

第10回哺乳動物生殖工学研究会

プログラム・抄録集

会期：平成10年12月12日（土）
午後1時00分～5時30分

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

開会の辞

会長 横山峯介

特別講演

精細胞を用いた顕微授精について

小倉淳郎先生（国立感染症研究所 獣医学部）

司会 横山峯介

シンポジウム

座長 長谷川孝徳

1. 国立遺伝学研究所における各種系統マウスの体外受精と胚の凍結保存
水品洋一・樹屋美代子（日本クレア㈱関連事業部・遺伝研 哺乳動物遺伝）

2. 日本クレアにおけるマウスの体外受精と胚の凍結保存の現状
かせ田一宏（日本クレア㈱）

3. 日本チャールス・リバーにおけるマウスの体外受精と胚の凍結保存の現状
宮地 均（日本チャールス・リバー㈱）

座長 宮地 均

4. 老化促進モデルマウス（SAMP）の体外受精と胚の凍結保存
大塚 純（ヤクルト本社中央研究所）

5. 創薬における体外受精の利用
鈴木 宏志（中外製薬株式会社 創薬資源研究所）

6. マウス体外受精の黎明期と将来の展望
豊田 裕（北里大学客員教授）

———— 総会 ————

精細胞を用いた顕微授精について

小倉淳郎（国立感染症研究所 獣医学部）

【はじめに】

雄性生殖細胞は、精細管の形成とともに精細胞(spermatogenic cell)と呼ばれるようになり、性成熟とともに精子発生を開始する。精細胞は、体細胞分裂(mitosis)、減数分裂(meiosis)、精子形成(spermiogenesis)を経て精子として完成する。精細胞は、大きく分けて、精祖細胞(spermatogonium)、一次精母細胞(primary spermatocyte)、二次精母細胞(secondary spermatocyte)、精子細胞(spermatid)に分類される。これらの細胞は、そのままでは、卵子を受精させることはできないが、顕微授精技術を用いることにより、少なくとも、卵子内へ導入することは可能である。これらの卵子が産子へ発生すれば、その精細胞は、広義の「受精能」を有していると言える。この「受精能」を確認するために、1990年代前半より精細胞を用いた顕微授精技術およびその周辺技術が開発されてきた。ここでは、精細胞を用いた顕微授精について、その成果および技術的側面を中心に解説する。

【現在までの成果】

精細胞を用いた顕微授精の現在までの成果の概略を表1にまとめた。これまでに産子が得られたのは、精子細胞でマウス、ウサギ、ヒト、二次精母細胞および一次精母細胞でマウスである。また、ヒトおよびマウスにおいては、凍結融解後の精子細胞でも産子が得られている。卵子は、円形精子細胞には第二減数分裂中期(Meta II)あるいは終期(Telo II)卵子を、二次精母細胞にはMeta II卵子、そして一次精母細胞にはMet I卵子(二回核移植)あるいはMet I卵子を用いる。これまで円形精子細胞の場合、顕微授精と同時あるいはその前に卵子を活性化することで、高レベルの MPF にさらされることを防ぐ必要があるといわれていた。しかし最近我々は、Meta II に停止させた卵子を用い、premature chromosome condensation を生じさせた後も正常な産子を得られることを明らかにした。

以上の動物は、体内的自然受精、人工授精、体外受精(IVF)あるいは細胞質内精子注入法(ICSI)で受精卵が回収でき、胚移植後に産子が得られている。しかしながら、家畜あるいは実験動物の中には、いかなる方法でも

容易に受精卵の得られない動物もある。例えば、アフリカ産の齧歯類であるマストミスが挙げられるが、最近、円形精子細胞で顕微授精することで、多数の受精卵を得るでき、胚を用いた実験が容易になった。

