

平成22年2月2日
 独立行政法人農業生物資源研究所
 麻布大学

世界初！マウス体内で成熟させた豚精子を用い、 正常子豚が誕生

- 絶滅が危惧される動物の新たな保存・利用の基盤技術として期待-

ポイント

- ・子豚の精巣を免疫不全マウスに移植し、その体内で豚成熟精子を作出。
- ・成熟精子を成熟卵と授精させた後に雌豚に移植し、子豚を分娩させることに世界で初めて成功。
- ・家畜だけでなく絶滅危惧種や希少な動物の保存・利用の基盤技術として期待。

概要

農業生物資源研究所と麻布大学は、子豚の精巣を免疫不全マウスに移植することで精子を成熟させ、この精子を豚の成熟卵に顕微授精（卵の細胞質に精子を注入する方法）して得られた受精卵を雌豚に移植する方法で、世界で初めて子豚の分娩に成功しました。哺乳動物ではこれまで雄の成熟した精子を採取して凍結し、保存・利用してきましたが、絶滅危惧種などの貴重なほ乳類の精子は常にその採取の機会や量が制約されています。今回開発した手法は、精巣組織を免疫不全動物に移植し、その移植組織の中で未成熟精子を発育・成熟させ、繁殖に利用するものです。家畜のほか、野生動物にも応用可能であり、未成熟の個体や事故等により死亡した希少な雄動物への適用も考えられます。そのため、本技術は絶滅が危惧されるアジアの貴重な豚品種など遺伝資源の新たな保存・利用法の基盤技術として期待されます。

予算：運営費交付金

問い合わせ先など

研究代表者：	(独)農業生物資源研究所 理事長	石毛 光雄
研究推進責任者：	(独)農業生物資源研究所 動物科学研究領域 生殖機構研究ユニット長	徳永 智之
研究担当者：	(独)農業生物資源研究所 動物科学研究領域 生殖機構研究ユニット 上級研究員	菊地 和弘
		電話番号：029-838-7447
	生殖機構研究ユニット 上級研究員	金子 浩之
	日本学術振興会特別研究員	中井 美智子
	麻布大学 獣医学部 教授	柏崎 直巳
広報担当者：	(独)農業生物資源研究所 広報室長	川崎 建次郎
		電話番号：029-838-8469

本資料は筑波研究学園都市記者会、農政クラブ、農林記者会、農業技術クラブに配付しています。

開発の社会的背景

哺乳動物における精子などの雄性遺伝資源の保存法としては、成熟した雄個体より採取した精子（射出精子）の超低温保存があり、融解後に人工授精に利用されています。個体が死亡した場合などの特殊なケースでは、精巣上体（精巣の近傍にあり、精子を貯留し精子に受精能を付与する器官）から精子（精巣上体精子）を採取し凍結が行われます。しかし、これらの凍結保存法は成獣が対象で、未成熟な個体からは精子の採取ができません。また、射出精子は採精の機会や精子の量も限られ、保存・利用の可能性が制約されています。

研究の経緯

精巣組織には、精子のもとになる精粗（あるいは精原）細胞が含まれ、これらが増殖・分化することで精子を生産しつづけています。これらの組織や細胞を直接保存できれば、利用の可能性が格段に向上します。

現在、精巣組織あるいはそれに含まれる細胞を直接保存する方法として、超低温保存法がありますが、加温（融解）後に十分な数の成熟した精子を得ることができないという問題があります。近年、新たな方法として、これらの組織を免疫不全動物に移植し、動物体内で細胞を保存し、同時にその移植組織の中で精子の発育・成熟を完結させるという技術開発が活発に行われています。この技術を用いれば、将来的には超低温保存した精巣組織から得られた未成熟な精粗細胞を成熟させて、繁殖に用いることも可能になると考えられます。しかしながら、これまでに 2002 年のウサギの精巣組織の移植の事例以外では成功例はなく、大型の哺乳動物にこの技術を利用することは困難であると考えられてきました。

