

国立環境研究所特別研究報告

Report of Special Research from the National Institute for Environmental Studies, Japan

SR-81-2008

鳥類体細胞を用いた子孫個体の創出 (特別研究)

Studies on the creation of offspring using somatic cells in birds

平成17～19年度

FY 2004～2007

NIES



独立行政法人 国立環境研究所
NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES
<http://www.nies.go.jp/>

鳥類体細胞を用いた子孫個体の創出 (特別研究)

Studies on the creation of offspring using somatic cells in birds

平成17～19年度

FY 2004～2007

特別研究「鳥類体細胞を用いた子孫個体の創出」
(期間 平成17～19年度)

特別研究責任者：桑名 貴
特別研究幹事：桑名 貴
特別研究報告書編集担当：桑名 貴

序

本報告書は、平成17～19年度の3年間にわたって実施した特別研究「鳥類体細胞を用いた子孫個体の創出」に関する研究の研究成果を取りまとめたものです。

鳥類体細胞を用いた子孫個体の創出に関する研究は、従前の繁殖技術を含めた保護・保全の手法によって絶滅を食い止めることができない鳥類種を最新の発生工学的手法によって救済することを目途として、新規の研究技術を研究・開発するためのものです。

国際自然保護連合（IUCN）による2008年版の絶滅危惧鳥類リスト（レッドリスト）によると、絶滅危惧種は07年版より5種増加。07年版リストに入っていたうち24種は、絶滅の危険度がより高い分類に見直されました。また、近い将来に「極めて」絶滅の恐れが高いとされたのは、シベリアの東端で繁殖して日本にも飛来するヘラシギや沖縄のノグチゲラなど190種、絶滅の恐れが高いとされた種が、タンチョウやヤンバルクイナなど363種。絶滅の危険が増大している種などが673種となっています。

上記のように年を追って増加する絶滅危惧鳥類種数から考えると、絶滅危惧鳥類種の生息域の整備・回復と並行した形で、最先端の発生工学技術を用いた新規の個体増殖法開発に早期に着手する必要性と蓋然性が高くなってきています。

折しも、国立環境研究所では平成14年度から環境試料タイムカプセル化事業の一環として、絶滅危惧動物種の生細胞を含んだ遺伝資源を凍結保存し始め、現時点での絶滅危惧動物試料数は59種、761個体、17,058サンプルとなっています。このうちで鳥類の占める割合は39種、584個体、15,053サンプルと保存試料の大部分を占めています。これは、世界に先駆けて開発改良した鳥類細胞の培養系を国立環境研究所が持っており、この培養技術を応用して絶滅危惧鳥類の細胞を大量に培養して凍結保存することが可能なためです。更に、個体発生の初期に出現する精子や卵のもとになる始原生殖細胞（生殖幹細胞）を用いた個体増殖法開発と確立も行うなど、国立環境研究所は鳥類の発生工学研究で世界のトップに立っています。

今回このような背景を踏まえて、特別研究「鳥類体細胞を用いた子孫個体の創出」という、環境研究だけでなく発生生物学分野でも挑戦的な研究を行う機会を得たことは、今後の環境研究の基盤技術の充実・整備のために大きな意味を持っています。その意味でも、本報告書の中の知見、技術が、開発半ばのものを含めて、次世代へ継承されていくことが強く望まれています。

平成20年12月

独立行政法人 国立環境研究所
環境研究基盤技術ラボラトリー長
植 弘 崇 嗣

目次

1	研究の目的と経緯	1
1.1	研究の目的	1
1.2	研究内容・成果の概略と達成状況	1
1.2.1	成果の総括	1
1.2.1.1	今後の課題	2
1.2.2	鳥類始原生殖細胞 (PGC) の大量培養法	2
1.2.3	PGC 機能を保持できる多世代継代培養法	2
1.2.4	異種間生殖巣キメラ個体におけるドナー PGC の精子・卵への分化	3
1.2.5	ドナー体細胞由来の核を有する PGC 創出	3
1.3	研究組織及び概要	4
2	研究の成果	5
2.1	生殖巣キメラ個体による子孫作出	7
2.1.1	フィーダー細胞上での始原生殖細胞の <i>in vitro</i> 培養	7
2.1.1.1	材料と方法	7
2.1.1.2	結果と考察	10
2.2	異種間生殖巣キメラ作成法の開発研究	33
2.2.1	材料と方法	33
2.2.2	結果と考察	34
2.2.2.1	異種間生殖巣キメラ作出	34
2.2.2.2	異種間生殖巣キメラ個体の後代検定並びに DNA 配列による異種間生殖巣キメラの検出・評価	34
2.3	ドナー体細胞の増殖培養と標識遺伝子の導入	38
2.3.1	材料と方法	38
2.3.2	結果と考察	39
2.4	体細胞核を持つ始原生殖細胞の創出	39
2.4.1	始原生殖細胞核の不活化条件の検討と細胞融合条件の検討	41
2.4.1.1	材料と方法	41
2.4.1.2	結果と考察	42
2.4.2	細胞融合条件の検討	47
2.4.2.1	GFP 導入ニワトリ胚性繊維芽細胞とニワトリ始原生殖細胞との PEG による核融合	48
2.4.2.2	脱核で得た胚性繊維芽細胞の核と始原生殖細胞との PEG による核融合	49
2.4.2.3	マイクロピペット、マイクロウェルによる PEG 細胞融合	49
2.4.2.4	微小電極を用いた電気刺激による細胞融合	50
2.4.3	体細胞由来始原生殖細胞の生体内移動能の評価	53
2.4.3.1	UV 照射始原生殖細胞の生殖巣原基への能動的遊走能による <i>in vivo</i> 評価	53

2.5 体細胞由来の生殖巣キメラ個体の創出	53
2.6 今後の研究展望	54

[資料]

I 研究の組織と研究課題の構成	55
1 研究の組織	55
2 研究課題と担当者	55
II 研究成果発表一覧	56

1 研究の目的と経緯

1.1 研究の目的

希少野生鳥類の保全においては、生息環境下で個体数維持や地域個体群など遺伝的多様性の確保がなされることが理想である。しかしながら、生息環境の急速な劣化は、そのような対処法のみでは希少鳥類を保全することが不可能な状況を惹起している。

一方、飼育・繁殖手法の進展もあり、我が国におけるトキやコウノトリのように生息域外で保護・増殖することも可能となりつつある。一方、生息域外飼育・増殖では、多様性を維持するために多くの個体を飼育する必要があるが、種によっては縄張りなどにより高密度飼育が困難なため、飼育場所として広大な空間を要することとなる。結果として多数個体を飼育することができず、当初の目的を達成できない場合も多い。

本研究の目的は、希少野生鳥類個体の遺伝情報を代表するものとして体細胞を長期間保存し、環境条件改善後などに保存した体細胞から遺伝的多様性を保持した個体復元を目指すものである。具体的には、我々が既に構築した「鳥類細胞の極低温長期保存手法」と「ドナー始原生殖細胞を用いた生殖巣キメラによるドナー由来子孫個体創出手法」を基盤技術とし、希少野生鳥類に適用するために以下の4課題に対して、技術開発により解決策を見出すことにある。

- 1) 鳥類始原生殖細胞 (PGC) の大量培養法
- 2) PGC機能を保持できる多世代継代培養法
- 3) 異種間生殖巣キメラ個体におけるドナー PGC の精子・卵への分化
 - ・ PGC から精原細胞・卵母細胞を経て精子・

卵に分化する際に減数分裂が起こり、兄弟姉妹レベルの遺伝的多様性を確保できる。

4) 希少種の体細胞由来の核を有する PGC 創出

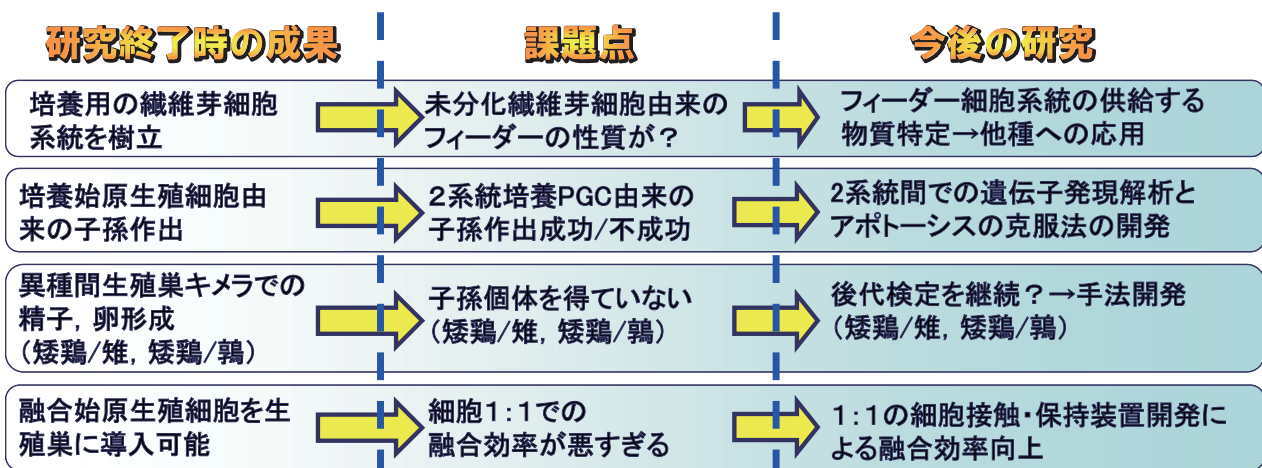
これらの課題を解決できれば、長期保存された希少種の体細胞から PGC を創出し、希少種類縁の鳥の発生段階の胚に導入すれば希少種個体の復元に繋がる。これにより、超低温容器を安全な避難場所として確保でき、環境修復・改善に対してより長期的な取組みが可能になるとともに、個体の飼育・繁殖に必要な広大な空間の問題も解決され、画期的な生息域外保全策となる。

1.2 研究内容・成果の概略と達成状況

1.2.1 成果の総括

全く新規の希少鳥類増殖法を開発し、基盤的な研究技術を開発・整備するための本研究は当初予想の80%程度の達成率と自己評価している。研究成果の概要は下記の通り。

- ・ 鳥類始原生殖細胞 (PGC) の大量培養法を開発した。
- ・ 長期培養後の PGC 由来細胞が細胞特性を保持して PGC と全く同じように子孫個体を作成することを実証した。
- ・ 異種間生殖巣キメラ個体では種を越えて精子、卵が生殖巣内で分化することが確認できた。
- ・ 細胞融合による始原生殖細胞が、ホスト始原生殖細胞の生殖巣への移動能を確保しながら細胞核を不活化する UV 照射量を確定できた。
- ・ ホスト始原生殖細胞と体細胞との融合は低率ながら成功した。



- ・融合始原生殖細胞が生殖巣へと到達することが確認できた。

目標が20%未達成の原因は、研究期間に対して達成目標が高すぎた可能性も否定できない。仮に本研究が同程度の予算規模で継続できた場合、重要な研究成果は本中期計画内で達成可能であり、更に成果を実際の希少鳥類個体増殖に応用するためには、その後三年程度であると予想している。

1.2.1.1 今後の課題

上記に記載したとおり、残された問題点は大きく4項目に上る。第1の問題点は、始原生殖細胞を培養する際に用いる繊維芽細胞の細胞学的性質が特定できておらず、始原生殖細胞の増殖が若干ながら不安定となる点である。第2の問題点は、繊維芽細胞との共培養で増殖する始原生殖細胞からの子孫個体は得たものの、無細胞系で継代培養したものから子孫を得ることができなかった。この2系統の培養系の差違についての詳細な情報は得られていない。第3の問題点は、研究終了時点では異種間で作製した生殖巣キメラ個体からドナー始原生殖細胞由来の子孫個体が得られていない点である。これに関してはその後韓国の研究グループが異種間生殖巣キメラからの子孫をキジとニワトリ間で作出したとの情報が得られている。第4の問題点は、始原生殖細胞と体細胞を1:1で効率的に細胞融合することが未だに困難である点にある。そのために、体細胞の核を持つ融合始原生殖細胞を大量に作出することが未達成であり、今後は上記の残された問題点を集中的に克服していく必要がある。

1.2.2 鳥類始原生殖細胞 (PGC) の大量培養法

PGCは受精卵の胚発生過程の極一時期にだけ見られる生殖系の幹細胞であり、持っている遺伝情報は他の体細胞と同じである。しかし、将来、分裂増殖して精原細胞・卵母細胞となり、体細胞にはない減数分裂を起こし、遺伝的に多様な精子や卵となる元の細胞である。このため、PGC由来の子はクローンとは異なり、兄弟姉妹レベルの多様性を保持している。

希少野生鳥類においては、余剰となる受精卵は極少数しか得られない可能性が高く、得られるPGCの量は多くはない。このため、多数の生殖巣キメラを作るのには、

PGCを大量に増やせる培養法の開発が必要である。

PGCや他の組織細胞を安定に培養するためには、共に培養するフィーダー細胞の選定が重要な要素を占める。このため、鳥類の初期胚の一部の細胞を種々の前処理、培地、播種密度、継代頻度などの諸条件を変えて、継代培養を行い細胞生存率と増殖を比較検討した。また、PGCの継代培養において、PGC増殖の追跡を容易にできるフィーダー細胞形態についても検討を加えた。その結果、繊維芽細胞系において適当なものを見出した。これにより、PGCを約40日間継代培養をして、最高2500倍程度の増殖率を得ることができた。

また、取扱いの容易さを考慮し、浮遊法によるPGC単独培養法についても検討を行った。培養後数日で細胞間癒着や肥大化などが見られ、更に継続すると接着性の細胞が頻繁に出現してくる。これら、接着性細胞は組織化学的にはPGCとしての性格を失っていると考えられるが、共存する浮遊性細胞については細胞化学的特性に関してはPGCとしての特性を保持していると判断された。

1.2.3 PGC機能を保持できる多世代継代培養法

PGCの大量培養には、多くの世代の継代培養が必要であるが、幹細胞であるPGCは、より特化した機能を持つ細胞へと分化してしまう可能性が高い。このため、PGC機能を失わない多世代継代培養法が必須である。1.2.2で開発した培養法によりPGCから増殖した細胞について、PGCとしての機能を有するかを検定するために、同種の胚に移植し生殖巣キメラを生成するか、さらにドナーPGC由来の個体を創出できるかという観点から検討した。

フィーダー細胞共存化で培養したPGCについては、200日以上培養した場合、或いは200日以上凍結保存した場合にも免疫学的手法で生殖巣キメラを生成すること

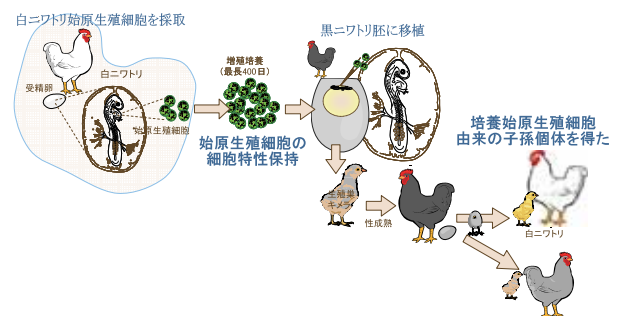


図1-1 始原生殖細胞の培養と生殖巣キメラ後代検定

が確認でき、更にドナー PGC 由来の子孫個体を作出できた。これは、これまで PGC は長期継代培養によって EG ないし ES 細胞のような未分化な細胞へと脱分化すると考えられていたことに対し、細胞特性を保存して長期培養を実現した世界最初の成果である。

一方、PGC 単独で培養した際に現出する浮遊性細胞については、DNA 解析の結果雄性と判ったので雄の胚に移植して検討した。免疫学的な検出や DNA 解析からはドナー PGC 由来の細胞はホストの精巣に定着することは確認できたものの、子孫個体の作出はできなかった。精巣の解剖学的検討を行った結果、ドナー PGC の生殖巣原基への移動や増殖は行われるものの、精子への最終的な変態の際に異常をきたすものと考えられた。

1.2.4 異種間生殖巣キメラ個体におけるドナー PGC の精子・卵への分化

希少種の PGC を同種の胚に導入しても、個体数の増加には効果がないため、より多数棲息する他種のホスト鳥の胚に導入する必要がある。この様な、異種のホストに導入されたゲスト PGC が成熟した精子や卵に発達しないと、ゲスト由来の子孫個体は得られない。

本研究では、ニホンキジ／ニワトリ（チャボ）、ニホンキジ／ウズラ及びライチョウ／ニワトリ（チャボ）の系（いずれもドナー／ホスト）で検討を行った。

全ての系で、雌雄の個体が性成熟期まで生存でき、これらの生殖巣にはドナー由来の DNA を検出できた。また、ニホンキジ／ニワトリ系では精液中にニホンキジ由来の DNA を検出できた。産卵された卵についての DNA 解析ではドナー由来の DNA は検出できていない。また、

戻し交配の結果としては、これまでのところ子孫個体は得られていない。

ニホンキジ／ニワトリ系における性成熟個体における生殖巣のキメラ率は高く、ホストであるニワトリにとって異種であるニホンキジの PGC は、免疫的排除を逃れて生存を続けており、更に精液中にはドナー由来の細胞が存在すると思われるが、ドナー由来子孫個体の誕生は達成できていない。

1.2.5 ドナー体細胞由来の核を有する PGC 創出

課題 1 - 3 は、遺伝子改変を伴わない操作であり、ある意味臓器移植と同等も云える。一方、本課題 4 では遺伝子改変により PGC の核置換を行うものである。

前述のとおり PGC は受精卵の発生過程の一時期にしか得られない細胞であり、希少種については入手が困難である。一方、生きている個体の皮膚の一部などは、入手が容易であり多数の個体から採取も可能である。

本研究における最も鍵となり、また最もチャレンジングな課題である。

希少野生鳥類の体細胞の採取は生殖細胞を得るよりは遙かに容易で、加えて増殖培養も可能になった (Kuwana *et al.*, 1996)。そのために、最も採取が容易な皮膚の一部から体細胞を取りだして培養し、これをもとに始原生殖細胞を創り出すことができれば体細胞をもとに希少野生鳥類の個体増殖も可能となる。なぜならば、始原生殖細胞の増殖培養、始原生殖細胞を用いた生殖巣キメラ個体作製し、生殖巣キメラ個体を経て、移植した始原生殖細胞由来の子孫を得る技術に関してはほぼ確立しており、元となる体細胞由来の核を持つ始原生殖細胞を創り出す技術ができれば、体細胞由来の子孫個体も作出可能である。

ニワトリを材料として、UV 照射による PGC 核の不活性化評価手法として *in vivo* 系を開発した。PGC が血液循環している胚発生ステージ 14 において、PGC を採取し UV 照射した後、再び同じステージにある別胚に移植し、1 日目と 3 日目の生殖巣観察により照射された PGC の生殖巣移動とその後の増殖を評価することにより、核の不活性化を評価した。これにより、UV (254 nm) 照射強度として 1 平方センチメートル当たり 1 マイクロワット、照射時間 120 秒という条件で、急性の細胞死を伴わない PGC 核の不活性化ができることを確認した。

体細胞の例として胚性繊維芽細胞の脱核処理につい

異種間生殖巣キメラ個体

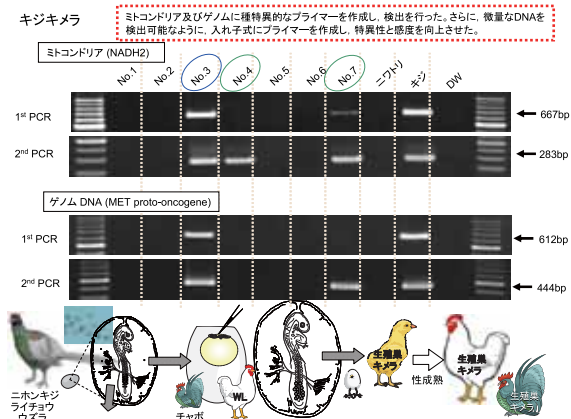


図1-2 異種間生殖巣キメラ個体作成と移植始原生殖細胞の精子への分化

て検討した。サイトカラシンBと遠心処理により核体(karyoplast: 別称 minicell)を得ることができたが、その成功率と純度の向上は今後の検討課題として残った。

