

第6回麻布大学 生殖・発生工学セミナー

ラット前核期胚のガラス化保存法の検討

倉持 隆司

株式会社 ワイエス研究所

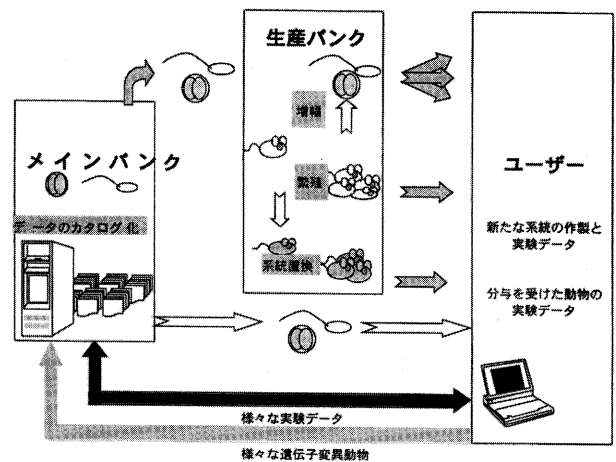
凍結胚によるTgラット作製の初期の取り組み

凍結保存した前核期胚をDNAマイクロインジェクションの材料として用いる事でTg作出に関する煩雑な手順を軽減することが出来る。この実証についてはマウスを用いた実験で1991年にLiboらによってなされている(1)。トランスジェニックラットを中心に研究を展開してきた当時のYSNT研究所にとって、体サイズの大きいラットにおいてはスペースやコストが大きいため、この手法の導入はTgラット作製システムの効率化にとって重要な課題となっていた。そこで修正2段階緩慢凍結保存法を用いてTgラットの作出を試み通常での非凍結でのTg作出効率と比較する取り組みを行い、凍結保存胚のTg作製への利用が効率的に行える事を証明した(2)。これにより、ドナーとレシピエントを同調して準備するための煩雑さからも開放された。

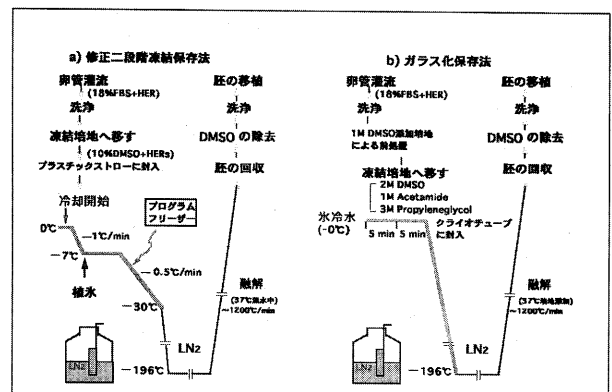
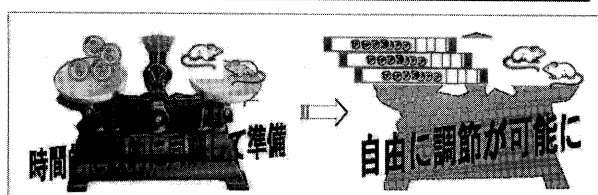
胚バンク構想

- i) 研究資源保存としての動物胚保存
遺伝子改変動物や突然変異動物が国際的に行われ

る時代において、今後も数限りなく新しい動物が研究資源として生み出される事が予測される。今世紀は、これらの情報を自由に入手し、分与される動物を使って生命科学に寄与する時代を迎える。このような「動物胚バンク構想」に基づいて、動物が自由に提供されるために、動物の分与生産をサポートするような体制の構築、情報を自由に入手できるシステム構築が整備されている。



	注入胚数	産子数	Tgラット数	作出効率%
非凍結胚	231	66	8	3.5
凍結胚	241	59	8	3.3



ii) 標準化

動物胚の研究資源としての保存への取り組みは90年代初頭よりマウスを中心に精力的に行われて来ており、現在では熊本大学動物資源開発研究センター(CARD)、理研バイオリソースセンター(BRC)などに集約されつつある。そこで採用されている胚の保存方法は中尾らによって開発されたDAP213保存液を用いたガラス化保存法である(3)。本法は培養液までキット化されていることから、バンクに登録された動物資源へのアクセスを容易にしている。この方法をラット用に書き換える事が出来れば、トランスジェニックラットが研究資源として有効活用される基礎が固まると言える。

ガラス化保存法の取り組み

現在我々のラット胚の保存に関する取り組みについて紹介する。これまでの経緯をふまえ、以下の目標よりラット胚のガラス化保存について実験を開始したので、これまでの成果について報告する。

1. 既存のマウス簡易ガラス化法をベースにラットに適応させるための「修正」を基本とした。
2. ゲノム時代を背景に今後の利用の増えると考えられる「近交系」をベースに実験を考えた。
3. Tg作製への利用を主眼として、凍結前核期胚にDNAマイクロインジェクションを実施し、非凍結でのTg作出効率と比較した。

展望

ラットにおいては、研究資源としての胚保存への取り組みは、ヒューマンサイエンス財団の運営するヒューマンサイエンス研究資源バンク(<http://www.jhsf.or.jp/bank/animal.html>)と、京都大学を中心とするナショナルバイオリソースプロジェクト-ラット(<http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/nbr/homejp.htm>)が既に運営を開始している。今後この胚バンク事業とも協調を図りながら、基本凍結法として推奨する事の出来るラットの凍結保存方法の開発に取り組んでゆく。今後も増え続けることが予測される実験モデルラットが、これら胚バンクを介して多くの研究者に有効に利用される事で、国内の生命科学のさらなる進展を期待したい。

文献

- 1) Leibo, S.P., Demayo, F.J. and O'Malley, B. (1991) Production of transgenic mice from cryopreserved fertilized ova. *Mol. Reprod. Dev.*, 30, 313-9.
- 2) Takahashi R, Hirabayashi M, Ueda M. Production of transgenic rats using cryopreserved pronuclear-stage zygotes. *Transgenic Res.* 1999; 8(5): 397-400.
- 3) Nakao K, Nakagata N, Katsuki M. Simple and efficient vitrification procedure for cryopreservation of mouse embryos. *Exp Anim.* 1997; 46(3): 231-4.