

カニクイザル胎仔大脳神経細胞の初代培養系の確立

分担研究者 黒田 洋一郎 (東京都神経科学総合研究所・神経生化学研究部門)

河村 晴次 (東京大学大学院・農学生命科学研究科)

協力研究者 根岸 隆之・吉川泰弘 (東京大学大学院・農学生命科学研究科)

中村 紳一郎 (日本獣医畜産大学)

開地 泰介 (東京都神経科学総合研究所・神経生化学研究部門)

研究要旨

胎齢80日カニクイザル胎仔の大脳組織を凍結保存した後、初代培養を行い培養下の神経細胞およびグリア細胞を経時的に観察した結果、培養容器に接着後、円形の細胞体に数本の突起を伸長させる神経細胞と平坦で増殖性に富むグリア細胞が確認された。また細胞を高密度に培養することによって培養14日目に細胞間で同調した「細胞内カルシウム濃度の自発的かつ周期的変化 (Ca²⁺シンクロナスオシレーション)」を確認した。これは霊長類由来初代培養下で神経細胞が細胞間ネットワークを形成したことを示唆する。凍結保存の影響を調べるために非凍結材料由来の初代培養と比較したが顕著な差は認められなかった。

A. 研究目的

繁殖、飼育に特殊な技術を要する霊長類由来の胎仔は稀少性の高い研究材料であり、新鮮な大脳組織を頻繁に入手することは非常に困難である。従ってカニクイザル胎仔大脳神経細胞初代培養を安定して作出、供給するには脳組織を液体窒素中で長期凍結保存し、必要に応じて初代培養を行える技術を開発することが有効である。これまでにラット胎仔を用いた凍結保存技術の確立、カニクイザル胎仔大脳神経細胞初代培養の材料としての最適胎齢、初代培養の条件等を決定した。これらの結果をふまえて胎齢80日胎仔凍結大脳由来の神経細胞初代培養において、免疫細胞化学的観察、経時的形態観察、

さらに新鮮材料由来初代培養との比較により凍結保存の影響を検討した。次に凍結組織由来細胞の高密度培養下でCa²⁺シンクロナスオシレーションを観察した。

B. 研究方法

帝王切開により得られた胎齢80日カニクイザル胎仔から大脳組織を無菌的に採材し、細切後DMSO10%含有培養液中で緩徐凍結し、液体窒素中で3ヶ月以上保存した。解凍後、酵素処理により細胞を分散させ初代培養を行った。形態観察は位相差顕微鏡を用いた。神経細胞に特異的であるMAP-2に対する抗体を用いて免疫染色を行い神経細胞を同定した。高密度培養下の

細胞にカルシウム蛍光指示薬(Fura-2)を取り込ませた後、蛍光顕微鏡および細胞内カルシウム濃度画像解析システム (ARGUS-50/CA、浜松ホトニクス) を用いてCa²⁺シンクロナスオシレーションを観察した。

C. 研究結果

初代培養下において、脳細胞は類円形の細胞体に数本の突起を有すMAP-2陽性細胞と平坦で増殖性が見られるMAP-2陰性細胞に大別された(図1)。前者は神経細胞で後者はグリア細胞と考えられる。今回の検索ではグリア細胞の種類の特定にまではいたらなかった。MAP-2陽性である神経細胞は培養3日目には突起を伸長し(図2A)、7日目には非常に複雑な突起網を形成し(図2B)、培養14日目にはグリア細胞とともに成熟した形態を示した(図2C)。培養90日目においても神経細胞は生存していた(図2D)。MAP-2陰性であるグリア細胞は培養日数につれその数を増し培養14日目(図2C)には培養面に単層を形成し90日には全面を占めていた(図2D)。これらの変化は以前報告したラット由来の初代培養とほぼ同様であった。高密度培養14日目にはCa²⁺シンクロナスオシレーションが観察された。新鮮材料由来、凍結保存由来の初代培養下神経細胞については形態レベルでは差は見られなかった(図2E)。

D. 考察

霊長類由来の神経細胞初代培養も形態的にはラット等齧歯類由来のそれと同様な振る舞いが見られたことから、神経細胞に対する毒性の定性的、定量的評価なくシナプスを介した神経細胞間ネットワーク形成能への影響も評価できる。また、新鮮材料由来の初代培養と形態的に差が見られなかったことは凍結保存という技術の有

効性を示唆している。

E. 結論

凍結保存したカニクイザル胎仔由来神経細胞の初代培養系を確立した。これを用いることにより、*in vitro*での神経細胞もしくは神経細胞間ネットワーク形成への影響を評価することが可能となった。

F. 研究発表

1. 論文発表

根岸 隆之、河村 晴次、吉川 泰弘、黒田洋一郎(1999)：サル神経細胞培養、BRAIN MEDICAL、11、266-273

2. 学会発表

根岸 隆之、木村 展之、河村 晴次、吉川 泰弘、黒田 洋一郎：凍結保存が初代培養下大脳皮質神経細胞に与える影響、日本実験動物学会、2000、徳島

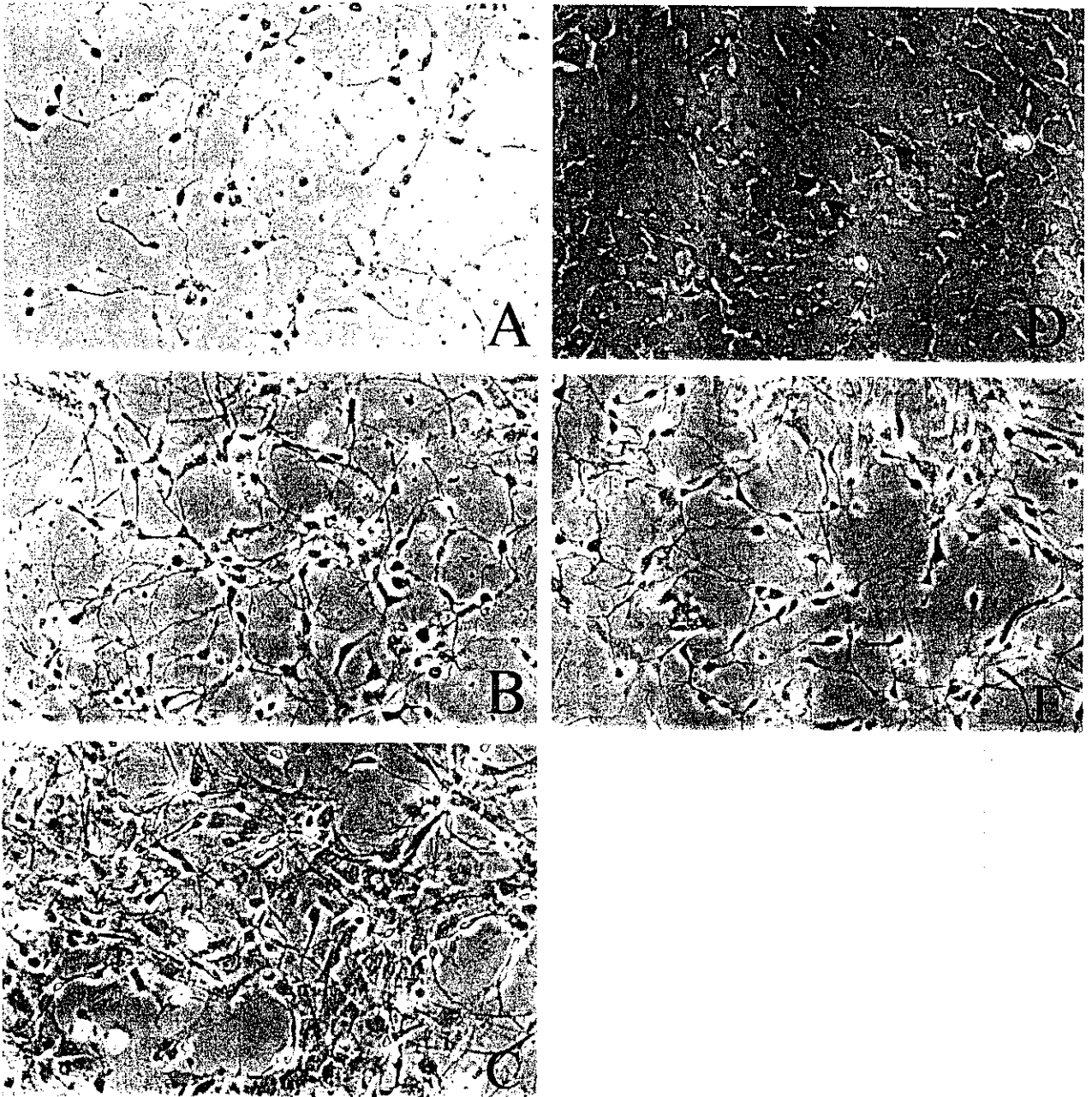


図2 80日齡胎仔由来初代培養の位相差顕微鏡による観察。
 凍結材料由来培養3日目(A)、7日目(B)、14日目(C)、90日目、矢印：神経細胞(D)。
 新鮮材料由来培養7日目(E)。