上記操作で得られた、核不活性化処理をしたPGCと胚性繊維芽細胞由来の核体の融合を、ポリエチレングリコール法(PEG法)及び電気刺激法により検討した。電気刺激法の法が細胞毒性を有するPEG法よりも利点を有するとの結論はでたが、いずれの手法によっても細胞融合の効率は低く、実用レベルには到達しなかった。

得られた少数の融合細胞(PGC+胚性繊維芽細胞核)について、ステージ14の胚に移植した結果、生殖巣原基への移動と定着を検討したところ、一部の例では定着が確認できた。しかし、融合細胞の数が少なく、性成熟後の検討は出来なかった。

1.3 研究組織及び概要

希少野生鳥類の体細胞から始原生殖細胞(将来の精子や卵のもとになる祖細胞)を創出し、これを用いて生殖巣キメラ個体を作成し、性成熟の後に体細胞由来の子孫個体を得る手法を開発するために、以下の4サブテーマと体制によって研究を推進した。

(1) 生殖巣キメラ個体による子孫作出

研究分担者: 川嶋貴治(主任研究員), 今里栄男(NIESアシスタントフェロー), 大場麻生(NIESアシスタント

フェロー), 桑名 貴(室長)

培養体細胞核を導入した融合PGCを用いて作製する異種間生殖巣キメラ個体から得るための基盤技術となる異種間生殖巣キメラ個体作成法を開発することを目的。

(2) ドナー体細胞の増殖培養と標識遺伝子の導入

研究分担者: 川嶋貴治(主任研究員), 桑名 貴(室長), 橋本光一郎(NIESフェロー), 今里栄男(NIESアシスタントフェロー)

モデルとして、ニワトリの体細胞(st27胚由来)を選び、特に単離した際に細胞径が小さい(10 μ m程度)となるものを選抜し、非ウイルスベクターを用いてGFP遺伝子を導入し、細胞株して本研究に使用。

(3) 体細胞核を持つPGCの創出

研究分担者: 川嶋貴治(主任研究員), 橋本光一郎(NIESフェロー), 今里栄男(NIESアシスタントフェロー), 桑名 貴(室長)

本サブテーマでは、PGC核の不活化条件の検討と細胞融合条件の検討を行って体細胞核を導入したPGCの創出法を開発。

(4) 体細胞由来の生殖巣キメラ個体の創出

研究分担者: 桑名 貴(室長)

融合PGCをホスト鳥類胚に移植することによって生殖巣キメラ個体を作成

2 研究の成果

本研究は、従来の手法によっては絶滅を食い止められない鳥類種を最新の発生工学的的手法によって救済することを目的とし、そのために必要となる新規研究技術の開発研究を行った。

絶滅のおそれのある鳥類種は年ごとに増加しており、世界の9,797種の鳥類の12%にあたる1,186種が絶滅の危機にさらされている。国内においても、環境省の2002年改訂版レッドデータブックにあげられた鳥類は137種・亜種にのぼる。これらの鳥類種を絶滅の危機から救うためには、早急に、保護増殖プロジェクトを展開する必要がある。しかしながら、個体数が極端に減少した種は、一般に産卵率や受精率などの繁殖能力が低く、通常自然繁殖で絶対数を増やすことは極めて困難である。

希少野生鳥類の体細胞の採取は生殖細胞を得るよりは遙かに容易で、加えて増殖培養も可能になった(Kuwana *et al.*, 1996)。そのために、最も採取が容易な皮膚の一部から体細胞を取りだして培養し、これをもとに始原生殖細胞を創り出すことができれば希少野生鳥類

の個体増殖の効率的な増殖法になるはずである。なぜならば始原生殖細胞さえあれば、我々が開発してきた始原生殖細胞の増殖培養系、始原生殖細胞を用いた生殖巣キメラ個体作製法、生殖巣キメラ個体から移植した始原生殖細胞由来の子孫を得る方法を持っているからである。さらに、体細胞核を持つ始原生殖細胞を創り出すことが可能となれば、既に絶滅してしまった鳥類体細胞を用いて子孫個体を得、絶滅種を復活させることができることになり、既に絶滅した日本産トキ（体細胞は環境試料タイムカプセル棟内で凍結保存しており、その細胞は増殖培養可能）の個体復元も可能となる。

急速に発展する人間活動と経済活動域の拡大によって野生鳥類を含む野生動物の生活域との重なり、隣接化と生息域の分断化が問題となっている現状から、野生鳥類の生息域内保全は益々困難となることは明らかである。生息域外保全の主流である保護増殖に関しても幾つかの代表的な種に限って重点的に行われるために生態系全体の多様性を将来、持続的に維持していくことが可能であ

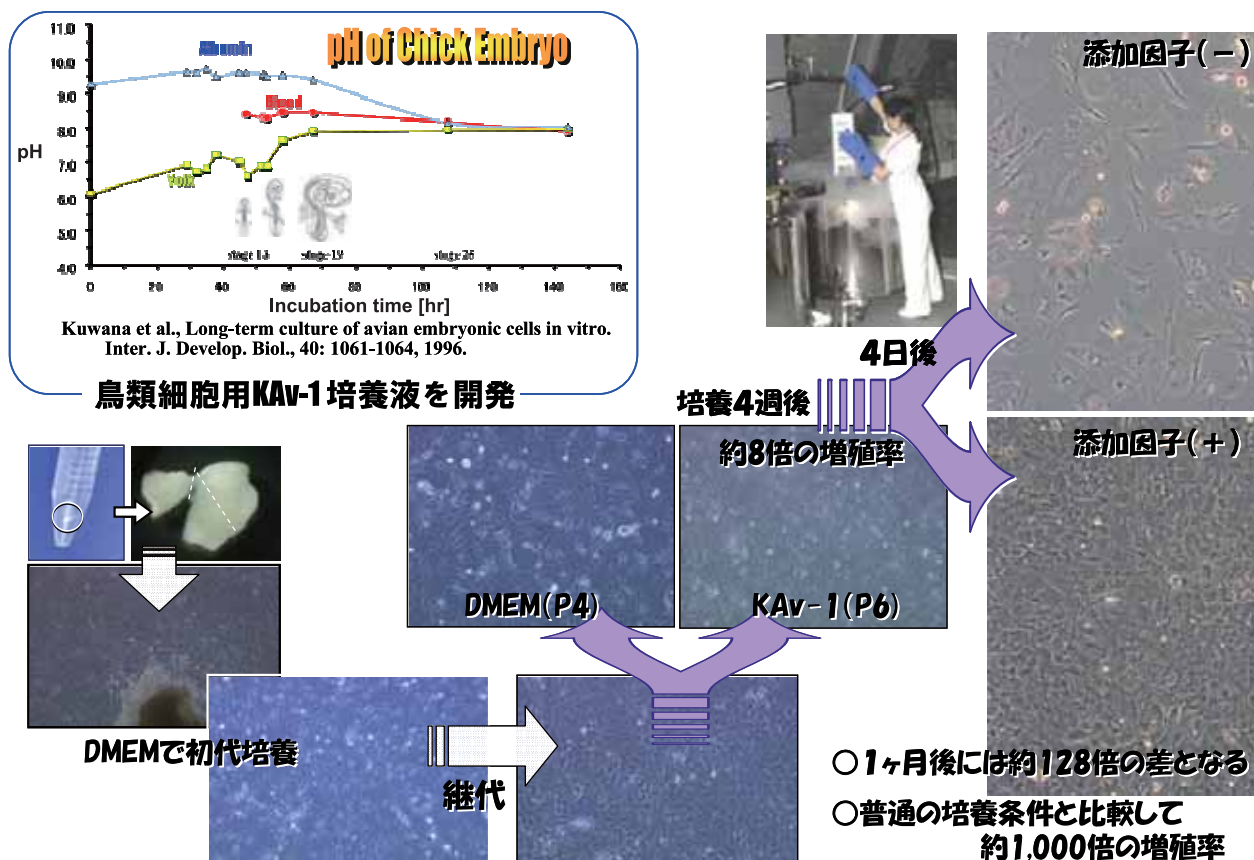


図2-1 鳥類体細胞の培養法開発と改良

るとは言い難い。このような状況下では、将来起こり得る希少野生鳥類の絶滅に直面することを想定し、絶滅希少鳥類の復元技術の基盤研究を行う必要性のあることは明白である。

近年、哺乳類においては体細胞を用いたクローン作成法が開発され、既にこの手法を用いて希少哺乳類を増殖させる試みが海外では進行している。その反面、鳥類のような卵に大量の卵黄顆粒を持つ動物種は、卵の保存や卵に対する核移植自体ができないためにクローン技術の応用や、受精卵や卵の凍結保存さえも不可能である。このような状況を解決するためには鳥類の個体発生初期に出現する始原生殖細胞への体細胞核の導入法を開発する必要がある。

更に本研究を環境研究の中で位置付けるとき、従来のあらゆる保全手段を尽くしても絶滅する希少野生鳥類種を救済可能とする新規手法開発のための基盤研究であり、本研究による技術開発によって絶滅という最悪の事態に陥った鳥類種を救済することを目的とする。また本研究の技術成果は世界に先駆けたものとなるために、絶滅寸前の数少ない希少個体からどのような生体試料を採取しておけば良いかのマニュアル作りの基礎資料となるうえに、鳥類の細胞バンク事業を推進する世界各国の研究施設の標準技術となる。

生物多様性条約第16条1において、「締約国は、技術にはバイオテクノロジーを含むこと並びに締約国間の技術の取得の機会の提供及び移転がこの条約の目的を達成するための不可欠の要素であることを認識し、生物の多様性の保全及び持続可能な利用に関連のある技術又は環境に著しい損害を与えることなく遺伝資源を利用する技術について、他の締約国に対する取得の機会の提供及び移転をこの条の規定に従って行い又はより円滑なものにすることを約束する。」とされている。近年の生命工学は飛躍的に進歩してきており、その中でも単一の細胞からの個体発生過程を制御する技術開発を目的とする発生工学は今世紀に飛躍的に進歩していく学問分野として医学、農学、環境分野で注目されている。しかしながら、日本国内のみならず世界各国において、発生工学的手法により種保全研究を実施しようとする試みはない。本研究は、すでに先導的な研究を行っている国立環境研究所を中核としてわが国の関係分野の研究者及び動物園関係者を本研究課題に結集し、基礎研究と応用現場の統合を図り、連携した研究体制のもと、発生工学を環境研究に根付かせ、加速度的に進展させるもので、国際的なニーズをふまえているのみならず、先駆的な研究といえる。これは、生物多様性維持のための研究分野で本研究所が中核的地位を占めていることを引き続き確かなものとする事と

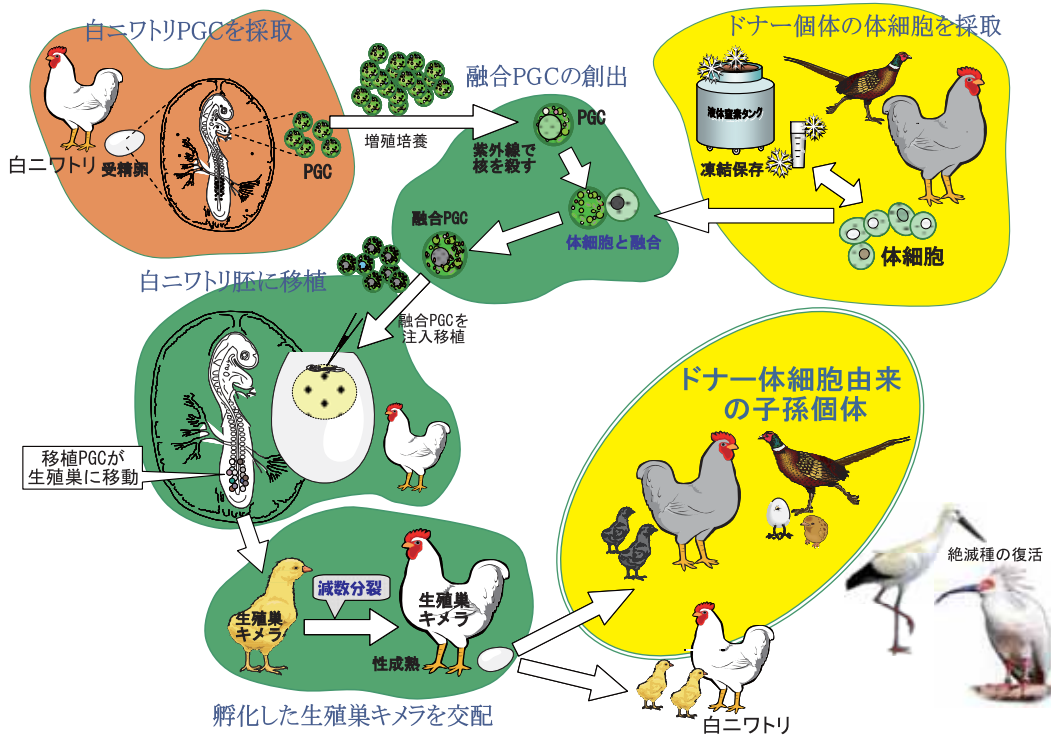


図2-2 本研究の全体計画

なるとともに、今後、自然環境モニタリング及び保護増殖事業等と、本研究分野が相互に提携することにより、生物多様性国家戦略が強力に推進されることが期待される。

また国立環境研究所環境研究基盤技術ラボラトリーにおいては、「知的研究基盤の整備」において、「5年間で200種類の絶滅の危機に瀕する野生生物の体細胞、生殖細胞及び遺伝子・・・」を保存していくこと、とあり、本研究は、この様な知的研究基盤整備の今後の方向性と応用・活用分野を示すものと位置付けられる。

この様な背景の元に本研究では後述の4つのテーマについて研究を行い、全く新規の発生工学的手法を用いた希少鳥類の個体増殖法の開発を目指した。

2.1 生殖巣キメラ個体による子孫作出

本サブテーマは、培養体細胞核を導入した融合始原生殖細胞を用いて作製する異種間生殖巣キメラ個体から得るための基盤技術となる異種間生殖巣キメラ個体作成法を開発、確立することを目的とした。

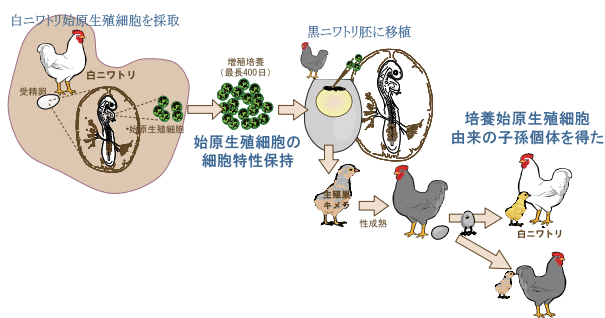


図2-3 始原生殖細胞の培養と子孫作出 (後代検定)

2.1.1 フィーダー細胞上での始原生殖細胞の *in vitro* 培養

本研究全体の基盤技術を確立するために、ドナー始原生殖細胞の *in vitro* 培養系の開発を行った。これは、希少鳥類では始原生殖細胞を採取する機会が極端に少なく、その採取可能な細胞数も少ないためである。効率的な始原生殖細胞培養を可能とすることによって、一度採取した始原生殖細胞を用いた子孫個体作出を効率よく行うことが可能となる。

ここではキジ目キジ科に属するコジュケイ、ポプホワイト、白色レグホーン系統のニワトリ胚を用いて孵卵2日目の血液循環期にある始原生殖細胞を単離し、予めマ

イトマイシンC処理によって細胞増殖を阻止したフィーダー細胞上で培養を行った。KAv-1培養液を用いて約1~2週間後には始原生殖細胞は増殖してフィーダー細胞上でES細胞様の細胞塊を形成した。この培養始原生殖細胞はアルカリフォスファターゼ活性陽性、PAS染色陽性、SSEA-1陽性であり、元々の始原生殖細胞と同様の細胞特性を保持していた。この細胞を更に長期継代し、始原生殖細胞としての細胞特性を保持していることを確認するために、ニワトリ(白色レグホーン)胚から単離した始原生殖細胞由来の培養細胞を羽毛色が異なる横斑プリマスロック系のニワトリ胚(孵卵2日目)の血流中に注入移植して生殖巣キメラ個体を作成、性成熟を待つて戻し交配によるキメラ率の検定を行った。その結果、200日を超えた長期継代培養を行って増殖した培養始原生殖細胞であっても次世代を作出する能力において無処理始原生殖細胞と全く同様の能力を示し、高率に移植した培養始原生殖細胞由来の子孫個体を得ることが出来ることを実証できた。

2.1.1.1 材料と方法

2.1.1.1.1 フィーダー細胞の調整

始原生殖細胞との共培養のために最適な繊維芽細胞を得るために、ニホンキジ、ポプホワイト、ニワトリ(日生研SPF卵C/O系)の各受精卵を孵卵し、初期胚を得た。頭部、心臓部域を切除した後に、残りの胚体の細胞をKAv-1培養液で継代培養を開始した。10代以上継代し、継代間隔が36-48時間になったものをフィーダー細胞として検定・使用した。また、この際に、幾つかの細胞をクローニングして単一な細胞系の樹立も試みた。

クローニングの際は、細胞の段階希釈による方法と、培養ウェル毎に1細胞を投入する2方法を用いて検討を行った。

段階希釈に世売る方法ではまず、25cm²培養フラスコ(IWAKI)を用いてKAv-1培養液で培養していたCSPF P17をトリプシン-EDTA 2mlで38.0℃、9分間処理した。KAv-1培養液4mlを添加して15ml遠沈管に回収し、4℃で1000rpm 3分間遠心した。上清を除き、さらにもう一回KAv-1培養液4mlで懸濁し、4℃で1000rpm 3分間遠心した。上清を除き、1mlのKAv-1培養液で懸濁して細胞数を測定すると、 1.88×10^6 cells/mlであった。1/2段階希釈を7回行って8段階の細胞濃度を作製し、それぞれに異なった培養条件(A群及びB群)を3wellずつ、

計48wellに細胞をまいた。段階希釈の細胞濃度は順に、
 ① 1.0×10^4 cells/well, ② 5.0×10^3 cells/well, ③ 2.5×10^3 cells/well, ④ 1.25×10^3 cells/well, ⑤ 6.25×10^2 cells/well, ⑥ 3.125×10^2 cells/well, ⑦ 1.5625×10^2 cells/well, ⑧78.125 cells/wellとなった。KAv-1培養液量は500 μ l/wellとした。その後、38 $^{\circ}$ Cで4日間培養した後に観察を行って細胞生存率と増殖を評価した。その間、培地交換は行っていない。

培養ウェル毎に1細胞を投入する方法では、CEF培養フラスコ(25cm² IWAKI)に0.1%トリプシンEDTAを2ml添加し、38 $^{\circ}$ Cで9分間インキュベートした。剥れた細胞を15ml遠沈管に移し、KAv-1を4ml添加して転倒混和した後、遠心分離した。トリプシン処理後の洗浄はKAv-1で2回おこなった。

遠心操作で得られたCEFのペレットを1mlのKAv-1に懸濁し、細胞数を測定した。測定結果から、 1×10^4 cells/mlの細胞懸濁液を作製し、これを段階希釈して5 cells/ μ lの懸濁液を作製した。さらに、この細胞懸濁液10 μ l(推定50 cellsを含む)を9.99mlのKAv-1に添加し、100 μ l中に0または1個の細胞を含む懸濁液を作製した。この懸濁液は、A群及びB群(コントロール群)の培養条件の培養液とした。最終的には、96well plateに各48well, 100 μ lずつ分注した。

細胞を分注した96well plateにシーリングフィルムを貼り、38 $^{\circ}$ Cのインキュベーターで静置培養した。

各繊維芽細胞系統は始原生殖細胞のフィーダー細胞として使用する12-18時間前に、80-90%コンフルエントの状態、10ug/ml MMCで3.0-3.5時間処理し、その後にKAv-1で3回洗浄した。MMC処理後の繊維芽細胞を0.1%トリプシン・EDTAで約7-10分間処理して細胞分散して、予め1%ゼラチンコート又は0.1%コラーゲンコートした48穴プレートに1ウェルあたり $8.0-12.0 \times 10^4$ となるように播種し、培養用密閉フィルムで密閉してKAv-1培養液を用いて培養した。

