

第15回哺乳動物生殖工学研究会

プログラム・抄録集

会期：平成15年12月6日（土）

午後1時00分～5時30分

場所：北里本館大会議室

港区白金5-9-1

特別講演

電子顕微鏡でみたマウスの発生

—受精卵・その形作りの妙技—

近藤俊三

日本電子（株）／日本電子データム(株)

一般講演

1. マウス精巣上体精子凍結保存におけるトレハロースおよびラフィノースによる凍害保護効果の比較
○奥田泰士、清田弥寿成、柏崎直巳、紫野正雄、福岡秀雄¹（麻布大学獣医学部動物繁殖学研究室、*基礎教育研究室）
2. マウス精子の凍結乾燥に対する研究
○金子武人（熊本大学CARD）
3. 発生段階の異なるマウス胚の同一受容雌における着床時期
○上田乙也¹、萬敬吾²、鎌田宣夫¹、寺柱下浩一^{1,2}、川瀬洋介^{1,2}、豊田裕³、鈴木宏志^{3,4}
(1) 中外医科学研究所、2) 中外製薬(株)、3) 帯広畜産大学原虫病研究センター、4) 東京大学医学系研究科発生・医療工学講座、)
4. Cryotopによるハムスター桑葉期胚のガラス化保存
○清田弥寿成、奥田泰士、猪股智夫¹、紫野正雄、柏崎直巳(麻布大学獣医学部動物繁殖学研究室、1) 実験動物学研究室)
5. 実験動物の生産・品質管理 —外観異常動物の発生概況について—
○中里英樹（日本チャールズ・リバー（株））
6. チンパンジーにおける精子および胚の凍結保存
○栗原隆、松本和也、海野佑一、安齋政幸、三谷匡、加藤博己、佐伯和弘、細井美彦、入谷明（近畿大学大学院・生物理工学研究科、近畿大学生物理工学部、近畿大学先端技術総合研究所）
7. ウシ細胞および体細胞クローン胚のゲノムDNAにおけるCpGメチル化について
○栗原隆、松本和也、海野佑一、安齋政幸、三谷匡、加藤博己、佐伯和弘、細井美彦、入谷明（近畿大学大学院・生物理工学研究科、近畿大学・生物理工学部、近畿大学・先端技術総合研究所）
8. 実験動物としてのクラウンネミフタの有用性とその研究動向
○佐藤啓介（鹿見島大学大学院農学研究科家畜繁殖学研究室）

電子顕微鏡でみたマウスの発生

— 受精卵・その形作りの妙技 —

近藤俊三

日本電子（株）/日本電子データム（株）

精子と卵子の出会い、この受精によって誕生した1個の受精卵はやがて個体を形成する。完成されたヒトの身体を構成する細胞の種類は約200種、総細胞数は60兆個にも及ぶという。その過程には、細胞の増殖や分化、移動、集合、あるいはアポトーシスなどの複雑な現象を伴いながら時間軸に沿って進行する。これらの現象観察は、これまで光学顕微鏡レベルを主体として研究され、その成果は教科書などに詳しく記載されている。しかし、その多くは切片像や模式図を主体としたものである。その像は明確さに欠けること、また断片的な像や模式図から刻一刻と変化する発生の現象を三次元的に理解することは容易ではない。

今日ではゲノム解析が終了し、ノックアウトマウスなど遺伝子操作動物の作出が日常化している。その手法を用い、医療面では疾病や先天異常の発症・治療の研究・再生医療への試み、畜産関係においても品種改良その他、活発に研究・応用がなされている。さらに内分泌かく乱物質（いわゆる環境ホルモン）の胎児や環境への影響も強く懸念されている今日、マウスの発生解析はこれら何れの事項において解析の基礎をなしている。正常な胎児発生、特に器官原基が構築される初期発生は、内因的因子や外因的因子の影響を最も受けやすい時期である。発生現象を扱う学問は、医学生物学領域にとどまらず生命科学の極めて広い領域に浸透している。これらのことを踏まえ、発生に伴う形態形成を正確に把握することはきわめて重要なことと受け止めている。

演者はこれまでに電子顕微鏡、とくに走査電子顕微鏡を用いてマウスの発生を三次元的に解析してきた。ここでは、約30年にわたる発生現象の解析のなかから、初期発生として受精の過程や卵割、着床、胚葉形成、神経管形成と神経堤細胞など。また、先天異常の発症として顔面形成と口蓋、アポトーシスの例として眼の発生などを紹介する。

