

# 第7回哺乳動物生殖工学研究会

プログラム・抄録集

会期 : 平成7年12月16日(土)  
午後1時30分～5時30分

会場 : 北里本館2階大会議室  
港区白金5-9-1  
TEL 03-3444-6161

開会の辞

会長 横山 肇介

牛体外受精講演

牛体外受精胚の発生特性

岩崎 説雄（東京農業大学）

司会 竹島 勉

—— 舟受講演 ——

座長 東 貞宏

1. クライオチューブを用いたマウス2細胞期胚の超急速凍結法の検討

鈴木 理可（三菱化学生命研）

2. 牛体外受精卵の利用と現状

浜野 晴三、鬼頭 武資（（社）家畜改良事業団）

座長 土屋 秀樹

3. 鹿の血清蛋白質型および血球酵素型の解析

福井 えみ子、小嶋 身江子、関谷 万里生、小向 麻子、吉沢 緑、村松 晉（宇都宮大農学部）

4. カニクイザルの精子濃度におよぼす放射線の影響

岡本 正則（放射線医学総合研究所）

—— 総 会 ——

# 牛体外受精胚の発生特性

岩崎説雄（東京農業大学）

体外成熟、体外受精を行った牛卵子の胚盤胞への体外発生能は、受精卵の約30%で、残りの胚は途中で発生を停止する。演者らはこの原因を解明するため、発生に伴う染色体異常の出現頻度の変動、内細胞塊の細胞数、形態と受精ならびに培養条件との関連、転写の開始時期および活性の変動、遺伝子発現のステージ特異性など、体外受精胚の発生特性を検討してきたので、これまでの研究成果、研究状況と今後の方向について述べる。また、約1年間滞在した英国Roslin研究所での研究状況についても紹介する。

## 1) 細胞遺伝学的特性（染色体異常）

2細胞期以降胚盤胞期胚の染色体異常出現頻度を検討した。胚の7-36%に染色体異常が存在し、そのほとんどは多精子侵入などの受精時の異常に起因した。胚盤胞期胚の内細胞塊(ICM)の染色体異常の出現頻度は栄養外胚葉に比べて低かった。また、顕微授精により人為的な三倍体の作出を試みたが、出現頻度は低く、注入した2精子とも受精に関与する割合は低かった。

## 2) 細胞学的特性（ICMの細胞数と形態）

免疫手術を利用した二重蛍光染色法を用い、ICMと栄養外胚葉の細胞数の分別計測法を確立した。この手法を用い、受精および発生条件を変えて作出した胚盤胞のICMの細胞数と形態を比較した。その結果、体外受精由来の胚盤胞ではICM細胞間の結合状態が緩かったが、ウサギ卵管移植への仮移植によりICM細胞数は有意に増加し、個々の形態が改善されることが認められた。さらに凍結保存した胚へ応用した結果、融解後の生存胚においてもICM塊に死滅細胞が認められ、このことが凍結保存胚の受胎性の低下の一因と推察された。

### 3) 転写開始時期と遺伝子発現特性

体外受精に用いられる体外成熟卵子は、果たしてその後の発生を支持する遺伝的素質を持っているのか？すなわち、発生を停止した胚は、本当に胚盤胞、さらには子どもになることができるのか？強引に成熟させた卵子の核だけが準備可能な状態で、細胞質はそれを支持する状態になっていないのではないかなど、疑問な点は多い。そこで、体外受精胚の遺伝的背景を明らかにする目的で、胚の遺伝子発現に先立って行われる遺伝情報の転写開始時期をRNA合成を指標にして検討した。その結果、従来報告（8細胞期）よりも早い時期（2細胞期）にすでに転写活性が認められた。また、転写活性の増加は、発生速度の遅いものほど活性が高いことが認められた。一方、発生におけるマーカーとしてのステージ特異的に発現する遺伝子を明らかにするため、Differential Display法の確立を試みた。予備的ではあるが、ステージ特異的DNA断片の存在が示唆された。

発生に関する研究は、主に遺伝子導入による物質生産を初めとするバイオテクノロジーに集中されがちであるが、生物が本来持っている機能の解明への応用や、培養条件の改善などの周辺技術の確立にもエネルギーを注ぐ必要があると考える。

## クライオチューブを用いたマウス2細胞期胚の超急速凍結法の検討

○ 鈴木理可（三菱化学生命研）

【目的】マウス胚の凍結保存法として、これまで種々の方法が検討されてきたが、その中でも中瀉によるDAP213（2M dimethyl sulphoxide , 1M acetamide , 3M propylenglycol in PB1）を保存液とする超急速凍結法は簡便で操作性に優れ、前核期受精卵から桑実期までの発生段階の胚のみならず未受精卵においても高い生存性が得られている。しかし、保存容器である500 $\mu$ lチューブ、チューブホルダー等は、液体窒素（LN<sub>2</sub>）タンク内での体系的な胚の管理が難しかった。そこで本実験では、保存容器を我々が緩慢凍結法で使用して安定した保存成績をもつクライオチューブに代え、超急速凍結法の検討を行った。