本研究で用いたコート用のタイプIコラーゲン溶液を調製するために、殺処分をしたウイスター系ラット(体重200-250g)の尻尾を70%アルコール中に浸したままで皮を剥ぎ、約1cm程度に切断して露出した腱を実体顕微鏡下でピンセットを用いて丁寧に引き抜くようにして集める。100%アルコール中で二度洗った後で滅菌済みプラスチックシャーレに入れて50 $^{\circ}$ Cの乾燥機内で乾燥する。1,000倍重量比の滅菌した0.1%酢酸水溶液に乾

燥した腱を入れて4 $^{\circ}$ Cで約2週間静置して、上澄みを冷蔵庫保存してコラーゲン溶液として培養皿のコティングに用いる。

2.1.1.1.2 始原生殖細胞の単離精製

コジュケイ、ボブホワイト、ニワトリ(白色レグホン系)の受精卵を38 $^{\circ}$ Cで50-54時間孵卵し、st12-15を得た。この胚の血液を採取し(図2-4)、50ml遠沈管に5mlずつ重層した11%、5.5%ナイコデنز溶液の上に約1,000個の始原生殖細胞を含む胚血液分散液を重層した。4 $^{\circ}$ C・400 \times g・15分遠心し、11%と5.5%の境界周辺部分を回収し(図2-5)、これをKAv-1培養液で洗浄した後始原生殖細胞のみを双眼顕微鏡下で回収した。

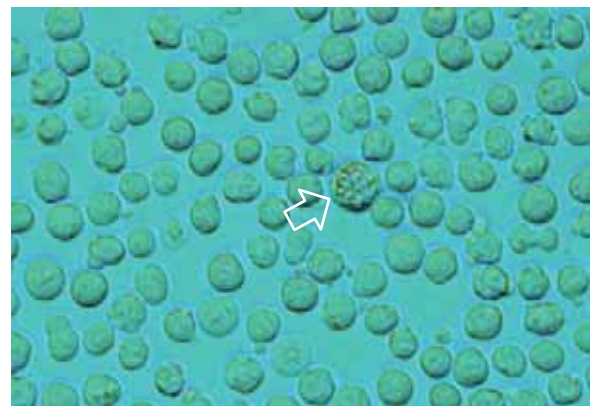


図2-4 胚血液中の始原生殖細胞(中央)

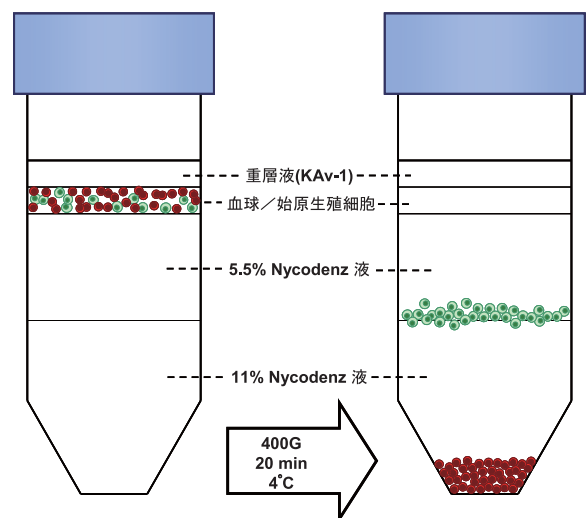


図2-5 始原生殖細胞の精製

Nycodenzの濃度の異なる相の界面に始原生殖細胞が残り、胚血球は遠心操作により沈殿する。

2.1.1.1.3 始原生殖細胞培養

予めMMC処理したフィーダー細胞上に単離精製した始原生殖細胞を1ウェルあたり500から1,000個で播種した(図2-6)。

その後は、始原生殖細胞がつくる細胞塊が大きくなる約2週間毎に1回の割合で継代を行った(図2-7)。継代の際にはピペティングにより始原生殖細胞の細胞塊を回収し、顕微鏡下で細胞塊のみを回収した。トリプシン処理により単細胞の始原生殖細胞あるいは小さなクラスターの状態になるまで分散し、始原生殖細胞数を計測した後に、準備しておいた新しいフィーダー上に始原生殖細胞を播種するという操作を繰り返した。

加えて、始原生殖細胞単独での培養条件を検討するために既に開発済みのKAv-1(鳥類専用培養液)及びMEM培地を基にして新しく開発したM1培地を用いて

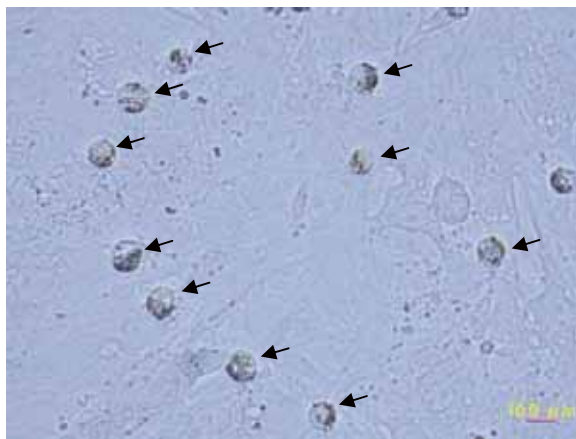


図2-6 培養開始0日のフィーダー上の始原生殖細胞(矢印)

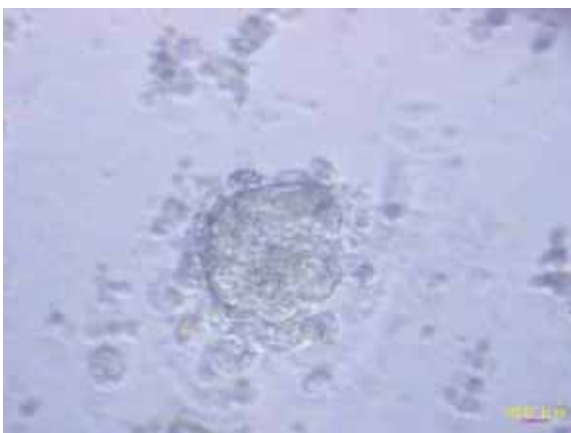


図2-7 培養した始原生殖細胞塊
培養開始後27日の細胞塊で、フィーダー細胞上に接着した状態で増殖している。

検討を行った。

白色レグホーン系ニワトリの受精卵を38℃でstage 14まで孵卵し、胚血液を周縁静脈からガラス製マイクロピペットを用いて吸引回収し、これを抗赤血球ポリクローナル抗体によるnegative selection方によりAutoMACSを用いて始原生殖細胞のみを回収した。

回収した始原生殖細胞はCorning Transwell culture plate (24 well)を使い、wellでは700μl、Transwell側では100-200μlの培地を入れて培養した。1週間毎にフィーダー細胞を交換し、3週間培養後にチャンバー内の細胞を分散させた。その中で付着傾向ではあるものの、ピペティングで容易に継代可能な細胞で、形態がPGC様の細胞が確認された。これらを48wellプレートに移し2ヶ月間培養を続け、接着性PGC様細胞(adhesive PGC-like cell: adPGCL)として樹立した。始原生殖細胞の単独培養の際には、この様にして樹立したadPGCLをフィーダーの代わりとし、同じく血液中より回収した2万個程度の始原生殖細胞を共培養した。

2.1.1.1.4 始原生殖細胞の組織化学的同定

アルカリフォスファターゼ(ALP)染色の際には、培養細胞塊をPBSで洗い、10%ホルマリンで10分間固定し、超純水で洗浄後に市販のALP染色キットを用いて染色した。また、PAS染色を行うために、培養細胞塊をPBSで洗い、10%ホルマリンで10分間固定し、超純水で洗浄後に0.5%過ヨウ素酸水溶液で室温・5分間処理した。超純水洗浄後にシッフ試薬で室温・5分間処理した。亜硫酸水で室温・1分処理後、超純水で洗浄し顕微鏡観察を行った。どう用に始原生殖細胞の免疫組織学的同定法であるSSEA-1免疫染色のため、培養細胞塊をPBSで洗い、ブアン固定液で20分間固定した。その後PBS洗浄、超純水を経て0.3%過酸化水素水で30分間処理し、超純水洗浄後PBSに5分浸した。抗SSEA-1抗体を3%BSA/PBSで1/100に希釈し、これを4℃で一晩試料に反応させた。最終的にPBS洗浄後にABCキットとDABキットで呈色反応を行いSSEA-1の存在を確認した。

同様の手法を用いて最終的にはCFT-1, SSEA-3, SSEA-4, CD57, VASA, Oct-4についても発現を評価した。

2.1.1.1.5 培養始原生殖細胞を用いた生殖巣キメラ個体
作出と後代検定

継代培養開始後16日, 45日, 93日, 106日, 218日,
及び207日培養後に凍結保存した白色レグホーン系ニワ
トリ始原生殖細胞由来の細胞を雛の羽毛が黒色の横斑ブ
リマスロック系の胚(孵卵52時間)の周縁静脈に注入
移植した。継代培養した始原生殖細胞由来細胞塊をトリ
プシン・EDTA/PBS(-)処理を行い単細胞にまで分散

し, KAV-1培養液で洗浄後に200細胞/胚で注入移植を行っ
て生殖巣キメラ個体を作成した。

2.1.1.2 結果と考察

2.1.1.2.1 フィーダー細胞の調整

胚性線維芽細胞の中でも, 特定の発生段階や胚部域由
来で始原生殖細胞と共培養した際に増殖補助機能に際が
あるかどうかを含めてフィーダー細胞とする細胞系統を

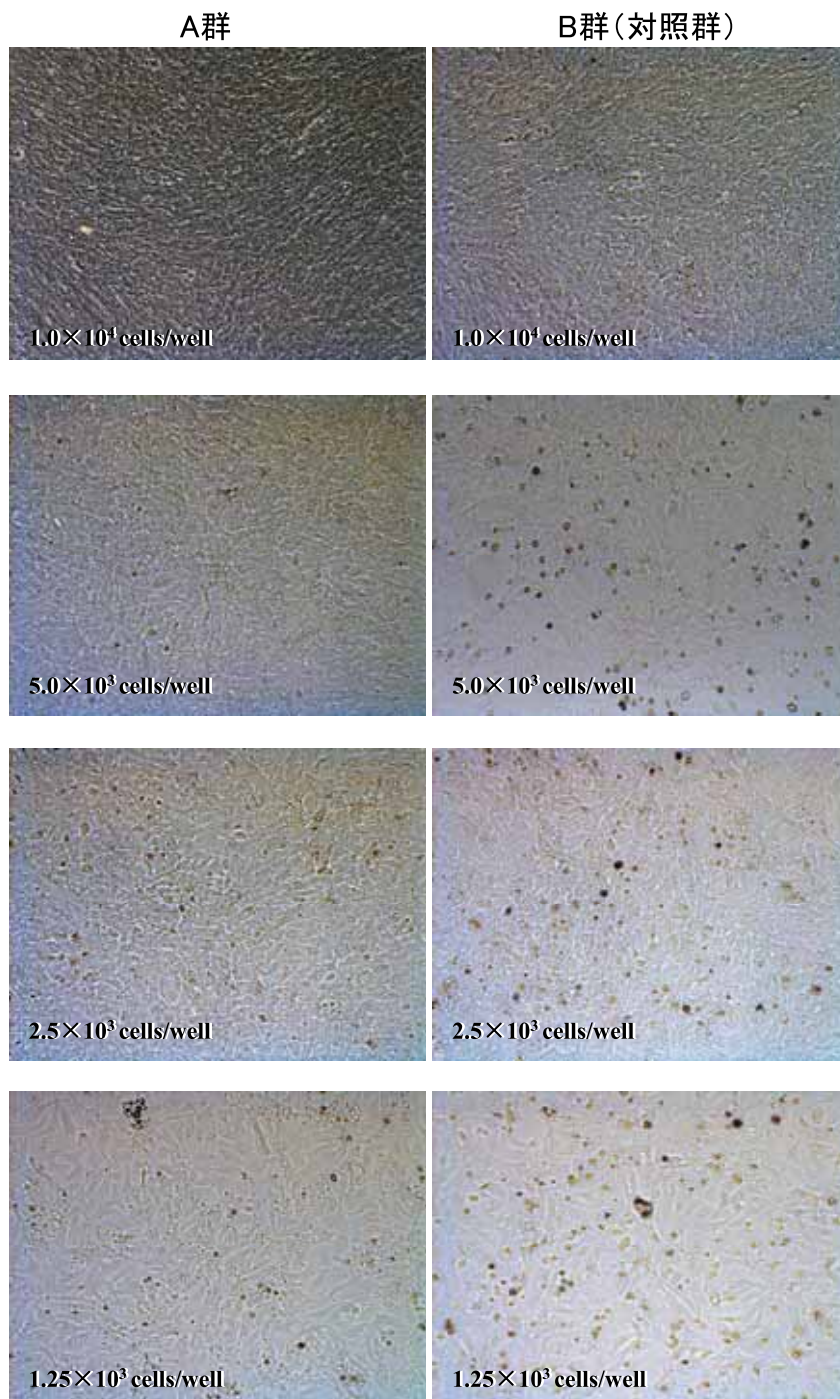


図2-8 中密度段階希釈による繊維芽細胞増殖(培養開始4日目)

選抜した。更に、始原生殖細胞増殖を安定させるために、鳥類では報告例のないフィーダー細胞のクローニングをも試みた。

まず、段階希釈による希薄細胞密度での培養を評価するために、培養開始から4日目にA群とB群の写真を撮り比較した(図2-8及び図2-9)。これによっても明らかのように、すべての実験区において、A群の方がB群に比べて、生細胞に対する死細胞の割合が低く、細胞生

存率が高く、結果的には細胞増殖が速かった。

観察比較したところ、すべての実験区においてA群の方が対照群のB群よりも、死細胞の割合が低く、A群の方が細胞生存率が高く、その分細胞増殖が速いのではないかと考えられる。

続いて、培養ウェル毎に1細胞を投入する方法では、KAv-1のみで単一の細胞を4日間培養したとき、播種から翌日までの観察で細胞が確認できた28 wellのうち13

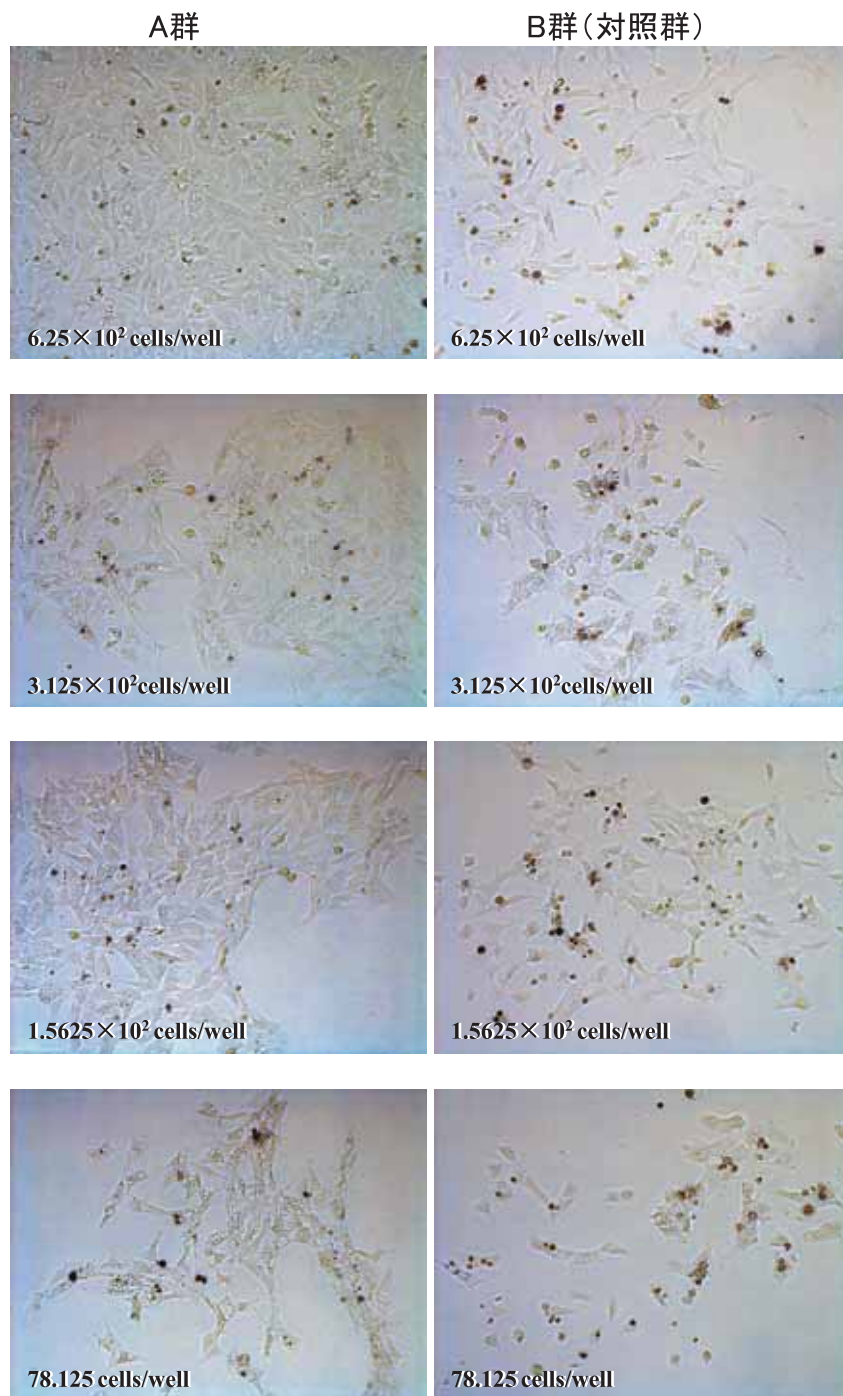


図2-9 低密度段階希釈による繊維芽細胞増殖(培養開始4日目)

wellの細胞が増殖した。その後、これら13 wellで細胞が死滅もしくは減少したのは9 wellだった。4日目の観察で増殖が確認できたのは、4 wellだった(表2-1)。細胞が確認されたwellのうち、約14%でクローニングに成功した。

A群条件で単一細胞を4日間培養したとき、播種から翌日までの観察で細胞が確認できた13 wellのうち、7 wellの細胞が増殖した。その後、これら7 wellで細胞が死滅もしくは減少したのは2 wellだったため、培養初日

表2-1 B群(対照群)の細胞数測定記録

Well No.	培養0日目	培養1日目	培養3日目	培養4日目
A-1	1	5	38 (5)	ca.51 (10)
A-2	-	1	(0)	(0)
A-3	-	1	7 (4)	1 (5)
A-4	1	1	2	(2)
A-6	-	2	3 (2)	3 (1)
B-5	-	2	6 (4)	1 (5)
B-6	(1)	(1)	×	×
C-1	1	7	13 (5)	7 (7)
C-3	1	0	0	0
C-4	1	(1)	×	×
C-6	1	4	7	6 (1)
D-1	-	2	0	0
D-2	1	(1)	×	×
D-3	1	(1)	×	×
D-4	1	(1)	×	×
D-5	(1)	(0)	×	×
D-6	1	(0)	×	×
E-1	1	2	2 (2)	0
E-2	(1)	(1)	×	×
F-1	1	2 (1)	2 (2)	0
F-2	1	2	16 (2)	17 (7)
F-5	1	(1)	×	×
G-1	-	(1)	×	×
G-4	1	3	9 (4)	16 (13)
G-6	1	(1)	×	×
H-2	1	2	0	0
H-3	1	(1)	×	×
H-5	1	0	0	0

- : 細胞が確認できなかった 単位: 細胞数 (個)
 () : 死細胞数
 × :
 ca. : (略) circa 細胞数の測定が困難であったため、目視で確認できるおおよその数を示した

に単一の細胞のみが確認できたwellのうち4日目の観察で増殖が確認できたのは、5 wellだった。細胞が確認できたwellのうち、約38%がクローニングに成功した。この測定結果には、培養初日の時点(細胞播種ご接着に必要な約3時間後)で接着細胞が2個以上見つかったwellは含めていない(接着までの3時間で細胞分裂した可能性もあるが、ここではクローニング成功例には算入しなかった)。細胞が2個確認された4 wellはいずれも細胞が増殖したが、そのうち1 wellは途中で死滅した。(表2-2)

