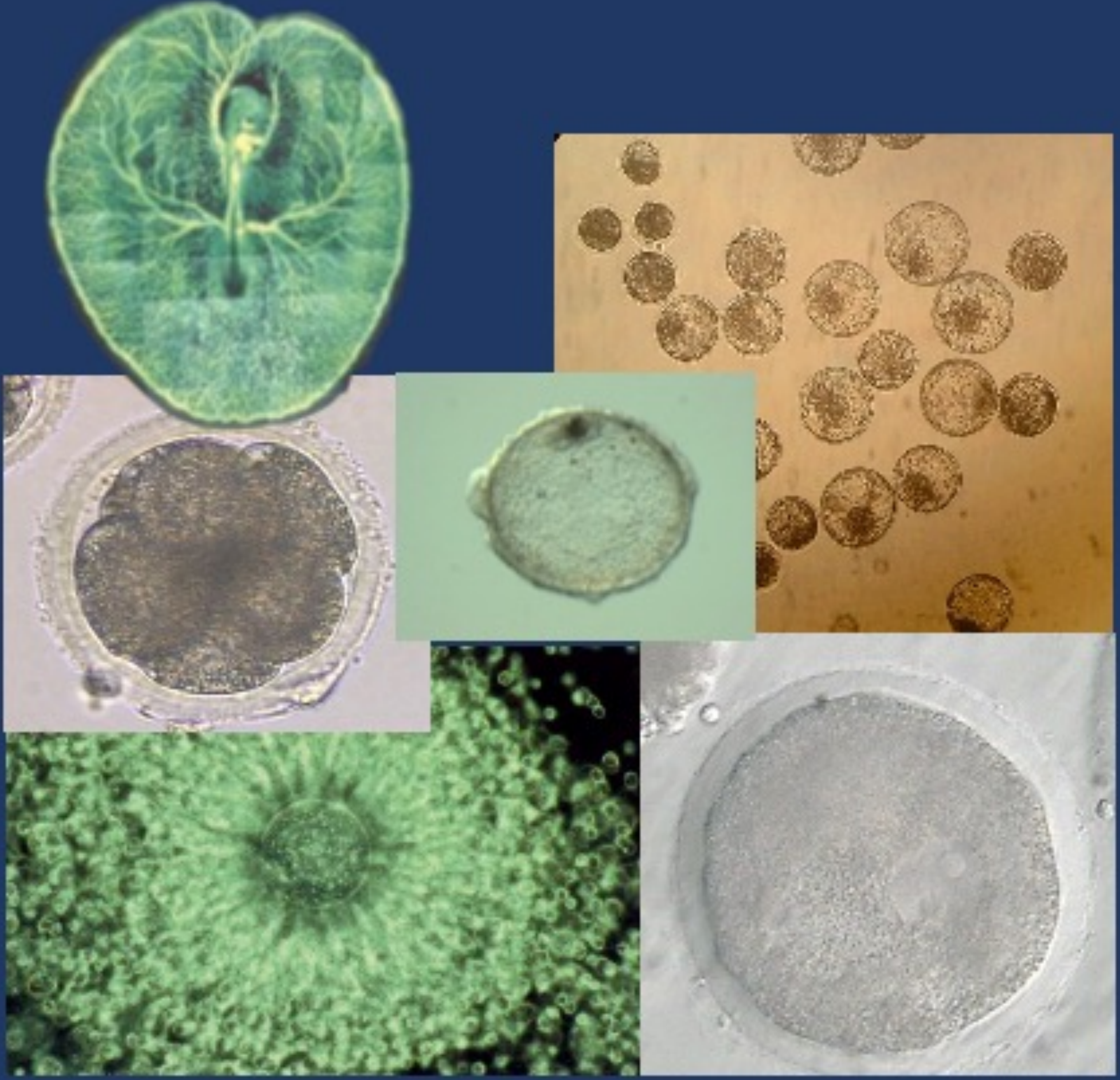
第44回動物生殖工学研究会

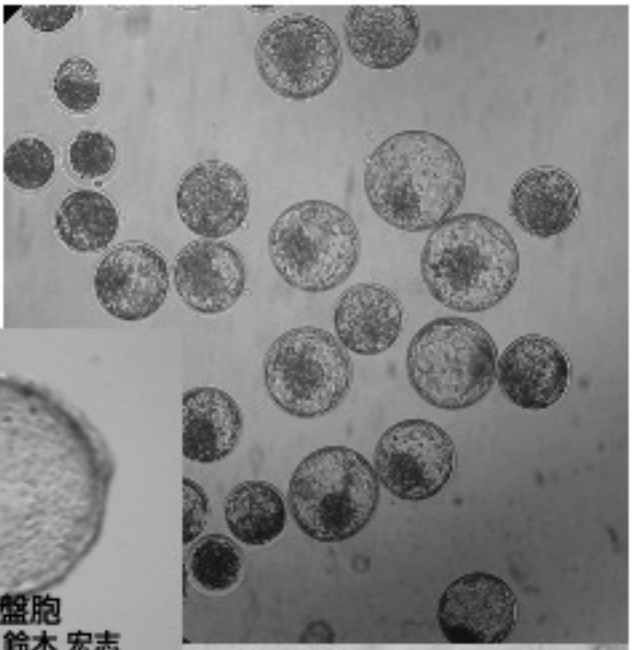
SARB : SOCIETY OF ANIMAL REPRODUCTIVE BIOTECHNOLOGY

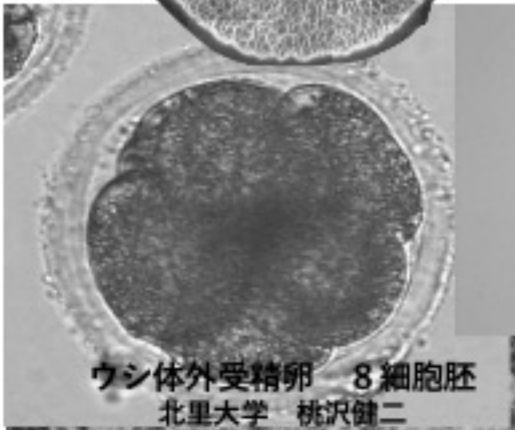


