

平成12年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第3分野

医薬品等の評価・試験方法の開発に関する研究

# 目 次

課題番号			
2.0000970A 31015	結核菌の迅速薬剤感受性試験法の開発	山崎 利雄	1
971A 31028	バイオテクノロジーを用いた薬物代謝酵素の特性解析と医薬品の適正使用化に関する研究	頭金 正博	9
972A 31064	感染症予防効果のある糖鎖を付加した多機能食用難消化性多糖類の開発とその有効性及び安全性を評価する方法の開発	小西 良子	23
973A 31065	食中毒細菌の検出方法の開発と評価	山本 茂貴	29
974A 31093	リポソームを用いた遺伝子導入法の開発、その有効性、安全性に関する研究	北川 隆之	39
975A 31112	ラット初代培養肝細胞を用いる毒性評価系の確立	四宮 貴久	47
977A 31219	生殖細胞系列の完全連続培養系の開発	佐藤 英明	52
978A 31238	精巣細胞各種分化系列を標識する抗体の作成と精巣障害解析の技術基盤の整備	井上 達	55
979A 31239	加速試験で評価できない製剤機能の安定性評価に関する研究	吉岡 澄江	66
980A 31240	新開発食品の食品化学的特性の解析と評価に関する研究	豊田 正武	74
981A 31242	糖タンパク質及び糖鎖関連物質の糖鎖の機能及び構造解析と品質等評価技術の開発	早川 堯夫	83
982A 31244	食品添加物の開発手法及び食品添加物の品質・安全性の評価・試験方法に関する研究	米谷 民雄	93
983A 31249	遺伝子改変テスターを用いる第二世代変異原性試験法の開発	能美 健彦	102
984A 31266	培養細胞を用いたインビトロ発熱性物質試験法の開発に関する研究	村井 敏美	108
985A 31267	薬物代謝活性の多型性とハイリスク患者における薬物評価に関する研究	大野 泰雄	116
2.0000976A 32146	トランスポーター遺伝子発現細胞を用いた薬物吸収・分布・排泄動態評価系の開発	辻 彰	126

## 生殖細胞系列の完全連続培養系の開発

所 属 東北大学大学院農学研究科

研究者 佐藤英明

### 研究分担者

- (1) 田辺製薬(株)安全性研究所 新比恵 啓志
- (2) 国立医薬品食品衛生研究所 水澤 博
- (3) 国立精神・神経センター 桃井 隆

### 要旨

良好な体外受精率を示す培養液の開発、受精卵の発生を促進するグリコサミノグリカンの同定、脱出胚盤胞からのES細胞様の樹立培養法の開発を行い、ブタ及びマウスにおいて卵子の体外成熟・体外受精、体外受精卵の体外発生・ES細胞への分化という連続培養法を開発した。また、このような連続培養系への遺伝子導入を行うことを可能にする核移植技術も確立した。さらに、精子形成にRA70が関わる可能性を指摘するとともにBVDVフリーの非汚染細胞系を樹立した。

### 1. 研究目的

個体の死を越えて生きながらえるために生物は生殖細胞をもつが、雌雄の性をもつ高等動物では受精により次世代へ自らの生命を伝承する。すなわち精子と卵子の合体により胚をつくり、さらに始原生殖細胞(primordial germ cell, PGC)を誕生させる。PGCは生殖原基へ移動し、減数分裂に入り、精子、卵子をつくり、受精へと進む。このような生殖細胞系列の「不死」の流れが永続性のある生物を成すわけであるが、このような流れは現在のところ、個体の力を借りてしか維持することはできない。しかし、個々の分化段階の生殖細胞の培養は可能となっており、その全分化過程を体外で再現することは潜在的に可能である。体外で一連の流れを再現できるようになれば、個体に依存せずに生存し続ける新しい「独立生命体」を手に入れることができる。このようなことが可能になれば動物産業(畜産や実験動物分野)、医療、環境保全に貢献することになる。本研究は、このような問題意識を背景に、生殖細胞系列の完全連続培養系の開発を目指して卵形成、成熟、精子形成、受精、初期発生、PGCの形成・増殖に関わる生理活性物質の同定や培養法の検討を行ったものである。また、このような培養にあたっては微生物管理が重要であり、そのような観点からも検討を行った。

### 2. 研究方法

マウスとブタの系を用いて、卵成熟、受精、初期発生、ES細胞、精子形成、微生物フリー培養細胞に関する実験を行い、それらの中から開発された培養系を連続させる試みを行った。さらに、特に平成11年度に樹立した胚由来細胞を用いる遺伝子改変生殖細胞系列を得るとともに、胚由来細胞から始原生殖細胞の幹細胞を得る系を作成する試みも行った。

### 3. 研究成果

(1) 卵成熟、受精、初期発生:ブタの系で未成熟卵母細胞から脱出胚盤胞期胚の作出に成功した。この過程で良好な体外受精率を示すTU(Tohoku University)培地を開発した。また分離を進めていた卵母細胞死滅抑制グリコサミノグリカンがヒアルロン酸であることを明らかにし、さらにヒアルロン酸を含む培地で体外受精卵を培養することにより、脱出胚盤胞をつくることのできた。さらに体外で作出したブタ脱出胚盤胞からES様細胞を樹立した。またマウスにおいても未成熟卵を高率に脱出胚盤胞へ発生させる体外成熟・体外受精・体外発生系を確立した。この細胞はneo耐性遺伝子・G418による遺伝子操作が可能であったが、実際に緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子を導入し、遺伝子導入細胞だけを選抜することができた。さらにGFP遺伝子導入細胞を除核未受精卵と電気融合し活性化条件を明らかにし、脱出胚盤胞まで発生させることに成功した。樹立した胚由来細胞は遺伝子操作に耐えうる細胞株であり、このような細胞を体外で分化させ、始原生殖細胞に分化誘導する系の作出に努力しているが、未だ成功していない。

