

## 初期胚の体外培養がマウスの個体発生に及ぼす影響

小田 佳奈子

新潟大学大学院医歯学総合研究科  
分子細胞医学専攻 発生・生殖工学分野  
(指導: 笹岡 俊邦教授)

### 英語の題名

Effect of *in vitro* culture of an early embryo on development of a mouse.

Kanako Oda

(Research supervisor: Prof. Toshikuni Sasaoka)

### 分野の英名

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

### 要旨

【目的】生殖工学的操作はマウスの生産に広く活用されているが、私は、生殖工学的操作で欠かせない体外培養が初期胚の発生および個体発生に及ぼす影響を明確にするため、体外培養した初期胚の発生の早さ・細胞数・遺伝子発現の解析、および体外培養胚から生産した個体と自然交配で得た個体の主要な臓器重量の比較等の解析を行った。

【方法と結果】マウス胚を組換えヒトアルブミン(r)を加えた rKSOMaa 培地または rMW 培地で培養を行ったものを体外培養(In vitro)胚とし、偽妊娠マウスに移植を行ったものを母体内発生(In vivo)胚として解析を行った。In vitro 胚

と In vivo 胚の形態を比較した結果、胚盤胞期胚の形態の違いが観察され、In vitro rKSOMaa 区および In vivo 区では高率で胚盤胞期胚へと発生することが分かった。胚盤胞期胚への発生時期を解析したところ、In vitro rKSOMaa 区は In vitro rMW 区より胚盤胞期胚への発生が早いことが観察され、培養培地の違いによっても発生率に違いが見られた。免疫抗体法を用いて簡便に媒精後 96 時間における内部細胞塊 (ICM) および栄養外胚葉 (TE) の細胞数を計数した結果、In vitro rKSOMaa 区では、In vivo 区に比較して、ICM 数は少ない ( $p < 0.05$ ) が、TE 数は多く ( $p < 0.05$ )、総細胞数は同等であった。TUNEL 法を用いてアポトーシス細胞数を計数した結果、In vitro rKSOMaa 区および In vivo 区と比較し In vitro rMW 区で多かった ( $p < 0.05$ )。胚移植を行い、妊娠 19.5 日目における産仔への発生数と総着床数を計数した。In vitro rKSOMaa 区では総着床数が多いにもかかわらず、In vivo 区よりも産仔への発生数が低かった。In vitro rMW 区は産仔率、総着床率共に低かった ( $p < 0.05$ )。体重および臓器重量の比較した結果、出生後 52 週では In vitro rKSOMaa 区で体重が重く、メスでは内臓以外の重量がオスでは内臓重量が多かった。インプリント遺伝子と分化マーカー遺伝子の発現解析では、In vitro rKSOMaa 区では In vivo 区に対して、インプリント遺伝子である *H19* の発現は低かったが、一方、栄養外胚葉の分化マーカーである *Cdx* と未分化細胞マーカーである *Nanog* は有意に高い値を示した。

【考察】マウス初期胚は体外培養を行うと、母体内培養を行ったものと比較し、胚の形態、発生時期並びに細胞数に差を生じ、産仔率の低下と成熟後の体重の増加という個体への発生に大きく影響を受ける事が示された。また、体外培養下で胚盤胞期におけるインプリント遺伝子の発現低下が確認された。この

ことは体外培養によりインプリント遺伝子のメチル化状態がリセットされていない部分があることを示唆している。

【結論】体外培養胚は、母体内発生胚に比べて胚盤胞期胚へ高効率で早く発生するが、インプリント遺伝子および分化マーカー遺伝子の発現に変化が見られ、産仔率に差があった。また、体外培養胚由来の個体は、自然交配由来の個体に比べ、成熟期の体重・臓器重量が増加していた。本研究により、自然交配と同等の動物生産に向けて体外培養を最適化する指標が明らかとなった。

#### キーワード

マウス初期胚, 体外培養, 生殖工学, ゲノムインプリンティング

#### 別刷請求先

〒951-8585 新潟市中央区旭町通 1-757 新潟大学脳研究所生命科学リソース  
研究センター バイオリソース研究部門 動物資源開発研究分野  
小田 佳奈子

## 緒言

生殖工学技術の進歩は目覚ましく、生命科学研究においては必須の技術となっている。体外受精あるいは顕微授精など生殖工学的操作を用いて生まれたマウスは、何ら問題なく成長することが知られているが、全く正常であると結論した報告は見られない。我々は生殖工学的操作を用いて日々マウスを生産している。その中で、オスの体重が増加する傾向を見いだした。最近、顕微授精を行うと、産仔の遺伝子発現にバラつきがあることが報告された<sup>1)</sup>。また体外培養し生産されたオスマウスでは精子運動性が悪く、受精効率が変わることも報告されている<sup>2)</sup>。これらの結果は、体外培養が個体発生に影響を及ぼし、自然交配により生産した個体とは異なる表現型となることを示唆している。個体間で特性に違いが生じることは、遺伝子改変マウスの解析にとって大きな問題である。また、マウス胚の体外培養において、現在多用されている培地である KSOM は、胚盤胞までの発生を高率で促進することが知られている。このような特徴は、高率に発生させるという点では優れていることを示している。しかし、KSOM による体外培養が胚発生を促進することについて、遺伝子発現の変化への影響及び個体発生への影響が検討されている。培養条件を最適化する際に、発生速度を最重視するのは適切でないことを示唆する以下のような報告もある。発生に一定の時間が掛かるのは、インプリンティング遺伝子の最適化に時間が必要であるという仮説が提唱されている<sup>3)</sup>。また、胚盤胞期でアポトーシス細胞の多さは、遺伝子発現にバラつきを生じ易いためであるという報告がある<sup>2)</sup>。