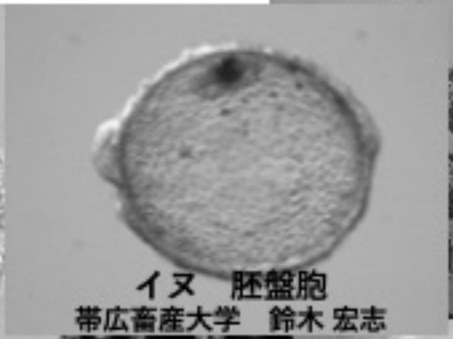
令和5年12月2日（土）
北里大学白金キャンパス
プラチナタワー　12階　会議室

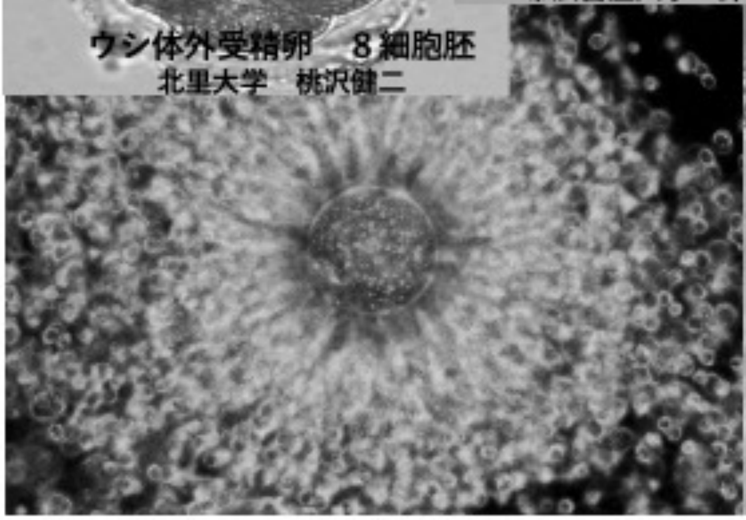
Stage 14 Chick Embryo
Original drawing by Hayashi & Tajima
cited in J. Poultry Scinece 50:1-8,2013

