

第12回哺乳動物生殖工学会

プログラム・抄録集

会期：平成12年12月2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

特別講演

ブタにおける発生工学研究の現状

柏崎 直巳

(麻布大学 獣医学部 動物応用科学科 動物繁殖学研究室)

シンポジウム

1. マウス精巢上体精子の低温暴露に対する系統差
倉持隆司 (三菱化学生命科学研究所)
2. Piezo Micro Manipulator を用いたマウス胚への顕微注入
川瀬洋介・鈴木宏志 (中外製薬株式会社創薬資源研究所)
3. 生殖生理におけるスカベンジャー受容体(SR-A I/II)の機能
鈴木宏志 (中外製薬株式会社)
4. アメリカにおける実験動物学の動向 ---51st AALAS National Meeting に参加して
上條信一 (三菱化学生命科学研究所)
5. 台湾の畜産技術の現状について
浜野晴三 ((社) 家畜改良事業団家畜バイオテクセンター)
6. 世界のマウス胚バンクについて
中嶋直己 (熊本・動物資源開発研究センター (CARD))

総 会

ブタにおける発生工学研究の現状

柏崎 直巳

(麻布大学 獣医学部 動物応用科学科 動物繁殖学研究室)

ブタは、優れた産肉・増殖能力を有し、タンパク質供給資源として非常に重要な家畜である。また解剖学・生理学的にヒトに類似し、実験動物、あるいはヒトへの異種臓器移植のドナーとしても注目されている。

ブタ胚の体外生産系とその発育能

胚操作を効率的におこなうには、その材料としての胚を効率的に入手する必要がある。従来、ブタ体内由来胚は外科的手法によって採取される。これには多大な労力と資金を要する。ウシにおいては未成熟卵子から体内成熟、受精、培養(IVM, IVF, IVC)によって体内由来胚にほぼ匹敵する体外生産(IVP)胚を作出する系がすでに確立されているが、ブタにおいては確立されていない。演者らのブタ IVM/IVF 系では、IVF 直後にレシヒエントへ移植すると4週齢胎子への発育率は約7%であるが、IVF 後に1-2日間培養して移植するとこの発育率は約2%へ低下する。そこで演者らは、ブタ卵管上皮細胞とIVM/IVF胚を共培養を試み、胚盤胞への発育率およびその細胞数が改善されることを明らかにした。また最近、ブタ IVM/IVF 胚をSOFにて培養し、えられた胚盤胞の移植による子ブタの作出も報告された。今後、さらなるブタ胚 IVP 系の改良が期待される。

トランスジェニックブタの作出と応用

最近、体細胞を核のドナーとした核移植によるブタクローン作出成功例が3例報告され、体細胞クローン技術を介したブタにおける特定遺伝子のノックアウト系の確立や効率的トランスジェニック作出法の確立への期待が高まった。従来のブタへの遺伝子導入方法は、1細胞期胚前核へDNAを注入するマイクロインジェクション法(MI法)が実用的なものであった。しかし、その作出効率は非常に低い。DNA注入胚は、レシヒエントへの移植により、その約10%が子ブタへ発育し、さらに誕生した子ブタの約10%で導入遺伝子がインテグレートし、その約半数で導入遺伝子が発現する。さらに、これらの個体全てが導入遺伝子を子孫へ伝達するわけではない。このMI法により1985年にヒト成長ホルモン遺伝子を有するトランスジェニックブタが報告されて以来、これまでに多くの作出例が報告されている。初期の研究では、主に成長ホルモン遺伝子が導入され、応用可能なラインも報告されている。また、ブタのミルク中あるいは血液系へ生理活性を有するヒトタンパク質を生産させることが報告され、ブタがバイオリアクターとして優れた動物であることも示唆された。瀧澤らも、トランスジェニックブタ乳腺で有用タンパク質を効率的に生産するシステムの研究開発をおこなった。その結果、ウシカゼインとヒト成長ホルモ

ンの遺伝子コンストラクトを有するフタを作出し、導入遺伝子の発現を確認している。さらにヒトへの異種移植臓器ドナーとしてのフタの開発を目的に、ヒト補体抑制因子遺伝子などがきかんにフタへ導入されている。

フタ精子および胚の超低温保存

フタ精子および胚を液体窒素中（ -196°C ）で保存できる。保存後にこれらの細胞由来の子孫を作ることができ、遺伝資源保存法として活用されている。フタ精子、胚は低温に対する感受性が高いことから、融解後の細胞生存率の改善が望まれる。

マウス精巣上体精子の低温暴露に対する系統差

倉持隆司

(三菱化学生命科学研究所)

精巣上体尾部を4℃に保管すると、短期間ではあるが精子の運動性を保持することができる。そこでマウス系統別の精子低温耐性を運動性と受精能で評価し、精巣上体尾部の冷蔵輸送への利用価値を検討した。