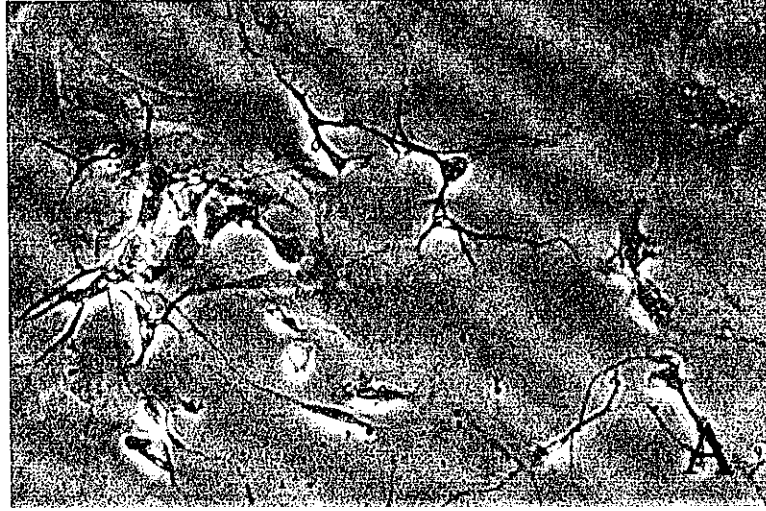


図 1. 抗MAP-2抗体を用いた免疫染色、培養10日目。位相差顕微鏡(A)、免疫染色(B)。

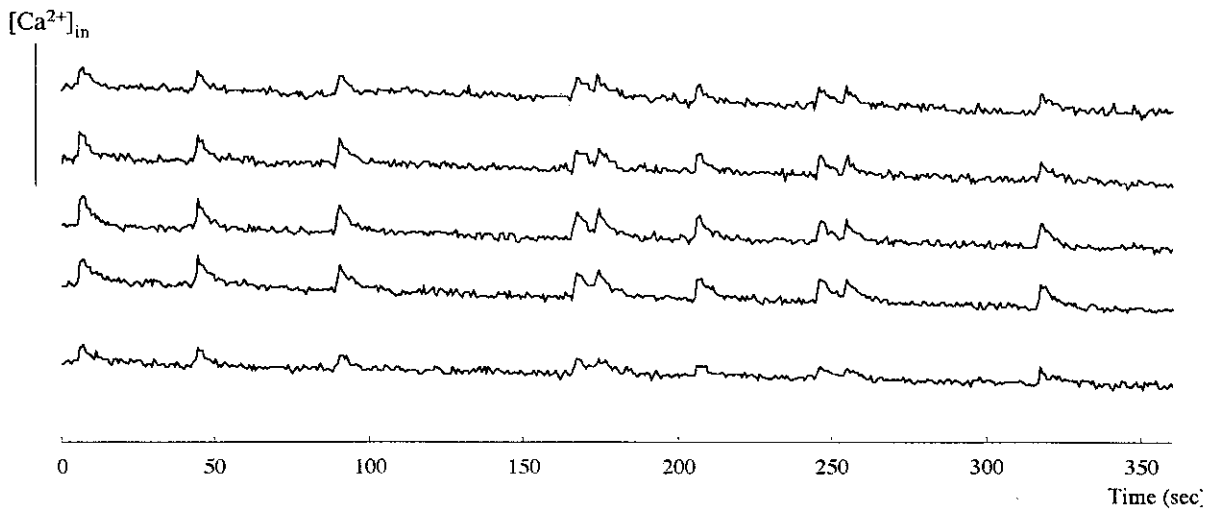


図 3. シンクロナスオシレーションの観察。80日齢凍結材料由来初代培養14日目。
無作為に選択した5個の細胞の細胞内カルシウム濃度の経時的変化。

分担研究報告書

カニクイザルの神経変性性疾患 -比較生物学的解析-

分担研究者 中山裕之（東京大学大学院農学生命科学研究科）

研究要旨

各種動物の老人斑の構造について、その特性をフラクタル解析法を用いて形態学的に解析した。即ち老人斑のフラクタル次元(FD)を求め、カニクイザルの老人斑の系統的位置付けを行った。動物種によって老人斑のFDが異なっていたが、カニクイザルのFDはヒトのFDと値が近かった。またヒトの代表的神経変性疾患の一つである進行性核上麻痺と診断された老齢カニクイザルに遭遇したので、詳細な病理観察を行った。以上のことからカニクイザルがヒト神経変性疾患のモデルとなりうる可能性が示された。

A. 研究目的

遺伝子治療法の有効性評価を行うには疾患モデル動物の開発が必須である。老齢サル類はヒトの神経変性疾患の優れたモデルになると期待されるが、ヒト以外の動物における自然発症性神経変性疾患の報告はまったくない。そこで本研究では疾患モデル開発にむけての基礎的研究として、老齢カニクイザルの自然発症性神経変性病変をしらべた。行った研究は以下の2つである。

1) 動物の老人斑のフラクタル解析：老人斑はヒトのアルツハイマー病などの神経変性疾患で観察される組織病変で、アミロイド β タンパク質(A β)の沈着により生じる。サル類をはじめいくつかの動物種で観察されるが、いずれもアルツハイマー病は発症しない。一方、フラクタル次元(FD)とは図形の複雑さや込み入り具合の程度を示す数値である。本研究では各種動物の老人斑についてフラクタル次元を求め、カニクイザルの老人斑の系統的位置付けを行った。

2) 進行性核上麻痺の老齢カニクイザルの一例：ヒトの代表的神経変性疾患の一つである進行性核上麻痺と診断された老齢カニクイザルに遭遇したので、詳細な病理観察を行った。

B. 材料・方法

1) 動物の老人斑のフラクタル解析：

イヌ7例（11～17歳）、カニクイザル1例（26歳）、アメリカクロクマ1例（20歳以上）、ネコ1例（20歳）、フタコブラクダ1例（23歳以上）、ヒト1例（72歳）の脳組織からPAM染色標本を作製した。老人斑をコンピューターに読み込み、ソフトウェア(Fractal Dimension Calculator)でFDを計算した。有意差の検定にはKruskal-Wallisの順位検定を用いた。

2) 進行性核上麻痺と考えられた老齢カニクイザルの一例：

タイ国バンコク市で飼育されていた老齢（35歳以上）のアルビノカニクイザルが歩行異常、上半身の不随意振戦、嗜眠、元気消失などの症状を約1年半にわたって示した後、斃死した。死因は心不全で、主たる肉眼病変として右耳内の基底扁平上皮癌が確認された。脳に肉眼的な異常はみられなかった。

C. 結果

1) 動物の老人斑のフラクタル解析：

イヌの瀰漫型老人斑(DP)のFDは 1.656 ± 0.046 、成熟型老人斑(MP)のFDは1.721

±0.048 で有意な差があった。老人斑のサイズを X 軸、FD を Y 軸にプロットしたところ、いずれの老人斑もサイズと FD 値が正の相関を示した(DP: $r^2=0.4929$, MP: $r^2=0.8015$)。瀰漫型と成熟型老人斑の近似線の傾きは DP($y=0.0174x+1.5918$)と MP($y=0.0099x+1.6622$)で著しく異なっていた。ヒトでも DP(1.632 ± 0.041)と MP(1.669 ± 0.030)で有意差がみられた。クマとサルでは、有意ではなかったが MP が DP より高い傾向があった。DP の FD を動物種で比べたところ、ネコ(1.468 ± 0.051)がイヌ(1.656 ± 0.046)、クマ(1.696 ± 0.049)、サル(1.664 ± 0.040)、ラクダ(1.666 ± 0.025)より有意に低値であった。サルとヒトを比較したところ、DP、MP とともに FD に有意の差はみられなかった。