研究の内容・意義

1. 本研究は、免疫不全マウス（ヌードマウス）への精巣組織の移植、精子の採取、卵の体外成熟培養、顕微授精、受精卵の体外培養、受精卵移植という一連の技術を用いました（図 1）。
2. 生後 6～15 日齢の子豚の精巣組織（精細管は発達していない）を約 1.5 mm 角に細切し、ヌードマウスの背部皮下組織に 1 頭あたり約 30 個移植したところ、移植後 118～280 日には移植組織片が発育しました（図 2）。組織を細切したところ 27 頭中 19 頭から成熟した精子が回収されました（回収個体率 70.4%）（図 3）。一部の精子には運動性が認められました。また、精子形成がみられた精細管が組織検査により確認されました（図 4）。
3. 移植後 133～280 日に得られた精子を、別に用意した体外成熟卵と顕微授精させたところ、受精が確認され、体外培養を行うと 6 日後に胚盤胞期の胚へと成長しました（図 5）。これらの胚は染色体検査の結果、正常な二倍体であることが確認されました。
4. 性周期を同期化させた借り腹の豚の卵管に、1 頭あたり 47～100 個の顕微授精直後の受精卵を外科的に移植したところ、23 頭の借り腹のうち 4 頭が妊娠し、そのうち 2 頭が分娩に至り、合計 6 頭（雌 1 頭、雄 5 頭）の子豚を出産しました（図 6）。生まれ

てきた子豚は健康に発育しており、一部は性成熟に達しました。

5. これまで、異種移植精巣組織から得られた精子で出産に至った例はウサギに限られていました（2002年）。本研究グループは、豚精子のヌードマウス体内での成熟、体外における胚の作出、ならびに受精卵移植による子豚の出産という繁殖サイクルに世界で初めて成功しました。

今後の予定・期待

1. 生まれた子豚が順調に生育し、次世代の繁殖が可能であることを証明します。
2. 精巣組織の超低温保存と組み合わせて、保存できる遺伝資源の対象を増やします。
3. 他の家畜や野生動物のほか、遺伝子改変動物にも応用可能であり、性成熟に達していない未成熟な個体や事故等により死亡した希少な雄動物からの組織の採取も可能で、新たな遺伝資源の保全法として期待されます。また幼若個体から組織を採取・移植した場合、世代間隔を短くすることが可能です。
4. 雌側の卵巣組織の異種移植・成熟技術が確立できれば、雌雄両方に利用できる技術となり、遺伝資源の保全効果がさらに高まります。

用語の解説

免疫不全動物（ヌードマウスなど）

もともとは胸腺を欠如する突然変異で免疫担当細胞の一つであるT細胞がない動物。このT細胞機能が欠如するマウスやラットを固定した系統は、合わせて被毛も欠如するためその外貌から「ヌードマウス」ならびに「ヌードラット」と呼ばれ市販されている。さらにT細胞・B細胞機能欠如マウスもあり、それらは「SCIDマウス」として市販されている。最近ではリンパ節・パイエル板欠損マウスも市販されている。これらの動物は免疫能が極度に低下するので、ヒト癌細胞の移植やモノクローナル抗体の作製に利用されてきた。細胞のみならず組織も許容するので、組織の異種移植も行われるようになった。

顕微授精

広義の「顕微授精」の定義としてはいろいろな手法が含まれるが、ふつう「顕微授精」とは細胞質内精子注入法を指す。微小なガラス管（マイクロピペット）に精子を吸い込み、顕微操作で、成熟卵の細胞質に穿孔し、精子を注入することで授精を行い、受精卵を作出する方法である。ヒトでは、精子の運動性がないなど不妊治療の一環として行われている。

受精卵移植

借り腹（「レシピエント」とも呼ばれる）豚に、ホルモン製剤を投与することで性周期を同期化させて、受精卵を卵管に注入する。豚では外科手術により行う。2細胞期以降の胚についても、発生段階に応じて卵管や子宮に注入する胚移植が行われる。

公開サイト

2009年12月16日

(Reproduction HP)

http://www.reproduction-online.org/cgi/content/abstract/REP-09-0509v1?ijkey=ff98186c11b5d5093cb5824617ae0978b6d0dad0&keytype2=tf_ipsecsha

[Reproduction2月号に掲載されます 139: 331–335; DOI: 10.1530/REP-09-0509]

(PubMed)

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20015869?itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum&ordinalpos=1