今回、生殖工学的操作で欠かせない体外培養が個体発生に及ぼす影響を明確にする必要があると考え、初期胚を体外培養して生産した個体と自然交配で生

まれた個体について、主要な臓器重量の比較等の解析を行った。

## 材料と方法

### 動物実験

本研究は新潟大学動物実験指針に従い、新潟大学動物実験倫理委員会の審査を受け、学長に承認された計画に基づき実施した。

### 胚の採取，体外受精，体外培養

メスマウスはC57BL/6N Cr1Cr1j (B6N) を日本チャールスリバーより購入した。オスマウスは発光オワンクラゲの GFP 遺伝子を組込み全身から緑色の蛍光を発する GFP トランスジェニックマウス (GFP) を使用した<sup>4)</sup>。体重測定および臓器重量測定を行うための個体作成には B6N オスマウスを使用した。胚移植のための偽妊娠マウスの作成には Jc1:MCH (ICR) (日本クレア) を使用した。B6N メスマウスと GFP オスマウスを体外受精し胚を得た<sup>5)</sup>。体外受精には TYH 培地を使用した<sup>6)</sup>。媒精後 6 時間に前核の形成を確認し、受精判定を行った。その後、媒精後 8 時間までに偽妊娠マウスに移植を行ったものを母体内発生 (In vivo) 胚とした。In vivo 胚の解析には、卵管および子宮から灌流し得られた胚を用いた。また前核形成を確認した後、マウス胚を KSOMaa 培地<sup>7)</sup>または MW 培地<sup>8)</sup>で培養を行ったものを体外培養 (In vitro) 胚とした。アルブミンの製造ロットによる差を抑えるため培地に組換えヒトアルブミン (r) を添加し培養を行った<sup>9)</sup>。以降 KSOMaa 培地は In vitro rKSOMaa , MW 培地は In vitro rMW と表記する。培養は 5% 炭酸ガス気相下で行った。

## マウス初期胚の形態および発生時期の解析

胚の形態および発生時期の解析は、In vitro rKSOMaa または In vitro rMW で培養を行った胚を媒精後 8 時間から 24 時間ごと実体顕微鏡下で観察した。In vivo 胚においては媒精後 8 時間までに偽妊娠マウスに移植を行った後、媒精後 24 時間ごとに卵管および子宮から灌流し得られた胚を観察した。胚の写真はオールインワン蛍光顕微鏡 (KEYENCE) で撮影した。

## 免疫染色

媒精後 96 時間の胚を 4%パラホルムアルデヒド溶液 (PFA, WAKO) で 20 分間固定した。免疫染色は既報<sup>10)</sup>に従い行った。一次抗体としてウサギ IgG ポリクローナル抗 Oct3/4 (1:100 希釈, Santa Cruz Biotechnology) とマウス IgG モノクローナル抗 Cdx2 (1:200 希釈, BioGenex) を使用した。二次抗体には Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG および Alexa Fluor® 546 goat anti-rabbit IgG (1:1000 希釈, Invitrogen) を用い、対比染色として DAPI (2  $\mu$ g/ml, DOJINDO) で核染色を行った。染色後スライドガラス上面に胚を置き、カバーガラスで圧片して標本を作成した。標本はオールインワン蛍光顕微鏡で観察した。

## TUNEL 染色

媒精後 96 時間の胚を 4%PFA で固定し、検出には TMR in situ 細胞死検出キット (Roche Applied Science) を使用した。検出方法はキットの手順に従った。

## 個体作成

In vitro rKSOMaa および In vitro rMW で培養を行った胚は、媒精後 72 時間まで培養した後、偽妊娠 2.5 日雌の子宮に移植を行った。In vivo 胚は、媒精後 8 時間までに偽妊娠 0.5 日雌の卵管に移植した。妊娠 19.5 日目に、自然分娩および帝王切開にて産仔を得た。偽妊娠マウスの子宮を解剖し、着床痕を調べた<sup>8)</sup>。体重および臓器重量を In vitro rKSOMaa 胚由来個体、In vivo 胚由来個体(In vivo (IVF))および自然交配後母体内発生胚由来個体(In vivo (NM))で比較した。

## 体重測定

動物の飼育にはプラスチック製ケージ(日本チャールスリバー)を使用し、床敷はチップ(ペパークリーン, 日本エスエルシー)を用いた。飼料は固形飼料(CRF1, オリエンタル酵母)を自由に摂取させ、水は限外ろ過水を自由摂取させた。飼育条件は、8 時点灯, 20 時消灯の 12 時間明暗で、温度  $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , 湿度  $50\% \pm 10\%$  で制御した。体重の測定は、出生後 4 週までは 7 日毎, その後は 4 から 5 週間隔で出生後 52 週まで行った。

## 臓器重量測定

出生後 52 週間飼育した後、臓器重量を測定した。内臓は舌から直腸までの胸腔内臓器, 腹腔内臓器および臓器周囲の脂肪を繋げて採材した。臓器は、脳, 脾臓, 肝臓, 心臓, 腎臓, 前頸骨筋を、オスにおいては精巣を採材し、臓器周囲の脂肪等を除いて臓器実質重量を測定した。採材した臓器はプラスチックシ