ウシ７日目体外受精卵
(国研）農業・食品産業技術総合研究機構　的場理子

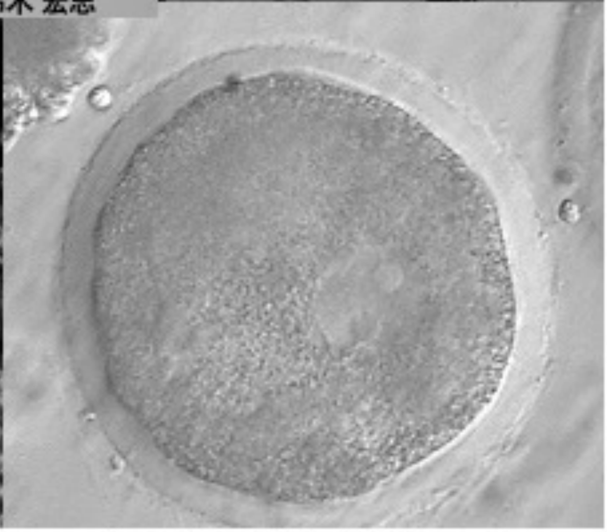








マウス未受精卵
熊本大学　中潟直己



ミーアキャット　GV-1
近畿大学　安齋政幸

第44回動物生殖工学研究会プログラム

2023年12月2日（土）

北里大学白金キャンパス

■総　会　　１３：００～

■開会挨拶　１３：３０～　会長：横山峯介

■特別講演　１３：４０～１４：５０　座長：福永憲隆

マウスにおける原始内胚葉幹細胞の樹立と人工胚作製の試み

大日向康秀先生（千葉大学大学院医学研究院）

■休　憩　　１４：５０～１５：００

■一般講演　１５：００～１５：４５（発表１０分質疑応答５分）

座長：松田正史

1. オンライン技術研修システムを活用した生殖工学に関する人材育成の取り組み

（15:00-15:15）

○古閑礼涼[1]、中尾聡宏[1]、土山修治[1]、宮地均[2]、中潟直己[3]、竹尾透[1]

（[1]熊本大学生命資源研究・支援センター資源開発分野、

[2]京都大学医生物学研究所附属感染症モデル研究センター、

[3]熊本大学生命資源研究・支援センター生殖工学共同研究分野）

2. 広角タイムラプス解析を用いたマウス受精卵における卵割タイミングの評価

（15:15-15:30）

○若杉理乃[1]、伊藤琴乃[1]、中尾聡宏[1]、中潟直己[2]、竹尾透[1]

（[1]熊本大学生命資源研究・支援センター資源開発分野、

[2]熊本大学生命資源研究・支援センター生殖工学共同研究分野）

3. マルチカラーFISHによるマウス卵母細胞の核型解析法の開発とその応用

（15:30-15:45）

○日野敏昭、日下部博一（旭川医科大学医学部生物学教室）

■休　憩　　１５：４５～１５：５５

■一般講演　１５：５５～１６：４０（発表１０分質疑応答５分）

座長：田熊究一

4. リン脂質指向型環状オリゴ糖による受精能獲得の誘導

（15:55-16:10）

○中尾聡宏[1]、伊藤琴乃[1]、酒匂一仁[1]、竹本賢司[1]、渡邊仁美[2]、近藤玄[2]、入江徹美[3]、中潟直己[4]、竹尾透[1]

（[1]熊本大学生命資源研究・支援センター資源開発分野、
[2]京都大学医生物学研究所統合生体プロセス分野、
[3]熊本大学グローバル天然物科学研究センター医薬品包装学寄附講座、
[4]熊本大学生命資源研究・支援センター生殖工学共同研究分野）

5. 感染症研究における遺伝子組み換えマウスの利用
（16:10-16:25）
〇後藤元人、盛林ひとみ、小林喜美男、高橋利一
（公益財団法人 実験動物中央研究所 動物資源技術センター）

6. Deep learning 技術を用いた Time Lapse 画像の機械学習による
2 前核自動検出システムの開発
（16:25-16:40）
〇福永憲隆、渡邊紘之、吉村友邦、木田雄大、辻暖永、浅田義正
（医療法人浅田レディースクリニック　浅田生殖医療研究所）

■休　憩　　１６：４０～１６：５０

■特別企画　１６：５０～１７：３０

柳町隆造先生との研究を振り返って
日野敏昭（旭川医科大学医学部生物学教室）
他、ビデオレター等

■閉会挨拶　１７：３０　　副会長：濱野晴三

注意事項

会場となる北里大学の以下の感染予防対策をご確認いただきご対応をお願いします。

１、次の場合は入構を制限させていただきます。
１）風邪の症状や 37.5 度以上の発熱、咳、倦怠感のある方
２）医療機関において新型コロナウイルスに感染していると診断された方。