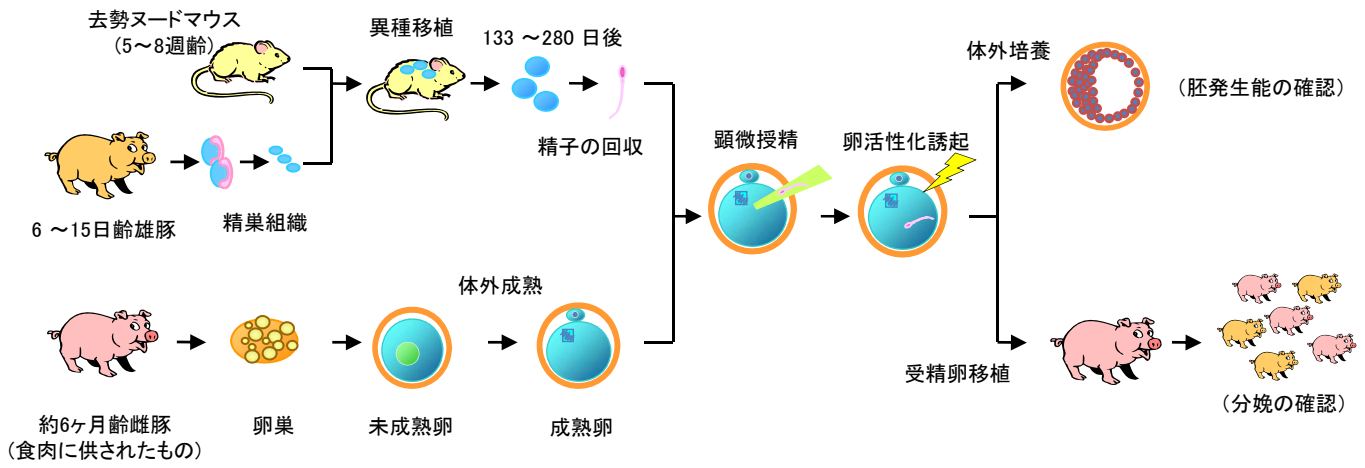


図1. 豚精巣組織の異種移植による精子作出～子豚の分娩

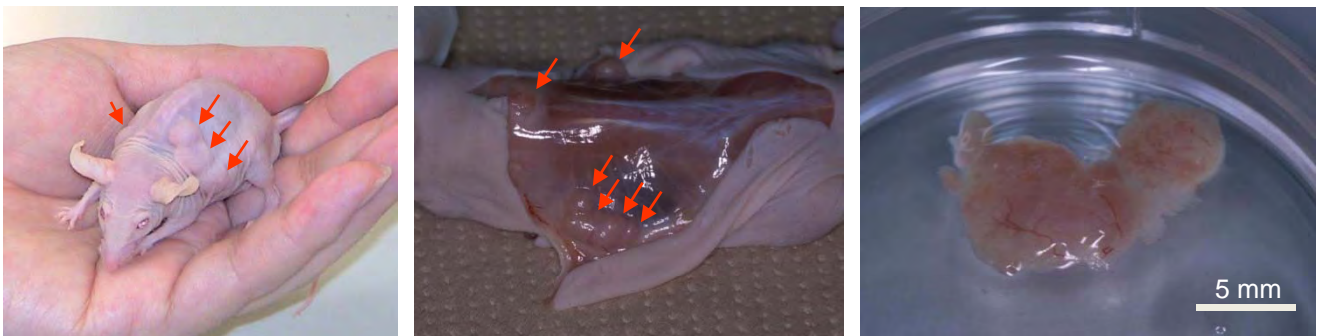


図2. 移植組織(矢印)の発育状況(移植後125日)