ヤーレ(60mm, IWAKI)に載せ、電子天秤(Sartorius)で測定し、0.0001g以下を四捨五入した。

## インプリント遺伝子と分化マーカー遺伝子の発現解析

媒精後 96 時間の胚盤胞期胚を用いて mRNA 発現の解析をおこなった。胚 2 個を 20U Protector RNase Inhibitor (Roche Applied Science) 存在下で凍結融解することにより RNA を抽出し、SuperScript® VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen)にて cDNA を合成した。qRT-PCR は Thermal Cycler Dice® Real Time System (TaKaRa BIO INC)を用いて 96 マルチウェルプレート上で行った。増幅反応は、SYBR® Premix Ex Taq™ II Tli RNaseH Plus (TaKaRa BIO INC)のプロトコールに従い、95°C30 秒による初期変性後、95°C5 秒、60°C30 秒の 2 ステップ PCR にておこなった。各遺伝子の Threshold Cycle (Ct) 値は、Second Derivative Maximum (SDM) 法により計算された値を採用し、発現量比の算出には、REST 2009 Software (QIAGEN) を用い、 $\Delta \Delta Ct$  法により計算した。具体的には内在性コントロール遺伝子として *Gapdh* を用い、In vivo 胚に対する In vitro rKSOMaa 胚の比を求めた。なお qRT-PCR に用いたプライマーは TaKaRa BIO INC より購入した。使用したプライマーと Primer Set ID は以下の通りである。*Gapdh*(MA050371), *Igf2*(set1:MA086208), *Igf2*(set2:MA091501), *H19*(set1:MA133628), *H19*(set2:MA155217), *Cdx*(MA095459), *Nanog*(MA143791), *Pou5f1*(MA152623), *Peg10*(MA129794)。

## 統計学的処理

マウス初期胚の胚盤胞期胚への発生率、産仔への発生率は、百分率を角度変



換し、分散分析によって区間の差の有意性を検討した。それ以外の解析は Mann-Whitney 検定を用いた。すべての数値は平均±標準誤差 (Mean±SEM) で表記した。P 値が 0.05 未満を統計学的有意とした。

## 結果

### 体外培養胚と母体内発生胚の形態比較

媒精後 24 時間から 96 時間まで経時的に実体顕微鏡下で初期胚の形態を観察した(図 1)。媒精後 72 時間において、In vitro rKSOMaa 区では、胚腔が形成され(胚盤胞腔)、次第に拡張し拡張胚盤胞期胚に発生している胚と孵化が始まった胚盤胞も観察された(図 1A)。媒精後 96 時間においてはほぼ全ての胚が拡張胚盤胞期胚へと発生した(図 1B)。In vitro rMW 区は、媒精後 72 時間において、割球がコンパクションを起こして集塊状になった桑実胚が多く、発生が途中で止まり、変性退行胚も観察された(図 1C)。媒精後 96 時間においては、胚盤胞期胚に混じり、変性退行胚が多く観察された(図 1D)。

In vivo 区は、媒精後 72 時間において、胚盤胞期胚への発生が観察されたが、In vitro rKSOMaa 区と比較し胚盤胞腔の拡張は少なかった(図 1E)。媒精後 96 時間においては、In vitro rKSOMaa 区と同様にほぼ全ての胚が拡張胚盤胞期胚へと発生し、孵化した胚も観察された(図 1F)。

これらの結果より、各区において胚の発生形態に違いがあることが観察され、In vitro rKSOMaa 区および In vivo 区では高率で胚盤胞期胚へと発生することが分かった。

## 胚盤胞期胚への発生時期の解析

媒精後 72 時間および 96 時間における、胚盤胞期胚への発生率を検定した(表 1)。In vitro rKSOMaa 区は媒精後 72 時間で供試胚 100 個中 75 個 (75%) の胚が胚盤胞期胚に発生していた。媒精後 96 時間においては、供試胚 100 個中ほぼ全てである 97 個 (97%) の胚が発生していた。In vitro rMW 区は媒精後 72 時間で供試胚 60 個中 5 個 (8%) の胚のみが胚盤胞期胚へと発生し、媒精後 96 時間でも 27 個 (45%) と In vitro rKSOMaa 区および In vivo 区と比較し有意に低い発生率であった。In vivo 区は媒精後 72 時間で供試胚 108 個中 44 個 (41%) の胚が胚盤胞期胚へ発生し In vitro rKSOMaa 区と有意差があったが、媒精後 96 時間では供試胚 29 個中 27 個 (93%) と In vitro rKSOMaa 区と同様に高い胚盤胞期胚への発生率が得られた。これらの結果より、In vitro rKSOMaa 区では In vitro rMW 区と In vitro rKSOMaa 区を比べ胚盤胞期胚への発生時期が早いことが観察された。また、In vitro rKSOMaa 区と In vivo 区では媒精後 96 時間で高い胚盤胞期胚への発生率が得られたのに対して、In vitro rMW 区では有意に低い発生率であったことから、培養培地の違いによっても発生率に違いが生じることが観察された。

## 胚盤胞期胚の細胞数

媒精後 96 時間における内部細胞塊 (ICM) および栄養外胚葉 (TE) の細胞数を計数した。図 2 に示すように免疫抗体法を用いて、ICM は抗 Oct3/4 抗体で TE は抗 Cdx2 抗体で明瞭に区別することが出来る。加えて対比染色を行うことで総細胞数を計数した。結果を表 2 に示す。In vitro rKSOMaa 区では、In vivo 区に比較

して、ICM 数は少ないが、TE 数は多く、総細胞数はほぼ同じであった。In vitro rMW 区では、In vitro rKSOMaa 区に比較して、ICM 数、TE 数、総細胞数のいずれも少なかった。

### 胚盤胞期胚のアポトーシス細胞数

TUNEL 法を用いて媒精後 96 時間におけるアポトーシス細胞数を計数した(図 3)。総細胞数当り TUNEL 陽性細胞の割合は、In vitro rMW 区(n=12)で In vitro rKSOMaa 区(n=17)と In vivo 区(n=9)と比較し有意に高かった。

