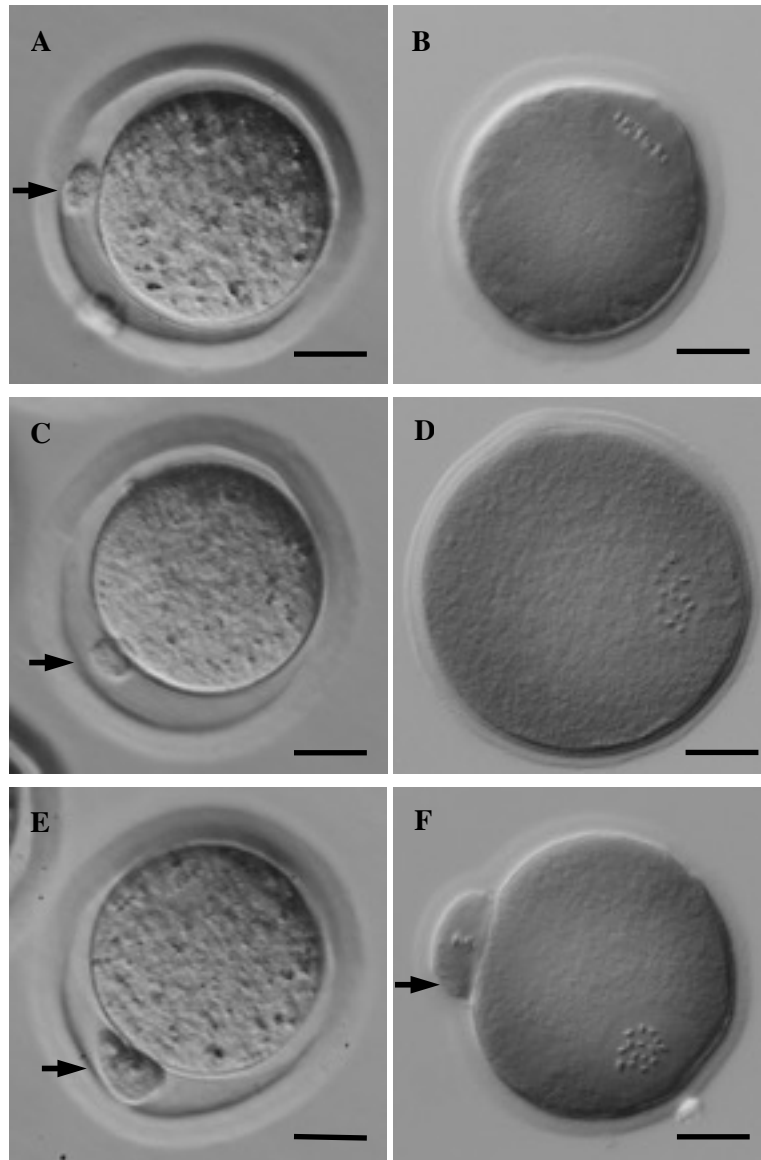


図13 異なる過剰排卵誘起法を用いたホンドハタネズミ  
体内成熟卵母細胞の形態

PMSG投与48時間後にhCG (AおよびB) , 交尾刺激 (C  
およびD) および20% PVP-GnRHα (EおよびF) 処理し,  
その10時間後に卵母細胞を採取した. 卵丘細胞を除去し  
た新鮮卵母細胞の形態をA, CおよびEに示した. 核相をB,  
DおよびFに示した. 矢印は第一極体を示し, スケール  
バーは20 μmである.

表11 ホンドハタネズミでの過剰排卵誘起における日齢およびPMSG濃度間の相互関係

日齢	PMSG 濃度 <sup>1,2,3</sup>	採卵可能			核相 (%) <sup>5,8</sup>		
		供試動物数	個体数 (%) <sup>4,5</sup>	総採卵数	平均採卵数 <sup>5,6,7</sup>	MII <sup>9</sup>	その他 <sup>10</sup>
19~29	0 IU	5	1 ( 20.0)	3	3	0 ( 0.0)	3 (100.0)
	7.5 IU	7	7 (100.0)	20	2.9 ± 0.3 <sup>a</sup>	15 (75.0)	5 ( 25.0)
	30 IU	6	6 (100.0)	135	22.5 ± 2.6 <sup>b</sup>	104 (77.0)	31 ( 23.0)
-----							
30~138	0 IU	13	6 ( 46.2)	15	2.5 ± 0.6	10 (66.7)	5 ( 33.3)
	7.5 IU	7	6 ( 85.7)	29	4.8 ± 1.8	21 (72.4) <sup>c</sup>	8 ( 27.6) <sup>c</sup>
	30 IU	11	8 ( 72.7)	55	6.9 ± 2.3	26 (47.3) <sup>d</sup>	29 ( 52.7) <sup>d</sup>

<sup>1</sup>各々のPMSG投与量を100 µlとした。

<sup>2</sup>hCG濃度を30 IUとし、100 µl投与した。

<sup>3</sup>0 IU区は対照区とし、0.9%生理食塩水を100 µl投与した。

<sup>4</sup>供試動物数を母数として算出した。

<sup>5</sup>19~29日齢における統計分析は7.5 IUおよび30 IU間でのみ行った。

<sup>6</sup>採卵可能個体数を母数として算出した。

<sup>7</sup>平均値 ± 標準誤差。

<sup>8</sup>総採卵数を母数として算出した。

<sup>9</sup>MII：第II減数分裂中期。

<sup>10</sup>変性、断片化および退化した卵母細胞を含む。

<sup>a-d</sup>同じ列内における異なる添え文字は有意差あり (P<0.05)。

表12 ホンドハタネズミの卵巣重量および子宮重量に及ぼすPMSG濃度の影響

日齢	PMSG濃度 <sup>1,2,3</sup>	供試動物数	卵巣重量 (mg) <sup>4,5</sup>	子宮重量 (mg) <sup>4,5</sup>
19～29	0 IU	5	9.7 ± 0.8	30.0 ± 4.9
	7.5 IU	7	8.1 ± 1.8 <sup>a</sup>	61.9 ± 9.1
	30 IU	6	22.0 ± 1.9 <sup>b</sup>	62.3 ± 4.5
30～138	0 IU	13	8.9 ± 0.7	57.7 ± 10.1
	7.5 IU	7	19.9 ± 2.2	98.9 ± 16.9
	30 IU	11	21.8 ± 3.7	76.5 ± 12.2

<sup>1</sup>各々のPMSG投与量を100 μlとした。

<sup>2</sup>hCG濃度を30 IUとし、100 μl投与した。

<sup>3</sup>0 IU区は対照区とし、0.9%生理塩水を100 μl投与した。

<sup>4</sup>平均値 ± 標準誤差。

<sup>5</sup>19～29日齢において統計分析は7.5 IUおよび30 IU間でのみ行った。

<sup>a, b</sup>同じ列内における異なる添え文字は有意差あり (P<0.05)。

表13 hCG-交尾刺激あるいは交尾刺激を用いた過剰排卵誘起による採卵数およびその核相

過剰排卵誘起 <sup>1</sup>	日齢	供試動物数	採卵可能 個体数 (%) <sup>5</sup>	総採卵数	平均採卵数 <sup>6,7</sup>	核相 (%) <sup>8</sup>	
						MII <sup>9</sup>	その他 <sup>10</sup>
hCG (対照区) <sup>2</sup>	30～138	8	8 ( 72.7)	55	6.9 ± 2.3	26 (47.3) <sup>a</sup>	29 (52.7)
hCG-交尾刺激 <sup>3</sup>	65～406	6	6 (100.0)	41	6.8 ± 0.8	40 (97.6) <sup>b</sup>	1 ( 2.4)
交尾刺激 <sup>4</sup>	68～301	14	14 ( 93.3)	195	13.9 ± 1.9	190 (97.4) <sup>b</sup>	5 ( 2.6)

<sup>1</sup>PMSG投与濃度を30 IUとし、100 μl投与した。

<sup>2</sup>対照区：30 IUのhCGを100 μl投与した。

<sup>3</sup>30 IUのhCG投与後すぐに精管結紮雄と交尾させた。

<sup>4</sup>30 IUのPMSG投与48時間後に精管結紮雄と交尾させた。

<sup>5</sup>供試動物数を母数として算出した。

<sup>6</sup>採卵可能個体数を母数として算出した。

<sup>7</sup>平均値 ± 標準誤差。

<sup>8</sup>総採卵数を母数として算出した。

<sup>9</sup>MI：第II減数分裂中期。

<sup>10</sup>変性、断片化および退化した卵母細胞を含む。

<sup>a, b</sup>同じ列内における異なる添え文字は有意差あり (P<0.05)。

実験③：性腺刺激ホルモン放出ホルモンアゴニスト（GnRH $\alpha$ ）による過剰排卵誘起

30 IUのPMSGおよび種々の濃度のGnRH $\alpha$ を雌ホンダハタネズミに投与し、GnRH $\alpha$ 投与後10～11時間で卵母細胞を採取した（図13 E）。結果として、すべての濃度で排卵が生じた（表14）。平均採卵数について、30  $\mu$ g/kgのGnRH $\alpha$ を投与した場合に最も多く（ $14.5 \pm 4.1$ 個），15  $\mu$ g/kgのGnRH $\alpha$ 投与の場合に最も少なかった（ $5.0 \pm 1.4$ 個）。すべての濃度から得られた多くの卵母細胞の形態は正常であった（図13 F）。採卵数に関わらず、すべての濃度で有意差はみられなかった。また、30  $\mu$ g/kgのGnRH $\alpha$ を19～29日齢の個体に投与した場合、PMSG-hCGを投与して得られる卵母細胞数と同程度であった（表15）。

表14 異なる濃度のGnRH $\alpha$  (含20% PVP) がホンドハタネズミにおける採卵数および核相に及ぼす影響

GnRH $\alpha$ 濃度 <sup>1</sup>	平均投与量 ( $\mu$ l) <sup>2</sup>	供試動物数	採卵可能			核相 (%) <sup>5</sup>		
			個体数 (%) <sup>3</sup>	総採卵数	平均採卵数 <sup>4</sup>	MII <sup>6</sup>	その他 <sup>7</sup>	
15 $\mu$ g/kg	120.0 $\pm$ 4.1	4	4 (100.0)	20	5.0 $\pm$ 1.4	20 (100.0)	0 (0.0)	
30 $\mu$ g/kg	230.0 $\pm$ 17.8	4	4 (100.0)	58	14.5 $\pm$ 4.1	56 ( 96.6)	2 (3.4)	
45 $\mu$ g/kg	358.0 $\pm$ 19.7	4	4 (100.0)	51	12.8 $\pm$ 2.7	50 ( 98.0)	1 (2.0)	
60 $\mu$ g/kg	460.0 $\pm$ 38.9	4	4 (100.0)	35	8.8 $\pm$ 3.7	33 ( 94.3)	2 (5.7)	

<sup>1</sup>PMSG投与濃度は30 IUであった。

<sup>2</sup>平均値  $\pm$  標準誤差。

<sup>3</sup>供試動物数を母数として算出した。

<sup>4</sup>採卵可能個体数を母数として算出した。

<sup>5</sup>総採卵数を母数として算出した。

<sup>6</sup>MI I：第II減数分裂中期。

<sup>7</sup>変性、断片化および退化した卵母細胞を含む。

表15 腔開口前ホンドハタネズミへの異なるホルモン処理が採卵数に及ぼす影響<sup>1</sup>

ホルモン処理 <sup>2</sup>	供試動物数	平均投与量 (μl)	採卵可能		核相 (%) <sup>8</sup>		
			個体数 (%) <sup>6</sup>	総採卵数 <sup>7</sup>	MII <sup>9</sup>	その他 <sup>10</sup>	
hCG <sup>3</sup>	5	100	3 (60.0)	63	21.0 ± 10.6	59 (93.7)	4 (6.3)
GnRHa <sup>4</sup>	4	123 ± 10.7 <sup>5</sup>	3 (75.0)	117	39.0 ± 9.0	114 (97.4)	3 (2.6)

<sup>1</sup>日齢は19～20日齢とした。

<sup>2</sup>PMSG投与濃度は30 IUであった。

<sup>3</sup>対照区：30 IUのhCGを投与した。

<sup>4</sup>20% PVP-GnRHaの濃度は30 μg/kgとした。

<sup>5</sup>平均値 ± 標準誤差。

<sup>6</sup>供試動物数を母数として算出した。

<sup>7</sup>採卵可能個体数を母数として算出した。

<sup>8</sup>総採卵数を母数として算出した。

<sup>9</sup>MII：第III減数中期。

<sup>10</sup>変性、断片化および退行した卵母細胞を含む。

## 考察

本実験の目的は、生殖補助技術開発に使用できる高品質な卵母細胞の作出である。本節の結果は、新規過剰排卵法がホンドハタネズミにおいて大いに効果的であったことを示している。

実験1)において、膣開口前後のホンドハタネズミへのPMSG-hCG投与による過剰排卵誘起条件について検討した。30 IUのPMSG-hCGをホンドハタネズミへ投与した場合、多くの卵母細胞が採取されたが、PMSG-hCG投与の有効性は雌の日齢により様々であった。PMSG-hCGを用いた過剰排卵誘起は膣開口前個体で最も有効であった。19～29日齢雌ホンドハタネズミにおいて平均 $36.5 \pm 3.5$ 個の卵母細胞を排卵したが、30日齢以上の雌ホンドハタネズミでは平均 $6.9 \pm 2.3$ 個にとどまった。この結果は、若齢マウス卵巣はホルモン感受性が高く、老齢マウスよりも多くの卵母細胞を採取できるという報告 (Zarrow and Wilson, 1961) と一致したことから、ホンドハタネズミにおいても同様の反応が起きたと考えられる。また他の理由として、hCGの作用に種差が生じたかもしれない。PMSGおよびhCGを含むFSHおよびLHホルモンはヘテロダイマーであり、共通する $\alpha$ サブユニット (CG $\alpha$ ) およびホルモン特異的な $\beta$ サブユニット (FSH $\beta$ , LH $\beta$ , CG $\beta$ ) を有する (Bousfield and Dias, 2011)。成熟タンパク質であるCG $\alpha$ は動物種間でcDNAが60%以上の高い相同性を示し (Suzuki et al., 2002), FSH $\beta$ は高い相同性を示すが (Ishii and Kubokawa, 1984), LH $\beta$ は相同性が低く、種差が大きい (Takano et al., 2004; Koura et al., 2004; Noguchi et al., 2006)。それゆえ、膣開口後個体にみられたホルモン感受性の低さは、LH $\beta$ の違いが原因であると考えられる。まとめると、PMSG-hCGによる過剰排卵法は、19～29日齢個体においてのみ有効性を示すことが明らかとなった。

実験2)において、30日齢以上の個体から効率的に排卵を誘起するために精管結紮雄を利用して検討したところ、交尾刺激により排卵を誘起できた。このことから、交尾刺激が内因性LH分泌を促進したために排卵誘起に至ったのではないかと推測された。



スクスでは交尾刺激が内因性LH放出を促して排卵を誘起するので (Inoue et al., 2011), 交尾排卵動物であるホンドハタネズミもスクスと同様の排卵機構を有するかもしれない。一方, PMSG-hCG-交尾刺激区での平均卵母細胞数は低下した。この理由として, hCGが内因性LH分泌を阻害した, あるいは混乱させたことが示唆された。結果として, PMSGおよび交尾刺激を用いることで膣開口後個体においてより多くの卵母細胞を排卵させることに成功した。

近年, GnRHを用いた過剰排卵法が開発されている (Vasudevan and Sztein, 2012; Nariai et al., 2005; Kanter et al., 2004)。GnRHはhCGよりも高位なホルモンであり, その作用について種間差が低いとされるホルモンである (Fernald and White, 1999; Amonss et al., 1971; Matsuko et al., 1971)。GnRHが内因性LH放出を誘起することからも, より高品質な卵母細胞を得られると考えられている。そこで, PMSGおよびGnRHaを組み合わせた過剰排卵誘起を試みるとともに, GnRHaの最適濃度についても検討した。この結果, すべての濃度で排卵を誘起でき, 最適濃度は30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ であることが明らかにされた。まず予備実験においてGnRHaを腹腔内あるいは筋肉内投与して採卵を試みたが, その効果はみられなかった (データ非表示)。そこで, GnRHaを投与後ゆるやかに体内吸収させるため, 高分子化合物であるPVPを使用した。PVPを溶解させたGnRHa希釈の効果は, ウシ (Chasombat et al., 2013) およびヒツジ (D'Alessandro et al., 2001) においても報告されている。本実験で設定したPVP使用条件に関しては, 予備実験において検討が重ねられ (データ非表示), その結果, 溶液の扱い易さおよび体内投与後のPVPの吸収性に優れたK-30で20%濃度という条件に決定された。また頸部には皮膚の弛みがあり, 粘性試薬を投与しやすいこと, および毛細血管が集中していることから試薬が血中に取り込まれやすいと推測し, 頸部皮下投与を決定した。本実験結果はGnRHaおよび20% PVPの組み合わせも過剰排卵誘起のために有効なホルモン処理であり, GnRHa投与がLHサージを誘起し, PMSG-交尾刺激よりも効率的に採卵が可能であることを示した。

以上の結果から、いずれの週齢であってもPMSGとhCG、交尾刺激あるいはGnRHα (+ 20% PVP) を用いることで、ホンドハタネズミにおいて同期化された多くの卵母細胞を安定して得られることが示された。次のステップとして、これらの卵母細胞の受精能および発生能を評価する必要がある。

## 第4章 ホンドハタネズミ体内受精胚の体外発生および非外科的胚盤胞移植

### 第1節 緒言

マウス着床前胚の培地検討は1950年代後半に始まり、Whitten (1956) はマウス8細胞期胚を胚盤胞まで発生させることに成功した。1956年に着床に影響を及ぼす因子の研究が行われ (McLaren and Michie) , 続いて体外培養させた胚盤胞を子宮内へ移植して産仔作出に (McLaren and Biggers, 1958) , 1967年には凝集キメラの作製およびその培養にそれぞれ成功した (Mintz) 。その後、浸透圧の変化, pH, アミノ酸組成およびエネルギー基質など培地の特徴を調べたBrinster (1965b-e) の体系的な研究が、マウス着床前胚のための培養の基礎を築いた。Whitten (1965) が開発した培地では第3の分割までの発生には至らなかったが、乳酸添加が2細胞期以降の発生を促すこと

(Brinster, 1965a) , グルコースではなくピルビン酸がマウス胚の初期エネルギー源となることおよびこれらが胚生存のために同時期に必須であることが証明された

(Brinster, 1965c, e) 。その後、Biggerら (1967) はマウス胚の2細胞期への発生にはピルビン酸が必須であることを示し、グルコースは4細胞期/8細胞期胚の発生に必要なことも明らかにされた (Brinster and Thomson, 1966) 。これらの研究がBMOC

(Brinster's Medium for Ovum Culture) 培地へつながり、最初の基礎培地であるBMOC2培地が完成した (Brinster, 1968, 1969) 。その後、培地研究が進み、動物種に合わせた培地が開発され、体外発生が行えるようになっている。

ホンドハタネズミ胚の体外発生もM16培地を用いて研究されており、M16培地を用いると、後期2細胞期以降の胚において高い割合で胚盤胞期に発生するが、前核期および前期2細胞期の胚は胚盤胞期までほとんど発生しなかった (Wakayama et al., 1994) 。一方、M16以外の培地での胚発生検討は行われていない。前章よりすべての週齢の雌ホンドハタネズミから正常な体内成熟卵母細胞を採取できるようになった。これにより、体外受精や顕微授精への利用および体外での胚作出が期待できる。このためには、前

核期胚を体外発生させる培地が必要不可欠であり、ホンドハタネズミの体内受精由来胚を用いて適切な培地を検討する必要があると考えられる。

体外作出胚から仔作出には、胚移植法が欠かせない。胚移植は、クローン動物や形質転換動物作製といった発生工学における重要な基盤技術である。一般に小型げっ歯類における胚移植では外科手術をとらない、実験者には高度な専門知識や技術経験が要求されるほか、レシピエントに対して術者の手技力に依存した負担がかかる (Green et al., 2009)。さらに、外科的胚移植においては技術習得のための相当な時間および訓練が必要であり (Steele et al., 2013)、多くの動物および器具をも必要とする (Moler et al., 1979)。一方、非外科的胚移植は外科的移植の過程を単純化するとともに、動物実験における国際原則である3Rを遵守した動物に対して安全な手法であり、ストレスを大幅に軽減できる移植法である (Steele et al., 2013)。非外科的胚移植では、外科的胚移植と同等な割合で健康な産仔を得られることも報告されている (Green et al., 2009; Cui et al., 2014; Bin Ali et al., 2014)。これらのことから、非外科的胚移植は外科的胚移植の代替法として改めて注目されつつあり、現在、多種の移植器具も販売され (Green et al., 2009; Moreno-moya et al., 2013; Cui et al., 2014)、実践的に使用され始めている (Kaufman et al., 2014)。

本章では、第一に体外受精あるいは顕微授精由来胚の体外培養条件を検討した。第二に、Wakayamaら (1994) の報告より、胚盤胞期への発生が低率な前期2細胞期胚を用いて培養条件を検討した。最後に、体内受精由来胚盤胞を非外科的に子宮内移植して産仔作出を試みた。

## 第2節 体内受精由来前核期および前期2細胞期胚の発生に適した培地の検討

本節では体外受精あるいは顕微授精由来ホンドハタネズミ胚を胚盤胞まで発生させられる培養条件を検討するために、他のげっ歯類で使用されている培地を用いて前核期胚および前期2細胞期胚を体外培養した。

### 材料および方法

#### 供試動物

第2章第2節と同様に飼育した。9～60週齢の雌ホンドハタネズミ53匹から体内受精卵母細胞を採取した。

#### 培地

体内受精卵の採取にはH-CZB（表1）を用いた。体外培養に、1 mg/mlのウシ血清アルブミン（SIGMA）を添加した potassium simplex optimized medium with amino acids（KSOMaa，表16），modified rat 1cell embryo culture medium（mR1ECM，表16），modified hamster embryo culture medium 1（mHECM-1，表16）およびhamster embryo culture mediumの基礎培地（Basic medium; BM）1～4を使用した（表16）。mHECM-1は、基本となるHECM-1にBMEおよびMEM（SIGMA）を添加したものである。なお、本研究で用いたmR1ECM，mHECM-1およびBM-1/2には、0.1% PVAおよびBM-3/4には0.01% PVAを添加した。

表16 体外培養に用いた各種培地の組成

成分	KSOMaa		mHECM-1		mRIECM		BM-1		BM-2		BM-3		BM-4	
	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM
NaCl	95.0	98.0	98.0	76.7	98.0	98.0	116.5	113.8	103.3					
KCl	2.5	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2	3.0	3.0					
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.35	—	—	—	—	—	—	—	—					
MgCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	—	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5					
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0.20	—	—	—	—	—	—	—	—					
NaHCO <sub>3</sub>	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0					
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	1.71	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	1.9	1.9					
Na <sub>2</sub> -EDTA•2H <sub>2</sub> O	0.01	—	—	—	—	—	—	—	—					
Na-lactate (60% syrup)	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	4.5	4.5					
Na-pyruvate	0.20	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25	—	—					
Glucose	0.20	—	—	7.5	—	—	—	—	—					
L-Glutamine	0.01	1.0	1.0	0.1	—	—	—	—	—					
Taurine	—	7.0	—	—	—	—	—	—	—					
BME (EAA)	1.0 ml/100ml	1.0 ml/100ml	1.0 ml/100ml	2 ml/100ml	—	—	—	—	—					
MEM (NEAA)	0.5 ml/100ml	0.5 ml/100ml	0.5 ml/100ml	1 ml/100ml	—	—	—	—	—					
Gentamicine	50 µg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml	—	—	—	—	—					
Phenol red	0.5 mg/ml	0.5 mg/ml	0.5 mg/ml	0.5 mg/ml	—	—	—	—	—					
HCl	—	—	—	—	—	—	—	140 µg/100ml	—					
BSA	1 mg/ml	—	—	—	—	—	—	—	—					
PVA	—	1.0 mg/ml	1.0 mg/ml	1.0 mg/ml	1.0 mg/ml	1.0 mg/ml	1.0 mg/ml	0.1 mg/ml	0.1 mg/ml					0.1 mg/ml

## 体内受精卵の準備と採取

雌ホンドハタネズミに30 IUのPMSGを腹腔内投与し、PMSG投与46～48時間後に繁殖能のある雄ホンドハタネズミと交尾させた（19:00～20:00）。交尾を確認した個体を妊娠と判定した。交尾確認から13～20あるいは26～29.5時間後に頸椎脱臼により動物を安楽死させた後、30 Gの灌流針を用いて卵管内をH-CZB液で灌流し、それぞれ前核期胚あるいは前期2細胞期胚を採取した。

## 実験計画

### 実験1) マウス、ラットおよびハムスターの体外発生培地の適用

体内受精由来のホンドハタネズミ前核期胚をマウス（KSOMaa）、ラット（mR1ECM）あるいはハムスター（mHECM-1）で使用されている培地中で培養した。培養のために、採取胚を各培地（100  $\mu$ l）中で3～4回洗浄し、1胚あたりの液量が5～10  $\mu$ lとなるように作製した流動パラフィンで覆った小滴に移し、炭酸ガス培養器内で100～107時間（桑実期および胚盤胞期）培養した。

### 実験2) 4種の基礎培地による検討

実験1)の結果より分割率の高かったmHECM-1に着目した。HECMには組成の異なる4つの基礎培地（BM）が設定されている。本実験では、ホンドハタネズミ前核期胚の発生に最適培地なものを調べた。実験1)と同様の方法で胚を培養した。

### 実験3) グルコース添加が胚発生に及ぼす影響

グルコースは胚発生（特に後半）に必要なエネルギー源であるが、動物種によっては胚発生そのものを阻害する因子にもなりうる。ハタネズミ胚発生（前半）に及ぼすグルコースの影響を調べるため、異なる濃度のグルコース（0 mM; BM-1由来、0.2 mM; KSOMaa由来および5.55 mM; CZB由来）をBM-1に添加して検討した。実験1)と同様の方法で胚を培養した。

#### 実験4) EDTA添加が胚発生に及ぼす影響

実験3) より、ホンドハタネズミの前核期胚は2細胞期で発生停止することが示された。これを解決するために、マウス胚における2 cell blockを解除することが知られている重金属キレート剤、EDTAを種々の濃度 (0 mM; BM-1由来, 0.01 mM; KSOMaa由来 および0.1 mM; CZB由来) でBM-1に添加し、2細胞期以降に発生するか否か調べた。実験1) と同様の方法で胚を培養した。

#### 実験5) グルタミン添加が胚発生に及ぼす影響

種々の濃度のグルタミン (1.0 mM; BM-1由来, 0.01 mM; KSOMaa由来および1.0 mM; CZB由来) をBM-1に添加し、ホンドハタネズミの前核期からの胚発生を検討した。実験1) と同様の方法で胚を培養した。

#### 実験6) ホンドハタネズミ体内受精由来前期2細胞期胚の発生培地の検討

HTFおよびmHECM-1を用いて前期2細胞期胚を胚盤胞まで実験1) と同様の方法で胚を培養した。

#### 統計処理

各実験の培地間の分割率 (%) の比較には一元配置分散分析し、実験区間に有意差が認められた場合、Tukey-Kramer法を用いて多重範囲検定した。危険率5%未満で統計的有意性が認められると判断した。



