

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約

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)

現在、実験動物として一般的に利用されているげっ歯類は遺伝的背景が明瞭であり、生殖活動様式を含む数々の特徴も広く調べられているため、多くの研究に利用されている。一方、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拓は、研究領域を広げるとともに、新たな生物学的知見につながる。本研究の対象となるハタネズミ(*Microtus*)属は、世界に全64種生息し、他のげっ歯類と異なる特徴をもつ。その特徴とは、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。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。最近では、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。

本研究室で長年系統維持しているホンドハタネズミ(*Microtus montebelli*)を含む本属の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が、現時点において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の開発もほとんど進んでいない。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各種生殖工学技術の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記載されていることから、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、本属での一連の生殖補助技術の確立を目的とし、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について詳細に検討した。

第1章では、ハタネズミ属の有用性および生殖補助技術について解説するとともに、研究背景について概説した。

第2章では、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保存にも適用できるか否かを検討した。その結果、凍結前(新鮮)と比較して凍結-融解後には、運動性、生存性および精子DNA完全性に関していずれも値の低下が認められた。また、マウス卵母細胞にホンドハタネズミの新鮮あるいは凍結-融解精子を顕微注入したところ、いずれの区においても注入した卵母細胞のすべてが減数分裂を再開して前核を形成した。このことから、ホンドハタネズミ精子は凍結-融解後も卵活性化能を十分に維持していることが示された。さらに、チューブおよびストローの2種類の凍結保存容器で凍結後の精子性状を比較したところ、ストローを用いた凍結においてより高い生存性を示し、有意差がみられた。次に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て、子宮頸

管経由法を用いて新鮮あるいは凍結-融解精子を子宮に非外科的移植して産仔作出を試みた。凍結-融解精子を用いた人工授精において産仔数は少なかったが、凍結-融解精子から個体を作成できることが明らかとなった。さらに、精子移植時間の変更（交尾確認後7～9時間）あるいはhypotaurine添加を組み合わせることにより、凍結-融解精子-人工授精由来産仔数が新鮮および自然交配区と同程度に改善された。

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ダハタネズミにおける新規過剰排卵法を検討した。まず、マウスで一般的に使用されている妊馬血清性腺刺激ホルモン(PMSG)およびヒト絨毛性腺刺激ホルモン(hCG)を組み合わせた過剰排卵法を膣開口前後(19～29および30～138日齢)の個体を用いて各濃度を最適化して採卵数を比較した。その結果、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。そこで、膣開口後個体においてより効率的に排卵を誘起するための過剰排卵法を検討した。ホンダハタネズミが交尾排卵動物であることを利用した交尾刺激あるいはhCGよりも上流のホルモンである性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)を利用し、内因性黄体形成ホルモン(LH)分泌促進を期待した過剰排卵法を考案した。この結果、PMSG-交尾刺激区およびPMSG-20% PVP-GnRH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。

第4章では、体外受精および顕微授精由来胚の体外培養条件を検討した。その結果、体内受精由来の前核期胚を様々な培養液で発生させたが、試したすべての培養液においておよそすべての体外作出胚が2細胞期で停止した。次に、体内受精由来の前期2細胞期胚を用いて培養条件を検討したところ、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に成功した。

第5章では、これまで利用してきたソムノペンチルが、近年、麻酔薬としてはその安全性に疑問が生じ、効果も不安定であることが問題となっていた。そこで、動物に対してより安全で有効な外科手術時間を得られるとされる三種混合(メドミジン/ミダゾラム/ブトルファノール；M/M/B: mg/kg)麻酔薬の有効性をホンダハタネズミにおいて確認するとともに、その至適濃度を検討した。その結果、ソムノペンチルにおいては雄雌ともに死亡率が高く、麻酔スコアは低いことを明らかにした。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、雄では全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、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であると示唆された。次に、第2および3章の人工授精および非外科的子宮内胚移植により産仔を得られたことから、非外科的に移植が可能となった。このことは、レシピエントを反復使用できる可能性を示している。そこで、レシピエントの反復使用を想定し、麻酔薬の反復投与が雌個体に与える影響を検討した。その結果、麻酔薬を反復して3回投与しても十分な非外科的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。