### 産仔への発生数

妊娠 19.5 日目における産仔への発生数と総着床数および割合を表 3 に示す。In vitro rKSOMaa 区は、In vivo 区に近い産仔率であった。一方 In vitro rMW 区は低い産仔率であった。総着床率は In vitro rKSOMaa 区で高く、In vitro rMW 区または In vivo 区に対し有意差があった。これらの結果より、In vitro rKSOMaa 区では総着床率が高いにもかかわらず、In vivo 区よりも産仔への発生率が低いことが分かった。In vitro rMW 区は産仔率、総着床率共に低い結果であった。

### 体重および臓器重量の比較

出生後 52 週の体重を図 4 に示す。メスマウスでは In vitro rKSOMaa 区(n=7)より得られた個体の体重は、In vivo (IVF) 区(n=9)および In vivo (NM) 区(n=10)よりも有意に重かった。オスマウスでは In vitro rKSOMaa 区(n=6)が In vivo (NM) 区(n=7)よりも有意に重かった。出生後 52 週の臓器重量を図 5 に示す。メス

マウスでは内臓以外の組織において、In vitro rKSOMaa 区は In vivo (IVF) および In vivo (NM) 両区よりも有意に重かった。オスマウスでは内臓において In vitro rKSOMaa 区が In vivo (NM) 区よりも有意に重かった。

### インプリント遺伝子と分化マーカー遺伝子の発現解析

qRT-PCR を用いて媒精後 96 時間における In vivo 区に対する In vitro rKSOMaa 区でのインプリント遺伝子発現の相対比について解析を行った (図 6)。インプリント遺伝子である *Igf2* および *H19* は 2 つのプライマーセットを用いて解析を行った。In vitro rKSOMaa 区では In vivo 区に対して、*H19* の発現は低く、また、栄養外胚葉の分化マーカーである *Cdx* と未分化細胞マーカーである *Nanog* は有意に高い値を示した。*Igf2*, *Pou5f1*, *Peg10* は差が見られなかった。

### 考察

本研究では、マウス初期胚の生殖工学的操作で欠かせない体外培養が、個体への発生に影響を及ぼすことが明らかとなった。体外培養に使用する培地の違いが、胚盤胞期胚への発生率に影響するという報告<sup>11)</sup>があるが、今回我々が体外培養を行った In vitro rKSOMaa 区と In vitro rMW 区の比較においても、胚盤胞期胚への発生率に有意な差があった。また、媒精後 96 時間の ICM 数、TE 数、総細胞数を計数したところ、有意に In vitro rMW 区が少なかった。且つ胚の総細胞数当り TUNEL 陽性細胞数の比率は高かった。産仔への発生率を比較したところ、In vitro rKSOMaa 区に比べて In vitro rMW 区で非常に少ない産仔率であり、総着床数も少なかった。これらの結果は、体外培養に使用する培地の違い

がマウス初期胚の発生に大きな違いを生じることを裏付けている。また、TUNEL陽性細胞数が多く観察されたことは、アポトーシスの初期に観察されるDNAの断片化が多く起こっていることを示し、その多さが産仔率と着床率の低さ、すなわち個体への発生に影響したと考えられる。

体外培養胚(In vitro rKSOMaa区)と母体内発生胚(In vivo区)の形態を比較した結果、胚の発生形態に違いがあることが観察されたが、高率で母体内発生胚(In vivo区)よりも早く胚盤胞期胚へと発生することが分かった。媒精後96時間の総細胞数に差はなかったが、ICM数は母体内発生胚(In vivo区)に比べ体外培養胚(In vitro rKSOMaa区)で少なく、TE数は多かった。TUNEL陽性細胞数は同程度であった。しかしながら、総着床率が高い割に、産仔率は母体内発生胚(In vivo区)に比べて低いことから、発生が停止した胚が多いことが確認された。このことより、体外培養胚の胚盤胞期胚への発生時期が母体内発生胚よりも早いことは、母体内発生胚から得られた産仔との差異を生じさせることが考えられる。

出生後52週まで体重を測定した結果、メスでは体外受精後母体内発生胚および自然交配後母体内発生胚よりも体外培養胚から得られた産仔で体重が重かった。オスでは自然交配後母体内発生胚よりも体外培養胚から得られた産仔が重かった。このことは、体外培養がマウスの個体の体重に変化を与えることを示している。この体重の変化は、メスでは内臓以外に、オスでは内臓に有意な差が得られている。各臓器の実質重量に差がない結果から、メスでは皮下脂肪がオスでは内臓脂肪が増加していると考えられる。今後、代謝と脂肪の形成についての検討を行う必要がある。

自然交配で得られた産仔と体外受精(IVF)で得られた産仔では、脳、肝臓、腎臓におけるトランスクリプトームの発現に差はないとの報告がある<sup>1)</sup>。しかし顕微授精(ICSI)を行うと、IVFで得られた胚に比較しインプリント遺伝子に代表される遺伝子群の発現量が変化するとの報告がある<sup>12)</sup>。

