

2012 年度 日本生殖工学会学術集会
～生殖細胞の形成から受精まで～

プログラムおよび講演要旨集

2012 年 4 月 22 日
明治大学リバティタワー

2012 年日本生殖工学会学術集会
2012 年 4 月 22 日(日)
明治大学リバティタワー 1103 教室

13:00 ~ 13:05 開会の辞

柏崎 直巳(麻布大)

13:05 ~ 14:00 セッションI:一般発表

座長:牛島 仁(日獣大) / 菊地 和弘(生物研)

佐藤 加奈 (麻布大院).....	3
堀内 理菜 (IVF 大阪クリニック).....	4
佐藤 暁 (静岡大院).....	5
古川 晃士 (麻布大院).....	6
中野 達也 (IVF なんばクリニック).....	7

14:00 ~ 14:30 Coffee Break

14:30 ~ 16:50 セッションII:シンポジウム

座長:古井 憲司(クリニックママ) / 柏崎 直巳(麻布大)

14:30-15:05 林 克彦(京都大院医) 多能性細胞を用いた始生殖細胞発生過程の再構築と機能的な精子の作製.....	8
15:05-15:40 笹浪 知宏(静岡大農学部) 鳥類の精子貯蔵管における貯精の分子機構.....	9
15:40-16:15 岡崎 哲司(大分県畜産研究部) 新規ブタ精子凍結融解法およびさらなる発展のための応用研究.....	10
16:15-16:50 藤原 敏博(山王病院) 卵胞形成・卵子成熟の from bench to bedside.....	11

16:50 ~ 17:10 総合討論

座長:鈴木 秋悦(東京生殖バイオロジー)

17:10 ~ 17:15 閉会の辞

後藤 正幸 (明治大)

17:20 ~ 懇親会 (リバティタワー 23F サロン燦(さん))

ウマ phospholipase C zeta のクローニングおよび マウス卵への注入による機能解析

佐藤 加奈・伊藤 潤哉・柏崎 直巳
麻布大院・獣医

【目的】ほ乳類の受精において、受精時に起こる卵内の Ca^{2+} イオン濃度の上昇は、卵の活性化を誘起する重要な現象である。Phospholipase C zeta ($\text{PLC}\zeta$) は受精時に卵内の Ca^{2+} イオン濃度の上昇を誘起する重要な因子であり、マウス、ラット、ウシ、ヒトなど多くの動物で存在が確認されている。本研究ではウマの $\text{PLC}\zeta$ の遺伝子クローニングと機能解析を行った。

【方法】(実験 1) RT-PCR によりウマ精巣から cDNA を抽出し、ウマゲノム DNA の配列を元に作成したプライマーを用いて PCR を行い、この PCR 産物を用いてシーケンス解析を行った。また、ウマ精子内の $\text{PLC}\zeta$ の存在および局在を調べる目的で、ウエスタンブロッティングおよび免疫蛍光染色を、それぞれウマ凍結融解精子をサンプルとし、 $\text{PLC}\zeta$ の抗体を用いて行った。

(実験 2) 実験 1 で得られた cDNA から作出した cRNA を、マウス卵内に注入し卵内 Ca^{2+} イオン濃度の測定を行い、前核形成率を観察した。さらに、卵内での $\text{PLC}\zeta$ の局在を調べる目的で、蛍光タンパク質を組み込んだ $\text{PLC}\zeta$ cRNA を作出し、マウス卵細胞質内に注入し局在の観察を行った。

【結果】(実験 1) ウマ $\text{PLC}\zeta$ は 1917 塩基からなり、これまで報告されている他ほ乳類の $\text{PLC}\zeta$ の塩基配列と 70%以上の高い相同性を示したことから、ウマ $\text{PLC}\zeta$ を初めて同定した。またウエスタンブロッティングの結果から、ウマ $\text{PLC}\zeta$ は精子内でタンパク質として存在していること、また、免疫蛍光染色の結果からウマ $\text{PLC}\zeta$ はウマ精子の頭部、赤道部および尾部に局在していることがわかった。