2) 進行性核上麻痺と考えられた老齡カニクイザルの一例

組織検査の結果、多数の Gallyas-Braak (GB)法陽性 glial fibrillary tangle (GFT)が被殻、尾状核、視床核、黒質、赤核、淡蒼球、台形体、錐体、橋、延髄に、また、少数の neurofibrillary tangle (NFT)が視床核の一部に観察された。これらの構造はいずれも tau 陽性であった。大脳皮質と海馬には多数の老人斑がみとめられた。ヒトで観察される GFT は形態的に3つに分類される。すなわち、1) tafts of abnormal fibers (TAF)、2) glial coiled bodies (GCB)、3) argyrophilic threads (AT)である。本例では、このうち TAF と GCB がとくに多く観察され、AT も少数認められた。また、一部の GFT は α -synuclein にも陽性であった。このような構造を有するグリア細胞は GFAP 陰性で、稀突起グリアと考えられた。これに加えて、顕著な神経細胞の消失と ubiquitin 陽性の spheroid body が黒質と淡蒼球に認められた。

D. 考察

1) 動物の老人斑のフラクタル解析：

イヌでは DP と MP は成長の過程が異なることが明らかになった。このことは両型の老人斑が全く別の発生機序によって形成されることを示している。また、動物種によって老人斑の FD が異なっていたことは、老人斑形成における初期条件、脳組織の環境などが異なるためと考えられた。

2) 進行性核上麻痺と考えられた老齡カニクイザルの一例：

動物における神経変性疾患の報告はこれまで全くなく、本例が最初と思われる。神経細胞とグリア細胞にみられた嗜銀性構造の特徴的な分布を考慮すると、本例はヒトの進行性核上麻痺(PSP)に相当する病態と考えられた。

E. 結論

カニクイザルでもヒトに類似した老人斑がみとめられ、さらにこれまで報告がなかった神経変性疾患がみつかった。これらのことはカニクイザルがヒト神経変性疾患のモデルになる可能性を示している。

F. 研究発表

論文発表

Kiatipattanasakul, W., Nakayama, H., Yongsiri, S., Chotiapisitkul, S., Nakamura, S., Kojima, H. and Doi, K. Abnormal neuronal and glial argyrophilic fibrillary structures in the brain of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Acta Neuropathol.* (in press)

学会発表

中山裕之、ウィジット・キアティパタナサクル、中村紳一郎、宮脇京子、菊田文夫、内田和幸、黒木宏二、吉川泰弘、土井邦雄 動物の老人斑のフラクタル解析 第128回日本獣医学会(つくば) 2000年4月

中山裕之、ウィジット・キアティパタ

ナサクル、中村紳一郎、小島英明、土井
邦雄 進行性核上麻痺と考えられた老齡

カニクイザルの一例 第41回日本神経
病理学会（米子）2000年6月

分担研究報告書

サル類の生殖生理学的基礎研究と発生工学的基盤技術の開発

分担研究者 山海 直 国立感染症研究所・筑波医学実験用霊長類センター主任研究官

研究要旨 サル類の疾患モデル動物の開発、疾患モデル動物の胚や配偶子の保存方法の開発、さらに遺伝子治療法の生殖細胞を用いた評価システムの開発を目的として、発生工学的基盤技術の開発研究を進めてきた。本年度は5項目について検討し、以下の結果を得た。1) これまでに得られた基礎データをもとに、カニクイザルの体外受精、胚移植を試み、健康な産児を得ることができた。2) カニクイザルの子宮内への金属ゾンドの挿入技術を向上し、本法を応用した人工授精により産児を得ることができた。3) カニクイザルの卵胞発育誘起のためにhMGを連続投与しhMG最終投与の翌日にhCGを投与、そしてhCGを投与後43時間目に卵採取を行うことで良質な卵を回収することができた。4) カニクイザルの排卵時期の血中ステロイドホルモン濃度とその動態について詳細な解析を試みた。E2濃度の動態を知ることで排卵日を推察することが可能であるが、E2に加えてプロゲステロン濃度を測定することで卵巣の状態を正確に把握することができた。その結果、排卵したにもかかわらず何らかの異常が示唆される個体が存在することが判明した。5) 妊娠カニクイザルの膣インピーダンス値と血中プロゲステロン濃度の動態の関係を縦断的に検索した。膣インピーダンス値は月経周期のなかではプロゲステロン濃度の動態に同調するが、妊娠期間中のプロゲステロン濃度の動態に一致するものではないということが示された。

A. 研究目的

本プロジェクトでは、サル類遺伝子、細胞などの研究資源の保存、遺伝子疾患モデル動物などの開発に関する有効な手段を確立すること、さらに遺伝子治療法の生殖細胞を用いた評価システムの開発を目指している。これらの目的を達成するためにはサル類の生殖生理を熟知し、発生工学的手法を用いた基盤技術の開発が必須の条件である。サル類生殖細胞の生理学的研究を進めるとともに、*in vitro*での生殖細胞の操作技術を確立することが現在の目標である。

本年度は、5つの項目について検討したが、各項目の目的は以下のとおりである。

1) カニクイザルにおける体外受精-胚移植による産児の作出

わが国では、カニクイザルの胚移植の成功例はない。国立感染症研究所・筑波医学実験用霊長類センターではすでにカニクイザルの体外受精に成功し、発育培養でhatched blastocystまで発生させることに成功している。この受精卵から個体を得ることは、本研究課題を遂行するために必須の技術である。ここでは、これまでに開発してきた受精卵作出技術、レシピエントザルの選択技術を応用して胚移植により妊娠例を得ること、さらに産児を得ることを目的とした。

2) カニクイザルの子宮内へのゾンドの挿入と人工授精による産児の作出

カニクイザルの子宮頸管は複雑な構造であり、またサイズが小さいためにゾンドの挿入が困難である。しかし、子宮内への人工授精や胚移植を施行するためにはゾンドを挿入する技術を開発しなければならない。今回、金属ゾンドの子宮内挿入を試み、さらに人工授精を行った。

3) hMG-hCGによるカニクイザルの卵胞発育誘起

当センターでは、カニクイザルの卵胞を人為的に発育させるための投与ホルモンとしてeCGを多く用いてきた。近年、アカゲザルの卵胞発育のためにhMGを用いて良好な卵が得られることが報告されている。本研究では、hMGがカニクイザルの卵胞発育のために有効か否かについて検討した。

4) カニクイザルの排卵時期における血中ステロイドホルモン濃度の解析

当センターでは、カニクイザルの血中FSHの動態、すなわちFSHサージを知ることで排卵日が推定できることを確認している。また、血中E2が上昇したのちの急激な低下は排卵を反映していることを卵巣の直接観察実験により確認している。排卵日を的確に推定する技術は、胚移植のためのレシピエント個体の選択、人工授精の施行時期の決

定のためにきわめて有効である。今回、この排卵日の推定をより確実に行う技術を確立することを目的として、カニクイザルの排卵時期の血中ステロイドホルモン濃度とその動態についての詳細な解析を試みた。

5) 妊娠カニクイザルの縦断調査による膣インピーダンス値と血中ステロイドホルモン濃度の動態の解析

カニクイザルにおける膣インピーダンスの変化は月経周期にともなう血中プロゲステロン濃度と関係あること、また、妊娠個体の横断調査の結果から妊娠期間中の膣インピーダンスの変化は必ずしも関係が見いだせないことをすでに報告している。今回、これらのことを明確にするため妊娠前から妊娠中、そして分娩に至るまでの縦断的な検索を試みた。