表1. 精細胞を用いた顕微授精の現在までの成果

年	動物種	用いた精細胞	方法*	発生	文献
1993	ハムスター	円形精子細胞	ICI	2-cell	Ogura & Yanagimachi
1993	ハムスター、マウス	円形精子細胞	EF	2-cell	Ogura et al.
1994	マウス	円形精子細胞	EF	産子	Ogura et al.
1994	ウサギ	円形精子細胞	ICI	産子	Sofikitis et al.
1995	マウス	円形精子細胞	ICI	産子	Kimura & Yanagimachi
1995	ヒト	伸張精子細胞	ICI	産子	Fishel et al.
1995	ヒト	円形精子細胞	ICI	産子	Tesarik et al.
1995	マウス	二次精母細胞	ICI	産子	Kimura & Yanagimachi
1996	ウシ	培養由来円形精子細胞	ICI	胚盤胞	Goto et al.
1996	マウス	凍結融解円形精子細胞	ICI	産子	Ogura et al.
1997	マウス	老齢無精子雄由来精子細胞	ICI	産子	Tanemura et al.
1997	マウス	一次精母細胞	EF	胚盤胞	Ogura et al.
1997	ヒト	凍結融解円形精子細胞	ICI	妊娠中	Antinori et al.
1998	マウス	一次精母細胞	ICI	産子(死亡)	Sasagawa et al.
1998	マウス	一次精母細胞	EF	産子	Ogura et al.
1998	マウス	一次およびMet I精母細胞	ICI	産子	Kimura et al.
	マウス	円形精子細胞**	ICI	産子	Ogura et al.
	ブタ	円形精子細胞	ICI	胚盤胞	Lee et al.
	マストミス	円形精子細胞	ICI	胚盤胞	Kojima

*ICI: 細胞質内注入法、EF: 電気融合法、**染色体凝集後

【方法について】

精細胞を用いた顕微授精技術は、多くの点で精子を用いた顕微授精技術と異なる。まず、精細胞を精細管から機械的あるいは酵素処理により採取しなければならない。顕微授精の方法として、注入法のみならず、膜融合法（主に電気融合法）を用いることができる。また、一部の動物の精子細胞を除き、卵子を人為的に活性化する必要がある。

【今後の展開】

顕微授精に用いることのできる精細胞は、もともと半数体か、あるいは授精後に半数体の染色体を形作る能力を持つ必要がある。その点では、一次精母細胞、それも後期 pachytene あるいは diplotene が利用の限界であろう。それよりも幼弱な精細胞、精祖細胞を用いる場合は、卵子の染色体を除くいわゆる核移植クローンの技術が必要になる。理論的にはこの方

法で二倍体胚が作成できるが、その胚が正常に発生するかどうかは、まだ不明である。

精細胞を用いた顕微授精技術の応用として多くの研究者が期待しているのが、遺伝子導入動物の作成である。しかしながら、精細胞は各種の遺伝子導入法に非常に敏感であり、体外で培養できない、などの理由からまだ実現されていない。今後、精細胞に関わる各種周辺技術の開発が期待される。

国立遺伝学研究所における各種系統マウスの体外受精と胚の凍結保存

水晶洋一・樹屋美代子

(日本クレア(株) 関連事業部・遺伝研 哺乳動物遺伝)

国立遺伝学研究所では昭和26年よりラット及びマウス約10系統を皮切としてネズミの系統保存事業を行っている。その後新規に導入した系統や野生ネズミを加えて規模が大きくなり、昭和57年よりマウス受精卵凍結保存技術、平成8年度より体外受精技術を導入し、マウス胚凍結保存事業を行っている。平成10年11月までに約220系統のマウスを凍結保存してきたが凍結胚は試験的な融解を除き、ほとんど融解されることはなかった。平成9年にSPFマウス飼育施設において*Pasteurella pneumotropica*の感染が認められたことから、凍結胚の融解移植による清浄化を現在行っている。マウス配偶子の体外受精については主に凍結胚を得るための手段として実施している。ここから得られた各種系統マウス体外受精の効率と*Pasteurella*清浄化の過程で得られた凍結胚融解の結果を併せて紹介したい。

日本クレアにおけるマウスの体外受精と胚凍結保存の現状

かせ田 一宏（日本クレア^株）

近年、トランスジェニック(Tg)マウスの作製技術が確立され、様々な分野で種々のTgマウスが次々と作製されている。Tgマウス作製の材料となる前核期受精卵を得るには、過排卵処置→交配→受精卵採取または体外受精→受精卵作出といった一連のシステムが必要である。よって前核期受精卵をあらかじめ用意できれば一連の操作過程を短縮できることから、凍結した前核期受精卵の大量かつ安定した供給が各種研究機関、製薬企業より要求されている。そこで、自社の体外受精法と胚の凍結・融解法を紹介し、現在使用している改良したTYH液の体外受精成績とその培地由来の受精卵の産仔への発生能を報告する。またマウス胚凍結保存の受託業務の現状とラット胚の凍結保存の現状も合わせて報告する。

