

第16回 哺乳動物生殖工学研究会
プログラム・抄録集

平成16年12月11日（土）

北里本館 大会議室

プログラム

開会挨拶

会長 横山峯介

特別講演

「生殖工学と発生工学の展望」

豊田 裕先生

(北里大学客員教授・帯広畜産大学名誉教授)

一般講演

1 烏類における体細胞核移植個体の作製に関する基礎的研究

田島 淳史 (筑波大学生命環境科学研究所)

2 ヒューマンサイエンス研究資源バンクにて推進中の動物胚バンク事業について

竹島 勉 (ヒューマンサイエンス研究資源バンク)

3 理研 C D B におけるマウスの I V F と凍結保存の紹介

○宮地 均・中尾 和貴 (理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター、変異マウス開発チーム)

4 E N U ミュータジェネシス 一弊社におけるE N U ミュータジェネシスの取り組み…

○後藤 元人^①、金子 武人^②、新名谷 典朗^③、中湯 直己^④ ((株)スボック^⑤、熊本大学 CARD 資源開発分野^⑥)

5 顕微操作技術の畜産への応用

牛島 仁 (千葉畜総研)

6 理化学研究所・横浜研究所動物飼育施設の概要紹介

望月 忍 (理研・免疫・免疫器官形成 G)

7 当研究所における、発生工学基礎技術の構築に向けた実験環境の整備

安齋 政幸 (近畿大学先端技術総合研究所、ジーンコントロール (株))

総 会

懇 親 会

生殖工学と発生工学の展望

豊田 裕

(北里大学)

1. 生殖と発生

生殖(Reproduction)と発生(Development)は本来切り離せない。生殖がなければ発生はなく、その逆もまた真である。したがって、それぞれの過程を実験的に改変する技術学としての生殖工学 (Reproductive Engineering) と発生工学 (Developmental Biotechnology) はその大部分が重複している。境界線を引くこと自体ほとんど意味がないが、あえて比較すれば、前者は何らかの形での有用な動物を効率的に生産することを主眼としているのに対して、後者は今まで自然界になかった新しい動物の作出を目指している点に特色があるといえよう。したがって、後者は前者の範囲を越えている部分を持っているが、一方では新しい個体を生み出すために前者を必要としている点で、前者に包含されているとも見ることもできる。

2. 生殖工学と発生工学の歴史

生殖工学は家畜の改良増殖のための技術学として長い歴史があり、そのルーツは 19 世紀まで遡る。しかし、生殖工学という概念が登場してきたのは発生工学の研究が本格化する 1980 年代後半からである。一方、発生工学の始まりはかなりはっきりしている。これには 2 つの画期的な技術革新が関係している。すなわち、トランスジェニックマウスの作製 (1980) とマウス胚性幹細胞の樹立 (1981) である。この 2 つは、ちょうど同じ時期に始まった組換え DNA 技術と相俟って哺乳類における発生学の研究手法に革命的な変化を引き起こしたと言っても過言ではない。

その後、1997 年にクローン羊ドリーが誕生するに及んで、生殖工学は社会全体の関心事となった。ヒトのクローン作製の可能性はいち早く懸念され、その論議は今も続いている。

3. 将来展望

生殖工学は本来の目的である食糧資源の確保に加えて、新しい実験動物の開発、生殖医療への応用、野生動物の救済など多方面にわたって日々進歩しており、将来は一層の貢献が期待される。さらに、新しい視点として伴侶動物学とでも言うべき分野への貢献も重視される。根本的な課題としては 63 億人にも達してなお増加の一途を辿る地球人口の制御の問題がある。21 世紀における生殖工学の役割は大きく、責任は重い。

鳥類における体細胞核移植個体の作製に関する基礎的研究

田島 淳史

(筑波大学生命環境科学研究科)

体細胞核移植個体の作製は、Wilmut らが 1997 年にヒツジで成功して以来、ウシ(1998)、マウス(1998)、ヤギ(1999)、ブタ(2000)、ネコ(2002)ウサギ(2002)、ラ(2003)、ブタ(2003)、ウマ(2003)で相次いで成功例が報告され、今や哺乳類の発生生物学における基盤技術の一つになりつつある。一方、鳥類における体細胞核移植個体の成功例は現時点では報告されていないが、これは卵の形成過程ならびに形態が哺乳類と大きく異なることから、体細胞核移植個体の作製には哺乳類とは異なった戦略をとる必要があるからである。そこで我々は、生殖系列キメラの作製技術を応用することにより鳥類における体細胞核移植個体を作製することができるのではないかと考え研究を行っているので紹介する。

1) 生殖系列キメラの作製方法に関する検討

(1) 移動中の始原生殖細胞(PGCs)を用いた生殖系列キメラ個体の作製

Tajima *et al.* Theriogenology 40:509-519, 1993.