実験には BALB/cA, C57BL/6J とこれを背景とする遺伝子操作マウス、C3H/HeJ, DBA/2J, NC, FVB/N, CB6F1, BDF1 の 15 系統を供試した。各系統の精巣上体尾部を乾燥を防ぐためにミネラルオイル中に入れて4℃に保管した。24, 48, 72 時間後にそれぞれの精巣上体尾部精子を TYH 培地中に懸濁して運動性の確認、および 48 時間後の体外受精能を調べた。24 時間後までの精子運動性は全ての系統で良好に保持されたが、BALB/cA 精子は 48 時間後には 90 % 以上の運動性が消失した。72 時間後には CB6F1 と BDF1 を除く系統での精子運動性消失が顕著であった。48 時間後の精子を用いた体外受精による 2 細胞期胚への発生率は C57BL/6J および遺伝子操作マウス (0-10%), BALB/cA (22%), C3H/HeJ (39%), BDF1 (28.1%), NC (41.4%), CB6F1 (44.8%), DBA/2J (90.8%) であった。桑実胚への発生率は NC (87.5%), CB6F1 (92.3%), DBA/2 (93.2%), 他は 100% であった。48 時間後の DBA マウス精子は低温に極めて耐性で、かつ高受精率であった。これに比べ交雑系 CB6F1 マウスの受精率は、意外にも DBA/2 マウスよりも低値であった。さらに C57BL/6J や C3H/HeJ マウスでは良好な精子運動性が保持されているにもかかわらず、受精率は極めて低値であった。これらのことから精子の低温暴露に起因する受精能獲得機序や受精障害が示唆された。

以上のことから、精巣上体尾部の冷蔵輸送はマウスの施設間輸送で危惧される感染と逃亡防止対策として、またエンブリオバンク業務の効率化に利用できるが、輸送の実用化に及んでは受精率の改善が課題とされる。

(本実験は実験動物中央研究所在籍中に行われたものである)

Piezo Micro Manipulator を用いたマウス胚への顕微注入

川瀬洋介・鈴木宏志

(中外製薬株式会社創薬資源研究所)

Piezo Micro Manipulator (PMM) は顕微授精 (ICSI) に初めて用いられ、現在ではクローンマウスの作出にも利用されている装置である。PMM が開発された初期は適切な使用がなされなかったため、一時はその普及が低迷したが、柳町研究室によるマウス ICSI の成功以来、多くの研究者が利用しているように思われる。最近、我々の研究室では ICSI のみならず、ES 細胞の胚盤胞へのインジェクションにも PMM を応用し、実用化を果たしているので報告する。

ES 細胞の胚盤胞へのインジェクションは、ノックアウトマウスをはじめとする ES 細胞を介したトランスジェニックマウス作出にとって重要な技術である。しかしながら、従来の方法 (conventional 法) では、熟練した技術が要求される上にインジェクションに用いる胚盤胞も十分に拡張したものしか使用できず、操作に時間がかかり、効率的とは言えない状況にあった。PMM を用いることで、ES 細胞のインジェクションの成功率を 91% (690/759) から 97% (819/843) に向上させることができた ($P < 0.001$)。また、1 時間に操作可能な胚数は conventional 法では平均 9.7 個であったが、PMM では平均 27.0 個であった。このように、PMM を用いることにより、ES 細胞の胚盤胞へのインジェクションにおいて約 3 倍の操作性向上と簡便化を果たした。

また、マウス ICSI の研究においては、もっぱら F1 卵子が用いられており、近交系マウスでの成功は報告されていないが、最近、我々はトランスジェニックマウス作成に汎用されている近交系マウス C57BL/6J における ICSI によって産仔を得ることに成功したので合わせて報告する。

生殖生理におけるスカベンジャー受容体(SR-A /II)の機能

Role for macrophage scavenger receptors (SR-A /II) in reproduction in mice

鈴木宏志

(中外製薬株式会社)

SR-A /II は、動脈硬化の発症・進展や生体防御に関与するばかりでなく、マクロファージの接着分子として機能することや細胞内シグナル伝達にも関与していることが知られている。これらの機能は、主に遺伝子欠損マウスを用いた解析によって明らかにされてきた。SR-A /II 欠損マウスは雌雄ともに正常な繁殖能力を有しているが、最近、この受容体が雄の生殖生理に重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。精巣で産生された精子は、精巣上体尾部に蓄えられて射精を待つが、それらの多くは射出に至ることなく精巣上体あるいは精管内で処理されることとなる。この処理には間質のマクロファージあるいは精巣上体管や精管の上皮細胞による食食、さらには精子の退行・変性後の吸収が考えられているが、その本態は明らかではなく、この処理に関わる分子も知られていない。SR-A /II 欠損マウスの精巣上体尾部中の精子数は正常マウスの約2倍に達しており、この精子数の上昇は異常（変性途上）精子の増加によってもたらされていた。精巣重量や1日あたりの産生精子数、さらには精巣上体頭部における異常精子率には、欠損マウスと正常マウスとに差を認めないことから、SR-A /II 欠損マウスに造精能の異常があるとは考えにくい。さらに、精管結紮を施すことによって、欠損マウスの精巣上体における異常精子の割合は上昇することから、非射出精子の処理は SR-A /II の重要な生理機能のひとつであると考えられる。精管結紮は男性側からの避妊法のひとつとして広く世界中で行われているが、この精管結紮の合併症のひとつに精管および精巣上体における精子肉芽腫の形成が知られている。この発症機構については明らかではなかったが、驚いたことに SR-A /II 欠損マウスでは、精管結紮後の肉芽腫形成が抑制されることが観察されており、この受容体の活性の抑制が、精子肉芽腫の予防・治療に効果的であることが示唆されている。

