

# 第6回哺乳動物生殖工学研究会

プログラム・抄録集

会期：平成6年12月3日（土）  
午後1時00分～5時30分

会場：北里本館2階大會議室

港区白金5-9-1 TEL 03-3444-6161

開会の辞

会長 横山謙介

特別講演

配偶子および胚に対する人為的操作と染色体異常

吉澤緑先生（宇都宮大学農学部）

司会 加藤基恵

一般講演

座長 星 雅樹

1. 凍結融解E S細胞とマウス胚との共培養によるキメラマウスの作出

鎌田宣夫・上田乙也・内田さとみ・寺社下浩一・鈴木宏志（CSKリサーチパーク）

2. 豚卵子の成熟分裂を制御する分子機構

内藤邦彦<sup>1</sup>・R. M. Moor<sup>2</sup>・豊田裕<sup>1</sup>（東大医研<sup>1</sup>、AFRC Babraham Institute<sup>2</sup>）

座長 板垣 佳明

3. 家畜改良センターにおけるウシ受精卵移植技術開発の取り組み

的場理子（農林水産省 家畜改良センター）

4. ニホンザルの生殖生理

清水慶子（京都大学靈長類研究所・分子生理部門）

5. FVB/Nマウス卵子の各種生殖工学技術適用時の成績および雌性前核形成速度、大きさについて

山田秀一（（財）実験動物中央研究所）

———— 総会 ———

## 配偶子および胚に対する人為的操作と染色体異常

吉澤 緑（宇都宮大学農学部）

染色体は生物の種によってその数や形態が一定であり、これを核型と称する。例えば、マウスは、雄  $2n=40XY$ 、雌  $2n=40XX$  の核型であり、ヒトは  $2n=46XX$  もしくは  $XY$  である。この核型の異常、すなわち、生物固有の染色体数や染色体の形態に生じた変化を染色体異常と称している。染色体異常の個体は、発生の過程でその多くが淘汰されると考えられ、先天的な染色体異常の個体として出生するのは、ごく限られた症例、数と考えられる。

近年の哺乳動物における配偶子および胚に対する人為的操作は、発生学生物学などの基礎学問分野の実験研究にとどまらず、畜産学、産科婦人科学などの分野への応用面、実用面での利用の段階へと急速な発展を見せている。これら様々な技術によって処理、生産された胚については、その生存性および様々な観点からの正常性の検討がなされているが、生産効率や次世代への影響という点から捉えると、細胞遺伝学的な正常性の判定はより重要なものと思われる。これは、細胞遺伝学的に異常な胚、すなわち3倍体のような重症な染色体異常の胚であっても、着床前の胚発生段階で形態的に異常の有無を判定することは困難であり、一部のものは妊娠中期頃まで生存しうることが確認され、しかもこれらの胚は妊娠末期まで生存することはほとんどなく流産に終わり、生産効率を低下させる一因となるからである。また、ダウン症のように、ある種のトリソミー（染色体が1本多い）の個体は、妊娠を継続して出生に至るものもあり、これらは出生時奇形等を呈したり、その後の発育に困難さを伴う。これら染色体異常の診断を行うには、当該個体より染色体標本を作製しなければならず、現在、受精時や胚の初期分割期に染色体標本作製を行って胚の正常性を調べることは、発生工学の様々な処理方法の妥当性を判定するための重要な手法のひとつになっている。また、染色体標本を作製した際、性染色体を観察することにより、胚の性の判定を同時にえ、さらに、この受精時の染色体標本作製技術を利用して配偶子の染色体を調べることも可能である。

著者らはこれまで、マウス、ハムスターなどの実験動物、および牛、豚などの家畜の胚の染色体分析において、分析率向上のための細胞分裂阻止剤の適切な使用濃度や処理時間、染色体標本の作製方法などについて検討し、これらの技術の上に立って、様々な発生工学的技術によって処理、生産された受精卵や初期胚について、染色体の観点から正常性の検討を行ってきた。

本講演では、著者らがこれまで行った研究、また現在進行中の研究を含め、染色体標本作製や分析についての基礎的な問題から、種々の人為的操作によって処理された配偶子、胚について染色体分析を行った結果などについて紹介したい。