## 結果

### 実験1) マウス, ラットおよびハムスターの体外発生培地の適用

マウス (KSOMaa), ラット (mR1ECM) およびハムスター (mHECM-1) で使用されている培地を用い, ホンドハタネズミ体内受精由来前核期胚の培養を試みた。いずれの培地においても2細胞期まで高い割合で分割したが (表17), 交尾確認後120時間まで培養しても, 胚盤胞には発生しなかった。mHECM-1において分割率が高い傾向がみられたため, 以降の実験では, 基礎培地としてHECMを用いた。

### 実験2) 4種の基礎培地による検討

組成を変化させた4種類のhamster embryo culture medium (HECM) の基礎培地 (BM) が考案されており, この中からホンドハタネズミ胚の体外発生に適しているものを検討した。いずれのBMにおいても2細胞期まで高い分割率を示したが (表18), 交尾確認後120時間において胚盤胞期まで発生した胚はなかった。

### 実験3) グルコース添加が胚発生に及ぼす影響

様々な濃度のグルコースを添加したところ, すべての区で前核胞期から2細胞期への高い分割率が観察されたが (表19), 交尾確認後120時間において胚盤胞に発生した胚は認められなかった。

### 実験4) EDTA添加が胚発生に及ぼす影響

実験3) で検討したグルコース濃度にさらにEDTAを添加し, ホンドハタネズミ体内受精由来前核期胚の培養を試みた。すべての区で前核胞期から2細胞期への高い分割率が観察されたが (表20), 交尾確認後120時間において胚盤胞に発生した胚は認められなかった。

表17 異なる培地を用いたハンドハタネズミ体内受精由来前核期胚の発生

交尾確認 からの時間	発生培地	供試胚数 <sup>1</sup>	胚ステージ <sup>2</sup>			
			2細胞期	桑実期	胚盤胞期	その他 <sup>3</sup>
40 hrs	KSOMaa	11	11 (100.0)	-	-	0 (0.0)
	mR1ECM	11	11 (100.0)	-	-	0 (0.0)
	mHECM-1	10	10 (100.0)	-	-	0 (0.0)
120 hrs	KSOMaa	11	-	1 (9.1)	0 (0.0)	10 ( 90.9)
	mR1ECM	11	-	0 (0.0)	0 (0.0)	11 (100.0)
	mHECM-1	10	-	0 (0.0)	0 (0.0)	10 (100.0)

<sup>1</sup>交尾後15～20時間に採取した前核期胚を供試胚数とした。

<sup>2</sup>供試胚数を母数として算出した。

<sup>3</sup>交尾確認後40時間は変性，断片化および退行を含み，交尾確認後120時間は発生停止，変性，断片化および退行を含む。

表18 組成の異なるhamster embryo culture medium-basic medium (HECM-BM) を用いたホンドハタタネズミ体内受精由来前核期胚の体外発生

交尾確認からの時間	発生培地	供試胚数 <sup>1</sup>	胚ステージ <sup>2</sup>				その他 <sup>3</sup>
			2細胞期	桑実期	胚盤胞期		
40 hrs	BM-1	26	26 (100.0)	-	-	0 ( 0.0)	
	BM-2	27	27 (100.0)	-	-	0 ( 0.0)	
	BM-3	25	22 ( 88.0)	-	-	3 (12.0)	
	BM-4	28	27 ( 96.4)	-	-	1 ( 3.6)	
120 hrs	BM-1	26	-	0 (0.0)	0 (0.0)	26 (100.0)	
	BM-2	27	-	0 (0.0)	0 (0.0)	27 (100.0)	
	BM-3	25	-	0 (0.0)	0 (0.0)	25 (100.0)	
	BM-4	28	-	0 (0.0)	0 (0.0)	28 (100.0)	

<sup>1</sup>交尾後15～16時間に採取した前核期胚を供試胚数とした。

<sup>2</sup>供試胚数を母数として算出した。

<sup>3</sup>交尾確認後40時間は1細胞期，変性，断片化および退行を含み，交尾確認後120時間は発生停止，変性，断片化および退行を含む。

表19 グルコース濃度の違いがホンドハタネズミ体内受精由来前核期胚の体外発生に及ぼす影響

交尾確認 からの時間	グルコース濃度 (mM) <sup>1</sup>	胚ステージ <sup>3</sup>				
		供試胚数 <sup>2</sup>	2細胞期胚	桑実期	胚盤胞期	その他 <sup>4</sup>
40 hrs	0	15	12 (80.0)	-	-	3 (20.0)
	0.2	16	13 (81.3)	-	-	3 (18.8)
	5.55	18	16 (88.9)	-	-	2 (11.1)
120 hrs	0	15	-	0 (0.0)	0 (0.0)	12 (100.0)
	0.2	16	-	0 (0.0)	0 (0.0)	13 (100.0)
	5.55	18	-	0 (0.0)	0 (0.0)	16 (100.0)

<sup>1</sup>基礎培地にはmHECM-1のbasic medium (BM-1)を使用し，各濃度のグルコースを添加した。

<sup>2</sup>交尾後13～14時間に採取した前核期胚を供試胚数とした。

<sup>3</sup>供試胚数を母数として算出した。

<sup>4</sup>交尾確認後40時間は1細胞期，変性，断片化および退行を含み，交尾確認後120時間は発生停止，変性，断片化および退行を含む。

表20 異なるEDTAおよびグルコース濃度がホンドハタネズミ体内受精由来前核期胚の体外発生に及ぼす影響

交尾確認 からの時間	EDTA		グルコース		供試 胚数 <sup>2</sup>	胚ステージ <sup>3</sup>			その他 <sup>4</sup>
	濃度 (mM) <sup>1</sup>	濃度 (mM) <sup>1</sup>	2細胞期	桑実期		胚盤胞期			
	0	0							
40 hrs	0	0	14 (93.3)	-	-	1 (6.7)			
	0.01	0.2	16 (88.9)	-	-	2 (11.1)			
	0.1	5.55	13 (81.3)	-	-	3 (18.8)			
120 hrs	0	0	-	0 (0.0)	0 (0.0)	15 (100.0)			
	0.01	0.2	-	0 (0.0)	0 (0.0)	18 (100.0)			
	0.1	5.55	-	0 (0.0)	0 (0.0)	16 (100.0)			

<sup>1</sup>基礎培地にはmHECM-1のBasic Medium (BM-1) を使用し、各濃度のEDTAおよびグルコースを添加した。

<sup>2</sup>交尾後13.5～15時間に採取した前核期胚を供試胚数とした。

<sup>3</sup>供試胚数を母数として算出した。

<sup>4</sup>交尾確認後40時間は1細胞期、変性、断片化および退行を含み、交尾確認後120時間は発生停止、変性、断片化および退行を含む。

#### 実験5) グルタミン添加が胚発生に及ぼす影響

実験3) および4) で検討した培地にさらにグルタミンを添加し、ホンドハタネズミ体内受精由来前核期胚の培養を試みた。交尾確認から40時間における分割率について、いずれの区間に差は認められなかったが、実験3) の添加物（グルタミン、グルコースおよびEDTA）を加えた区において、低率ながら胚盤胞を得られた（表21）。

#### 実験6) ホンドハタネズミ体内受精由来前期2細胞期胚の発生培地の検討

体内受精由来前期2細胞期胚をHTFあるいはmHECM-1中で培養したところ、mHECM-1区においてに高い桑実胚および胚盤胞期への発生率を示した（表22）。

表21 種々の濃度のグルタミン、グルコースおよびEDTAがホンドハタネズミ体内受精由来前核期胚の体外発生に及ぼす影響

交尾確認 からの時間	グルタミン		グルコース		EDTA		供試 胚数 <sup>2</sup>	胚ステージ <sup>3</sup>			その他 <sup>4</sup>
	濃度 (mM) <sup>1</sup>	濃度 (mM) <sup>1</sup>	濃度 (mM) <sup>1</sup>	濃度 (mM) <sup>1</sup>	2細胞期	桑実期		胚盤胞	拡張胚盤胞	その他 <sup>4</sup>	
40 hrs	1.0	0	0	0	38	36 (94.7)	-	-	-	2 ( 5.3)	
	0.01	0.2	0.01	0.01	38	31 (81.6)	-	-	-	7 (18.4)	
	1.0	5.55	0.1	0.1	37	31 (83.8)	-	-	-	6 (16.2)	
120 hrs	1.0	0	0	0	38	-	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (2.6)	37 (97.4)	
	0.01	0.2	0.01	0.01	38	-	1 (2.6)	1 (2.6)	1 (2.6)	35 (92.1)	
	1.0	5.55	0.1	0.1	37	-	2 (5.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	35 (94.6)	

<sup>1</sup>基本培地にはmHECM-1のBasic Medium (BM-1) を使用し，各濃度のグルタミン，グルコースおよびEDTAを添加した。

<sup>2</sup>交尾後13.5～15時間に回収した前核期胚を供試胚数とした。

<sup>3</sup>供試胚数を母数として算出した。

<sup>4</sup>交尾確認後40時間は1細胞期，変性，断片化および退行を含み，交尾確認後120時間は発生停止，変性，断片化および退行を含む。

表22 ホンドハタネズミ体内受精由来前期2細胞期胚の体外発生

培地	胚ステージ <sup>2,3</sup>						
	供試胚数		胚盤胞期				
	(前期2細胞期胚) <sup>1</sup>	桑実胚	合計	初期胚盤胞	胚盤胞	拡張胚盤胞	その他 <sup>4</sup>
HTF	26	0 (0.0)	0 ( 0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 ( 0.0)	26 (100.0)
mHECM-1	27	1 (3.7)	18 (66.7)	3 (11.2)	5 (18.5)	10 (37.0)	8 ( 29.6)

<sup>1</sup>交尾確認後26～29.5時間で胚を採取した。

<sup>2</sup>交尾確認後120時間まで培養した。

<sup>3</sup>供試胚数を母数として算出した。

<sup>4</sup>変性，断片化および退行を含む。



## 考察

マウス胚の発生培地として用いられているKSOM<sup>aa</sup>は、構成成分の最適化戦略、すなわち、いくつかの培地組成を同時に最適化し、遠縁交配系マウス胚（CF1）の2細胞期ブロックを解除するSimplex Optimized Medium (SOM; Lawitts and Biggers, 1991, 1992)をもとに、NaClおよびKCl濃度を改良した培地（KSOM）にアミノ酸を添加した培地である。研究開始当初、マウス2細胞期胚が、胚盤胞へ発生するための必須な外因性アミノ酸はないと報告されていた（Brinster, 1965e）。しかし、マウス胚にはアミノ酸を取り込む能力があり（Brinster, 1971）、アミノ酸は雌生殖器道に豊富に含まれている（Miller and Schultz, 1987）。いくつかのマウス系統の体外発生は特定のアミノ酸を添加することで改良された（Mehta and Kiessling, 1990; Gardner and Lane, 1993, 1996; Ho et al., 1995）。KSOM培地へのアミノ酸添加も、胚盤胞あるいは脱出胚盤胞への発生率および細胞数の上昇を導いた（Ho et al., 1995）。さらに、培地改変によって数種のタンパク質のmRNA合成を*in vivo*レベルまで上昇させることに成功した（Ho et al., 1995）。ハムスター培地として用いられているHECM-1はグルコースおよびリン酸を含まないタイロッド液であり、ハムスター2および4細胞期胚を胚盤胞まで発生させた培地である。それまでハムスター2細胞期胚は体外での発生阻害が生じるため、培養が困難であった。しかし、Schni and Bavister (1988)らは発生阻害の原因がグルコースおよびリン酸であることを見出し、前核期胚から胚盤胞期まで発生する培地が開発されるようになった（Seshagiri and Bavister, 1989; McKiernan et al., 1991; Barnrtt and Bavister, 1992; Bavister and McKiernan, 1993; McKiernan and Bavister, 1994; McKiernan et al., 1995; McKiernan and Bavister, 2000）。これらの発見が、体外で胚の発生に阻害が生じていた他の動物種において、胚盤胞まで発生させる培地の開発につながった。その一例が、ラット胚発生培地として用いられているmR1ECMである（Miyoshi et al., 1994, 1995）。ラット初期胚の発生を阻害せず、桑実胚から胚盤胞への発生を促進することが報告されており、mR1ECMはグルコースが添加されている（Miyoshi et al., 1994）。

実験1)の結果では、mHECM-1培地において発生率が高かった。この理由として、ハムスター初期胚と同様にグルコースおよびリン酸の“Crabtree effect” (Crabtree, 1929), つまりミトコンドリア呼吸の抑制により、発生が阻害されたかもしれない (Schini and bavister, 1988; Seshagiri and Bavister, 1989, 1991)。このことから、ハタネズミ胚の特性はマウスよりもハムスターに近いことが示唆された。ゆえに今後の実験にはmHECM-1を使用した。

ハムスター培地は開発されて以降現在まで、BM-1からはHECM-1 (Schni and Bavister, 1988), BM-2からはHECM-2 (Seshagiri and Bavister, 1989), BM-3からはHECM-3, 5~8 (McKiernan et al., 1991; McKiernan et al., 1995), BM-4からはHECM-4 (Bavister and McKiernan, 1993) がそれぞれ開発され、さらにビタミン添加によりHECM-9 (McKiernan and Bavister, 2000), 低濃度のリン酸添加でHECM-10 (Ludwig et al., 2001) が開発されている。またハムスター以外の動物種でも使用されている (ウシ: Rose and Bavister, 1992; サル: Schramm and Bavister, 1996; ラット: Matumoto and Sugawara, 1998)。各基礎培地 (BM) の組成 (構成成分) は同じものの、各試薬の添加量が様々である。実験1)の結果より、ハムスター培地を用いた場合の発生率が高い傾向にあったことから、BMを用いることが適切であると考えた。しかしながら、いずれのBMにおいても発生率が低かったことから、他の要因により分割が停止したことが推測された。そこで、BM-1にグルコース添加 (実験3), EDTA添加 (実験4) およびグルタミン添加 (実験5) して検討したが、いずれの実験においても2細胞期以降への発生率は低く、各添加物質の効果はみられなかった。しかし、グルタミン添加により、低率ではあったが胚盤胞期に発生した胚が観察された。これは、必須アミノ酸であるグルタミンは8細胞期までの分割を早め、マウス胚の発生率および生存性を向上させる (Lane and Gardner, 1994, 1997), 2細胞期での発生停止を解除して胚盤胞期まで発生させる (Chatot et al., 1989)。高濃度のリン酸存在下においてマウス分割胚はグルコースによる阻害を受けなくなる (Lane and Gardner, 1996) などの要因によるものと考えられる。

本研究では、既知培地を用いて体外受精および顕微授精で作出した胚の体外培養条件を検討したが、多くの胚が2細胞期胚で発生を停止していた。これを解決するために、他の動物種で一定の効果が示されている薬剤について調べたが、ホンドハタネズミにおいてはいずれも効果的ではないことが示された。他の原因として、浸透圧がラット初期胚の発生に影響を及ぼす報告があることから (Miyoshi et al., 1994) , 本研究では調べなかった培地の浸透圧が未知の影響を及ぼしたことも考えられる。今後は、各試薬の添加後の浸透圧、あるいはウシやブタなどで使用されている培地の検討が、ホンドハタネズミ前核期胚を胚盤胞期まで発生させる手がかりとなるかもしれない。

### 第3節 体内受精由来胚盤胞の非外科的子宮内移植による産仔作出

本節では、キメラあるいはトランスジェニックハタネズミ作製など胚盤胞移植による産仔作出を想定し、ホンドハタネズミ体内受精由来胚盤胞を非外科的に子宮内移植して産仔作出を試みた。

#### 材料および方法

##### 供試動物

第2章第2節と同様に飼育した。6～49週齢の雌ホンドハタネズミ62匹から体内受精卵母細胞を採取した。

##### 体内受精卵の作出

第4章第2節と同様の方法で体内受精由来胚を作出した。

##### 体内受精卵の採取

繁殖能のある雄ホンドハタネズミとの交尾を確認した日を妊娠0日目とした。妊娠3.5日目に雌動物を頸椎脱臼にて子宮を摘出し、29Gのマイジェクターを用いて子宮内をH-CZB液で灌流して桑実胚から胚盤胞を採取した。採取した胚をH-CZB液下で3～4回洗浄し、移植までmHECM-1液中でインキュベーター内で培養した。

##### 精管結紮雄の作製

第2章第3節と同様の方法で作製した。

## 非外科的胚移植 (non-surgical embryo transfer; NSET)

移植スケジュールを図14に示す。17～37週齢の雌ホンダハタネズミを精管結紮した雄ホンダハタネズミと交尾 (19:00～20:00) させ、偽妊娠を誘起した。交尾を5回以上確認した個体を偽妊娠と判断し、偽妊娠0日目とした。偽妊娠2.5日目のレシピエントに10%ペントバルビタールナトリウムを30 mg/kgの用量で腹腔内投与して麻酔後、耳鏡を用いて肉眼で外子宮口に移植器具を挿入した。移植には、プラスチックニードル (ニシカスピン, 日本歯科薬品株式会社, 山口, 日本) を1 mlシリンジ (テルモ株式会社) に装着し、パラフィルムで接合部を覆った。2  $\mu$ lのH-CZB液と共に充填した桑実胚から胚盤胞を子宮内に排出した。各子宮内に移植する胚の数を4～6個とし、両子宮角に移植した受精卵の総数は8～12個であった。偽妊娠21日目を出産予定日とし、出産2日目 (出産日を0日目とする) に産仔重量を調べるとともに雌雄判別した。また偽妊娠14日後までに体重増加が見られない場合は過麻酔により安楽死させ、子宮内の着床痕を確認した。偽妊娠21.5日目で出産しなかった場合、頸椎脱臼によって安楽死後、開腹して胎仔および胎盤を摘出し、各重量の計測、雌雄判定および着床痕を記録した。

## 外科的胚移植

10～33週齢の雌ホンダハタネズミを精管結紮した雄ホンダハタネズミと交尾 (19:00～20:00) させ、偽妊娠を誘起した (図14)。交尾を5回以上確認した個体を偽妊娠と判断し、翌朝を偽妊娠0.5日目とした。偽妊娠2.5日目のレシピエントに三種混合麻酔薬をホンダハタネズミに適した濃度 (後述) で腹腔内投与し、不動化までケージに静置した。胚移植には不動化した個体のみを使用した。不動化後、腰椎背部の皮毛をバリカンにより術囲の約3倍の面積を剃った後、0.1%ヒビテン液を含む脱脂綿で術野を消毒した。ホンダハタネズミの頭部全面が右側になるように実体顕微鏡下に横向きに寝かせ、最後肋骨から約1 cm尾側の皮膚を縦に約1 cm、筋層を約0.5 cm切開した。切開部から卵巣および子宮の一部を取り出し、卵巣周囲に付着する脂肪塊をクレンメで掴んで固定した。27 Gの注射針を用いて子宮に沿って走る血管を避けて穴を開け、

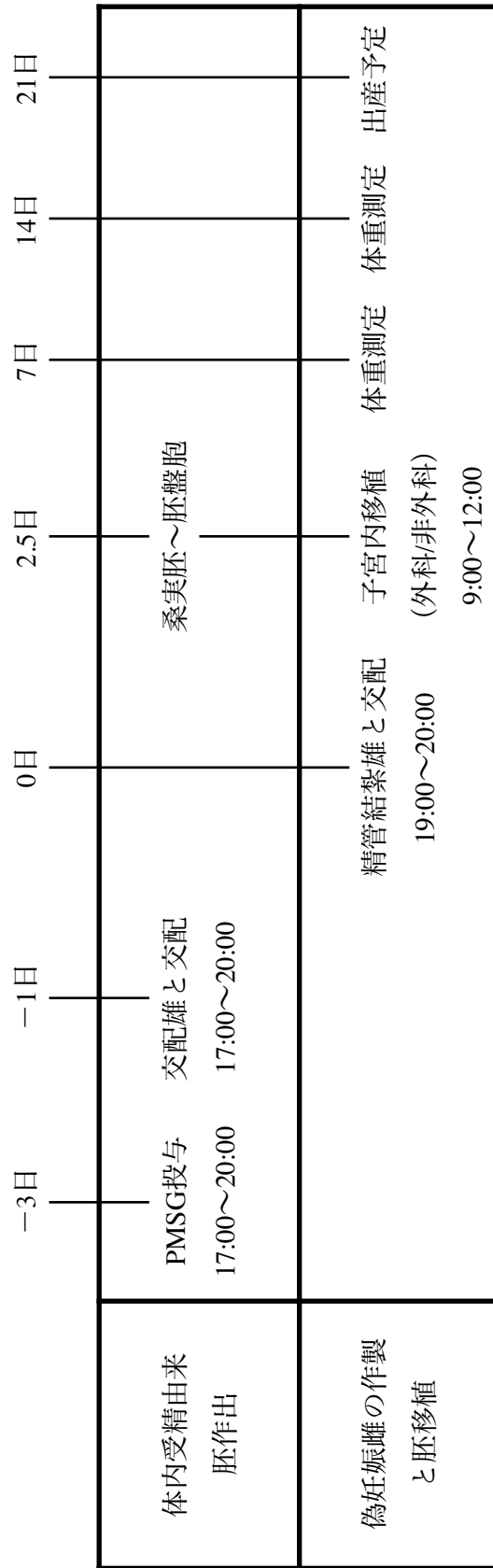


図14 体内受精由来胚の移植スケジュール

胚と少量のH-CZB液を充填した滅菌キャピラリーを挿入してキャピラリー先端から気泡が出るまで静かに胚を排出した。各子宮角に4～6個の胚を移植し、両子宮角に移植した受精卵総数は8～12個であった。また、キャピラリー内の気泡2個が子宮内に放出されたことを胚排出の確認の目安とした。胚排出後、子宮角を切開部から体内に戻して筋層を縫合糸で1針縫合し、皮膚をクリップで固定した。縫合後、塩酸メデトミジンの拮抗剤であるアチパメゾールを0.23 mg/kgの用量で腹腔内投与した。その後、覚醒確認までキムタオルに包み、加温板上のケージ内で保温した。動物がキムタオルから出てきた場合に覚醒したとみなし、ケージ内にて通常飼育した。以後の操作は非外科的胚移植と同様に行った。

## 実験計画

次の通り、実験区を設定した。

対照区：ペントバルビタールナトリウムを用いた非外科的胚移植を前述の通りに行つて産仔作出を試みた。

実験区I：投与麻酔薬を三種混合麻酔薬（M/M/B: 0.15/2/2.5）に変更し、対照区と同様にNSETを行った。移植後すぐにアチパメゾールを投与して覚醒を促した。

実験区II：投与麻酔を三種混合麻酔薬（M/M/B: 0.23/3/3.75）に変更し、胚移植後に5～10分程、頭部が下向き斜めの状態でレシピエントを保定した（手技の変更）。保定終了後すぐにアチパメゾールを投与して覚醒を促した。

実験区III：三種混合麻酔薬（M/M/B: 0.23/3/3.75）を用い、外科的胚移植を前述の通りに行つて産仔作出を試みた。

## 統計処理

第2章第3節と同様に分析した。

## 結果

### ホンドハタネズミの体内受精由来胚盤胞の子宮内胚移植

三種混合麻酔薬（M/M/B: 0.15/2/2.5）を用いたNSET区の妊娠率，産仔率および着床率のすべての項目で0%となり，他の3区と比較して有意に低い値を示した（表23， $P<0.05$ ）。手技を変更したNSET区において，ペントバルビタールナトリウムを用いた対照区といずれの項目においても同等であった。外科的胚移植区において，妊娠率，産仔率および着床率は対照区および手技を変更したNSET区と同等であった。流産率において，外科的胚移植区はNSET区と比較して有意に高い流産率を示した（ $P<0.05$ ）。

### ホンドハタネズミ体内受精由来胚盤胞を用いた移植による産仔数，形態，性別，産仔重量および胎盤重量

いずれの項目においても4区間で有意な差は認められなかった（表24）。



表23 異なる移植法および麻酔薬がホンドハタネズミ体内受精由来胚盤胞の移植後の妊娠率、流産率、産仔数および着床率に及ぼす影響

移植の種類	麻酔の種類	麻酔薬濃度 (mg/kg)	レシピエント 数	妊娠率(%) <sup>1</sup>		流産率(%) <sup>2</sup>		産仔率(%) <sup>3</sup>		着床痕+生存産仔数 /移植胚数
				移植 胚数	妊娠匹数 /移植匹数	着床痕数 /移植胚数	出産匹数 /移植胚数	産仔率(%)		
NSET <sup>1</sup> (対照区)	ペントバルビタール	30	8	82	5/8 (62.5) <sup>a</sup>	1/82 (1.2) <sup>c</sup>	12/82 (14.6) <sup>e</sup>	13/82 (15.9) <sup>g</sup>		
NSET	三種混合麻酔薬	M/M/B: 0.15/2/2.5	5	52	0/5 ( 0.0) <sup>b</sup>	0/52 (0.0) <sup>c</sup>	0/52 ( 0.0) <sup>f</sup>	0/52 ( 0.0) <sup>h</sup>		
NSET (手技変更)	三種混合麻酔薬	M/M/B: 0.23/3/3.75	5	46	3/5 (60.0) <sup>a</sup>	0/46 (0.0) <sup>c</sup>	9/46 (19.6) <sup>e</sup>	9/46 (19.6) <sup>g</sup>		
外科的胚移植	三種混合麻酔薬	M/M/B: 0.23/3/3.75	6	61	4/6 (66.7) <sup>a</sup>	5/61 (8.2) <sup>d</sup>	13/61 (21.3) <sup>e</sup>	18/61 (29.5) <sup>g</sup>		

<sup>1</sup>NSET: non-surgical embryo transfer.

<sup>2</sup>体重増加が認められた個体.

<sup>3</sup>胚移植14日目に体重増加が認められない場合、安楽死処理後観察.

<sup>4</sup>胚移植後21～22日目に出産した個体.

<sup>a-h</sup>同じ列内における異なる添え文字は有意差あり (P<0.05).

表24 ホンドハタネズミの体内受精由来胚盤胞を用いた移植による産仔数、形態、性別、産仔重量および胎盤重量

移植の種類	産仔数 (%) <sup>2</sup>			形態 <sup>2</sup>		性別 (%) <sup>3</sup>		産仔重量(g) <sup>3,4</sup>		胎盤重量 (g) <sup>4,5</sup>	
	合計	生存	死亡	正常	雌	雄	正常	正常	正常	正常	
NSET <sup>1</sup> (対照区)	12	11 ( 91.7)	1 ( 8.3)	12	6 (50.0)	6 (50.0)	3.32 ± 0.18	0.98			
NSET	0	-	-	-	-	-	-	-			
NSET (手技変更)	9	9 (100.0)	0 (0.0)	9	7 (77.8)	2 (22.2)	3.45 ± 0.09	-			
外科的胚移植	13	13 (100.0)	0 (0.0)	13	7 (53.8)	6 (46.2)	3.81 ± 0.21	-			

<sup>1</sup>NSET: non-surgical embryo transfer.

<sup>2</sup>出産日 (0日目) に測定および観察.

<sup>3</sup>出産日から2日目に測定および観察.

<sup>4</sup>平均値 ± 標準誤差.

<sup>5</sup>帝王切開した個体のみ測定.

