

## 動物筋組織を用いた真空乾燥処理による冷凍保存の試み

梶本 みずき<sup>1</sup>、東 里 香<sup>2</sup>、井上 達也<sup>1</sup>、久保 盛恵<sup>3</sup>、野々上 範之<sup>3</sup>、  
小橋 朱里<sup>1</sup>、折杉 卓哉<sup>1</sup>、細井 美彦<sup>1,2,4</sup>、安齋 政幸<sup>4</sup>

### 要 旨

本実験では、死亡個体から採取した筋組織に真空乾燥処理を施し、8~13ヶ月間凍結保護剤を用いず-30℃下にて冷凍保存を行った。保存された組織から修正 MIP 法を用いて筋組織由来体細胞核を回収した。得られた体細胞核は、免疫組織学的染色を行い、核内 Histone H3 および核膜構成タンパク質 Lamin B2 の局在を観察した。さらに、得られた体細胞核の一部を体細胞核移植操作により、前核様構造形成の確認を行った。真空乾燥処理を施した各動物筋組織から体細胞核の回収に成功し、0.64nL 当たりに含まれる体細胞核数は、それぞれ、6.4 個 (マウス)、5.8 個 (ケープハイラックス) であった。得られた体細胞核を用いた、免疫組織学的染色では、いずれの組織由来体細胞核にも Histone H3 および Lamin B2 の局在を認めた。体細胞核移植操作による前核様構造の形成率は、マウス 74% (43/58)、ケープハイラックス 96% (44/46) であった。以上の結果より、真空乾燥処理を施した筋組織由来体細胞核には、核膜構成タンパク質および核内 Histone H3 が存在し、前核様構造形成能力を有することから、研究資源としての保存の有効性が期待できると考えられた。

キーワード：筋組織、真空乾燥、冷凍保存、遺伝資源保存、体細胞核移植

### 1. 緒 論

これまで多くの動物種が絶滅の危機に曝されており、現存する動物から積極的に遺伝資源を保存することが必要となっている<sup>(1)</sup>。遺伝資源の保存方法の一つとして動物園や水族館による飼育下での繁殖が試みられている<sup>(2-4)</sup>。しかし、生体による遺伝資源の保存には、個体の飼養や繁殖のための輸送に掛かる莫大な費用および大規模な飼育スペースを要する<sup>(1, 5-7)</sup>。今日では、遺伝資源を保存する場合、生殖細胞や胚の凍結保存のような低温保存および顕微授精、核移植などの再生技術が進歩している<sup>(8, 9)</sup>。凍結保存を用いることは理想的な保存法である<sup>(10)</sup>が、細胞の超低温保存には液体窒素の補充や持続的な監視が必要である<sup>(11)</sup>。液体窒素を使用しない保存法としては、凍結保護剤を用いず、-20℃下において16年間冷凍保存されたマウス組織から体細胞核移植により作製したクローン胚から ntES 細胞を樹立し再度核移植操作を行うことにより産仔の産出を報告している<sup>(12)</sup>。さらに、金子らは凍結乾燥保存により保存された精子を用いた顕微授精操作により産仔の作出を報告している<sup>(13)</sup>。精子の凍結乾燥法は、凍結保存法のように液体窒素の補充が必要でなく、簡便で長期間の保存では低費用であり、遠距離輸送も費用が安価となる技術である<sup>(14)</sup>。

本実験では、新たな遺伝資源の保存方法の開発を目的とし、広島市安佐動物公園より提供されたケープ

原稿受付 2016年2月19日

本研究の一部は、近畿大学 学内助成金 21世紀研究開発奨励金「マンモス研究拠点の形成に向けて：YUKA マンモスのサンプルを用いたマンモスの総合的研究」の助成を受けた。

1. 近畿大学生物理工学部 遺伝子工学科 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930
2. 近畿大学大学院 生物理工学研究科 生物工学専攻 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930
3. 広島市安佐動物公園 〒731-3355 広島県広島市安佐北区安佐町大字動物園
4. 近畿大学先端技術総合研究所 〒642-0017 和歌山県海南市南赤坂 14-1