## 凍結融解ES細胞とマウス胚との共培養によるキメラマウスの作出

鎌田宣夫 上田乙也 内田さとみ 寺社下浩一 鈴木宏志  
(CSKリサーチパーク)

近年、遺伝子の機能解析のみならず、疾患モデル動物開発の可能性をも有しているジーンターゲティングによる遺伝子欠損マウスの作出が、盛んに行われている。しかし、そのためのキメラマウス作出は、ES細胞を胚盤胞、もしくは8細胞期胚に注入しなければならず、その操作には熟練した技術と労力が必要となる。Woodらにより注入操作をいっさい必要としない8細胞期胚とES細胞との共培養による簡便なキメラマウス作出法が報告され、キメラマウス作出は容易になった。しかし、この方法を用いても、共培養の日程に合わせてES細胞培養、および、フィーダー細胞培養・調整の手間は依然として残ることになる。そこで、我々は、あらかじめ1バイアル当たり $4-6 \times 10^6$ 個のES細胞を凍結保存しておき、共培養当日に細胞を融解し、キメラマウス作出の検討を行った。

ES細胞A3-1株の相同組換体(ET-1遺伝子欠損ES細胞株)を用いた共培養では、共培養時のES細胞の濃度を $5-5.5 \times 10^5$ cells/mlと $16.4-20 \times 10^5$ cells/mlの濃度で比較すると(表1)、胚盤胞への発生率、着床数、産仔数のいずれも、 $5-5.5 \times 10^5$ cells/mlの実験区が $16.4-20 \times 10^5$ cells/mlの実験区に比べ高い傾向があった。 $16.4-20 \times 10^5$ cells/mlでは胚盤胞への発生率が低く、キメラマウスも得られず、共培養時のES細胞の濃度がキメラマウスの作出効率に影響を与えたものと考えられ、このことはES細胞が付着しそぎた胚が多かったことによるものではないかと予想された。また、ES細胞融解後、フィーダー細胞を除去せずに共培養を行う際に、6-8%程度のフィーダー細胞が共培養の場に混入することになり、フィーダー細胞の混入がキメラマウス作出に影響を及ぼすことが危惧されたが、この程度のフィーダー細胞の混入ではキメラマウス作出には影響は認められないようである(表2)。

共培養によって得られたキメラマウスのgermline transmissionも確認しており、凍結融解直後でフィーダー細胞を除去しないES細胞使用するこ

とにより、キメラマウス作出の多くの手間を省けるようになった。現在、我々はES細胞の培養条件を含め、キメラマウス作出の効率化について検討継続している。

表1 キメラマウス作出成績

ES細胞濃度 $\times 10^5$ cells/ml	胚盤胞への 発生率	移植	着床	産仔	キメラ
5.0- 5.5	80/129(62)	83	32(39)*	15(18)*	4(5)*
16.4-20.0	26/ 97(27)	66	22(33)*	6( 9)*	0(0)*

Co-culture medium: DMEM+5%FCS and 23mM calcium lactate

\*：移植数に対する割合

表2 キメラマウス作出におけるフィーダー細胞の影響

フィーダー細胞	胚盤胞への 発生率	移植	着床	産仔	キメラ
-	56/ 96(58)	87	22(25)*	15(17)*	2(2)*
+	52/136(28)	128	31(24)*	20(15)*	3(2)*

Density of ES cells: 5.0-5.5 $\times 10^5$  cells/ml

\*：移植数に対する割合

## 豚卵子の成熟分裂を制御する分子機構

内藤邦彦<sup>1</sup>・R. M. Moor<sup>2</sup>・豊田 裕<sup>1</sup>

(東大医科研<sup>1</sup>・AFRC Babraham Institute<sup>2</sup>)