今回、体外培養胚の遺伝子発現変化の検討のため、インプリント遺伝子群に着目した。そこで、IVFにより得られた胚を使用し、母体内発生胚(In vivo 区)に対する体外培養胚(In vitro rKSOMaa 区)でのインプリント遺伝子と分化マーカ遺伝子の発現比を解析した結果、インプリント遺伝子である *H19* が有意に低い結果が得られた。本実験で検定に用いた *Igf2* と *H19* インプリント遺伝子は、クラスターを形成し、*Igf2/H19* 領域は父親性インプリント領域であり、父親由来の *H19* が DNA メチル化されている。この状態で *Igf2* は発現し、*H19* は抑制される。逆に母親由来の *H19* は非メチル化状態であり、*Igf2* は抑制され、*H19* は発現する。しかし着床前の胚において、広範囲な DNA 脱メチル化が起こっていることが知られている<sup>13)</sup>。このことより、体外培養胚では、*H19* 遺伝子の発現が母体内発生胚(In vivo 区)に対して有意に低いことは、DNA メチル化が初期化されず、父親性インプリント領域が維持されていると考えられる。栄養外胚葉の分化マーカである *Cdx* と未分化細胞マーカである *Nanog* は有意に高い値を示した。*Cdx* の発現上昇は、TE 数の多さに準じていると考えられる。*Nanog* の発現上昇は、In vivo 胚に比べ少ない ICM 数が個体形成に寄与するため、単位細胞当たりの発現量が上昇しているのかも知れない。

今回の研究では、体外培養がマウス個体の産仔率と体重の増加に大きく影響していることが示された。引き続き体外培養が遺伝子のメチル化と発現様式に

与える影響およびマウス個体の発生に与える影響について検討を続けていく。

## 結論

体外培養胚は、母体内発生胚に比べて胚盤胞期胚へ高効率で早く発生するが、インプリント遺伝子および分化マーカー遺伝子の発現に変化が見られ、出生時の産仔率に差があった。また、体外培養胚由来の個体は、自然交配由来の個体に比べ、成熟期の体重・臓器重量が増加していた。本研究により、自然交配と同等の動物生産に向けて体外培養を最適化する指標が明らかとなった。

## 謝辞

本研究においてご指導を賜りました新潟大学脳研究所動物資源開発研究分野の笹岡俊邦教授、横山峯介前教授、佐藤俊哉先生、藤澤信義先生、前田宜俊博士ならびに職員の皆様に深謝申し上げます。また、本研究は平成 25 年度新潟大学プロジェクト推進経費(奨励研究)の支援を受けました。

## 文献

- 1) Kohda T, Ogonuki N, Inoue K, Furuse T, Kaneda H, Suzuki T, Kaneko-Ishino T, Wakayama T, Wakana S, Ogura A and Ishino F: Intracytoplasmic sperm injection induces transcriptome perturbation without any transgenerational effect. *Biochem Biophys Res Comm*: 410:282-288, 2011.
- 2) Calle A, Miranda A, Fernandez-Gonzalez R, Pericuesta E, Laguna R and Gutierrez-Adan A: Male mice produced by in vitro culture have reduced fertility and transmit organomegaly and glucose intolerance to their male offspring. *Biol Reprod*: 87:34, 1-9, 2012.

- 3) Market Velker BA, Denomme MM and Mann MR: Loss of genomic imprinting in mouse embryo with fast rates of preimplantation development in culture. *Biol Reprod*: 86:143, 1-16, 2012.
- 4) Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T and Nishimune Y: 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett*: 407: 313-319, 1997.
- 5) 小田佳奈子, 横山峯介 : マウス胚の凍結保存, 村松正實, 山本 雅, 岡崎康司 新遺伝子工学ハンドブック. 第5版, 羊土社, 東京, pp303-308 2010.
- 6) Toyoda Y, Yokoyama M and Hoshi T: Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro. In vitro fertilization of eggs by fresh epididymal sperm. *J Animal Reprod*: 16:147-157, 1971.
- 7) Lawitts JA and Biggers JD: Culture of preimplantation embryos. *Methods Enzymol*: 225:153-164, 1993.
- 8) 野村達次, 勝木元也: 発生工学実験マニュアル —トランスジェニックマウスの作り方—. 講談社サイエンティフィック, 東京, pp109-115, 1992.
- 9) Takenaka M and Horiuchi T: Recombinant human albumin supports mouse blastocyst development, suppresses apoptosis in blastocysts and improves fetal development. *Reprod Med Biol*: 6:195-201, 2007.
- 10) Terashita Y, Li C, Yamagata K, Sato E and Wakayama T: Effect of fluorescent mercury light irradiation on in vitro and in vivo development of mouse oocytes after parthenogenetic activation or sperm microinjection. *J Reprod Dev*: 57:564-571, 2011.
- 11) Amarnath D, Wakayama S, Zhu J, Moawad AR, Wakayama T and Campbell KH: The novel use of modified pig zygotic medium for the efficient culture of the preimplantation mouse embryos. *Theriogenology*: 76:1639-1646, 2011.



12) Giritharan G, Li MW, De Sebastiano F, Esteban FJ, Horcajadas JA, Lloyd KC, Donjacour A, Maltepe E and Rinaudo PF: Effect of ICSI on gene expression and development of mouse preimplantation embryos. Hum Reprod: 25:3012-3024, 2010.

13) 牛島俊和, 眞貝洋一: イラストで徹底理解する エピジェネティクスキーワード事典～分子機構から疾患・解析技術まで. 第1版, 羊土社, 東京, pp109-129, 2013.