【材料と方法】過排卵処理したB6C3F1雌マウスを同系雄マウスと交配して2細胞期胚を得た。凍結は、クライオチューブ（ヌンク：1.0ml No.377224）内の保存液 DAP213 に胚を入れた後、チューブをケーンにセットし、LN<sub>2</sub>へ浸漬して行った。実験1では、保存液の量は15, 30 および 50  $\mu$ l として37°Cに保ち、胚を入れてから凍結するまでの時間を8秒以内, 10 および 20 秒とした。また実験2では、保存液の量を15  $\mu$ l として0°Cに保ち、凍結までの時間を8秒以内, 1, 2, 3, 4 および 5 分後とした。融解は、LN<sub>2</sub>から取り出したチューブを直ちに37°C温水中におき、あらかじめ37°Cに温めた0.2mlの0.3M sucrose in PB1を加えて行った。回収した胚はMWメディウムで3回洗浄後、形態的な観察を行って、その正常性を判定した。さらに正常と判定した胚は、同メディウムで培養を行い、胚盤胞までの発生を調べた。

【結果と考察】実験1：保存液を15 $\mu$ lとして温度を37°Cに保ち、8秒以内, 10 および 20 秒後に凍結した際の胚の生存率は96.7, 85.2, 54.5%であり、培養による胚盤胞への発生率は100, 73.9, 25.0%で

あった。同様に30  $\mu$ lでは 89.8, 91.7, 53.8%の生存率で、89.7, 34.4, 6.0%の発生率であった。さらに50  $\mu$ lでは、89.8, 74.8, 39.1%の生存率で、78.3, 16.9, 2.8%の発生率であった。これにより37°C保存液では、液量は少なく、凍結までの時間は短いほど高い成績の得られることが知られた。実験 2: 保存液を15  $\mu$ lとして温度を0°Cに保ち、8秒以内, 20秒, 1, 2, 3, 4 および 5分後に凍結した際の生存率は、それぞれ 10, 27.5, 22.8, 65.5, 94.6, 86.8 および 73.7%であり、培養による胚盤胞への発生率は 0, 9.1, 61.5, 63.9, 88.6, 87.9 および 32.1%であった。これにより0°C保存液では、胚を入れてから 3~4 分後に凍結することが、安定した生存性を得る条件であることが知られた。

以上の結果から、クライオチューブを用いても超急速凍結保存が可能であり、体系的な胚の管理を行えることが明らかとなった。

## 牛体外受精卵の利用と現状

(社)家畜改良事業団  
家畜バイオテクセンター  
浜野晴三&鬼頭武資

牛卵子の体外受精により我国で最初の産子が得られた昭和62年以降、今までと場廃棄物であった卵巣が個体を生産し得る有効な遺伝資源であることが認識されている。

平成3年4月に牛肉の輸入自由化が“国際化”という大義名分により開始され、日本の肉牛産業の将来が事実上規制された。牛肉の貿易自由化以来、それまで培われた日本の畜産基盤は大きく変質し始め、輸入牛肉の量的・価格的压力にさいなまれ、牛肉の国内生産量は徐々に減少している。このような情勢の中、和牛卵巣を材料とした体外受精技術を既存の繁殖系に組み込み、酪農家に和牛を生産させ国内農家に国際競争力を養わせる政策を背景として、牛体外受精に関する研究開発が急速に発展した。

(社)家畜改良事業団では平成3年度以降、体外受精卵を用いた和牛素牛増産を目的とした国の助成事業を担当している。この事業とは、黒毛和種雌牛の卵巣より採取した卵子を体外受精に供して胚盤胞を作出し、受精卵移植技術により酪農家のホルスタイン種に移植して、より価値の高い和牛子牛を生産するものであり、更に生産された子牛(あるいは素牛)は市場で肥育農家等へ販売され、育成・肥育を経て食肉市場へ出荷されて食肉となり、国内牛肉生産を活性化することも目的とされる。また、雌牛の卵巣は再度子牛生産のための資源として活用される。

牛体外受精胚生産技術の開発では「如何に大量の胚盤胞を生産するか」に主眼が置かれ、現在は採取卵子の約40%が胚盤胞へと発生し、その25%が凍結保存され、当団で年間約2万個の凍結体外受精卵を生産している。

事業開始当初、如何にこの技術が農家に浸透し、輸入自由化への対抗措置として利用されるかに注目してきた。現在、助成事業を含めて全国26都道府県の100団体以上で体外受精卵は利用され、年間およそ2,500頭に移植されている。受胎成績は、凍結卵で平成3年度50%であったもの

が平成6年度30%と年々低下してきているが、団体・農家・移植師等を個々に調べると0～67%と大きな格差がある。

体外受精卵を利用する上でのメリットは、体内受精卵に比べて受精卵価格が安価であることと、酪農家と肥育農家との連携により無登録牛を地域一貫体制により低コストで作りに上げていくことにあると考えている。しかしながら、体外受精卵の価値に対する認識はまだ低いのが実状と思える。その大きな要因は、生産される体外受精卵の父方には人工授精で人気のある複数の種雄牛の精子を用いているが、と場で採取する卵巣の素性、即ち母方の血統は不明な状態での生産が主流を占めていることにある。