細胞周期を制御する因子の解析が盛んに研究され始めてから5年が過ぎ、酵母から人にいたる全ての真核生物の細胞分裂を制御する因子、p34<sup>cdc2</sup>とcyclinBの働きが明かになった。これらの分子は、もともとウニ、ヒトデ、ホッキ貝といった海産動物卵、およびXenopus卵の成熟分裂を制御する因子の解析から発見された。一方、哺乳動物卵子を体外成熟させる技術は以前から広く応用されているが、その制御機構の解析は極めて遅れており、これらの存在が確認されているのはマウス卵のみで、しかも成熟期間を通しこれらの変動を調べた報告は無かった。

我々は英國AFRC Babraham Instituteにおいて、豚卵子を材料として成熟分裂過程におけるこれらの分子の卵細胞内濃度、生合成、結合状態の変化について1年半にわたり研究してきた。その結果、cyclinBは成熟期間を通しあまり大きな変動はしないという、これまでの海産動物やXenopus卵での報告と大きく異なる哺乳動物卵子特有の成熟分裂の制御が示され、第86回家畜繁殖学会で報告した。すなわち、(1)豚の未成熟GV卵はcyclinBを持ってはいるが、その量は極めて僅かであること、(2)GV期間中はcyclinBは產生されず、従ってその含量、結合型cdc2の量もほとんど増加しないこと、(3)GVBD以降はcyclinBが產生され、それによって含量、結合型cdc2の量は著しく増加し、cdc2活性も増加すること、(4)第2減数分裂中期(MetII)ではcyclinBが盛んに產生されており、cyclinB含量、結合型cdc2量は第1減数分裂中期(MetI)と比べ一段と増加することなどを明かにした。

しかし、この実験は豚卵子の成熟に伴う疑問点、つまり24時間という異常に長いGV期間中に產生されるタンパク質は何か、またこの間にどのような変化が起こっているのかという点を解決してはいない。むしろMetIIではMetIと比較しサイクリンB含量が極端に多いが、p34<sup>cdc2</sup>活性が等しいのはなぜか、MetIとMetIIでのp34<sup>cdc2</sup>のリン酸化状態の相違は何を意味するのか、という疑問点を増やしてしまった。今回はこれらの疑問点について考察を加えたい。

家畜改良センターにおける  
ウシ受精卵移植技術開発の取り組み

的場 理子（農林水産省 家畜改良センター）

平成2年、家畜改良センターは畜産新技術を利用した家畜の改良増殖及びその技術の開発・実用化を図るため、前身である種畜牧場を再編整備して新しく設立されたものである。現在、センター本所と全国11牧場から組織されている。特に本所では受精卵移植技術の平準、簡易化を図り、家畜の改良増殖を行うことを目的として、周辺技術の開発・実用化に関する調査試験を行っている。

### 1. 受精卵移植技術の平準化・簡易化

#### ＜過剰排卵処理技術＞

##### 1) PVP溶解FSH1回投与による過剰排卵処理の簡易化

通常の処理ではFSHを朝夕2回、連続4日間にわたり投与する必要がある。FSHを粘稠性の高いポリビニルアルコール(PVP)溶液に溶解して投与するとFSHが徐々に吸収されるため、PVPに溶解したFSHを1回のみ投与しても通常の処理と同等の採卵成績が得られることが報告されている。本法におけるFSHの投与量、投与部位及び用いる供卵牛の品種等の影響について検討している。黒毛和種を用いて行った実験では、常法と変わらない結果が得られている。また、筋肉内よりも皮下への投与が良好な成績を示している。

##### 2. 黄体ホルモン製剤を用いた連続過剰排卵処理

発情周期の同期化を目的として使用されている黄体ホルモン製剤(CI-DR:天然型、SMB:合成型)を過剰排卵処理に併用することで、牛の発情周期に関係なく人為的に発情周期をコントロールし、過剰排卵処理を開始することが可能となる。また、処理後の発情周期の回帰を待つことなく連続して同様の処理を行い、28日間隔で採卵を行うことができ、通常年4回程度しか実施できなかった採卵回数の向上を検討している。採卵を28日間隔で2回実