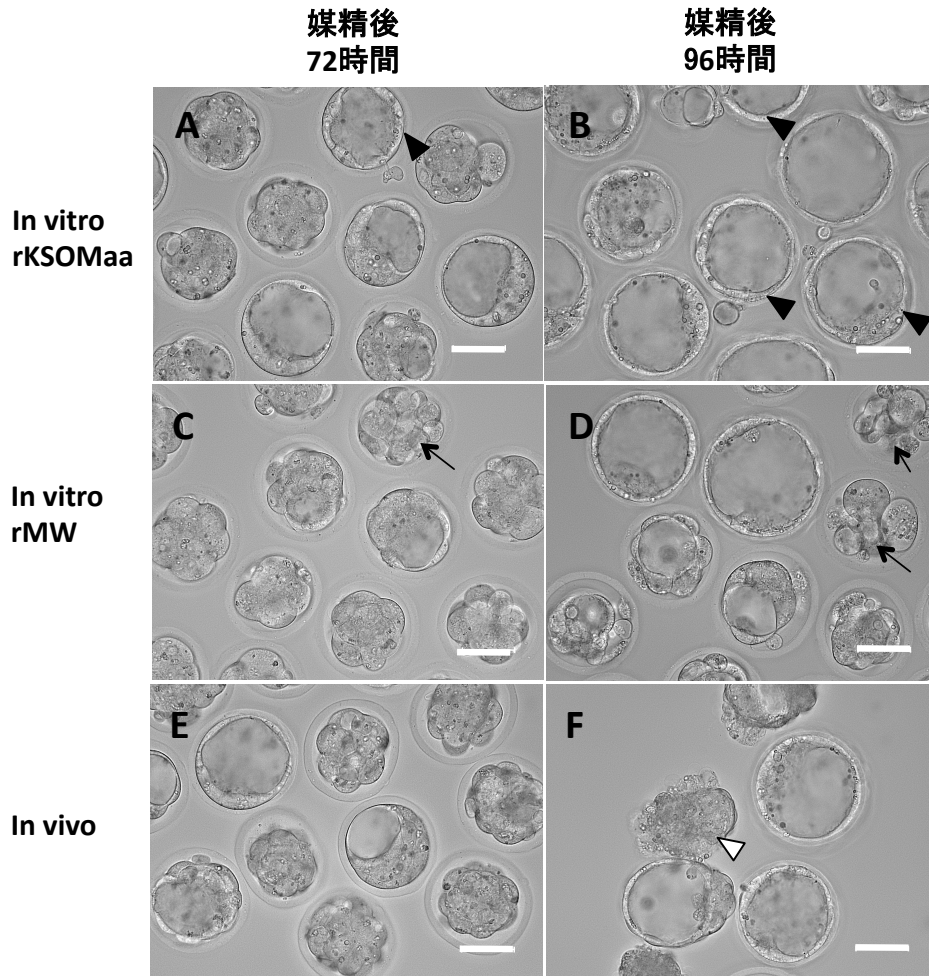


図1 体外培養胚と母体内発生胚の形態比較

A, rKSOMaaによる体外培養胚 (In vitro rKSOMaa). 胚盤胞期胚が多く, 孵化し始めた胚が観察された (▶). B, 拡張胚盤胞期胚が観察された. 孵化し始めた胚 (▶). C, rMWによる体外培養胚 (In vitro rMW). 桑実胚, 拡張が始まった胚盤胞期胚と一部割球が変性し発生が退行した胚 (変性退行胚) が観察され (→). D, 拡張胚盤胞期胚と変性退行胚 (→) が観察された. E, 母体内発生胚 (In vivo). 拡張が始まった胚盤胞期が観察された. F, 拡張胚盤胞期胚と孵化した胚 (▷) が観察された. スケールバー ; 50  $\mu$ m

表1 マウス初期胚の胚盤胞期胚への発生率

区	供試胚数	媒精後72時間(%)	媒精後96時間(%)
In vitro			
rKSOMaa	100	75(75)	97(97)
rMW	60	5(8)	27(45)
In vivo	108	44(41)	-
In vivo	29	-	27(93)

\* p<0.05

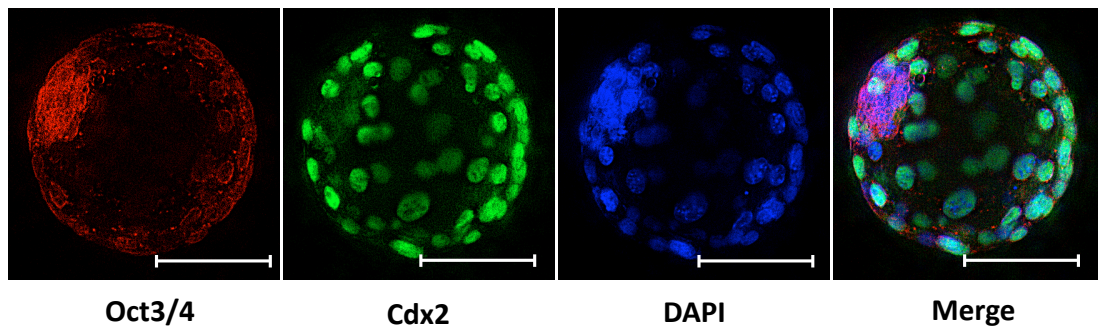


図2 胚盤胞期胚の内部細胞塊 (ICM) および栄養外胚葉 (TE) の抗体染色による区分け  
 媒精後96時間の胚で、ICMは抗Oct3/4抗体でTEは抗Cdx2抗体で明瞭に区別することが出来る。対比染色にDAPIを用いた。スケールバー；50  $\mu$  m

表2 媒精後96時間の細胞数

区	標本数	ICM数	TE数	総細胞数
In vitro胚				
rKSOMaa	34	10.6 $\pm$ 0.5	48.1 $\pm$ 1.7	58.0 $\pm$ 2.0
rMW	17	8.2 $\pm$ 0.7	39.2 $\pm$ 3.2	43.0 $\pm$ 3.0
In vivo胚	18	15.0 $\pm$ 0.9	39.4 $\pm$ 2.1	54.0 $\pm$ 3.0