ハイラックスの組織へ真空乾燥処理を施し、凍結保護剤を用いず冷凍保存を行い、保存後の組織から回収された体細胞核の機能性を検討した。

## 2. 材料および方法

### (1) 供試動物

ドナー組織には、成熟齢に達した B6D2F1 マウス（日本 SLC（株））後肢大腿部筋肉組織および広島市安佐動物公園より提供頂いたケープハイラックス（*Procavia capensis*：雌）広背筋を使用した。また、体細胞核移植操作に供されるマウスは、成熟齢に達した B6D2F1 マウス（日本 SLC（株））を使用した。マウスは入荷後、概日リズムの調整（明期 7:00-19:30）を 1 週間以上行い順化した。飼育環境は、室温 23±2℃、湿度 50% 下において、飼料（CRF1R：オリエンタル酵母工業（株））および飲水を自由摂取させた。なお、本実験における動物実験の立案および実験動物の飼養と管理については、近畿大学動物実験規程に準じて行った。

### (2) 真空乾燥処理および筋組織由来体細胞核の回収

供試した各組織（マウス：300-900mg、ケープハイラックス：50-300mg）は、油回転真空ポンプ（到達圧：6.7-0.067Pa）と遠心濃縮機（TOMY, CC-105, 到達真空度：-101kPa, -760mmHg）を用いて、大気圧から真空処理を施し 30 時間組織を乾燥処理させた。乾燥させた組織は、-30℃（SANYO, BIOMEDICAL FREEZER）下で 8～13 ヶ月保存した。保存した各組織は、MIP 法<sup>(15)</sup>を若干修正して体細胞核の回収を行った。まず、4well dish（Thermo scientific）内で、酸性タイロド溶液（IS Japan）200 μL 下に 1 分間浸潤させ、余液をキムワイプで取り除いた。その後 12.5-0.75% Triton X-100 を含む Tris-EDTA buffer pH=8.0（以下、TE buffer）に組織を浸潤させ、無鉤ピンセットを用いて組織破碎を行った。続いて、溶液と共に組織を 20 μm 径 FILCONS S カップ（ASONE）に移し、遠心処理（83（×g）, 5sec.）を施すことで夾雑物の除去を行った。回収した溶液は、再び遠心処理（83（×g）, 10min）にて上清を除去した後、TE buffer を 30 μL 加え、核回収液として各実験に供した。

### (3) 核回収液に含まれる体細胞核の計測

修正 MIP 法を用いて回収し筋組織由来体細胞核を含む各 TE buffer は、0.01mm<sup>2</sup> における底面積 0.64nL に含まれる体細胞核数を計測した。まず、核回収液 5 μL をチャンバー上に滴下し、体細胞核を区別するため、DAPI（1:1000 Invitrogen）を滴下し、核回収液と均一になるように混合し核染色を行った。混合液は直径 1cm の円状となるようにチャンバー上に塗布（図 1）し、蛍光顕微鏡（Leica BMI 6000B）を用いて DAPI 陽性を示す体細胞核を計測した。

### (4) 回収した筋組織由来体細胞核の免疫組織化学的検査

回収した筋組織由来体細胞核の一部は、免疫組織化学的検査により正常性を確認した。まず、核回収液 9 μL と Smear Gell（GenoStaff）1 液 6 μL を混合して調整した。APS コート付き MICRO SLIDE GLASS（MATSUNAMI GLASS）上に Smear Gell 2 液を 5 μL 滴下した。次に、スライドガラス上へ調整液を 5 μL 添加することで均一に混合し、室温下で 2 分間乾燥させた。続いて、99.5% Ethanol（nacalai tesque）に浸漬し 20 分間固定した。固定後、蒸留水（以下、DW）を用いて洗浄した後、2% TritonX-100 in DW に 2 時間浸漬することにより透過処理を行った。その後、再び DW で洗浄し、3% BSA（nacalai）を含む Tween<sup>®</sup> 20 Detergent（CALBIOCHEM<sup>®</sup>）in DW を用いて 1 時間 Blocking 処理を施した。Blocking 処理一