B. 研究方法

1) カニクイザルにおける体外受精-胚移植による産児の作出

体外受精の基本的方法は既報にしたがったが、今回、卵胞発育誘起にhMGを用い、卵胞卵はhCG投与後43時間経過したのちに採取するという新しい方法を採用した。また、体外受精で得られた卵はCMRL-1066の培養液でBRL cellと共培養した。4-cellのときに3個をレシピエントの卵管内に移植した。レシピエントは、EIA法によりE2値を測定し、体外受精施行日の翌日にピークを示した個体を選択した。

2) カニクイザルの子宮内へのゾンドの挿入と人工授精による産児の作出

マウス用経口ゾンドを用いてカニクイザル子宮内への挿入を試みた。まず直腸に人差し指を挿入し膣内に差し込んだゾンドを感知しながら子宮頸管口へ誘導した。保定したカニクイザルを真っ直ぐに保ち、ゾンドを上下にずらしながら頸管口を探すのがコツである。また、EIA法による迅速なE2値の測定を行いE2値がピークであること、すなわち翌日にはE2値が低下することを予測し、人工授精を試みた。人工授精は、直腸電気刺激法により採取した精液を注入した。注入場所は、膣内あるいは子宮内とし、注入量、注入精子の性状を記録した。

3) hMG-hCGによるカニクイザルの卵胞発育誘起

いくつかの投与スケジュールで施行錯誤を繰り返しながらhMG-hCGによる卵胞発育誘起を試み

た。最終的に固定した方法は次のとおりである。月経周期の第3日から8日のあいだにhMGを12回投与（1日に午前と午後の2回投与）し、最終投与の翌日にhCGを投与した。hCG投与後43時間目に開腹手術により卵胞卵を採取した。得られた卵は体外受精実験に用いて卵の性状を評価した。

4) カニクイザルの排卵時期における血中ステロイドホルモン濃度の解析

年齢（10-18歳）、月経出血期間（2-10日）、月経周期、経産歴などが明らかな成熟カニクイザル37頭を実験に供した。排卵時期に採血を行い、RIA法あるいはEIA法により血中ステロイドホルモン濃度を測定した。得られたホルモン測定値をもとに様々な観点から解析を試みた。

5) 妊娠カニクイザルの縦断調査による膣インピーダンス値と血中ステロイドホルモン濃度の動態の解析

規則的な月経周期を確認した4頭のメスカニクイザルにおいて交配時から分娩に至るまでの期間の膣インピーダンス値と血中ステロイドホルモン濃度の動態を測定した。

C. 研究成果

1) カニクイザルにおける体外受精-胚移植による産児の作出

本実験で用いたドナー個体の卵巣には29個の卵胞が発育し15個の卵胞卵が採取された。形態的に正常な11個で体外受精を試み10個の受精卵を得た。これらの受精卵はすべて分割を開始した。体外受精を行ってから2日後に受精卵は4-cellに発育し、そのうち3個を卵管内に移植した。4週目に超音波診断装置を用いて観察した結果、長径5mmの胎児の頭部が確認された。その後、胎児は正常に発育をつづけ、体外受精施行日から159日目に帝王切開により胎児を摘出した。産児は人工保育により育てられ現在も健康に成長している。

2) カニクイザルの子宮内へのゾンドの挿入と人工授精による産児の作出

ほとんどの個体においてマウス用経口ゾンドをカニクイザルの子宮内に挿入することができた。しかし、かなりの時間を要する個体や挿入できなかった個体もあった。人工授精では、E2値のピークが的確に予測できその日に精液を注入した18頭のうち1頭が妊娠した。胎児は正常に発育をつづけ、その後、健康な産児を得ることができた。

3) hMG-hCGによるカニクイザルの卵胞発育誘起

実験を8回行った結果、245個（1個体あたり30.6±18.3個）の発育卵胞を認め、122個（15.3±10.0個）の卵胞卵を採取した。そのうち59個（7.4±4.8）が形態的に正常な成熟卵であり体外受精を行って30個（3.8±3.6個）の受精卵を得た。受精率は50.8%であり、得られた受精卵は発育培養により29個が分割を開始した。

4) カニクイザルの排卵時期における血中ステロイドホルモン濃度の解析

E2値が100pg/ml以上のピーク値を示し、その翌日の測定値が50pg/ml以上低下した日を排卵日と推定した。月経出血を認めた日を第1日として数えて、それぞれ9、10、11、12、13および14日目に排卵と推定された個体は、1（2.7%）、5（13.5%）、7（18.9%）、12（32.4%）、10（27.0%）および2頭（5.4%）であった。また、多くの個体で排卵後のプロゲステロンの上昇を認めたが、E2値が低下する1あるいは2日前にすでにプロゲステロン値が上昇していた個体も認めた。E2値の変動が顕著であるにもかかわらずプロゲステロン値の上昇が認められない個体も存在した。

5) 妊娠カニクイザルの縦断調査による膣インピーダンス値と血中ステロイドホルモン濃度の動態の解析

妊娠中の膣インピーダンス値の変化は、血中プロゲステロン濃度の動態とは同調することなく推移し、妊娠の初期から中期にかけては常に高い値を示した。血中プロゲステロン濃度は妊娠後期においても高値を維持し分娩の直前に急激な低下を認めたが、膣インピーダンス値は妊娠後期に徐々に低下した。

D. 考 察

1) カニクイザルにおける体外受精-胚移植による産児の作出

カニクイザルの体外受精、胚移植に成功したことは非常に大きな成果であると考えている。本実験に用いた卵は明らかに質的に良好であり、また、レシピエント個体の選択が的確であったといえる。本プロジェクトを遂行するにあたり、必須の課題であった生殖細胞の採取から受精卵の作出、そして胚移植により産児を得るまでの一連の実験に成功したことになるが、この技術を安定したものにすることが今後の課題である。

2) カニクイザルの子宮内へのゾンドの挿入と人工授精による産児の作出

今回、マウス用経口ゾンデを用いてカニクイザル子宮内への挿入が可能になった。しかし、施術者が熟練することが条件となっており、個体によっては挿入できない場合があったり、また、やや大きめのラット用経口ゾンデの挿入はできていない。今後、さらに技術を向上する必要がある。本技術とE2値測定による排卵日の推定技術を組み合わせた子宮内人工授精で産児を得た成果の意味は大きい。また、ゾンデ内にチューブを挿入していくことで子宮内への胚移植なども可能になるものと考えている。これまでもゾンデの子宮内挿入を応用した実験成果は報告されていたが、供試個体を傷つけることなくより確実に挿入する技術を確立することでその応用範囲は広がるものと思われる。

3) hMG-hCGによるカニクイザルの卵胞発育誘起

個体によりバラツキを認めたが、比較的安定して良質な卵が得られたと考えている。採取する卵の質はその卵を用いた実験の成績に大きく影響するため決して軽視できない検討課題である。今回、hCG投与後43時間目に卵採取を試みているが、その時間が卵の成熟の度合いに関係していることは明らかである。より良質な卵をより多く採取するための方法を確立するための大きな足がかりができたと考えている。

4) カニクイザルの排卵時期における血中ステロイドホルモン濃度の解析

今回、37頭のカニクイザルで解析し、その多くが正常なホルモン動態を示した。しかし、何らかの異常が考えられる個体も存在していた。E2濃度の動態を知ることで排卵日を推察することが可能であるが、プロゲステロン濃度の測定により卵巣の状態を正確に把握することができる。ホルモン測定は排卵日の推定に有効であり、胚移植、人工授精などに応用することは可能である。しかし、排卵したにもかかわらず黄体形成過程で何らかの問題が考えられる個体が存在することは考慮している必要がある。

5) 妊娠カニクイザルの縦断調査による膣インピーダンス値と血中ステロイドホルモン濃度の動態の解析

カニクイザルの膣インピーダンス値はプロゲステロンの作用が直接影響するものではなく、とくに妊娠という複雑なメカニズムのなかでは複数の要因が関与しているものと考えられた。