哺乳動物の発生は、母体の中で進行することや複雑な発生過程その他からややもすると難解な学問と受け止められがちである。これを踏まえ、今回の講演では発生過程を三次元的ならびに経時的変化を目でみる発生として紹介する。あわせて試料作製についてもふれる。

マウス精巣上体精子凍結保存におけるトレハロース およびラフィノースによる凍害保護効果の比較

○ 奥田 泰士、清田 弥寿成、柿崎 直巳、紫野 正雄、福岡 秀雄*

(麻布大学 獣医学部 動物繁殖学研究室、*基礎教育研究室 (生物学))

【目的】ラフィノースとスキムミルクを含む凍結保存液によるマウス精巣上体精子の凍結保存において、一部の系統で融解後の運動精子率や体外受精の受成績が低く、さらなる改善が望まれている。本研究は、マウス精子凍結保存法の改善を目的に、凍結培地中の糖類トレハロースとラフィノースの凍害保護効果について比較検討した。

【方法】雄 ICR マウス (Ic1, 15~30 週齢) から採取した精巣上体尾部を室温下で12%トレハロース (Tre 区) または18%ラフィノース (Raf 区) と3%スキムミルクを含む精子凍結保存液 250 μ l 中で細切した後、1 分間静置して精子を浮遊させた。これらの精子懸濁液 20 μ l を 0.25 ml フラスチックストローに封入し、このストローを液体窒素液面上 2.0 cm に 10 分間静置して予備凍結した。そして、このストローを液体窒素中に投入し、1 週間以上凍結保存した。凍結精子の融解は、ストローを 37.0°C の温水中にて 10 秒間浸漬しておこなった。融解した 20 μ l の精子懸濁液に KRB 1.0 ml を微量ずつ添加して希釈し、これを 37.0°C で 2 時間培養した。凍結融解精子は、融解直後および融解 2 時間後に運動精子率を評価した。また、融解直後における精子の原形質膜の損傷を 2 重蛍光染色法 (SYBR-14, propidium iodide: PI) により評価した。

【結果】マウス精巣上体凍結精子の融解後における運動精子率は、凍結融解直後において、Tre 区で $26.8 \pm 2.8\%$ 、Raf 区では $23.3 \pm 3.0\%$ であった。また、凍結融解 2 時間後では、Tre 区で $32.7 \pm 2.5\%$ 、Raf 区では $21.4 \pm 2.9\%$ で、Tre 区が Raf 区より有意に ($p < 0.05$) 高い値を示した。融解精子原形質膜の正常率は、Tre 区で $32.0 \pm 1.9\%$ 、Raf 区では $21.4 \pm 3.5\%$ で、Tre 区が Raf 区より有意に ($p < 0.05$) 高かった。

以上の結果から、マウス精巣上体精子の凍結におけるトレハロースの凍害保護効果は、従来もちいられているラフィノースの効果よりも優れていることが示唆された。

マウス精子の凍結乾燥に関する研究

金子武人
(熊本大学(CARD))

凍結乾燥したマウス精子から産子が得られたことにより、凍結乾燥技術をマウス精子保存法に応用できる可能性が示された。凍結乾燥されたマウス精子は、冷蔵庫(4°C)での保存が可能であり、輸送の際も特殊な液体窒素容器を必要としない特徴を持つ。本研究は、凍結乾燥後のマウス精子が効率的に受精能力を保持できる方法を開発することを目的として、凍結乾燥用保存液のpH値が凍結乾燥中にマウス精子に与える影響について検討した。pH9.0、8.0、7.4および6.0に調整した凍結乾燥用保存液(10mM Tris-HCl, 50mM EGTA および50mM NaCl)を用いてB6D2F1マウス精子を凍結乾燥した。凍結乾燥精子は一定期間冷蔵庫で保存し、卵細胞質内精子注入法(ICSI)を用いてB6D2F1マウス卵子に受精させた。得られた受精卵は染色体解析、体外培養による胚盤胞への発生および移植後の胎仔への発生について検討した。その結果、pH9.0および8.0の凍結乾燥用保存液において、有意にマウス精子染色体は保持された(pH9.0: 8.0: 7.4: 6.0= 66%: 76%: 35%: 18%; $p < 0.05$)。胚盤胞への発生においても、pH9.0および8.0の凍結乾燥用保存液において有意に高い値を示した(pH9.0: 8.0: 7.4: 6.0= 65%: 69%: 28%: 22%; $p < 0.05$)。さらに、pH9.0および8.0の凍結乾燥マウス精子から得られた受精卵は、50%の移植胚が胎仔へ発生した。現在我々は、凍結乾燥マウス精子を長期保存し1年半保存したマウス精子から産子を得ることに成功している。以上のことから、マウス精子凍結乾燥法は新たな精子保存法の一つとして期待される。