(材料および方法) マウス：受精卵の作出は、C57BL/6JJcl、C57BL/6NJcl、C3H/HeJJcl,C3H/HeNJcl,BALB/cA-hr/hrJcl,B6C3Fe由来のミュータントのそれぞれ成熟個体を用いた。過排卵処置は、PMSGとhCG各5IUを48時間間隔で腹腔内投与した。体外受精は、豊田らの方法に準じ、通常のTYH液と改良したTYH液(M.TYH液：CaCl₂濃度2倍；高純度BSA)の受精成績を比較した。なお、前核期はC57BL/6J、2細胞期胚では各系統の成績を調べた。胚の凍結は、前核期と2細胞期胚をそれぞれ緩慢凍結法で行った。胚の移植は、凍結融解後の前核期と2細胞期胚を、偽妊娠雌(Plug確認)の卵管に移植した。

(結果および考察) C57BL/6Jの前核期受精卵と判定した体外受精率および平均受精卵数は、TYH液では55.5%、8.0個でM.TYH液では86.1%、13.4個であった。2細胞期胚では66.8%、11.3個および94.7%、13.8個であった。また、その他の系統はTYH液では21.3～94.4%でM.TYH液では45.5～97.1%であった。どの系統ともM.TYH液を用いた方が受精率は高い値となった。凍結・融解された前核期および2細胞期胚の生存性には、培地または系統による差はなく、80%以上であった。また、凍結・融解後の前核期および2細胞期胚は、培地に関係なくほぼ同じ値で産仔に発生した。

以上の結果、改良したTYH液は、どの系統でも通常のTYH液に比べ高い受精成績を示すことから、より多くの受精卵を得ることができた。また、この培地由来の受精卵は、産仔への発生能も全く変わらないため、有用な体外受精用の培地であることが明らかになった。

日本チャールス・リバーにおける マウスの体外受精と胚の凍結保存の現状

宮地 均

日本チャールス・リバー（株）

我々は、生産コロニーのバックアップを目的とし、マウス胚の凍結保存を検討中である。その作業の一環として、効率的な胚の回収と、繁殖性の劣る系統への対応を視野に入れた、基礎検討のために、体外受精を行なっている。しかしながら、そのレベルはいまだ実験室レベルであり、企業が大量生産を行なう状態までには、残念ながら達していない。

このような現状ではあるが、現在、我々が行なっている、マウスの体外受精について出来るだけ詳しく紹介する。

また、Vitrificationによるマウス胚の保存について、我々が行なっている方法を、併せて紹介する。

老化促進モデルマウス（SAM）の体外受精と胚の凍結保存

大塚 純（ヤクルト本社中央研究所）

モデル動物の生産や系統維持には多大な労力や経費を要する。これらを効率的に行うには体外受精や胚の凍結保存の応用が有効である。当研究所で系統維持している老化促進モデルマウス（SAM）のうちSAMP1（P1）は繁殖能力が低く出産後の食殺も多いため、その系統維持や動物の生産には大変な労力を要している。もし、P1を個体ではなく凍結胚として保存し、必要に応じて個体に戻すことができれば系統維持にかかる多大な労力や経費などが軽減され、効率的な系統維持が可能となる。そこで、P1およびそのコントロール系統のSAMR1（R1）の胚を凍結保存することを目的として検討を行った。まず、実験1ではP1およびR1におけるホルモン処理後の排卵数、体外受精率、胚の体外発生率、移植による仔への発生率などの胚の基礎的事項について調べた。次に、実験2においては、超急速凍結法を用いてP1およびR1の胚を凍結し、融解後の胚から仔が得られるかどうかを検討した。その結果、実験1では、P1およびR1においてはホルモン処理および体外受精を用いることによりに高率に受精卵が得られることや、体外における1細胞期胚からの培養では *in vitro* 2-cell block現象がみられ、多くの胚は2細胞期で発生を停止することが明らかとなった。

さらに、これらの結果を踏まえて行った実験2では、超急速凍結法により凍結融解したP1およびR1の胚は回収された胚の90%以上が形態的に正常であり、それらをレビエントの卵管に移植することにより凍結融解由來の産仔が得られることが明らかとなった。