今回の実験結果から、A群条件で対照群よりも明らかにクローニングの成功率が高くなることが確認できた(表2-3)。しかし、希釈法で細胞を播種した為、比較対照の数に差が出ることや、1 wellあたりの細胞数が2個以上になることがあった。

今回使用したFibroblastは様々な種類の細胞を含んでいた為、wellごとに異なる形態をもつ多様な細胞が得られた。増殖速度もそれぞれ異なっていた(図2-10)。

表2-2 A群の細胞数測定記録

Well No.	培養0日目	培養1日目	培養2日目	培養4日目
A-10	1	(1)	×	×
A-12	1	2	0 (2)	0
B-8	2	2 (1)	10 (3)	32 (3)
B-9	2	3	12 (2)	6 (3)
B-10	-	1	0	0
B-11	1	1	0	0
C-7	1	2	6	Ca.45
C-9	1	0	×	×
D-7	1	0	×	6 (3)
D-11	1	0	×	0
E-12	-	3 (4)	24	5
F-8	-	(1)	×	×
F-11	-	2 (2)	18 (3)	18 (3)
G-7	2	3	ca.30 (3)	ca.60 (11)
G-8	2	3	ca.28 (3)	ca.76 (3)
G-9	1	3	ca.23 (1)	ca.45
H-8	1	3 (1)	ca.24 (4)	ca.47 (5)

- : 細胞が確認できなかった 単位: 細胞数 (個)
 () : 死細胞数
 × :
 ca. : (略) circa 細胞数の測定が困難であったため、目視で確認できるおおよその数を示した

表2-3 培養条件による繊維芽細胞クローニング

well No.	Exp.Groupe	Day 1	Day 4	Day 10	Remarks
A-1	B				死んで黒く見える細胞が多い。細胞がかたまっていて、均一に広がっていない。
A-3	B			写真なし (day 4では生存1個)	day 4以降細胞数が減少した。Day 10でほぼ死滅し、細胞が見つからなかった。
C-1	B				day 4以降細胞数が減少しday 10でほぼ死滅。
C-6	B	写真なし 生細胞数:1個			細胞が少しずつ増加しているが、大きな液胞が多く、このまま死滅した。
F-2	B				増殖を続けているが、死細胞も多い。
G-4	B				増殖を続けていて、細胞数も多いが、死細胞も多い。上皮性様細胞。
C-7	A	写真なし 生細胞数:2個			増殖中。死んで黒く見える細胞は少ない。Day 10で20% confluent。
D-7	A	写真なし (day 0では生存1個)			day 1は細胞を確認できなかった。Day 10で細胞がほぼ死滅した。
E-12	A				増殖中。死んで黒く見える細胞は少ない。Day 10で40%confluent。
F-11	A				増殖中。死んで黒く見える細胞は少ない。細胞がかたまっていて、均一に広がっていない。Day 10で5% confluent。
G-9	A				他の細胞と形状が大きく異なる。増殖しているが、液胞のようなものが細胞に付着している。Day 10で20% confluent。
H-8	A				増殖中。死んで黒く見える細胞がやや多い。Day 10で30% confluent。

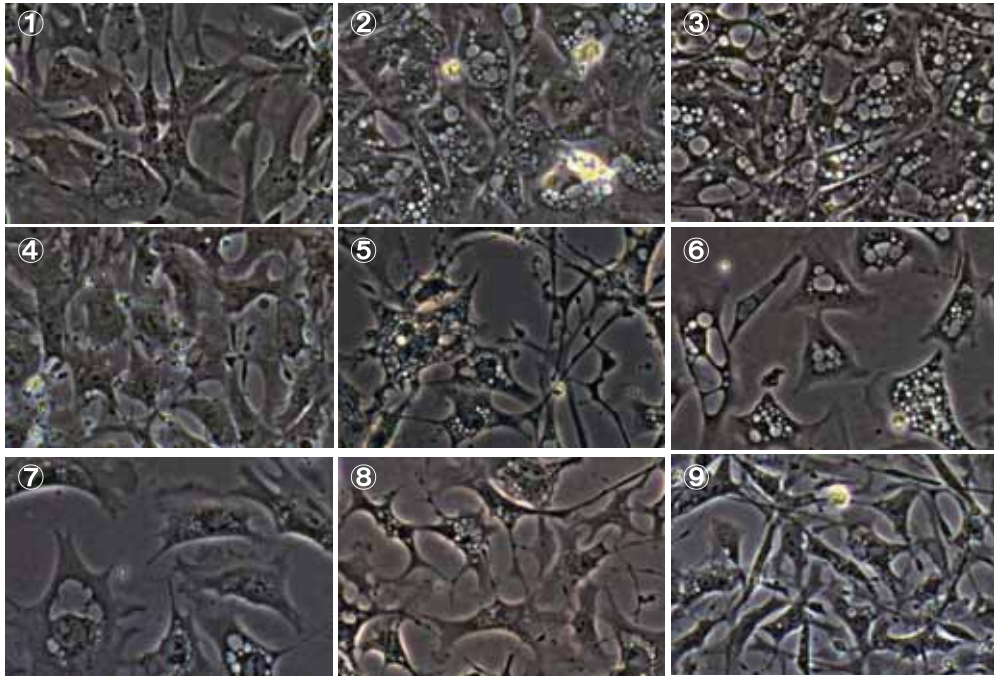


図2-10 クローニングによって得られた細胞系の例
細胞接着性，増殖率，接触阻止の程度，形態，大きさ等に大きな幅がある（全て22継代培養の同一倍率写真）

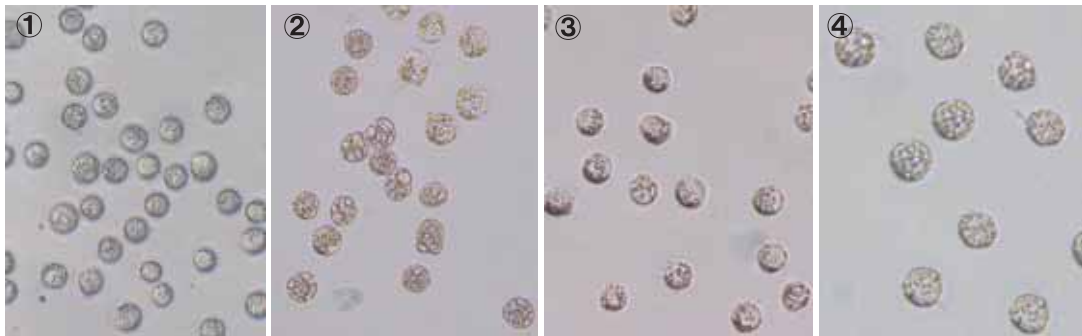


図2-11 単離精製後の始原生殖細胞
①：ニワトリ ②：ニホンキジ ③：コジュケイ ④：ボブホワイト

2.1.1.2.2 始原生殖細胞の単離精製

2.1.1.1.2の図2-5に示したように，コジュケイ，ボブホワイト，ニワトリ（白色レグホーン系）の受精卵を38℃で50～54時間孵卵して得た発生段階12～15の胚から胚血液をガラス製マイクロピペットを用いて吸引採取した。KAv-1培養液で洗浄した後に血球／始原生殖細胞の混合液として11%の上に重層した5.5% Nycodenz-KAv-1溶液の上に薄く重層して遠心後，重層した両層の界面に集まった高濃度の始原生殖細胞懸濁液を採取，KAv-1洗浄後に双位相顕微鏡下で始原生殖細胞のみをピックアップして精製した（図2-11）。

2.1.1.2.3 始原生殖細胞培養

2.1.1.2.3.1 フィーダー細胞の選抜

始原生殖細胞の培養には2.1.1.2.1で調製した繊維芽細胞系のうちで，始原生殖細胞を増殖させる能力が高いものを評価・選抜した。評価にはstage12-15の胚から単離精製した新鮮な始原生殖細胞を用いた。図2-12にこのようなフィーダー細胞の評価例を示している。

倒立位相差顕微鏡観察によって始原生殖細胞の増殖を追跡することを考慮して，候補となる繊維芽細胞系の中から死細胞数が少なく，扁平で液胞が比較的少なく光学的な障害になりにくいもの，更に細胞の接触抑制が比較的にかかるもの，かつ基質への接着が強くコンフルエント

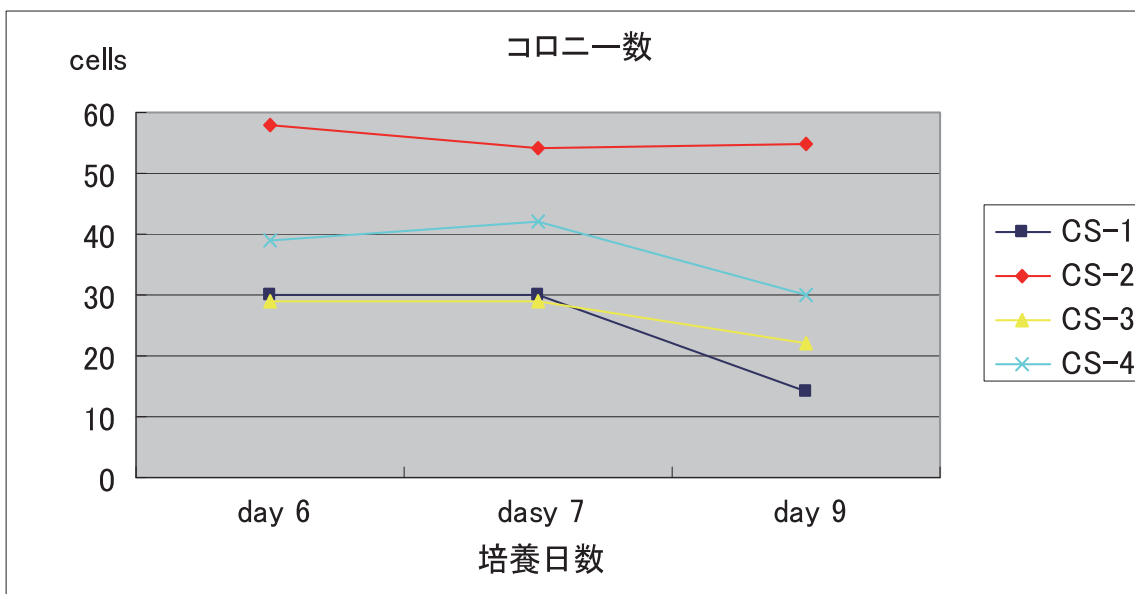
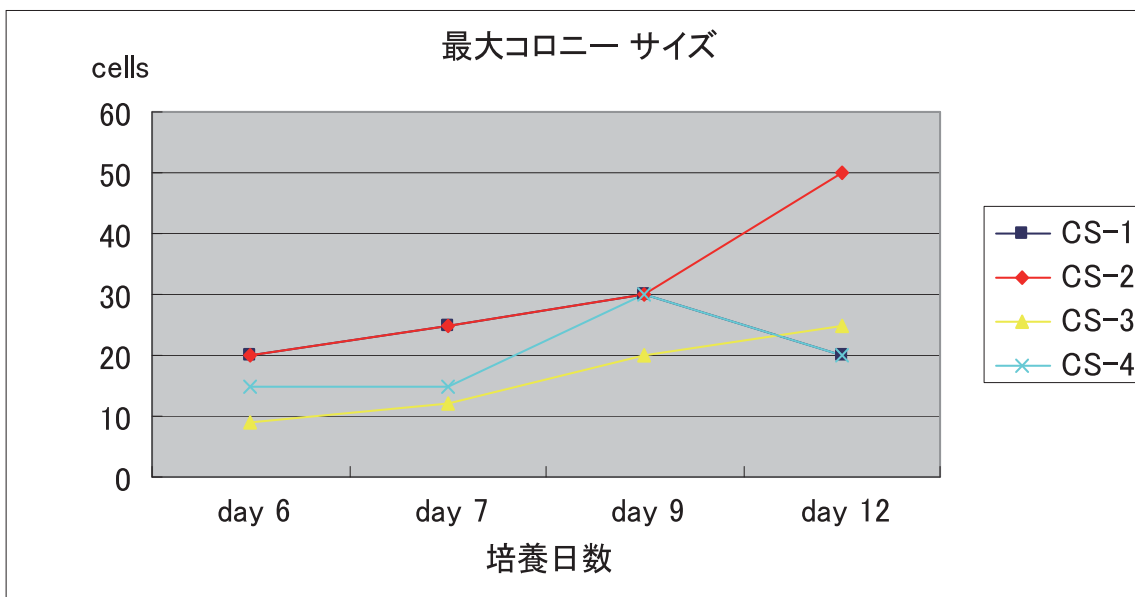
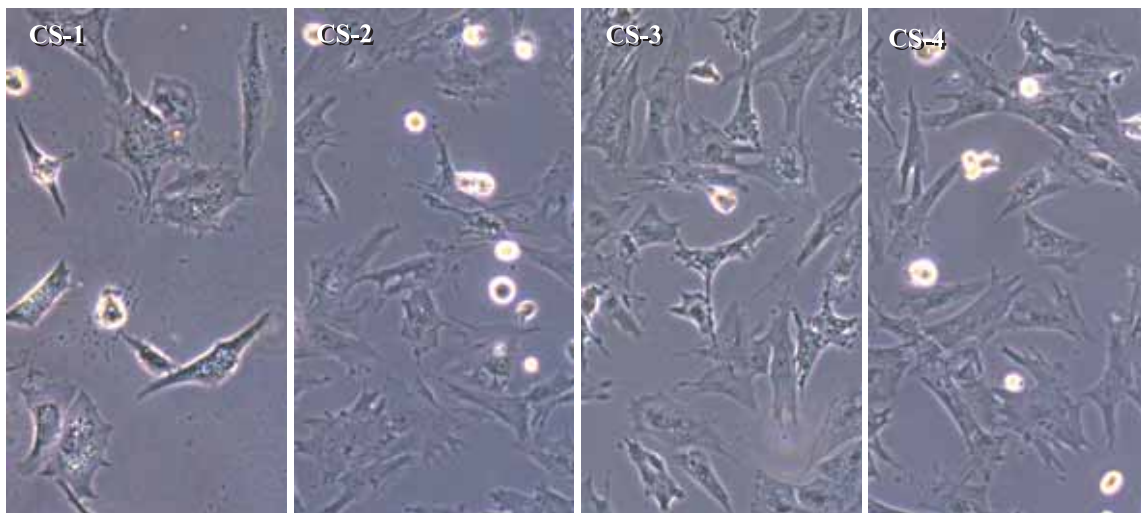


図2-12 フィーダー細胞の評価例

上段：評価対象とした細胞系（CS-1～4）

中段：各培養日数での最大コロニーに含まれる始原生殖細胞数の変化

下段：各培養日数でのコロニー数の変化（コロニーは5個以上の細胞を含むもののみ。また、細胞残渣が多く培養12日の測定不能）

になった際にも細胞層の端がめくれることが少ないもの、加えて細胞数の倍加速度が3～5日程度のもを予め選択した。上記の条件を満たすものを順次凍結保存した上で、4～5系統ずつ図2-12に示すような評価を行っていった。

始原生殖細胞の培養の際には生細胞数の総数が比較的
最大コロニーに含まれる始原生殖細胞数と全コロニー数
に相関が有るために、フィーダー細胞の一次評価には最大コロニー中の始原生殖細胞数と全コロニー数を測定した。図の例では、最終的にCS-2系統の繊維芽細胞が最も始原生殖細胞のフィーダーとして適していると判断した。

この様にして、最終的にフィーダーとして最適な細胞系を幾つか評価・選択し、以後の始原生殖細胞培養に使用した（図2-13）。

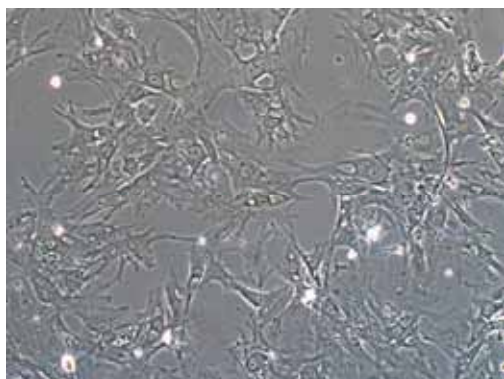


図2-13 始原生殖細胞のフィーダーとして最適な繊維芽細胞の例

2.1.1.2.3.2 フィーダー細胞上での始原生殖細胞培養

予めMMC処理によって細胞増殖を阻止したフィーダー細胞を 4×10^4 程度の数でコラーゲンコートした96 wellプレートに播種して細胞接着が完了した後にKAv-1洗浄し、各wellに100～500個の始原生殖細胞を播種した（図2-14）。MMC処理を行ったフィーダー細胞層は2週間強の期間は徐々に死滅して遊離する細胞があるものの、充分始原生殖細胞を増殖させることができた（図2-15）。ただ、始原生殖細胞塊が大きくなり、おおむね2週間を過ぎると死滅する細胞塊が増える（図2-15F）。そのため始原生殖細胞塊を最長2週間毎に継代する必要があった。

大きくなった始原生殖細胞塊はピペティングによって容易にフィーダー細胞層から遊離するために、緩慢なピ

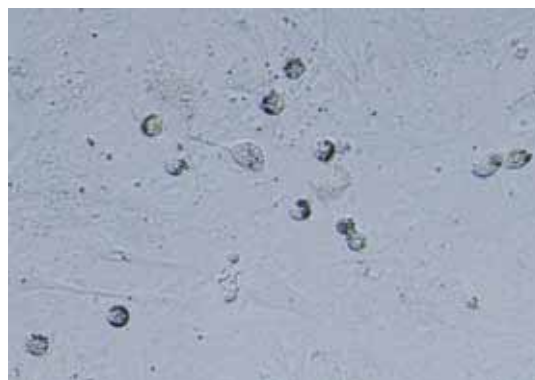


図2-14 播種直後の始原生殖細胞
播種直後は細胞内の油滴によって容易に他の細胞と判別可能

ペティングを行って細胞塊を回収した後始原生殖細胞塊のみを倒立顕微鏡下でガラス製ピペットを用いて採取する（図2-16）。単離した始原生殖細胞塊をトリプシンEDTA溶液で処理して細胞分散して、初代培養と同様にMMC処理したフィーダー細胞層上に播種した。全細胞培養期間にわたって始原生殖細胞数を測定していった際に、図2-17に示すような始原生殖細胞に形態的に酷似したフィーダー細胞層由来の細胞が出現することがあるために、始原生殖細胞を播種しないwellで出現した始原生殖細胞酷似の細胞数をコントロールとして、測定した始原生殖細胞数から差し引いた細胞数を始原生殖細胞の数とした。また、最終的には始原生殖細胞特異的なモノクローナル抗体CFT-1（鳥類でのSSEA-1）での生体蛍光染色を行って培養細胞が始原生殖細胞由来であることを一定期間毎に確認した（図2-18）。

播種する始原生殖細胞の数（細胞密度）が増殖に及ぼす影響を評価したところ図2-19に示すように、至適細胞密度は200～400であることが判明した。同様にコロニー形成率は播種数が200以下だと有意に低くなる（図2-20）。ただし、形成されるコロニーを構成する細胞数は各実験群で有意の差は認められなかった（図2-21）。ただし最大コロニーを構成する細胞数は、当初の播種細胞数200以下、200～400個、400以上の各群でそれぞれ、 39.3 ± 26.2 , 65.3 ± 19.7 , 73.5 ± 27.1 （mean \pm SD, -200 n=16, 200-400 n=17, -400 n=13）であり、初期播種数が200個以下の場合には他群に比較して有意に低くなった（ $P \leq 0.01$ ）（図2-22）。

また、始原生殖細胞の増殖率に関してはかなりの幅がある結果となった（図2-23）。約40日間の培養期間中に

数十倍から2,500倍程度と大きな幅を持って増殖したことは、胚血液中から採取した始原生殖細胞の性質が異なっているのか培養条件の検討が更に必要なかの検討が今後必要となってくる。ここでは示さないが、幾つかの実験群では計算上11~12回程度の細胞分裂の後に増殖速

度が急激に低下する現象が見られ、*in vivo*で卵巣や精巣での始原生殖細胞増殖回数と一致するのかもしれない。ただし、低率ではあるものの培養日数が400日を越える実験群もあることから今後の検討課題として研究を継続すべきである。