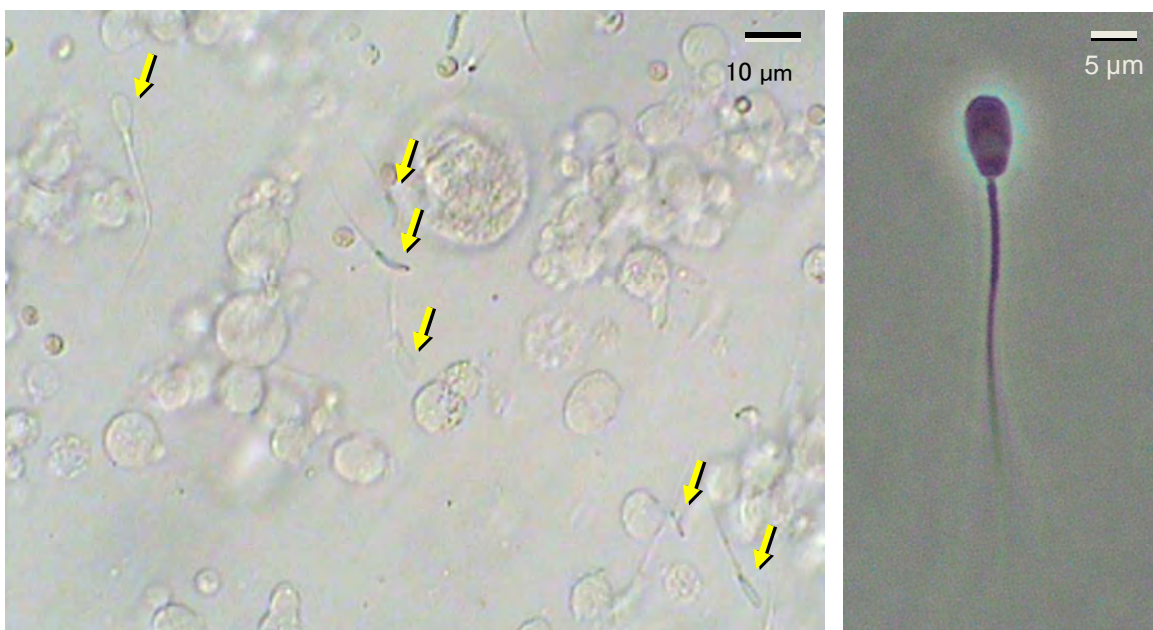


図3. 移植組織から細切して得られた精子(左)、その拡大図(右:代表例)
(ともに移植後125日)

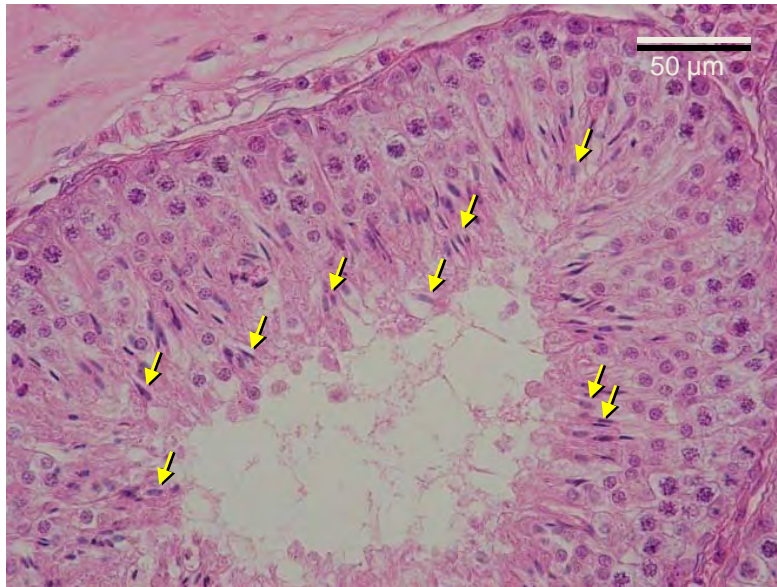


図4. 移植組織の精細管組織像(移植後118日、矢印:精子)

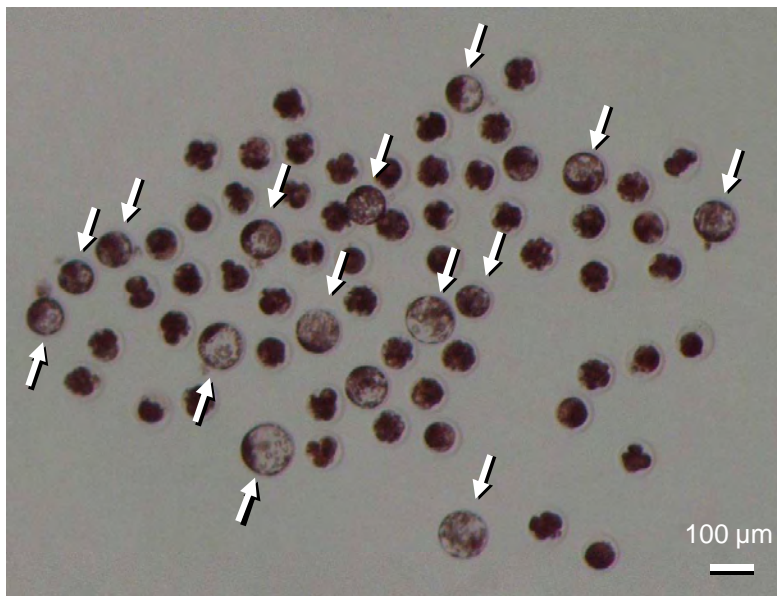


図5. 体外培養後の胚(顕微授精後6日、矢印:胚盤胞)