(実験 2) ウマ $\text{PLC}\zeta$ cRNA のマウス卵内への注入により、反復的な Ca^{2+} イオン濃度の上昇が誘起され、すべての卵で前核が形成されたことから、ウマ $\text{PLC}\zeta$ は分子レベルでカルシウムオシレーション誘起能を持つということが明らかになった。さらにウマ $\text{PLC}\zeta$ はマウス卵細胞質に注入後、核を除く卵細胞質内に拡散していた。

以上のことから、本研究によりウマ初めてウマ $\text{PLC}\zeta$ がクローニングされ、カルシウムオシレーション誘起能を持つことが明らかになった。

Rapid-i 法により凍結融解したヒト胚の発生能について

堀内 理菜・水野 里志・大垣 彩・宮地 志織・春木 篤・福田 愛作・森本 義晴
医療法人三慧会 IVF 大阪クリニック

【目的】現在、当院では Cryo-top 法により胚の凍結を行っている。この方法は、シート上に凍結溶液と胚を載せた状態で、密封することなく液体窒素に投入する為、液体窒素内での細菌やウイルス感染を 100%否定できるわけではない。今回我々は、液体窒素の冷気で間接的に胚を冷却するため凍結保存中の胚が全く液体窒素に接触せず保存ができる Rapid-i 法が Cryotop と同様の効率で凍結保存できるのか予備実験を行った。

【材料と方法】今回の検討には、患者が廃棄処分を希望した凍結保存中の前核期受精卵、あるいは 3 日目分割期胚を患者のインフォームドコンセントを得て使用した。これらの胚を一度融解し、無作為に Cryotop 法と Rapid-i 法に割り当て再凍結した。その後それぞれの方法で融解し、融解後の生存率と Day 5、Day 6 での胚盤胞到達率を比較した。

【結果】今回の検討では、凍結方法や使用した胚のステージにかかわらず再凍結後融解した胚は全て生存した。前核期受精卵を融解した場合の胚盤胞到達率は Cryotop 法および Rapid-i 法{(Day 5: 17.1% (6/35) vs. 14.0% (6/43), Day 6: 25.7% (9/35) vs. 25.6% (11/43)}で有意な差は認められなかった。また、分割期胚を融解した場合の胚盤胞到達率においても Cryotop 法および Rapid-i 法{(Day5: 27.0% (5/18) vs. 50.0% (9/18), Day6: 55.6% (10/18) vs. 66.7% (12/18)}で差は認められなかった。

【結論】Rapid-i 法と従来の Cryotop 法で再凍結、融解した前核期受精卵あるいは分割期胚の胚盤胞への発生に差はなかった。このため、液体窒素に胚が直接接触することなく胚の凍結保存が可能な Rapid-i 法は、液体窒素内での細菌やウイルスからの感染を予防できる安全で有効な方法と考えられる。

ウズラ ICSI-SMGT 法に及ぼす精子凍結融解処理の効果

佐藤 暁¹・笹浪 知宏¹・小野 珠乙²・島田 清司³・水島 秀成¹

¹静岡大・農, ²信州大・農, ³ソウル大・WCU Biomodulation

【目的】ウィルスを用いずに鳥類個体に外来遺伝子を導入することは極めて困難である。一方、哺乳類のトランスジェニック動物の作出に、前核注入法や顕微授精法 (ICSI-SMGT) がルーチンワークとして用いられる。鳥類では近年 ICSI-SMGT 法が確立され、界面活性剤の TritonX-100 (TX-100) によるウズラ精子処理は、外来遺伝子 (GFP) と精子との結合率を上げ、効率よくウズラ卵に導入することがわかった。しかし、本技術では得られたウズラ胚の発生が初期卵割ステージで停止することが大きな問題として残されている。そこで、本研究では、ICSI-SMGT 法によって得られたウズラ胚の胚発生に及ぼす精子凍結融解処理法の効果を検討した。