発生段階の異なるマウス胚の同一受容雌における着床時期

○上田乙也¹⁾、萬啓悟²⁾、鎌田宣夫¹⁾、寺社下浩一³⁾、川瀬洋介⁴⁾、豊田 裕¹⁾、鈴木宏志¹⁾

(¹⁾福中外医科学研究所、²⁾中外製薬㈱、³⁾帯広畜産大学原虫病研究センター、⁴⁾東京大学医学系研究科発生・医療工学講座)

<目的>

マウスにおいて胚盤胞の子宮への着床可能時期、いわゆる”window of implantation”は卵巣由来ホルモンにより厳密な調節を受けており、およそ24時間であるとされている。発生段階の異なる初期胚を同一受容雌へ移植した場合には、いずれの発生段階にある胚も正常に産仔まで発生することが知られているが、これは着床前において胚発生の同期化が起き、同一時期に着床するためであると信じられてきた。しかし、その調節機構に関する詳細な解明はなされていない。我々は、胚発生が同期化される時期を特定するために、異なる発生段階の初期胚を同一受容雌の左右の卵管内に別々に移植し、24時間毎に胚発生を検討した。

<材料および方法>

Jcl:ICR系成熟マウスを用い常法に従って体外受精を行った。媒精6時間後の前核期受精卵(PN)および媒精約54時間後まで培養して得られた8細胞期胚(SC)を移植に供した。PNを偽妊娠Day 0(胚栓確認日をDay 0とする)の受容雌の左右いずれかの卵管内に、SCを同一受容雌の反対側の卵管内に移植した。移植後18時間より24時間間隔にて受容雌の剖検を行って、胚の着床および発生の観察を行った。受容雌には剖検15-20分前に0.2mlの0.5%ポンタミンプルー溶液を静脈内投与し、青色に染色の認められた部位を着床部位と判定した。移植後90, 114, 138, 162, 186および210時間においてポンタミンプルー反応部位の長径および短径を計測し、着床部位の体積を算出するとともに、移植後90, 114, 138および162時間には組織学的な検討を実施した。

<結果および考察>

着床前の発生過程および卵管から子宮への移行時期には、発生段階の異なる移植胚の共存の影響は認められなかった。SCは移植後42, 66および90時間において53, 63%および74%に着床が認められた。一方、PNでは移植後90時間にて初めて着床が認められ、その際の着床率は移植胚の59%であった。着床部位の体積および組織学的な検討により、発生段階の異なる胚の発生が移植後162時間付近で同期化することが明らかとなった。これらの結果は、発生段階の異なる胚を同一受容雌の卵管に移植した場合には、発生段階のより進んでいるSCはPNと比較してより早期に着床し、その後PNも正常に着床し、両者はneural plate, presomite stage周辺の時期に両者の胚発生が同期化されることを示している。今回の実験において、偽妊娠雌の子宮における”window of implantation”を人為的に拡大し得ることが強く示唆された。

Cryotop による

ハムスター桑実期胚のガラス化保存

○清田 弥寿成・奥田 泰士・猪股 智夫¹・紫野 正雄・柏崎 直巳
(麻布大学 獣医学部 動物繁殖学研究室・実験動物学研究室)

[目的]

シリアンハムスターは、卵子がハムスターテストにもちいられるだけでなく、腫瘍学や免疫学分野の研究に使われる重要な実験動物である。本研究は、シリアンハムスターの効率的な遺伝資源保存法の開発を目的として、ハムスター桑実期胚を Cryotop (北里サプライ) をもちいてガラス化保存し、加温後の胚の生存性を調べた。

[方法]