## 考察

非外科的胚移植は、レシピエントへの安全性、ストレス軽減および使用動物数削減に貢献できる移植方法である。本移植用器具も開発が進められており、移植器具に関する研究報告において、シリコンチューブを用いて6匹のレシピエントマウスにそれぞれ胚盤胞20個を移植したところ、5匹が仔を分娩したことが報告されている（妊娠率: 83%; Green et al., 2009）。またテフロンチューブを用いて片側一子宮角に6~8個の胚盤胞を7匹のレシピエントにおいて移植したところ、すべてのレシピエントにおいて産仔を得られている（Cui et al., 2014）。本研究では高中（2015）の報告から、比較的高い出産率を得られたプラスチックニードルを使用した。この移植器具は、片手で容易に操作でき、低コストでもある。プラスチックニードルは半透明であることから器具内での胚の存在を確認しながら操作でき、さらに移植後の器具内の胚残存はみられなかった（未表示のデータ）。

当初、非外科的胚移植の麻酔薬に関しては不動化にとどめるために、外科手術よりも低濃度の麻酔薬を用いた（ホンドハタネズミにおける麻酔薬の詳細な検討を第5章第2節に述べる）。ペントバルビタールナトリウムを用いた非外科的胚移植の妊娠率が外科的移植の次に高かった理由として、移植器具を挿入して頸管が拡張されるため、移植器具抜去後の頸管の大きさが元に戻るまでの時間が必要であり、ペントバルビタールナトリウムでは不動化時間が長く、十分な頸管収縮時間が確保できたことにより、移植胚の流出が抑制された、および子宮角内の深部にとどまりやすかったことが推測された。三種混合麻酔（M/M/B: 0.15/2/2.5）を用いた場合、不動化後ペントバルビタールナトリウムと同様に移植し、直ちに塩酸メedetミジンの拮抗剤アチパメゾールを腹腔内投与して覚醒を促した。この場合、レシピエントは移植中あるいは拮抗剤投与後2~3分ですぐに動き回るあるいは、腔周囲を舐めたりといった行動、および腔からの液体流出などを確認した（データ未表示）。このことから、移植胚が拡張した子宮頸管から流出してしまい、産仔作出に至らなかったことが推察される。これを確かめる

ために、1) 不動化時間を外科的移植時間と同じにする、2) 移植器具によって拡張された頸管から移植胚流出が抑制されるよう、頭部を下に身体を傾けて一定時間保定するといった修正を加えて実験した。この結果、ペントバルビタールナトリウムと同程度まで妊娠率、産仔数および着床率が改善された。この理由として、諸々の原因による子宮からの移植胚の流出が大いに抑制されたためと考えられる。また、非外科的胚移植は外科的胚移植と比較すると、同程度の妊娠率および産仔数を示している。流産の割合も非外科的胚移植では低く、レシピエントを傷つけない手法のために複数回の移植も可能となり、一匹あたりから得られる産仔数が上昇する。以上のことから、ホンドハタネズミの非外科的胚移植は外科的移植の十二分な代替法となり、キメラあるいはトランスジェニックハタネズミ作製など胚盤胞移植からの産仔作出に貢献する可能性が示唆された。

## 第5章 ホンドハタネズミの外科手術時に用いる麻酔薬の検討

### 第1節 緒言

主要成分がペントバルビタールナトリウムであるソムノペンチルは、認定動物医薬品（要処方箋薬）であり、各種動物実験において広く使用されている。ペントバルビタールナトリウムは強い鎮静および睡眠作用を示し、意識喪失をともなう外科麻酔を獲得できるが、このような状況は致死相当を投与した場合に現れる。ペントバルビタールナトリウムは中枢神経系に迅速に作用し、深性麻酔下で血圧低下、呼吸低下および停止を潜在的に誘起する。この理由により、実験操作中にしばしば動物が死亡する例もあることから、ペントバルビタールナトリウムの単独使用による外科手術は不適切であると明言されている（Heavner and Cooper, 2008; Flecknell, 2009）。

他の麻酔方法として吸引麻酔があげられる。吸引麻酔は長時間の麻酔効果を呈し、安全性および信頼性のある麻酔法であるが、専用の器具や機器が必須であり、複数の動物への同時麻酔操作においては、注入麻酔と比べて多くの操作スペースおよび費用が必要になる。このため、取り扱いおよび低費用に優れるとともに、動物に対して高い安全性と麻酔効果を示す注入麻酔が求められる。

Kawaiら（2011）は、マウスにおいてケタミンおよびキシラジンの混合麻酔薬と同等の効果を有する新しい注入麻酔を報告し、この混合麻酔薬は2種類の鎮静剤であるメドミジンおよびミダゾラムと非麻薬性の鎮痛薬であるブトルファノールから構成される。本麻酔薬はICRマウスにおいて約40分間の有効麻酔時間を生み出し（Kawai et al., 2011）、BALB/c および C57BL/6J系マウスにおいても、雌雄同等に有効な麻酔効果を誘導した（Kirihara et al., 2013）。さらに三種混合麻酔薬は、実験動物への利用だけでなく（Itamoto et al., 2000, 2002; Kalema-Zikusoka et al., 2003; Kirihara et al., 2015a, 2015b; Tsukamoto et al., 2015）、野生動物の捕獲にも利用されている（Spelman, 2004; Bertelsen and Villadsen, 2009; Wenger et al., 2010; Lapid and Shilo-Benjamini, 2015）。

精管結紮雄作製や胚移植といった生殖補助技術開発にあたり、麻酔薬も重要な要因となりうる。しかしながら、ハタネズミ属において様々に優れた効果をもつ三種混合麻酔薬を検討した報告はなく、その他麻酔薬を利用した研究報告も少ない（Wakayama et al., 1996; Manoli et al., 2012; Horie et al., 2015）。

本章では、第一に雌雄ホンダハタネズミにおいて、外科あるいは非外科的操作時に使用する三種混合麻酔薬の安全性と有効性を検討した。第二に、雌ホンダハタネズミにおいて非外科的胚移植を反復することを考慮し、麻酔薬の反復投与が個体に及ぼす影響を検討した。

## 第2節 各麻酔薬が雌雄の麻酔スコアに及ぼす影響

本節では、ペントバルビタールナトリウムおよび異なる濃度の三種混合麻酔薬が、雌および雄ホンダハタネズミに及ぼす影響を麻酔時間、呼吸数および体重変化により評価し、ホンダハタネズミに適した麻酔薬およびその濃度を検討した。

### 材料および方法

#### 供試動物

第2章第2節と同様に飼育した。6～69週齢の雌ホンダハタネズミ36匹および8～37週齢の雄ホンダハタネズミ36匹を、雌雄それぞれにおいて4つのグループに9匹ずつになるように無作為に選出した。

#### 麻酔薬の調整

すべての麻酔薬を0.9%生理食塩水により希釈した。ペントバルビタールナトリウム（ソムノペンチル；共立製薬株式会社，東京，日本）の投与量を40 mg/kgとし，使用前に1 mlのペントバルビタールナトリウム原液を0.9%生理食塩水で10倍希釈した。

三種混合麻酔薬については，次に示すいくつかの濃度を設定した；1) 0.3 mg/kgの塩酸メデトミジン（ドルベネ注；共立製薬株式会社），4.0 mg/kgのミダゾラム（ミダゾラム注；サンド株式会社，山形，日本）および5.0 mg/kgの酒石酸ブトルファノール（ベトルファール；Meiji Seikaファルマ，東京，日本）を混合し（M/M/B: 0.3/4/5），実践的には，0.75 mlの塩酸メデトミジン，2 mlのミダゾラムおよび2.5 mlの酒石酸ブトルファノールを全量25 mlとなるように0.9%の生理食塩水で調整した。同様の方法を用いて，2) M/M/B: 0.15/2/2.5および3) M/M/B: 0.23/3/3.75を調整した（それぞれ0.15および0.23 mg/kgの塩酸メデトミジン，2.0および3.0 mg/kgのミダゾラムおよび2.5および3.75 mg/kgの酒石酸ブトルファノール）。

アチパメゾール（アチパメ注；共立製薬株式会社）を塩酸メデトミジンの拮抗剤（覚醒剤）として、0.3、0.15および0.23 mg/kgとなるように0.9%生理食塩水で調整したものを使用した。またペントバルビタールナトリウムの鎮痛剤として、ブプレノルフィン（レペタン注；大塚製薬株式会社，東京，日本）を0.02 mg/kgとなるように0.9%生理食塩水で調整したものを使用した。

#### 麻酔薬の投与および取り扱い

すべての実験を明期（7:00～21:00）に動物飼育室内において実行した。麻酔薬投与前に体重測定し、投与量を算出した。算出後、投与する麻酔薬を27Gの注射針を装着した1 mlのシリンジ内に充填し、保定した動物の腹腔内に2段階穿刺にて投与した。正向反射の消失まで飼育ケージに戻した。正向反射消失後、加温板上に横たわせ、麻酔スコアおよび呼吸数を記録した。記録後直ちに拮抗剤を投与して、ケージに戻して正向反射の回復を待った。自力で歩き出した場合に正向反射の回復と定義した。

#### 麻酔スコアの測定

Kawaiら（2011）およびKiriharaら（2013）の方法を一部修正した麻酔スコアを用い、次に示す5ヶ所での反射により測定した：1) 正向反射；ホンドハタネズミを仰向けの状態にし、起き上がった場合にスコア1，起き上がらなかった場合にスコア0とした，2) 角膜反射；シリコンキャップを装着したパストツールピペットを用いて眼球から1 cm離れた場所から空気を吹きかけて刺激し，瞬きをしない場合にスコア1，瞬きした場合にスコア0とした，3) 尻尾反射；ピンセットで尻尾を摘み，体が動かなかった場合にスコア1，体が動いた場合にスコア0とした，4) 前肢反射；ピンセットで前肢を摘み，前肢を動かさない場合にスコア1，動かした場合にスコア0とした，5) 後肢反射；ピンセットで後肢を摘み，後肢を動かさない場合にスコア1，動かした場合にスコア0とした。



すべての麻酔スコアを5段階（0～5）で評価し、麻酔スコアが3～5の範囲であった場合に外科麻酔レベルを満たすと定義した。スコア3以上を示す時間を深性麻酔時間とみなした。麻酔薬投与時を麻酔スコア0とし、正向反射消失（0分；麻酔スコア測定開始）から10分毎に麻酔スコアを測定し、最大30分まで記録を継続した。

#### 呼吸回数

麻酔スコア測定時に呼吸回数を測定した。正向反射消失（0分：呼吸回数測定開始）から10分毎に20秒ずつ呼吸回数をカウンターを用いて測定し、最終的に測定した回数を1分間あたりの回数に換算した。

#### 時間の指標

不動化時間（動物が動かない時間）を正向反射の消失から回復までの時間と定義した。導入時間を正向反射消失から外科麻酔開始までの時間と定義した。深性麻酔時間を外科麻酔時間とした。覚醒時間を外科麻酔時間終了から正向反射回復までの時間と定義した。

#### 体重測定

麻酔薬投与日を0日（Day 0）とし、1（Day 1）、3（Day 3）、5（Day 5）、7（Day 7）および14（Day 14）日目の体重を測定した。

#### 統計処理

表および図のデータを平均値 ± 標準誤差で示した。全ての割合の分析には  $\chi^2$  検定を用い、時間および麻酔スコアについては一元配置分散分析を用いて分析した。実験区間に有意差が認められた場合、Tukey-Kramer法を用いて多重範囲検定した。体重の差には繰り返しのある一元配置分散分析を用いた。危険率5%未満で統計的有意性が認められると判断した。

## 結果

### 麻酔有効動物数および生死率

雌ホンドハタネズミにおいて、麻酔有効個体はペントバルビタールナトリウムおよびM/M/B: 0.3/4/5で100%、M/M/B: 0.23/3/3.75およびM/M/B: 0.15/2/2.5で77.8%であった(表25)。一方、ペントバルビタールナトリウムでの死亡率はM/M/Bの3グループと比較して有意に高かった ( $P < 0.05$ )。すべてのM/M/Bグループにおいて、個体の死亡は確認されなかった。

雄ホンドハタネズミの麻酔有効個体について、ペントバルビタールナトリウム(100%)、M/M/B: 0.3/4/5およびM/M/B: 0.23/3/3.75 (77.8%)、M/M/B: 0.15/2/2.5 (66.7%)の順で高かった。個体の死亡は雌と同様に、ペントバルビタールナトリウム投与区でのみ確認された。

### 時間

雌ホンドハタネズミにおいて、すべてのグループでの正向反射消失時間が5分以内であったことから(表26)、麻酔スコアの記録を麻酔投与5分後に開始した。M/M/B: 0.15/2/2.5における導入時間が最長となり ( $P > 0.05$ )、ペントバルビタールナトリウムでの麻酔時間は短かったが ( $24.2 \pm 3.0$ 分)、M/M/B: 0.3/4/5 ( $29.6 \pm 0.3$ 分)では長かった ( $P > 0.05$ )。M/M/B: 0.3/4/5での覚醒時間はM/M/B: 0.23/3/3.75と類似していたが(それぞれ  $5.7 \pm 2.4$ および  $5.8 \pm 3.4$ 分)、M/M/B: 0.15/2/2.5では短かった ( $1.8 \pm 0.9$ 分、 $P > 0.05$ )。さらに、M/M/B: 0.3/4/5での不動化時間が最長となり、ペントバルビタールナトリウムでは最短となったが、すべてのグループ間でいずれの時間パラメーターにおいて有意差は認められなかった。

雄ホンドハタネズミにおいて、すべてのグループの正向反射消失時間は5分以下であった(表26)。ペントバルビタールナトリウムでの麻酔時間は長く ( $28.8 \pm 3.5$ 分)、M/M/B: 0.15/2/2.5では短かった ( $24.2 \pm 2.5$ 分)。M/M/B: 0.15/2/2.5の覚醒時間が最短

表25 異なる麻酔薬および濃度を投与した時の雌雄ホンダネズミの有効麻酔個体数, 生存および死亡率の比較

性別	麻酔薬	供試			麻酔有効		
		動物数	体重 (g) <sup>2</sup>	投与量 (ml) <sup>2</sup>	動物数 <sup>3,4</sup>	生存率(%) <sup>5,6</sup>	死亡率(%) <sup>5,7</sup>
雌	ペントバルビタール <sup>1</sup>	9	30.19 ± 1.28	0.18 ± 0.01	9/9 (100.0)	5/9 ( 55.6) <sup>a</sup>	4/9 (44.4) <sup>c</sup>
	M/M/B: 0.3/4/5	9	29.19 ± 1.24	0.29 ± 0.01	9/9 (100.0)	9/9 (100.0) <sup>b</sup>	0/9 ( 0.0) <sup>d</sup>
	M/M/B: 0.23/3/3.75	9	28.86 ± 1.40	0.28 ± 0.01	7/9 ( 77.8)	7/7 (100.0) <sup>b</sup>	0/7 ( 0.0) <sup>d</sup>
	M/M/B: 0.15/2/2.5	9	27.90 ± 1.90	0.27 ± 0.02	7/9 ( 77.8)	7/7 (100.0) <sup>b</sup>	0/7 ( 0.0) <sup>d</sup>
雄	ペントバルビタール <sup>1</sup>	9	37.67 ± 0.02	0.23 ± 0.01	9/9 (100.0)	6/9 ( 66.7)	3/9 (33.3)
	M/M/B: 0.3/4/5	9	40.77 ± 1.80	0.40 ± 0.02	7/9 ( 77.8)	7/7 (100.0)	0/7 ( 0.0)
	M/M/B: 0.23/3/3.75	9	42.18 ± 2.22	0.42 ± 0.02	7/9 ( 77.8)	7/7 (100.0)	0/7 ( 0.0)
	M/M/B: 0.15/2/2.5	9	41.07 ± 2.85	0.41 ± 0.03	6/9 ( 66.7)	6/6 (100.0)	0/6 ( 0.0)

<sup>1</sup>ペントバルビタールナトリウム; ペントバルビタール.

<sup>2</sup>平均値 ± 標準誤差で示した.

<sup>3</sup>正向反射を消失した個体と定義した.

<sup>4</sup>供試動物数を母数として算出した.

<sup>5</sup>麻酔有効個体数を母数として算出した.

<sup>6</sup>正向反射を回復した個体と定義した.

<sup>7</sup>心拍停止を確認した個体と定義した.

<sup>a-b</sup>同じ列内にある異なる添え文字は有意差あり (P<0.05) .

表26 異なる麻酔薬および濃度を使用した場合の正向反射消失, 導入, 麻酔, 覚醒および不動化時間

性別	麻酔薬	供試動物数	正向反射消失必要時間 (min) <sup>2</sup>	導入時間 (min) <sup>2</sup>	麻酔時間 (min) <sup>2</sup>	覚醒時間 (min) <sup>2</sup>	不動化時間 (min) <sup>2</sup>
雌	ペントバルビタール <sup>1</sup>	5	2.8 ± 0.4	0.8 ± 0.4	24.2 ± 3.0	-	25.0 ± 2.7
	M/M/B: 0.3/4/5	9	2.7 ± 0.5	0.7 ± 0.2	29.6 ± 0.3	5.7 ± 2.4	35.3 ± 2.2
	M/M/B: 0.23/3/3.75	7	4.1 ± 0.8	0.9 ± 0.3	26.9 ± 2.8	5.8 ± 3.4	32.7 ± 4.4
	M/M/B: 0.15/2/2.5	7	4.6 ± 0.8	2.0 ± 0.7	26.7 ± 2.0	1.8 ± 0.9	30.1 ± 2.2
雄	ペントバルビタール <sup>1</sup>	9	5.0 ± 0.7	1.2 ± 0.3	28.8 ± 3.5	-	30.0 ± 3.3
	M/M/B: 0.3/4/5	7	3.0 ± 1.0	1.0 ± 0.0	27.9 ± 2.1	6.0 ± 3.6	34.7 ± 4.6
	M/M/B: 0.23/3/3.75	7	3.0 ± 0.4	0.7 ± 0.2	27.3 ± 2.7	1.5 ± 0.4	29.9 ± 3.2
	M/M/B: 0.15/2/2.5	6	4.2 ± 0.3	0.8 ± 0.3	24.2 ± 2.5	0.5 ± 0.5	25.2 ± 2.4

<sup>1</sup>ペントバルビタールナトリウム; ペントバルビタール.

<sup>2</sup>平均値 ± 標準誤差で示した.

( $0.5 \pm 0.5$ 分) , 不動化時間についてはM/M/B: 0.3/4/5が最長となり ( $34.7 \pm 4.6$ 分) , M/M/B: 0.15/2/2.5が最短であった ( $25.2 \pm 2.4$ 分) 。一方, すべてのグループ間でいずれの時間パラメーターにおいて有意差は認められなかった。

#### 麻酔スコア

雌の麻酔スコアの結果を図15A, 雄の結果を図15Bに示した。雌ホンダハタネズミでは, M/M/B: 0.3/4/5および0.23/3/3.75の記録時間0, 10および20分においてペントバルビタールナトリウムと比較して有意に高い麻酔スコアが示された (図15A,  $P < 0.05$ ) 。M/M/B: 0.15/2/2.5は, M/M/B: 0.3/4/5と比較して0, 10および20分で有意に低い麻酔スコアを示した ( $P < 0.05$ ) 。記録時間0分において, M/M/B: 0.3/4/5はM/M/B: 0.23/3/3.75より有意に高い麻酔スコアを示し ( $P < 0.05$ ) , 10分において, M/M/B: 0.15/2/2.5はペントバルビタールナトリウムより有意に高かった ( $P < 0.05$ ) 。記録時間30分においてはすべてのグループ間でスコアに有意差は認められなかった。

雄ホンダハタネズミでは, すべての記録時間においてM/M/B: 0.3/4/5はペントバルビタールナトリウムと比較して有意に高い麻酔スコアを示した (図15B,  $P < 0.05$ ) 。記録時間0, 10および20分でのM/M/B: 0.23/3/3.75はペントバルビタールナトリウムと比較して有意に高い麻酔スコアであった ( $P < 0.05$ ) 。記録時間10分でのM/M/B: 0.15/2/2.5はペントバルビタールナトリウムと比較して有意に高い麻酔スコアであり ( $P < 0.05$ ) , 30分においてM/M/B: 0.15/2/2.5はM/M/B: 0.3/4/5と比較して有意に低い麻酔スコアであった ( $P < 0.05$ ) 。

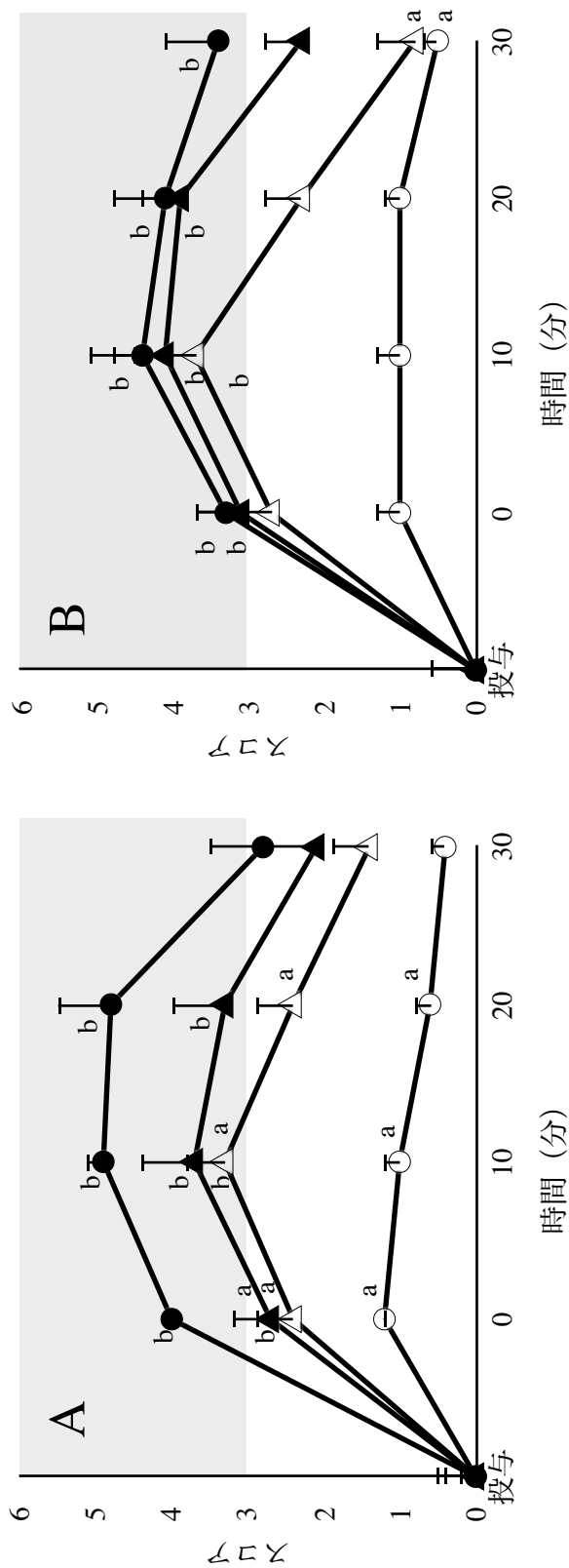


図15 雌 (A) および雄 (B) ホンドハタネズミにおける麻酔スコアの経時的变化  
 麻酔投与時のスコアを0として、麻酔スコアを正方向反射消失の0分から記録した。記号の表記は以下に従う；40 mg/kgの  
 ペントバルビタールナトリウム (○), M/M/B:0.3/4/5 (●), M/M/B:0.23/3/3.75 (▲) およびM/M/B:0.15/2/2.5 (△)。  
 グラフの表記は平均値 ± 標準誤差で示している。グレースケールは効果的な外科麻酔領域を示す。a: M/M/B:0.3/4/5  
 と比較して有意差あり (P<0.05)。b: ソムノペンチルと比較して有意差あり (P<0.05)。

## 呼吸回数

雌ホンドハタネズミにおいて、ペントバルビタールナトリウムでの呼吸回数は記録時間0分で高かったが、10分で著しく低下した。しかしながら、すべてのグループ間で有意差は認められなかった（図16A）。

雄ホンドハタネズミにおいて、0分でのペントバルビタールナトリウムはM/M/B: 0.3/4/5およびM/M/B: 0.15/2/2.5と比較して有意に高い呼吸回数を示したが（ $P<0.05$ ），他の時間での呼吸回数に有意差は認められなかった（図16B）。

## 体重変化

本実験においては生存個体のみを測定した（表27）。雌ホンドハタネズミの体重変化において、ペントバルビタールナトリウムでは投与当日（Day 0）から緩やかな体重低下が観察されたが、M/M/B投与区では大きな変化はみられなかった（ $P>0.05$ ）。また雄ホンドハタネズミにおいても、著しい体重の変化は認められなかった。

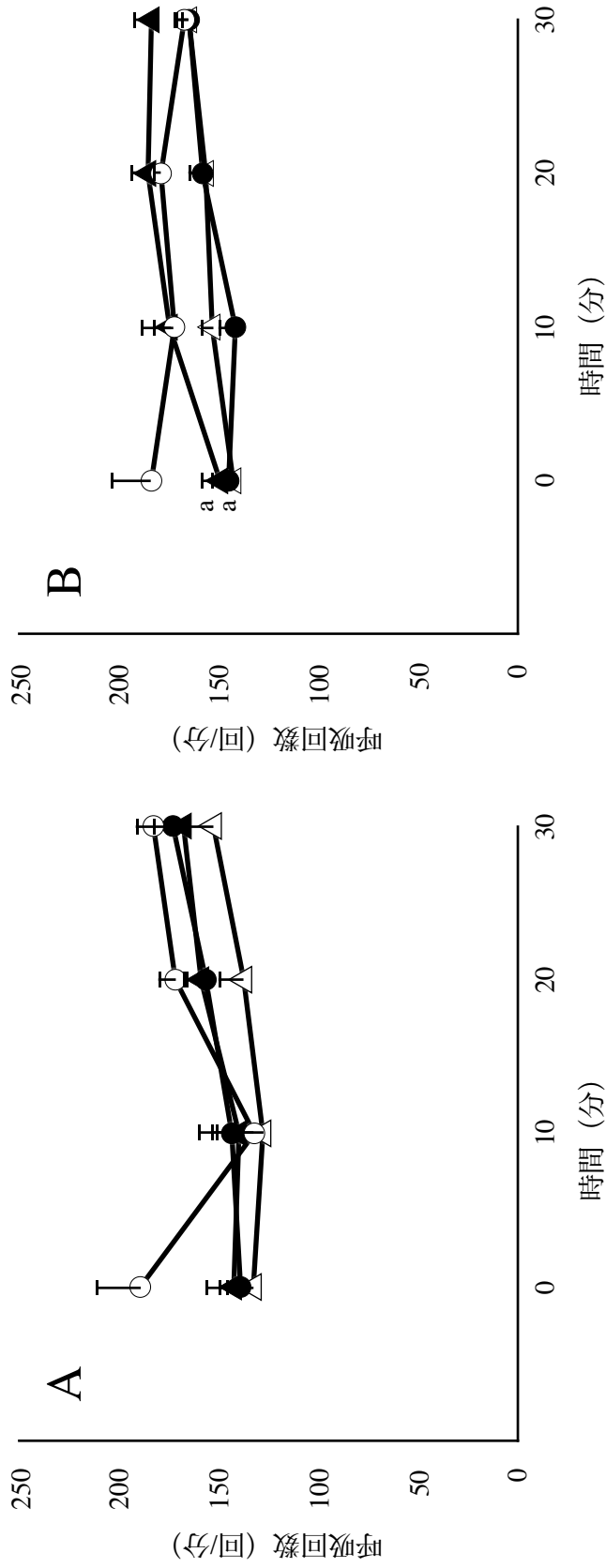


図16 雌 (A) および雄 (B) ホントハタネズミにおける, 呼吸回数を経過的な変化  
 正向反射消失 (0分) から測定した. 記号の表記は以下に従う; 40 mg/kgのソムノペンチル (○), M/M/B: 0.3/4/5  
 (●), M/M/B: 0.23/3/3.75 (▲) およびM/M/B: 0.15/2/2.5 (△). 棒グラフの表記は平均値 ± 標準誤差で示してい  
 る. a: ソムノペンチルと比較して有意差あり (P<0.05).