次抗体として Rabbit-anti Histone H3 抗体 (1:50 Abcam) および Mouse-anti Lamin B2 抗体 (1:50 Abcam) を用いて、定着処理 (4°C, overnight) を行った。次に、DW 洗浄を行い、2次抗体として Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 conjugate (1:200 Abcam) および Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor<sup>®</sup> 568 conjugate (1:200 Thermo) を用いて 1時間室温下にて処理した。2次抗体処理の後、DW で洗浄し、VECTASHIELD with DAPI (Vector Lab.) を 5  $\mu$ L 滴下しカバーガラスで封入した。作製した試料は、蛍光顕微鏡 (Leica: BMI 6000B) を用いて観察した。続いて、0.02  $\mu$ m 間隔で撮影した筋組織由来体細胞核の免疫染色像は、3D deconvolution (Leica: LAS AF) にて画像処理を行った。

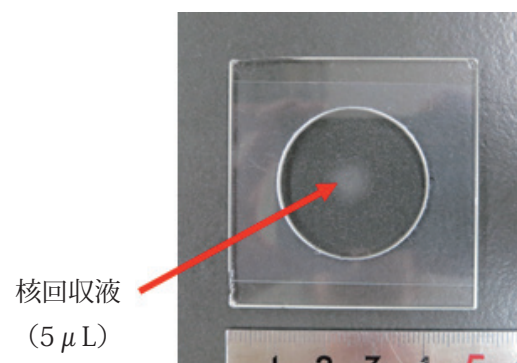


図 1. 核回収液をチャンバー上に塗布した様子  
蛍光顕微鏡 (Leica BMI 6000B) を用いて  
0.01mm<sup>2</sup> 当たりの体細胞核数を計測した。

#### (5) 体細胞核移植操作

体細胞核移植操作は Wakayama らの方法に準じて行った<sup>(16)</sup>。成熟齢に達した B6D2F1 雌マウスに常法に従い過剰排卵処置を施し、hCG (あすか製薬 (株)) を投与後 14-16 時間後に卵子卵丘細胞複合体を回収した。回収した卵子卵丘細胞複合体は、0.1% のヒアルロニダーゼを含む mCZB-HEPES 培地に 10 分間静置し、卵丘細胞を除去した。回収した未受精卵は 5  $\mu$ g/mL サイトカラシン B (以下、CB: 和光純薬工業 (株)) を含む mCZB-HEPES 培地で洗浄後、マイクロマニピュレーターシステムへピエゾ圧電素子 (PRIME TECH) を装着し、除核操作を行った。除核した卵子は、mCZB 培地にて洗浄後、ドナー細胞の注入操作まで炭酸ガスインキュベーター内 (37°C, 5% CO<sub>2</sub> in air) で培養した。続いて回収した各筋組織由来体細胞核は、9% Polyvinylpyrrolidone (36 万 kDa, 和光純薬工業 (株)) in mCZB-HEPES 培地内にて懸濁した。体細胞核の注入操作は、除核した卵子を mCZB-HEPES 培地内に移し、4-5  $\mu$ m 径のインジェクションピペットを用いて除核した卵子透明帯をピエゾ圧電素子により穿孔 (Int: 3-4, Speed: 2) し、さらに卵子細胞質を開孔 (Int: 1-2, Speed: 1) させ、ドナー細胞を注入した。

注入後生存卵子は、mCZB 培地に移し、炭酸ガスインキュベーター内で約 1 時間培養し、早期染色体凝集を確認した後、10mM 塩化ストロンチウム (和光純薬工業 (株))、5  $\mu$ g/mL CB を含む Ca<sup>2+</sup> 不含 mCZB 培地にて 3 時間の卵子活性化処理を行った。続いて、5  $\mu$ g/mL CB を含む mCZB 培地にて 3 時間卵子を培養し、前核様構造の形成を確認した。