自然交配させたシリアンハムスターの子宮から、交配後 70 から 72 時間目に桑実期胚を回収した。基礎培地として PBS+20% FCS をもちい、この基礎培地に 7.5% (EG: ethylene glycol) と 7.5% DMSO を添加した平衡培地で、胚を 3 分間平衡した。3 分間の平衡後、直ちに基礎培地に 15.0% EG、15.0% DMSO および 0.5 M sucrose (S) を添加したガラス化培地で 1 分間平衡した。このガラス化培地の平衡時間内に Cryotop 先端に胚を装填し、平衡時間の終了と同時にその Cryotop を液体窒素中へ投入してガラス化させた。ガラス化保存胚は、1 週間以上液体窒素中で保存後に加温した。加温は、室温 (22-24°C) 下の基礎培地に 0.5 M S を添加した希釈培地中にその Cryotop 先端を浸漬しておこない、胚をその希釈培地中で 5 分間保持した。その後、PBS+20% FCS で 3 回洗浄した。これらの胚を mHECM-9 (アミノ酸を除いたもの)+5% FCS 培養液中で 24 時間培養した。培養条件は 37.5°C、5%CO₂、95%空気、湿度飽和とした。加温後 3 時間および 24 時間目に胚が形態的に正常なものを生存胚とした。さらに、培養後 24 時間目の胚盤胞への発育も調べた。

[結果]

加温後の胚の生存率は、加温 3 時間後で 84.8% (39/46)、加温 24 時間後においては 34.8% (16/46) で、胚盤胞への発育率は 13.0% (6/46) であった。

以上の結果から、ハムスター桑実期胚を 15.0% EG、15.0% DMSO および 0.5 M S を含むガラス化培地で Cryotop をもちいてガラス化保存できることが明らかになった。

実験動物の生産・管理 – 外観異常動物の発生概況について –

中里 英樹

(日本チャールス・リバー株式会社)

日本チャールス・リバー株式会社ではラット、マウス、モルモット等の実験動物を自社生産及び輸入により供給しています。実験動物を安定的且つ継続的に生産し続けるには、常に適正な飼育環境を維持し、適正な遺伝管理により系統特性を維持し、商品として適正な出荷動物を選抜して出荷するためのシステムを維持し続けることが極めて重要です。つまり、何も変わらないことが当たり前というような極めて地道な作業の積み重ねによって成り立っています。

今回の発表では、生産管理に関する各種業務の概要と、その環境での外観異常動物の発見と排除について系統毎の特徴と実例を幾つか紹介します。本研究会の会員の中には日頃の研究に実験動物を使用されている方も多いと思います。それらの実験動物について、ブリーダーではどのように維持、生産されているのかということについての話題提供として気楽にお聞き頂ければ幸いです。

チンパンジーにおける精子および胚の凍結保存

○井手幸恵、中湯直己、坂本亘、竹市美和子、中島竜之、友栗徹上、吉本信彦、早坂郁夫、吉川泰弘（熊本大学CARD 資源開発、三和化学研究所熊本霊長類パーク、東京大学大学院農学生命科学研究科）

目的：チンパンジーは、遺伝学的にヒトに一番近い大型類人猿であることから、我が国では、主に認知科学などの分野で盛んに研究が行われ、きわめて大きな成果を挙げている。また、近年においては、ウイルス性肝炎研究、医薬品の評価研究、遺伝子・ゲノム関連の研究に用いられている。しかしながら、その一方では、チンパンジーは絶滅に瀕している野生動物であるにもかかわらず、生殖生理学的な研究や生殖細胞の保存は、あまり成されていないのが現状である。そこで、私たちは、雄チンパンジーから精子を採取、凍結保存を行い、融解後、ハムスターテストやチンパンジーの未受精卵を用いて顕微受精(ICSI)を行った。方法：精子の凍結は、採取した精液を等量の培養液で懸濁、遠心(400×g)することにより培養液を除去し、Gabriel et al.の方法(2000)に従って行った。約1-4週間後に行い、目視により運動精子の割合および活力を算出した。また、融解した精子を用いてハムスターテストを行ない、媒精後24時間のハムスター卵子を固定、染色することで侵入した精子を観察した。さらに、経膈法により雌のチンパンジーから採取した未受精卵を用いてICSIを行った。結果：すべての個体において、融解後の精子活力は良好であり、すべての個体の凍結精子は、ハムスター卵子へ進入可能であった。また、ICSIを行った卵子はほとんどが受精し、その一部は、胚盤胞まで発生した。

ウシ細胞および体細胞クローン胚のゲノム DNA における

CpG メチル化について

○ 栗原隆、松本和也、海野佑一、安齋政幸、三谷匡、加藤博己、佐伯和弘、細井美彦、入谷明
(近畿大学大学院・生物理工学研究科、近畿大学・生物理工学部、近畿大学・先端技術総合研究所)