\* p<0.05

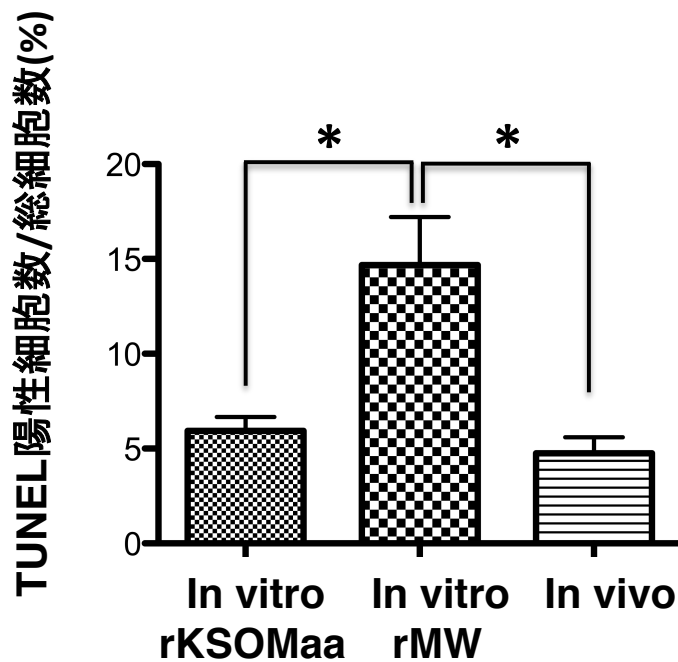


図3 媒精後96時間の胚の総細胞数当り TUNEL陽性細胞数の割合 (\*p<0.05)

表3 産仔への発生数

区	移植胚数	産仔数(%)	総着床数(%)	産仔数/総着床数(%)
In vitro				
rKSOMaa	117	52(44.4)	101(87.5)	52/101(51.5)
rMW	139	9(6.5)	62(44.6)	9/62(14.5)
In vivo	80	52(65.0)	60(75.0)	52/60(86.7)

\* p < 0.05

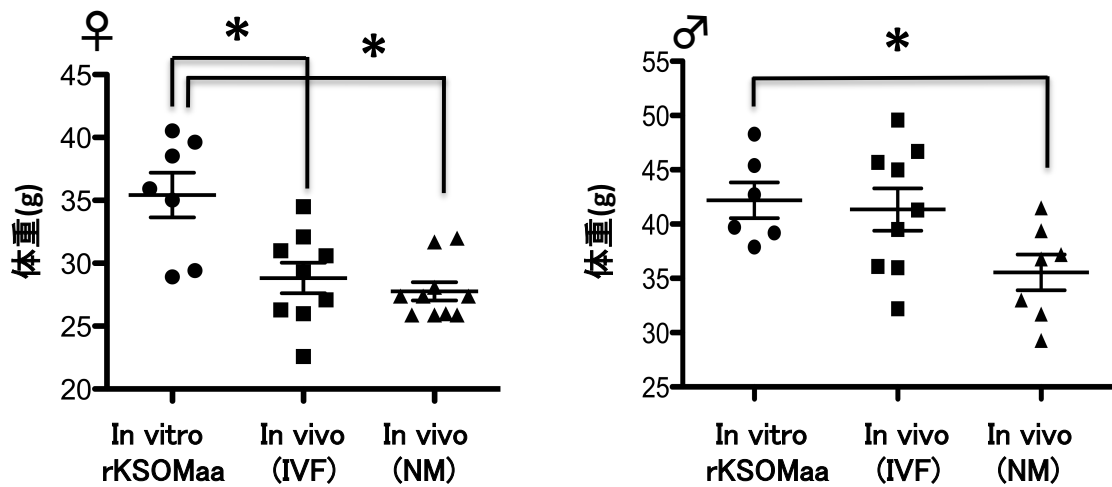


図4 出生後52週の体重比較

出生後52週において、メスではIn vitro rKSOMaaに対して体外受精後母体内発生胚(In vivo(IVF))および自然交配後母体内発生胚(In vivo(NM))両区において有意差があった。

オスではIn vitro rKSOMaaとIn vivo(NM)において有意差があった。( \*p<0.05)