表27 異なる麻酔薬および濃度の投与後Day 0からDay 14までの雌雄ホントハタネズミの体重変化

性別	麻酔薬	動物数 <sup>2</sup>	検査 体重 (g) <sup>3</sup>							
			Day 0	Day 1	Day 3	Day 5	Day 7	Day 14		
雌	ペントバルビタール <sup>1</sup>	5	28.88±2.08	27.23±2.76	27.59±2.46	26.83±1.90	26.63±1.85	27.39±2.24		
	M/M/B: 0.3/4/5	9	29.19±1.24	29.54±1.12	29.13±1.12	29.47±1.16	28.52±1.01	28.89±1.00		
	M/M/B: 0.23/3/3.75	9	28.86±1.40	28.42±1.40	28.38±1.46	28.63±1.41	28.72±1.30	29.30±1.37		
	M/M/B: 0.15/2/2.5	9	27.90±1.90	27.84±2.22	27.18±1.67	28.81±2.10	28.84±2.11	28.93±2.11		
雄	ペントバルビタール <sup>1</sup>	6	38.39±1.44	38.03±1.92	39.23±1.40	39.56±1.35	39.70±1.77	40.77±1.72		
	M/M/B: 0.3/4/5	9	40.77±1.89	39.14±1.59	40.43±1.79	41.07±1.79	41.43±1.99	42.31±1.73		
	M/M/B: 0.23/3/3.75	9	41.15±2.45	39.70±2.14	40.61±2.22	40.94±2.11	41.74±2.11	43.49±2.16		
	M/M/B: 0.15/2/2.5	9	41.07±2.79	40.49±2.77	40.82±2.81	41.69±2.90	41.98±2.89	41.50±2.91		

<sup>1</sup>ペントバルビタールナトリウム；ペントバルビタール。

<sup>2</sup>麻酔効果の有無に関わらず，麻酔薬を投与した個体の体重を測定した。

<sup>3</sup>平均値 ± 標準誤差で示した。

## 考察

これまで、ペントバルビタールナトリウムをホンドハタネズミの外科麻酔薬として使用していたが、投与されたハタネズミが胚移植や精管結紮といった操作中に死亡する例も少なからずみられた（未表示のデータ）。このため、代替となる麻酔薬検討の必要性が考えられた。

近年開発された、塩酸メデトミジン、ミダゾラムおよび酒石酸ブトルファノールで構成される三種混合麻酔薬は、多くの動物で使用されている（カルフォルニアアシカ/Spelman, 2004；アカギツネ/Bertelsen and Villadsen, 2009；マウス/Kawai et al., 2011；ラット/Kirihara et al., 2015；ヌビアアイベックス/Lapid and Shilo-Benjamini, 2015）。さらにイヌ（Itamoto et al., 2000, 2002），サル（Kalema-Zikusoka et al., 2003; Ochi et al., 2014）および動物園でのアフリカライオン（Wenger et al., 2010）においても使用されている。げっ歯類では、三種混合麻酔薬はラット、ICRおよび近交系マウスにおいて十分な麻酔時間を生じ（Kawai et al., 2011; Kirihara et al., 2013, 2015），アシカ，アカギツネおよびアイベックスといった野生動物においても安全で信頼できる麻酔薬として報告されている（Spelman, 2004; Bertelsen and Villadsen, 2009; Lapid and Shilo-Benjamini, 2015）。一方、単一投与麻酔薬であるペントバルビタールナトリウム（ソムノペンチル）は、極度の有害な心呼吸系反応および乏しい鎮痛作用を誘起することが報告されている（Tsukamoto et al., 2015）。

本研究ではホンドハタネズミにおいて、上記三種混合麻酔薬がペントバルビタールナトリウムの代替薬となるかを調べるとともに、適切な麻酔濃度を検討した。ホンドハタネズミにおいて、35 mg/kgのペントバルビタールナトリウムの投与濃度を用いて外科的に胚移植した報告があるが（Wakayama et al., 1996）。本研究の予備実験において、35 mg/kgのペントバルビタールナトリウム投与では正向反射消失を誘起できず、45 mg/kgでは高い死亡率を示したことから（未表示のデータ），マウスで利用されている濃度よりも低い40 mg/kgで実験をした。ペントバルビタールナトリウム投与時の麻酔スコ

アでは、その平均スコアは3に到達しなかった。このことはペントバルビタールナトリウムが深性麻酔を誘起せず、不適切な麻酔薬であったことを示唆している。この結果は、50 mg/kgのペントバルビタールナトリウムを投与しても、げっ歯類では適切な麻酔を誘導しないと過去の報告と一致する (Erhardt et al., 1984; Smith, 1993; Spikes et al., 1996)。

3つの薬品はそれぞれ異なる薬理学的な機能を有する。塩酸メデトミジンは、鎮静鎮痛作用を呈すアドレナリン $\alpha_2$ 受容体である (Vähä-Vahe, 1989; Vainio et al., 1989)。ミダゾラムは鎮静作用を有するベンゾジアゼピン系鎮痛剤である (Khanderia and Pandit, 1987)。酒石酸ブトルファノールは、鎮痛作用を生み出すオピオイド $\kappa$ 受容体作動薬として作用する麻酔性を示さないオピオイド $\mu$ 受容体拮抗薬である (Hosgood, 1990)。アチパメゾールはアドレナリン $\alpha_2$ 受容体に拮抗作用があり、塩酸メデトミジンの効果を拮抗する (Flecknell, 2009)。ホンドハタネズミへの三種混合麻酔薬投与時、雌雄それぞれの平均麻酔スコアが3を記録し、三種混合麻酔薬は深性麻酔を誘起できることが明らかとなった。これらの結果から、ホンドハタネズミにおいても三種混合麻酔薬の腹腔内投与は外科手術時に利用できる適切な麻酔薬であり、生存率も100%であったことから、安全で信頼できることが示唆された。しかしながら、M/M/B: 0.3/4/5を投与した77.8%のホンドハタネズミにおいて、呼吸リズムの乱れおよび無呼吸状態が観察された (データ未表示)。この濃度で観察された呼吸症状は、高い死亡率を示したペントバルビタールナトリウムと類似していた。さらに、この症状は、断続的に週齢に関係なく観察された。アチパメゾール投与後もこの症状が観察されるが、覚醒するに従ってその症状は緩和される。しかし、覚醒直後の個体はケージ内を活発に動かず、うずくまっている個体が多く観察された。

一方、M/M/B: 0.23/3/3.75濃度ではアチパメゾール投与後にこのような症状は観察されなかった。M/M/B: 0.3/4/5および0.23/3/3.75間の覚醒時間に有意差は見られなかったが(表26)、雄に関しては  $1.5 \pm 0.4$ 分 (M/M/B: 0.23/3/3.75) から  $6.0 \pm 3.6$ 分 (M/M/B: 0.3/

4/5) に覚醒時間が延長した。さらに、M/M/B: 0.15/2/2.5のスコアは他の三種混合麻酔薬区よりも低かった。M/M/B: 0.23/3/3.75を投与した場合、雌雄における麻酔時間は30分よりも短かったが、胚移植および精管結紮などの外科手術には十分な麻酔時間である。これらのことから、M/M/B: 0.23/3/3.75がホンドハタネズミの外科手術に最適な麻酔薬濃度であることを決定した。

マウスでは、性別間で麻酔効果の差はないと報告されているが (Kirihara et al., 2013) , ホンドハタネズミでは異なる傾向がみられ、雄ホンドハタネズミにおける不動化時間は雌よりも短縮された。この理由として、雄は雌よりも体重が重く、麻酔薬の投与量が多くなったことが関係しているかもしれない。一方、雌ホンドハタネズミにおいて、ペントバルビタールナトリウム投与時の呼吸回数が著しく低下した時間が存在した。近交系マウス系統間で気管支の反応性が異なることから (Duguet et al., 2000) , ペントバルビタールナトリウムは雌ホンドハタネズミの気管支に過敏に反応し、高頻度の呼吸数を引き起こしたかもしれない。一方、三種混合麻酔薬において雌雄間での効果の差はなかった。本研究では外科手術を実施しなかったため、次のステップとして検討された麻酔薬を用いて外科手術を検討する必要がある。

本研究ではペントバルビタールナトリウムの代替薬として、三種混合麻酔薬が雌雄ホンドハタネズミにおいてもより安全で効果的な麻酔薬であることを証明した。さらに、麻酔薬の濃度を、0.23 mg/kgの塩酸メデトミジン、3 mg/kgのミダゾラムおよび3.75 mg/kgの酒石酸ブトルファノールに調整することで、効果的な外科手術を期待できることが示唆された。

### 第3節 麻酔薬の反復投与が雌の麻酔スコアに及ぼす影響

本節では雌ホンダハタネズミへの麻酔薬の反復投与（3回）が麻酔時間，呼吸回数および体重変化に及ぼす影響を評価した。

#### 材料および方法

##### 供試動物

第2章第2節と同様に飼育した。6～69週齢の雌ホンダハタネズミ24匹を4つのグループに6匹ずつ無作為に選出した。また，それぞれの麻酔薬投与間隔を3～4週間空け，同一個体において実験を3回反復した。

##### 麻酔薬の調製

第5章第2節と同様の方法で麻酔薬を調製した。

##### 麻酔薬の投与および取り扱い

第5章第2節と同様の方法で行った。

##### 麻酔スコアの測定

第5章第2節と同様の方法で測定した。

##### 呼吸回数

第5章第2節と同様の方法で測定した。

##### 各種麻酔時間に関連した指標

第5章第2節と同様に定義した。

## 体重測定

第5章第2節と同様の方法で測定した。

## 統計処理

第5章第2節と同様の方法で統計処理した。

## 結果

### 麻酔有効個体数，生死の割合および各種麻酔関連時間

麻酔有効動物の割合において，ペントバルビタールナトリウム区で投与回数に関わらず高い値を示し，三種混合麻酔薬（M/M/B）区ではいずれの濃度においても高率であったが，2回目の投与群の値が低下する傾向がみられた（表28）。しかし，投与回数間で有意な差はなかった（ $P>0.05$ ）。生存および死亡率において，ペントバルビタールナトリウム区では高死亡率を示したが，投与回数による影響はみられなかった（ $P>0.05$ ）。M/M/B区において，2回目以降で死亡する個体が若干数認められたものの生存率は高かった。ペントバルビタールナトリウム区の麻酔時間において，2回目および3回目投与区は1回目投与区に比べて有意に長い時間を示した（ $P<0.05$ ）。また覚醒時間において，M/M/B: 0.23/3/3.75区の2回目投与区で有意に短時間で覚醒した（ $P<0.05$ ）。不動化時間において，ペントバルビタールナトリウム区の2および3回目投与区は1回目投与と比較して有意に長い不動化時間を示した（ $P<0.05$ ）。

### 麻酔スコア

ペントバルビタールナトリウム区は，いずれの測定時間においても投与回数間に有意差はみられず（図17A），麻酔スコアは低くかった。M/M/B: 0.3/4/5区では，投与回数が増すにつれて麻酔スコア値が低下するが，いずれの測定時間においても投与回数間で有意差はみられなかった（図17B），M/M/B: 0.23/3/3.75区においては，1回目投与よりも2回目および3回目の麻酔スコアが高くなったが，有意差はみられなかった（図17C）。M/M/B: 0.15/2/2.5区では，記録時間0分において1回目投与と比較して3回目投与が有意に低いスコアを示し（図17D;  $P<0.05$ ），記録時間10，20および30分において，投与回数間で有意差はみられなかった。

表28 麻酔薬の反復投与が雌ホンドハタネズミの麻酔有効個体数、生存率および各種麻酔関連時間に及ぼす影響

麻酔薬	正向反射									
	投与回数 <sup>2</sup>	麻酔有効動物数(%) <sup>3,4</sup>	生存率(%) <sup>5,6</sup>	死亡率(%) <sup>5,7</sup>	消失必要時間(min) <sup>8</sup>	導入時間(min) <sup>8</sup>	麻酔時間(min) <sup>8</sup>	覚醒所要時間(min) <sup>8</sup>	不動化時間(min) <sup>8</sup>	
ペントバルビタール <sup>1</sup>	1回目	6/6 (100.0)	3/6 ( 50.0)	3/6 (50.0)	2.3 ± 0.3	1.3 ± 0.3	19.7 ± 2.0 <sup>a</sup>	-	21.0 ± 2.1 <sup>a</sup>	
	2回目	3/3 (100.0)	3/3 (100.0)	0/3 ( 0.0)	4.0 ± 0.6	1.0 ± 0.0	39.3 ± 3.4 <sup>b</sup>	-	40.3 ± 3.4 <sup>b</sup>	
	3回目	3/3 (100.0)	2/3 ( 66.7)	1/3 (33.3)	4.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	34.0 ± 1.0 <sup>b</sup>	-	35.0 ± 1.0 <sup>b</sup>	
M/M/B: 0.3/4/5	1回目	6/6 (100.0)	6/6 (100.0)	0/6 ( 0.0)	1.8 ± 0.4	0.7 ± 0.2	29.3 ± 0.5	1.8 ± 1.2	31.8 ± 1.4	
	2回目	5/6 ( 83.3)	5/5 (100.0)	0/5 ( 0.0)	3.0 ± 0.8	1.0 ± 0.3	30.0 ± 0.0	6.6 ± 5.6	39.0 ± 5.5	
	3回目	5/5 (100.0)	4/5 ( 80.0)	1/5 (20.0)	4.8 ± 1.7	1.3 ± 0.5	24.3 ± 4.8	3.5 ± 0.5	27.5 ± 6.0	
M/M/B: 0.23/3/3.75	1回目	5/6 ( 83.3)	5/5 (100.0)	0/5 ( 0.0)	4.0 ± 1.1	0.8 ± 0.4	25.6 ± 3.9	4.7 ± 4.7 <sup>a,b</sup>	29.8 ± 5.4	
	2回目	4/6 ( 66.7)	3/4 ( 75.0)	1/4 (25.0)	3.0 ± 1.0	1.3 ± 0.3	30.0 ± 0.0	0.7 ± 0.3 <sup>a</sup>	33.3 ± 0.9	
	3回目	4/5 ( 80.0)	4/4 (100.0)	0/0 ( 0.0)	2.5 ± 0.3	1.0 ± 0.0	27.0 ± 3.0	15.7 ± 2.8 <sup>b</sup>	40.5 ± 7.4	
M/M/B: 0.15/2/2.5	1回目	5/6 ( 83.3)	5/5 (100.0)	0/5 ( 0.0)	3.6 ± 0.4	2.4 ± 0.9	25.6 ± 3.9	2.0 ± 1.2	29.6 ± 3.0	
	2回目	4/6 ( 66.7)	4/4 (100.0)	0/4 ( 0.0)	3.5 ± 0.6	1.0 ± 0.0	28.0 ± 2.0	3.0 ± 2.5	32.0 ± 3.5	
	3回目	5/6 ( 83.3)	5/5 (100.0)	0/5 ( 0.0)	3.8 ± 0.4	0.8 ± 0.2	28.8 ± 1.2	0.5 ± 0.3	30.2 ± 1.4	

<sup>1</sup>ペントバルビタールナトリウム；ペントバルビタール。  
<sup>2</sup>麻酔薬投与後，3週間の間隔を空けて再び麻酔薬を投与した。  
<sup>3</sup>正向反射を消失した個体と定義した。  
<sup>4</sup>供試動物数を母数として算出した。  
<sup>5</sup>麻酔有効個体数を母数として算出した。  
<sup>6</sup>正向反射を回復した個体と定義した。  
<sup>7</sup>心拍停止を確認した個体と定義した。  
<sup>8</sup>平均値 ± 標準誤差で示した。  
<sup>a, b</sup>同じ列内にある異なる添え文字は有意差あり (P<0.05)。



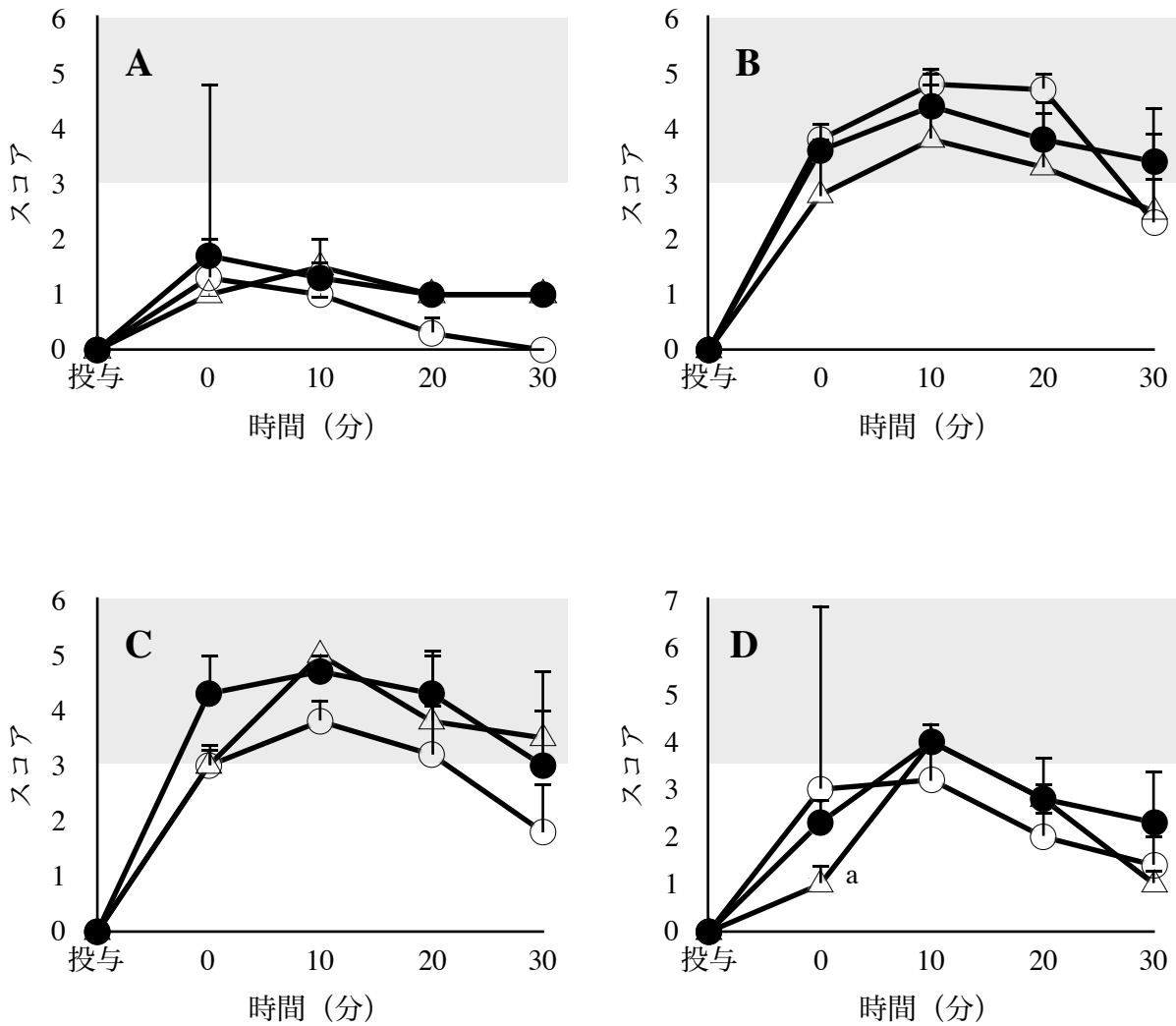


図17 麻酔薬の反復投与が雌ホンダハタネズミの麻酔スコアに及ぼす影響

ペントバルビタールナトリウム (A) , M/M/B: 0.3/4/5 (B) , M/M/B: 0.23/3/3. (C) , M/M/B: 0.15/2/2.5 (D) をそれぞれ投与した. 麻酔スコアは麻酔薬投与时から測定した. 記号の表記は以下に従う; 1回目 (○) , 2回目 (●) , および3回目 (△) . 棒グラフの表記は平均値 ± 標準誤差で示している. . グレースケールは効果的な外科麻酔領域を示す. a: 1回目の投与と比較して有意差あり (P<0.05) .

## 呼吸回数

ペントバルビタールナトリウム区において、記録時間0から10分の間で1回目および2回目投与時に著しく低下したが、投与回数間に有意差はみられなかった（図18A）。

M/M/B: 0.3/4/5区（図18B）、0.23/3/3.75区（図18C）および0.15/2/2.5区（図18D）において、いずれの投与回数間も有意差はみられなかった。

## 体重変化

ペントバルビタールナトリウム区、M/M/B: 0.3/4/5区、0.23/3/3.75区および0.15/2/2.5区のいずれにおいても投与回数間および測定期間で有意な差は認められなかった（表29）。

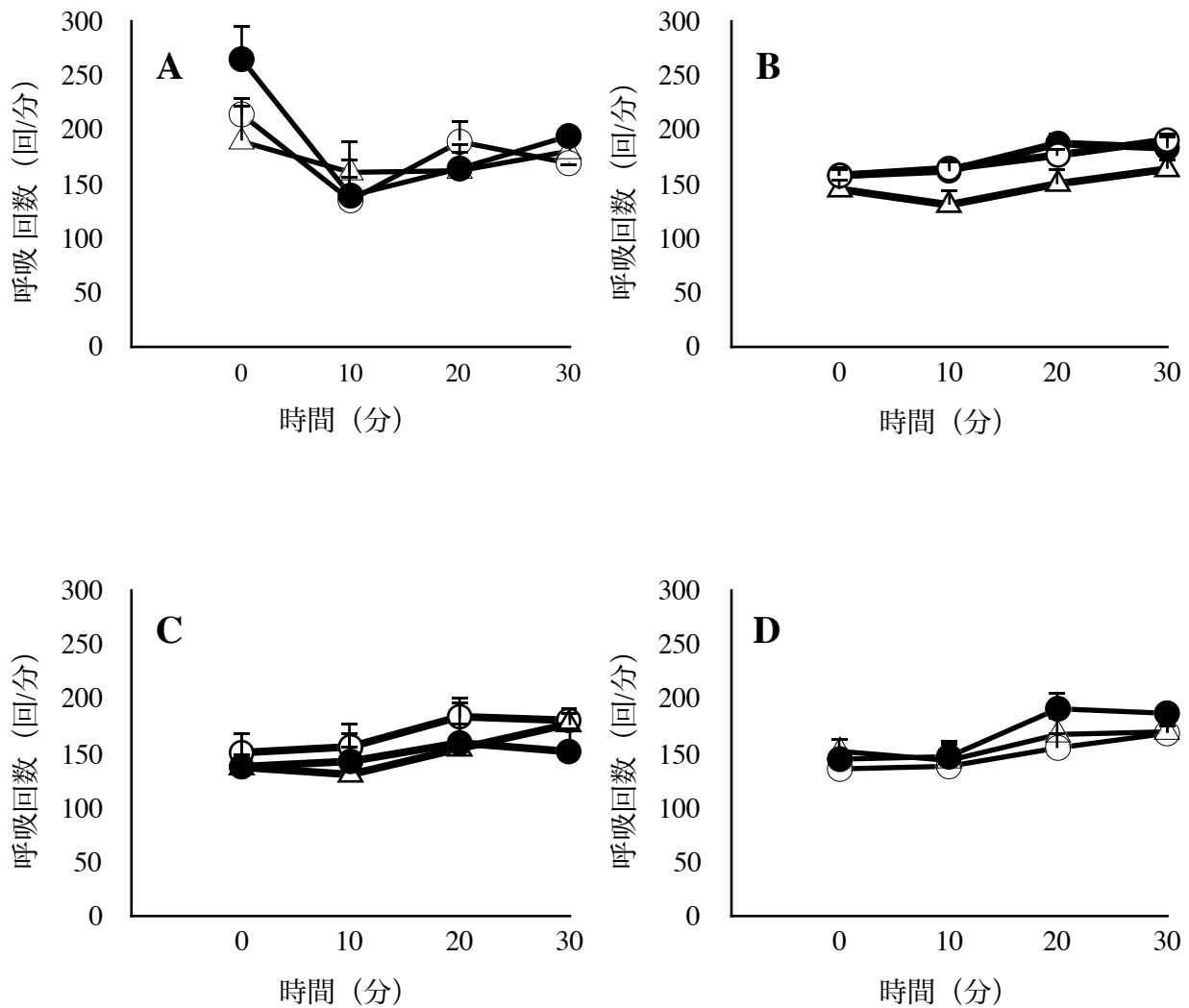


図18 麻酔薬の反復投与が雌ホンダハタネズミの呼吸回数に及ぼす影響  
 ペントバルビタールナトリウム (A) , M/M/B: 0.3/4/5 (B) , M/M/B: 0.23/3/3.75  
 (C) , M/M/B: 0.15/2/2.5 (D) をそれぞれ投与した。麻酔スコアは麻酔薬投与時  
 から測定した。記号の表記は以下に従う；1回目 (○) , 2回目 (●) , および3  
 回目 (△) 。棒グラフの表記は平均値 ± 標準誤差で示している。

表29 麻酔薬の反復投与が雌ホルドハタネズミの体重変化に及ぼす影響

麻酔薬	投与 供試		体重(g) <sup>3</sup>						
	回数	動物数 <sup>2</sup>	Day 0 (投与日)	Day 1	Day 3	Day 5	Day 7	Day 14	
ペントバルビタール <sup>1</sup>	1回目	3	30.16 ± 3.49	29.66 ± 3.96	29.61 ± 3.82	28.24 ± 3.02	28.19 ± 2.87	29.27 ± 3.25	
	2回目	3	29.91 ± 3.12	29.36 ± 3.02	28.99 ± 3.15	30.14 ± 3.27	29.95 ± 3.70	29.61 ± 2.87	
	3回目	2	31.84 ± 4.26	32.36 ± 5.81	32.63 ± 5.63	32.89 ± 5.44	33.47 ± 5.27	34.29 ± 6.43	
M/M/B: 0.3/4/5	1回目	6	29.48 ± 1.54	30.25 ± 1.16	29.51 ± 0.92	29.84 ± 1.08	29.61 ± 0.99	30.34 ± 0.83	
	2回目	5	30.32 ± 1.36	30.01 ± 1.56	30.55 ± 1.56	30.36 ± 1.31	30.47 ± 1.51	31.07 ± 1.55	
	3回目	4	31.12 ± 1.32	30.25 ± 1.18	30.35 ± 1.29	30.67 ± 1.13	30.77 ± 1.06	30.27 ± 1.05	
M/M/B: 0.23/3/3.75	1回目	6	29.33 ± 1.40	28.84 ± 1.55	28.57 ± 1.56	28.83 ± 1.51	29.00 ± 1.35	29.13 ± 1.32	
	2回目	5	29.33 ± 1.40	28.84 ± 1.55	28.57 ± 1.56	28.83 ± 1.51	29.00 ± 1.35	29.13 ± 1.32	
	3回目	5	29.65 ± 1.16	29.25 ± 1.11	29.50 ± 1.03	29.50 ± 1.05	30.14 ± 0.82	29.82 ± 1.16	
M/M/B: 0.15/2/2.5	1回目	6	27.11 ± 2.62	27.99 ± 2.78	26.23 ± 1.95	28.09 ± 2.72	27.98 ± 2.52	28.93 ± 2.83	
	2回目	6	29.28 ± 3.26	28.55 ± 3.25	29.03 ± 3.23	28.89 ± 3.20	29.41 ± 3.26	29.51 ± 3.11	
	3回目	6	31.83 ± 3.18	31.21 ± 3.04	31.26 ± 2.81	31.15 ± 2.56	31.19 ± 2.70	30.78 ± 2.77	