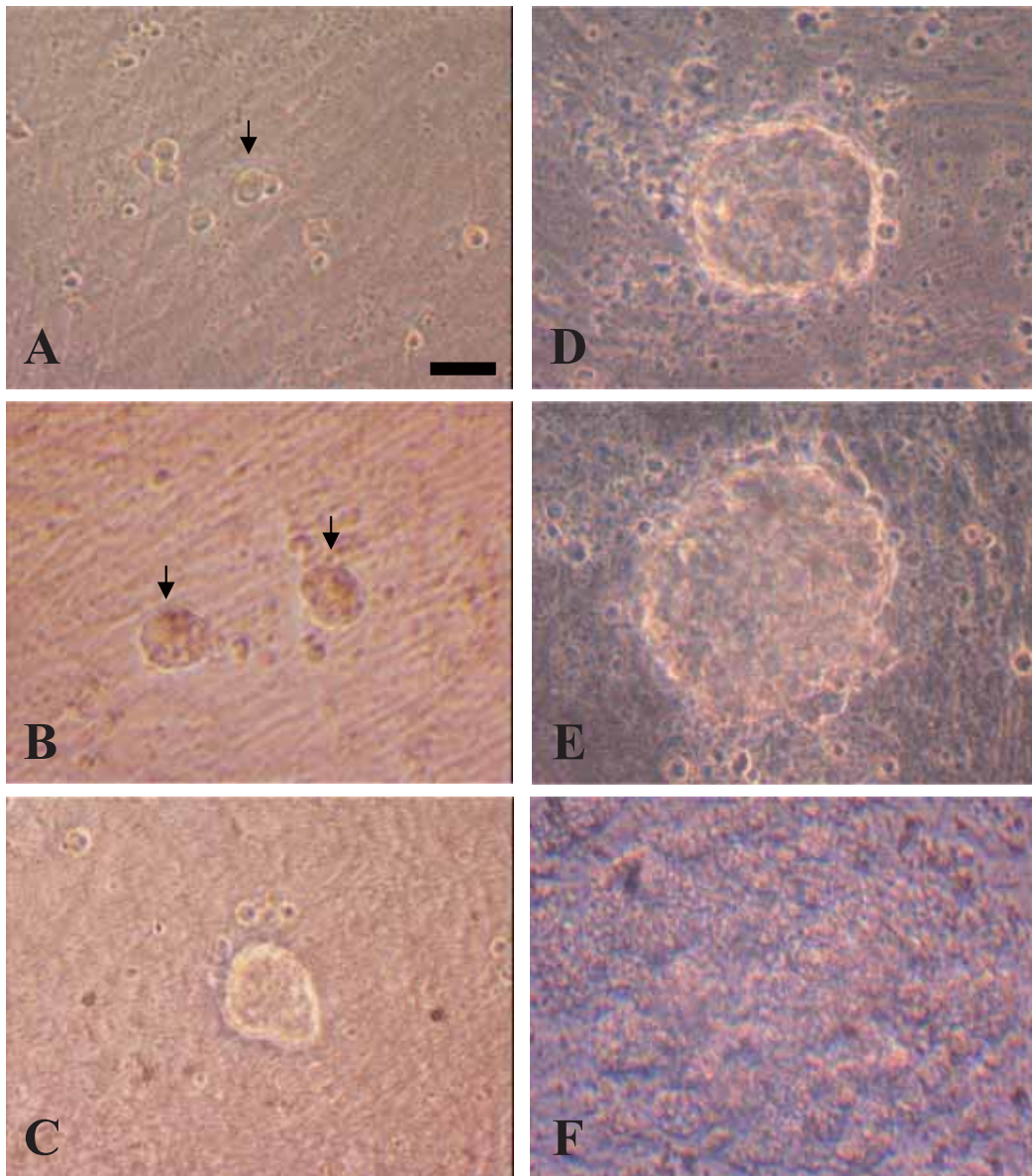


図2-15 始原生殖細胞の各増殖段階

位相差顕微鏡下で始原生殖細胞数を計測することができる。

A : 3個の始原生殖細胞 B : 同10個 C : 同20個 D : 80個の始原生殖細胞 E : 120個の始原生殖細胞 F : 死滅した始原生殖細胞塊 バーは50 μm を示す

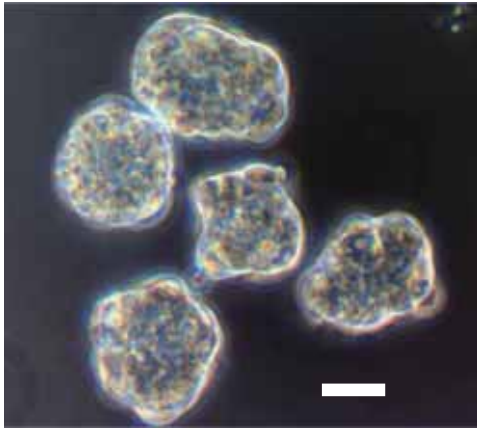


図2-16 単離してきた始原生殖細胞塊
 ピペッティングによって簡単に遊離する。
 トリプシンによって単細胞に分散して継代した。
 バーは50 μ m

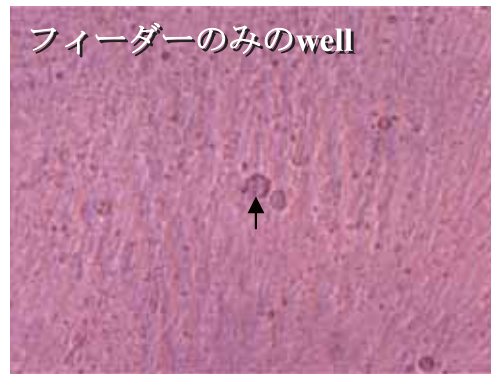
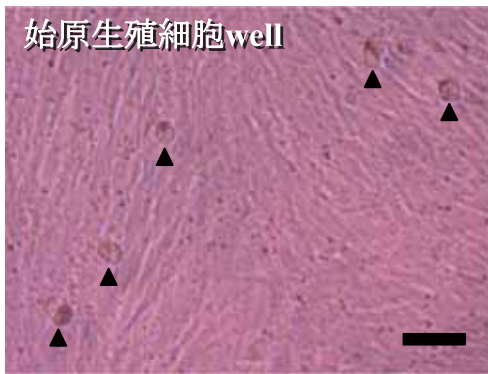


図2-17 フィーダ由来の判別困難な細胞
 左の写真中の黒い矢頭印は播種された始原生殖細胞。右の写真中の矢印の細胞は始原生殖細胞に形態が極めて似たフィーダ細胞由来の細胞。バーは50 μ m

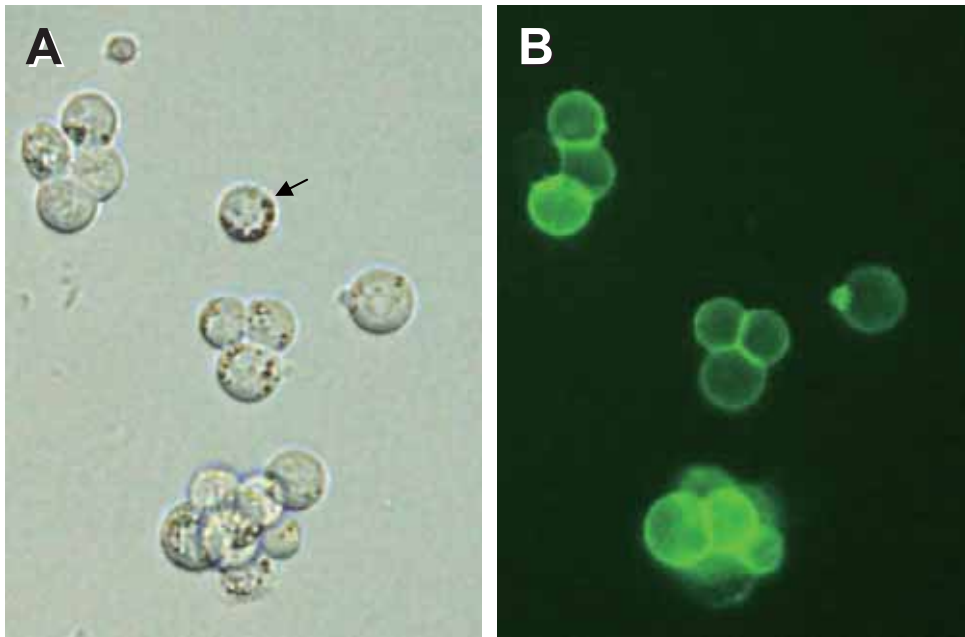


図2-18 培養始原生殖細胞とCFT-1蛍光染色による同定
 培養開始から57日目の始原生殖細胞を単離・分散した位相差顕微鏡像 (A) と同視野の抗CFT-1蛍光染色像 (B)
 矢印の細胞はCFT-1抗体陰性となっているが、他の細胞はCFT-1陽性であることが分かる。

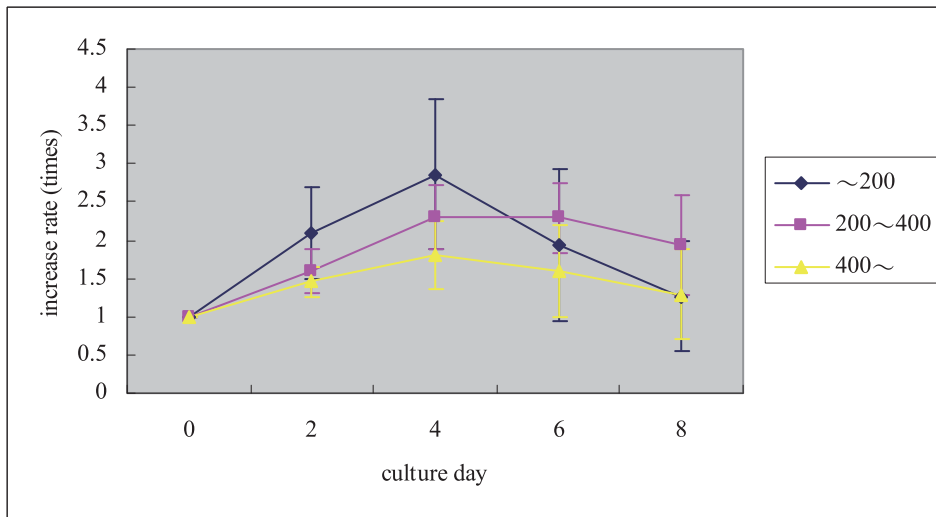


図2-19 播種細胞密度による増殖の差 (mean±SD, ~200 n=16, 200-400 n=16, 400- n=14)
 培養開始時に200個以下または400個以上の場合は200から400個の場合に比較して有為に増殖率が低い結果となる (P≤0.01)

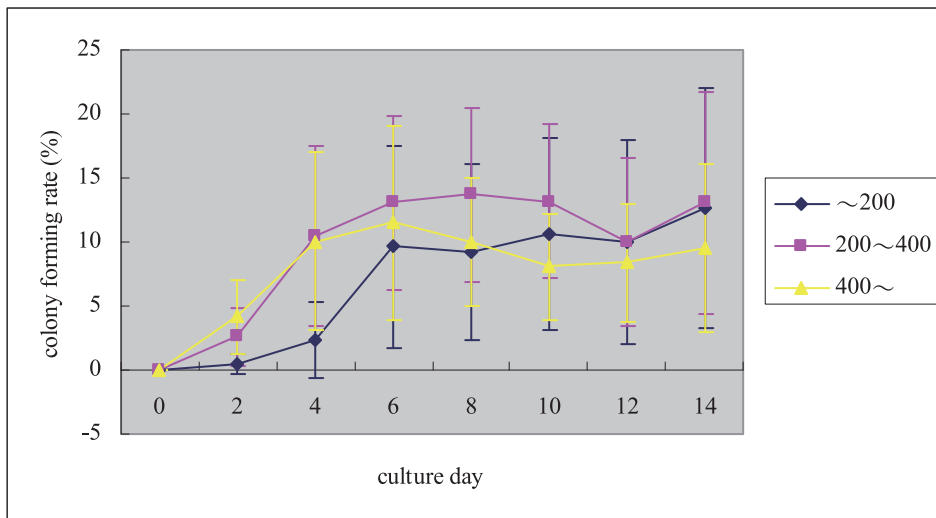


図2-20 細胞塊の形成率 (mean±SD, ~200 n=16, 200-400 n=17, 400- n=13)
 培養開始時に400個以上の場合は他の実験群と比較して有為にコロニー形成率が低い (P≤0.05)

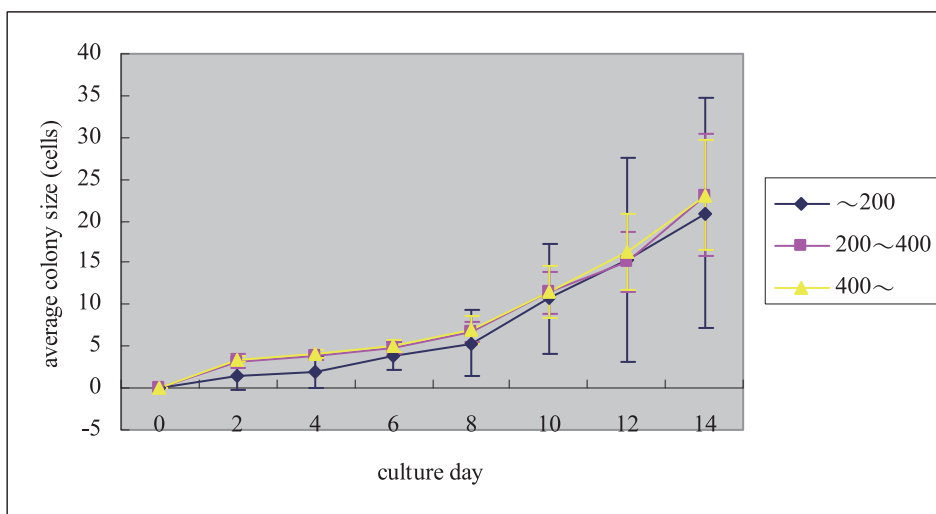


図2-21 播種細胞数とコロニー構成細胞数 day14 (mean±SD, ~200 n=16, 200-400 n=17, ~400 n=13)
 播種した始原生殖細胞数は細胞塊を構成する細胞数には有意の影響が無い

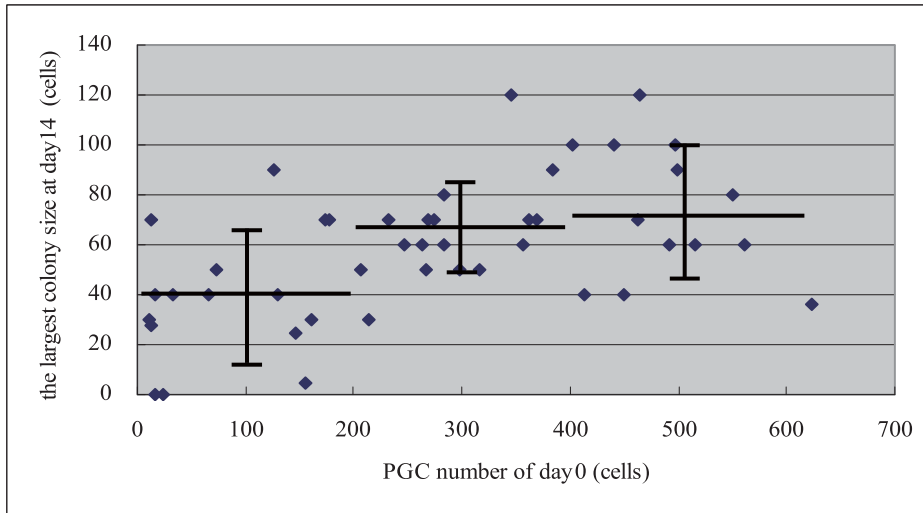


図2-22 最大コロニーサイズ (培養14日目 n=46)
 最大コロニー構成細胞数は播種の際に始原生殖細胞数が200以下のものよりも200以上の
 場合の方が有意に多い ($P \leq 0.01$)。

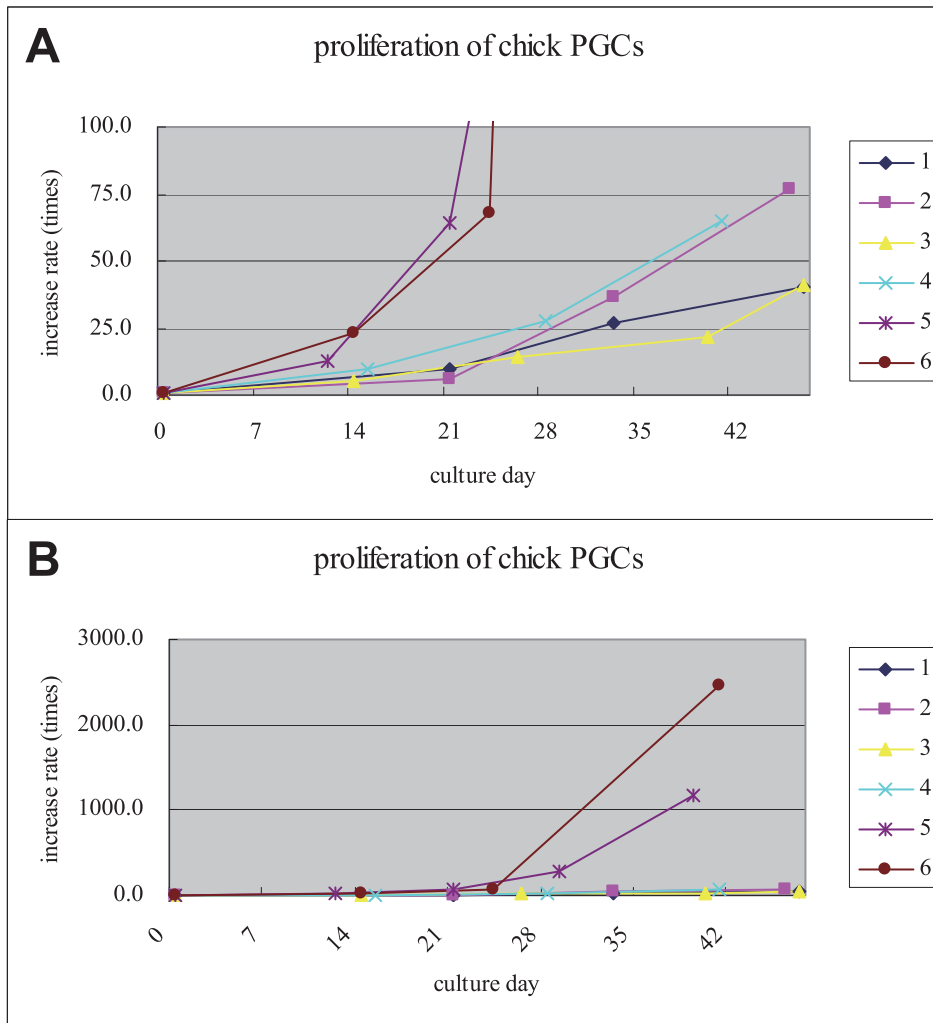


図2-23 始原生殖細胞の増殖曲線
 培養45後の実験群1～4での始原生殖細胞数はおおよそ30～80倍であり (A), 実験群5
 と6では40日間に約1,000～2,500倍にまで増殖した (B)。

2.1.1.2.3.3 始原生殖細胞単独での培養

単離した1,334個の始原生殖細胞を Trans well (T/W) 側で培養し、well 側にはPGCL (始原生殖細胞様細胞：primordial germ cell like cells) を培養した。二日後の観察では数は変わらないものの、二つの細胞が癒着しているようなものや、肥大化しているものが認められた (図2-24)。8日後、新しいT/Wに移し替えたために、細胞数が減少したが、その数日後にはまた増殖ををはじめ、18日後には接着性の細胞が増殖してくるのを確認した (図2-25)。

この接着性の細胞が出現してくる現象が起こると、同well内の他の細胞も増殖する傾向が見られるため、これ以後は接着性の細胞の比率が多くなっていく度にピペティングではがれたものだけを新しいT/Wへ移動するようにした。