創薬研究における体外受精の利用

中外製薬株式会社 創薬資源研究所 鈴木 宏志

1970年代に黎明期を迎えた遺伝子工学と生殖工学は、80年代初頭には哺乳動物 *in vivo* における遺伝子機能の解析系を提供するとともに、我が国では発生工学と呼ばれる研究領域を形成した。現在、遺伝子の過剰発現あるいは欠損系を中心とした、いわゆる、トランスジェニックマウスは、遺伝子機能の解析に必須な研究手段として認識されており、医学・薬学研究においては、疾患モデルとしてのみならず、新規ターゲット分子の *in vivo* 評価系として貢献している。生殖工学は、トランスジェニックマウスの作出や、その後の解析のための維持・繁殖にとって重要な幾つかの技術で構成されているが、とりわけ体外受精と配偶子の凍結保存技術はトランスジェニックの作出のみならず、維持・繁殖にも主要な役割を担っており、マウスを用いた研究の質とスピードを向上させるうえで極めて重要な技術である。したがって、これら二つの技術を持たない研究室／機関では、トランスジェニックマウスの作出は可能ではあるものの、研究の幅には大きな制約を受けるように思われる。創薬研究においてもトランスジェニックマウスの需要は、ここ数年間で大幅に増大しており、マウスの作出、維持にかかる効率性も要求されるところである。本講演では、筆者らの経験した実用的な見地からのトランスジェニックマウスと体外受精とのかかわりあいを紹介する。

体外受精は、ヒトの臨床のみならずマウスにおいても、先天的あるいは加齢に伴う不妊を克服するために利用されるが、その適用にはおのずから限界がある。例えば、自然交配による繁殖が不調に終わり体外受精の適応を図る場合には、過剰排卵のためのホルモンに反応できないような老齢マウスを用いることはできないので、その適用範囲／時期をあらかじめ把握しておくことが重要である。また、ある系統の大群生産を行う場合にも体外受精は効果的であるが、この優位性は一度に多くの半きょうだいが得られるということよりもむしろ、誕生日を同一に設定することが可能であることがある。感染した病原微生物の除去にも体外受精は効果を発揮する。したがって、外部の研究機関からのマウスの導入に際しては、体外受精の利用によって、クリーニングと大量生産を一度に行なうことが可能である。また、最近では、マウス個体を運搬して導入するのではなく、精巣上体尾部のみを低温輸送して体外受精を行う方法も実用化している。さらには、体外受精と凍結保存技術を併用することによって、遺伝子の導入に用いる前核期の卵子を大量に確保し、任意の時間に実験を行うことも

軌道に乗っている。従来、トランスジェニックマウスの保存には胚の凍結保存が用いられていたが、1990年以降になって優れた精子の凍結保存技術が開発されたために、胚から精子への転換が行なわれている。精子の凍結保存は、サチュレーションミュータジェネシスを現実的にさせる重要な要素であるが、ここでも体外受精技術は不可欠なものとなっている。

もちろん、体外受精を効果的に活用するためには、凍結保存技術のみならず、胚移植、胚の顕微操作、胚の培養等の他の生殖工学技術の総合的な充実も必要である。

マウス体外受精の黎明期と将来の展望

豊田 裕（北里大学客員教授）

マウス体外受精の最初の成功は、Whittinghamによって今から30年前（1968）に報告された（1）。ちょうど同じ時期に、筆者はラットの体外受精について透明帯除去の条件下で受精の成立を報告した（2）。この2つの論文は偶然にも同じ雑誌の同じ号に印刷された。それ以来、マウスとラットの体外受精は筆者の主要な研究テーマとなった。

マウスの体外受精を成功に導いた時代的背景としては、Austin（3）とChang（4）による受精能獲得の発見に始まり、Chang（5）によるウサギ体外受精胚移植の成功に至る哺乳類受精研究の進歩と、Hammond Jr.（6）に始まり、Whitten（7）およびBrinster（8）と続くマウス初期胚培養の研究成果が特に重要と思われる。

ここでは、これら当時の研究の背景について概観し、将来の発展のための糧とたい。

文献

- (1) Whittingham DG. Nature 220:592-593, 1968.
- (2) Toyoda Y, Chang MC. Nature 220:589-591, 1968.
- (3) Austin CR. Aust.J.Sci.Res.B.4:581-596, 1951.
- (4) Chang MC. Nature 168:697-698, 1951.
- (5) Chang MC. Nature 184:466-467, 1959.
- (6) Hammond J Jr. Nature 163:28-29, 1949.
- (7) Whitten WK. Nature 177:96, 1956; ibid.179:1081-1082, 1957.
- (8) Brinster RL. Exp.Cell Res.32:205-207, 1963.