

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*)

学位論文の内容の要旨

獣医生命科学研究科応用生命科学専攻博士後期課程平成25年入学

影 山 敦 子

(指導教員：牛 島 仁)

ハタネズミ(*Microtus*)属は、複胃を有する草食性小型げっ歯類であり、種間で染色体数が異なることから、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。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あるいは脳内機構研究のモデルとして利用されている。近年では、同属のプレーリーハタネズミ(*Microtus ochrogaster*)においてiPS細胞樹立あるいはトランスジェニック動物作製など、新たなハタネズミ研究が展開されている。一方、当研究室で長年系統維持しているホンダハタネズミ(*Microtus montebelli*)を含む本属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が、現時点において本属の生殖様式は未解明な部分が多いほか、生殖細胞の保存や個体再生に関わる生殖補助技術の開発もほとんど進んでいない。前述の新規研究領域を強力に推し進めるためには、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生殖補助技術の早期確立が望まれている。

また本属のうち10種が絶滅危惧として認定されていることから考えても、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、生物多様性保全にも役立つと考えられる。本研究では、各種生殖補助技術の確立を目的とし、ホンダハタネズミにおける効率的な動物供給法および生殖細胞保存法について詳細に検討した。

本研究にお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、これら胚盤胞の非外科的移植に成功した、4) 外科的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) 体外受精胚および顕微授精胚から産仔を作出した。以上の結果は、これら生殖補助技術を用いて効率的な動物供給および種の保存に十分に貢献できることを示している。

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

Abstract of doctoral dissertation

Graduate school of veterinary medicine and life science doctoral course in applied life
science, 2013 entrance to school

Atsuko KAGEYAMA

(Supervisor: Prof. Dr. Hitoshi USHIJIMA)

The vole, *Microtus*, is herbivorous small rodent with multiple stomachs and chromosome number is different among species. Thus, it has been expected as models of digestion-metabolic control system for middle or large herbivory and/or for study of speciation-species profile. Since some of them possess monogamy system that is less than 3% in mammals, they are utilized for models of social behavior in human mating system or brain mechanism study. Recently, establishment of iPS cell in prairie voles (*Microtus ochrogaster*) were succeeded and then production of transgenic prairie voles was attempted. In fact, such novel studies on vole is developing. When it considers wide utilization of this genus including Japanese field vole (*Microtus montebelli*), stable supply of animals for experiments is essential. However, there are few reports about their reproductive pattern and assisted reproductive technologies (ARTs) related with preservation of germ cells and regeneration of individual at present. To advance above-mentioned new research field, it is greatly desirable to establish ARTs such as cryopreservation of germ cells, artificial insemination, *in vitro* fertilization and embryo transfer. In addition, ten of sixty four species in this genus have been classified into the endangered category and conservation for such species is also important to maintain the biological diversity. The present study aimed establishment of a series of ARTs to enable researchers to supply animals stably and conserve germ cells in Japanese field vole.

In this study, the following results were provided; 1) sperm cryopreservation procedure was successfully applicable to mouse system and litter size similar to natural mating could be obtained by non-surgical artificial insemination with frozen-thawed sperm, 2) oocyte could be collected from all weeks-old voles by novel superovulation procedure, 3) medium that was able to develop from early 2 cell stage to blastocyst stage was revealed and non-surgical embryo transfer with these embryos production of offspring was succeeded, 4) optimum anesthetic and the concentration were examined for surgical operation and then safe and effective anesthetic was determined, 5) offspring derived from *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection embryos could be produced. Taken together, all results show that ARTs modified for voles could efficiently be contributed to animal supply and conservation of not only *Microtus montebelli* but also other vole species.