#### (6) 統計学的解析

実験操作におけるすべての統計学的処理は、Stat View-J 5.0 ソフトウェアを用いて、t 検定およびカイ 2

乗検定により求めた。なお、有意差表値については、5%水準以下とした。

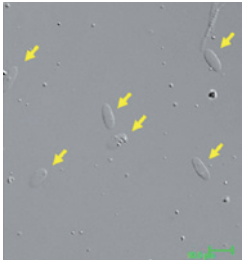
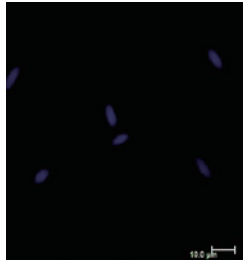
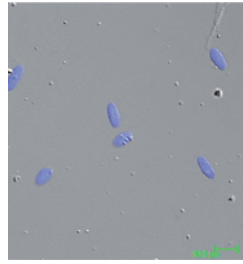
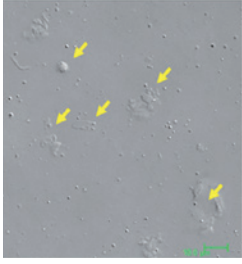
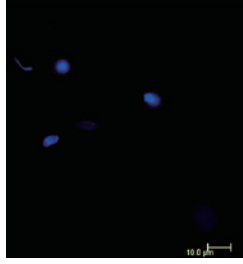
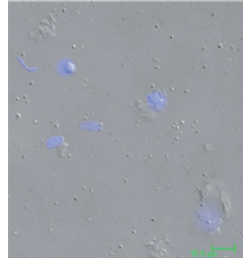
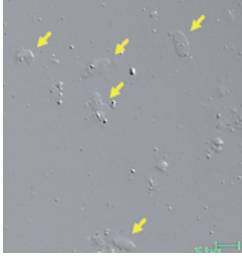
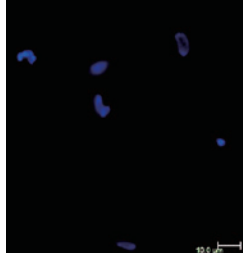
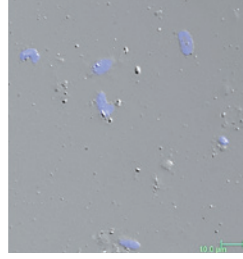
### 3. 結 果

真空乾燥処理を施す前後の筋組織の重量および重量の変化を減少率にし、表 1 に示した。30 時間の真空乾燥処理を施したマウス大腿部筋組織は 652.9mg から 179.7mg に約 28%減少し、ケープハイラックスは 186.6mg から 56.3mg へと約 30%組織重量が減少した。

表 1. 各動物種の真空乾燥処理前後の組織重量平均の比較

供試動物	真空乾燥前 (mg)	真空乾燥後 (mg)	減少率 (%)
マウス	652.9 ± 211.9	179.7 ± 59.9	27.5 ± 0.79
ケープハイラックス	186.6 ± 84.8	56.3 ± 28.4	30.3 ± 4.9

(mean ± SD)

供試動物	保存条件	明視野	DAPI	Merge	体細胞核数 /0.64nL
マウス	新鮮				6.3 <sup>a</sup> ± 0.6
	真空乾燥 (13ヶ月)				6.4 <sup>a</sup> ± 0.7
ケープハイラックス	真空乾燥 (8ヶ月)				5.8 <sup>a</sup> ± 0.2

(mean ± SE)

図 2. 真空乾燥処理を施した筋組織から回収された体細胞核の形態像および 0.01mm<sup>2</sup> 当たりに含まれる体細胞核数 (染色像は 400 倍を示す) 同文字間に有意差なし (P > 0.05)



真空乾燥処理を施した各組織から修正 MIP 法を用いて回収した筋組織由来体細胞核を図 2 に示した。真空乾燥処理後 8-13 ヶ月、 $-30^{\circ}\text{C}$  下で保存した組織から修正 MIP 法を用いて筋組織由来体細胞核を回収し、 $0.64\text{nL}$  当たり各動物種組織由来体細胞核数を 10 区画計測した結果、マウスの新鮮組織では、体細胞核数は  $6.3 \pm 0.6$  個、真空乾燥処理を施したマウス筋組織では  $6.4 \pm 0.7$  個、ケープハイラックスの広背筋では  $5.8 \pm 0.2$  個を確認した。

図 3 には、真空乾燥処理を施し修正 MIP 法を用いて回収した筋組織由来体細胞核の一部を免疫組織化学的染色により核内 DNA である Histone H3 および核膜構成タンパク質である Lamin B2 を検出した結果の一例を示した。各動物種筋肉由来体細胞核について、核内に Histone H3 の局在が確認でき、核膜上に Lamin B2 の局在が示された。このことから、真空乾燥処理を施した筋組織由来体細胞核の正常性が明らかになった。