施することを1セットとして3セット（計6回採卵）実施した平均正常卵数の成績は、通常の過剰排卵処理と同等の結果であった。

### <体外受精>

#### 1. 体外受精技術における発生率改善のための培養条件の検討

体外受精における培養液の種類及び培養液への各種添加物質が発生率に及ぼす影響について検討を行っている。培養液の種類については、CR1aaを用いることによりTCM-199に比べて胚盤胞への発生率が向上した。しかし、発生した胚盤胞の耐凍性は改善されなかった。このため、耐凍性を高めるためにリノール酸アルブミンを発生培養液に添加したところ、凍結融解後の生存率は向上した。

#### 2. 生体からの卵胞卵子の採取と体外受精への応用

過剰排卵処理成績の悪い供卵牛や妊娠牛の卵巣から吸引針を超音波誘導することにより未成熟卵子を採取できる。この様にして採取した未受精卵子は体外受精を行うことにより有効利用できる。未受精卵子の採取は一週間に1～2回実施することが可能である。この技術では、卵巣内の卵胞数や卵胞の大きさが採取卵子数に大きく影響することが推測される。このためホルモン剤による前処理を行い、採取卵子数、形態学的品質及び発生能に与える影響を検討している。

### <凍結保存技術>

#### 1. ダイレクト法の検討

今まで凍結胚の移植には耐凍剤の希釈除去が必要とされてきた。これらの方法は融解後、実験室内で段階的に希釈して再びストローに詰め直す煩雑さ、或いはストロー内での希釈操作等の技術の熟練度がその後の受胎率に大きく影響する。そのため、段階希釈を必要としない簡易な方法の開発、実用化について検討を行ってきた。エレングリコールを耐凍剤として用いたダイレクト法では、耐凍剤を希釈することなく受卵牛に直接移植することができ、段階希釈法と同様の受胎率を得ることができる。

## 2. 形態学的低品質卵の品質向上と凍結保存法の検討

国内で実施される受精卵移植は凍結・融解胚を用いることが多いが、回収された胚のうち、生存率が低い低品質胚は利用されず廃棄されることが多い。しかし、育種改良を図る上では経済的能力が期待できる供卵牛から回収した胚は低品質胚といえども有効利用する必要がある。このようなことから  $\beta$ -ペルガトロナ-肽を培養液に添加し、低品質胚を短期間の培養後に凍結して培養効果を検討している。培養試験の結果では、顕著な効果が認められ、凍結融解後の生存率への影響については現在検討中である。

## 3. ガラス化保存法の検討

ガラス化保存法は、高価な凍結機械を使用せずに回収した胚を保存することができる簡易的な方法である。しかし、ガラス化溶液は各種耐凍剤が高濃度で添加されており浸透圧も高く、細胞毒性が高いとされている。現在、エレングリコール、グリセリン、グルコース、シュガースの4種類の耐凍剤を添加したガラス化溶液を用い、後期桑実胚から拡張胚盤胞までのガラス化保存が可能である。

### <核移植>

#### 1. 体外受精胚の卵割時期の確認と核移植への応用

核移植技術が実用化されれば一卵性多子を作出できるため、優良牛の増産、改良が望める。しかし、その産子数は少なく、今だ基礎研究の域をでるに至っていない。一卵性多子を効率的に生産するためには、移植可能な再構築胚の発生率を改善する必要がある。その方法の一つとしてドナーリビエント細胞の細胞周期の同期化が重要とされている。ドナーリビエント細胞の細胞周期を確認するため、卵割時期を経時的に観察し、細胞融合の最適時期を決定して核移植を行い、胚盤胞への発生率の及ぼす影響について検討している。

#### 2. 核移植ドナーリビエント細胞（16～32細胞期）胚の越低温保存法の検討

核移植を実施するにあたり、ドナーリビエント細胞の確保が必要である。ドナーリビエント細胞を安定的に供給するために生体、体外受精由来16～32細胞期胚の凍結保存法を検討している。

### <雌雄産み分け>

雄特異的DNAの塩基配列を用いた、ウシ胚の性判別技術及び周辺技術の確立

雌雄産み分けは農家にとって育種改良上、有益な技術であり早急に実用化することが求められている。この方法は、胚の一部細胞をバイオブレーカーにより採取し、雄特異的DNAが含まれているか否かで雌雄を判定するが、判別胚或いは判別後の凍結融解胚の生存性は低い等の問題がまだ残されている。現在、処理の簡易化、バイオブレーカー後の胚の生存率向上及び凍結保存法の検討を行っているところである。