(2) 精子形成：レチノイン酸による P19EC 細胞の分化過程および細胞死の過程発現誘導される RA70 は細胞質に存在する分子量 55kDa の蛋白であり、ヒト Fyn 結合蛋白 SKAP 55 と一部高いホモロジーを示す。また、RA70 は SKAP 55 と同様、PH ドメインとチロシンリン酸化部位をもつ。RA70 は In Vitro では SKAP55 同様、Fyn SH2 ドメインと結合し P19EC 細胞に発現している Src family の Hck との相互作用がみられた。In Situ hybridization による解析の結果、RA70 は精巣の精子細胞に多く発現することが明らかとなった。RA70 は精子形成過程で Src ファミリーと結合し、カスパーゼ活性化の機構を介して、減数分裂にともなう異常生殖細胞の細胞死を制御している可能性が考えられる。

(3) 微生物フリー培養細胞：培養細胞の実用化にあたっては様々な面からその安全性を検討する必要がある。近年、JCRB 細胞バンクの調査から、ウシ由来血清に BVDV (ウシ下痢症ウイルス) の汚染のあることが明らかになってきた。しかし、検査にあたっては感度を上げるために RT-PCR 法を採用したためウイルスの生物活性の有無についてはいまだ不明である。これを確認するためには、BVDV に汚染されていないウシ細胞系を入手する必要があるが、流通しているウシ細胞の大部分は既に BVDV が感染していると推定される。そのため、BVDV フリーのウシ胎児から新たに非汚染細胞系を樹立し、その性状を確認した

#### 4. 考察

未成熟卵を高率に脱出胚盤胞へ発生させる体外成熟・体外受精・体外発生系を確立し、脱出胚盤胞から胚由来細胞を樹立することに成功し、胚由来細胞から始原生殖細胞の樹立に努力しているが、成功していない。しかし、樹立した胚由来細胞は遺伝子操作に耐える細胞であり、遺伝子改変胚由来細胞の体外分化を試みるとともに、除核未受精卵と融合させ脱出胚盤胞期胚を経由して始原生殖細胞を樹立しようとしている。新規タンパク質・RA70 は精子形成過程で Src ファミリーと結合し、カスパーゼ活性化の機構を介して、減数分裂にともなう異常生殖細胞の細胞死を制御している可能性を指摘した。

#### 5. まとめ

胚由来細胞に遺伝子を導入し、その生殖細胞系列への影響を解析するため、遺伝子導入胚由来細胞の樹立と核移植による遺伝子改変胚由来細胞由来胚盤胞の作出を目的として実験を行なった。遺伝子導入胚由来細胞の樹立と核移植による遺伝子改変胚由来細胞由来胚盤胞の作出に成功したが、このような細胞を体外で分化させ、始原生殖細胞に分化誘導する系の作出に努力しているが、未だ成功していない。

#### 6. 研究発表

- 1) 佐藤英明：体細胞クローン技術を用いた遺伝子改変ブタの開発。化学と生物、38(8):508-513, 2000
- 2) 佐藤英明：移植臓器生産トランスジェニックブタの開発-作出戦略と研究の現状-。研究ジャーナル、23(5):15-20, 2000
- 3) Miyoshi, K., Y. Taguchi, Y. Sendai, H. Hoshi, E. Sato: Establishment of a porcine cell line from in vitro-produced blastocysts and transfer of the cells into enucleated oocytes. Biol. Reprod., 62:1640-1646, 2000
- 4) 佐藤英明：卵成熟の分子機構、新女性医学体系 14、生殖・内分泌、受精と着床、武谷雄二総編集、pp.19-30, 中山書店、2000
- 5) 三好和睦・佐藤英明：マウス以外の動物種における多分化能細胞株の樹立状況。畜産の研究、54(5):591-597, 2000
- 6) Mori, T., M. W. Guo, E. Sato, T. Baba, S. Takasaki, E. Mori: Molecular and immunological approaches to mammalian fertilization. J. Reprod. Immunol., 47:139-158, 2000
- 7) Miyoshi, K., E. Sato: Recent advances in cloning technology in the pig. Asian-Aus. J. Anim. Sci., 13:258-264, 2000
- 8) Sato, E., N. Kimura, M. Yokoo: Synthesis and accumulation of hyaluronic acid in porcine cumulus-oocyte complexes: the role of oocytes. J. Fert. Implant. (Tokyo), 17:35-38, 2000
- 9) Takahashi, Y., N. Yamakawa, K. Matsumoto, Y. Toyoda, K. Furukawa, E. Sato: Analysis of the role of egg integrins in sperm-egg binding and fusion. Mo. Reprod. Dev., 56:412-423, 2000
- 10) Jiang, J. Y., M. Umezumi, E. Sato: Characteristics of infertility and improvement of fertility by thyroxine treatment in adult male hypothyroid rdw rats. Biol. Reprod., 63:1647-1651, 2000

11)Miyoshi, K., K. Saeki, E. Sato:Improvement in development of porcine embryos reconstituted with cells from blastocyst-derived cell lines and enucleated oocytes by optimization of reconstruction methods. Cloning, 2:175-184, 2000

---

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第3分野

医薬品等の評価・試験方法の開発に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号  
共同ビル（小伝馬町駅前）4F  
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社