【方法】凍結融解処理精子 (FT 群) を LIVE/DEAD Sperm Viability Kit (Invitrogen) を用いて、精子膜が破壊された割合を確認した。その精子と外来遺伝子 (EGFP) とをインキュベートした後、卵管より採取したウズラ卵の胚盤に注入した。ポジティブコントロールとして TX-100 処理群を、ネガティブコントロールとして未処理精子 (未処理群) を使用した。注入した卵は 24 時間の体外培養を行った後、発生の進行度と GFP 蛍光を観察した。GFP 蛍光が観察された胚よりゲノム DNA を抽出し、GFP 特異的プライマーを用いた PCR 解析を行った。

【結果】未処理精子群の 41.4% の精子の膜がダメージを受けていなかったが、TX-100 群と FT 群のほとんどの精子の膜が、ダメージを受けていた。また全群 (未処理群、TX-100 群、FT 群) が 80% 以上の胚盤葉発生率を示し、未処理群に関しては、ステージ VIII-IV まで進行したが、GFP を発現した胚は無かった。対照的に TX-100 群のほとんどの胚はステージ V で停止したが、GFP を発現していた。一方、FT 群に関して、15 例中 7 例に stageV 以降の進行が確認され、GFP の発現も確認された。さらに、PCR 解析により TX100 群から発生した 11 例中 4 例、FT 群から 15 例中 7 例の胚から GFP 遺伝子増副産物が確認された。以上の結果より、ICSI-SMGT 法はトランスジェニック鳥類の作出に有用な手段になりうると考えられた。

卵黄を含まないラット精子凍結保存液の開発

古川 晃士・伊藤 潤哉・柏崎 直巳
麻布大院・獣医

【目的】ラットはヒト疾患モデルとして重要な実験動物であり、近年では ES 細胞またはジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)を用いたノックアウトラットの作製が可能になったことから、今後はさらに多くの遺伝子改変ラットの作製が予想される。これらの貴重な遺伝資源を保存するために、ラット精子凍結保存は重要な技術である。現在、ラット精子凍結保存には卵黄を主成分とした保存液が用いられているため、卵黄を介した病原体の混入などの問題がある。本研究では、卵黄を含まないラット精子凍結保存法の開発を目的にラフィノースとスキムミルクからなる凍結保存液を用いてラット精子を凍結し、融解後の精子性状を検討した。

【材料と方法】28 週齢以上の雄ラット(Crlj: Wistar)から精巣上体尾部を採取し、卵黄液 (23% (v/v) egg yolk, 8% (w/v) lactose monohydrate, 1000 IU/ml penicillin G potassium, 1 mg/ml streptomycin sulphate, and 0.7% (v/v) EquexStem)および様々なラフィノース濃度 (10%~15% (w/v))と3% (w/v) スキムミルクを組み合わせた凍結保存液に精巣上体尾部精子を浮遊させて、その後、0.25 ml プラスチックストローに封入し、プログラムフリーザーを用いて-0.5 °C/min の冷却速度で室温から5°Cまで冷却した。冷却後に15分間の予備凍結(-150°C)を行い、液体窒素下にて保存した。融解は37°Cの温水にストローを15秒間浸漬させ、精子を融解希釈液に回収し、37.5°C、5% CO₂、95% 空気および湿度飽和条件下で培養した。融解直後から5時間後までの精子の運動性、原形質膜正常性および先体正常性を調べた。