### <客観的受卵牛の選定>

受卵牛の黄体所見、牛乳中P値及び受胎率との関連

「オーチェックカラット」・Wを用い、乳汁中プロゲステロン濃度の定性測定を行うことで、直腸検査による主観的な受卵牛の選択よりも、より正確な黄体機能を把握することが可能であり、受胎率の向上が期待できる。また黄体検査とP値の測定を組み合わせることで、今まで直腸検査で黄体の形状が悪いと判断され、除外されていた受卵牛の中からも移植可能な黄体機能を有している個体を選抜できる等、正確な受卵牛の選定が行えるかどうかの検討を行っている。

### <一卵性双生子の生産>

受精卵の分割技術

黒毛和種をドナーとして過剰排卵処理を行い、回収した胚を分割移植することにより、一卵性双子を生産する。一卵性双子を利用した①肥育試験（超音波診断装置、コンピュータ画像解析装置による肉質・肉量の推定）、②繁殖性の調査（過剰排卵処理による母牛反応性）を行い、相似性を検討している。

## ニホンザルの生殖生理

清水慶子 京都大学靈長類研究所・分子生理部門

ニホンザル (*Macaca fuscata*) は、北海道を除く日本列島に広く分布する日本固有種の、ヒト以外の靈長類のうち世界中で最も高緯度に生息する真猿類である。また、高等靈長類の中で例外とも言えるほど明瞭な繁殖期の季節性を持ち、生態学的にも、生理学的にも貴重なサルと言える。さらに、系統分類学的にも、ヒトときわめて近く、解剖学的構造や生理機能、実験反応性がヒトに近似するなどの点から、近年、実験動物としての有用性が認識されつつある。

生殖生理面では、ニホンザルの月経周期は、ヒトと同様、約28日であり、月経周期もヒトと近似する等の特徴を持つ。しかし、ヒトと異なりニホンザルでは排卵を伴う正常月経周期は繁殖期にあたる秋から冬の数カ月間しか発現せず、他の時期には無排卵が持続し、月経もほとんどみられない。。また、オスの性腺にも季節変化が見られ、射精を伴った交尾行動はメスと同様、繁殖期にしか見られない。

本研究会では、これらのニホンザルの生殖の生理の特性について、メスを中心に、我々の研究室の最近の成果を紹介したい。

# FVB/Nマウス卵子の各種生殖工学技術適用時の成績および雄性前核形成速度、大きさについて

山田 秀一（財団法人 実験動物中央研究所）

FVB/Nマウスは、NIHにおいて維持しているSwissマウスを起源とし、Friend leukemia virusの高感受性をもとに1970年にNIHで確立されたコンジェニックである。このマウスは、武藤ら（Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 88, 2065-2069, 1991）によると、前核の体積がC57BL/6J、B6SJLF1卵子に比較して大きく、マイクロインジェクションの操作性が高い。さらにインジェクションした卵子の生存性と移植によって得られた産仔が注入DNAをインテグレイトする割合がC57BL/6JおよびB6SJLF1と比較して高いことを報告している。この点からアメリカでは、FVBはトランスジェニックに好適系統として使用されている。トランスジェニックを作成し系統育成する場合、体外受精、培養、移植ならびに凍結保存の一連の生殖工学の手法を適応した際のバックグラウンドが明確でない点やFVBの生理学的なバックグラウンド等が明らかでない、またコマーシャルベースにのっていない等の理由から日本での使用は限られている。本実験では、FVBをトランスジェニックに使用にあたり、前核が真に大きいのか、また生殖工学的手法を用いた際のバックグラウンド収集の目的で、体外受精、培養、移植および凍結をおこない若干の知見を得たので報告する。