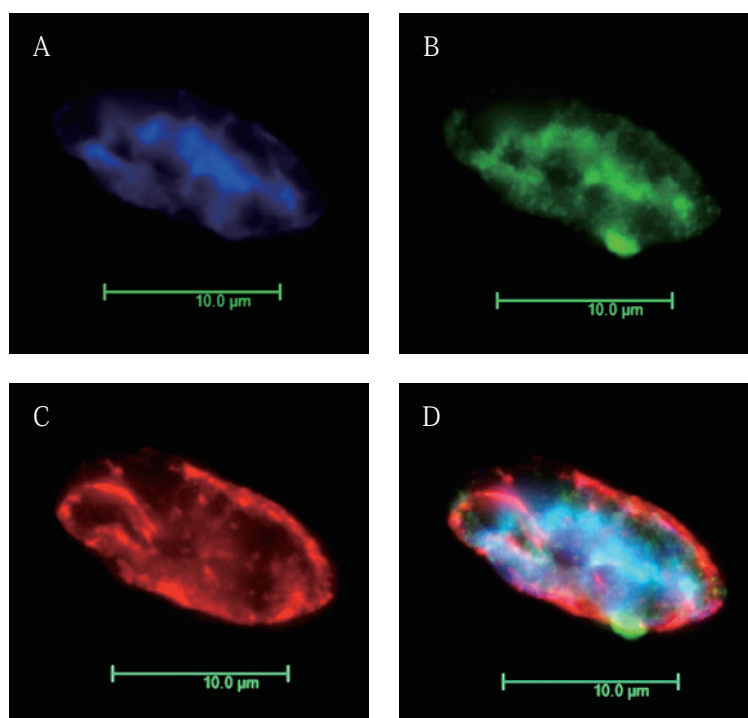


図 3. 真空乾燥処理を施した筋組織由来体細胞核における Histone H3 および Lamin B2 の免疫組織化学的検査の一例 (A-D) は、真空乾燥処理を施した後、修正 MIP 法を用いて回収したケープハイラックス筋組織由来体細胞核の蛍光写真である (染色像は 1,000 倍を示す)。  
(A) DAPI (B) Histone H3 (C) Lamin B2 (D) Marge

表 2 には、真空乾燥処理を施した各筋組織由来体細胞核を用いた体細胞核移植成績を示した。注入後生存卵子は、真空乾燥処理を施したマウス筋組織由来体細胞核において 76% (58/76) であり (新鮮: 62% (48/77))、ケープハイラックスでは、71% (46/65) であった。これらの生存卵子は 1 時間の培養の後、マウス筋組織由来体細胞核では、真空乾燥処理区のドナー核を注入した場合、91% (53/58) であり、ケープハイラックス筋肉組織では、真空乾燥処理区では 96% (44/46) が早期染色体凝集を形成した。また、早期染色体凝集を確認した生存卵子に活性化処理を施した結果、マウス筋肉組織では真空乾燥処理区にお

いて74% (43/58) であり、ケーブハイラックス筋肉組織では真空乾燥処理区において96% (44/46) であった。

表2. 真空乾燥処理を施した各筋組織由来体細胞核を用いた体細胞核移植成績

供試動物	保存条件 (期間)	供試卵数	体細胞核注入後 生存卵子数 (%)*	早期染色体凝集 形成卵子数 (%)**	前核様構造形成 卵子数 (%)**
マウス	新鮮	77	48 (62)	45 (94)	34 (71) <sup>a</sup>
	真空乾燥 (13ヶ月)	76	58 (76)	53 (91)	43 (74) <sup>a</sup>
ケーブハイ ラックス	真空乾燥 (8ヶ月)	65	46 (71)	44 (96)	44 (96) <sup>b</sup>

異文字間に有意差あり (P < 0.05)

(%)\* = / 供試卵数 × 100

(%)\*\* = / 生存卵子数 × 100

#### 4. 考 察

IUCN (国際自然保護連合) の報告では、哺乳類の既知数約 5,500 種のうち 1,200 種が絶滅危惧種に指定されており (IUCN2015 IUCN Red List of Threatened Species, Version 2015.2.)、遺伝資源を保存することは急務である。遺伝資源として保存されている生殖細胞は、生体から採取されるものと比較して性状が悪いことが報告されている<sup>(17)</sup>。加えて卵母細胞や胚は、死後変化を受けやすく、死因や年齢などによっては、配偶子が全く回収できないこともある<sup>(17)</sup>。一方で、体重の5割以上を占める骨格筋は、若老齢動物や性差を問わず哺乳類の全身に存在する組織である<sup>(18)</sup>。私たちは、新たな遺伝資源を回収する試みとして、死後直後および冷凍下において保管した筋組織から体細胞核を回収することに成功し<sup>(15)</sup>、マウスを含め 14 種の動物から筋組織由来体細胞核を回収することに成功している (未発表)。