培養を始めてから22日後には、接着性の細胞と一緒に、球形でT/W底面に張り付いているものが出現しているのを確認した。これらは、Nycodenz後の始原生殖細胞含有細胞群をそのまま培養して出現してくる始原生殖細胞様の細胞 non-coat wellで培養した時に見られる始原生殖細胞の形態に酷似している (図2-26)。

培養開始後20日以降は接着性で紡錘型の細胞ばかり増える傾向になった (図2-27)。そのために、25日目にピペティングで剥がした細胞をM1で培養し、剥がれなかったものは継続して同じ方法で培養を続けた。

なお、KA_v-1中で培養していた細胞をゼラチンコートwellで培養するとaggregateを形成する。しかしピペティングしても全てがバラバラにはならず、塊のままなので、癒着型のaggregateといった状態に近い。

一方、non coat wellで継続的に培養する場合は、aggregateは形成されず、底面に軽く接着している状態のものと、底面に強固に張り付いているものと二種類が混在する。前者は軽くピペティングすることで剥がれる。また、これらピペティングで剥がれる細胞は始原生殖細胞に似ているため、それらをPKH26で染色した後、孵卵2.5日目の胚血中に注入移植し、5.5日目の生殖巣付近を観察した。サンプル3個体のうち、2個体はそれぞれstage 26

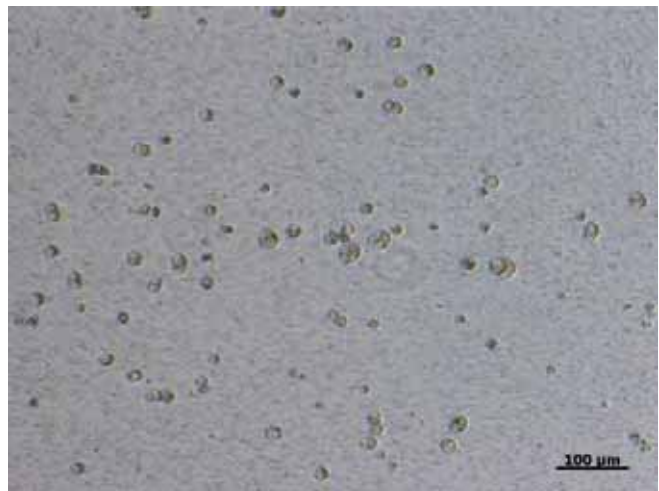


図2-24 始原生殖細胞培養3日後 (T/W側)
始原生殖細胞が認められ、肥大化しているものや、2個が癒着しているように見えるものもある。

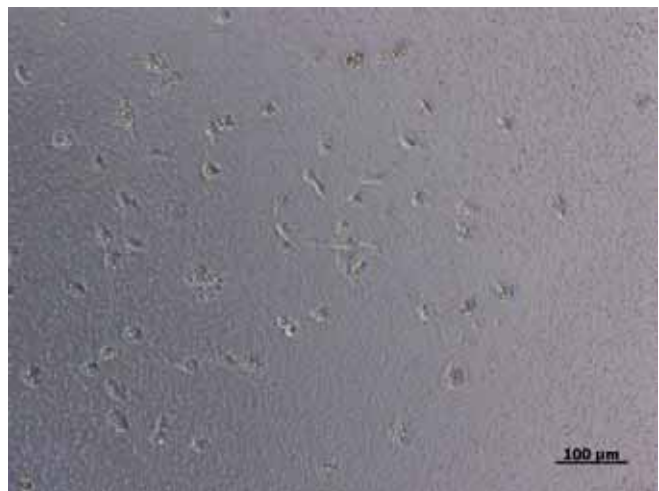


図2-25 始原生殖細胞培養18日後 (T/W側)
始原生殖細胞は接着型細胞に形態変化している。

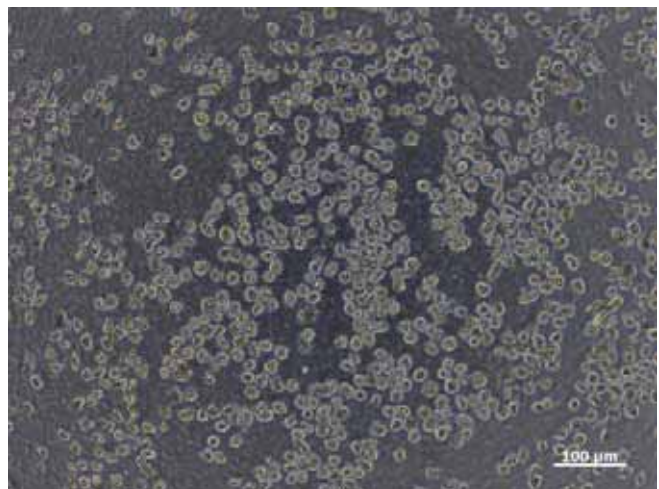


図2-26 始原生殖細胞培養22日後 (T/W側)
始原生殖細胞は増殖し、接着型細胞が減少しているように見える。

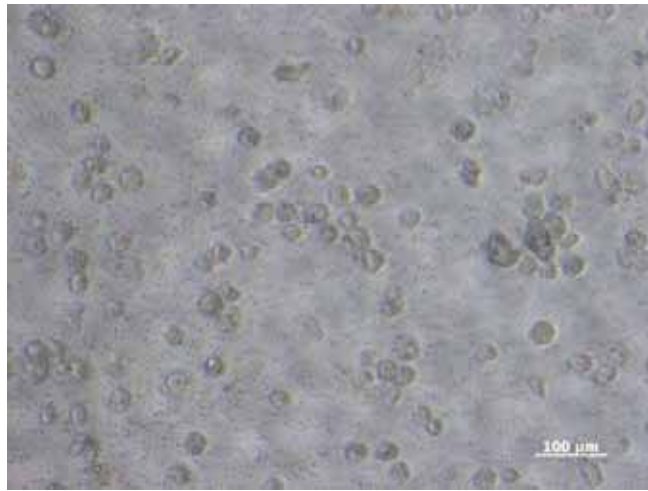


図2-27 始原生殖細胞培養24日後 (T/W側)
球形の細胞もあるが、接着型の細胞が多く見られる。

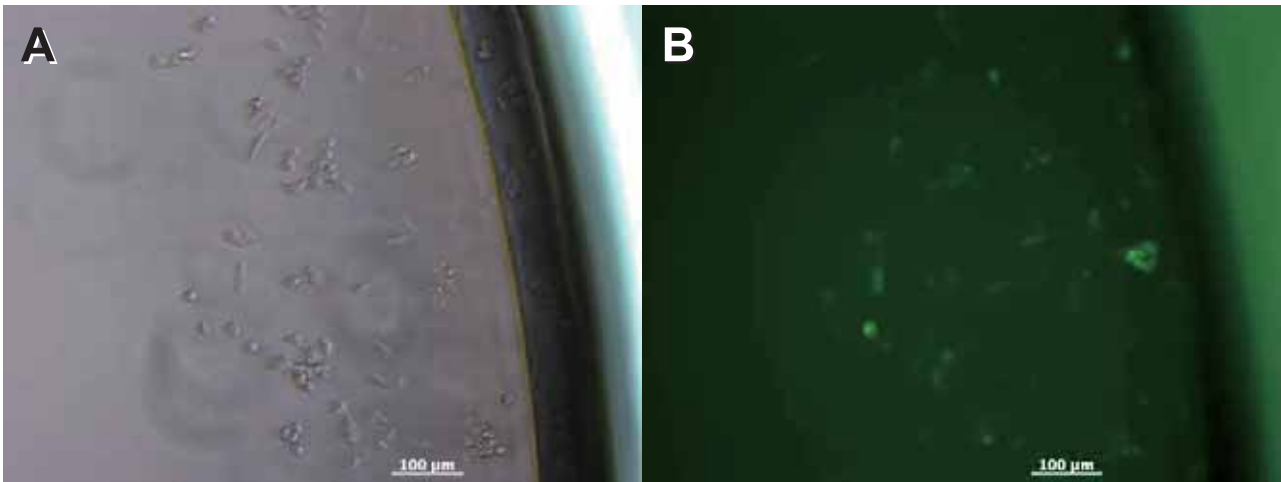


図2-28 培養37日目の始原生殖細胞 (T/W側)
A：位相差顕微鏡像 B：抗CFT-1抗体蛍光像，球形の細胞はCFT-1陽性で，接着型の細胞は弱陽性，もしくは陰性になっている。

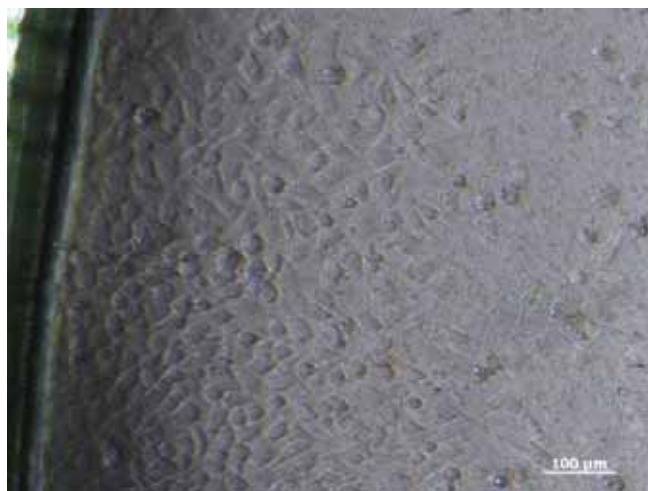


図2-29 培養25日目の始原生殖細胞 (T/W側)
PGCLが増えているように見えるが，これはT/Wのメンブレン裏側に付着したものが，写真に写りこんでいる。顕微鏡で見る限りは区別しづらいが，ピペティングしても全く剥がれないので，裏側の細胞であった。

と stage 20 付近で発生が stop していた。1 個体のみ正常に発生していたが、生殖巣には移植した蛍光を持つ細胞は見られなかった。だが、腸間膜に 3~5 個程度と、中腎近傍に数個の陽性細胞が確認できた。

M1 培地に変更して培養したものは、少しずつ増えていくものの接着性の細胞が頻繁に見られるようになるため、96well プレート内で増殖させることを試みた。しかし、それから 2 日後に観察したところ、全て紡錘型の接着性細胞に変化していた。これに CFT-1 を直接加えて観察したところ、球形の細胞は CFT-1 陽性を弱いながらもいまだに保持しており、完全に紡錘型になっている細胞はわずかに陽性、もしくは陰性となっていた (図2-28)。

また、T/W にて KAv-1 のままで培養し続けたものは、時折接着性のものが出現し、T/W のメンブレン裏側に PGCL がくっついてしまう現象が見られるが (図2-29)、そのたびに新しい well に変えていけば、少しずつ増殖していく傾向にあった。

一方 T/W にて M1 で培養し続けたものは、徐々に接着性細胞が増殖していくようになり、T/W を新しい物に代えてもやはり接着性になってしまい、最終的には完全に球形のものは見られなくなった。

ただし、上記の方法は KAv-1 で培養してから M1 に移行した状態であるため、より条件を一定にする目的で、はじめから M1 を使用して培養する方法も試した。

まず、M1 培地を用いて PGCL に依存することなく始原生殖細胞の培養が可能かどうかを試すため、T/W 側に収集した始原生殖細胞を、well 側に胚血液から始原生殖細胞を pickup した残りの細胞 (pickup しそこねた PGC も含む) を入れて培養を試みた。

well 側に入れた pickup 余りの細胞からは始原生殖細胞や PGCL に似た細胞が出現してくる。これらは、T/W (KAv-1) で始原生殖細胞培養中に出現してきた接着性細胞を剥がして 24 well プレート内で培養した時の細胞形態 (図2-30) や、M1 で培養したときに出現してきた紡錘型の細胞とよく似ている。

このような形態となる始原生殖細胞を含有した細胞群を PGCL の代わりとし、T/W 側に純粋な始原生殖細胞を入れて培養すると、培養開始後一週間は始原生殖細胞の形態や個数に変化はないが、11 日目で個数がかなり減少する。この時期、well 側では、血

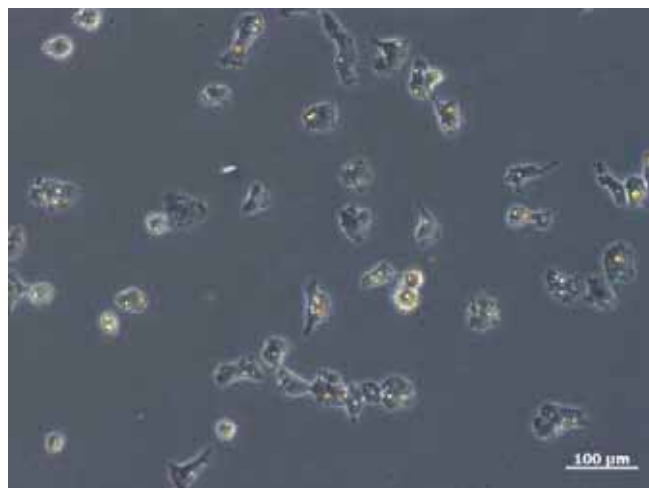


図2-30 培養24日目の始原生殖細胞
培養開始24日後 (通常の24 well に移動してから10日後)。
PGC が接着性の細胞に変化している。



図2-31 培養44日目の始原生殖細胞
T/W なしで培養はじめて30日、内ゼラチンコート well で培養して 2 日後。始原生殖細胞は aggregate を形成している。

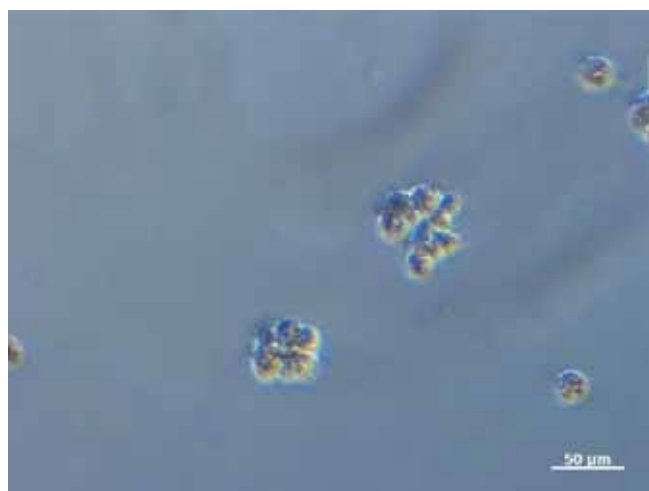


図2-32 ピペッティングした培養44日目の始原生殖細胞
T/W なしで培養はじめて30日、内ゼラチンコート well で培養して 2 日後のものをピペッティングで剥がしても、は完全にはバラバラにならない。始原生殖細胞から細胞仮足が出ているのが見える。

球様の細胞がなくなり、接着型の細胞が見られるようになる。

その後、18日目に、始原生殖細胞が緩やかに増殖し始め、20日目には顕著に増殖していた。この現象はKAv-1培地の場合と同じであるが、それよりも全体的に少し遅いように感じられる。

本法で培養した始原生殖細胞は他の培養法を採った際と異なり、aggregateを形成することはなかった。これは、本研究ではnon-coat plateを使用したためかもしれない。実際、KAv-1を用いて培養中の始原生殖細胞をT/Wからnon-coat plate (48 well)に移した場合は接着性と球形の細胞が混在したまま増殖するが、それらをゼラチンコート済みの同plate wellで培養すると、小さいaggregateを形成するからである(図2-31)。

また、ピペティング後に残った接着性の細胞をそのまま培養した場合、殆どの細胞が接着性を保持するものの、一部球形の細胞も出現するようになる。この現象はT/W中で培養していた場合の始原生殖細胞の動向と非常によく似ている。T/Wでの培養では、始原生殖細胞が一端減少してから後に再び増殖する過程でも接着性の細胞が同様に出現してくることから、始原生殖細胞が接着性とそうでない球形の形態を行き来しているようにも考えられる。

さらに、通常のwellに移動してからの培養PGCはピペティングである程度容易に剥がすことができるが、

剥がした細胞を観察すると、仮足が付いた状態であるものが多く見られる(図2-32)。non-coatの場合でも少々仮足が出現するものの、ゼラチンコート程の顕著な仮足は見られず、aggregateもほとんど形成しないことから、aggregate形成にはゼラチンもしくはコラーゲンコートが必須であることが示唆された。

2.1.1.2.4 始原生殖細胞の組織化学的同定

培養を行った始原生殖細胞由来の細胞に関して、その細胞学的形質が保存されているか否かを確認するために、培養期間の途中で適宜組織化学的手法を用いて始原生殖細胞同定を行った。特に後述の2.1.1.1.5において生殖巣キメラを介して子孫個体作出に至らなかった単独培養を行った始原生殖細胞由来細胞に関しては詳細に検討した。

単独培養を継続していくと、接着性を持った細胞が頻繁に出現してくる(図2-33)。これらの細胞は組織化学的には始原生殖細胞としての特性を失っていると考えられたものの、接着性の細胞の存在によって浮遊型の細胞の増殖が可能となっている可能性も高い。そのために、浮遊型の細胞に関して始原生殖細胞特異的な抗原の評価を行った。図2-34の倒立顕微鏡像から見ると、この浮遊型細胞は正常な始原生殖細胞と全く区別がつかないほど酷似している。

この浮遊性を保持している始原生殖細胞由来の培養細胞に関して組織化学的検討を行った(表2-4)。その結果、

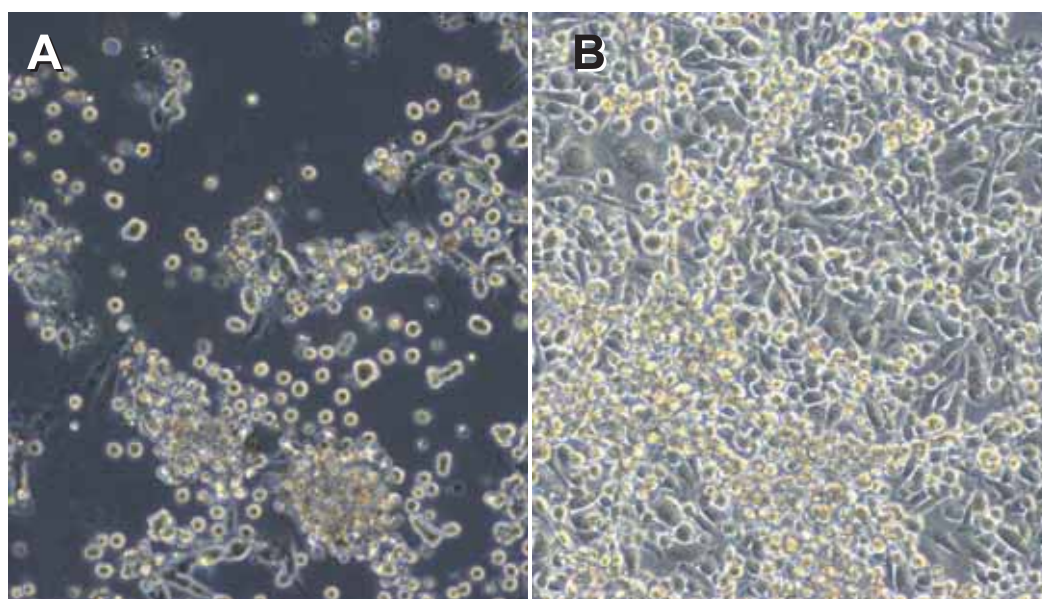


図2-33 単独培養条件で出現する始原生殖細胞由来の接着性細胞
A: 低濃度の位相差顕微鏡像 B: 高密度の接着性細胞(放置すると接着性細胞が優勢となる)

この浮遊性の細胞は生体から単離精製直後の始原生殖細胞と変わらず、細胞化学的特性を保持していることが判明した。

フィーダー細胞層上で長期培養した始原生殖細胞についても組織化学的特性が保持されているかどうかの検討

を行った結果、形成している細胞塊の場合（図2-35）及び細胞塊を分散した場合（図2-36）の両者ともアルカリフォスファターゼ活性、PAS染色性、SSEA-1活性共に陽性で始原生殖細胞としての組織化学的特性を良く保存していた。