体細胞クローン胚では、個体まで発生する割合が非常に低く、この原因の一つとして核移植後の核の再プログラム化の時期に胚性遺伝子の活性化が正常に行われなかったことが示唆されている。また、DNA のメチル化による遺伝子発現制御機構も体細胞クローン胚の再プログラム化に密接に関与していることが示されている。しかし、これらの研究においてサテライト配列のようなゲノム DNA に広範囲に点在する反復配列の CpG メチル化の状態については明らかにされてはきていないが、初期胚の発生に関わる機能的遺伝子の転写調節領域についてはまだ知見が少ないのが現状である。

本実験では、まず初期胚の胚発生に関わる遺伝子として Interleukin-6 (IL-6) 遺伝子の転写調節領域を、広範囲に存在する反復配列として satellite I 配列を選び、ウシ卵巣、体外受精胚盤胞期胚、そして体細胞クローン胚盤胞期胚における各 DNA 配列の CpG メチル化状態を比較・検討した。

その結果、satellite I 配列はウシ卵巣では高メチル化状態であったのに対し体外受精胚盤胞期胚では低メチル化状態であった。一方、mRNA の発現が確認されたウシ卵巣、体外受精胚盤胞期胚、そして体細胞クローン胚盤胞期胚のいずれにおいても、IL-6 遺伝子転写調節領域は低メチル化の状態にあった。

現在、他の機能的遺伝子、somatotropin receptor 遺伝子および telomerase RNA 遺伝子の転写調節領域における CpG メチル化状態について、体細胞クローン胚を使って解析を進めている。また、体細胞核移植においてドナー核として使われる細胞の遺伝子転写調節領域の CpG メチル化についても解析を進めている。

実験用動物としてのクラウン系ミニブタの有用性とその研究動向

佐藤啓介

(鹿児島大学大学院農学研究科家畜繁殖学研究室)

現在、ミニブタが実験用動物として注目を集めている。その理由として大きく4つの社会的背景が挙げられる。第1に、ヒトの病気が感染症から脳疾患や動脈硬化症、悪性新生物などに移り、これらの治療法を研究するには、できるだけヒトに近いサイズ、代謝、食性などを持った実験用動物が必要である。第2に、医薬品、食品、化学物質などの安全性や毒性をチェックするためには、より人間に近い特性をもった動物を用いることが要求されるようになった。第3に、これまで実験用動物として一定の評価を得てきたイヌが動物愛護、福祉の観点から、実験用として利用することが極めて難しい状況となり、イヌに代わる実験用動物として、ミニブタの利用が検討されている。第4に、世界的に臓器移植に対して臓器提供者が極めて少なく、異種移植に用いる臓器提供用動物としてミニブタが期待されている。また、21世紀の医療をになうと期待されている再生医療においても医療用材料として必要性が増している。

当研究室では1978年にオーミニ系の雄とゲッチングン系の雄との間に生まれた雌と、LW(ランドレース種と大ヨークシャー種の交雑種)の雄を交配してできたミニブタ雑種3頭(雄1頭、雌2頭)を(株)日本配合飼料中央研究所から導入した。導入後10年程して、近交系としてクラウン系ミニブタを確立したことから、鹿児島県畜産試験場に種豚を分譲し性能調査を行い、その実用性が実証された。このことから平成13年に県内にある(株)ジャパンファームに県外で繁殖させないことを条件に分譲し、年間2000頭の出荷を目標に供給体制を整えている。さらに、平成14年には鹿児島大学生命科学資源開発研究センターが設置され、その中に学内共同遺伝子実験分野、医学部動物実験分野とともに、我が国で最初の医用ミニブタ研究分野の設置が認められた。

クラウン系ミニブタは、4ヶ月で性成熟に達し、8ヶ月齢で妊娠し、12ヶ月齢で分娩が可能である。一腹産子数は本大学で平均5.5頭(n=45)である。体重は1歳で40kg、成長しても人並みの80kgと普通のブタの4分の1から5分の1程度の大きさで、性格も温厚で扱いやすい。

現在、当研究室ではこのミニブタを用いて疾患モデル、異種移植用臓器の生産を目的とした遺伝子改変ミニブタの作出のために体細胞クローン技術の開発を試みている。