図6. 分娩した子豚(雌1頭、雄4頭、分娩後1日)

〈参考〉

第 12 回 麻布大学 生殖・発生工学セミナー 「ブタ遺伝資源保存の新展開」 2/13(土)開催

2月13日(土)に開催する、第12回 麻布大学 生殖・発生工学セミナー「ブタ遺伝資源保存の新展開」では、共同研究担当者である金子浩之氏(独立行政法人農業生物資源研究所 動物科学研究領域 生殖機構研究ユニット上級研究員)に御講演いただきます。本セミナーの開催告知及び取材につきましても、併せてお願い申し上げます。

〈ご挨拶〉

第 12 回 麻布大学 生殖・発生工学セミナー「ブタ遺伝資源保存の新展開」にあたって 柏崎 直巳・伊藤 潤哉 [麻布大学 獣医学部 動物繁殖学研究室]

ブタは、私達人類の豊かな生活を支えてくれる非常に重要な家畜で、最近ではヒト異種臓器移植用のドナーとしても注目を集めております。現在、ブタの生産農場へは決して数多くはないブリーダーから母豚と交配あるいは人工授精に用いる精液を採取するための雄豚が供給されております。また、生産規模の拡大と熾烈な生産性の競合のため、ブタの生産農場はその数を減少させております。このような背景から、ブタのブリーダーにおいてはその遺伝資源枯渇が問題となっており、遺伝資源を効率的に保全するシステムの確立が要望されております。そこで、本年度のこのセミナーでは、この問題に着目し、遺伝資源保存に関連した精子、卵・初期胚および生殖腺の異種移植の保存と保存細胞からの個体復元に関連した最新の研究者をお招きすることといたしました。

講演 I として、この精子・受精に関連した分野の第一人者である島田昌之先生(広島大学)に「豚凍結精子を用いた人工授精の実用化に向けて -凍結, 融解, 人工授精条件の最適化-」をご講演していただきます。通常、ブタの凍結融解精液の人工授精では、その受胎成績、とくに産子数が液状保存精液の人工授精のものと比較して減少することが知られております。しかし、島田先生の研究グループは、この問題を克服するために様々なユニークで素晴らしい研究を進め、その改善法をここでご提示していただけると期待しております。

講演 II としては、ブタ卵もしくは受精卵を solid surface vitrification 法によって超低温保存する研究を展開し、超低温保存した受精卵からブタを誕生させた新進気鋭の若手研究者でハンガリー出身のタマス・ソムファイ先生(畜産草地研究所)に「Cryopreservation of porcine oocytes and zygotes by solid surface vitrification」をお願いしております。この研究は麻布大学の動物繁殖学研究室との共同研究で、本学の豚舎でこれらのブタが誕生しており、Biology of Reproduction の表紙およびカレンダーにこの子ブタ達がカバーされました。

講演 III としては、この分野の研究では世界をリードする金子浩之先生(農業生物資源研究所)に、「異種間移植によるブタ性腺の発育と配偶子の発生能」をご講演していただきます。この研究では、ブタの生殖巣(性腺)をヌードマウスへ異種移植し、そこで形成された配偶子の受精能力や発生能力を綿密に調べられており、このマウスで形成された精子からも子ブタ達が誕生しております。この子ブタも、本学の豚舎で誕生しております。