(2) 生殖巣内の未分化生殖細胞(GGCs) の移住能に関する検討

Minematsu *et al.* J. Poult. Sci. 41(3):178-185, 2004.

(3) 凍結/融解された PGCs/GGCs を用いた生殖系列キメラ個体の作製

PGCs: Naito *et al.* J. Reprod. Fert. 102:321-325, 1994.

GGCs: Tajima *et al.* J. Exp. Zool. 280:265-267, 1998.

Tajima *et al.* Anim. Sci. J. 75:85-88, 2004.

2) 生殖細胞に対する体細胞核の導入技術の開発

(1) 生殖細胞の除核法に関する検討

Minematsu *et al.* J. Poult. Sci. 41:110-119, 2004.

(2) 細胞融合法を用いた体細胞核の導入方法に関する検討

Minematsu *et al.* 75:271-274 Anim. Sci. J. 2004.

今後、体細胞の核を移植された生殖細胞を 2 日胚の血管内に移植した場合における生殖腺への移住能力の検討を行い、近い将来に後代検定を実施することを目指している。なお、本研究の背景についての詳細については、以下の総説を御参照頂きたい。Tajima A. Production of germ-line chimeras and their application in domestic chicken. Avian and Poultry Biology Review. 13:15-30, 2002.

ヒューマンサイエンス研究資源バンクにて推進中の 動物胚バンク事業について

竹島 勉
(ヒューマンサイエンス研究資源バンク)

ヒューマンサイエンス研究資源バンクは動物胚バンクの他に細胞バンク、遺伝子バンク、ヒト組織バンクの4バンクと資源の情報を管理するデータベース部門から構成されている。細胞と遺伝子バンクの事業は、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団が1995年に大阪市内に設立・開設した。その主な事業内容は、国立医薬品食品衛生研究所、国立感染症研究所で収集・標準化し、品質管理を行った細胞(802株)、遺伝子(8111クローン)等を保存した後、国内および海外の研究者に分譲することである。動物胚とヒト組織バンクについては、2000年11月に新規事業として設立され、他のバンクと統合され新たに大阪府泉南市に開設された。

動物胚バンクでは疾患モデル、トランスジェニック、ノックアウト、ミュータントなどのマウスやラット胚ならびに精子を収集保管し、品質を管理すると共に研究者に供給する事業と資源の安全を図るために保管事業を行っている。現在、動物胚バンクに寄託されているマウス系統は国立感染症研究所から10系統、国立循環器病センターから2系統、大阪大学から1系統、田辺製薬から2系統、計15系統が凍結2細胞期胚(6)、凍結精子(8)あるいは動物(1)で寄託され、ラットでは自治医科大学から12系統、ワイエス研究所から3系統、北里大学から1系統の計16系統が凍結2細胞期胚で寄託されている。これらの寄託資源は研究機関により凍結方法や、保存容器等に若干の違いがある。マウス胚では耐凍剤としてDAP213、EFS30を用いた急速凍結の2種類で、前者は保存容器にクライオチューブ、融解時に0.25M-Sucrose、後者は保存容器にストロー、融解時に0.5M-Sucroseを用いている。ラット胚では耐凍剤に1.5Mあるいは10%DMSOを用いた緩慢凍結と耐凍剤にEFS40あるいはDAP213を用いた急速凍結法があり、これらの耐凍剤をHER液やPB1で溶解、保存容器、融解時のSucrose濃度もマウスと同様に2種類ある。凍結マウス精子についてはストローのシーリングがパウダーあるいは電気的シーラによる違い、印字方法の違いはあるが、耐凍剤18%Raffinose+3%Skim Milkおよび凍結方法は統一されている。