【結果】様々なラフィノース濃度 (10%~15% (w/v))と3% (w/v) スキムミルクを組み合わせた凍結保存液を用いたラット凍結融解精子の精子性状 (運動性、原形質膜正常性および先体正常性)を比較したところ、ラフィノース11%とスキムミルク3%を組み合わせた凍結保存液 (R11S3)で精子の運動性および原形質膜正常性に関して最も高い値を示した。このR11S3凍結保存液を用いた凍結融解精子と卵黄液を用いた凍結融解精子の精子性状を比較したところ、R11S3凍結保存液は卵黄液に対して、精子の運動性は有意に低かったが、原形質膜正常性と先体正常性には有意な差は認められなかった。以上のことから、R11S3凍結保存液はラット遺伝資源保存のために有効な精子凍結保存液として期待される。

着床前診断における成長段階別胚盤胞の生検時期の最適化と凍結融解の影響

中野 達也・赤松 芳恵・佐藤 学・橋本 周・姫野 隆雄・大西 洋子
井上 朋子・伊藤 啓二郎・中岡 義晴・森本 義晴
医療法人三慧会 IVF なんばクリニック

均衡型染色体異常を対象とする着床前診断には、3 日目の分割期胚から採取した 1 ないし 2 細胞を用いる Fluorescence in Situ Hybridization (FISH 法)が多く使われている。しかし、FISH 法は固定標本の出来具合によるシグナル検出精度の低下や胚のモザイクによる診断ミスなどが指摘されている。一方、近年の分子遺伝学検査の発達により、全染色体を網羅的に解析できる Array Comparative Genomic Hybridization (aCGH 法)が臨床応用されるようになってきた。aCGH 法はより多くの細胞を用いることでより正確な診断ができるため、その生検には分割期胚よりも胚盤胞が適している。そこで、胚盤胞のどの成長段階からの生検が適しているかを採取細胞数および凍結融解後の生存率をもとに検討した。その結果、初期、後期、拡張期、完全脱出胚盤胞から採取できた総細胞数はそれぞれ 3.8 ± 0.7 個、 7.9 ± 0.8 個、 7.8 ± 0.9 個、 10.8 ± 1.0 個であった。そのうち、生細胞数はそれぞれ 2.6 ± 0.5 個、 5.6 ± 0.6 個、 5.1 ± 0.5 個、 8.1 ± 0.8 個であり、初期胚盤胞に比べ、後期以降の胚盤胞は有意に多く生細胞が得られた ($P < 0.05$)。また、生検後 2 時間培養した胚盤胞は、すべての成長段階において 100%の生存が確認された。さらに、凍結融解後の胚盤胞の生存率はそれぞれ 87.5% (7/8)、90.0% (9/10)、88.9% (8/9)、88.9% (8/9)となり、各成長段階で有意な差はみられなかった ($P > 0.05$)。本研究により、どの成長段階の胚盤胞からでも凍結融解後に高い生存性を維持しつつ、確実に生細胞を採取できることがわかった。しかし、初期胚盤胞は細胞数が少なく、開孔部からの細胞の脱出が少ないため採取できた生細胞も少なかった。以上から、aCGH 法を行うための十分な生細胞を得るには、初期胚盤胞よりも後期以降の胚盤胞からの生検が適していると考えられた。

多能性細胞を用いた始原生殖細胞発生過程の再構築と機能的な精子の作製

林 克彦
京都大院医

始原生殖細胞（PGCs）は、胚発生初期に体細胞系列より分岐し独自の発生過程をたどる。マウスの PGCs は胎生 6 日目前後にエピブラストから BMP4 シグナルにより分化する。PGCs では特異的な転写因子群の働きにより体細胞化のプログラムが抑制されると同時に、多能性細胞特異的遺伝子 Nanog や Sox2 の再発現が認められる。またその後エピゲノムリプログラミングがおきる。多能性細胞特異的遺伝子の発現やエピゲノムリプログラミングは全能性の構築に重要であると考えられているが、PGCs は胚中に少数しか存在せず、その解析は不十分であった。