51st AALAS National Meeting に参加して

上條 信一

(三菱化学生命科学研究所)

先月11月5日から9日にかけての5日間、AALAS National meeting (米国実験物学会) が米国サンディエゴにて開催され、参加する機会を得た。そして、直属の上司よりその所感をこの研究会で話してほしいと、遠くサンディエゴまでメールが届き、正直なところ断りきれず、今回のご報告となる。

この学会は年に1回5日間の予定で毎年開催され、私は実に9年ぶりの参加となった。基本的には日本の実験動物学会のアメリカ版といったものだが、その内容に関しては実験動物技術者を対象にしている感が強く、さしずめ日本における日本実験動物技術者協会の母体で内容をよりレベルアップしたような雰囲気のある学会である。しかし、私にとっては日常の主務が実験動物センターの管理・運営であるので、ある意味非常に親近感が持てたのも事実である。

今回はミーティングの様子を含め、現在(今後)の米国における実験動物界がどのような方向に向かっているのかなど、感じた事をお話ししたい。ブレイクタイムの延長のつもりで気軽に聞いていただければ幸いである。

台湾の畜産技術の現状について

浜野晴三

((社)家畜改良事業団家畜バイオテクセンター)

4年前、台湾省畜産試験所の李善男(Shan-Nan Lee)主任が当センターで研修を行ったのが縁で、台湾で体外受精と核移植に関するセミナーの開催要請があり出向いた(黒和牛体外受精卵之生産興核移植技術)。

台湾では受精卵移植(=受精卵移植)技術は試験研究段階であり、フィールドでの一般的な繁殖手法にはなっておらず、移植開始から今年で7年目になるという。年間250頭の移植が実施され、で台南、台中、台北地域は受胎率50%程度だが、台東地域は30%と低く、地域差が問題となっている。また、移植は11月から2月末までの冬期に集中的に実施されるが、人工授精は通年を通して行われている。

台湾大学の宋永義(Yung-Yi Sung)教授に通訳を依頼し、新化(Hsin-Hua)の畜産試験所と台中市の国立中興大学で2回のセミナーを開始し、台北市の台湾大学で Winston T. K. Cheng 教授等とディスカッションを行った。

台湾での畜産技術の課題は、受精卵の凍結保存と核移植にあり、凍結保存した胚の移植後の受胎率は非常に低く、様々なプログラムを試みている。また、核移植は体細胞クローン牛の生産に勢力を傾けているが、全く受胎していない。さらに、Cheng 教授らは、卵丘細胞に遺伝子導入を行い、その細胞でクローン胚の生産もしており、再構築胚はできるものの受胎に結びつかないことを悩んでいる。

行政院農業委員会畜牧所家畜生産科を訪問した際、日本での胚の性別別の実施率についてされているのが論点となった。

台湾は口蹄疫清浄国となっていないため、今回の訪問では一切家畜を目にすることは無く、また帰国時にも動物検疫所に訪問先・行程を伝え対応する必要があった。

世界のマウス胚バンクについて

中舘直己

(熊本・動物資源開発研究センター (CARD))

現在、遺伝子改変マウスが爆発的な勢いで増え続けており、その Archive として世界各国に胚バンクが作られつつあることから、お互い共通のデータベースを作る必要性が出てきた。そこで組織されたのが IMSR である。IMSR とは、International Mouse Strain Resources の略で、世界の研究者が誰でも利用できるマウス系統に関する共通のデータベースとして、英国の MRC (Medical Research Council) と米国の Jackson 研究所が最小限の情報を入力し作成したものである。米国では公的機関だけでなく、民間会社も参加が予定されていることや重複して複数のグループが形成されていることから複雑になってきている。現在の予定構成メンバーは、MRC と Jackson の他に (1) MMRC (Mutant Mouse Resource Centers : NIH からのグラントをもらっている機関で構成しているグループで、Jackson 研究所が Information Coordination Center (ICC) となっている。Node として UC Davis, University of North Carolina, Taconic (会社)、Harlan Sprague Dawley (会社) が参加している。)、(2) CARD, Kumamoto University、(3) EMMA (European Mutant Mouse Archives : イタリアの Monterotondo、イギリスの MRC、フランスの Orlean、スウェーデンの Stockholm、ホルトカルの Risbon (ここはノトバイオートのみ) が参加メンバー。)、(4) GSF、(5) Oakridge National Laboratory、(6) Charles River (確定はしていない) である。熊本大学動物資源開発研究センター (CARD) では、すでに IMSR に参加することに合意し、現在、凍結胚に関するデータベースを構築中であり、2001 年 3 月までにその構築を終え、それらの中から IMSR へデータを転送するものを選定する予定である。