２、施設内への入構時の対応について
１）建物入口等に設置の手指消毒アルコールでの消毒をお願いします。
２）マスクの着用を推奨します。

特別講演

マウスにおける原始内胚葉幹細胞の樹立と人工胚作製の試み

大日向康秀
千葉大学大学院医学研究院

我々の生命は唯一つの受精卵から派生する。受精卵は卵割を繰り返し、やがて胚盤胞と呼ばれる初期胚を形成する。胚盤胞は、着床前エピブラスト、栄養膜、原始内胚葉の 3 種類の細胞系譜で構成される数 10 個の細胞の集合であるが、このような単純な組織が個体生命を発生させる能力を保持する理論は解明されていない。ES/iPS 細胞が持つ多能性概念の研究分野が成熟期を迎えつつある今日、研究の最先端が、上位の本来受精卵のみが保持する全能性概念に向かうのは必然であるが、近年の幹細胞研究分野の急速な発展によって、試験管内で幹細胞のみから人工胚を作製することに現実のテーマとして挑戦し得る時機が来ている。マウスにおいては、胚盤胞からは、従来、着床前エピブラストの幹細胞として ES 細胞(Evans & Kaufman, *Nature* 1981)、栄養膜の幹細胞である TS 細胞(Tanaka et al, *Science* 1998)が樹立されていたが、しかしこれらだけでは、原始内胚葉系列組織を派生することができないため、胚を再構成することはできないと予想される。

本研究において我々は、残る原始内胚葉の幹細胞を樹立するため、様々な増殖因子や低分子化合物およびそれらの組み合わせについて培養条件を探索し、無血清培養条件下、GSK3 を阻害する低分子化合物である CHIR99021、FGF4、PDGF-AA を組み合わせて用いることで、原始内胚葉幹細胞(Primitive Endoderm Stem Cell, PrES 細胞)を樹立できることを見出した。PrES 細胞は、特徴的なドーム型のコロニーを形成し、試験管内での長期培養が可能で、多能性マーカー(OCT4、E-Cadherin)と内胚葉マーカー(GATA6)を共発現していた。ES 細胞、TS 細胞、XEN 細胞との単一細胞解析による比較では、PrES 細胞は、既知のいずれの幹細胞とも類似しておらず、E3.5 及び E4.5 の内部細胞塊の細胞との比較では、形成直後の原始内胚葉と良く似た遺伝子発現パターンを示した。胚盤胞への注入によっては、PrES 細胞は速やかに胚の原始内胚葉に取り込まれ、またそれら胚盤胞注入を行なった胚を子宮へ移植することによっては、壁側卵黄嚢の壁側内胚葉、境界領域内胚葉、臓側卵黄嚢の臓側内胚葉に高効率に寄与し、卵黄嚢キメラを形成した。さらに原始内胚葉を欠失した胚性致死の胚盤胞を宿主として用いれば、PrES 細胞は、胚の致死を救済し、全ての原始内胚葉系列細胞系列組織を補完することができた。

PrES 細胞の樹立により、マウスにおいては、胚盤胞を構成する全ての細胞系譜の幹細胞が揃ったこととなり、概念的にはこれら 3 種の幹細胞を組み合わせることによって、胚を再構成できる可能性が示唆される。次に我々は、ES 細胞、TS 細胞、PrES 細胞の共培養によって胚オルガノイドを作製した。ES 細胞と PrES 細胞の共培養では、速やかに ES 細胞の塊を PrES 細胞が取り囲み、内部細胞塊様構造が形成された。さらに TS 細胞を追加することでは着床後胚様構造が形成された。これら胚オルガノイドの子宮への移植によっては、高効率に着床し、脱落膜を誘導することができた。また脱落膜内部には 2 重の卵黄嚢様シートに取り囲まれた胚様構造が形成されたが、正常な胚は生じなかった。今後は、幹細胞培養技術および胚盤胞オルガノイド作製技術のさらなる洗練によって現在の胚オルガノイドの問題を解決し、発生能を保持する胚の再構成を実現したい。

参考文献：

Ohinata Y et al, Science 375, 574-578 (2022)

一般演題　1

オンライン技術研修システムを活用した生殖工学に関する人材育成の取り組み

○古閑礼涼[1]、中尾聡宏[1]、土山修治[1]、宮地均[2]、中潟直己[3]、竹尾透[1]
[1]熊本大学　生命資源研究・支援センター　資源開発分野
[2]京都大学　医生物学研究所　附属感染症モデル研究センター
[3]熊本大学　生命資源研究・支援センター　生殖工学共同研究分野