E. 結論

1) カニクイザルにおける体外受精-胚移植による産児の作出

体外受精により得られた受精卵の胚移植により産児を得ることができた。この一連の技術を再現性のある安定したもののが今後の大きな課題である。

2) カニクイザルの子宮内へのゾンドの挿入と人工授精による産児の作出

カニクイザル子宮内へのゾンドの挿入技術を向上し、その技術を応用した人工授精により産児を得ることができた。

3) hMG-hCGによるカニクイザルの卵胞発育誘起

hMG-hCGにより卵胞を発育させることができ、その卵胞から良質な卵が回収された。さらに技術を向上する必要があるが、卵を用いた研究に大きく貢献するものである。

4) カニクイザルの排卵時期における血中ステロイドホルモン濃度の解析

E2濃度の動態を知ることで排卵日を推察することが可能であることが確認され、またプロゲステロン濃度の測定により卵巢の状態を正確に把握することができた。

5) 妊娠カニクイザルの縦断調査による臏インピーダンス値と血中ステロイドホルモン濃度の動態の解析

カニクイザルの臏インピーダンス値は月経周期のなかではプロゲステロン濃度の動態に同調するが、妊娠期間中のプロゲステロン濃度の動態に一致するものではないということが示された。

F. 研究発表

1. 誌上発表

- 1) T. Endo, K. Kanayama, T. Sankai. Rabbit fetuses implanted and developed in the greater omentum. J. Mamm. Ova Res. 16, 50-52, 1999
- 2) J. H. Liang, T. Sankai, T. Yoshida, F. Cho, Y. Yoshikawa. Localization of immunoreactive testosterone and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4 isomerase in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) testes during postnatal development. J. Med. Primatol. 28, 62-66, 1999
- 3) M. Matsumuro, T. Sankai, F. Cho, Y. Yoshikawa, T. Yoshida. A two-step

extraction method to measure fecal steroid hormones in female cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). Am. J. Primatol. 48, 291-298, 1999

- 4) 山海 直. サル類生殖細胞の体外操作基盤技術の開発. Science & Technonews Tsukuba, 50, 43-45, 1999
 - 5) T. Sankai. *In vitro* manipulation of nonhuman primate gamete for embryo production and embryo transfer. Exp. Anim. (in press)
 - 6) 山海 直. 未成熟卵子、排卵卵子、受精卵の採取法: サル, 卵子の体外培養法, 生殖工学のための講座「卵子研究法」鈴木秋悦、佐藤英明編集, 養賢堂 (印刷中)
 - 7) 山海 直. 卵子の体外成熟・体外受精・体外培養法: サル, 卵子の体外培養法, 生殖工学のための講座「卵子研究法」鈴木秋悦、佐藤英明編集, 養賢堂 (印刷中)
 - 8) A. Okada, H. Igarashi, M. Kuroda, T. Sankai, K. Terao, Y. Yoshikawa. Cryopreservation-induced acrosome vesiculation in live sperm from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). (submitted)
 - 9) J. H. Liang, T. Sankai, T. Yoshida, Y. Yoshikawa. Immunolocalization of proliferation cell nuclear antigen (PCNA) in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) testes during postnatal development. (submitted)
 - 10) S. Miyamoto, Y. Chen, H. Kurotori, T. Sankai, T. Yoshida. Monitoring the reproductive status of gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*) by measuring steroid hormones in fecal samples. (submitted)
 - 11) J. H. Liang, T. Sankai, T. Yoshida, Y. Yoshikawa. Comparison of the effects of two fixatives for immunolocalization of testosterone in the testes of the cynomolgus monkey, mouse, and rat. (submitted)
 - 12) T. Sankai, H. Tsuchiya, N. Ogonuki. Short-term nonfrozen storage of mouse epididymal spermatozoa. (submitted)
2. 学会発表
- 1) 山海 直, 土屋英明, 吉田高志. eCG投与回数,

- hCG投与時期が未性成熟カニクイザルの卵胞発育および回収卵の質に及ぼす影響. 第46回日本実験動物学会(市川市)1999年5月
- 2) 越後貫成美, 山海直, 八神健一, 小倉淳郎. マウスおよびカニクイザル雄性生殖細胞に由来する卵子活性化因子の発現と受精卵におけるその動態の解析. 第46回日本実験動物学会(市川市)1999年5月
- 3) 土屋英明, 吉田高志, 小野孝浩, 鈴木通弘, 長文昭, 山海直. 妊娠カニクイザルにおける膈インピーダンスの変化. 第46回日本実験動物学会(市川市)1999年5月
- 4) 川崎勝義, 山海直, 寺尾恵治, 小山高正, 吉川泰弘. カニクイザル及びラットの行動解析におけるデジタル動画像処理応用の試み. 第59回日本動物心理学会(金沢)1999年5月
- 5) 土田順子, 川崎勝義, 久保南海子, 山海直, 寺尾恵治, 小山高正, 吉川泰弘, 牧野順四郎, 小嶋祥三. 老齢カニクイザルにおける図形弁別学習. 第59回日本動物心理学会(金沢)1999年5月
- 6) 川崎勝義, 池口邦彦, 村松慎一, 静間奈美, 山海直, 寺尾恵治, 小山高正, 吉川泰弘. パーキンソン病の重症度判定における動画像差分処理の応用. 第29回精神薬理学会(広島)1999年9月

研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
J. Mamm. Ova Res. 16, 50-52 Rabbit fetuses implanted and developed in the greater omentum.	1999		T. Endo, K. Kanayama, T. Sankai.
J. Med. Primatol. 28, 62-66 Localization of immunoreactive testosterone and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4 isomerase in cynomolgus monkey (<i>Macaca fascicularis</i>) testes during postnatal development.	1999		J. H. Liang, T. Sankai, T. Yoshida, F. Cho, Y. Yoshikawa.
Am. J. Primatol. 48, 291-298 A two-step extraction method to measure fecal steroid hormones in female cynomolgus monkeys (<i>Macaca fascicularis</i>).	1999		M. Matsumuro, T. Sankai, F. Cho, Y. Yoshikawa, T. Yoshida.
Science & Technonews Tsukuba, 50, 43-45 サル類生殖細胞の体外操作基盤技術の開発.	1999		山海 直.
Exp. Anim. In vitro manipulation of nonhuman primate gamete for embryo production and embryo transfer.	(in press)		T. Sankai.
鈴木秋悦、佐藤英明編集, 未成熟卵子、排卵卵子、受精卵の採取法： サル、卵子の体外培養法、生殖工学のための講座「卵子研究法」	(印刷中)	養賢堂	山海 直.
鈴木秋悦、佐藤英明編集, 卵子の体外成熟・体外受精・体外培養法： サル、卵子の体外培養法、生殖工学のための講座「卵子研究法」	(印刷中)	養賢堂	山海 直.

研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Cryopreservation-induced acrosome vesiculation in live sperm from cynomolgus monkeys (<i>Macaca fascicularis</i>).	(submitted)		A. Okada, H. Igarashi, M. Kuroda, T. Sankai, K. Terao, Y. Yoshikawa.
Immunolocalization of proliferation cell nuclear antigen (PCNA) in cynomolgus monkey (<i>Macaca fascicularis</i>) testes during postnatal development.	(submitted)		J. H. Liang, T. Sankai, T. Yoshida, Y. Yoshikawa.
Monitoring the reproductive status of gorillas (<i>Gorilla gorilla gorilla</i>) by measuring steroid hormones in fecal samples.	(submitted)		S. Miyamoto, Y. Chen, H. Kurotori, T. Sankai, T. Yoshida.
Comparison of the effects of two fixatives for immunolocalization of testosterone in the testes of the cynomolgus monkey, mouse, and rat.	(submitted)		J. H. Liang, T. Sankai, T. Yoshida, Y. Yoshikawa.
Short-term nonfrozen storage of mouse epididymal spermatozoa.	(submitted)		T. Sankai, H. Tsuchiya, N. Ogonuki.