第6章では、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。この結果、新鮮精子での体外受精では、hypotaurine添加時期に関係なく高い受精率を示した。次に、新鮮精子で得られた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ところ、凍結-融解精子を用いた体外受精においても高い受精率を示した。さらに、体外受精由来胚が正常に分割する発生培地を検討を行ったところ、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2cell 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、媒精日の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。結果は、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。第5章で、三種混合麻酔薬はソムノペンチルと比較すると死亡率が低く、覚醒も早いことが明らかとなったことから、ソムノペンチルあるいは三種混合麻酔薬が産仔作出に及ぼす影響を比較するとともに、胚移植時間を再検討した。その結果、三種混合麻酔薬において妊娠率が高い傾向を示し、流産率は有意に低かった。さらに移植時間の変更により産仔数が上昇した。しかし、ソムノペンチル区および三種混合麻酔薬区ともに産仔数および産仔重量に違いはみられなかった。

第7章では、新鮮および凍結-融解精子を用いた顕微授精法について検討し、それらの受精卵からの産仔作出を試みた。新鮮および凍結-融解精子の顕微授精では、それぞれ高い割合で卵母細胞が減数分裂を再開して雌雄前核を形成した。次に、顕微授精由来胚を前章と同様に胚移植して産仔を得られた。

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受精胚が得られ、産仔を作出できることを示した。

これらの結果は、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示している。

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

Summary 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)

Rodents are generally used for various studies, because of clear genetic background and their characteristic including reproductive function. However, development of new experimental animals possessing different characteristic from conventional experimental animals, such as mouse and rat, will expand not only research field but also novel biological knowledgement. Sixty-four of *Microtus* species inhabit in the world and each species possess unique characteristic. The major and common characteristic of vole is a 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 experimental or research models of social behavior in human mating system or brain mechanism. Recently, establishment of iPS cells 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 (AI), *in vitro* fertilization (IVF) and embryo transfer (ET). 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 Chapter 1, we described utility and ARTs on vole and also outlined background of related studies.

In Chapter 2, we examined whether mouse sperm cryopreservation system was applicable to spermatozoa of *Microtus montebelli*. The rate of mortality, viability and sperm integrity after frozen-thawed (FT) were lower than fresh. Then, all of mouse oocytes injected resumed meiosis and formed pronucleus when they were injected with a single vole fresh or FT spermatozoa. These results showed that FT spermatozoa of *Microtus montebelli* sufficiently maintained the fertilizing capacity. Furthermore, effect of two freezing containers (tube or straw) on properties of FT spermatozoa was examined. After frozen-thawed, mortality with straw was higher than tube and there was no difference on viability. Finally, we used non-invasive AI with fresh or FT spermatozoa to attempt production of offspring and perform the final evaluation of sperm cryopreservation technology on *Microtus montebelli*. Although litter size derived from AI with FT spermatozoa was low, we demonstrated that pups could be produced from FT spermatozoa. Furthermore, when delayed sperm transfer (at 7-9 hours after copulation) or hypotaurine treatment were performed, the litter size derived from AI with FT was improved and such value was similar to those of fresh spermatozoa and natural mating.

In Chapter 3, we performed to establish novel superovulation procedure on Japanese field vole for reliable supply of oocytes throughout all ages. In general, combination of pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG) and human chorionic gonadotropin (hCG) is used for superovulation in mice. Firstly, female Japanese field voles were divided into two groups of voles before vaginal opening (19-29 days old) and after vaginal opening (30-138 days old). Then, voles were administrated with various

concentration of PMSG and hCG and number of ovulated oocytes from voles were compared. In results, regardless of hormonal concentration, number of ovulated oocytes from voles after vaginal opening was less than those of voles before vaginal opening. Therefore, we examined a new superovulation procedure to induce more effective ovulation on voles after vaginal opening. Mating stimulus (because Japanese field vole is a copulation ovulation animal) or gonadotrophin releasing hormone (GnRH) that is a up-regulated hormone of luteinizing hormone (LH) were used, since it was estimated that GnRH facilitated endogenous LH release and then induced superovulation. When females were treated with mating or 20% PVP-GnRH, twice number of oocytes could be obtained comparing with PMSG-hCG. Furthermore, in case of applying 20% PVP-GnRH to voles before vaginal opening, number of oocytes similar to PMSG-hCG was obtained.