## [材料および方法]

### 1. 各種生殖工学技術適用時の成績

FVB/Nは、1992年萬有製薬株式会社の武藤博士から実験動物中央研究所に7ペア導入し、兄妹交配によって系統を維持、実験に供した。体外受精は常法（豊田ら1971）に従った。受精卵の発生能力を調べる目的で媒精後120時間まで培養し倒立顕微鏡で観察した。なお培地は、Whitten-514をベースに100uM EDTA添加の効果を調べた。受精卵の移植は常法に従い2-CellをDay1(=plug確認日)の偽妊娠雌の卵管に移植した。凍結は緩慢凍結法に

よった。すなわち室温から-7°Cまで0.5/min、植氷後5-10分の平衡、-7~-50°Cまで0.5/min、-50~-70°Cを1/minで冷却後、液体窒素の液層保存とした。融解は室温下で緩慢融解で行った。移植は新鮮卵子と同様に行った。

## 2. 前核は大きいのだろうか？

FVB/N卵子の前核が他の系統と比較し大きいのか調べる目的で、2時間ブレインキュベートしたJcl:MCH(ICR)の精巣上体精子をFVB/N卵子、対照としてJcl:MCH(ICR)卵子に授精後、経時的にヘキスト染色で精子の細胞質への侵入の有無、侵入精子頭の前核への変化ならびに前核の直径を観察した。

## 〔結果〕

### 1. 各種生殖工学技術適用時の成績

授精後約6時間での第2極体の放出と雌雄両前核の形成を指標とした受精率は、FVB/Nで81.3%であった。体外受精卵の培養成績は（表1）に示した。EDTA添加培地で受精後120時間で94.2%が胚盤胞に発生し、無添加培地で95.1%が胚盤胞に発生した。新鮮卵の2細胞期胚を移植した成績は、移植した7例全てが妊娠し移植胚の67.3%が正常な産仔になった。緩慢凍結・融解後、形態的正常胚は、92.2%であった。この胚を約72時間継続培養した結果97.6%が胚盤胞に発生した。また融解2細胞期胚の移植によって約6割が新生仔に発生した。

FVB/N系統は体外受精、培養、凍結および移植のいずれにおいても安定した高い成績が得られる事が知られた。

## 2. 前核は大きいのだろうか？

体外受精後30分でFVBおよびMCH両系統のほぼ全ての卵子に精子の侵入が見られた。授精後1時間ではFVBの卵子に侵入した精子頭部はMCHの卵子に侵入した卵子に比較してやや大きな膨大精子頭を形成していた。授精後3時間では、FVBの卵子に侵入した精子頭部は明らかに前核を形成しているのに対して、MCHではほぼ全てが膨大精子頭に留っていた。MCHは授精後4~5時間で雄性前核の形成が認められた。授精後6時間での雄性前核の直径はFVBで　　um、MCHでは　　umであった。

以上の点から、FVB/Nマウス卵子は、各種生殖工学技術適用時の成績が非常に高く、ほかのアルビノマウスに類を見ない、扱いやすい系統であることが知られた。また前核が他の系統と比較して大きいと言うよりはむしろ、前核形成速度が非常に速い系統であることが知られた。

Table 1 In Vitro Culture of FVB/N Strain Mouse Eggs in Whitten's Medium with or without  $1.0 \times 10^{-4}$  mol EDTA

EDTA 100uM	No. of eggs cultured	No. (%) of eggs developed to:			
		2-cell in 24h	4-cell in 48h	8-Morula in 72hr	Blastcyst in 120h
+	83	83 (100)	78 ( 94.0)	77 ( 92.8)	75 ( 90.4)
+	82	82 (100)	81 ( 98.8)	80 ( 97.6)	80 ( 97.6)
+	60	60 (100)	56 ( 93.3)	58 ( 96.7)	57 ( 95.0)
total	225	225 (100)	215 ( 95.6)	215 ( 95.6)	212 ( 94.2)
<hr/>					
-	80	80 (100)	77 ( 96.3)	80 (100 )	79 ( 98.8)
-	80	80 (100)	78 ( 97.5)	76 ( 95.0)	76 ( 95.0)
-	60	60 (100)	59 ( 98.3)	57 ( 95.0)	55 ( 91.6)
total	220	220 (100)	214 ( 97.3)	213 ( 96.8)	210 ( 95.1)