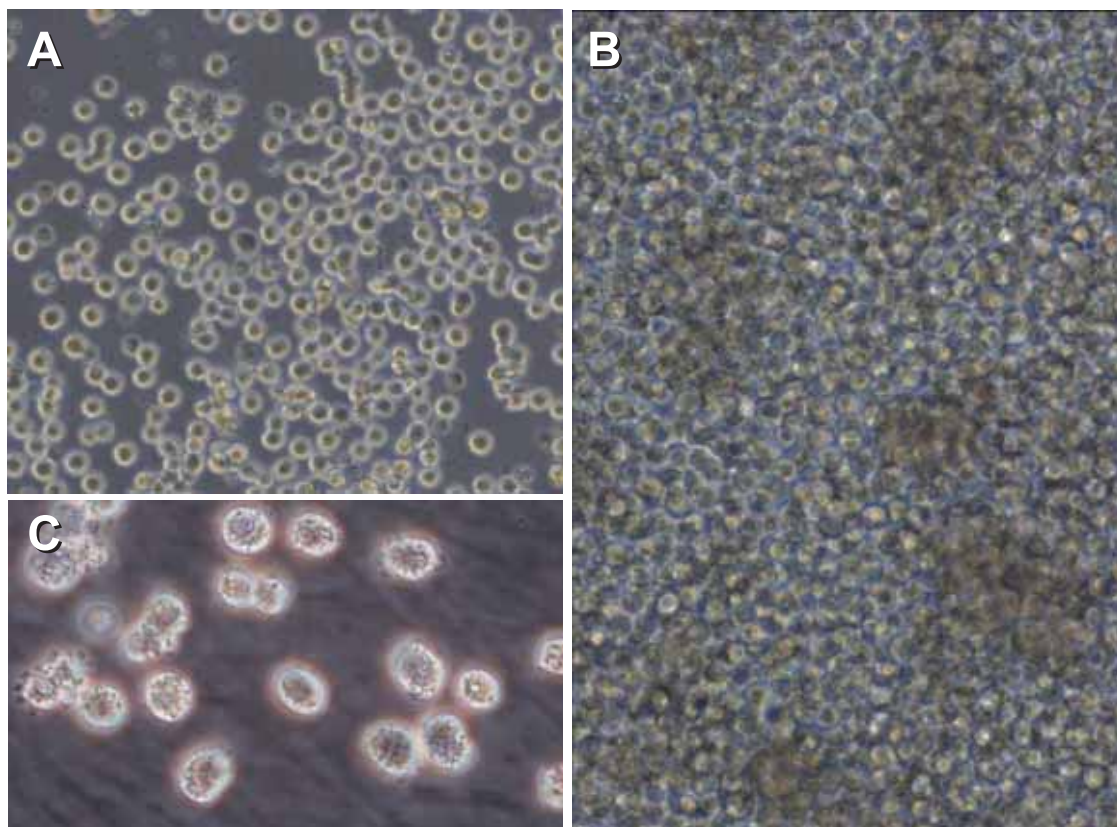


図2-34 単独培養条件下で増殖を続ける始原生殖細胞由来の浮遊生を保持した細胞
A: 低濃度の位相差顕微鏡像 B: 同倍率の高濃度像 C: 浮遊性細胞の高倍率位相差像

表2-4 始原生殖細胞と培養細胞の組織化学的検討

	SSEA-1	SSEA-3	SSEA-4	CD 57	VASA	Oct-4	PAS
単離直後の始原生殖細胞	++	-	-	+	+	+	+~±
単独培養した始原生殖細胞	++	-	-	+	+	+	+

生体より単離精製直後の始原生殖細胞と2年間単独分散培養した始原生殖細胞由来の細胞との組織化学的比較を行ってみると、若干の強さの違いはあるものの培養細胞は始原生殖細胞としての細胞化学的特性を保持している。

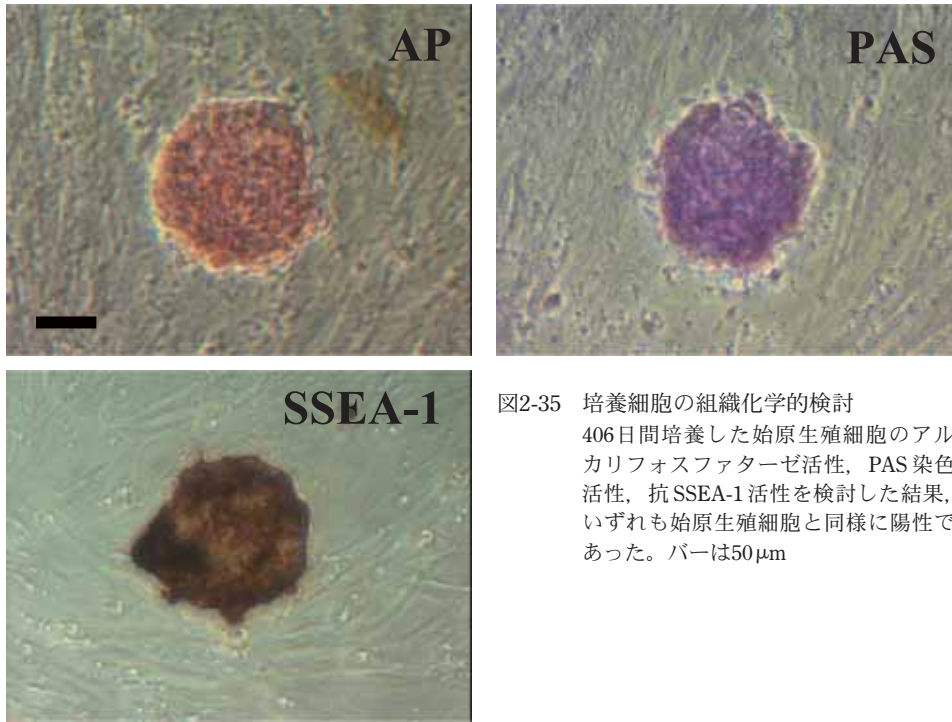


図2-35 培養細胞の組織化学的検討
406日間培養した始原生殖細胞のアルカリフォスファターゼ活性, PAS染色活性, 抗SSEA-1活性を検討した結果, いずれも始原生殖細胞と同様に陽性であった。バーは50 μ m

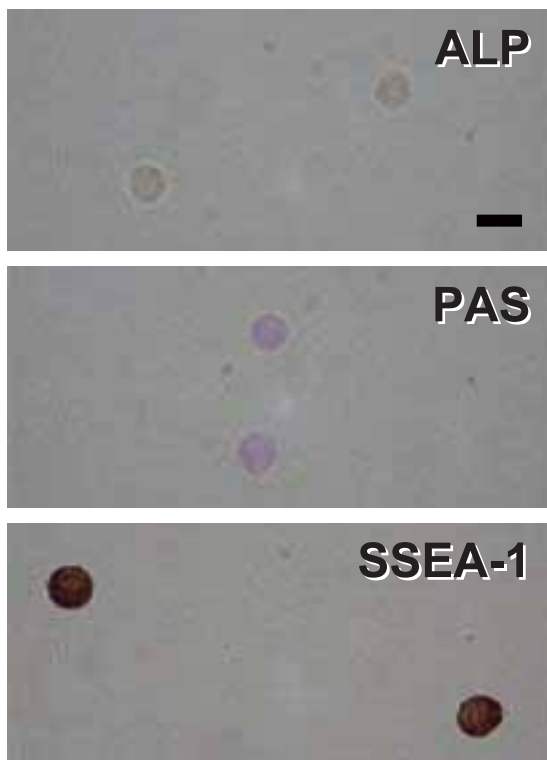


図2-36 共培養した始原生殖細胞の組織化学
培養218日目の始原生殖細胞の細胞塊をトリプシンEDTAで分散して組織化学的特性を評価した。アルカリフォスファターゼ活性は生体から採取直後の始原生殖細胞に比べて弱い。
バーは10 μ m

2.1.1.2.5 培養始原生殖細胞を用いた生殖巣キメラ個体 作出と後代検定

始原生殖細胞は培養開始後2日目に3-4細胞の細胞塊を形成し始め, 日ごとに大きくなった。最も大きな細胞塊では4日目で8個, 6日目で14個, 8日目で36個, 10日目で50個, 12日目で70個, 14日で120個の始原生殖細胞から形成されていた。細胞塊が120個以上になると死滅したため, 約2週間でリプシン処理により細胞塊を分散して継代して長期培養を行った。

各継代操作での始原生殖細胞数を培養0日の始原生殖細胞数で割り, 増殖率を求めたところ, 培養当初はゆるやかだった増殖率が最初の継代後に増加し, 2回目の継代後はさらに増加した。最も増殖率が高いものでは, 培養40日で1,000~2,500倍となった。

また, これらの始原生殖細胞由来細胞はいずれの段階でもPAS染色陽性, SSEA1免疫染色陽性であったが, ALP染色に関しては陽性又は陰性を示し若干不安定であった。そのために, このフィーダー細胞層上で76日間増殖培養した後の始原生殖細胞をPAS染色性陰性の始原生殖細胞を持つニホンウズラ胚 (stage 14) の血液中に注入移植し, stage 20の胚の生殖巣原基 (生殖上皮) 内に移植した培養始原生殖細胞が到達するかどうかを検討した。その結果, PAS染色性陽性の培養始原生殖細胞はウズラ胚の生殖巣原基内に定着しており (図2-37),

生理的にも生殖巣原基への移動・定住能力を保存していることが示された。

一方、単独の分散培養法によって継代増殖を続けた始原生殖細胞由来細胞に関しても、胚に移植することで生殖巣原基への移住能の評価を行った。より精確な評価を目指して移植は同種間でニワトリ胚に行った。そのために評価する培養細胞を予めPKH67で生体蛍光標識して孵卵2.5日胚 (stage 14) に移植して胚を引き続き発生させた。4日後の6.5日胚 (stage 30) になってから中腎と発達中の生殖巣を蛍光実体顕微鏡によって観察して生殖巣内に蛍光標識された細胞が定住しているか否かを観察した。この際のコントロールとして、同様に蛍光標識した繊維芽細胞を stage 14 に注入移植し、stage 30 に実体顕微鏡下で標識した繊維芽細胞が生殖巣内に存在するか否かを観察した。

まず蛍光標識した繊維芽細胞の場合は、中腎の内側にある腸間膜根領域にかなりの数の蛍光標識細胞が存在していた (図2-38)。しかしながら、左右の生殖巣を切り出して詳細に観察しても生殖巣内に標識細胞は存在していなかった。これに対して、PKH67蛍光標識した培養始原生殖細胞の場合は、左右の生殖巣内に多数定住していた (図2-39)。また、繊維芽細胞と異なり腸間膜根にはほとんど残っていない。また、GFP 遺伝子を導入して蛍光標識を行った単独分散培養細胞を移植した後に孵化直前まで孵卵して生殖巣内での移植細胞の増殖を観察したところ、図2-40 に示すように精巣内で増殖しているのか観察できた。これによって、単独分散培養した始原生殖細胞は組織化学的にも生殖巣への移動・定住と細胞増殖の面で正常の始原生殖細胞と同じ性質を保持していると考えられたために、この細胞を移植した生殖巣キメラ個体を作製し、雛を性成熟まで飼育した後に後代検定を開始した (図2-41)。作製した生殖巣キメラは横斑プリモス・ロック20羽 (雄19羽, 雌1羽), ロード・アイランド・レッド15羽 (雄14羽, 雌1羽) であった。更に、この生殖巣キメラ個体を作製する際に長期培養した単独分散培養細胞の性判定を試みたところ、遺伝的には雄の始原生殖細胞由来であり、雌の始原生殖細胞の混入は認められなかった (図2-42)。鳥類の性染色体はZW型であり、雌がヘテロ、雄がホモであるために2年半以上の長期培養を行ってきた単独分散培養細胞は明らかに雄の遺伝子型を持っている。そのために、後代検定は雄の生殖巣キメラ個体でのみ行うこととした。

後代検定はそれぞれの系統で、1:1の自然交配で行った。この間、精子採取のために交配期間を短縮するため、十巣告坂明子的な交配期間はほぼ4ヶ月程度と短くならざるを得なかった。

表2-5は単独分散培養細胞をロード・アイランド・レッド (RIR) 胚に移植して得た生殖巣キメラ個体の後代検定の結果を示している。孵化した雛は、計84羽であった。

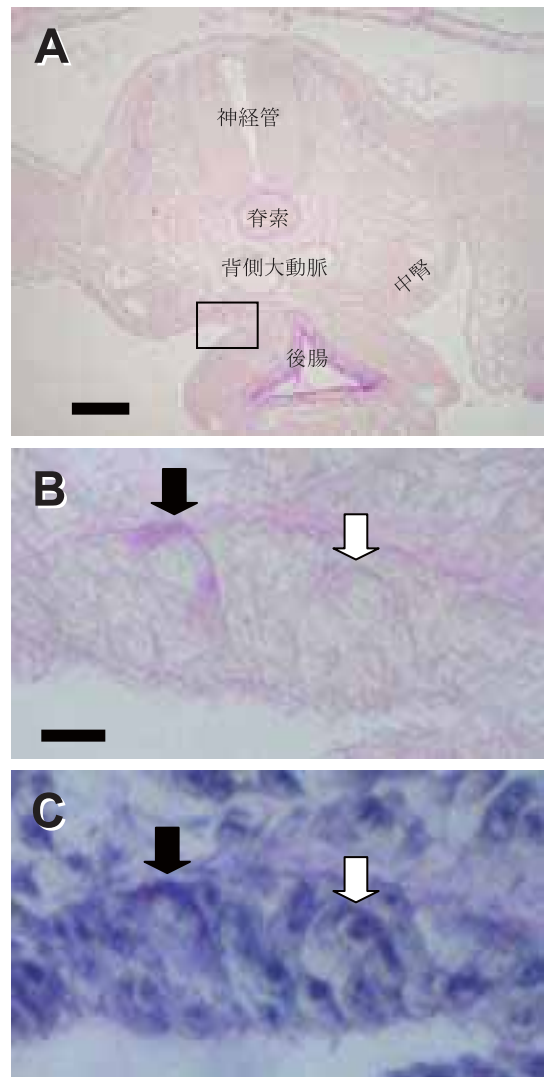


図2-37 フィーダー細胞層上培養した始原生殖細胞の生殖巣原基への移住能の評価

stage14の段階で培養始原生殖細胞を注入移植してウズラ生殖巣原基へ培養したニワトリ始原生殖細胞が定着するか否かを検討した。(A) は注入移植操作を受けたウズラ胚を stage 20 まで発生させた後に固定、PAS 染色した断面像。四角形で囲まれた部分 (生殖巣原基領域) を拡大したものが (B)。 (B) の黒矢印は PAS 染色陽性の培養始原生殖細胞で、白矢印の PAS 染色陰性のウズラ始原生殖細胞と容易に判別できる。両細胞共に生殖巣原基内に定住している。(C) は同部域を更にヘマトキシリンによって細胞核を染色した像。バーは10 μ m.

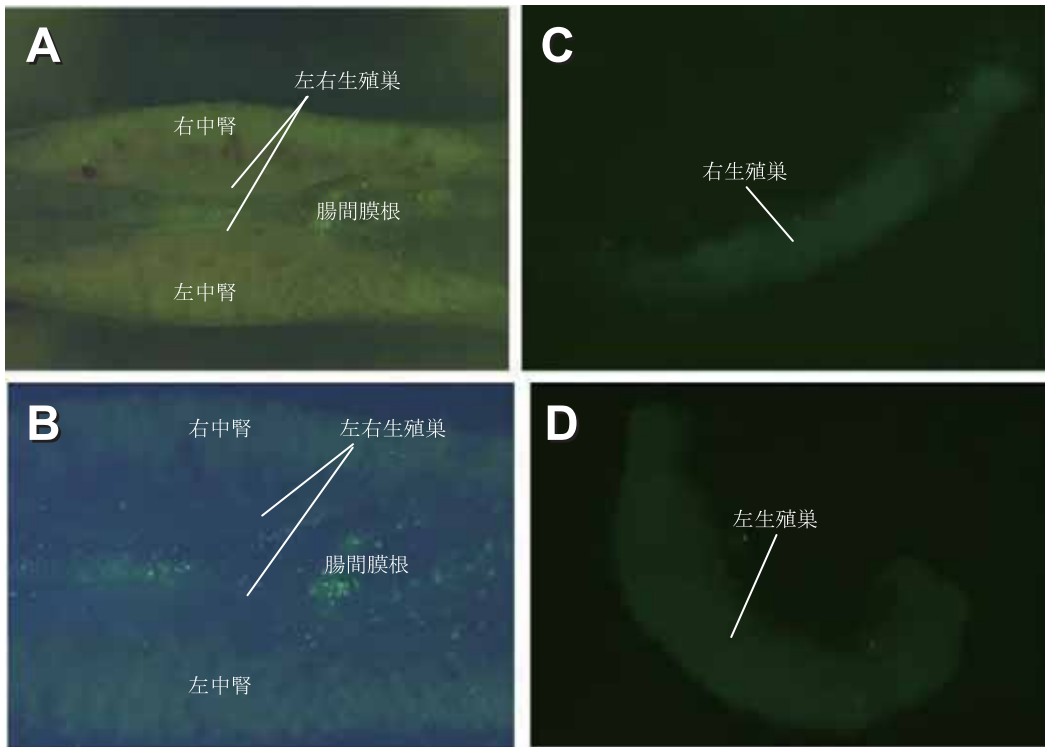


図2-38 繊維芽細胞を移植して4日後の生殖巣領域
 PKH67で蛍光標識した繊維芽細胞は腸間膜根には存在するものの、左右の生殖巣内には侵入していない。
 A: 左右の中腎と内側にある左右生殖巣，中央に腸間膜根が見える B: Aの強拡大像
 C: 右生殖巣を切り出したもの D: 左生殖巣を切り出したもの

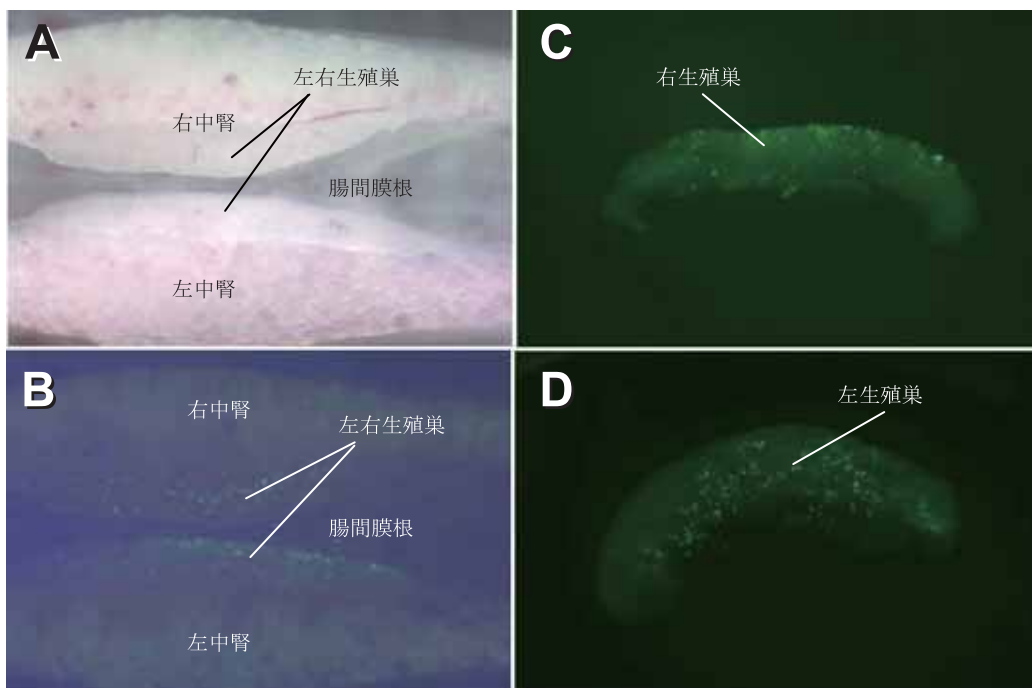


図2-39 培養始原生殖細胞を移植して4日後の生殖巣領域
 PKH67で蛍光標識した始原生殖細胞由来の培養細胞が左右の生殖巣内に多く見られ，逆に腸間膜根には少ない。
 A: 左右の中腎と内側にある左右生殖巣，中央に腸間膜根が見える B: Aの強拡大像
 C: 右生殖巣を切り出したもの D: 左生殖巣を切り出したもの

