

論文審査の結果の要旨

申請者名 影 山 敦 子

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ド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。ホンド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ドハタネズミにお

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 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。

以上のように、本論文はホンドハタネズミにとどまらず、ハタネズミ属の生殖補助技術を用いた動物供給や種の保存に大きく貢献できる可能性を示すものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。

よって審査委員一同は、本論文が博士（応用生命科学）の学位論文として十分な価値を有するものと認め、合格と判定した。

最終試験の結果の要旨

申請者名 影 山 敦 子

成 績 : 合 格

審査委員一同は、平成28年5月12日、学位論文審査申請者に対し、論文の内容ならびに関連事項について試験を行った結果、本申請者が博士（応用生命科学）の学位を受けるに必要な学識を有するものと認め、合格と判定した。

論文目録

報告番号	博応甲 第 号	申請者氏名	影山 敦子
学位論文			
1. 題目 ¹⁾ 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			
2. 印刷公表の方法及び時期 ^{2) 3)}			
公表（予定）年月日	出版物の種類及び名称 ⁴⁾		
平成 年 月 日	Establishment of superovulation procedure in Japanese field vole, <i>Microtus montebelli</i> . [英文]		
公表内容	Theriogenology (DOI information: 10.1016/j.theriogenology. 2016.03.012)		
全文・要約	(Kageyama A, Tanaka M, Morita M, Ushijima H, Tomogane H, OkadaK)		
公表（予定）年月日	Anesthetic effects of a mixture of medetomidine, midazolam and butorphanol on producing offspring of Japanese field vole, <i>Microtus montebelli</i> .		
平成 年 月 日	The Journal of Veterinary Medical Science 78巻8号(2016年8月号)		
公表内容	掲載予定		
全文・要約	(Kageyama A, Tohei A, Ushijima H, OkadaK)		
3. 冊数	2 編		
参考論文 ⁵⁾	なし		

- 注 1 学位論文の題目が外国語の場合は、日本語訳を併記する。
 2 論文は公表予定を含め、すべて併記する。
 3 論文は発表年代順に記載する。
 4 共著者全員の氏名を記載する。和文の場合は姓だけでもよい。
 5 参考論文がある場合は、学位論文の公表の記載に準じて表示する。