真空乾燥法は、水蒸気圧との平衡関係により真空下で乾燥を行うものであり、砂糖、甘味類、野菜類などの乾燥に使用される方法である。また、温風乾燥法で生じる脂質の酸化を防止するという特徴がある<sup>(19)</sup>。生体の組織には、多量の水が含まれており、その性質は、理化学的に均一なものではなく分子が自由に動き、凍結および気化や物質を溶解させることができる自由水と食品中のタンパク質や炭水化物と水素結合し、分子運動が制限されている結合水に分けられる<sup>(20, 22)</sup>。筋肉組織は、全水分の約 90% が自由水であり、食品の場合では、真空乾燥処理により水分が急激な蒸発をし、組織は部分的な破壊を受けるため、復元時の食感および形態の変化が起こることから凍結真空乾燥処理が保存方法として一般的に採用されている<sup>(20, 21)</sup>。さらに、自由水の減少とタンパク質の変性との間には、ほぼ平衡な関係が認められ自由水の減少が組織中に溶解している無機塩類の濃度を高め、タンパク質の変性に関与している<sup>(22, 23)</sup>。今回の結果において、真空乾燥処理を施し凍結保護剤を加えず冷凍保存した筋肉組織から体細胞核の回収が可能であった要因のひとつとして、筋肉組織および筋繊維束が部分的に破壊を受け組織間の結合が脆化したと考えられた。また、真空乾燥処理を施した筋肉組織の 80-100mg において 0.64nL 当たりに含まれる体細胞核数は、表 1 を用いて新鮮状態の重量に換算すると、マウス筋肉組織の場合では、おおよそ 3.3 倍の 270-330mg となり、新鮮状態と比べて核回収数が増加することが考えられた。しかし、図 2 で示したよ

うに、真空乾燥処理を施したマウス筋肉組織では6.4個であり新鮮マウス由来組織（6.3個）と比較して差は見られなかった（ $P > 0.05$ ）。真空乾燥処理を施した組織から回収された体細胞核が、新鮮組織由来体細胞核と比較して有意な差が見られなかった結果として、真空乾燥処理を施した筋肉組織は乾燥状態であるために、体細胞核回収時に用いたTE bufferが組織へ予想以上に吸収されたものと考えられ、今後、さらなる効率的な体細胞核回収液の開発を予定している。

Hoshinoらは、凍結保護剤を用いず10年間 $-80^{\circ}\text{C}$ 下にて保存し、さらに3年間液体窒素にて保管したウシ精索から初代培養細胞を樹立させ、核移植に供することにより正常な産子が得られたと報告している<sup>(24)</sup>。しかし、Cetinkayaらは、 $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結した耳介軟骨組織から初代培養細胞の樹立に成功したが、 $-20^{\circ}\text{C}$ において冷凍保存した耳介組織から初代培養細胞の樹立はできなかつたと述べている<sup>(25)</sup>。温度条件が $0^{\circ}\text{C}$ 以下になると細胞内の水分は凍り始めるが、 $-5^{\circ}\text{C}$ から $-10^{\circ}\text{C}$ においては細胞内の水は過冷却状態であり、細胞外からの氷晶形成と共に凍結を行う<sup>(26)</sup>。また、冷却速度が小さい際には細胞内の水は、細胞内外の浸透圧の差により細胞外へ浸透するが、同時に細胞質内電解質が濃縮されて細胞膜に塩害を生じる可能性や冷却速度が大きい場合には、細胞外からの植氷を受け氷晶の再形成が誘起される<sup>(27)</sup>。筋組織由来体細胞核は、新鮮組織のみならず氷晶形成を受けるであろう真空乾燥処理および冷凍保存を施した組織を用いた場合でも回収することが可能であった。このことから、筋組織に真空乾燥処理を施し $-30^{\circ}\text{C}$ 下にて冷凍保存を行うことは、研究資源としての保存の有効性が示唆され、新たな遺伝資源の保存の一つの可能性が期待できると考えられた。