サル類のための発生工学における基礎的研究

分担研究者 岡田詔子

1)研究協力者 村上 邦夫¹⁾ 五十嵐広明¹⁾
喜多 清²⁾ 伊藤 雅夫²⁾

1) 東邦大学医学部第二解剖学講座

2) 東京農業大学大学院生物産業学研究科

研究要旨 サル類の配偶子、胚の操作や保存方法開発のための基礎的研究を行ってきた。1. 精子や卵は操作過程で遠心G負荷を受けることがあるが、細胞内小器官への影響は明かでない。本年度は、卵母細胞へのG負荷が表層果粒を移動して、アクチンの重合を促進する成績が得られ、アクチンの活性化が多精子受精の増加に関係深いことが示唆された。2. スフィンゴミエリンと特異的に結合する蛋白質ライセニンによる精子先体や尾部の変化について検討し、先体は消失し低浸透圧下では速やかに尾部が膨化し死亡することから、Lysenin は透過性の変化と関係深いことが示唆された。3. カニクイザル精子は凍結保存により先体反応様の変化を起こすことを既に見出しているが、FITC-PSA法により比較し新鮮・凍結精子の成績を追加し、電顕での成績を支持する成績が得られた。

1. マウス卵子の遠心G負荷後のアクチン分布

A. 研究目的

サル類の卵を多量に取り扱ったり、血球やゴミなどの混濁した液から卵細胞を効率よく回収する場合に遠心操作により回収することが考えられる。また 12000~15000G 負荷後の顕微授精や凍結保存法がブタ卵などで知られているがG負荷の細胞内小器官への影響は明かでない。マウス卵子に 1) 3G、6G 負荷させると極体放出領域付近と卵表層のCG (表層果粒) は移動して¹⁾、多精子受精が増加する²⁾。2) 1万G 負荷卵の電顕観察では細胞膜に著しい陥凹が生じることを認めた。これらの変化はアクチンと関係することが示唆されるのでG負荷がアクチン線維の分布に影響するか否かを調べた。G負荷卵と無G処理卵を、アクチン線維と特異的に結合するFITC-phalloidin で染色してレーザー顕微鏡により観察した。

B 方法

採卵: BDF1 マウスに eCG(7.5iu)と hCG (5iu) 投与し過排卵処理を行った。G負荷群の採卵は hCG 投与後 16 時間に卵管より回収した。対照群は一次卵母細胞を卵管から、hCG 投与後 16 時間の二次卵母細胞を卵管より採取した。回収卵は採卵後直ちにヒアルロニターゼで卵丘細胞を除去した。遠心G負荷: 卵丘細胞を除去した一部の卵を DPBS (生理的食塩水) 中で 120 分間 3G 負荷させ (既報のG負荷装置を用いた Kita et al. 1999)、残りの卵は 37°C に設定した微量高速冷却遠心器 (株式会社トミー精工 MRX-150) により、15 分間 1 万 G を負荷させた。3G および 1 万 G の対照群は 37°C の CO₂ 培養器内でそれぞれ 120 分間、15 分間の静置培養した。対照の一次卵母細胞では極体放出部が突出或いは放出直前になるまで 30~60 分間培養した。透明帯除去: 酸性タイロド液で透明帯を除去し、0.3% の BSA を添加した DPBS により 3 回洗浄した。固定: 4% パラホルムアルデヒド、0.21% のピクリン酸、2 mM の EDTA を添加した 0.1M の PBS を用いて 4~5°C で一晩浸漬固定した。染色: 固定後 0.1% Triton に 1 分間曝露し、100 μg/ml の FITC-phalloidin と 0.2mg/ml の PI (propidium

iodide) により核染色した。染色の対照は 100 μ M の phalloidin で前処理して観察した。

C 結果

対照群の一次卵母細胞では極体放出領域の突出部に強い FITC 蛍光を認め、極体の細胞質内ではさらに強い蛍光を認めた。静置培養した二次卵母細胞では卵表層に帯状の蛍光を呈するものと、それに加えて極体領域に強い蛍光も認めるものが存在した。極体領域に強蛍光を認める率は 3 G 負荷群では約 62% で対照では約 27% であった。1 万 G 負荷群では 76% と 11% で、G 負荷群では増加した。また、3 G 負荷群では静置卵よりも全周に強い蛍光を認めた。しかし 1 万 G 負荷卵の極体領域の強い蛍光は異常な形状を呈するものを認め、その隣接部に細胞の突出部を認めるものが約 50% (17 個/34 個) で、その突出部の PI や FITC 蛍光は弱かった。

D 考察

極体形成領域のアクチン線維は一次卵母細胞の成績から、重合と脱重合により極体の形を整え極体中に放出されると考えられる。二次卵母細胞の 3 G 負荷卵では卵表層と極体領域の蛍光が強くなったことから卵表層のアクチン線維の重合が促進されていると考えられる。高 (60) G 負荷では骨芽細胞の cAMP とアクチン線維が増加すると報告されているが⁴⁾、低 G 負荷によるアクチン線維の重合促進の報告はみあたらない。アクチン線維の活性化は、卵が phagocytosis により精子を取込み受精丘を作るので、低 G 負荷による受精率の増加や³⁾、3 G 負荷の多精子受精の上昇²⁾ に関与すると考えられる。また G 負荷卵では極体領域の蛍光が増加し、1 万 G ではこの部位は細胞膜が陥凹して蛍光が異形を呈するので、G 負荷によりアクチンの移動と重合は促進されるが脱重合を伴う正常な極体形成は 1 万 G 負荷では傷害される可能性が考えられる。

E 結論

G 負荷によりマウス卵母細胞のアクチン線維の重合が促進される。低 G では受精を促進、3 G では多精子受精を増加し、高 G 負荷では脱重合との調節が傷害されると考えられた。

文献

1.) S. Kita et. al. 1999 .Effect of gravity load on cortical granule distribution in the mouse oocyte. J. Mamm Ova Res. 16.104-109 2.) 喜多 清 等 1997 哺乳動物

の生殖機能に関する重力依存性。Space Utilization Research. 14. 48-51. 3.) 伊藤 雅夫 等 1993 マウス卵子の受精と初期発生に及ぼす G 負荷の影響。30. 19-25 4) 川島光太郎 等 1988 高重力負荷による骨芽細胞の分化促進作用—細胞質骨格系の関与。日本骨代謝学会。15 巻 P111

2. スフィンゴミエリン結合蛋白 Lysenin とモルモット精子細胞膜の変化

A 目的

Lysenin はスフィンゴミエリン (SM) と特異的に結合する。結合の特異性は ELISA, TLC や Liposome lysis assay で確かめられている²⁾。Lysenin の生理作用は溶血と脊椎動物以上の SM の豊富な精子を短時間で不動化し、尾部を湾曲 (swelling) して死滅させるが SM のない精子は死滅しない。マウス精子への結合能は頭部が尾部より豊富である³⁾。しかし何故脊椎動物の精子が Lysenin で死ぬのか不明である。モルモット精子は先体が大きく光学顕微鏡下で生きたまま先体反応を観察できる。モルモット精子を用いて Lysenin の精子頭部と尾部の膜への作用を調べた。また SM 豊富な脳の抽出液を添加して効果が抑制されるか否か調べた。低張液と高張液、及び凍結融解により死滅させた精子の膜における Lysenin の効果も調べた。

B 方法

モルモット精子は精巣上体より回収した。精子は 2 回遠心洗浄後、0.1 μ g/ml の Lysenin を精子浮遊液に添加して、運動能や先体の有無と尾部の変化を調べた。216-339 mOsm 溶液中に 100 ng/ml の Lysenin を添加し、各群における精子の変化を比較した。脳の抽出液は遠心上清に 100 ng/ml の Lysenin を添加したものをを用いた。Lysenin は全葉工業からの提供を受けた。

C 結果

モルモット精子は 100 ng/ml の Lysenin を添加すると、処理後 30 分で 95% の精子が不動化し、90% の精子先体は消失し、尾は湾曲した精子が増加した。その効果は容量依存性に認められ高濃度で促進されたが、生理的な先体反応促進は観察されず、脳抽出液添加群では 1 μ g の Lysenin 群でも抑制された。216 mOsm の 100ng Lysenin 液では 3 分後に 100% 近い精子の尾が湾曲し不動となった。

しかし、Lysenin なし群、と等張、高張液群では Lysenin の有無に関係なく効果がなかった。また脳抽出液を添加した 216 mOsm の低張液群と、凍結融解後の死滅精子では Lysenin の効果は認められなかった。

