

2015 年度 日本生殖工学会学術集会

プログラムおよび講演要旨集

2015 年 12 月 13 日(日)

明治大学グローバルホール

2015 年日本生殖工学会学術集会
2015 年 12 月 13 日(日)
明治大学駿河台キャンパス
グローバルホール

13:00 ~ 13:05 開会の辞

柏崎 直巳(麻布大)

13:05 ~ 14:00 一般講演(講演 9 分, 質疑応答 3 分)

(座長:牛島 仁(日獣大)・杉浦 幸二 (東大院))

小畑 仁美 (麻布大院).....	3
高草 翔太 (麻布大院).....	4
山崎 承美 (日獣大).....	5
鴨下 真紀 (麻布大院).....	6

14:00~17:15 シンポジウム(講演 35 分, 質疑応答 10 分)

(座長:菊地 和弘(生物研)・伊藤 潤哉(麻布大))

14:00 ~ 15:30 シンポジウム I「精子の生理機能」

講演 I :「ブタ精子capacitationの分子機構-タンパク質チロシンリン酸化と ROS レベルの関与について-」

加藤 侑希 (茨城県立医療大).....	7
----------------------	---

講演 II :「メス生殖器における精子サバイバル術」

河野 菜摘子 (明治大).....	8
-------------------	---

15:30 ~ 15:45 Coffee Break

15:45 ~ 17:15 シンポジウム II「人工授精」

講演 III :「受精に関わる免疫機能の解明とそれを利用した繁殖技術の開発」

島田 昌之 (広島大院).....	9
-------------------	---

講演 IV :「ヒト凍結精子による生殖医療」

安藤 寿夫 (豊橋市民病院).....	11
---------------------	----

17:15 ~ 17:20 閉会の辞

森本 義晴 (HORAC グランフロント大阪クリニック)

17:30 ~ 19:30 懇親会 (アカデミーコモンカフェ パンセ)

一般講演

体外発生培養液へのエチレンジアミン四酢酸およびグルタミンの添加が ラット前核期胚の体外発生能に与える影響

小畑 仁美・伊藤 潤哉・柏崎 直巳
麻布大院・獣医

哺乳類初期胚の体外培養系は、胚発生機構の解明だけでなく、発生工学技術適用のためにも極めて重要である。ラット前核期胚の体外発生培養 (*in vitro* culture: IVC) は可能であるが、安定して胚盤胞を得ることが難しい。本研究は、ラット初期胚の体外発生培養成績改善を目的とし、エチレンジアミン四酢酸 (Ethylenediaminetetraacetic acid: EDTA) とグルタミン (Glutamine: Gln) の培養液への添加がラット前核期胚の体外発生能に与える影響を検討した。

実験には Wistar ラットを用いた。過剰排卵処置をした雌ラットを自然交配させることで *in vivo* 由来前核期胚を得た。また、過剰排卵処置をした雌ラットから回収した未受精卵と雄ラットの精巢上体尾部精子との体外受精により *in vitro* 由来前核期胚を得た。これらの前核期胚は、37.5 度、5% CO₂、95% 空気、湿度飽和の条件下で 120 時間培養した。培養液として mR1ECM から Gln を除去したもの、EDTA 0.01 mM および Gln 0.1 mM もしくは Gln 1.0 mM を添加したものをを用いた。培養開始 24 時間後に 2 細胞期胚、120 時間後に胚盤胞への発生を観察した。得られた胚盤胞はアセトオルセイン染色により細胞数を計測した。

In vivo 由来前核期胚の IVC おいて、2 細胞期胚率に有意な差は認められなかった ($P > 0.05$) が、胚盤胞率では mR1ECM +(EDTA 0.01 mM, Gln 1.0 mM) 区が mR1ECM +(EDTA 0 mM, Gln 0.1 mM) 区に比べて有意に高かった ($P < 0.05$)。また、EDTA 添加の有無にかかわらず、Gln 1.0 mM の添加により胚盤胞の細胞数は有意に増加した ($P < 0.05$)。 *In vitro* 由来前核期胚の IVC おいては、2 細胞期胚率に有意な差は認められなかった ($P > 0.05$)。胚盤胞率においては、mR1ECM +(EDTA 0.01 mM, Gln 1.0 mM) 区が mR1ECM +(EDTA 0 mM, Gln 0.1 mM) 区に比べて有意に高かった ($P < 0.05$) が、胚盤胞の細胞数は有意な差は認められなかった ($P > 0.05$)。