多能性胚性幹細胞である ES 細胞は胚盤胞に導入すると、エピブラストを介して PGCs に分化する。このキメラ胚の中でおこる ES 細胞から PGCs の分化を体外培養で再構築することができれば、PGCs を多数得ることが可能となり、その分化やエピゲノムリプログラミングのメカニズムの解明に貢献する。体外培養による PGC 分化系の再構築において重要な点は、PGCs が安定的かつ効率的に分化誘導されることと、その分化様式が体内の発生様式を忠実に再現していることである。演者は最近の研究において、ES 細胞をエピブラスト様細胞に分化させた後に PGCs に分化させる培養法を確立した。この培養法で得られた PGCs の分化過程は遺伝子発現、エピゲノムリプログラミングともに体内の発生様式を再現するものであり、得られた PGCs は精子にまで分化する能力を有していた。本シンポジウムでは演者の最近の知見を含めてこの技術の利用価値について議論したい。

鳥類の精子貯蔵管における貯精の分子機構

笹浪 知宏

静岡大学農学部応用生物化学科

動物は受精戦略に工夫を凝らし、生存競争を勝ち抜く事で今日における進化を遂げてきた。鳥類は季節繁殖を行う動物であり、その受精戦略は非常に巧みである。繁殖期には短期間の間に複数の卵を産むが、その一続きのクラッチで排卵される卵子を効率良く受精させるために、精子を貯蔵する特殊な組織を卵管の子宮腔移行部 (Utero-vaginal junction: UVJ) に備えている。精子貯蔵管 (Sperm storage tubules: SST) と呼ばれるこの組織中で、精子は長期間生存するので、一度の交尾で長期間受精卵を産み続けることが可能なのである。これまで、鳥類の卵管における貯精の仕組みはほとんど解明されていなかったが、性ステロイドであるプロゲステロンが SST からの精子の放出のトリガーとなっていることが明らかになり、血中プロゲステロン濃度の上昇が精子放出と排卵とを同調させることが分かった。鳥類では、一旦精子を SST 内に貯蔵するという戦略により、精子と卵子との出会いのタイミングを体内で調節するとともに、卵管から大量に分泌される卵白や卵殻に精子が絡めとられるのを防いでいるのである (Endocrinology 152: 3952-3962 (2011))。

SST 内で精子は運動を停止し、あたかも休眠状態のように振る舞っている。UVJ の抽出物と射出精子とをインキュベートすると、精子の運動が抑制され、インビトロで長期間維持できることがわかった。さらに、UVJ の抽出物は種を越えて、ほ乳類精子もインビトロで長期間運動を継続できることが分かった。

本講演では、卵管における貯精現象を中心に、鳥類の受精の特殊性について紹介したい。

新規ブタ精子凍結融解法およびさらなる発展のための応用研究

岡崎 哲司

大分県農林水産研究指導センター畜産研究部

各国の養豚業における種付け業務は、自然交配と液状精液による人工授精で行われている。しかし、液状精液は保存期間が短く肉豚生産や育種改良の上で不便な点が多い。このデメリットを解消するため、凍結精液の利用が強く求められているが、人工授精後の繁殖成績が低く実用化されていないのが現状である。我々は精液凍結過程の主要な3ステップである「冷却」・「凍結」・「融解」の各条件を最適化し、新鮮精液の成績と同等の人工授精法を開発したのでここで紹介したい。

【採精後の精子前処理法】種雄豚の耐凍能の差異は技術普及の妨げになっている。この原因は精液中に存在する細菌およびエンドトキシンにあることを見いだした。従来手法ではこれらの因子が混在した精漿と数時間暴露後に凍結していたために融解後に精子機能が低下していたのである。そこで、精液採取後に精漿を完全に除去し、LPSの生物活性部位を不活化するPolymyxin B添加前処理液にて処理する方法を確立した。