## 5. 結 論

本実験では、新たな遺伝資源の保存方法の開発を目的とし、広島市安佐動物公園より提供されたケーブルハイラックスの組織へ真空乾燥処理を施し、凍結保護剤を用いず $-30^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存を行い、保存後の組織から回収された体細胞核の機能性を検討した。真空乾燥を施した組織から回収した体細胞核は、免疫組織学的染色により、核内にHistone H3が局在し、さらに、核膜タンパクであるLamin B2を確認し、形態的に正常であることが示された。さらに、一部の核を用いた体細胞核移植を試み、活性化処理を施すことによって再構築卵子を形成した。これらのことから、実験動物のみならず動物園動物の筋組織を真空乾燥処理施した後、冷凍保存を行うことは、研究資源としての組織の保存に有効であると考えられる。

## 6. 謝 辞

本実験に関して、貴重な試料を提供頂きました、広島市安佐動物公園関係者一同に感謝申し上げます。また、実験操作において多くのご助言を賜りました、株式会社日本医化器械製作所 永井匡先生に謝意を表します。本研究の一部は、近畿大学 学内助成金 21世紀研究開発奨励金「マンモス研究拠点の形成に向けて：YUKA マンモスのサンプルを用いたマンモスの総合的研究」の助成を受けたものです。

## 7. 参考文献

1. 中村隼明、鏡味裕、田上貴寛（2009）生殖細胞による動物遺伝資源の保存と個体への再生、動物遺伝育種研究学会誌 37, 41-58.
2. 楠比呂志、木下こづえ、佐々木春菜、荒蒔祐輔（2009）我が国における動物園・水族館での保全繁殖共同研究. 日本野生動物医学会誌 14, 37-50.

3. 福井大祐 (2005) 生物多様性の保全を目指した野生動物の人工繁殖と細胞保存、日本野生動物医学学会誌 10, 1-12.
4. 安齋政幸、村井仁志、宮下実、岸昌生、中家雅隆、西村愛美、杉本奈央、松崎ひかる、東里香、三谷匡、加藤博己、細井美彦 (2014) 野生マウス由来線維芽細胞の樹立による遺伝資源保存技術の一例、近畿大学先端技術総合研究所紀要 19, 13-23.
5. 成島悦雄 (2005) 冷凍動物園と野生動物の未来、日本獣医師会雑誌 58, 6-7.
6. 高橋貢 (1997) 野生動物絶滅の危機を考える、学術の動向 2, 76-78.
7. 大沼学 (2014) 絶滅危惧種の遺伝資源の保存、獣医畜産新報 67, 35-44.
8. 越後貫成美 (2013) 実験動物の顕微授精技術の開発とその応用、Journal of Mammalian Ova Research. 30, 159-167.
9. Lanza, R. P., Cibelli, J. B., Diaz, F., Moraes, C. T., Farin, P. W., Hammer, C. J., West, M. D., Damiani, P. (2000) Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. Cloning 2, 79-90.
10. 村田浩一、成島悦雄、原久美子 (編) (2014) 動物園の保全生物学、動物園学入門、pp46-63, 朝倉書店
11. P, Loi., D, Iuso., M, Czernik., F, Zacchini., G, Ptak. (2013) Towards storage of cells and gametes in dry form. Trends in Biotechnology 31, 688-695.
12. S, Wakayama., H, Ohta., T, Hikichi., E, Mizutani., T, Iwaki., O, Kanagawa., T, Wakayama. (2008) Production of healthy cloned mice from bodies frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 16 years. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 105, 17318-17322.
13. T, Kaneko., T, Serikawa. (2012) Long-term preservation of freeze-dried mouse spermatozoa. Cryobiology 64, 211-214.
14. 小山久一、星野実、土屋加那美、阿部大樹、Abukar Hassan Sugulle、堂地修 (2007) ウシおよびヒツジ凍結融解精子ならびに凍結乾燥精子を用いた卵細胞質内精子注入法の発生、酪農学園大学紀要 31, 231-238.
15. 東里香、宮下実、村井仁志、中家雅隆、崎田恵、亀井美紅、三谷匡、細井美彦、安齋政幸 (2014) 絶滅に瀕する小型動物種の有用遺伝子回収方法の確立に向けて、第20回日本野生動物医学学会要旨 pp44.
16. Wakayama, T., Perry, A.C., Zuccotti, M., Johnson, K. R., Yanagimachi, R. (1998) Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. Nature 394, 369-374.
17. 楠比呂志 (2005) 希少動物種の種の保存を目的とした保全繁殖技術、日本野生動物医学学会誌 10, 1-12.
18. 吉岡利忠 (1999) 骨格筋細胞と環境因子、体力科学 48, 1-4.
19. 青木秀敏 (1994) 各種乾燥法における魚肉の品質の変化、八戸工業大学食品工学研究所紀要 5, 23-32.
20. 右田正男 (1966) 食品タンパク質と水、日本食品工業学会誌 13, 395-400.
21. 木村進 (1961) 食品の凍結乾燥、凍結及び乾燥研究会記録 4, 3-11.
22. 榎本則行、田中義次 (1970) 魚肉タンパク質の乾燥変性と自由水、結合水量の変化との関係、佐賀大学農学彙報 30, 25-31.
23. 清水亘、日引重幸 (1952) 水産動物肉に関する研究凍結及び塩蔵による魚肉蛋白の変性並びにそ