以上の結果より、ラット前核期胚の体外発生培養液 mR1ECM に EDTA および Gln を添加することでその体外発生能が改善されることが明らかになった。

一般講演

ブタにおける体外受精卵細胞質小片の融合による成熟卵の活性化誘起

高草 翔太¹・伊藤 潤哉¹・菊地 和弘²・柏崎 直巳¹

¹麻布大学大学院獣医学研究科

²農業生物資源研究所

【目的】卵の人為的活性化とは、第二減数分裂中期で細胞周期が停止した状態から人為的に活性化誘起刺激を与え、減数分裂を再開させることである。様々な動物種で塩化ストロンチウムやエタノールによる処理、また電気刺激などの多様な活性化法が考案されており、体細胞核移植によるクローン胚作出、あるいは顕微授精時に用いられている。

本研究ではブタ体外受精(IVF)卵から、Serial centrifugation 法で小片化し、これを成熟卵と融合させて効率的な活性化法の開発を目的とした。

【材料と方法】食肉処理場より得られたブタ卵巣から卵丘細胞卵複合体(COC)を回収し、NCSU-37にて44時間体外成熟培養を行い、ヒアルロニターゼで裸化处理した。第一極体が放出されているものを成熟卵と判定し実験に用いた。培養は38.5°C, 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂湿度飽和の条件下で行った。成熟卵と凍結融解精巣上体精子との3時間のIVFにより、受精卵を得た。この受精卵をSerial centrifugation 法、すなわち、細胞質内脂肪滴を偏在化させる遠心処理後、3層のPercoll溶液による密度勾配で2回目の遠心処理を行うことで受精卵の細胞質を小片化させて回収した。そして、1)この受精卵細胞質小片を成熟卵と電気融合させた受精卵小片区、2)成熟卵からSerial centrifugation 法によって細胞質小片を作出し、成熟卵と電気融合させた成熟卵小片区および3)透明帯除去成熟卵に電気融合刺激を与えたControl区を設けた。各々の試験区の処置卵をCytochalasin B (5 µg/mL)で2時間培養し2倍体処理をして、続けてNCSU-37にて体外成熟培養と同様な条件下で体外発生培養(IVC)を行った。そして、IVCの10時間後に雌性前核形成を、144時間後に胚盤胞への発生を観察した。また、144時間のIVCで得られた胚盤胞をヘキスト染色して、その細胞数を調べた。

【結果】受精卵小片区、成熟卵小片区およびControl区の雌性前核形成率は、それぞれ85.0%、34.0%および12.2%で、受精卵小片区と成熟卵小片区、受精卵小片区とControl区と間に有意差が認められた($P < 0.05$)。胚盤胞率はそれぞれ46.0%、22.5%および9.3%となり、受精卵小片区と成熟卵小片区、受精卵小片区とControl区の間において有意差が認められた($P < 0.05$)。また、各試験区における胚盤胞の平均細胞数は、35.6、28.3および25.6で、有意な差は認められなかった($P > 0.05$)。

以上の結果から、ブタ受精卵細胞質小片を成熟卵へ融合させることにより、効果的に成熟卵を活性化させることができた。

一般講演

凍害保護物質をストロー内 1 段階希釈されたウシガラス化胚の体外発生能 *In vitro* development of vitrified bovine embryos diluted cryoprotectants by one-step in straw method

山崎 承美・尾池 紹子・小熊 惇平・Yunitasari Amalia・岡田 幸之助・牛島 仁
日本獣医生命科学大

【目的】最少容量ガラス化法はウシ胚の保存方法としても活用され、最近では1段階で凍結保護剤の除去が行われるようになり、生産現場で利用できる方法として普及が期待されている。一方で胚の生存性の低下やガラス化した胚をストロー内に移送する際の失宜が指摘されている。そこで、これらの手技の改良を行うとともに、ウシ体外受精胚を用いてガラス化後の体外発生能を検討した。

【材料及び方法】胚に悪感作を与えないガラス化法に改良するため、加温液のシュクロース濃度を検討した(実験 1,2)。胚を確実にストロー内に移送するため手技を改良するとともに、一連の手技が衛生的に行われていることを検証した(実験 3,4)。そして、体外受精後 7~8 日目の胚を用い、改良した方法で処理した胚の生存性を調べた(実験 5)。