熊本大学生命資源研究・支援センターは、生命科学研究や疾患モデルとして有用な遺伝子改変マウスに関する研究支援のため、遺伝子改変マウスの作製、保存および供給を行うマウスバンクを運営している。また、当研究室では、マウスバンク運営に有用な生殖工学技術の開発に取り組み、本技術に関する研修会を通じて生殖工学に関する人材育成も行っている。

研修会では、講義および手技の実演・指導を対面で行っているが、近年はデジタルトランスフォーメーション(Dx)を利用した、場所にとらわれない人材育成の需要が高まっている。そこで私たちは、生殖工学研修会の Dx を実践するために、オンライン技術研修システムを構築した。本システムは、オンライン化した生殖工学技術に関する機器および Zoom 等の会議ツールを利用することで、遠隔からの技術研修参加を可能とした。これまでに本システムを用いて、熊本大学からタイのコンケン大学における生殖工学研修会の開催やスリランカ実験動物学会のシンポジウムにおいて生殖工学技術の実演を行った。また、今年開催した生殖工学オンラインセミナーでは、マウス生殖工学技術の基礎から応用に至る講義を行った。

本発表では、国際的に高まる生殖工学技術に関わる人材育成を Dx を利用し解決する、オンライン技術研修システムを紹介する。

一般演題　2

広角タイムラプス解析を用いたマウス受精卵における卵割タイミングの評価

○若杉理乃[1]、伊藤琴乃[1]、中尾聡宏[1]、中潟直己[2]、竹尾　透[1]
[1]熊本大学 生命資源研究・支援センター 資源開発分野
[2]熊本大学 生命資源研究・支援センター 生殖工学共同研究分野

体外受精は、遺伝子改変マウスの作製、繁殖および保存に有用な技術として、多くの研究施設で利用されている。体外受精における受精率の評価は、前核期受精卵や二細胞期胚の数を顕微鏡下でカウントするため、技術者による受精の判別や作業が必要である。近年、デジタル技術を活用した研究のデジタルトランスフォーメーション(DX)が進められており、体外受精技術もデジタル化することで DX の実現が期待できる。そこで本研究では、体外受精技術のデジタル化の取り組みとして、マウス体外受精により作製した複数の受精卵を同時に観察できる広角タイムラプス観察システムの構築を試みた。

本研究では、倒立型顕微鏡 BioRevo を使用し、培養環境および培地を検討した。本観察システムにおける前核期受精卵の二細胞期胚への発生率は、CO_2インキュベーター内の発生率と同等であった。さらに、本システムは、インターネットを介した操作も可能であり、遠隔での受精卵の観察も可能であった。

以上、本研究により、体外受精における受精卵の観察に有用な広角タイムラプス観察システムを構築した。本システムを活用することで、体外受精における客観的な研究データの収集、自動化、リモート化を推進し、研究 DX の実現や働き方改革に対応していきたいと考えている。

一般演題　3

マルチカラーFISH によるマウス卵母細胞の核型解析法の開発とその応用

○日野 敏昭、日下部 博一
旭川医科大学医学部生物学教室

卵母細胞の減数分裂における染色体分配異常は加齢にともない増加し、異数性を誘発することから、その生成機序や生成要因を解明するための研究が盛んに行われている。マウスはその目的で最もよく用いられる実験動物であり、マウスで利用できる染色体研究のための様々な手法や遺伝子改変マウスは染色体分配異常の理解に大きく貢献してきた。しかし、マウスの卵母細胞においては信頼性の高い核型解析法が確立されておらず、染色体分配異常における染色体特異性に着目した包括的な研究は進んでいない。

本研究では、卵母細胞の染色体標本作製法の一つであり、段階的な卵母細胞の固定により染色体の人為的流失を抑えることのできる漸進固定空気乾燥法と、マルチカラーFISH による染色体分染法を組み合わせることで、効率よく確実にマウス卵母細胞を核型解析できる手法の開発を行った。