【凍結条件】凍結時の問題は、ブタ精子は他動物種と比較してglycerolの感受性が高いことにある。そこで、glycerol非依存的に、凍結前に精子細胞内の水分量を低減し、低濃度glycerol下で凍結する必要があると考えた。Glycerol平衡前に精子を高張の希釈液で処理することによりglycerol量を既存の3%から2%へと減少させる新規凍結保存液を開発した。これら冷却・凍結法は、一般豚として知られるランドレースやデュロック以外のパークシャーや精液特性が大きく異なるアグーといった貴重な品種においても応用可能で、その汎用性が示されている。

【融解・人工授精法の最適化】自然交配で子宮内へ流入する精漿には、精子のcapacitationを抑制することによる、長時間の運動保持と交配後の異物貪食のために誘引される白血球の免疫抑制という2つの役割がある。したがって、このような機能を有した融解液の開発が必要となる。凍結融解精子は Ca^{2+} に依存したcapacitationが過剰に誘起される。融解液への Ca^{2+} キレーターであるEGTAの添加は、このcapacitation誘起を抑制できた。さらには精漿中から免疫抑制作用をもつcortisolを発見し、子宮内の白血球を消失させることを明らかとした。この合成融解液を人工授精に用いることで受胎率90%、産子数9頭以上というこれまでにない新しいブタ凍結精液技術の開発に成功した。

今後、これらの技術を利用することで優良な遺伝資源保存が加速すると期待されるが、その場合、ウイルスなど病原体も共に凍結保存しないことが絶対条件である。我々は、凍結過程でブタウイルス(PRRRSV, ADV, PCV2)を不活化可能であるか否かについて研究しており、現在までに効率的なpercoll密度勾配遠心法による「除去」、界面活性剤による「不活化」という複合処理で精液中のウイルスtiterをおよそ1/100,000に低減できることを確認している。本シンポジウムでは、これらの内容についても紹介したい。

卵胞形成・卵子成熟の from bench to bedside

藤原 敏博

医療法人財団順和会 山王病院リプロダクションセンター

“from bench to bedside”見馴れない言葉であるが、基礎研究の成果を臨床医学に活かしていこうという意味である。生殖医療は医学の中でもかなり特異的であり、それ自体が基礎科学的な性格をもっている。その背景にあるのは畜産学で培われてきた知見であり、細分化していけば、(分子)生物学・発生学・遺伝学等から導入されたものが基礎となっている。

さて、現在の生殖医療の起源は不妊治療にあり、これを効率的に行うためには、妊娠成立の生理を理解したうえで異常(=病態生理)を解明してその改善に努めなければならない。生殖医療の中核となる技術は体外受精・胚移植であるが、ここでも動物実験で得られた知識が大いに活躍している。一方で、動物実験でよく用いられるマウスを初めとする齧歯類とヒトとでは、卵胞発育・卵子成熟の様式やメカニズムが完全には同等ではないために、個別化して考えていかねばならないことが多々あることも事実である。

その差異の一例を挙げるならば、ヒトは単一排卵動物である点であり、その中で良質な卵子を得るためにはどうすれば良いかということが課題となる。もちろん単一排卵であっても、その卵子が十分に妊娠に結びつくだけのクオリティをもっていれば問題はないが、残念ながら妊娠率をみる限りそれだけでは不十分である。そのためには卵巣刺激を行い、多発卵胞発育を促していくことが行われる。この際に、ヒトにおける単一卵胞発育・排卵に関わる各種因子並びにメカニズムを認識したうえで、同調性をもった効率の良い刺激を行なうことが必要となってくる。

多くの医学においてそうであるように、生殖医療においても基礎研究と臨床医学とは車の両輪のようなものであり、両者がいかに有機的に融合していくかということが、今後の発展に不可欠である。



2012年度 日本生殖工学会学術集会
講演要旨集

編集・発行 SRE[日本生殖工学会]

発行代表者 柏崎 直巳

〒252-5201

神奈川県相模原市中央区淵野辺 1-17-71
麻布大学 獣医学部 動物繁殖学研究室内

電話:042-769-2339

FAX:042-769-1762

発行 平成 24 年 4 月 22 日