<sup>1</sup>ペントバルビタールナトリウム；ペントバルビタール。

<sup>2</sup>麻酔効果の有無に関わらず，麻酔薬を投与した個体の体重を測定した。

<sup>3</sup>平均値 ± 標準誤差で示した。

## 考察

本研究では、一頭体において複数回の使用を想定し、麻酔薬の反復投与が雌個体に及ぼす影響を検討した。本研究室での長年の研究結果および本章第2節より、ホンドハタネズミにおけるペントバルビタールナトリウム投与濃度は、マウスでの60 mg/kgよりも低い40 mg/kgであるにもかかわらず、死亡割合が高いことが問題となっていた。このため、個体生存に大きく影響されず、不動化できるペントバルビタールナトリウム投与濃度を検討してきた（未表示のデータ）。この結果、30 mg/kgが有効であることが示され、第2および4章の実験にも使用した。第2章第3節よりホンドハタネズミにおける非外科的な人工授精、第4章第2節よりペントバルビタールナトリウムを用いたホンドハタネズミの非外科的胚移植にそれぞれ成功しており、非外科的手法を最大限に生かす個体の反復利用の可能性が示唆された。一方、M/M/Bにおいても前節の結果よりすべての個体の生存が確認されたため、ホンドハタネズミにもマウスと同様に安全で効果的な麻酔薬であることが示されたことから、M/M/Bについても3回の反復投与実験を計画した。

ホンドハタネズミの妊娠期間は21日（3週間）であり、分娩後すぐに妊娠できることから投与間隔を、投与日から3～4週間の間隔を経て再投与することとした。その結果、2および3回目以降において、いずれの麻酔薬を投与しても十分な不動化時間を有することが示され、体重の著しい変化も認められなかった。しかしながら、M/M/B区においても、若干ではあるが死亡個体が認められたことから、投与前の動物の状態（行動や体重の低下など）を考慮すべきであったと考えられた。ペントバルビタールナトリウム区においては死亡匹数が他の区よりも高かったことから、前節と同様に反復投与にも適さない麻酔薬であることが明らかとなった。M/M/B: 0.3/4/5も前節と同様に拮抗剤投与で覚醒するが、呼吸リズムの乱れおよび数分間にわたる無呼吸状態が続く個体が多く観察された（未表示のデータ）。このことから、M/M/B: 0.3/4/5はホンドハタネズミにおける至適濃度にはならないことが推測された。さらに、M/M/B: 0.23/3/3.75

を投与して非外科的人工授精あるいは非外科的胚移植し、いずれにおいても2回の反復分娩に成功している（未表示データ）。この結果からも、ホンドハタネズミへ投与するM/M/Bは0.23/3/3.75が至適濃度であり、調べた限りではM/M/Bによってレシピエントに生じる著しい悪影響（例えば、高い死亡率や高度の障害）は認められなかった。

本研究では、雌ホンドハタネズミにおける非外科的胚移植時のレシピエントの複数回利用を想定し、麻酔薬の反復投与が個体に与える影響を検討した結果、複数回投与においても、M/M/B（0.23/3/3.75）は安全で効果的な麻酔薬であることが明らかとなった。また、M/M/Bは非外科操作を行うために十分な麻酔時間を有していた。さらに、非外科操作の時間や内容によって麻酔薬濃度を選択できることが示唆された。

## 第6章 ホンドハタネズミにおける体外受精，体外発生および体外受精由来産仔の作出

### 第1節 緒言

Chang (1951) とAustin (1951) が，生理的および機能的な精子変化がなければ卵母細胞に侵入できないことを発見して以来，体外受精の研究は精子の受精能獲得と表裏一体になって進められてきた。組成が定義されており，様々な分析に適している合成培地による受精能獲得の研究は，主にげっ歯類で進められてきた。1963年に Yanagimachi and Changはハムスターにおいて，精巣上体精子の受精能獲得の誘起およびその精子を用いた体外受精に初めて成功した。その後，排卵卵子を用いた体外受精-胚移植による妊娠あるいは産仔が，マウス，ラットおよびウサギにおいて報告された (Pavlok, 1967; Toyoda and Chang, 1974; Bedford and Chang, 1962)。

生殖補助技術の中樞を担う体外受精の利点として，一度に多数の同調した胚が得られ，自然交配が困難な系統においても安定して胚を得られることから，凍結精子由来産仔を作出するための有効な手段の一つである。一方，体外受精には多くの供試動物，精子および体内成熟卵母細胞を必要とするほか，作出した受精卵を偽妊娠した雌動物へ外科的に移植しなければならず，十分な経験と高度な技術も要求される (Sato et al., 2002)。

プレーリーハタネズミの体外受精も検討されており，新鮮あるいは凍結-融解精子を用いた体外受精法の確立に成功している (Horie et al., 2015)。またホンドハタネズミの体外受精も検討され，新鮮精子での体外受精法の確立および新鮮精子由来胚からの正常産仔作出に成功している (Wakayama et al., 1996)。一方，当時はまだホンドハタネズミ精子の凍結保存法は開発されておらず，ホンドハタネズミの凍結-融解精子からの産仔作出は報告されていない。

第2章第3節の人工授精において，ホンドハタネズミの凍結-融解精子由来産仔の作出に成功していることから，体外受精においてもホンドハタネズミの凍結-融解精子を十

分に利用できると考えられる。本種において信頼ある体外受精法が確立できれば、安定-効率的な産仔作出だけでなく、ノックイン・アウト動物、キメラ動物、クローン動物、胚性幹細胞（embryonic stem cell: ES細胞）あるいは人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell: iPS細胞）の作出にも貢献でき、さらなるハタネズミ属における研究への道が広がる。さらに、他の野生ハタネズミの個体復元にも大いに期待がもてる

本章ではWakayamaら (1996)の方法を基礎として、凍結-融解精子を用いた体外受精条件の検討および卵管内移植による産仔作出を試みた。



## 第2節 新鮮および凍結-融解精子を用いた体外受精

本節では、凍結-融解精子に適した体外受精条件を検討するために、まず新鮮精子を用いてhypotaurine添加時期（前培養あるいは媒精時）が体外受精率に及ぼす影響を検討した。次に、新鮮精子で得られた最適体外受精条件を用いて、凍結-融解精子を用いた体外受精の受精率を検討した。

### 材料および方法

#### 供試動物

第2章第2節と同様に飼育した。本実験では、20～23日齢（2.9～3.3週齢）の雌ホンダハタネズミ13匹から体内成熟卵母細胞を採取し、15～73週齢雄ホンダハタネズミ8匹から採精して体外受精した。

#### 培地

体内成熟卵母細胞の採取には、H-CZB（表1）を用いた。前培養および媒精には、5 mg/mlのBSA（SIGMA）を添加したHTF（表1）を用いた。BSA無添加HTFにhypotaurine（SIGMA）を100 mM濃度で溶解してストックを作製した。使用前、0（対照区）あるいは1 mMのhypotaurineをHTFに添加し、インキュベータ内で一晩ガス平衡して実験に用いた。

#### ホンダハタネズミ体内成熟卵母細胞の準備

第3章第2節と同様の方法で過剰排卵を誘起した。第2章第2節と同様の方法で卵母細胞-卵丘細胞複合体を採取し、HTF中で洗浄後、380  $\mu$ lのHTFが入った4穴ディッシュ内で実験に用いるまでインキュベータ内で保持した。

## 精子の採取，凍結，融解および精子処理

Wakayamaら（1996）の方法に修正を加えた。第2章第2節と同様の方法で精子を採取および凍結した。新鮮精子区には，凍結に使用しなかった精子懸濁液を用い，血球計算盤で精子濃度を計測して $2 \times 10^7$ 個/mlになるようにHTFで希釈後，インキュベータ内で2時間前培養した。

## 体外受精（媒精）

精子前培養後，静かに攪拌した精子懸濁液20  $\mu$ lを卵母細胞を含んでいる媒精培地に添加し，6時間媒精した。媒精時の最終精子濃度が $1 \times 10^6$ 個/mlとなるように精子懸濁液を添加した。

## 受精検査

第2章第2節と同様の方法で行った。

## 実験計画

実験I Hypotaurine添加時期がホンドハタネズミの新鮮精子を用いた体外受精に及ぼす影響

以下の3つの組合せについて比較した。

1) 媒精時添加：採精から前培養終了までをhypotaurine無添加とし，媒精培地に1 mM hypotaurine添加して体外受精した。

2) 前培養時添加：採精から前培養までをhypotaurine添加HTFで処理し，精子濃度を血球計算盤で計測して $2 \times 10^7$ 個/mlになるようにhypotaurine添加HTFで希釈した。この時， $2 \times 10^7$ 個/mlの精子懸濁液を1.5 mlマイクロチューブに1 ml作製した。前培養終了後に精子懸濁液を等量に分注（500 $\mu$ lを2本作製）した。Hypotaurine除去のために，室温， $400 \times g$ ，10分間の条件で遠心分離した。遠心分離後，ピペットチップを用いて400  $\mu$ lの

上澄みを静かに除去した。400  $\mu$ lのHTFを加えてペレット状に沈殿した精子を静かに再懸濁させ、同条件でもう一度遠心処理および操作し、媒精培地に精子懸濁液を添加して体外受精した（hypotaurineの最終推定濃度：0.01 mM）。

3) 前培養と媒精時に添加：2) のもう一方のhypotaurineを含むマイクロチューブの精子懸濁液を媒精培地に添加して体外受精した。

#### 実験II 凍結-融解精子を用いた体外受精の正常受精率

実験Iで得られた最適条件を用いて体外受精した。第2章第2節と同様の方法で凍結精子を融解した。次に、実験Iと同様の方法で精子処理および媒精した。

#### 統計処理

処理間（卵母細胞数の割合（%））の検定には $\chi^2$ 検定を用い、危険率5%未満の場合に差が有意であると判定した。

## 結果

### 実験I Hypotaurine添加時期がホンドハタネズミの新鮮精子を用いた体外受精に及ぼす影響

前培養および媒精時にhypotaurineを添加しなかった区（対照区）の正常受精率は、70.6%（36/51）であった（表30）。一方、媒精時、前培養時あるいは両方にhypotaurineを添加した区の正常受精率は、それぞれ83.6%（61/73）、86.0%（43/50）および85.7%（48/56）となり、対照区よりも高い正常受精率を示す傾向がみられた。異常受精率は、それぞれ1.0%（1/51）、16.4%（12/73）、14.0%（7/50）および14.3%（8/56）となり、対照区と比較した場合、各実験での異常受精率は有意に上昇した（ $P < 0.05$ ）。また対照区では、第II減数分裂中期（MII）の割合が27.5%（14/51）であったが、他3区においては0%であった。

### 実験II 凍結-融解精子を用いた体外受精の正常受精率

実験Iの結果より、全培養（前培養および媒精）時にhypotaurineを添加する条件下で、凍結-融解精子を用いて体外受精した。この結果、正常受精率は97.1%（33/33）と高い割合を示した（表31）。

表30 Hypotaurine添加時期がホンドハタネズミの新鮮精子を用いた体外受精に及ぼす影響

Hypotaurine (1 mM)		検査			
前培養	媒精 <sup>1</sup>	卵母細胞数 <sup>2</sup>	正常受精 <sup>3,4</sup>	異常受精 <sup>3,5</sup>	MII (%) <sup>3,6</sup>
-	-	51	36 (70.6)	1 (1.9) <sup>a</sup>	14 (27.5)
-	+	73	61 (83.6)	12 (16.4) <sup>b</sup>	0 (0.0)
+	-	50	43 (86.0)	7 (14.0) <sup>b</sup>	0 (0.0)
+	+	56	48 (85.7)	8 (14.3) <sup>b</sup>	0 (0.0)

<sup>1</sup> 前培養+および媒精-区の最終推定hypotaurine濃度は、0.01 mM.

<sup>2</sup> 検査卵母細胞では、媒精6時間後に単為発生、退行、断片化および変性を除いた.

<sup>3</sup> 検査卵母細胞数を母数として算出した.

<sup>4</sup> 正常受精には、2極体1雌前核1雄前核および2極体1雌前核1膨化精子頭部を含む.

<sup>5</sup> 異常受精には、多精子受精および1極体2雌前核1雄前核を含む.

<sup>6</sup> MII：第II減数分裂中期.

<sup>a,b</sup>同じ列内における異なる添え文字は有意差あり (P<0.05) .

表31 ホンドハタネズミの凍結-融解精子を用いた体外受精における  
hypotaurineの影響<sup>1</sup>

処理	検査卵子数 <sup>3</sup>	正常受精 <sup>4,5</sup>	MII <sup>5,6</sup>
対照区 <sup>2</sup>	10	0 ( 0.0)	10 (100.0)
凍結-融解	34	33 (97.1)	1 ( 2.9)

<sup>1</sup> 全培養期間（前培養および媒精時）に1 mM hypotaurineを添加.

<sup>2</sup> 受精前の卵母細胞の核相.

<sup>3</sup> 検査卵子数は、媒精後に単為発生および断片化を除いた数値.

<sup>4</sup> 正常受精は、2極体1雌前核1雄前核と判断した.

<sup>5</sup> 検査卵子数を母数として算出した.

<sup>6</sup> MII：第II減数分裂中期.

## 考察

本実験において、前培養あるいは媒精時に新鮮精子をhypotaurine処理することにより、高い正常受精率を得た。ブタあるいはハムスターの体外受精ではhypotaurine処理により、受精率が向上することが知られており（ブタ: Suzuki et al., 2007, ハムスター: Barnett and Bavister, 1992），ホンドハタネズミにおいては新鮮精子のhypotaurine処理によって精子運動性が向上することが報告されている（Wakayama et al., 1995, 1996）。しかし、hypotaurineをどの時期に添加すれば最も有効であるかは報告されていない。本実験では新鮮精子におけるhypotaurineの添加時期（精子前培養時と媒精時）について検討した。

Hypotaurine無添加区の正常受精率は70.6%だったのに対し、hypotaurine添加区では83.6～86.0%と正常受精率が上昇した。この実験結果は、Wakayamaら（1996）の報告（hypotaurine無添加区: 28.7%, hypotaurine添加区: 40.5%～80.0%）と類似していた。Hypotaurine添加区で正常受精率が上昇した要因として、人工授精時と同様にhypotaurineが精子運動性を向上させ、早期に重炭酸イオンを補助因子としてカルシウムイオンを上昇させた結果、ハイパーアクチベーションを誘起して多くの卵母細胞が正常に受精したと考えられる。これらのことから、添加時期に関わらず、新鮮精子をhypotaurine処理することで、高い受精率を得られることが示された。また、凍結-融解精子を用いて体外受精した場合、hypotaurine処理した新鮮精子と同程度に高い正常受精率を示したことから、凍結-融解精子を用いた体外受精においてもhypotaurine処理は有効であることが示唆された。

本実験の結果より、新鮮および凍結-融解精子へのhypotaurine処理は、ホンドハタネズミの体外受精時の正常受精率を向上させることが明らかになった。

### 第3節 体外受精胚の発生培地の検討および体外受精胚由来産仔の作出

前節の結果において、凍結-融解精子由来体外受精卵を効率良く得られた。本節では、これらの体外受精卵の体外発生および産仔作出を試みた。

#### 材料および方法

##### 供試動物

第2章第2節と同様に飼育した。本実験では、19～22日齢（2.7～3.1週齢）の雌ホンドハタネズミ12匹から体内成熟卵母細胞を採取し、9～55週齢の雌ホンドハタネズミ14匹をレシピエントおよび13～42週齢雄ホンドハタネズミ9匹から精子を採取した。また、偽妊娠を促すための精管結紮雄を9～92週齢の繁殖能が確認された雄ホンドハタネズミ10匹から作製した。

##### 精子の採取、凍結、融解および精子処理

第2章第2節と同様に精子を採取および凍結した。また、第6章第2節と同様の方法で融解および精子処理した。

##### ホンドハタネズミ卵母細胞の準備

第3章第2節と同様の方法で卵母細胞を採取した。

##### 体外受精

第6章第2節と同様の方法で体外受精した。

##### 受精検査

媒精6時間後、実体顕微鏡下で第二極体および2個の前核が確認された卵母細胞を受精卵と判断し、胚移植に用いた。



## 体外培養

体外発生培地にはHEPES-Naを添加しないCZB（表1）に4 mg/mlのBSA (SIGMA)を添加して使用した。また、MEMおよびBME無添加のKSOM（表16）に1 mg/mlのBSAを添加し、HTFには5 mg/mlのBSA（SIGMA）を添加したものをを用いた。EDTA添加実験では、BSA無添加HTFを用いて1M濃度のEDTA（ナカライテスク）ストックを作製し、使用前に、0（対照区）、0.01あるいは0.1 mM濃度となるようにEDTAストックをHTFに添加した。さらに、mHECM-1（表16）を用いた。すべての培地をインキュベータ内で一晩ガス平衡して実験に用いた。第4章第2節と同様の方法で受精卵を培養した。

## 精管結紮雄の作製

第2章第3節と同様の方法で精管結紮雄を作製した。

## 卵管内移植

Wakayamaら（1996）の方法に修正を加えたスケジュール（図19）に従って胚移植した。媒精開始後、1匹の雌ホンダハタネズミと1匹の精管結紮した雄ホンダハタネズミを同居させ（12:00～13:00）、交尾確認した雌を移植に使用した。同日17:00～20:00に受胎ハタネズミに0.9%生理食塩水で10倍希釈した10%ペントバルビタールナトリウムを40 mg/kgの用量で腹腔内投与し、腰椎背部の皮毛をバリカンを用いて術野の約3倍の面積を剃った後、0.1%ヒビテン液を含む脱脂綿で術野を消毒した。ハタネズミの頭が右になるように実体顕微鏡ステージ上に横向きに寝かせ、最後肋骨から約1 cm尾側の皮膚を縦に約1 cm、筋層を約0.5 cm切開した。切開部から卵巣および卵管を取り出し、卵管膨大部が見えるようにクレンメで脂肪を掴んで固定した。次に、実体顕微鏡下で卵管膨大部を確認後、卵管膨大部と切開部位が一直線になるように綿棒あるいはマイクロピンセット（マイクロ無鉤ピンセット直型；夏目製作所，東京，日本）で卵管を伸ばし、卵管采側（2くびれ目）をマイクロバサミ（マイクロ剪刀反型；夏目製作所）により約1/3切開した。切開部から胚と少量のH-CZB液を充填した滅菌キャピラリー

	-2日	-0.5日	0日	0.5日	7日	14日	21日
体外受精由来胚の 作製	卵母 細胞	eCG投与 19:00	採卵 9:00	前核期胚			
	精子		採精 7:30~9:30	媒精 9:30~15:30			
偽妊娠雌の作製				精管結紮雄と交配 12:00~13:00	卵管内移植 17:00~20:00	体重測定	出産予定

図19 体外受精由来胚の移植スケジュール

を挿入して先端が膨大部に到達するまで押し進め、キャピラリー先端から気泡が排出されるまで静かに胚を排出した。各卵管に9～10個の胚を移植し、両卵管に移植した受精卵総数は18～20個であった。また、キャピラリー内の気泡2個が卵管膨大部に放出されたことにより、胚排出完了とみなした。胚排出後、卵管を切開部から体内に戻して筋層を縫合糸で1針縫合し、皮膚をクリップで固定した。縫合後、0.9%生理食塩水で10倍希釈したレペタンを0.05 mg/kgの用量で筋注投与した。覚醒確認までキムタオルに包んで、加温板上のケージ内で保温した。動物がキムタオルから出てきた場合に覚醒したとみなし、ケージ内にて通常飼育した。偽妊娠21～21.5日後に産仔数を記録し、出産2日目（出産日を0日目とする）に産仔重量を調べるとともに雌雄判別した。また、偽妊娠14日後までに体重増加が見られない場合、過麻酔により安楽死させて子宮内の着床痕を確認した。

#### 統計処理

第4章第2節と同様に統計処理した。

## 結果

種々の培地を用いたホンドハタネズミ新鮮精子由来体外受精卵の体外発生

マウスで広く使用されている培地 (HTF, CZB および KSOM) を用いてホンドハタネズミ体外受精由来胚の培養を試みた (表32)。媒精24時間後、2細胞期胚への分割を生じた培地はHTF (25.5%)、CZB (13.6%) およびKSOM (3.2%) であり、HTFで最も高い値を示した ( $P>0.05$ )。媒精96時間後、すべての培地においてほとんどの胚が発生を停止していた。

異なるEDTA濃度 (EDTA-HTF) がホンドハタネズミ体外受精卵の体外発生に及ぼす影響

2細胞期胚への分割率が最も高かったHTFを用い、マウス2 cell blockを解除できる重金属キレート剤EDTAを添加して体外発生を試みた (表33)。EDTAを0, 0.01あるいは0.1 mMで添加したところ、媒精24時間後のすべての区で高い分割率を示した。一方、媒精96時間後では、EDTA添加濃度に依存して2細胞期以降に発生する傾向がみられたが、胚盤胞には発生しなかった。

ホンドハタネズミ体外受精由来胚における発生培地の比較

第4章第2節において前期2細胞期胚を胚盤胞まで発生させられたmHECM-1を用い、ハタネズミ体外受精由来胚の培養を試みた (表34)。媒精24時間後に、mHECM-1では88.5%の胚が2細胞期胚に発生し、媒精96時間後では、桑実胚 (3.8%)、あるいは胚盤胞 (7.7%) に発生した。

表32 種々の培地を用いたホンドハタネズミ新鮮精子由来体外受精卵の体外発生

培養時間 (hrs) <sup>1</sup>	培地	各ステージへの発生胚数(%) <sup>3</sup>			
		供試胚数 <sup>2</sup>	2細胞	胚盤胞	その他 <sup>4</sup>
24	HTF	55	14 (25.5)	-	41 (74.5)
	CZB	66	9 (13.6)	-	57 (86.4)
	mKSOM	63	2 ( 3.2)	-	61 (96.8)
96	HTF	55	-	0 (0.0)	55 (100.0)
	CZB	66	-	0 (0.0)	66 (100.0)
	mKSOM	63	-	0 (0.0)	63 (100.0)

<sup>1</sup>媒精後の培養時間を示した。

<sup>2</sup>媒精6時間後に第2極体および前核が確認できたものを供試胚数（退行，断片化および

未受精卵を除いた目視での正常受精数）とした。

<sup>3</sup>媒精24後の供試胚数を母数として算出した。

<sup>4</sup>媒精24時間は変性，断片化および退行を含み，媒精96時間は発生停止，変性，断片化および退行を含む。

表33 異なるEDTA濃度 (EDTA-HTF) がホンドハタネズミ体外受精卵の体外発生に及ぼす影響

培養時間 (hrs) <sup>1</sup>	EDTA		胚ステージ <sup>4</sup>		
	濃度 (mM) <sup>2</sup>	供試胚数 <sup>3</sup>	2細胞	胚盤胞	その他 <sup>5</sup>
24	0	24	21 (87.5)	-	3 (12.5)
	0.01	30	25 (83.3)	-	5 (16.7)
	0.1	39	33 (84.6)	-	15 (38.5)
-----					
96	0	24	-	0 (0.0)	24 (100.0)
	0.01	30	-	0 (0.0)	30 (100.0)
	0.1	39	-	0 (0.0)	39 (100.0)

<sup>1</sup>媒精後の培養時間を示した.

<sup>2</sup>HTFにEDTAを添加した.

<sup>3</sup>媒精6時間後に第2極体および前核が確認できたものを供試胚数 (退行, 断片化および未受精卵を除いた目視での正常受精数) とした.

<sup>4</sup>媒精24供試胚数を母数として算出した.

<sup>5</sup>媒精24時間は変性, 断片化および退行を含み, 媒精96時間は発生停止, 変性, 断片化および退行を含む.

表34 ホンドハタネズミ体外受精由来胚における発生培地の比較：mHECM-1の検討

培養時間 (hrs) <sup>1</sup>	培地	供試胚数 <sup>2</sup>	胚ステージ <sup>3</sup>			
			2細胞	桑実胚	胚盤胞	その他 <sup>4</sup>
24	mHECM-1	26	23 (88.5)	-	-	3 (11.5)
	HTF (対照区)	55	14 (25.5)	-	-	41 (74.5)
96	mHECM-1	26	-	1 (3.8)	2 (7.7)	23 ( 88.5)
	HTF (対照区)	55	-	0 (0.0)	0 (0.0)	55 (100.0)

<sup>1</sup>媒精後の培養時間を示した。

<sup>2</sup>媒精6時間後に第2極体および前核が確認できたものを供試胚数（退行，断片化および未受精卵を除いた目視での

正常受精数）とした。

<sup>3</sup>媒精24時間後の供試胚数を母数として算出した。

<sup>4</sup>媒精24時間は変性，断片化および退行を含み，媒精96時間は発生停止，変性，断片化および退行を含む。

ホンドハタネズミの新鮮あるいは凍結-融解精子由来胚移植後の出産率，産仔生存率，流産率および着床率

凍結-融解精子由来区は，新鮮精子由来胚に比べていずれの値も低下する傾向を示した（表35）。この結果より，新鮮あるいは凍結-融解精子を用いた体外受精-卵管内移植による，産仔作出の可能性が示された。

ホンドハタネズミの新鮮あるいは凍結-融解精子由来産仔の出産数，形態および体重

新鮮および凍結-融解精子由来胚区の出産数は，それぞれ4匹および1匹であり（表36，図20），産仔は生存しており，形態も正常であった。雌雄割合は新鮮精子由来胚区で雌雄各2匹，凍結-融解由来胚区で雄1匹であった。産仔体重について，新鮮精子由来胚区が $3.33 \pm 0.33$  g，凍結-融解由来胚区が3.91 gであった。



表35 ホンドハタネズミの新鮮あるいは凍結-融解精子を用いた体外受精胚移植後の出産率，産仔生存率，  
流産率および着床率

移植胚	レシピエント数		出産率(%) <sup>1</sup>		産仔率(%) <sup>2</sup>		流産率(%) <sup>3</sup>		着床率(%)	
	レシピエント数	レシピエント数	出産動物数	レシピエント数	産仔数	レシピエント数	着床痕数	レシピエント数	着床痕+産仔数	レシピエント数
新鮮精子由来	8	8	2/8 (25.0)	レシピエント数	4/150 (2.7)	レシピエント数	11/150 (7.3)	レシピエント数	15/150 (10.0)	レシピエント数
凍結-融解精子由来	6	6	1/6 (16.7)	レシピエント数	1/109 (0.9)	レシピエント数	0/109 (0.0)	レシピエント数	1/109 (0.9)	レシピエント数

<sup>1</sup>胚移植後21～22日目に出産した個体.

<sup>2</sup>生存以外の産仔は食殺により判定不明.

<sup>3</sup>胚移植14日目に体重増加が認められない場合に観察.

表36 ホンドハタネズミの新鮮あるいは凍結-融解精子を用いた体外受精胚由来の産仔数、  
形態および体重

移植胚	産仔数 <sup>1</sup>		形態 <sup>1</sup>		性別 <sup>2,3</sup>		体重(g) <sup>2,3,4</sup>
	生存		正常		雌	雄	
新鮮精子由来	4		4		2 (50.0)	2 ( 50.0)	3.33±0.33
凍結-融解由来	1		1		0 ( 0.0)	1 (100.0)	3.91

<sup>1</sup> 出産日 (0日目) に測定-観察.

<sup>2</sup> 生存産仔数を母数として算出.

<sup>3</sup> 出産日から2日目に測定.