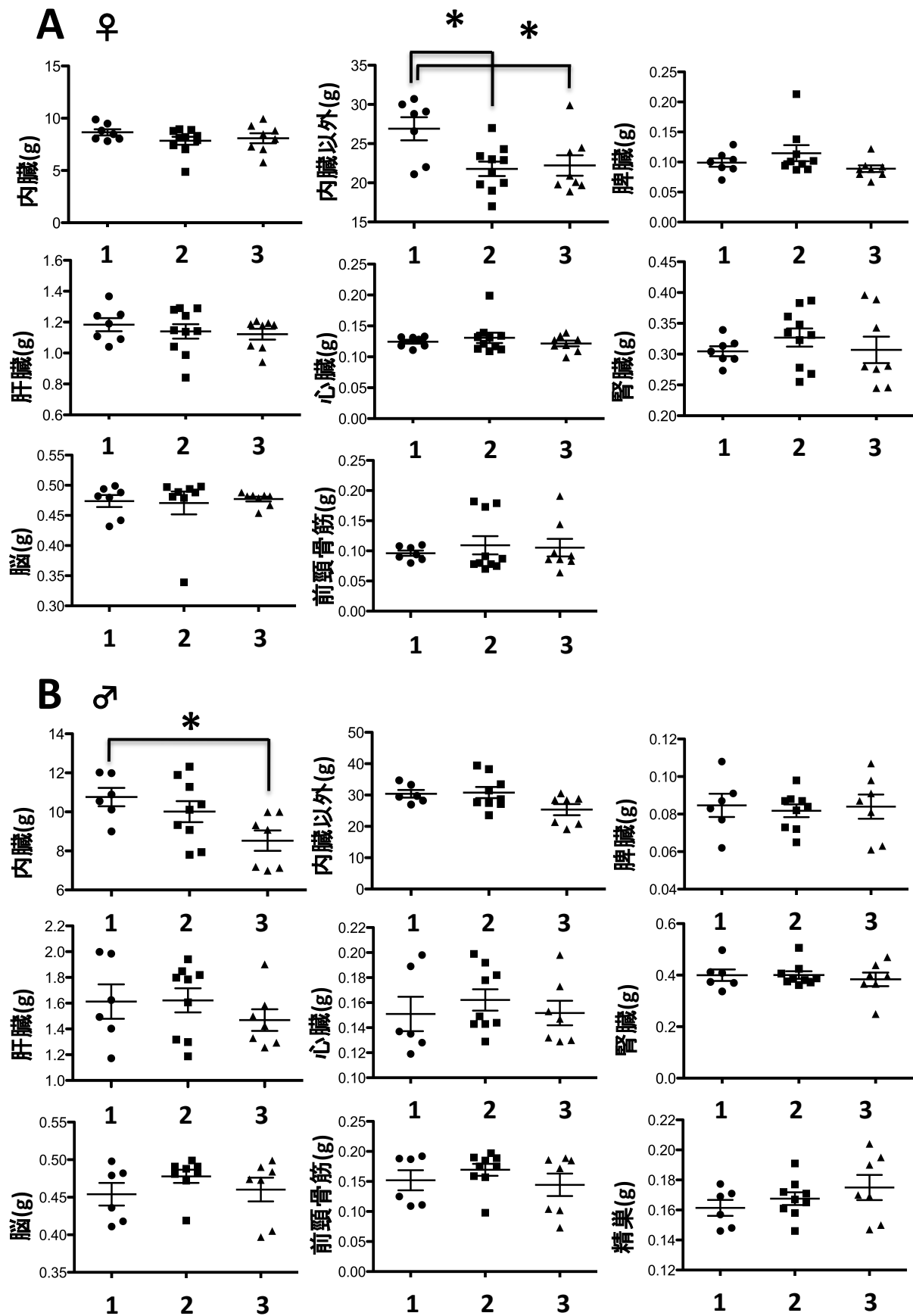


図5 出生後52週の臓器重量比較

A, メスでは内臓以外の組織において, In vitro rKSOMaaに対してIn vivo(IVF)およびIn vivo(NM)両区において有意差があった。

B, オスでは内臓においてIn vitro rKSOMaaとIn vivo(NM)に有意差があった。

1, In vitro rKSOMaa 2, In vivo(IVF) 3, In vivo(NM) (\* $p < 0.05$ )

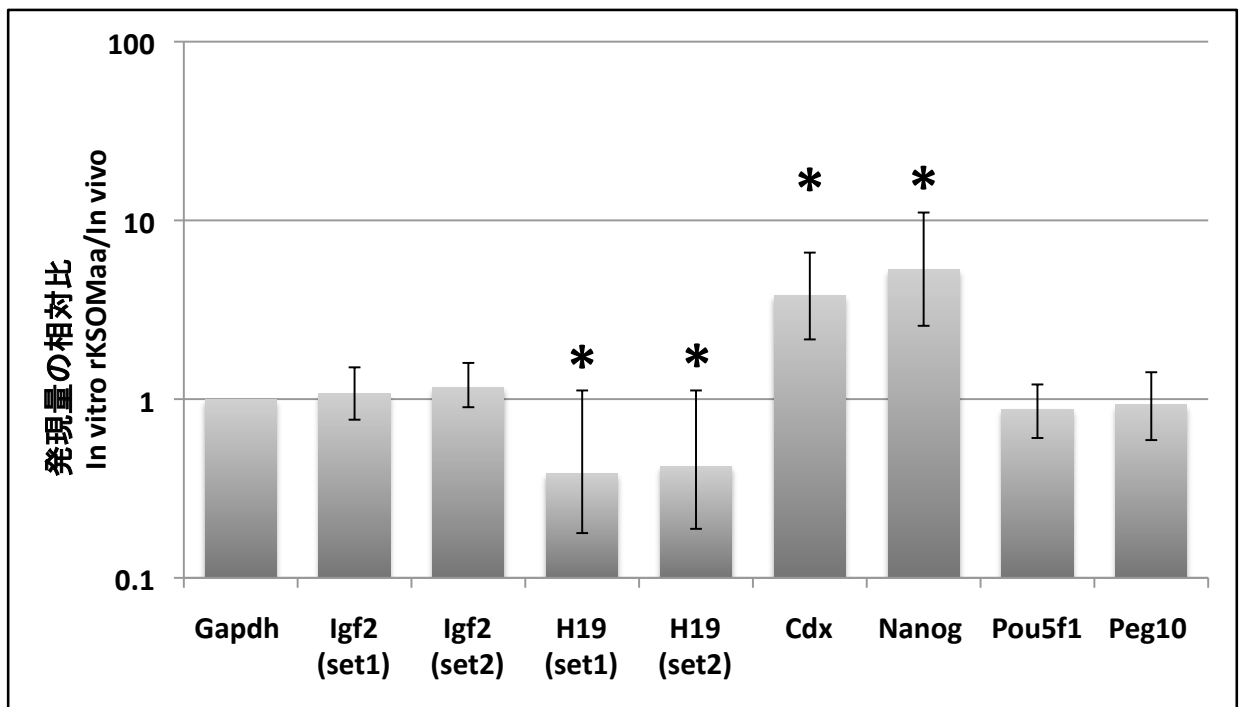


図6 媒精後96時間のIn vitro rKSOMaa胚とIn vivo胚におけるインプリント遺伝子と分化マーカー遺伝子の発現量の相対比 (\* $p < 0.05$ )