いずれの講演も、皆様にとって、たいへん興味深いものであると思います。今後とも、益々のご指導、ご鞭撻を賜りますよう、よろしくお願い申し上げます。

第12回 麻布大学 生殖・発生工学セミナー

「ブタ遺伝資源保存の新展開」

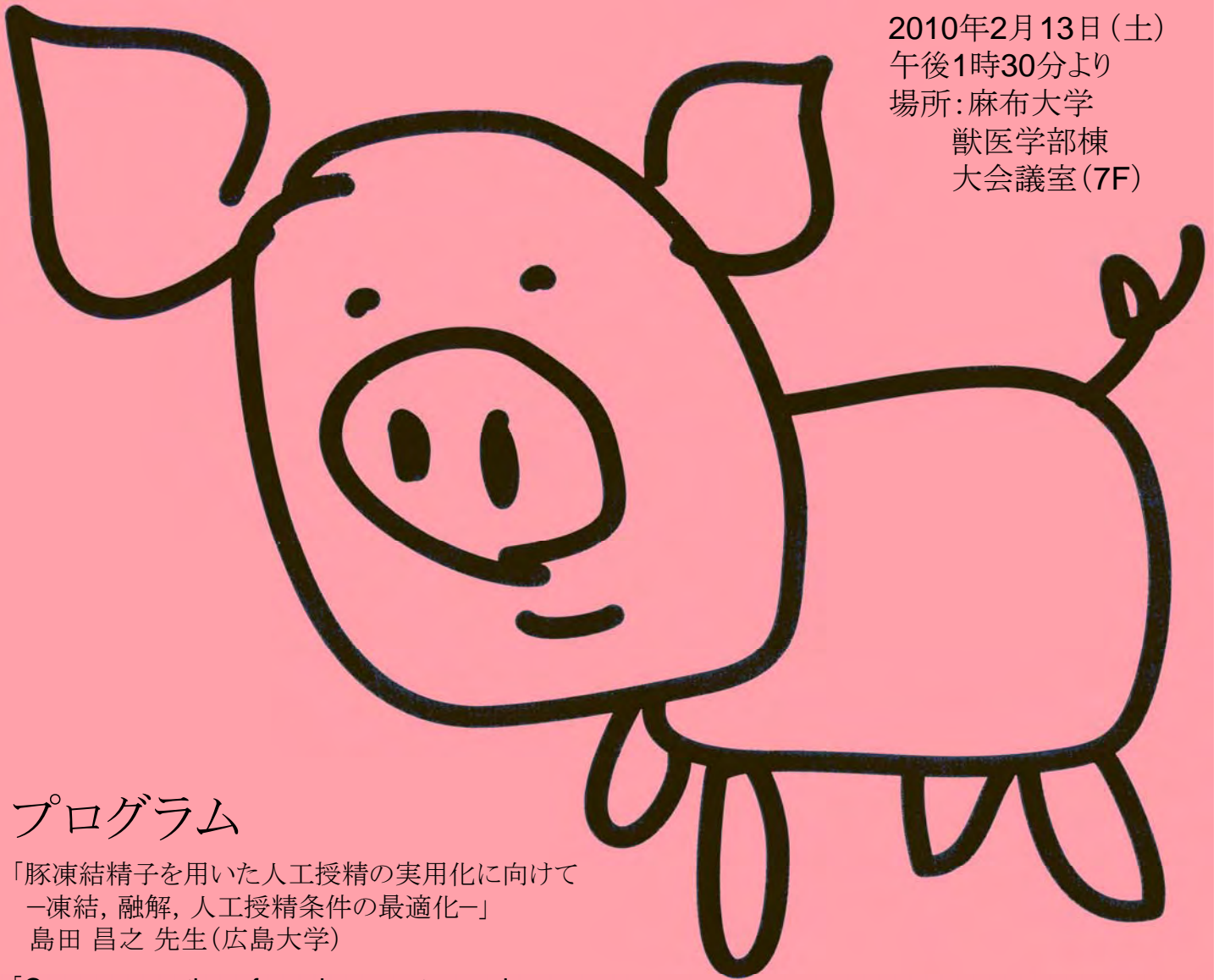
2010年2月13日(土)

午後1時30分より

場所:麻布大学

獣医学部棟

大会議室(7F)



プログラム

「豚凍結精子を用いた人工授精の実用化に向けて
ー凍結, 融解, 人工授精条件の最適化ー」
島田 昌之 先生(広島大学)

「Cryopreservation of porcine oocytes and
zygotes by solid surface vitrification」
Tamas Somfai 先生(畜草研)

「異種間移植によるブタ性腺の発育と配偶子の発生能」
金子 浩之 先生(農業生物資源研)

総合討論
(懇親会も準備しております: 7Fラウンジ)

連絡先: 麻布大学 獣医学部
動物繁殖学研究室
柏崎 直巳・伊藤 潤哉

E-mail: nkashi@azabu-u.ac.jp

Tel: 042-769-2339 Fax: 042-769-1762

アクセス: <http://www.azabu-u.ac.jp/other/access.html>