これらの凍結資源を融解後、2細胞期胚および精子は体外受精にて2細胞期胚を作製し、受容体雌に移植してビニールアイソレーター内で分娩・哺育を行い、離乳時に受容体雌の微生物検査で陰性を確認した仔をワンラックケージあるいはクリーンゾーンの開放型ケージに移し、繁殖させ分譲資源作製用の動物を増していく。疾患モデル動物については症状発現、トランスジェニック、ノックアウト動物ではPCR等による標的遺伝子を確認した後、2細胞期胚および精子の凍結資源を作製する。マウスおよびラット胚はクライオチューブを用い1M-DMSOからDAP213に移した急速凍結法、マウス精子はストローを用いた18%Raffinose+3%Skim Milkの急速凍結法を採用している。

資源の分譲は2003年度に8研究機関(マウス:ICGN/Mネフローゼー2件、GFP1件、MG21件、MG31件、ラット:GFP2件、DsRed21件)、2004年度12月までに9研究機関(マウス:ICGN/Mネフローゼー2件、GFP2件、ラット:GFP3件、DsRed23件)およびELてんかんマウスが2005年1月に1件分譲予約されている。

現在、資源作製および品質確認のため動物で飼育している系統は EL てんかんマウス、ICGN/M ネフローゼマウス、YPC 稲毛マウス、GFP マウス、Rolling Nagoya マウス、計 5 系統と GFP ラット、DsRed2 ラットの 2 系統である。

今後、本事業においては寄託資源数をさらに増やすとともに国内外の研究機関への分譲を拡大して行くことにより貴重な遺伝資源の保存ならびに活用を推進したいと考えている。

理研 CDB におけるマウスの IVF と凍結保存の紹介

宮地 均・中尾 和哉

(理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター
変異マウス開発チーム)

実験動物施設で維持されている貴重なマウスを不測の感染事故から守るために、外部からの受け入れを禁止することが最も確実な方法である。しかし、外部からのマウスの受け入れを全て拒否することは、活発な研究活動を抑制することになり、現実的には不可能である。そのため、信頼できるブリーダー以外からのマウスの受け入れには、必ずクリーニングを実施することが必須である。また、一般的にクリーニングの方法として、帝王切開法が広く用いられているが、体外受精(IVF)および、胚移植等の生殖工学技術を利用した方が、産仔数や実施日の設定が可能になるため有利である。また IVF はクリーニングのみならずコロニーの拡大や系統保存を行うために多量の受精卵を得るための手段としても有効である。

我々の所属する発生・再生科学総合研究センター(CDB)、変異マウス開発チームでは変異マウスの開発のみならず、CDB 動物施設の運営にも携わっており、外部から導入するマウスのクリーニングと、その時に必ず凍結保存を行い不測の事態に備えている。さらに研究者の希望に応じて IVF を用いてマウスコロニーの拡大も実施している。

今回、CDB で行っているクリーニングやコロニー拡大ための生殖工学技術の利用について、特に IVF と凍結保存について紹介する。

ENU ミュータジェネシス — 弊社における ENU ミュータジェネシスの取り組み —

○ 後藤 元人¹⁾、金子 武人²⁾、新名谷 典朗¹⁾、中渴 直己²⁾
((株)スボック¹⁾、熊本大学 CARD 資源開発分野²⁾)

近年、世界各国で大規模な ENU ミュータジェネシスプロジェクトが進行しており、遺伝子機能解明に有用なヒト疾患モデル動物が作出されている。

化学変異原物質である N-ethyl-N-nitrosourea(ENU)は点突然変異を高率に誘発し、少なくともマウス1個体あたり 30 以上の遺伝子座に劣性表現型を示す点突然変異が誘発されることが示唆されている。その突然変異は機能欠損型のみならず、機能低下型、機能獲得型など多様な変異が得られることから、ヒトの疾患に多く見られるような遺伝子機能低下のモデル動物として利用価値は高いと考えられる。

私達は、ランダムに SNPs を作り出し、これらの表現型を解析し、データ、リソースを蓄積する。さらには、Tg、KO など、既知遺伝改変動物との交雑を行うことにより、遺伝子間の関連や表現型に与える影響などを調べ、生体内で働いているアルゴリズムを解明したいと考えている。

現在、弊社では C57BL/6J のマウスに ENU を投与し、その投与した G0 マウス及びその産子である G1 マウスから、様々な生殖工学技術を用いて、効率的に優性突然変異マウスの作出を行っている。そこで今回はその作出手順とこれまでに作製された優性突然変異マウスについて紹介する。

顕微操作技術の家畜生産への応用

牛島 仁
(千葉県畜産総合研究センター)