D 考察

Lysenin 処理により先体の消失、尾の膨化と細胞死が認められ低浸透圧下で促進されたが、脳の抽出液で抑制され死滅精子では効果がなかった。生理的先体反応の際に SM が減少することが報告されている⁴⁾が Lysenin が SM に結合すると死ぬ理由についてはまだ明かでない。一方、精子形成細胞には熱ショック蛋白や Fas が発現している。これらは、アポトーシスと関連深く、アポトーシスの誘導時に SMase (加水分解酵素) の増加や⁵⁾ in vitro の系では 5 分で SM が 50% に減少することが報告されている⁶⁾。以上のことから、Lysenin が SM に結合すると、膜の free SM が減少して膜の透過性が変わり尾が膨化し、死に至る可能性が考えられる。

E 結論

Lysenin 処理により先体の消失、尾の膨化と細胞死が認められ、その作用は低浸透圧下で促進されたが、死滅精子では効果が認められなかった。Lysenin が精子膜の SM に結合すると膜の free な SM が減少し透過性が変わり、死に至る可能性が考えられた。

文献

- 1) Yamaji A. et.al.(1998) Lysenin, a novel sphingomyelin-specific binding protein. 273. 5300-5306
- 2) Ito M. et al. (1997) Lethal effects of lysenin, a novel protein isolated from the coelomic fluid of the earthworm *EISENIA FOETIDA*, on the spermatozoa of the african clawed frog and the mouse
- 3) Nikolopoulou, M. et.al. (1986) Modulation of the lipid composition of boar sperm plasma membranes during an acrosome reaction in vitro. Arch. Biochem. Biophys. 250. 30-37.
- 4) Cifone M G. et.al. (1995) Multiple pathways originate at the Fas / APO-1(CD95) receptor: sequential involvement of phosphatidylcholine-specific phospholipase C and acidic sphingomyelinase in the propagation of the apoptotic signal. EMBO J.14. 5859-5868.
- 5) Dressler K.A. et. al. (1992) Tumor Necrosis Factor- α activates the sphingomyelin signal transduction pathway in a cell-free system. Science 255. 1715-1718.

3. FITC-PSA によるカニクイザル精子の観察

A 目的

山海等¹⁾は、凍結保存により先体反応が促進されることを報告し、電顕により、凍結した生存精子に先体膜の融合や空砲化が観察される事を見出した。そこで FITC-PSA 法により先体が変化している率と PI 染色の成績は電顕の生存精子における成績と一致するか否かを新鮮精子の観察も新たに加えて検討した。

B 方法

カニクイザル精子は新鮮精子と凍結融解後 0-2h 培養したものをを用いた。精子の凍結や培養条件は Sankai 等の方法を用い、FITC-PSA の染色法は Cross 等の方法に準じた。対照群は α Methyl mannoside 処理と凍害予防せずに凍結融解した死滅精子とした。観察は共焦点レーザー顕微鏡を用いた。

C 結果

死滅処理した精子は PI で 100%核が染色された。凍結保存精子では 0 h 培養精子で PI に染色される精子は 1.7%であった。また、生存 intact 精子は 43.1%、先体に於ける FITC 蛍光が中等度のもの 55.4%であった。2h 培養精子の成績は前者が 20.6%で後者が 58.8%であった。新鮮 0h 培養では intact 精子は 91.8%、2h 培養精子では 79%であった。しかし mannoside 処理した精子では頭の蛍光は消失したが、尾部の蛍光が残存した。以上の精子頭部での成績は TEM の成績と近似していた。

D 考察

凍結保存精子の生存率や先体反応率は FITC-PSA と TEM の成績が近似していた。凍結 0 h で FITC-PSA の染色性が中等度ものは細胞膜に穴が開いているものと考えられる。

E 結論

FITC-PSA と TEM の成績から凍結融解直後の生存精子の約 50% に、何らかの形で先体反応が進行していると考えられた。

F 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kita S, Ishijima Y, Okada A, and Ito M.
(1999) Effect of gravity load on cortical
granule distribution in the mouse oocyte.
J. Mamm Ova Res. 16:104-109

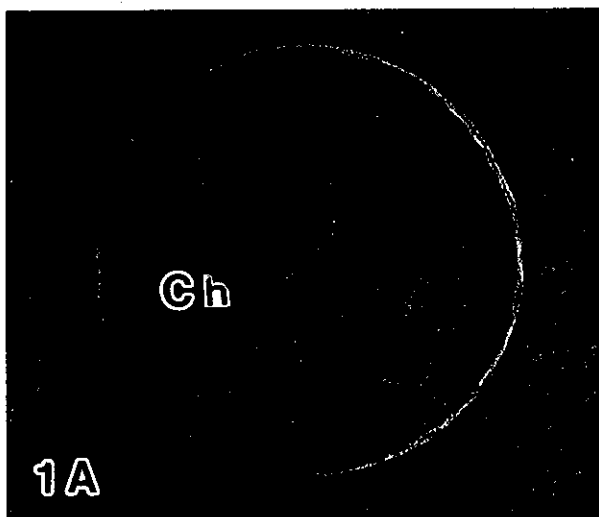
2. 学会発表

- 1) 岡田 詔子、山海 直、土屋英明、永江 毅、
五十嵐広明、黒田 優。
マウス未受精卵膜のスフィンゴミエリンの
Lysenin による観察法
第 40 回哺乳学会 1999 5月 東京

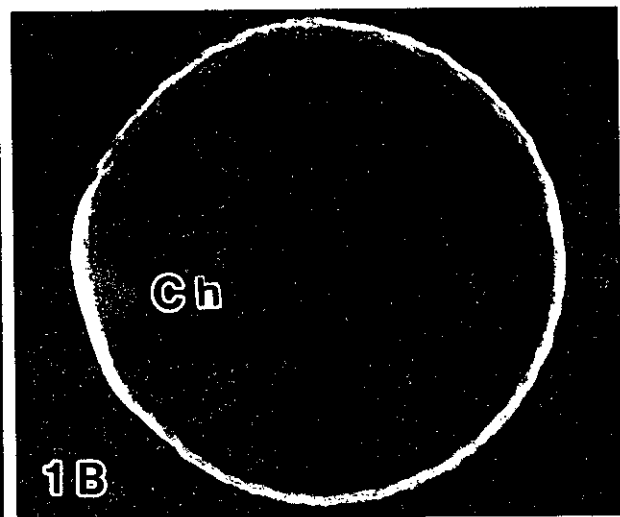
- 2) 喜多 清、伊藤 雅夫、石島 芳郎、山海 直、
五十嵐広明、岡田 詔子
マウス卵子の遠心G負荷後のアクチン分布
第 41 回哺乳学会 2000 6月 網走

- 3) Okada A., Nagae T., Igarashi H., Kuroda
M., Miura K., and Sankai T. Membrane
alteration in guinea pig sperm due to the
sphingomyelin-specific binding protein
Lysenin.

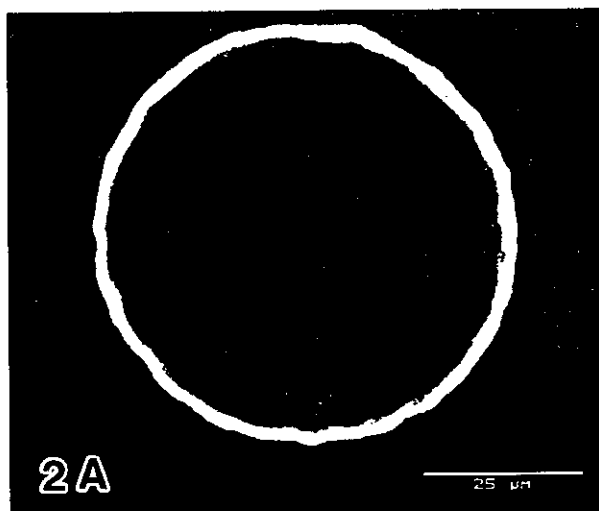
III rd Asian and Oceanic Congress of
Andrology. 2000 May Makuhari Messe.