<sup>4</sup> 平均値 ± 標準誤差.



図20 新鮮精子を用いた体外受精胚の移植によるホンドハタネズミ産仔

## 考察

前節において、新鮮および凍結-融解精子を用いた体外受精由来胚を作出できた。マウスと同様に2細胞期胚での卵管内胚移植のための体外発生を試みた。前培養および媒精に用いたHTF、マウス胚の発生培地であるCZBおよびKSOMを使用した。多くの胚が2細胞期で発生を停止した。この理由として、ホンドハタネズミ胚が培地中のリン酸およびグルコースの存在により、胚発生が抑制されたという第4章第2節の結果と一致する。そこで、リン酸およびグルコースを添加していないmHECM-1を用いて胚発生を試みたが、結果は第4章第2節および他の培地と同様に2細胞期でほとんどの胚が発生を停止していた。プレーリーハタネズミの体内受精由来胚において、ヒト胚の発生培地であるGlobal培地あるいはG-1/G-2培地を用いて前核期胚を発生させ、Global培地で47.5%、G-1/G-2培地で81.0%を胚盤胞に発生させることに成功しており（Horie et al., 2015）、いずれの培地も市販されている。今回使用した培地と組成の違いを直接比較できないが、ハタネズミ胚の発生条件を満たす物質などが含まれているのかもしれない。このGlobal培地およびG-1/G-2培地を使用することで、ホンドハタネズミ胚の体外発生が改善されるかもしれない。

本実験の結果より、2細胞期以降の発生および胚盤胞での移植を望めないため、産仔作出のためのWakayamaら（1996）の方法を基礎として前核期胚での移植を考えた。Wakayamaら（1996）の実験においては、新鮮精子由来胚からの産仔作出に成功しているが、凍結-融解精子由来の産仔作出は未だ報告されていない。本実験において、新鮮精子区では受胎したレシピエントが8例中2例（25.0%）となり、妊娠率はWakayamaら（1996）の報告（20.7%）と類似していたことから、技術的な手技および手法に問題はなかったと考えられる。他に、新鮮精子区において着床率が低かった主な要因として、1) 3週齢で採取した未成熟卵母細胞を用いたこと、2) 体外発生環境が不十分なこと、3) 施術レシピエントへのストレスなどの要因が重なったためと考えられる。1) の原

因として、マウスにおいても若齢の未性成熟個体から採取した体内成熟卵を用い、体外受精および卵管内移植をした場合、受胎率が低くなる傾向がみられるが、その原因は不明である。同様に、ホンドハタネズミにおいても生じたと推察される。第3章第2節より、膣開口後の個体においても卵母細胞を採取できたことから、体外受精および卵管内移植を検討する必要性が示唆された。2) の原因として、M16あるいはmKRBを用いた場合、ホンドハタネズミの体外受精胚は2細胞期に高率で発生するが、これ以降は非常に低率である (Wakayama et al., 1995, 1996)。また、体外受精由来胚の体外発生の結果も同様の結果を示している。このことより、現在は前核期胚を卵管内移植しているが、移植後2細胞期に発生した時点で発生が停止したために着床しなかった、あるいは着床したが流産してしまったかもしれない。また、生殖細胞や胚の体外操作によりDNAメチル化や刷り込み遺伝子の発現異常を生じ (Niemitz and Feinberg, 2004; Lucifero et al., 2004)、胚の発生停止あるいは流産につながったかもしれない。これらのことから、ホンドハタネズミの体外発生培地は現状不十分であり、今後様々な条件について詳細に検討する必要がある。この点を解決して、体外受精胚の体外発生が可能になれば、移植後の産仔作出も大きく期待できる。最後に3) の原因として、長年実験環境下で飼育されてきたにも関わらず、ホンドハタネズミは実験動物のように温順ではなく、人に触られることを極端に嫌う。このため、麻酔を含めた手術時のレシピエントへのストレスがマウス以上に負荷された結果、未着床や流産を生じたかもしれない。

総じて、凍結-融解精子由来胚の移植では、新鮮精子由来胚よりも出産率および着床率は低くなる傾向を示し、着床痕も認められなかった。凍結-融解精子においても新鮮精子と同様な問題点が関わっていると推測された。また、産仔に関する形態は、新鮮あるいは凍結-融解精子区は自然交配区と相違なく、繁殖能も正常に有していた。以上の結果より、新鮮および凍結-融解精子を用いた体外受精由来胚から産仔を作出できたが、より安定した産仔作出のためには、本種における体外受精法のさらなる改善が必須である。

#### 第4節 種々の麻酔薬および胚移植時間が体外受精由来胚の産仔数に及ぼす影響

前節の結果において凍結-融解精子を用いて産仔を作出できたが、その出産率および産仔数は低かった。本節では、凍結-融解精子を用いた体外受精による産仔数向上を目的に、異なる麻酔薬の影響および胚移植時間について検討した。

#### 材料および方法

##### 供試動物

第2章第2節と同様に飼育した。本実験では、19～21日齢（2.7～3週齢）の雌ホンドハタネズミ11匹から30 IUのPMSG-hCG投与、9～40週齢の雌ホンドハタネズミ24匹からPMSG-交尾刺激および5～33週齢の雌ホンドハタネズミ33匹からPMSG-20%PVP-GnRHα投与によりそれぞれ体内成熟卵母細胞を採取した。13～47週齢の雌ホンドハタネズミ36匹をレシピエントとし、15～57週齢雄ホンドハタネズミ14匹から精子を採取した。また、偽妊娠を促すための精管結紮雄を9～92週齢の繁殖能が確認された雄ホンドハタネズミ10匹から作製した。

##### 精子凍結保護剤

第2章第2節と同様に凍結保護剤を作製した。

##### 精子の採取，凍結，融解および精子処理

第2章第2節と同様に精子を採取および凍結し、第6章第2節と同様の方法で融解および精子処理した。

##### ホンドハタネズミ卵母細胞の準備

第3章第2節と同様の方法で卵母細胞を採取した。

## 体外受精

第6章第2節の方法に修正を加えて体外受精した。体外環境にさらされる時間をできる限り短縮するために、媒精時間を6時間から3時間に変更した。

## 受精検査

媒精3時間後、形態の正常な1細胞（前核）期胚を受精卵と判断し、胚移植に用いた。

## 精管結紮雄の作製

第2章第3節に修正を加えて精管結紮雄を作製した。麻酔薬をペントバルビタールナトリウムから三種混合麻酔薬（M/M/B: 0.23/3/3.75）に変更し、術後ブプレノルフィン投与せず、塩酸メドミジンと同じ濃度の拮抗剤（アチパメゾール）を投与した。正向反射を消失した個体のみを使用した。

## 卵管内移植

第6章第3節の方法に修正を加えて移植した移植（図21）。偽妊娠誘起日を採卵前日の夜（過剰排卵誘起処理日と同日）に1匹の雌ホンドハタネズミと1匹の精管結紮した雄ホンドハタネズミを同居させ（9:30～20:30）、交尾確認した雌を移植に使用した。移植時に使用する麻酔薬にはペントバルビタールナトリウムあるいは三種混合麻酔薬を使用した。また、いずれの麻酔薬においても正向反射を消失した個体のみを使用した。三種混合麻酔薬はM/M/B: 0.23/3/3.75を0.01 ml/gとなるように腹腔内投与し、手術後にブプレノルフィンは投与せずにメドミジンの拮抗剤であるアチパメゾールを0.23 mg/kg腹腔内投与した。また、移植胚数を各卵管4～6個に設定し、両卵管に移植した受精卵総数は8～12個とした。

	-2日	-0.5日	0日	0.25日	7.14日	21日
体外受精 由来胚の 作製	GnRHα投与	PMSG投与 20:30	20% PVP-GnRHα投与 19:30~20:30	採卵 7:00~7:30	第二減数 分裂後期~ 前核期胚	
	交尾刺激	PMSG投与 20:30	精管結紮雄と交配 (交尾刺激) 19:30~20:30	採卵 7:00~7:30	第二減数 分裂後期~ 前核期胚	
	hCG投与 (19~21days)	PMSG投与 20:30	hCG投与 19:30~20:30	採卵 7:00~7:30	第二減数 分裂後期~ 前核期胚	
偽妊娠雌 の作製			精管結紮雄と交配 19:30~20:30	前培養 7:00~7:30で15分間	卵管内移植 11:00~12:00	体重測定 出産予定
	精子			媒精 (3hrs) 7:30~10:30		

図21 麻酔薬および胚移植時間を変更した体外受精由来胚の移植スケジュール



## 統計処理

第2章第3節と同様に統計処理した。

## 結果

ペントバルビタールナトリウム区の死亡率（33.3%）はM/M/B区（0.0%）よりも有意に高かった（表37:  $P < 0.05$ ）。M/M/B区の妊娠率（66.7%）はソムノペンチル区（58.3%）よりも高い傾向を示し（ $P > 0.05$ ）、ペントバルビタールナトリウム区の出産率（21.8%）はM/M/B区（16.8%）より高かったが（ $P > 0.05$ ）。流産率および着床率はペントバルビタールナトリウム区で有意に高い値を示した（ $P < 0.05$ ）。

生存産仔率、産仔重量、胎盤重量および性別のいずれの項目において、ペントバルビタールナトリウム区およびM/M/B区間で有意な差はなかった（表38）。

表37 麻酔薬の違いがレシピエントの生死、妊娠率、産仔率、流産率および着床率におよぼす影響

麻酔薬	レシピエント							
	数	生存率 (%) <sup>2</sup>	死亡率 (%) <sup>2</sup>	妊娠率 (%) <sup>3</sup>	移植胚数	産仔率 (%) <sup>4</sup>	流産率 (%) <sup>4</sup>	着床率 (%) <sup>4,5</sup>
ペントバルビタール <sup>1</sup>	18	12 ( 66.7) <sup>a</sup>	6 (33.3) <sup>c</sup>	7 (58.3)	124	27 (21.8)	18 (14.5) <sup>e</sup>	45 (36.3) <sup>g</sup>
M/M/B: 0.23/3/3.75	18	18 (100.0) <sup>b</sup>	0 ( 0.0) <sup>d</sup>	12 (66.7)	202	34 (16.8)	14 ( 6.9) <sup>f</sup>	48 (23.8) <sup>h</sup>

<sup>1</sup>ペントバルビタール；ペントバルビタールナトリウム。

<sup>2</sup>レシピエント数を母数として算出した。

<sup>3</sup>生存個体数を母数として算出した。

<sup>4</sup>移植胚数を母数として算出した。

<sup>5</sup>着床率は産仔数および流産数の積算値とした。

<sup>a-h</sup>同じ列内にある異なる添え文字は有意差あり (P<0.05)。

表38 異なる麻酔薬を用いた胚移植が生存産仔率、産仔重量、胎盤重量および性別に及ぼす影響

麻酔薬	産仔数	生存産仔率 (%) <sup>2</sup>		産仔重量 (g) <sup>3</sup>	胎盤重量 (g) <sup>3</sup>	性別 (%) <sup>4</sup>	
		生存	死亡			雌	雄
ペントバルビタール <sup>1</sup>	27	23 (85.2)	4 (14.8)	3.09 ± 0.13	0.20 ± 0.03	13 (56.5)	10 (43.5)
M/M/B: 0.23/3/3.75	34	29 (85.3)	5 (14.7)	3.19 ± 0.09	0.24 ± 0.02	14 (48.3)	15 (51.7)

<sup>1</sup>ペントバルビタール；ペントバルビタールナトリウム。

<sup>2</sup>産仔数を母数として算出した。

<sup>3</sup>平均値 ± 標準誤差。

<sup>4</sup>生存産仔数を母数として算出した。

## 考察

ペントバルビタールナトリウムの死亡率は第5章2節の結果と同程度の割合であることから、移植時の動物の死亡原因が手技によるものではないことが明らかとなった。また、三種混合麻酔薬（M/M/B）を投与されたレシピエントはすべて生存していたので、外科手術においてもM/M/Bは動物に対して安全な麻酔であると示された。さらに、ペントバルビタールナトリウムの流産率はM/M/Bよりも有意に高かったことから、ペントバルビタールナトリウムは痛みおよび手術ストレスといった悪影響をレシピエントに生じさせることが推測された。産仔の生死率、産仔および胎盤重量、性別の間で差はなく、その後の産仔の繁殖能にも異常はみられなかった。これらの結果は、M/M/Bがペントバルビタールナトリウムの代替麻酔薬となりうることを実証している。

前節の結果と比較して、ペントバルビタールナトリウム区およびM/M/B区の両区において妊娠率が上昇した。この理由として、1) 偽妊娠交配を排卵誘起処理と同じ日にした、2) 胚移植時間を媒精直後（午前中）に変更した、3) 移植胚数を変更したことがあげられる。1) において、変更前は媒精後に偽妊娠を誘起（12:00～13:00）していたが、20% PVP-GnRHa、交尾刺激あるいはhCG処理するのと同時に、偽妊娠誘起（19:30～20:30）するように変更した。2細胞期胚の卵管内胚移植において、レシピエントの体内環境と胚の発生時間の差は0～0.5日、かつ胚の発生時間がレシピエントよりも早く進行していることが条件となる（Whittingham DG, 1968；山内, 2005）。胚を偽妊娠雌の体内環境より早い段階に移植する理由は、着床に適した条件にさらされる前に、発生の進み具合が子宮条件に合わせるための時間を胚に与えるためである。つまり、移植胚がレシピエントの体内環境に合わせて一旦休眠し、体内環境と胚発生ステージが合致したときに休眠を解除して発生再開するということである。理論上、変更前のレシピエントの体内環境と胚の発生時間の差は0.25日であり、変更後は0日である。この点においては問題ないが、十分な偽妊娠交尾を誘起するためには、精管結紮

雄との同居の時間が変更前では短すぎ、偽妊娠誘起が誘起されにくかったかもしれない（変更前の同居時間：5時間，変更後の同居時間：16時間）。

前述の2)において，午前中の胚移植が着床率が良好である（未表示のデータ）。これは暗期に近づくにつれて卵管上皮細胞の繊毛運動が活発になるが，胚移植によってその繊毛運動による胚の移動が妨げられることが原因であると推察されている。変更前は17:00～20:00の暗期前時間帯で移植していたが，変更後は11:00～12:00の間で移植し，胚が体外環境にさらされる時間をできる限り短縮したことで胚発生が適切に進行したかもしれない。

前述3)において，変更前はマウス（ICR）と同数の各卵管に8～10個（合計20個）の胚を移植していた。マウスとハタネズミでは，乳頭数や平均産仔数など異なる点があり，胚移植時に多くの胚を移植すれば多くの産仔数を得られるものでもなく，各動物種に適した胚数があると考えられる。そこでマウスにおける移植胚数設定を参考に，ホンドハタネズミに適した胚移植数を考案した。ICRマウスの場合，ICRマウスの平均産仔数は10匹前後であり，移植にはその2倍の20個の胚を移植している。また，乳頭が10個存在することおよび哺育が良好な系統であることから，仮に移植した20個の胚のすべてが産仔に発生したとしても哺育できる（未表示のデータ）。これをホンドハタネズミに適用した場合，平均産仔数は4匹であり，その2倍の8個の胚を移植することになる。仮にすべての胚が産仔に発生したとしても乳頭数が8個存在するので産仔哺育は可能であると考えた。また，媒精3時間後での胚においては第二極体を放出しているもの，あるいは前核が形成されているものは少なく，未受精卵と区別がつかない。そこで，媒精3時間での受精率を調べたところ，その数値は70%であり（未表示のデータ），必ず受精卵が8個含まれるようにするには理論上13.6個の胚を移植すればよい。前述したように，ホンドハタネズミにおいて8匹を超える産仔を育てることは困難であること，および左右の卵管に移植することを考慮し，本実験では最大12個の胚を移植することに決定した。これら3点について変更した結果，妊娠率，産仔率および着床率が改善された。

本研究の結果から、ホンドハタネズミにおいてM/M/Bは外科手術にも利用でき、ペントバルビタールナトリウムの代替となる麻酔薬であることが実証された。また、移植時間帯を変更することで、前節において低率であったホンドハタネズミの産仔数を上昇させた。

## 第7章 ホンドハタネズミにおける顕微授精および顕微授精由来産仔の作出

### 第1節 緒言

顕微授精は、非運動性精子を人為的に卵細胞質内へ導入できる利点のほか、正常に受精できない様々な異常精子の検査に利用できる。哺乳類における最初の顕微授精は卵細胞質内精子注入法 (ICSI) であり、1976年にUehara and Yanagimachiにより、ゴールデンハムスターにおいて初めての報告がなされたが、産仔作出までには至らなかった。ハムスターでのICSI成功から22年を経て、1988年にウサギ (Hosoi et al.) でICSI由来産仔作出が成功して以来、1990年にウシ (Goto et al.)、1992年にヒト (Palermo et al.) で成功例が報告された。一方、マウスにおけるICSIは、注入後に高頻度で細胞膜の破綻を起こすことから、他動物種より技術開発が遅れていたが、1995年にKimura and Yanagimachiがピエゾ装置をICSIに導入することで、マウスの顕微授精効率を飛躍的に向上させた。一方、多くの動物種で顕微授精が試みられているが、産仔作出に至っている動物種は少ない。げっ歯類において、産仔作出に成功している動物種は、マウス、ラット、ハムスターおよびウサギのみであり、スナネズミおよびモルモットでは産仔作出には至っていない。この理由として、哺乳類の卵母細胞、精子および受精卵は、それぞれ種に固有の生物学的および物理学的性質があるため、顕微授精技術、受精卵の培養および移植技術も各動物種に応じて開発する必要性が生じるためである (毛利と星, 2006)。例えば、ゴールデンハムスターは初期の顕微授精実験に広く用いられたが、精子注入胚が強力な体外発生停止を起こしてしまうため、顕微授精由来産仔を得られたのは2002年になってからである (Yamauchi et al., 2002)。

顕微授精技術の他の利用法として、核移植クローニング、凍結およびフリーズドライ精子の注入 (Kaneko et al., 2007; Kaneko and Serikawa, 2012)、および初めての核移植由来胚性幹細胞の樹立を可能にするなど発生工学研究において、多種多様な利便性をもつ (Yoshida and Perry, 2007)。これらのことから、広範囲な実験利用が期待されてい



るハタネズミ属においても、顕微授精技術の確立は重要である。さらに、ハタネズミ属の顕微授精法が確立できれば、体外受精と同様に、効率的な産仔作出はもちろん、キメラ動物やクローン動物の作出あるいは他のハタネズミ属の個体復元のための基盤技術となる。

第2章2節より、ホンドハタネズミの新鮮および凍結-融解精子ともに十分な卵活性化能を有していることが示されており、顕微授精へのこれら精子の利用は十分可能である。一方、ホンドハタネズミの卵母細胞を用いた顕微授精は今までに試みられていないため、特性を含めて卵母細胞の顕微授精への応用の可否は不明である。本章では、ホンドハタネズミにおいて新鮮および凍結-融解精子を用いた顕微授精方法を検討し、それら受精卵からの産仔作出を試みた。

## 第2節 新鮮あるいは凍結-融解精子を用いた顕微授精および顕微授精由来産仔の作出

本節では、過剰排卵処理より得られたホンドハタネズミの体内成熟卵母細胞に、新鮮あるいは凍結-融解精子を顕微注入して正常に受精するか否かを調べた。さらに、得られた顕微授精由来胚からの産仔作出を試みた。

### 材料および方法

#### 供試動物

第2章第2節と同様に飼育した。本実験では、2.7~40週齢（19~210日齢）の雌ホンドハタネズミ11匹から体内成熟卵母細胞を採取し、10~24週齢の雌ホンドハタネズミ7匹をレシピエントに用い、16~60週齢雄ホンドハタネズミ5匹から精子を採取した。また、偽妊娠を促すための精管結紮雄を9~92週齢の繁殖能が確認された雄ホンドハタネズミ10匹から作製した。

#### 試薬および培地

第2章第2節と同様に試薬および培地を調製した。

#### ホンドハタネズミ体内成熟卵母細胞の準備

第3章第2節と同様の方法で体内成熟卵母細胞を採取した。

#### 精子注入用ピペットの作製

第2章第2節と同様に精子注入用ピペットを作製した。

#### 精子凍結保護剤

第2章第2節と同様に凍結保護剤を作製した。

精子の採取，凍結および融解

第2章第2節と同様に行った。

顕微操作

第2章第2節と同様に顕微操作した。新鮮精子については凍結前に使用したため，各個体について1回のみの実験とした。凍結-融解精子については，各個体について3回以上実験を繰り返した。

受精検査

第2章第2節と同様の方法で行った。また，顕微授精後に，形態の正常な1細胞（前核）期胚を受精卵と判断し，胚移植に用いた。

精管結紮雄の作製

第2章第3節と同様の方法で精管結紮雄を作製した。

卵管内移植

第6章第4節と同様の方法で行った。移植スケジュールを図22に示す。

統計処理

第2章第2節および第2章第3節と同様に統計処理した。

	-2日	-0.5日	0日	0.25日	7, 14日	21日
体外受精 由来胚の 作出	PMSG投与 20:30 卵母 細胞	a) 20% PVP-GnRHα投与	採卵 7:00~7:30	顕微授精 7:30~10:00	第二減数 分裂後期~ 前核期胚 10:00~12:00	
		b) 精管結紮雄と交配 (交尾刺激)	c) hCG投与 19:30~20:30	前培養 7:00~7:30で15分間		
偽妊娠雌 の作製		精管結紮雄と交配 19:30~20:30			卵管内移植 10:00~12:00	出産予定

図22 顕微授精由来胚の移植スケジュール

## 結果

### ホンドハタネズミの新鮮あるいは凍結-融解精子を用いた顕微授精

精子をホンドハタネズミの卵母細胞に注入したところ、新鮮精子区（98.5%）あるいは凍結-融解精子区（96.8%）ともに高率で減数分裂を再開した（表39）。また減数分裂を再開した卵母細胞の多くが、第二極体を放出して雌雄前核を形成した。精子未注入（対照）区において減数分裂を再開した卵母細胞の割合は13.8%であり、減数分裂再開は注入操作ではなく、注入された精子によって誘起されたことが示された。

### ホンドハタネズミの新鮮あるいは凍結-融解精子を用いた顕微授精由来胚移植後の妊娠率、流産率、産仔率および着床率

新鮮あるいは凍結-融解ホンドハタネズミ精子由来顕微授精胚を移植したところ、妊娠率は66.7%あるいは85.7%であり、対照区（凍結-融解精子体外受精胚移植：57.1%）との間に有意差は認められなかった（表40）。凍結-融解精子を用いた顕微授精由来胚区の産仔率は、体外受精区と比較して有意に高い値を示した（34.7% vs 14.5%,  $P<0.05$ ）。新鮮精子を用いた顕微授精由来区の流産率は、体外受精区と比較して有意に低い値を示した（1.8% vs 14.5%）。凍結-融解精子を用いた顕微授精由来胚区の着床率は、体外受精区および新鮮精子由来胚区と比較して有意に高い値を示した（ $P<0.05$ ）。

### ホンドハタネズミの顕微授精由来産仔の体重および雌雄割合

新鮮あるいは凍結-融解精子を用いた顕微授精由来胚区における、産仔の生存と死亡率、産仔重量、胎盤重量および雌雄割合について、体外受精由来胚区と比較して、すべての項目で有意差はみられなかった（表41）。

表39 ホンドハタネズミの新鮮あるいは凍結-融解精子を用いた顕微授精

処理区 <sup>1</sup>	検査				
	卵母細胞数	減数分裂を再開した卵母細胞数 (%) <sup>2</sup>	雌雄前核を形成した卵母細胞数 (%) <sup>2,3</sup>	MII (%) <sup>2,4</sup>	その他 (%) <sup>2,5</sup>
新鮮(n=3)	137	135 (98.5)	125 (91.2)	0 ( 0.0)	12 ( 8.8)
凍結-融解(n=3)	250	242 (96.8)	223 (89.2)	0 ( 0.0)	27 (10.8)
対照	159	22 (13.8)	0 ( 0.0)	137 (86.2)	22 (13.8)

<sup>1</sup> 新鮮は1回, 凍結-融解は3回, 実験を繰り返した. 対照: 精子を注入せずに実験区と同様に顕微操作した.

<sup>2</sup> 検査卵母細胞を母数として算出した.

<sup>3</sup> 正常な核構成 (2極体1雌前核1雄前核) を有していた卵母細胞を含む.

<sup>4</sup> MII: 第II減数分裂中期.

<sup>5</sup> 変性, 断片化, 単為発生および極体欠2雌前核1雄前核を含む.

表40 ホンドハタネズミの凍結-融解精子を用いた顕微授精由来胚移植後の妊娠率，流産率，産仔率および着床率

胚の種類	精子処理	レシピエント数	妊娠率(%)		産仔数		流産率(%)		着床率	
			移植胚数	妊娠匹数 /移植匹数	出産匹数 /移植胚数(%)	着床痕数 /移植胚数(%)	着床痕+生存産仔数 /移植杯数(%)			
顕微授精由来	新鮮	6	57	4/6 (66.7)	14/57 (24.6) <sup>ab</sup>	1/57 ( 1.8) <sup>c</sup>	15/57 (26.3) <sup>e</sup>			
	凍結-融解	7	72	6/7 (85.7)	25/72 (34.7) <sup>a</sup>	6/72 ( 8.3) <sup>cd</sup>	31/72 (43.0) <sup>f</sup>			
体外受精由来 (対照区)	凍結-融解	7	76	4/7 (57.1)	11/76 (14.5) <sup>b</sup>	11/76 (14.5) <sup>d</sup>	22/76 (29.0) <sup>e</sup>			

<sup>1</sup>レシピエント数を母数として算出した。

<sup>2</sup>移植胚数を母数として算出した。

<sup>3</sup>着床率は産仔数および流産数の積算値である。

<sup>a-f</sup>同じ列内にある異なる添え文字は有意差あり (P<0.05)。

表41 ホンドハタネズミの凍結-融解精子を用いた顕微授精由来胚移植後の産仔率，体重および性別

胚の種類	精子処理	生存比率 (%) <sup>1,2</sup>		産仔重量 (g) <sup>3,4</sup>	胎盤重量 (g) <sup>3,4,5</sup>		性別 (%) <sup>3,6</sup>	
		産仔数	生存		死亡	雌	雄	
顕微授精由来	新鮮	14	13 ( 92.9)	1 ( 7.1)	3.22 ± 0.38	0.15 ± 0.01	10 (76.9)	3 (23.1)
	凍結-融解	25	22 ( 88.0)	3 (12.0)	3.01 ± 0.07	0.22 ± 0.01	10 (45.6)	12 (54.5)
体外受精由来(対照区)	凍結-融解	11	11 (100.0)	0 ( 0.0)	3.46 ± 0.15	0.22	6 (54.5)	5 (45.5)

<sup>1</sup>出産日 (0日目) に測定-観察.

<sup>2</sup>産仔数を母数として算出.

<sup>3</sup>出産日から2日目に測定.

<sup>4</sup>平均値±標準誤差.

<sup>5</sup>帝王切開した個体のみ測定.

<sup>6</sup>生存産仔を母数として算出.