高度繁殖技術の応用によって、胚の絶対数を確保したり、胚に付加価値をつけることができれば、家畜生産のための胚移植技術を効率化することができる。そこで、顕微操作を家畜生産現場に活用することを目的に、その技術確立を行うとともに、実用性を検討した。

胚の分割技術と性判別：一卵性双子の生産や性判別胚の作出方法として利用されている胚の分割技術の普及性を高めるため、操作方法を検討した。また、分割によって採取した10個程度の割球を染色体検査法やPCR法を用いて、性判定するプロトコールを開発した。これらの結果、性判別技術は、受胎性を損なうことなく胚に付加価値を付けられる技術となり、野外の牛胚移植技術に利用されている。また、この研究を発展させ、3分割胚の1つから事前に性を予知し、残る2つの胚を移植することにより、性判別された一卵性双子を生産する事や、核移植に用いるドナー胚を性判別することにより、性判別された核移植雌産子の生産も可能となつた。

顕微授精技術の活用：市販されている凍結精液を用いた体外受精成績には個体差が認められるので、体外受精条件の安定化が求められている。体外受精に細胞質内直接注入法を導入したところ、正常受精率およびその後の胚発生能が向上することを認めた。このことから、顕微授精は、希少性の高い牛凍結精液を有効に活用する手段として注目される。

凍結保存技術の開発：ブタ胚や、牛体外受精由来の初期胚は耐凍性が低いため、凍結保存に供する事が困難であり、胚の利用は制限を受けていた。遠心分離によって局在化した細胞質内脂肪顆粒を除去する顕微操作が、胚特有に認められる低温に対する感受性を改変することに着目し、その実用性について検討した。その結果、この除去操作が牛体外受精由来の初期胚の凍結保存やブタ胚ガラス化保存に有効であることを認めた。

このように、一連の顕微操作は、家畜胚の生産性や胚移植技術の効率化を高める有益な繁殖手段になると考えられる。

その他の概要

- ◆氏名：牛島 仁
- ◆所属：千葉県畜産総合研究センター 市原乳牛研究所 育成研究室
- ◆郵便番号：290-0531
- ◆所属住所：千葉県市原市国本602
- ◆電話：0436-96-1231
- ◆FAX：0436-96-0956
- e-mailアドレス：h.ushjm@ma.pref.chiba.jp

理化学研究所・横浜研究所動物飼育施設の概要紹介

望月 忍

(理研・免疫器官形成 G)

理化学研究所（横浜）の動物実験飼育施設は平成16年1月に本稼動を開始した。飼育施設（北研究棟7F床面積：1800m²）は最大収容マウス数：68,000匹、最大収容ケージ数：13,600ケージの収容能力を持っている。施設と設備は次の通りである。

【施設】飼育室 SPF 区域：12部屋<6mx11m> 感染区域：5部屋<2mx4m> P3 実験室（飼育室：1部屋）<9mx4m> 胚操作室（処置室）<6mx11m> 滅菌保管庫 マウス飲水作製室 実験室（細胞培養・胚操作等）

【設備】自動給水システム（飼育形態）更衣室 トイレ 管理室 洗浄室（ケージワッシャー：2基<10mx18m>、ラックワッシャー：1基、オートクレイブ：3基、空調設備、入室管理システム

稼動後1年の飼育施設管理状況(H.16.11現在)は収容匹数：50,000匹、収容ケージ数：9,800ケージに達している。（飼育室占有状況：SPF飼育区域→72%、感染飼育区域→90%）作業要員：飼育管理要員(業務委託)11名、中央支援業務要員（派遣社員含）9名である。また、中央支援業務として、保存胚作製、Tg·KOマウスの作製をおこなっている。

当研究所における、発生工学基盤技術の構築に向けた実験環境の整備

安齋 改善

(近畿大学先端技術総合研究所、ジーンコントロール(株))

近年、人為的に遺伝子操作を施した遺伝子改変マウスの開発が幅広く研究分野に浸透し現在の生命科学にとって欠くことのできないものとなっている。

しかしながら、開発した技術は革新的であり日進月歩の勢いですが、それらを支える基盤技術と研究環境は常に安定していることが必須であり、個々の実験動物技術者の黒たす役割や人材の養成は非常に重要と思われる。

我々のグループでは、本研究所における発生工学技術による遺伝子改変マウスの作成を含めた基盤整備ならびに技術体系の整備を2002年11月よりはじめました。今回は、それら周辺技術ならびに成果の一部を紹介いたします。