---

の関連性について、日本水産学会報誌 17, 301-303.

24. Hoshino, Y., Hayashi, N., Taniguchi, S., Kobayashi, N., Sakai, K., Otani, T., Iritani, A., Saeki, K. (2009) Resurrection of a bull by cloning from organs frozen without cryoprotectant in a -80 degrees c freezer for a decade. *Plos One* 4, 1-6.
25. Cetinkaya, G., Hatipoglu, I., Arat, S. (2014) The value of frozen cartilage tissues without cryoprotection for genetic conservation. *Cryobiology* 68, 65-70.
26. 僧都博 (1980) 生細胞の凍結による障害と保護の機構、*化学と生物* 18, 78-87.
27. 棚沢一郎、永田真一、木村直宏 (1992) 生体の凍結に関する研究、*生産研究* 44, 475-478.

## 英文抄録

Attempt at frozen storage by using animal muscle tissues treated  
with vacuum dried.

Mizuki Kajimoto<sup>1</sup>, Rika Azuma<sup>2</sup>, Tatsuya Inoue<sup>1</sup>, Moriyoshi Kubo<sup>3</sup>, Noriyuki Nonoue<sup>3</sup>,  
Akari Obashi<sup>1</sup>, Takuya Orisugi<sup>1</sup>, Yoshihiko Hosoi<sup>1,2,4</sup> and Masayuki Anzai<sup>4</sup>

## Abstract

In this study, the muscle tissues derived from dead animals were vacuum dried and cryopreserved without cryoprotectant at -30C for 8 to 13 months. The myocyte nuclei were successfully collected from these preserved tissues by modified MIP methods (*Mus musculus*: 6.4/0.64nL and *Procavia capensis*: 5.8/0.64nL). The normal localization of Histone H3 and Lamin B2 in the collected myocyte nuclei were confirmed by immunohistochemical staining. In addition, somatic cell nuclear transfer was performed using collected myocyte nuclei and the formation of pronuclear-like structure were observed in reconstructed oocytes (*Mus musculus*: 74% (43/58) and *Procavia capensis*: 96% (44/46)). From these results, it was suggested that the combination method of vacuum drying and cryopreservation is the useful method for the preservation of animal muscle tissue for long time as for the genetic resource.

Key word: muscle tissues, vacuum drying, frozen storage, genetic resource, somatic cell nuclear transfer

- 
1. Department of Genetic Engineering, Faculty of Biology Oriented Science and Technology, Kindai University. Kinokawa, Wakayama, 649-6493, Japan.
  2. Division of Biological Science, Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University. Kinokawa, Wakayama, 649-6493, Japan.
  3. Asa Zoological Park Hiroshima. Hiroshima, Hiroshima, 731-3355, Japan.
  4. Institute of Advanced Technology, Kindai University. Kainan, Wakayama, 649-0017, Japan.