はじめに、美甘と上口ら(1983, Radiation-Induced Chromosome Damage in Man)の方法に従い、減数第一分裂と減数第二分裂期の卵母細胞の染色体標本を作製した。次に、染色体標本にマルチカラーFISH 用の DNA プローブをプロトコールに従いハイブリダイズさせ、得られた染色体蛍光画像をもとに核型解析を行った。その結果、解析した卵母細胞の多くで細胞質のバックグラウンド蛍光が強くでてしまい、染色体の蛍光シグナルがそれに覆い隠され、およそ 70%の卵母細胞で核型解析に失敗した。そこでバックグラウンド蛍光を抑えるために、スライドガラスに固着した卵母細胞の"扁平化 "を行い、染色体標本のハイブリダイゼーションの温度を室温から 4℃に変更したところ、バックグラウンド蛍光は大きく抑えられ、核型解析成功率は 90%以上と大きく向上した。染色体の人為的な流失もなかった。最後に、老齢雌マウス、ならびにコルヒチンで染色体分配異常を誘発した雌マウスの卵母細胞における核型解析に本手法を応用し、その妥当性を検証した。その結果、採取した卵母細胞の 80%以上で核型解析でき、分配異常を起こしたすべての染色体において、染色体の種類や異常型を正確に同定できた。加えて、コルヒチンで誘導される染色体異常はすべての染色体で起きうることも明らかになった。以上、我々は、マウス卵母細胞における効率的で信頼性の高い核型解析法の開発に成功した。

一般演題　4

リン脂質指向型環状オリゴ糖による受精能獲得の誘導

○中尾聡宏[1]、伊藤琴乃[1]、酒匂一仁[1]、竹本賢司[1]、渡邊仁美[2]、
近藤　玄[2]、入江徹美[3]、中潟直己[4]、竹尾　透[1]
[1]熊本大学　生命資源研究・支援センター　資源開発分野
[2]京都大学　医生物学研究所　統合生体プロセス分野
[3]熊本大学　グローバル天然物科学研究センター　医薬品包装学寄附講座
[4]熊本大学　生命資源研究・支援センター　生殖工学共同研究分野

精子の受精能獲得は、哺乳動物の精子が受精能力を得るための生理的かつ物理的な変化である。精子膜からのコレステロールの流出は、受精能獲得のトリガーとして知られている。一般的に体外受精では、受精能獲得を誘起するために、コレステロールアクセプターであるウシ血清アルブミン(BSA)や、コレステロール指向型環状オリゴ糖であるメチル-b-シクロデキストリン(MBCD)が用いられている。BSA や MBCD を精子に処理することで、精子膜からのコレステロールの漏出が促進され、精子の受精率が向上する。本年、私たちは、リン脂質指向型の環状オリゴ糖であるジメチル-a-シクロデキストリン(DMACD)も、精子の受精能獲得を誘起することを報告した。

DMACD をマウス精子に処理することで、体外受精における受精率が向上した。DMACD 処理精子由来の受精卵は、胚移植により正常に産子へと発生した。また、興味深いことに、DMACD は、これまで精子の受精能獲得に重要と考えられてきたコレステロールの漏出を促進せず、リン脂質の漏出を促進することで、精子の受精能を向上させることが明らかになった。さらに、DMACD を処理した精子の機能解析を行なったところ、これまでに精子の受精能獲得マーカーとして知られている、膜流動性の増加、脂質ラフトの局在変化、先体反応が起きていることも確認した。

本結果より、DMACD は、コレステロールの漏出に依存しない、リン脂質の漏出を介した新たなメカニズムによって、精子の受精能獲得を誘導し、体外受精率を向上させることが明らかとなった。本知見は、リン脂質の漏出を標的とした、新たな受精能獲得誘導技術の開発に繋がると考えられる。

一般演題　5

感染症研究における遺伝子組み換えマウスの利用

○後藤元人、盛林ひとみ、小林喜美男、高橋利一
公益財団法人 実験動物中央研究所 動物資源技術センター

我が国は国家戦略としてワクチン開発を迅速に推進するために平時からの研究開発を主導する体制として先端的研究開発センター(SCARDA)を日本医療研究開発機構(AMED) 内に設置した。SCARDA は「ワクチン開発のための世界トップレベル研究開発拠点の形成事業」を公募し、我々実験動物中央研究所は「感染症研究に有用な小型実験動物の開発と供給に関するサポート機関」に採択された。

本事業では「支援」として、様々な感染症研究で用いられる動物実験系統の収集、保存、供給、さらにはモデル動物に関する様々な情報を収集し、データベース化する取り組みを進めている。さらに「高度化」として新たなヒト化感染症モデル、マーモセット感染モデルの開発を行なっている。