【結果】ガラス化液量を増やすことにより冷却/加温速度が低下した(実験 1)。また、0.5M と 1.0M 濃度では時間経過に伴い卵子は徐々に収縮し、0.2M では希釈液に入れた直後から元の細胞質の大きさよりも膨張した。0.3M では約 10 分で元の細胞質の大きさに復水した(実験 2)。クライオテックのアニマル仕様ならびにストローに移送するアダプターにクリアチップを用いることにより、全ての胚がストロー内に収納されること(実験 3)、ストローと培養液に細菌が検出されないことを確認した(実験 4)。この方法で処理した胚は品質に依存することなく全て生存するとともに、保有する細胞数は対照となる新鮮胚と同等であった(実験 5)。これらのことから、一連の方法は生産現場の新たな胚移植方法として利用できると考えられる。本研究はニューテック財団研究奨励金を用いて行われた。

一般講演

カルボキシル基導入ポリリジンを含む保存液によりガラス化保存した ブタ前核期胚の発生能

鴨下 真紀・加藤 翼・伊藤 潤哉・柏崎 直巳
麻布大学院・獣医

【目的】ガラス化保存したブタ前核期胚における加温後の生存性および発生能は低いことが知られている。本研究では新たな凍害保護物質(CPA)であるカルボキシル基導入ポリリジン(COOH-PLL)を用いたブタ前核期胚のガラス化保存法の改善を目的とし、ガラス化保存したブタ前核期胚の体外での発生能および産子への発生能を調べた。

【方法】前核期胚は平衡液に10分間静置した後、PB1に20% (v/v) fetal calf serum, 30% (v/v) ethylene glycol (EG), 0, 1, 10, 20 および 30% (w/v) COOH-PLL を含むガラス化液(P0, P1, P10, P20 および P30)で1分間静置し、Cryotopを用いてガラス化保存した。平衡液のCPAは、ガラス化液中のEGおよびCOOH-PLLを半量として用いた。加温後、体外発生培養を行い、胚盤胞への発生率を調べた。ガラス化保存を行わない胚を対照区とした。さらに、高い発生率を示したP20でガラス化保存したブタ前核期胚の産子への発生能を調べるため、加温後に前核期胚を胚移植した。

【結果】P0, P1, P10, P20 および P30 でガラス化保存した前核期胚の胚盤胞への発生率はそれぞれ1.3%, 3.8%, 12.2%, 19.4%および4.8%であり、P20はP0よりも有意に高く、対照区(28.4%)と有意差のない発生率を示した($P < 0.05$)。さらに、P20でガラス化保存した前核期胚を移植した8頭のレシピエントのうち2頭が分娩し、15頭の産子が得られた。以上の結果より、COOH-PLLを含む保存液を用いてガラス化保存したブタ前核期胚の体外での発生能は向上し、本方法によりガラス化保存したブタ前核期胚は産子への発生能を有することが示された。

シンポジウム I 「精子の生理機能」

ブタ精子 capacitation の分子機構 -タンパク質チロシンリン酸化と ROS レベルの関与について-

加藤 侑希

茨城県立医療大学・人間科学センター

哺乳動物の精子は、精巣で形成された段階では未熟で受精能力を備えていない。精巣上体における精子成熟、及び、輸卵管峡部における受精能獲得反応 (capacitation ; CPN) という段階的な活性化を受けた精子だけが、超活性化運動 (hyperactivation) 及び先体反応を起こして卵と受精することが可能となる。CPN の詳しい分子メカニズムは未だ不明な点が多いが、CPN に直接結びつく反応として活性酸素種 (ROS) レベルの上昇と機能タンパク質のチロシンリン酸化が特に重要であると考えられている。しかし、これまでに CPN に伴ってチロシンリン酸化されるタンパク質の存在についてはいくつか報告があるものの、そのリン酸化タンパク質の機能を明らかにしたものは少ない。また、ROS レベルの調節機構も明らかにされているとはいえない。本研究では、CPN に伴いチロシンリン酸化されるタンパク質として、aldose reductase (AR) と NADP⁺依存性イソクエン酸脱水素酵素 (IDPc) を新たに同定し、それらのタンパク質の機能解析を行った。その結果、チロシンリン酸化によって AR は活性を上昇させ、反対に、IDPc は活性を低下させることが明らかとなった。更には、両者の活性変化は精子細胞内 NADPH 量及びグルタチオンサイクルの低下を促し、結果として、精子内 ROS レベルを上昇させていることが判明した。

AR 及び IDPc の解析から、精子が生理的な ROS 産生系を持ち、それが細胞内 NADPH レベルによって制御されていることが強く示唆された。これまで、精子で産生される ROS は主にミトコンドリアを起源とするとされてきたが、本研究結果は新しい ROS 産生系の存在を示したものである。