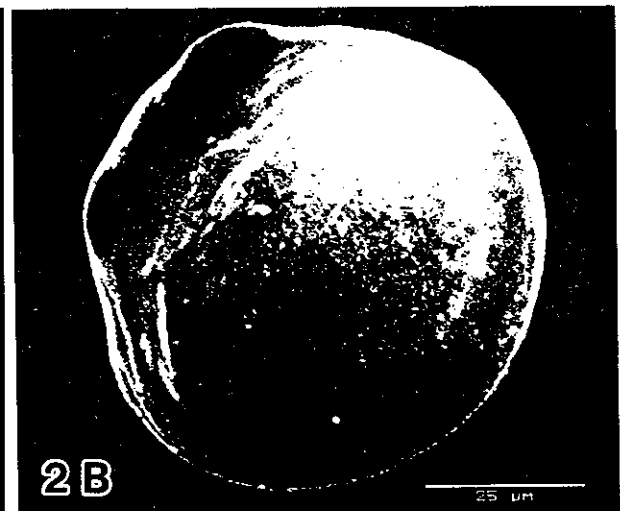
1 図 A. 0G 負荷 120 分静置培養卵
染色体 (Ch.) 表層と卵表層の
FITC 蛍光は弱い。



1 図 B. 3G120 分負荷卵
染色体 (Ch.) 表層に強い
FITC 蛍光を認める。



2 図 A. 0G 負荷 15 分静置培養卵
卵表層に帯状の FITC 蛍光を
認める。



2 図 B. 1 万 G 15 分負荷卵
強い FITC 蛍光と突出部を認める。

生殖幹細胞への遺伝子導入によるトランスジェニック動物作出に関する研究

分担研究者

橋本光一郎

明治乳業ヘルスサイエンス研究所 主任研究員

研究要旨

生殖系列の精原細胞への遺伝子導入によるトランスジェニック動物作出法は、精原細胞のin vitro増殖条件を残しほぼ完成しているので、マウス精原細胞を使いその増殖条件を検討した結果、更なる検討が必要であることが明らかとなった

A. 研究目的

トランスジェニック動物作出のために、生殖幹細胞、特に雄のほぼ一生のあいだ精子を生産しつづけるために必要な雄性生殖細胞の幹細胞である精原細胞を外来遺伝子導入の対象の細胞として利用する方法の開発を本研究の目的としている。雄生殖幹細胞の増殖条件は、外来遺伝子導入後の選別にも、また得られたクローンの増殖のためにも必須である。この精原細胞の増殖条件を残し、マウスなどでは雄性生殖細胞を介した個体作出法の大筋はほぼ完成していると思われる。昨年度は、最も増殖条件に関する研究が進んでいると思われるラットにより、増殖に関与しているとの報告がなされた種々の成長因子について追試を行った。しかし、この種の実験において最も重要な点である精原細胞の同定がより厳密に行うことがラットでは容易な問題ではないことから、種々のマーカー分子による同定法が適用出来る点と同時に精子形成という分化等についての解析が進んでいる点を考慮し、材料をマウスに替えて検討することにした。

B. 研究方法

精原細胞の採取：C57BL/6の1.5日齢雄マウス（ラットではWisterの2.5日齢雄）の精巣を摘出し、コラゲナーゼやトリプシン・EDTA処理にて精細管を単離した後精原細胞とセルトリ細胞へと解離した。

in vitro 共培養：培養皿底面を細胞外マトリックスのマトリゲル或いはラミニンをコートし、DMEMとハムF12培地の混合無

血清培地(pH7.4)を用いて、細胞密度を 2.5×10^5 細胞/cm²として細胞を播種、5%CO₂インキュベーター内で、32度或いは37度にて6日間培養した。

精子形成細胞の同定：マウスの細胞に対しては、冷アセトン-メタノールで固定・風乾後モノクローナル抗体(TRA98：マウス精子形成細胞に特異的に反応する)を反応させ、ABC法により免疫組織化学的染色にて陽性細胞を精子形成細胞と同定した。ラットの細胞に関しては、細胞を培養皿からトリプシンにて回収し、細胞のサイズを計測し直径およそ20μmのものを精子形成細胞とみなした。

C&D. 研究結果と考察

単離した新生仔ラット精細管は、精原細胞とセルトリ細胞の前駆細胞から構成されている。これを解離して培養し（精原細胞とセルトリ細胞の共培養）、トリプシンにより剥がして解離した細胞のサイズからlarge cellを精原細胞として（図1）ラット精原細胞に対する増殖効果が報告されている成長因子LIFやCNTFについて、その添加した場合の効果を検討した（図2）。全細胞数はLIFやCNTFの添加に関わらず培養日数と共に増加した（図2上）。large cell（？精原細胞）はLIF添加の場合のみ増加が見られた（図2下）。この培養条件をマウス新生仔精細管からの細胞に適用した（図3）。全細胞数はラットの場合と異なった増殖パターンを示した。CNTF添加において著しい増殖が認められ、この増殖は、細胞のサイズの大型の細胞であった(図

3上下)。このlarge cellの細胞種の同定が必須であったことから、モノクロー抗体 TRA98により同定を行うことにした。本抗体は、新生仔精細管内の精原細胞のみに特異的に反応した(図4)。新生仔精細管内において、TRA98陽性細胞の動態を検討したところ、陽性細胞は日齢1.5日から7.5日までにほぼ6倍に増殖していた(図5)。本抗体は、培養細胞においても適用可能であった(図6)。そこで、図3にて示した培養条件でTRA98陽性細胞の動態を検討したところ、成長因子無添加の対照では培養6日間でlarge cellはおよそ3倍に増殖したが、TRA98陽性細胞でみるとおよそ1/70に減少していた(図7-1, -2)。

そこで、培養温度として32度と37度について、及びTRA98陽性細胞による評価に基づきマウス精原細胞の培養条件(細胞外マトリックスとしてマトリゲルとラミニン、成長因子LIFとCNTF)を再検討した。

培養温度に関しては、一般に精子形成細胞の培養温度は32度であるが、これはマウス成体精巣は陰嚢内にあり、体腔内に停留すると生殖細胞が死滅する(停留辜丸)からであるが、我々は新生仔精巣が体腔内にあることから(新生仔の体温は37度であろうと仮定して)あえて37度で実施した。精原細胞とセルトリ細胞の共培養で、これらの温度の影響を検討したところ、32度では細胞数に大きな変化が認められなかった

(図8)。37度では若干の増殖が認められ(図8)が、図7の結果とあわせて考えると、この増殖は体細胞であることから、これらの増殖はむしろ精原細胞の増殖の妨げになることが考えられるため、培養温度を32度にすることにした。

細胞外マトリックスとして使用したマトリゲルはEHS Sarcomaの抽出物であることから、種々に成長因子を含んでいてTGF β の様な増殖に抑制的に作用するものがあるため、精細管を包む基底膜の構成成分であるラミニンを検討した。対照の無コート

(接着細胞であるセルトリ細胞が自らラミニンを産生する)とラミニン・コートとの間には有為さを認めなかったが、マトリゲル・コートでは有意にTRA98陽性細胞の増殖の抑制(およそ1/2)が認められた(図9)。

成長因子LIFとCNTFの添加の効果については、TRA98陽性細胞は培養日数を経るにつれ漸次減少していく。培養6日目で見ると対照と添加区の間には有為さは認められなかったが、CNTF添加区がより高い傾向が認められた(図10)。

E. 結論

これまでの培養条件の検討により得られた精原細胞培養条件は、未だ生体内の環境を十分に再現仕切れていない。検討した成長因子はわずかに2物質だけであったが、6日間の培養でも少数ではあるが生存していたことは、今後更なる成長因子の検討と培養条件の改良を行なうことにより、マウス精原細胞の培養条件の確立は不可能ではないと思われる。特に、今回使用した条件のうち、セルトリ細胞の増殖を抑制する条件にて精原細胞の培養を実施する必要があると思われる。また、動物種として主にマウスを使用した。他動物種を視野にした研究を実施するには、特に精原細胞の同定をいかにするかがキーとなる。また、昨年報告したin vivoでのアッセイシステムは上記同定法とは異なり最終的な評価法となると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表

1) 齊籐友昭・橋本光一郎・仁科行雄
マウスの精粗細胞とSertoli細胞の体外共培養

日本発生生物学会第32回大会、1999