In Chapter 4, in order to examine the conditions of *in vitro* culture for embryos derived from IVF or intracytoplasmic sperm injection (ICSI), we tested various media with *in vivo* embryo at first. As a result, it revealed that all *in vivo* pronuclear embryos cultured arrested at 2 cell stage. When early stage of *in vivo* 2 cell embryos was examined, it could develop to blastocyst stage. Finally, because it is assumed that vole offspring derived from chimera or transgenic will be produced by embryo-manipulations, *in vivo* blastocysts were non-surgically transferred to uterine and production of offspring was succeeded.

In Chapter 5, recently, it has been known that Somnopentyl has problems of not only safety but also unstable effects as an anesthetic. Alternatively, availability of mixture anesthetic (medetomidine/midazolam/butorphanol; M/M/B: mg/kg) that is known to obtain more safe and effective surgical operation time was examined in *Microtus montebelli* and such optimum concentration was determined. That results revealed that mortality with Somnopentyl was higher and anesthesia score was lower in male and female, compared with mixture anesthetic. When all concentration tested in male and 0.3/4/5 (M/M/B) and 0.23/3/3.75 of concentrations in female were administrated, more effective surgical operation time and anesthesia score was obtained. Moreover, it was suggested that optimal concentration was 0.23/3/3.75 in *Microtus montebelli*, since disorder of respiratory rhythm and several time of apneic states were observed in many voles administrated with 0.3/4/5. Next, we examined the effect of mixture anesthetic on number of offspring from non-surgical embryo transfer (NSET) and AI. As results, there was no detrimental effect. Furthermore, with proper interval, it was shown that mixture anesthetic could be used repeatedly (at least three times), suggesting that recipient for NSET or AI is able to use several times and total number of offspring will be increased.

In Chapter 6, to examine optimum condition for IVF, hypotaurine treatment at pre-culture or insemination with fresh spermatozoa was investigated. This result showed that although fertilization rate was not affected by hypotaurine treatment in IVF with fresh spermatozoa, fertilization rate with FT spermatozoa was increased. Next, when we examined media for IVF embryos, development of embryos arrested at 2 cell stage in all media tested. Although EDTA which is known to release the 2 cell block in mice was also examined, there was no effect on vole embryos. From these results, we determined to transfer embryos into oviducts of recipient to produce offspring from IVF embryos. Although litter sizes derived from IVF using fresh and FT spermatozoa were low, we demonstrated that the pups could be produced. Moreover, we compared Somnopentyl with mixture anesthetic on production of offspring from surgical ET. That results showed that mixture anesthetic tended to show higher pregnancy rate and lower

abortion rate, although there was no difference on litter size and weight of offspring between Somnopentyl and mixture anesthetic.

In Chapter 7, we performed ICSI with fresh and FT spermatozoa in a manner to mouse procedure and transferred embryos in a manner to IVF. When vole oocytes were microtus-inseminated with fresh or FT spermatozoa, oocytes resumed meiosis and formed pronucleus. Finally, we were successful in production of offspring derived from ICSI embryos.

Taken together, 1) sperm cryopreservation procedure was successfully applicable to mouse system and litter size similar to natural mating could be obtained by non-surgical AI with FT 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 using non-surgical ET 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 IVF and ICSI embryos could be produced. Overall, the results show that ARTs modified for voles could be efficiently contributed to animal supply and conservation of not only *Microtus montebelli* but also other vole species.