シンポジウム I 「精子の生理機能」

メス生殖器における精子サバイバル術

河野菜摘子^{1,4}・康 宇鎮¹・吉田 薫²・吉田 学³・宮戸健二⁴

¹ 明治大学農学部生命科学科, ² 桐蔭横浜大学先端医用工学センター,

³ 東京大学大学院理学系研究科, ⁴ 国立成育医療研究センター細胞医療研究部

多くの動物において、精子は卵に受精するために非常に特化した形態・機能を有しており、精子形成が完了した時点で遺伝子の転写および翻訳は行われていないと考えられている。一方、精子とともに雌生殖器へ運ばれる精漿には、精子の運動能や受精能を制御し、受精効率を高める働きがあると古くから考えられてきたが、実際に体内で観察を行うのは困難であった。今回、精囊から分泌される精漿タンパク質 Seminal Vesicle Secretion 2 (SVS2) に着目し解析を行うことで見えてきた、精漿タンパク質および子宮の役割について報告する。

SVS2 を欠損させた雄マウスは、野生型の雄と同様に IVF では高い受精率を示したが、自然交配では産仔がほとんど得られなかった。その原因の一つとして、マウス交尾特有である腔栓の形成不全が考えられたが、腔栓の代替物としてシリコンを用いて人工授精を行ったところ、精子は子宮内に留まるものの、SVS2 非存在下では依然として受精率が極めて低い結果となった。また同様の実験において、SVS2 存在下では精子は高い受精能を示したことから、SVS2 は体内受精に必須な因子であることが明らかになった。

さらに精子のミトコンドリアが DsRed、先体が GFP の蛍光を持つ遺伝子改変マウス (RBGS002) を用いて解析したところ、野生型の雄マウスの場合、子宮内精子の約 9 割が GFP の蛍光を有していたのに対し、SVS2 欠損マウスの場合では約 3 割と有意に低下している様子が観察された。電子顕微鏡を用いて精子細胞膜の状態を調べたところ、SVS2 非存在下では精子は子宮内で細胞膜が破壊され、死滅していることが明らかとなった。回収した子宮内液を体外で精子に添加したところ、有意に精子の生存性が低下し、精子が凝集する様子が観察された。これらの結果から、子宮内には精子を死滅させる液性因子が存在すること、また精漿中の SVS2 はその因子から精子を保護する作用があることが明らかになった。

以上のことから、子宮内では細菌と同様に精子は異物として認識されると考えられ、精子は生体防御系からの攻撃に対象になること、さらに、その攻撃から精子を守るために精漿成分の SVS2 が重要な役割を果たしていると考えられた。この子宮内における攻撃と防御のバランスが、競合的な精子選抜を引き起こし、選ばれた精子が卵管内で待つ卵と受精可能となる仕組みが存在することが予想される。

シンポジウムⅡ「人工授精」

受精に関わる免疫機能の解明とそれを利用した繁殖技術の開発

島田 昌之

広島大学院・生物圏科学

射出された精子は、ブタやマウスでは精漿と共に直接子宮内に注入され、卵管で受精する。この精漿成分は、精子や受精卵(胎児)に対する免疫寛容を引き起こし、受精や着床、妊娠が成立する。しかし、人工授精では、抗生剤処理し、凍結あるいは冷却保存した精子を、精漿はほとんど(あるいは全く)含まれない状態で、希釈液や凍結精液成分(血漿タンパク質、卵黄やグリセロール)と共に子宮内に注入する、という非生理的なステップが含まれる。したがって、細菌や異物への反応、精子や胎児の許容といった生殖免疫の最新の知見をレビューしながら、対象動物の繁殖技術における非生理的事象に着眼し、その差異を克服することで、繁殖成績の向上が図られると考えている。

我々は、ブタ精液中には多数のグラム陰性菌が混雑すること、抗生剤処理が溶菌を促す結果、精液中の内毒素(LPS)濃度を急激に上昇させることを見出した。LPSは、主に免疫細胞で発現するToll様受容体(TLR)-4に結合し、それにより免疫細胞は初期免疫応答を行う。精管炎個体の射出精液には多数の白血球が観察されるが、雄の生殖器表面に付着する細菌が精液採取時に混雑する場合は、白血球は精液中にほとんど存在しない。しかし、このような精液を抗生剤処理した時、精子の運動性が低下したことから、精子自身が細菌の存在を認識し、何らかの影響を受けていると仮説立てた。そこで、精子に発現するTLR family やサイトカイン・ケモカイン類の受容体を網羅的に探索した結果、TLR-4 の他、グラム陽性菌に対するTLR-2 およびDNA ウイルスを検知するTLR-9、ケモカイン類受容体(CCR family)や抗菌ペプチド受容体(CXCR family, TFRC)が精子に発現することが明らかとなった。これらの機能について、遺伝子欠損マウスや体外受精系を用いて解析し、精液中の病原体により精子TLR family が活性化され、アポトーシスが誘導されること、CCR やCXCR, TFRC はミトコンドリアのATP産生を向上させ、受精能獲得を誘起することを示した。