## 考察

新鮮あるいは凍結-融解精子を用いた顕微授精において、それぞれ91.2%および89.2%と高い正常受精率を示した。マウスとは異なり、顕微注入した卵母細胞は注入後に退行せず、前核形成期まで正常に発生したことから、ホンドハタネズミの卵母細胞（膜）は物理的衝撃に対する耐性が高いことが明らかとなった。このことから、顕微操作を用いた様々な発生工学に十分利用できることが示唆された。一方、変性および断片化する卵母細胞が8.8~13.8%とやや高い割合を示した。この原因として、ホンドハタネズミの第II減数分裂中期紡錘体は卵細胞質の約半分の位置を占めているが（データ未表示）、マウスのように紡錘体位置の特定が容易でなく、顕微注入時に精子注入ピペットによって紡錘体に損傷を与えている可能性が考えられた。卵母細胞の変性および断片化を低率に抑える方法として、目視で観察できない第II減数分裂中期の紡錘体を蛍光色素などで染色し(Terashima et al., 2011; Yamagata et al., 2012)、可視化して顕微授精することで紡錘体損傷を抑えられるかもしれない。

次に、顕微授精由来受精卵からの正常産仔作出の可否を検討した。体外受精と同率あるいはそれ以上の産仔率および着床率を示した。この理由として、1) 確実に受精した胚を移植できた、2) 作出後、胚を体内環境に素早く戻せたことが良い結果に結びついたと考えられる。

顕微授精は1つの卵母細胞に1つの精子を注入する方法であり、理論上は移植する胚すべてが受精卵であるが、体外受精の場合、移植するすべての胚が正常な受精卵とは必ずしも言い切れない。第6章第4節の考察で述べたように受精卵が最低8個はレシピエントの卵管内に存在できるように移植胚数を算出しているが、凍結-融解精子により受精率（顕微授精：89.2% vs 体外受精：74.6%）に差があることも事実である。この理由から、体外受精由来の産仔率および着床率が低くなった要因の1つだと示唆された。また、体外受精では媒精3時間後に胚を移植する。顕微授精では、顕微授精直後に胚移植をしている。採卵匹数あるいは採卵数により顕微授精の所要時間は異なるが、本研究

では2時間以内にすべての顕微注入を終了しており、体外授精と比較して約1時間早く移植できている。つまり体外環境にさらされる時間がさらに短縮され、体内環境下での胚発生が正常に進行した結果、産仔率および着床率が向上したと考えられる。

本実験において、新鮮および凍結-融解精子を用いた顕微授精により正常受精卵を得られた。さらに、顕微授精由来胚からの産仔作出に成功した。本実験の結果は、ハタネズミ属におけるキメラ動物やクローン動物の作出あるいは他のハタネズミの個体復元のためのさらなる基盤技術となりうることを示している。

## 第8章 総括

本研究では、ホンドハタネズミにおいて安定した産仔作出法を開発することを目的に、種々の生殖補助技術を用いて次のことを論証した；1) 精子凍結保存法にはマウス精子凍結保存法を適用でき、この凍結-融解精子を用いた非外科的人工授精によって自然交配と同等の産仔数を得られた、2) 新規過剰排卵誘起法の開発により全週齢からの採卵が可能となった、3) 前期2細胞期胚を胚盤胞期まで発生させる培地を明らかにし、胚盤胞の非外科的胚移植に成功した、4) 外科的胚移植に最適な麻酔薬および濃度を検討し、安全で有効な麻酔薬を明らかにした、5) 体外受精条件について新たに検討し、得られた胚から産仔を作出した、6) 顕微授精によって得られた胚から産仔を作出した。

1) ホンドハタネズミの精子凍結保存法について、凍結-融解精子と新鮮精子を比較すると、運動性（新鮮：72%，凍結-融解：67%）および生存性（新鮮：87%，凍結-融解：67%）は低下し、DNA損傷レベル（新鮮：2.0%，凍結-融解：2.5%）は上昇したが、手技の対照区であるマウスにおいても同様の傾向を示したことから、本種の精子凍結に成功したことが示された。また、凍結-融解後も卵活性化能を十分に保持していることが示された。チューブおよびストローの2種類の凍結保存容器を用いて凍結-融解後の精子性状を比較したところ、運動性（チューブ：73%，ストロー：74%）と差はみられず、ストローを用いた凍結において生存性（チューブ：67%，ストロー：74%）および正常受精率（チューブ：74.1%，ストロー：82.8%）が上昇する傾向がみられた。この結果は、マウス精子凍結保存法がホンドハタネズミの精子にも応用できることを明らかにしている。次に、人工授精によって産仔を得ることにより、ホンドハタネズミ精子の凍結保存法の最終的な検証とした。新鮮精子を用いて人工授精した場合、自然交配の平均産仔数（4.7匹）と比べても産仔数が高く（6.0～7.4匹）、凍結-融解精子を用いた場合にも産仔を作出できたが（1.5匹）、自然交配よりも低い値であった。

凍結-融解精子由来産仔数を改善するためにhypotaaurine添加，あるいは精子移植時間を変更して人工授精したところ，自然交配の平均産仔数と同程度の産仔数（5.4～7.0頭）を得られた。

2) ホンドハタネズミの新規過剰排卵法について，膣開口前後で比較すると，膣開口前個体では30 IUのPMSG-hCGを投与した場合に最も多い採卵数（22.5個）を示したが，膣開口後個体ではいずれの濃度を投与しても採卵数は少なかった（0 IU：2.5個，7.5 IU：4.8個，30 IU：6.9個）。そこで，膣開口後個体においてより効率的に排卵誘起できる過剰排卵法を検討した。交尾刺激を利用した過剰排卵法では，PMSG-hCG-交尾刺激区（6.8個）よりもPMSG-交尾刺激区（13.9個）の方が採卵数が多かった。PMSG-20% PVP-GnRH $\alpha$ 区においても排卵を誘起できた（5.0～14.5個）。PMSG-交尾刺激区およびPMSG-20% PVP-GnRH $\alpha$ 区（GnRH $\alpha$ の濃度30 mg/kg）の両区において，従来のPMSG-hCG区の約2倍の採卵数が得られた。さらに，20% PVP-GnRH $\alpha$ 区を膣開口前個体に適用したところ，PMSG-hCG区と類似した採卵数が得られた（39.0個）。

3) ホンドハタネズミ体内受精卵の体外発生では，体内受精由来の前核期胚を様々な培地で発生させたが，試したすべての培地においておよそすべての胚が2細胞期で停止した。次に修正hamster embryo culture medium-1（mHECM-1）を用い，体内受精由来の前期2細胞期胚を培養したところ，胚盤胞へ発生させることができた。最後に，キメラあるいはトランスジェニックハタネズミ作製など胚盤胞移植からの産仔作出を想定し，体内受精由来胚盤胞を非外科的に子宮内移植して産仔作出を試みた。三種混合麻酔薬（M/M/B）を用いて非外科的に胚移植したところ，移植後すぐに覚醒を促したM/M/B: 0.15/2/2.5区では産仔作出に至らなかったが，手技を変更したM/M/B: 0.23/3/3.75区では平均3.0匹（産仔率：19.6%）の産仔作出に成功し，ペントバルビタールナトリウムを用いた非外科的胚移植と同程度の産仔数であった（平均2.4匹，産仔率：14.6%）。また非外科的胚移植は，外科的胚移植と比較して流産率が低く（非外科的胚移植：0～

1.2%，外科的胚移植：8.2%），外科的手法の代替法となりえることが示された。

4) ホンドハタネズミに適した麻酔薬の検討においては、ペントバルビタールナトリウムでは雌雄ともに死亡率が高く（雌：44.4%，雄33.3%），麻酔スコアは低い（0.4～1.2）ことが明らかになった。また，三種混合麻酔薬のうち，雌ではM/M/B: 0.3/4/5および0.23/3/3.75，雄ではすべての濃度で有効な外科手術時間および麻酔スコアが得られた。しかしながら，M/M/B: 0.3/4/5の麻酔薬を用いた場合に，呼吸リズムの乱れおよび無呼吸状態が確認されたため，ホンドハタネズミにおける至適濃度はM/M/B:0.23/3/3.75であることが示唆された。次に，麻酔薬の反復投与が雌個体に与える影響を検討したところ，麻酔薬を反復して3回投与しても，十分な非外科的胚移植の時間を得られたとともに，個体に悪い影響を及ぼさないことが明らかとなった。

5) ホンドハタネズミの体外受精では，hypotaurine処理によって添加時期に関係なく，高い正常受精率（83.6～86.0%）が示され（hypotaurine無処理区：70.6%），凍結-融解精子区においてもhypotaurine処理は高率な正常受精をもたらした（97.1%）。次に，体外受精由来胚が正常に発生できる培地を検討したところ，いずれの培地においても2細胞期で発生が停止した。このため，マウスの2 cell blockを解除する重金属キレート剤を様々な濃度で添加したが，その効果はみられなかった。そこで，媒精日夜にレシピエントの卵管内に胚移植し，体外受精卵からの産仔作出を試みた。結果として，新鮮あるいは凍結-融解精子を用いた両区ともに産仔数は少なかったが産仔を作出できた（新鮮：4匹，凍結-融解：1匹）。第5章において，M/M/Bはペントバルビタールナトリウムと比較すると死亡率が低く，覚醒も早いことが示されたことから，ペントバルビタールナトリウムあるいはM/M/Bが産仔作出に及ぼす影響を比較するとともに，胚移植条件を再検討した。その結果，M/M/Bにおいて妊娠率（M/M/B：66.7%，ペントバルビタールナトリウム：58.3%）が高い傾向を示し，流産率（M/M/B：6.9%，ペントバルビタールナトリウム：14.5%）は有意に低かった。さらに移植条件の変更により産仔

数（変更前：0.9%，変更後：16.8～21.8%）が上昇した。

6) ホンドハタネズミの顕微授精において、新鮮および凍結-融解精子区で正常受精卵を得られたことから（新鮮：91.2%，凍結-融解：89.2%），ホンドハタネズミ卵母細胞膜は顕微注入操作に対して高い耐性を示すことが明らかになった。次に，得られた顕微授精由来胚からの個体作出を試みたところ，新鮮および凍結-融解精子区で14匹および25匹（産仔率：24.6%，34.7%）の産仔を得ることに成功した。体外受精由来胚区と比較して産仔率（体外受精由来胚区：14.5%）は高い傾向を示し，流産率（顕微授精由来胚区：1.8%，8.3%，体外受精由来胚区：14.5%）は低い傾向を示した。

以上の結果から，数々の生殖補助技術を用いたホンドハタネズミの産仔作出において，精子凍結保存法にはマウス精子凍結保存法を適用でき，この凍結-融解精子を用いた非外科的人工授精により，自然交配に近い産仔数を得られることが明らかになった。次に，新規過剰排卵誘起法の検討により検査したすべての週齢から採卵が可能となった。さらに，前期2細胞期胚を胚盤胞期まで発生させる培地を明らかにし，胚盤胞の非外科的胚移植に成功した。一方で，外科的移植時の最適麻酔薬およびその濃度を検討し，安全で有効な麻酔薬を明らかにした。最後に，体外受精および顕微授精においても体外作出胚が得られ，産仔を作出できることを示した。

これらの成果は，ホンドハタネズミにとどまらず他のハタネズミ属において，将来的にこれらの生殖補助技術を用いた効率的な動物供給，その利用および種の保存に大きく貢献できる可能性を強く示している。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、本当に多くの方々からの絶大なるご指導ならびにご協力いただきました。ここに記して心から謝意を表します。

本研究の遂行ならびに本論文作成あたり、始終暖かいご指導と御教示を賜った、日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科教授 牛島 仁 博士に深甚なる敬意を示すとともに、実験および本論文作成についての直接的な御助言ならびに技術をご指導いただいた、日本獣医生命科学大学応用生命科学部准教授 岡田 幸之助 博士に深く感謝いたします。また、研究の考え方から実験の進め方について御教示くださり、非常に多くの刺激を与えてくださった、日本獣医生命科学大学応用生命科学部名誉教授 友金 弘 博士に謝意を表します。

過剰排卵に使用するホルモンについての様々な情報ならびに投与方法について細やかに御指導くださり、また麻酔薬実験の進め方について御教示くださいました、日本獣医生命科学大学応用生命科学部准教授 藤平 篤志 博士、大学院生 山本 将寛 君に心から感謝いたします。

卵管内胚移植および精管結紮雄作成など、外科手術に関わる技術を御指導いただいた、日本獣医生命科学大学獣医学部教授 袴田 陽二 博士に心から感謝いたします。

また、実験の遂行およびあらゆる面でご協力いただいた当研究室の後輩の皆様に感謝します。

最後に、大学院での研究生活を理解し、常に勉学に専念できるように協力してくれた私の家族、私を始終暖かく励ましてくれた友人に心から感謝いたします。

## 引用文献

- Adams CE.** Inhibition of superovulation in the rabbit. *Nature*, 1953; 172(4367): 82.
- Amoss M, Burgus R, Blackwell R, Vale W, Fellows R, Guillemin R.** Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) of ovine origin. *Biochemical and biophysical research communications*, 1971; 44(1): 205–210.
- Aragona BJ, Wang Z.** The prairie vole (*Microtus ochrogaster*): an animal model for behavioral neuroendocrine research on pair bonding. *Institute of Laboratory Animal Resources*, 2004; 45(1): 35–45.
- Aravindan GR, Bjordahl J, Jost LK, Evenson DP.** Susceptibility of human sperm to in situ DNA denaturation is strongly correlated with DNA strand breaks identified by single-cell electrophoresis. *Experimental cell research*, 1997; 236(1): 231–237.
- Armstrong DT, Pfitzner AP, Warnes GM, Ralph MM, Seamark RF.** Endocrine responses of goats after induction of superovulation with PMSG and FSH. *Journal of reproduction and fertility*, 1983; 67(2): 395–401.
- Austin CR.** Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Australian journal of biological sciences*, 1951; 4(4): 581–596.
- Avery TL, Fahning ML, Graham EF.** Investigations associated with the transplantation of bovine ova. II. Superovulation. *Journal of reproduction and fertility*, 1962; 3: 212–217.
- Ballachey BE, Hohenboken WD, Evenson DP.** Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to bull fertility. *Biology of reproduction*, 1987; 36(4): 915–925.
- Barnett DK, Bavister BD.** Hypotaourine requirement for *in vitro* development of golden hamster one-cell embryos into morulae and blastocysts, and production of term offspring from *in vitro*-fertilized ova. *Biology of reproduction*, 1992; 47(2): 297–304.
- Bavister BD, Chen AF, Fu PC.** Catecholamine requirement for hamster sperm motility *in vitro*. *Journal of reproduction and fertility*, 1979; 56(2): 507–513.
- Bavister BD, Mckiernan SH.** Regulation of hamster embryo development *in vitro* by amino acids. In *Bavister BD (ed) "Preimplantation Embryo Development"*, 1993. New York: springer-Verlag, pp 57–72.
- Bavister BD.** Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Human rproduction update*, 1995; 1(2): 91–148. Review.
- Barnett DK, Bavister BD.** Hypotaourine requirement for *in vitro* development of golden hamster one-cell embryos into morula and blastocysts, and production of term offspring from *in vitro* fertilized ova. *Biology of reproduction*, 1992; 47:297–304.



- Bedford JM, Chang MC.** Fertilization of rabbit ova *in vitro*. *Nature*, 1962; 193: 808 – 809.
- Bertelsen MF, Villadsen L.** A comparison of the efficacy and cardiorespiratory effects of four medetomidine-based anaesthetic protocols in the red fox (*Vulpes vulpes*). *Veterinary anaesthesia and analgesia*, 2009; 36(4): 328 – 333.
- Biggers JD, Whittingham DG, Donahue RP.** The pattern of energy metabolism in the mouse oöcyte and zygote. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1967; 58(2): 560 – 567.
- Bin Ali R, van der Ahé F, Braumuller TM, Pritchard C, Krimpenfort P, Berns A, Huijbers IJ.** Improved pregnancy and birth rates with routine application of nonsurgical embryo transfer. *Transgenic research*, 2014; 23(4): 691 – 695.
- Boatman DE.** oviductal modulators of sperm fertilizing ability. In *Fertilization in Mammals* (Bavister BD, Cummins JM, Roldan E, eds), 1990; pp 223 – 238. Serono Symposia USA, Norwell, MA.
- Boatman DE, Bavister BD, Cruz E.** Addition of hypotaaurine can reactivate immotile golden hamster spermatozoa. *Journal of andrology*, 1990; 11(1): 66 – 72.
- Bousfield GR, Dias JA.** Synthesis and secretion of gonadotropins including structure-function correlates. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, 2011; 12(4): 289 – 302.
- Brinster RL.** A method for *in vitro* cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst. *Experimental cell research*, 1963; 32: 205 – 208.
- Brinster RL.** Lactate dehydrogenase activity in the preimplanted mouse embryo. *Biochimica et biophysica acta*, 1965a; 110(2): 439 – 441.
- Brinster RL.** Studies on the development of mouse embryos *in vitro*. I. The effect of osmolarity and hydrogen ion concentration. *The Journal of experimental zoology*, 1965b; 158: 49 – 57.
- Brinster RL.** Studies on the development of mouse embryos *in vitro*. II. The effect of energy source. *The Journal of experimental zoology*, 1965c; 158: 59 – 68.
- Brinster RL.** Studies on the development of mouse embryos *in vitro*. 3. The effect of fixed-nitrogen source. *The Journal of experimental zoology*, 1965d; 158: 69 – 77.
- Brinster RL.** Studies on the development of mouse embryos *in vitro*. IV. Interaction of energy sources. *Journal of reproduction and fertility*, 1965e; 10(2): 227 – 240.
- Brinster RL.** *In vitro* culture of mammalian embryos. *Journal of animal science*, 1968; 27 Suppl 1: 1 – 14.
- Brinster RL.** Uptake and incorporation of amino acids by the preimplantation mouse embryo. *Journal of reproduction and fertility*, 1971; 27(3): 329 – 338.
- Brinster RL, Thomson JL.** Development of eight-cell mouse embryos *in vitro*. *Experimental cell research*, 1966; 42(2): 308 – 315.

- Brinster RL.** Mammalian embryo culture. In *The mammalian oviduct* (ed. E.S.E. Hafez and R. Blandau). University of Chicago Press, Illinois, 1969: pp. 419–444 .
- Burdick HO, Whitney R.** Ovulation induced in mice by single injections of follutein or untreated human pregnancy urine. *American Journal of Physiology*, 1941; 132: 405–410.
- Burdick HO, Watson H, Ciampa V, Ciampa T.** A rapid test for pregnancy gonadotropins on the basis of induced ovulation in mice. *Endocrinology*, 1943; 33: 1–15.
- Chang MC.** Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*, 1951; 168(4277): 697–698.
- Carlson CM, Schneider JR, Pedersen JA, Heisey DM, Johnson CJ.** Experimental infection of meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*) with sheep scrapie. *Canadian journal of veterinary research*, 2015; 79(1): 68–73.
- Carter CS, DeVries AC, Getz LL.** Physiological substrates of mammalian monogamy: the prairie vole model. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 1995; 19(2): 303–314.
- Cattanach BM, Patrick G, Papworth D, Goodhead DT, Hacker T, Cobb L, Whitehill E.** Investigation of lung tumour induction in BALB/cJ mice following paternal X-irradiation. *International journal of radiation biology*, 1995; 67(5): 607–615.
- Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JL, Torres I.** An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro*. *Journal of reproduction and fertility*, 1989; 86(2): 679–688.
- Chasombat J, Sakhong D, Nagai T, Parnpai R, Vongpralub T.** Superstimulation of follicular growth in Thai native heifers by a single administration of follicle stimulating hormone dissolved in polyvinylpyrrolidone. *The Journal of reproduction and development*, 2013; 59(2): 214–218.
- Cole HH.** On the biological properties of mare gonadotrophic hormone. *American Journal of Anatomy*, 1936; 59: 299–331.
- Crabtree HG.** Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *The Biochemical journal*, 1929; 23(3): 536–545.
- Cui L, Zhang Z, Sun F, Duan X, Wang M, Di K, Li X.** Transcervical embryo transfer in mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 2014; 53(3): 228–231.
- D'Alessandro AG, Martemucci G, Colonna MA, Borghese A, Terzano MG, Bellitti A.** Superovulation in ewes by a single injection of pFSH dissolved in polyvinylpyrrolidone (PVP): effects of PVP molecular weight, concentration and schedule of treatment. *Animal reproduction science*, 2001; 65(3-4): 255–264.
- Deneke WA, Day BN.** Effect of superovulation on litter size of swine at 70 days of gestation. *Journal of animal science*, 1973; 36(6): 1137–1138.

- Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A.** Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART. *Advances in urology*, 2012; 2012: Review Article.
- Donaldson ZR, Yang SH, Chan AW, Young LJ.** Production of germline transgenic prairie voles (*Microtus ochrogaster*) using lentiviral vectors. *Biology of reproduction*, 2009; 81(6): 1189–1195.
- Dozortsev D, Rybouchkin A, De Sutter P, Qian C, Dhont M.** Human oocyte activation following intracytoplasmic injection: the role of the sperm cell. *Human reproduction*, 1995; 10(2): 403–407.
- Duguet A, Biyah K, Minshall E, Gomes R, Wang CG, Taoudi-Benchekroun M, Bates JH, Eidelman DH.** Bronchial responsiveness among inbred mouse strains. Role of airway smooth-muscle shortening velocity. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 2000; 161(3 Pt 1): 839–848.
- Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR.** Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*, 1980; 210(4474): 1131–1133.
- Evenson DP, Thompson L, Jost L.** Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. *Theriogenology*, 1994; 41(3): 637–651.
- Fernald RD, White RB.** Gonadotropin-releasing hormone genes: phylogeny, structure, and functions. *Frontiers in neuroendocrinology*, 1999; 20(3): 224–240.
- Flecknell P.** Laboratory Animal Anaesthesia. 3rd edition. London: Academic Press, 2009.
- Gardner DK, Lane M.** Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. *Biology of reproduction*, 1993; 48(2): 377–385.
- Gardner DK, Lane M.** Alleviation of the '2-cell block' and development to the blastocyst of CF1 mouse embryos: role of amino acids, EDTA and physical parameters. *Human reproduction*, 1996; 11(12): 2703–2712.
- Gómez-Fernández J, Gómez-Izquierdo E, Tomás C, González-Bulnes A, Sánchez-Sánchez R, de Mercado E.** Inclusion of seminal plasma in sperm cryopreservation of Iberian pig. *Animal reproduction science*, 2012; 130(1-2): 82–90.
- Goto N, Hashizume R, Sai I.** Litter size and vaginal smear in (*Microtus montebelli*). *Journal of the Mammalogical Society of Japan*, 1977; 7: 75–85.
- Goto N, Hashizume R, Sai I.** Pattern of ovulation in (*Microtus montebelli*). *The Journal of Mammal Society of Japan*, 1978; 7: 181–189.
- Goto K, Kinoshita A, Takuma Y, Ogawa K.** Fertilisation of bovine oocytes by the injection of immobilised, killed spermatozoa. *The veterinary record*, 1990; 127(21): 517–520.

- Green M, Bass S, Spear B.** A device for the simple and rapid transcervical transfer of mouse embryos eliminates the need for surgery and potential post-operative complications. *Biotechniques*. 2009; 47(5): 919-924.
- Hassold T, Chiu D, Yamane JA.** Parental origin of autosomal trisomies. *Annals of human genetics*, 1984; 48(Part 2) : 129–144.
- Haines G, Marples B, Daniel P, Morris I.** DNA damage in human and mouse spermatozoa after *in vitro*-irradiation assessed by the comet assay. *Advances in experimental medicine and biology*, 1998; 444: 79–93.
- Hasegawa A, Yonezawa K, Ohta A, Mochida K, Ogura A.** Optimization of a protocol for cryopreservation of mouse spermatozoa using cryotubes. *The Journal of reproduction and development*, 2012; 58(1): 156–161.
- Heavner JE, Cooper DM.** Pharmacology of analgesics. In: *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals, 2nd ed.* (Fish, R.E., Brown, M.J., Danneman, P.J., and Karas, A.Z. eds.), Academic Press, NY, 2008
- Ho Y, Wigglesworth K, Eppig JJ, Schultz RM.** Preimplantation development of mouse embryos in KSOM: augmentation by amino acids and analysis of gene expression. *Molecular reproduction and development*, 1995; 41(2): 232–238.
- Hosgood G.** Pharmacologic features of butorphanol in dogs and cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1990; 196(1): 135–136.
- Horie K, Hidema S, Hirayama T, Nishimori K.** *In vitro* culture and *in vitro* fertilization techniques for prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Biochemical and biophysical research communications*, 2015; 463(4): 907–911.
- Hosoi Y, Miyake M, Utsumi K, Iritani A.** Development of rabbit oocytes after microinjection of spermatozoa. In *proceedings 11th international congress on animal reproduction and artificial insemination*, 1988; 1 :26–30, 331 (abstract).
- Hu JH, Zan LS, Zhao XL, Li QW, Jiang ZL, Li YK, Li X.** Effects of trehalose supplementation on semen quality and oxidative stress variables in frozen-thawed bovine semen. *Journal of animal science*, 2010; 88(5): 1657–1662.
- Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ, Thompson W.** A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. *Molecular human reproduction*, 1996; 2(8): 613–619.
- Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ, Thompson W.** Reproducibility of human sperm DNA measurements using the alkaline single cell gel electrophoresis assay. *Mutation research*, 1997; 374(2): 261–268.
- Huxtable RJ.** Physiological actions of taurine. *Physiological reviews*, 1992; 72(1): 101–163.
- Ishii S, Kubokawa K.** Avian gonadotropin receptors: a comparative view. *The Journal of experimental zoology*, 1984; 232(3): 431–434.

- Inoue N, Sasagawa K, Ikai K, Sasaki Y, Tomikawa J, Oishi S, Fujii N, Uenoyama Y, Ohmori Y, Yamamoto N, Hondo E, Maeda K, Tsukamura H.** Kisspeptin neurons mediate reflex ovulation in the musk shrew (*Suncus murinus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011; 108(42): 17527–17532.
- Itamoto K, Hikasa Y, Sakonjyu I, Itoh H, Kakuta T, Takase K.** Anaesthetic and cardiopulmonary effects of balanced anaesthesia with medetomidine-midazolam and butorphanol in dogs. *Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine*, 2000; 47(7): 411–420.
- Itamoto K, Taura Y, Wada N, Takuma T, Une S, Nakaichi M, Hikasa Y.** Quantitative electroencephalography of medetomidine, medetomidine-midazolam and medetomidine-midazolam-butorphanol in dogs. *Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine*, 2002; 49(4): 169–172.
- Jacobs P, Hassold T, Harvey J, May K.** The origin of sex chromosome aneuploidy. *Progress in clinical and biological research*, 1989; 311: 135–151.
- Whitten WK.** Culture of tubal mouse ova. *Nature*, 1956; 177(4498): 96.
- Kalema-Zikusoka G, Horne WA, Levine J, Loomis MR.** Comparison of the cardiorespiratory effects of medetomidine-butorphanol-ketamine and medetomidine-butorphanol-midazolam in patas monkeys (*Erythrocebus patas*). *Journal of zoo and wildlife medicine : official publication of the American Association of Zoo Veterinarians*, 2003; 34(1): 47–52.
- Kaneko T, Kimura S, Nakagata N.** Offspring derived from oocytes injected with rat sperm, frozen or freeze-dried without cryoprotection. *Theriogenology*, 2007; 68: 1017–1021.
- Kaneko T, Nakagata N.** Relation between storage temperature and fertilizing ability of freeze-dried mouse spermatozoa. *Comparative medicine*, 2005; 55(2): 140–144.
- Kaneko T, Serikawa T.** Long-term preservation of freeze-dried mouse spermatozoa. *Cryobiology*, 2012; 64: 211–214.
- Kanter M, Yildiz C, Meral I, Koc A, Tasal I.** Effects of a GnRH agonist on oocyte number and maturation in mice superovulated with eCG and hCG. *Theriogenology*, 2004; 61(2-3): 393–398.
- Kaufman MR, Albers RE, Keoni C, Kulkarni-Datar K, Natale DR, Brown TL.** Important aspects of placental-specific gene transfer. *Theriogenology*, 2014; 82(7): 1043–1048.
- Kawai S, Takagi Y, Kaneko S, Kurosawa T.** Effect of three types of mixed anesthetic agents alternate to ketamine in mice. *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science*, 2011; 60(5): 481–487.
- Keebaugh AC, Modi ME, Barrett CE, Jin C, Young LJ.** Identification of variables contributing to superovulation efficiency for production of transgenic prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 2012; 10: 54.

