

## 論文内容の要旨

申請者氏名 Gemma Puspa Sari

マウスは、解剖学的、生理学的、および遺伝的にヒトと類似性があるために、生命科学の実験動物として数多く用いられてきている。特に遺伝子改変マウスが誕生して以来、遺伝子改変マウス作製における作製時間の短縮、コストや労力の削減のための様々な技術開発がなされてきた。しかし、遺伝子改変マウスを誕生させるために必要な遺伝子改変を行った受精卵を移植するための代理母である偽妊娠マウスの作製方法は、実験系が確立されて以来、ほとんど進歩していなかった。マウスを偽妊娠状態にさせるためには、発情周期を合わせたり、ホルモン投与を行ったりするだけでは、コントロールできず、精管切除されたオスと交配させ、交尾刺激を与えなければならない。また、オスと交配させる前日に、発情前期または発情期状態のメスを選ぶなければならないが、選択の精度は、実験者の経験や方法に依存する。このため、実験初心者が遺伝子改変動物作製技術を習得するために、偽妊娠マウスを効率的かつ安定に準備することは困難であった。

そこで、本研究では、実験初心者でも簡単に偽妊娠マウスを作製できる方法の開発を試みた。まず、発情前期または発情期状態のメスマウスを選ぶ方法として知られていた膣スメア法を用いてメスマウスを選択し、交配を行ったところ、約 64%のメスマウスがオスマウスと交配することが確かめられ、無作為に選ぶよりも効率的であることが分かった。しかしながら、膣スメア法で発情前期または発情期状態のメスマウスを選ぶには、多数のメスマウスのサンプルを回収しなければならず、初心者が遺伝子改変動物作製技術を習得する目的としては、労力に見合わないと考えられた。次に、発情周期の同調を誘導することを目的とし、偽妊娠ラットの作製に使われている黄体ホルモン放出ホルモンアゴニスト (LHRHa) に着目した。LHRHa のマウスでの投与量の情報がなかったため、発情周期が同調しているかどうかを指標に投与量の最適化を行った。ICR メスマウスに 0 mg, 0.005 mg, 0.01 mg, 0.02mg, 0.04mg/mouse の条件で LHRHa を投与し、96 時間後に膣スメア法による発情期の判定を行った。その結果、0.02mg/mouse の投与条件で 73.3%のメスマウスが発情期であると判定され、LHRHa 投与により発情周期が同調することがわかった。続いて、野生型オスマウスとペアにし、翌日の膣栓の存在による交尾率を調査したところ、0.02mg/mouse の LHRHa の単回投与では、交尾率は 40%以下だったが、2 日連続投与することにより 70%以上の交尾率になることが確かめられた。さらに、これら交尾したメスマウスの妊娠率、妊娠期間、同腹仔数、および産仔の体重、翌日までの生存性は、自然妊娠マウスと比べても異常がないことが確かめられた。本研究にて確立した偽妊娠マウスの作製方法は、実験初心者でも LHRHa 投与のみで高効率に偽妊娠メスマウスを作製できる方法としてだけでなく、マウスの維持総数を減らすことも可能にした。

やむを得ない事由[ 図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ( ) ]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】

## 論文審査結果の要旨

申請者氏名 Gemma Puspa Sari

マウスは、解剖学的、生理学的、および遺伝学的にヒトと類似性があるために、実験モデル動物として最も多く用いられており、多数の遺伝子改変モデルや疾患モデルが確立されてきた。これら遺伝子改変モデルは、その作製技術や受精卵・配偶子の凍結保存技術の発展により、効率的に作られ、バイオリソースとして保管・配布されるようになってきている。しかし、凍結胚や体外受精などの方法を用いて、受精卵から復元させるためには、代理母となる偽妊娠マウスが必要不可欠であるが、その準備方法は、労力や時間、コストを伴う非効率的な方法であり、おおいに改善の余地があった。

申請者は、この偽妊娠マウスを容易に準備する方法の確立を目指して、本研究を行った。まず、オスと交配すると言われていた発情前期・発情期のメスマウスを膣スミア法にて判定し、精管結紮したオスマウスと交配させ、翌日プラグ形成を確認することで、交配したと判定した。その結果、発情前期・発情期と判定したメスマウスの64%がオスと交配することが分かり、他の発情周期よりも有為に交配しやすい事が示された。しかし、この方法では、自然な状態の発情周期のメスを解析することから、必要数の6-7倍のメスマウスについて解析しなければならず、多大な労力を伴う方法であった。一方で、膣スミア法で発情前期・発情期のメスが交配しやすい事が確かめられたため、申請者は、次に発情周期を同調させる方法に着目し、ラットで成功例のある黄体ホルモン放出ホルモンアゴニスト(LHRHa)の投与による発情周期の同調を試みた。マウスにおいて、LHRHaを適用した報告は、これまでにないため、まず、マウスにおいてLHRHaで発情周期が同調するかどうか、様々な投与量で検討し、0.02mg LHRHa/mouseで投与した4日後、70%以上のメスマウスが発情期に同調することを明らかにした。さらに、0.02mg LHRHa/mouseの単回投与では、交配率の上昇は認められなかったが、交配4日前と3日前の2回投与により、70%以上のメスマウスがオスマウスと交配し、その後、妊娠、産仔への影響はほとんどない事を確かめた。

以上により、本論文では、LHRHa投与により計画的な妊娠マウス作製方法を確立するに至った。この方法は、妊娠・偽妊娠マウスを必要とする実験を計画的に行えるというだけでなく、発情周期を制御することで、マウス飼育総数を80%近く削減することも可能とした。今後、動物愛護の観点からも、偽妊娠マウスや妊娠マウスを作製する方法として、動物実験のスタンダードプロトコールとしての適用が期待される。

以上のように、本論文は遺伝子改変動物作製や発生生物学への適用により生命科学の分野への貢献が期待されるもので、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(バイオサイエンス)の学位論文として価値あるものと認めた。

やむを得ない事由[ 図書出版、学術雑誌等への掲載、特許・実用新案出願、個人情報等の保護、その他( ) ]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】