これらの基礎的知見から、溶菌せずに細菌増殖を抑制するタイプの抗生剤で精子を処理・保存すること、パーコール密度勾配法による精子、細菌、内毒素の分離が、精子の人工授精と体外受精の受精率向上みでなく凍結精液の質の改善につながることを報告した。さらに、精液量の多いブタでは、LPSを直接的に不活化するポリミキシンBを他の抗生剤(非溶菌性)と複合処理することで、液状保存と凍結精液の精子性状を向上させ、人工授精成績を安定化しうることが明らかとなった。一方、精子の受精能獲得については、ヒト高度生殖補助医療において体外受精不成功群で卵丘細胞が分泌するケモカイン類や抗菌ペプチド類が低値であり、これらの添加が受精率を向上させることから、効率的に精子の受精能獲得を誘導する体外受精系を構築した。さらに、子宮内に凍結精液や希釈液成分が持ち込まれる家畜人工授精の問題点は、これら異物が子宮内の劇症性炎症を引き起こし、精子の早期排除、受精卵を攻撃することにより繁殖成績が低下していることも明らかとした。

しかし、家畜繁殖の現場でこれらを除去する遠心操作を行うことは非現実的なことから、細胞性免疫を抑制する薬剤投与により、受胎率を向上させる新技術を発明し、ブタの凍結精液人工授精の飛躍的な成績向上に成功した。

以上のように、精子を中心とする免疫機能に着眼することで、人工授精技術の開発(改良)を行ってきた。今後は、免疫のみでなく代謝や遺伝子発現制御などもターゲットとした「精子の基礎研究」を行い、それらから繁殖成績を改善する技術革新を図っていきたいと考えている。

シンポジウムⅡ「人工授精」

ヒト凍結精子による生殖医療

安藤 寿夫

豊橋市民病院総合生殖医療センター

ヒト凍結保存精子を用いた人工授精の最初の妊娠例は 1953 年に報告されているものの、本格的な臨床応用に至ることなく、30 年以上が経過した。その後、一大転機が訪れる。1985 年に HIV 陽性ドナーの精子を用いた人工授精を実施した患者女性が感染したのをきっかけに、一定期間(通常 6 ヶ月間)を経て安全だと判明してから、予め凍結しておいた射出精子を人工授精に用いるようになった。

射出精子のもうひとつの医学的凍結適応は、悪性腫瘍患者が化学療法や放射線治療を行うケースにおいてである。結婚年齢が年々上昇していることや、がん治療の成功率が上昇していることなどにより、1998 年に凍結を開始した当院でも、生殖医療を行いつつ多数の診療科から成り立つ総合病院であることも影響して悪性腫瘍患者の治療前射出精子凍結は近年増加している。ただ、本日のテーマである人工授精に用いることができる十分な運動精子を凍結することは、治療直前に依頼を受けて量的に限られた精液検体からの凍結であるため困難であり、現実的には少数の運動精子でも高い成功率が期待できる顕微授精 ICSI に供することが前提となっている。

無精子症における精巣精子や精巣上体精子の凍結保存は、採取時に得られた新鮮精子をそのまま ICSI に用いることが理想的であるが、ベストタイミングで採卵できなければ至適成功率に至らないことや、不成功の場合に繰り返しの精子採取になることを避けるために、精子凍結が広く行われている。

以上のようなヒト精子凍結は、生殖医療を行うすべての施設で行われているわけではないが、基本的な手法については概ね確立されている。凍結法として代表的なのは、液体窒素蒸気凍結法とプログラムフリーザー法であるが、当院をはじめとして液体窒素蒸気凍結法が主流のようである。

本シンポジウムでは、生殖医療における精子凍結の現状や手技について、医学的・倫理的問題にも一部触れながら紹介していきたい。

Japan Society for Reproduction Engineering
日本生殖工学会 **SRE**