- Kenney RM, Evenson DP, Garcia MC, Love CC.** Relationship between sperm chromatin structure, motility, and morphology of ejaculated sperm and seasonal pregnancy rate. *Biology of reproduction monographs ser 1. equine reproduction*, 1995; 6: 647–653.
- Khanderia U, Pandit SK.** Use of midazolam hydrochloride in anesthesia. *Clinical pharmacy*, 1987; 6(7): 533–547.
- Kimura Y, Yanagimachi R.** Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biology of reproduction*, 1995; 52(4): 709–720.
- Kito S, Yano H, Ohta Y, Tsukamoto S.** Superovulatory response, oocyte spontaneous activation, and embryo development in WMN/Nrs inbred rats. *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science*, 2010; 59(1): 35–45.
- Kirihara Y, Takechi M, Kurosaki K, Kobayashi Y, Kurosawa T.** Anesthetic effects of a mixture of medetomidine, midazolam and butorphanol in two strains of mice. *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science*, 2013; 62(3): 173–180.
- Kirihara Y, Takechi M, Kurosaki K, Kobayashi Y, Saito Y, Takeuchi T.** Anesthetic effects of a three-drugs mixture--comparison of administrative routes and antagonistic effects of atipamezole in mice. *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science*, 2015a; 64(1): 39–47.
- Kirihara Y, Takechi M, Kurosaki K, Kobayashi Y, Saito Y, Takeuchi T.** Effects of an anesthetic mixture of medetomidine, midazolam, and butorphanol in rats-strain difference and antagonism by atipamezole. *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science*, 2015b. Advance Publication.
- Koura M, Handa H, Noguchi Y, Takano K, Yamamoto Y, Matsuda J, Suzuki O.** Sequence analysis of cDNA encoding follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone  $\beta$ -subunits in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *General and comparative endocrinology*, 2004; 136(3): 406–410.
- Kudo H, Oki Y.** Breeding and rearing of Japanese field voles (*Microtus montebelli* Milne-Edwards) and Hungarian voles (*Microtus arvalis* Pallas) as new herbivorous laboratory animal species. *Jikken dobutsu*, 1982; 31(3): 175–183.
- Kudo H, Oki Y.** *Microtus* species as new herbivorous laboratory animals: reproduction; bacterial flora and fermentation in the digestive tracts; and nutritional physiology. *Veterinary research communications*, 1984; 8: 77–91.
- Ladman AJ, Palm JE, Runner MN.** Bioassay of mouse pituitary gonadotropin by induced ovulation in pregnant mice; evaluation and biologic application. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1953; 84(3): 582–584.
- Lane M, Gardner DK.** Increase in postimplantation development of cultured mouse embryos by amino acids and induction of fetal retardation and exencephaly by ammonium ions. *Journal of reproduction and fertility*, 1994; 102(2): 305–312.

- Lane M, Gardner DK.** Selection of viable mouse blastocysts prior to transfer using a metabolic criterion. *Human reproduction*, 1996; 11(9): 1975 – 1978.
- Lane M, Gardner DK.** Nonessential amino acids and glutamine decrease the time of the first three cleavage divisions and increase compaction of mouse zygotes *in vitro*. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 1997; 14(7): 398 – 403.
- Lapid R, Shilo-Benjamini Y.** Immobilization of captive nubian ibex (*capra nubiana*) with butorphanol-midazolam-medetomidine or butorphanol-azaperone-medetomidine and atipamezole reversal. *Journal of zoo and wildlife medicine : official publication of the American Association of Zoo Veterinarians*, 2015; 46(2): 291 – 297.
- Lasserre A, Cebal E, Vitullo AD.** Successful capacitation and homologous fertilization *in vitro* in *Calomys musculinus* and *Calomys laucha* (Rodentia - sigmodontinae). *Journal of reproduction and fertility*, 2000; 120(1): 41 – 47.
- Lawitts JA, Biggers JD.** Optimization of mouse embryo culture media using simplex methods. *Journal of reproduction and fertility*, 1991; 91(2): 543 – 56.
- Lawitts JA, Biggers JD.** Joint effects of sodium chloride, glutamine, and glucose in mouse preimplantation embryo culture media. *Molecular reproduction and development*, 1992; 31(3): 189 – 194.
- Ledford H.** ‘Monogamous’ vole in love-rat shock. *Nature*, 2008; 451(7179): 617. 1 – 10.
- Lee ST, Kim TM, Cho MY, Moon SY, Han JY, Lim JM.** Development of a hamster superovulation program and adverse effects of gonadotropins on microfilament formation during oocyte development. *Fertility and sterility*, 2005; 83 Suppl 1: 1264 – 1274.
- Leibfried ML, Bavister BD.** The effects of taurine and hypotaurine on *in vitro* fertilization in the golden hamster. *Gamete research*, 1981; 4: 57 – 63.
- Leibfried ML, Bavister BD.** Effects of epinephrine and hypotaurine on *in-vitro* fertilization in the golden hamster. *Journal of reproduction and fertility*, 1982; 66(1): 87 – 93.
- Li MW, Meyers S, Tollner TL, Overstreet JW.** Damage to chromosomes and DNA of rhesus monkey sperm following cryopreservation. *Journal of andrology*, 2007; 28(4): 493 – 501.
- Liu LJ, Xu P, Gu JZ, Fu J, Si E, Xie E.** Artificial reproduction of the Yangtze field vole: *in vitro* embryo development and fertilization with fresh and freeze-thawed sperm. *Lab animal (NY)*, 2006; 35(8): 37 – 41.
- Lucifero D, Chaillet JR, Trasler JM.** Potential significance of genomic imprinting defects for reproduction and assisted reproductive technology. *Human reproduction update*, 2004 ; 10(1): 3 – 18.
- Ludwig TE, Squirrell JM, Palmenberg AC, Bavister BD.** Relationship between development, metabolism, and mitochondrial organization in 2-cell hamster embryos in the presence of low levels of phosphate. *Biology of reproduction*, 2001; 65(6): 1648 – 1654.

- Martín-Coello J, González R, Crespo C, Gomendio M, Roldan ER.** Superovulation and *in vitro* oocyte maturation in three species of mice (*Mus musculus*, *Mus spretus* and *Mus spicilegus*). *Theriogenology*, 2008; 70(6): 1004–1013.
- Manoli DS, Subramanyam D, Carey C, Sudin E, Van Westerhuyzen JA, Bales KL, Blelloch R, Shah NM.** Generation of induced pluripotent stem cells from the prairie vole. *PLoS One*, 2012; 7(5): 1–10.
- Matsumoto H, Sugawara S.** Effect of phosphate on the second cleavage division of the rat embryo. *Human reproduction*, 1998; 13(2): 398–402.
- Matsuo H, Baba Y, Nair RM, Arimura A, Schally AV.** Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochemical and biophysical research communications*, 1971; 43(6): 1334–1339.
- Mazurok NA, Rubtsova NV, Isaenko AA, Pavlova ME, Slobodyanyuk SY, Nesterova TB, Zakian SM.** Comparative chromosome and mitochondrial DNA analyses and phylogenetic relationships within common voles (*Microtus Arvicolidae*). *Chromosome research: an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology*, 2001; 9(2): 107–120.
- McKiernan SH, Bavister BD, Tasca RJ.** Energy substrate requirements for *in-vitro* development of hamster 1- and 2-cell embryos to the blastocyst stage. *Human reproduction*, 1991; 6(1): 64–75.
- McKiernan SH, Bavister BD.** Timing of development is a critical parameter for predicting successful embryogenesis. *Human reproduction*, 1994; 9(11): 2123–2129.
- McKiernan SH, Clayton MK, Bavister BD.** Analysis of stimulatory and inhibitory amino acids for development of hamster one-cell embryos *in vitro*. *Molecular reproduction and development*, 1995; 42(2): 188–199.
- McKiernan SH, Bavister BD.** Culture of one-cell hamster embryos with water soluble vitamins: pantothenate stimulates blastocyst production. *Human reproduction*. 2000; 15(1): 157–164.
- McGraw LA, Young LJ.** The prairie vole: an emerging model organism for understanding the social brain. *Trends in neurosciences*, 2010; 33(2): 103–109.
- McLaren A, Michie D.** Studies on the transfer of fertilized mouse eggs to uterine foster-mothers. I. Factors affecting the implantation survival of native and transferred eggs. *The Journal of experimental biology*, 1956; 33: 394–416.
- McLaren A, Biggers JD.** Successful development and birth of mice cultivated *in vitro* as early as early embryos. *Nature*, 1958; 182(4639): 877–878.



- Mehta TS, Kiessling AA.** Development potential of mouse embryos conceived *in vitro* and cultured in ethylenediaminetetraacetic acid with or without amino acids or serum. *Biology of reproduction*, 1990; 43(4): 600–606.
- Meizel S, Lui CW, Working PK, Mrsny RJ.** Taurine and hypotaurine: their effects on motility, capacitation and the acrosome reaction of hamster sperm *in vitro* and their presence in sperm and reproductive tract fluids of several mammals. *Development, growth and differentiation*, 1980; 22(3): 483–494.
- Miller JG, Schultz GA.** Amino acid content of preimplantation rabbit embryos and fluids of the reproductive tract. *Biology of reproduction*, 1987; 36(1): 125–129.
- Mintz B.** Mammalian embryo culture. In *Methods in developmental biology* (ed. F. H. Wilt and N. K. Wessels), 1967: pp. 379–400. Cromwell, New York.
- Miyoshi K, Funahashi H, Okuda K, Niwa K.** Development of rat one-cell embryos in a chemically defined medium: effects of glucose, phosphate and osmolarity. *Journal of reproduction and fertility*, 1994; 100(1): 21–26.
- Miyoshi K, Abeydeera LR, Okuda K, Niwa K.** Effects of osmolarity and amino acids in a chemically defined medium on development of rat one-cell embryos. *Journal of reproduction and fertility*, 1995; 103(1):27–32.
- Moler TL, Donahue SE, Anderson GB.** A simple technique for nonsurgical embryo transfer in mice. *Laboratory animal science*, 1979; 29(3): 353–356.
- Moreno-Moya JM, Ramírez L, Vilella F, Martínez S, Quiñonero A, Noguera I, Pellicer A, Simón C.** Complete method to obtain, culture, and transfer mouse blastocysts nonsurgically to study implantation and development. *Fertility and sterility*, 2014; 101(3): e13.
- Morton DB, Bavister BD.** Fractionation of hamster sperm-capacitating components from human serum by gel filtration. *Journal of reproduction and fertility*, 1974; 40(2): 491–493.
- Nakagata N.** Production of normal young following insemination of frozen-thawed mouse spermatozoa into fallopian tubes of pseudopregnant females. *Jikken dobutsu*, 1992; 41(4): 519–522.
- Nakatsukasa E, Inomata T, Ikeda T, Shino M, Kashiwazaki N.** Generation of live rat offspring by intrauterine insemination with epididymal spermatozoa cryopreserved at –196 degrees C. *Reproduction*, 2001; 122(3): 463–467.
- Nariai K, Ishinazaka T, Suzuki K, Uchiyama H, Sato K, Asano R, Tsumagari S, Yukawa M, Kanayama K.** Optimum dose of LH-RH analogue Fertirelin Acetate for the induction of superovulation in mice. *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science*, 2005; 54(1): 97–99.

- Niemitz EL, Feinberg AP.** Epigenetics and assisted reproductive technology: a call for investigation. *American journal of human genetics*, 2004; 74(4): 599–609.
- Noguchi Y1, Takano K, Koura M, Uchio-Yamada K, Matsuda J, Suzuki O.** Sequence analysis of cDNA encoding rabbit follicle-stimulating hormone  $\beta$ -subunit precursor protein. *General and comparative endocrinology*, 2006; 147(2): 231–235.
- Ochi T, Nishiura I, Tatsumi M, Hirano Y, Yahagi K, Sakurai Y, Matsuyama-Fujiwara K, Sudo Y, Nishina N, Koyama H.** Anesthetic effect of a combination of medetomidine-midazolam-butorphanol in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 2014; 76(6): 917–921.
- Ogonuki N, Sankai T, Cho F, Sato K, Yoshikawa Y.** Comparison of two methods of assisted fertilization in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*): intracytoplasmic sperm injection and partial zona dissection followed by insemination. *Human reproduction*, 1998; 13(9):2555–2560.
- Ono T, Okada S.** Radiation-induced DNA single-strand scission and its rejoining in spermatogonia and spermatozoa of mouse. *Mutation research*, 1977; 43(1): 25–36.
- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC.** Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 1992; 340(8810): 17–18.
- Pasco R, Gardner DK, Walker DW, Dickinson H.** A superovulation protocol for the spiny mouse (*Acomys cahirinus*). *Reproduction, fertility, and development*, 2012; 24(8): 1117–1122.
- Pavlok A.** Development of mouse ova in explanted oviducts: fertilization, cultivation, and transplantation. *Science*, 1967; 157(3795): 1457–1458.
- Pitkow LJ, Sharer CA, Ren X, Insel TR, Terwilliger EF, Young LJ.** Facilitation of affiliation and pair-bond formation by vasopressin receptor gene transfer into the ventral forebrain of a monogamous vole. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2001; 21(18): 7392–7396.
- Polge C, Rowson LEA.** Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at 79 degrees C. *Nature*, 1952; 169(4302): 626–627.
- Quan GB, Hong QH, Hong QY, Yang HY, Wu SS.** The effects of trehalose and sucrose on frozen spermatozoa of Yunnan semi-fine wool sheep during a non-mating season. *Cryo letters*, 2012; 33(4): 307–317.
- Roldan ER, Horiuchi T, Yanagimachi R.** Superovulation in immature and mature Chinese hamsters. *Gamete research*, 1987; 16(4): 281–290.
- Rose TA, Bavister BD.** Effect of oocyte maturation medium on *in vitro* development of *in vitro* fertilized bovine embryos. *Molecular reproduction and development*, 1992; 31(1): 72–77.

- Ross HE, Freeman SM, Spiegel LL, Ren X, Terwilliger EF, Young LJ.** Variation in oxytocin receptor density in the nucleus accumbens has differential effects on affiliative behaviors in monogamous and polygamous voles. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009; 29(5): 1312–1318.
- Runner MN, Gates A.** Conception in prepuberal mice following artificially induced ovulation and mating. *Nature*, 1954; 174(4422): 222–223.
- Sailer BL, Jost LK, Evenson DP.** Bull sperm head morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility. *Cytometry*, 1996; 24(2): 167–173.
- Sato M, Kimura M.** Intrabursal transfer of spermatozoa (ITS): a new route for artificial insemination of mice. *Theriogenology*, 2001; 55(9): 1881–1890.
- Sato M, Nagashima A, Watanabe T, Kimura M.** Comparison of intrabursal transfer of spermatozoa, a new method for artificial insemination in mice, with intraoviductal transfer of spermatozoa. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 2002; 19(11): 523–530.
- Sato M, Tanigawa M, Watanabe T.** Effect of time of ovulation on fertilization after intrabursal transfer of spermatozoa (ITS): improvement of a new method for artificial insemination in mice. *Theriogenology*, 2004; 62(8): 1417–1429.
- Schini SA, Bavister BD.** Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. *Biology of reproduction*, 1988; 39(5): 1183–1192.
- Schramm RD, Bavister BD.** Development of *in-vitro*-fertilized primate embryos into blastocysts in a chemically defined, protein-free culture medium. *Human reproduction*, 1996; 11(8): 1690–1697.
- Seager SWJ.** The breeding of captive wild species by artificial methods. *Zoo biology*, 1983; 2: 235–239.
- Seshagiri PB, Bavister BD.** Comparison of hamster embryo culture medium -I and II for supporting *in vitro* development of hamster 2- and 8-cell embryos. *Journal of Cellular Biochemistry*, 1989; 13:200.
- Seshagiri PB, Bavister BD.** Phosphate is required for inhibition by glucose of development of hamster 8-cell embryos *in vitro*. *Biology of reproduction*, 1989; 40(3): 607–614.
- Seshagiri PB, Bavister BD.** Glucose and phosphate inhibit respiration and oxidative metabolism in cultured hamster eight-cell embryos: evidence for the "crabtree effect". *Molecular reproduction and development*, 1991; 30(2): 105–111.
- Small E.** The new Noah's Ark: beautiful and useful species only. Part 1. Biodiversity consevation issues and priorities. *Biodiversity*, 2012a; 1–16.
- Small E.** The new Noah's Ark: beautiful and useful species only. Part 2. The chosen species. *Biodiversity*, 2012b; 13(1): 37–53.

- Spelman LH.** Reversible anesthesia of captive California sea lions (*Zalophus californianus*) with medetomidine, midazolam, butorphanol, and isoflurane. *Journal of zoo and wildlife medicine : official publication of the American Association of Zoo Veterinarians*, 2004; 35(1): 65–69.
- Steele KH, Hester JM, Stone BJ, Carrico KM, Spear BT, Fath-Goodin A.** Nonsurgical embryo transfer device compared with surgery for embryo transfer in mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 2013; 52(1): 17–21.
- Stone BJ, Steele KH, Fath-Goodin A.** A rapid and effective nonsurgical artificial insemination protocol using the NSET™ device for sperm transfer in mice without anesthesia. *Transgenic research*, 2015; 24(4): 775–781.
- Suzuki C, Yoshioka K, Sakatani M, Takahashi M.** Glutamine and hypotaurine improves intracellular oxidative status and *in vitro* development of porcine preimplantation embryos. *Zygote*, 2007; 15(4): 317–324.
- Suzuki O, Mochida K, Yamamoto Y, Noguchi Y, Takano K, Matsuda J, Ogura A.** Comparison of glycoprotein hormone alpha-subunits of laboratory animals. *Molecular reproduction and development*, 2002; 62(3): 335–342.
- Sztejn JM, Farley JS, Mobraaten LE.** *In Vitro* Fertilization with Cryopreserved Inbred Mouse Sperm. *Biology of Reproduction*, 2000; 63: 1774–1780.
- Takahashi H, Liu C.** Archiving and distributing mouse lines by sperm cryopreservation, IVF, and embryo transfer. *Methods in enzymology*, 2010; 476: 53–69.
- Takano K, Koura M, Noguchi Y, Yamamoto Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J, Suzuki O.** Sequence analysis of cDNA encoding follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone  $\beta$ -subunits in the Mastomys (*Praomys coucha*). *General and comparative endocrinology*, 2004; 138(3): 281–286.
- Takehima T, Nakagata N, Ogawa S.** Cryopreservation of mouse spermatozoa. *Jikken dobutsu*, 1991; 40(4): 493–497.
- Taketsuru H, Kaneko T.** Efficient collection and cryopreservation of embryos in F344 strain inbred rats. *Cryobiology*, 2013; 67(2): 230–234.
- Terashita Y, Li C, Yamagata K, Sato E, Wakayama T.** Effect of fluorescent mercury light irradiation on *in vitro* and *in vivo* development of mouse oocytes after parthenogenetic activation or sperm microinjection. *The Journal of reproduction and development*, 2011; 57(5): 564–571.
- Toyoda Y, Chang MC.** Fertilization of rat eggs *in vitro* by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer. *Journal of reproduction and fertility*, 1974; 36(1): 9–22.

- Tougaard C, Renvoisé E, Petitjean A, Quéré JP.** New insight into the colonization processes of common voles: inferences from molecular and fossil evidence. *PLoS One*, 2008; 3(10): 1 – 10.
- Tsukamoto A, Serizawa K, Sato R, Yamazaki J, Inomata T.** Vital signs monitoring during injectable and inhalant anesthesia in mice. *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science*, 2015; 64(1): 57 – 64.
- Tummers M, Thesleff I.** Root or crown: a developmental choice orchestrated by the differential regulation of the epithelial stem cell niche in the tooth of two rodent species. *Development*, 2003; 130(6): 1049 – 1057.
- Uehara T, Yanagimachi R.** Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. *Biology of reproduction*, 1976; 15(4): 467 – 470.
- Vähä-Vahe T.** The clinical efficacy of medetomidine. *Acta veterinaria Scandinavica. Supplementum*, 1989; 85: 151 – 153.
- Vainio O, Vähä-Vahe T, Palmu L.** Sedative and analgesic effects of medetomidine in dogs. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 1989; 12(2): 225 – 231.
- Vasudevan K, Sztejn JM.** *In vitro* fertility rate of 129 strain is improved by buserelin (gonadotropin-releasing hormone) administration prior to superovulation. *Laboratory animals*, 2012; 46(4): 299 – 303.
- Vieira LA, Gadea J, García-Vázquez FA, Avilés-López K, Matás C.** Equine spermatozoa stored in the epididymis for up to 96h at 4°C can be successfully cryopreserved and maintain their fertilization capacity. *Animal reproduction science*, 2013; 136(4): 280 – 288.
- Wakayama T, Matsubara Y, Imamura K, Kurohmaru M, Hayashi Y, Fukuta K.** Development of early-stage embryos of the Japanese field vole, *Microtus montebelli*, *in vivo* and *in vitro*. *Journal of reproduction and fertility*, 1994; 101(3): 663 – 666.
- Wakayama T, Suto J, Matubara Y, Imamura K, Fukuta K, Toyoda Y, Kurohmaru M, Hayashi Y.** *In vitro* fertilization and embryo development of Japanese field voles (*Microtus montebelli*). *Journal of reproduction and fertility*, 1995; 104(1): 63 – 68.
- Wakayama T, Suto JI, Imamura K, Toyoda Y, Kurohmaru M, Hayashi Y.** Effect of hypotaurine on *in vitro* fertilization and production of term offspring from *in vitro*-fertilized ova of the Japanese field vole, *Microtus montebelli*. *Biology of reproduction*, 1996; 54(3): 625 – 630.
- Wang L, Li D, Li Z.** Changes in the reciprocal position of the first polar body and oocyte chromosome set in golden hamsters. *Bioscience reports*, 2009; 29(5): 315 – 320.

- Watanabe H, Tateo H, Kusakabe H, Matsuoka T, kamiguchi Y, Fujise Y, Ishikawa H, Ohsumi S, Fukui Y.** Fertilizability and chromosomal integrity of frozen-thawed Bryde's whale (*Balaenopteraedeni*) spermatozoa intracytoplasmically injected into mouse oocytes. *Zygote*, 2007; 15(1): 9–14.
- Watanabe S.** A derailed cytogenetic analysis of large numbers of fresh and frozen-thawed human sperm after ICSI into mouse oocytes. *Human reproduction*, 2003; 18(6): 1150–1157.
- Watson PF.** Artificial breeding of non-domestic animals. Symposium 43, of the Zoological Society of London. London & N.Y., Academic Press. 1978. *Theriogenology*, 1979; 12(2): 115.
- Wenger S, Buss P, Joubert J, Steenkamp J, Shikwambana P, Hatt JM.** Evaluation of butorphanol, medetomidine and midazolam as a reversible narcotic combination in free-ranging African lions (*Panthera leo*). *Veterinary anaesthesia and analgesia*, 2010; 37(6): 491–500.
- Whitten W.K.** Culture of tubal mouse ova. *Nature*, 1956; 177:96.
- Whittingham DG.** Fertilization of mouse eggs *in vitro*. *Nature*, 1968; 220(5167): 592–593.
- Wilson ED, Zarrow MX.** Comparison of superovulation in the immature mouse and rat. *Journal of reproduction and fertility*, 1962; 3: 148–158.
- Yamagata K, Iwamoto D, Terashita Y, Li C, Wakayama S, Hayashi-Takanaka Y, Kimura H, Saeki K, Wakayama T.** Fluorescence cell imaging and manipulation using conventional halogen lamp microscopy. *PLoS One*, 2012 ;7(2): 1–10.
- Yamauchi Y, Yanagimachi R, Horiuchi T.** Full-term development of golden hamster oocytes following intracytoplasmic sperm head injection. *Biology of reproduction*, 2002; 67(2): 534–539.
- Yanagimachi R, Chang MC.** Fertilization of hamster eggs *in vitro*. *Nature*, 1963; 200: 281–282.
- Yanagimachi R, Yanagimachi H, Rogers BJ.** The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biology of reproduction*, 1976; 15(4): 471–476.
- Yanagimachi R.** Fertilization studies and assisted fertilization in mammals: their development and future. *The Journal of reproduction and development*, 2012; 58(1): 25–32.
- Yoshida N, Perry AC.** Piezo-actuated mouse intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Nature protocols [electronic resource]*, 2007; 2(2): 296–304.
- Zarrow MX, Caldwell AL Jr, Hafez ES, Pincus G.** Superovulation in the immature rat as a possible assay for LH and HCG. *Endocrinology*, 1958; 63(6): 748–758.

Zarrow MX, Wilson ED. The influence of age on superovulation in the immature rat and mouse. *Endocrinology*, 1961; 69: 851–855.

国際自然保護連合 (IUCN: the International Union for Conservation of Nature) , RED LIST 2015.

江藤禎一, 今道友則, 星冬四郎. 胎盤性性線刺激ホルモン単一皮下注射による成熟雌ラット及びマウスの排卵反応について. *家畜繁殖誌*, 1955; 1: 11–12.

江藤禎一, 松本武司, 星冬四郎. 胎盤性性線刺激ホルモン効力検定の判断基準としてのマウスの排卵反応. *家畜繁殖誌*, 1958; 4: 121–122 .

川村麟也, 池田嘉平. 恙虫病発生原野におけるハタネズミ, *Microtus montebelli*の生態観察. *動物学雑誌*, 1935; 47: 90–101.

楠田哲士. わが国の動物園における種の保存を目的とした希少動物の繁殖研究と人工繁殖の現状. *動物園研究*, 2003; 7: 1–17.

笹本修二, 村上一雄. 妊馬血清性腺刺激ホルモンの生物学的正常に関する二三の考察 特に絨毛性性腺刺激ホルモン追注による幼若マウスの排卵反応を中心として. *家畜繁殖誌*, 1959; 5: 63–66.

笹原修二. 絨毛性性腺刺激ホルモンによるマウスの過剰排卵誘起に関する研究. 東京農工大学農学部学術報告, 1970; 13: 1–45.

佐藤英明, 石橋武彦. 誘起排卵マウス (JCL-ICR) における胎児体重と胎児数の関係. *家畜繁殖誌*, 1979; 25: 136–140.

高中恵. 種々の移植器具を用いた非外科的胚移植によるマウス産仔作出. 卒業論文, 2014.

竹島勉, 豊田裕. マウスの人工授精, とくに受胎率および産仔数に及ぼす精子数の影響について. *実験動物学*, 1977; 26: 317–322.

渡辺菊治. 作物保護学的見地より見た鼠の分類および生態に関する研究. 宮城県立農業試験場報告, 1962, 第31号.

中野寛, 荒木慶彦. 哺乳類の生殖生化学. *アイピーシー*, 1999: 66–68.

西澤行人. 繁殖生物学. *インターズー*, 2013: pp107.

毛利秀雄, 星元紀. 新編 精子学. 東京大学出版社, 2006: 334, 474–475.

山内一也, 豊田裕, 岩倉洋一郎, 佐藤英明, 鈴木宏志. マウスの胚の操作マニュアル. 近代出版, 2005: 32–35.