我々「支援」チームでは、バイオリソースバンクとして収集頒布活動のみならず、遺伝子改変マウスの迅速な作製と供給にも取り組んでいる。今回は我々の支援での取り組みと感染症研究に使用されている遺伝子改変マウスを紹介するとともに感染症研究の問題点をお話しできればと思う。

一般演題　6

Deep learning 技術を用いた Time Lapse 画像の機械学習による 2 前核自動検出システムの開発

〇福永 憲隆、渡邊 紘之、吉村 友邦、木田 雄大、辻 暖永、浅田義正
医療法人浅田レディースクリニック
浅田生殖医療研究所

【目的】我々は生殖医療分野において胚の培養環境を最適化する目的で低酸素を維持し胚を空気中へ晒すことのない連続培養系の確立を目指して Time Lapse 機器を全症例に導入した。Time Lapse 機器は培養しながら連続撮影し胚の成長を経時的に観察できるが得られた画像データは膨大であり、その処理が新たな課題となっている。そこで我々は近年、医療分野でも注目されている Deep learning 技術を用いた画像解析に着目した。Deep Learning は脳の神経回路と同様な深い構造を作り出し機械学習を繰り返すことで精度を大幅に向上できる技術である。この技術を活用し媒精から前核消失までの画像を解析することによって前核とその個数を自動で検出するアルゴリズムの開発を目指した。

【方法】前核数を検出するアルゴリズムは入力した Time Lapse 画像に対して前核数を出力するニューラルネットとして実現させた。このニューラルネットは、胚培養士が評価した前核数を正解データとし Deep learning 技術によって学習させた。学習には前核数が明らかになっている Time Lapse 画像をそれぞれ 300 胚用い、検出精度の評価は学習に使用していない Time Lapse 画像を 100 胚用いた。ニューラルネットの構築は一般的な Deep learning 技術を適用した方法と Time Lapse 画像による受精卵の特徴を重み付けした改良法を行った。

【結果】一般的な Deep learning 技術を適用した方法では 2 前核検出率が 91%(91/100)であった。これに対し重み付けをした改良法の 2 前核検出率は 99%(99/100)に達し正解データの前核数と非常に高い相関性を示す検出精度となった。

【考察】今回の解析により 2 前核の検出精度は非常に高い相関性を得ることができた。生殖医療分野において、 短時間に多数の受精判定をするためには経験を積み身に付ける必要があるが Deep learning による機械学習はその精度が短期間で身に付いた事になる。現在は複数の前核数を検出するアルゴリズムを開発しており合わせて報告する。今後、画像データを更に学習させ Time Lapse 機器とセットにした Deep learning による自動前核検出システムの開発を目指す。

婦人科（生殖医療・不妊治療）
医療法人浅田レディースクリニック
ART JAPAN Asada Ladies Clinic

浅田レディース品川クリニック
Asada Ladies Shinagawa Clinic
東京都港区港南 2-3-13 品川フロントビル 3F
TEL.03-3472-2203

浅田レディース名古屋駅前クリニック
Asada Ladies Nagoya Clinic
名古屋市中村区名駅4-6-17名古屋ビルディング3·4F
TEL.052-551-2203

浅田レディース勝川クリニック
Asada Ladies Kachigawa Clinic
愛知県春日井市松新町1-4ルネック5F
TEL.0568-35-2203

培養室

ビューアー

受付

待合室

婦人科（生殖医療・不妊治療）

浅田レディース品川クリニック

Asada Ladies Shinagawa Clinic

ART JAPAN

東京都港区港南 2-3-13 品川フロントビル 3F　品川駅 港南口 徒歩３分
TEL.03-3472-2203

浅田レディース名古屋駅前クリニック
Asada Ladies Nagoya Clinic
名古屋市中村区名駅4-6-17名古屋ビルディング3F･4F
TEL.052-551-2203

浅田レディース勝川クリニック
Asada Ladies Kachigawa Clinic
愛知県春日井市松新町1-4ルネック5F
TEL.0568-35-2203

https://ivf-asada.jp/

浅田義正（あさだ よしまさ）
医療法人浅田レディースクリニック 理事長
医学博士
日本産婦人科学会認定専門医
日本生殖医学会認定 生殖医療専門医

ーンショット