和牛の登録業務の中心となる（社）全国和牛登録協会には、登記牛から生産した子牛は登記が採れない規定がある。体外受精に用いる卵子を提供している雌牛のほとんどはこの子牛登記しかされておらず、体外受精卵により生産された子牛を登記することは現状ではできない。市場での無登記子牛の扱いはF1同様で安価で取引される現状があり、体外受精卵由来の子牛を生産しても酪農家の利益に直接結びつかず、体外受精卵の価値が見い出せないままに現在に至っている事業参画団体（農協等）が数多くある。

しかし、最近では体外受精卵産子が食肉として流通ルートに流れる機会も多くなり、それらの枝肉成績も徐々に明らかにされ、全国的にも高い評価をされ始め、体外受精卵の需要も伸び始めている。

このような状況の中で、体外受精卵の利用を普及定着させるために、生産者から付加価値を持つ体外受精卵を求める声に応え、東京食肉市場の協力を得て出荷牛の一部の雌牛の鼻紋を採取し、画像解析による照合で、登記（登録）書と本牛とが一致していることを確認したうえで、個体別に卵巣を採取して体外受精に供し、父・母の血統を明らかにし、加えて母親の枝肉成績を明らかにした付加価値を持った体外受精卵の生産を実施し、配布を開始した。

さらに、移植技術者を対象に各地で実務レベルの研修会を開催して受胎率向上を図ると共に、生産者（農家）とは流通事例や枝肉情報の公表などを含めた懇談を行い、体外受精卵に対する認識を深め、和牛の増産に努めている。



## 鹿の血清蛋白質型および血球酵素型の解析

福井えみ子, 小嶋身江子, 関谷万里生, 小向麻子, 吉沢 緑, 村松 晋  
(宇都宮大学 農学部)

### [目的]

ニホンシカは、日本各地に生息分布している日本固有種であり、その一部は狩猟の対象であったが、近年消費者の嗜好の変化に応じ食肉としての需要が高まり、各地でその養殖が盛んに行われるようになった。養鹿業の盛んなオーストラリアやヨーロッパ諸国では、1970年代からアカシカなどシカ類の血液蛋白質型の遺伝学的研究が行われ、その中でニホンシカの例も報告されている。しかし、国産のニホンシカ、すなわち各地の亜種の血清蛋白質型や赤血球酵素型に関する 詳細な報告は少ない。

そこで、本研究では、青森産のニホンシカを対象として、血液に関する 5 つの遺伝子座について検査を試みたので報告する。

### [方法]

実験は、日本養鹿協会の協力により採取されたニホンシカ 2 3 例 (青森産) の新鮮血を材料として行った。採取した血液は遠心により、血清部分と血球部分に分離し実験に供した。

赤血球酵素型は、ヘモグロビン (HE) 型、エステラーゼ D (ESD) 型、6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ (PGD) 型について、常法に従って分析した。血清蛋白質型は、グループスペシフィックコンポーネント (GC) 型、トランスフェリン (TF) 型について分析した。方法は、TF型は等電点電気泳動法 (pH5-7) およびクマシー染色より行った。GC型については、等電点電気泳動法 (pH4.5-5.4) および酵素抗体法による染色によって行った。

### [結果]

PGD型、ESD型およびTF型は、2 3 例すべて同様の型を示し、多型は認められなかった。GC型では多型が認められ、その内訳は、FA型 1 7 例、FB型 4 例、FAFB型 2 例であった。HE型でも多型が認められ、その内訳は、CC型 7 例、DD型 1 1 例、CD型 5 例であった。

# カニクイザルの精子濃度におよぼす放射線の影響

放射線医科学総合研究所

岡本 正則

人体に対する放射線の影響の中で、生殖細胞の変化に基づく遺伝的影響は身体的影響と並んで重要である。ヒトへの放射線の遺伝的影響を推定するために、従来は主にマウスの実験結果を基礎に評価しているが、ヒトに外挿するに当たっては、ヒトに近縁なサル類を用いた実験的研究を行なうことが重要な知見を提供すると考えられる。これまで放射線の影響の研究にサル類で主に用いられてきたアカゲザルはヒトと異なり繁殖機能に季節性を有しており、生殖細胞への影響を検討することが困難である。一方、アカゲザルと同じマカカ属に属するカニクイザルは周年繁殖動物であることから生殖生理学的にヒトの実験モデルとして有用と考えられる。しかし、カニクイザルを用いた放射線障害に関する研究は少なく、とくに生殖細胞への影響に着目した研究はほとんど成されていない。

以上の観点から、本研究ではカニクイザルを用いた $\gamma$ 線高線量率の精巣局部照射実験を行った。そして照射後経時的に精液を採取して精液性状、とくに精子濃度を検査し、この成績を指標に雄性生殖細胞の放射線障害とその後の回復を検討した。本研究会では、カニクイザルの精子濃度におよぼす放射線の影響を中心に得られた実験成績の概要を報告する。