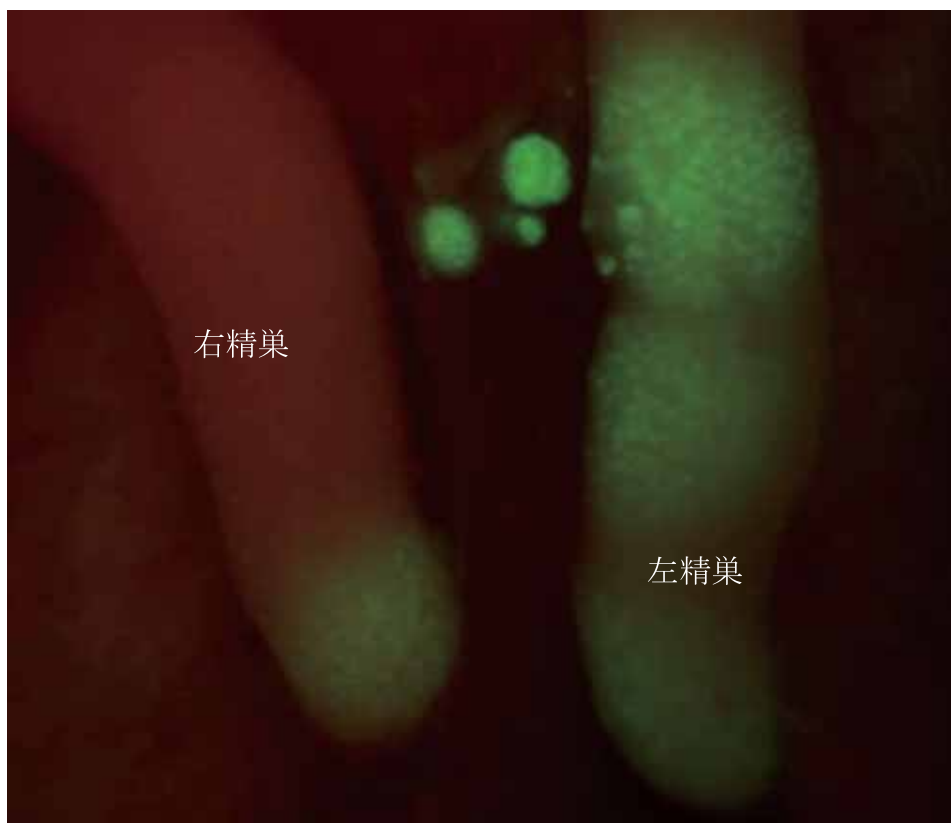


図2-40 培養した始原生殖細胞を移植した孵化直前の発達中の精巣
 蛍光標識した始原生殖細胞由来の細胞が雄生殖巣内で増殖している。増殖した蛍光標識細胞が精細管内に細い紐状に連続して明るく見える。



図2-41 単独培養した始原生殖細胞移植による生殖巣キメラ個体
 横斑プリマスロック20羽、ロード・アイランド・レッド15羽の生殖巣キメラ
 個体

たが、これらの雛の羽装 (coloration) は、すべて、RIRの羽装であり、ホワイトレグホーン (WL) の羽装の雛は得られなかった。なお、本研究に使ったRIRは個体間の変異が大きかったため、BPRの場合のように系統識別を可能とすることが出来た、「ミトコンドリアDNAのDループ領域」の「一塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNP)」を利用した系統識別法を作ることが出来なかった。

横斑プリマスロックの後代検定は、表2-6に示す通りである。雄17羽のうち、受精卵を得られなかった個体は8羽であり、加えて雄個体の子孫はC-4の雛のみであった。また得られた雛は全て横斑プリマスロックの羽装

(黒色) であった。更に、この後代検定の際の受精率、孵化率、精液と精巣の組織から調製したDNAを用いたキメリズム解析の結果、及び精巣の組織学的検討の結果を表2-7にまとめている。

横斑プリマスロックの雄個体は、精巣のサイズに関わらず、すべてが正常な繁殖期の雄の鶏冠を持っていた。精液は、RIRに比べて、採取がかなり困難で、雄だけの個別飼育を2週間した後でもその状況は変わらなかった。精液のサンプリングが出来た個体は9羽であり、これらの精液の解析によって、B-1とB-3がキメラであることが判明した。更に、最終的に精巣組織から調整したDNAでの分析結果では、B-1, B-2, B-3, B-4, C-2,

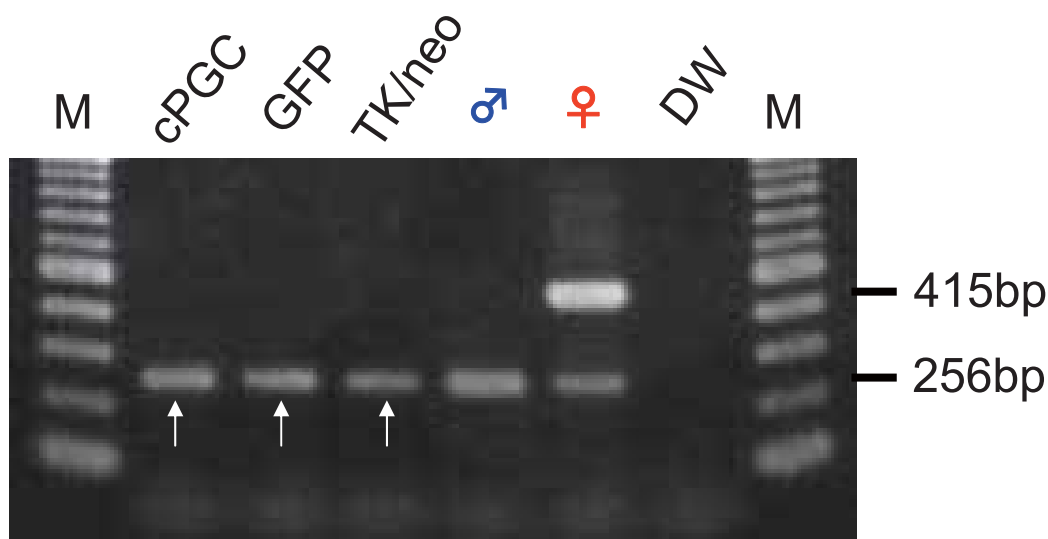


図2-42 単独培養した始原生殖細胞の性判定結果
白矢印のものが単独培養した始原生殖細胞由来の細胞のバンド (cPGC)。GFPとTK/neoとはどちらもこの細胞株にGFP遺伝子をintegrateさせたもので、導入遺伝子のコンストラクトが異なる。

表2-5 単独分散培養細胞/ロード・アイランド・レッド間の生殖巣キメラ後代検定

	sex	Individual No.	Total eggs (A)	Total fertilized eggs (B)	Fertilization rate B/A (%)	Total hatched chicks (C)	Hatch rate C/B (%)
RIR	♀	G-1	58	36	62	14	39
		F-1	56	27	48	9	33
		F-2	70	28	40	5	18
		F-3	74	21	28	6	29
	♂	F-4	93	59	63	24	41
		G-2	44	15	34	2	13
		G-3	16	11	69	0	0
		G-4	58	37	64	12	32
		H-1	36	12	33	0	0
		H-2	14	4	29	2	50
		H-3	90	48	53	10	21
		H-4	40	10	25	0	0

E-2, E-3, E-4の計8羽がキメラであることが判明した。

本試験で使ったすべての個体から、精巣と精巣上体、輸卵管（1羽の卵巣）をサンプリングし、パラフィン包埋後切片を作成し、組織学的検討を精巣からのDNAで、キメラであることが判明した個体のうちのE-4, B-4, E-3に加えて、精液でもキメラであることが示されたB-1で行った。

図2-43は一例として示す精巣と精巣上体の組織切片である（E-4個体）。精細管内には精子がほとんど認め

られず、精子頭部の横断面像と、核濃縮様の黒い点が精細管内の広範囲に認められる。また、精細管腔内に異常形態の細胞（多核細胞）も認められた（A, B）。Cは精巣網（精細管が統合して精巣外に通じる部分）、Dは精巣上体であるが、腔内には多数の細胞と細胞残渣が認められるものの、精子はほとんど存在しない。他の個体の組織像も極めて類似のものであり、ここで検討した単分散培養を行ってきた始原生殖細胞由来の細胞株は生殖系列の細胞としての細胞マーカーを持っており、生殖巣

表2-6 単分散培養細胞/横斑プリマスロック間の生殖巣キメラ後代検定

	sex	Individual No.	Total eggs (a)	Total fertilized eggs (b)	Fertilization rate (b/a) %	Total hatched chicks (c)	Hatch rate (c/b) %
BPR	♀	A-1	94	61	65	13	22
		A-3	57	0	0	0	0
		A-4	62	2	3	0	0
		B-1	35	0	0	0	0
	♂	B-2	60	13	22	0	0
		B-3	95	1	1	0	0
		B-4	52	0	0	0	0
		C-2	110	6	6	0	0
		C-3	68	5	7	0	0
		C-4	112	52	46	22	48
		D-1	73	0	0	0	0
		D-2	66	5	8	0	0
		D-3	103	3	3	0	0
		D-4	7	0	0	0	0
		E-1	87	0	0	0	0
		E-2	69	0	0	0	0
		E-3	26	12	46	0	0
		E-4	22	0	0	0	0

表2-7 単分散培養細胞/横斑プリマスロック間の生殖巣キメラ解析結果

個体番号	移植細胞数	雄外観	発生数/産卵数 (%)	孵化数/発生数 (%)	PCR判定精液	PCR判定精巣	精巣重量(g)		精巣所見 (*水泡状所見)
							左	右	
A-3	50	○	0/57 (0)	0	×	×			
A-4	50	○	2/62 (3)	0/2 (0)	採取不能	×	12.8	12.2	
B-1	50	○	0/35 (0)	0	○	○	12.2	10.4	
B-2	50	○	13/60 (22)	0/13 (0)	採取不能	○	15.6	11.4	
B-3	100	○	1/95 (1)	0/1 (0)	○	○	18.2	15.6	
B-4	?	○	0/52 (0)	0	採取不能	○	17.1	17.8	
C-2	25	○	6/110 (6)	0/6 (0)	×	○	22.0	17.2	
C-3	50	○	5/68 (7)	4/5 (80)	×	×	8.4	7.0	* ほぼセルトリ細胞から成る精細管
C-4	50	○	52/112 (46)	22/52 (42)	×	×	25.8	15.6	
D-1	25	○	0/73 (0)	0	採取不能	×	15.0	11.6	
D-2	100	○	5/66 (8)	1/5 (20)	採取不能	×	0.8	0.6	ほぼセルトリ細胞から成る未熟精細管
D-3	50	○	3/103 (3)	0/3 (0)	×	×	9.2	8.6	
D-4	25	○	0/7 (0)	0	採取不能	×	14.8	13.0	* ほぼセルトリ細胞から成る精細管
E-1	25	○	0/87 (0)	0	×	×	7.8	6.6	
E-2	50	○	0/69 (0)	0	×	○	—	—	
E-3	25	○	12/26 (46)	0/12 (0)	採取不能	○	5.2	4.4	ほぼセルトリ細胞の精細管
E-4	25	○	0/22 (0)	0	採取不能	○	9.5	9.1	
Control		○	—	—	—	—	15.8	16.6	

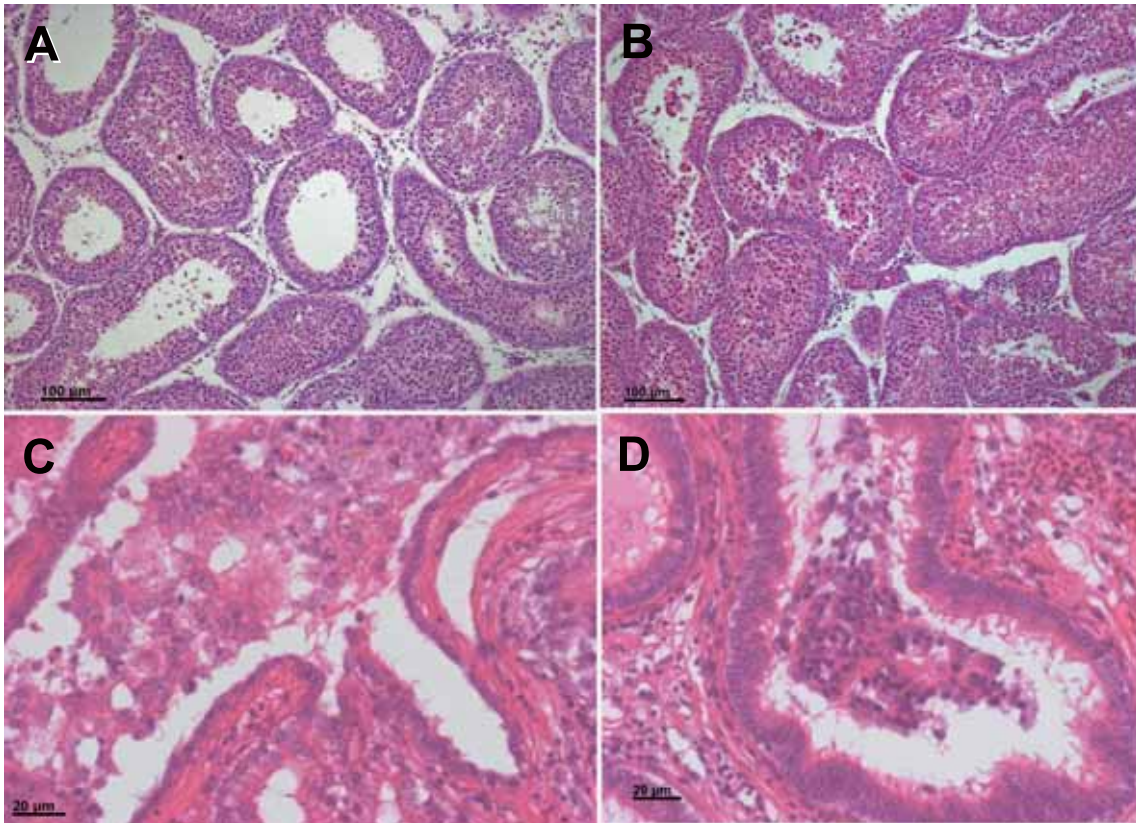


図2-43 E4キメラ個体の精巣の組織切片（病理評価例）
 A及びB：精巣内の精細管の低倍率像 C：精巣網の部分 D：精巣上体



図2-44 フィーダー細胞層上での長期培養始原生殖細胞由来の子孫作出

表2-8 単分散培養細胞/横斑プリマスロック間の生殖巣キメラ解析結果

個体番号12	PGC 培養期間 (日)	ホスト性	PGC 由来個体	ホスト由来個体	キメラ効率 (%)
1	16	♀	4	18	18
2	16	♀	6	19	24
3	16	♀	4	11	27
4	16	♀	0	0	—
10	16	♂	0	0	—
5	45	♀	14	14	50
6	93	♀	0	1	0
7	93	♀	9	5	64
8	106	♂	1	1	50
11	106	♂	0	0	—
12	106	♂	0	0	—
14	207	♂	1	2	33
9	218	♀	13	16	45
13	218	♂	0	2	0

原基への移動や増殖には異常がないものの、精子への最終的な変態の際に異常をきたすものと考えられる。

上記の培養系を用いた始原生殖細胞由来の細胞株以外に、胚由来の繊維芽細胞上で継代培養を行った白色レグホーン系のニワトリ始原生殖細胞由来細胞を横斑プリマスロック系の胚に注入移植して生殖巣キメラ個体を作成し、これらの生殖巣キメラ個体を性成熟まで飼育し、横斑プリマスロック系との戻し交配の結果、多くの長期培養した始原生殖細胞由来の子孫個体を得ることができた。継代培養16日の始原生殖細胞を用いた生殖巣キメラ個体では18–27%、45日では50%、93日では64%、106日では50%、218日では45%、更に207日培養後に凍結保存していた細胞由来の子孫は33%であった（図2-44、表2-8）。

これによって、フィーダー細胞層上で長期培養した始原生殖細胞はその細胞特性を保持し、生殖巣キメラ個体を介して培養始原生殖細胞由来の子孫個体を作成する能力を持っていることを実証できた。通常は始原生殖細胞を長期培養するとEG細胞もしくはES細胞のようなより未分化な細胞へと脱分化を起こすと考えられていたことから、本研究の成果は細胞特性を変化させることなく始原生殖細胞を長期培養出来た世界初の成果である。

2.2 異種間生殖巣キメラ作製法の開発研究（図2-45）

鳥類での異種間生殖巣キメラ個体を、ニホンキジ、ライチョウの始原生殖細胞をニワトリ胚とウズラ胚に、ニワトリ始原生殖細胞をウズラ胚へ移植して異種間生殖巣キメラ個体を作製し、それらの性成熟を待って、後代検

定を行い、受精卵、発生停止胚、雛のDNAを調整し、キメラ効率を調べた。

2.2.1 材料と方法

2.2.1.1 異種間生殖巣キメラ作出

ライチョウ始原生殖細胞をニワトリ（チャボ）胚へ生殖巣キメラ作出法に則り移植した。移植胚10個体のうち4羽が孵化した。1羽が雛の時期に死亡し、DNAから♂であった。残る3羽（♂1と♀2羽）で後代検定を行った。

ニホンキジ始原生殖細胞をニワトリ胚78（白色レグホン12、チャボ66）へ移植し、白色レグホーン4羽、チャボ17羽が孵化した。現在、14羽（雄10、♀4）で後代検定を行った。

ニホンキジ始原生殖細胞をウズラ胚85へ移植、32羽が孵化し、現在20羽（♂13、♀7）で後代検定。

ニワトリ（白色レグホーン）始原生殖細胞をウズラ胚41へ移植、8羽が孵化（♂4、♀4）で、後代検定。

2.2.1.2 異種間生殖巣キメラ個体の後代検定

異種間生殖巣キメラ個体を飼育して性成熟させた。キメラ個体が雄の場合は、ドナー種の雌にキメラ個体の精液を用いて人工授精あるいは自然交配にて受精卵を得、これを孵化させてキメラ個体のキメラ効率を評価した。また、キメラ個体が雌の場合は同じくドナー種の雄からの精液を用いて人工授精、自然交配を行い、受精卵を得、これを孵化させてキメラ効率を評価した。

精液採取の際には予め雄個体を順化させるために、採

精の前日に採精個体のマッサージと採精操作を加えた。マッサージは個体の側方から行う。まず頭部を下に下げさせ、胴体背部の精巣と輸精管の位置の表面から総排泄腔の方向にかけて軽く圧迫しながらマッサージを繰り返す。加えて、腹部の総排泄腔の下周りを同時に軽く圧迫しながら押し出すようにしてマッサージを行った。採精の際は、この一連のマッサージの流れの最後に左手で尾羽根を背部側に押さえ上げ、同時に総排泄腔の両脇を軽く押しながらかつまんで反転させ、滲み出た精液をピペットで採取した。

2.2.1.3 DNA配列による異種間生殖巣キメラの評価

作出した異種間生殖巣キメラ個体の性成熟を待って♂ではその精液内の精子、♀では放卵した種卵を孵卵し雛を得た。孵化しなかった卵について、未受精卵、発生停止胚、死籠もり胚などからDNAを調整し、ドナー寄与率を検定した。DNAによる種判別法は、同じ遺伝子のDNA配列二種特異的な相違点をPCRによって増幅して検知するものである。遺伝情報としては、ゲノムDNAと、ミトコンドリアDNAに大別されるが、ゲノムDNAのMet proto-oncogeneの一部配列と、mtDNAのND2配列の全長を決定、比較して種特異的と考えられる配列に基づき、プライマーを設計作製した。これを用いて生殖

巣キメラ個体の精液中のドナー精子をPCRで識別した。同様に、卵巢についても識別を行ってドナー始原生殖細胞由来の卵細胞の存在を評価した。

2.2.2 結果と考察

2.2.2.1 異種間生殖巣キメラ作出

ライチョウ/ニワトリ(チャボ)生殖巣キメラは移植胚10個体のうち4羽が孵化した。1羽(♂)が雛の時期に死亡し、残る3羽(♂1と♀2羽)が性成熟した。また、ニホンキジ/ニワトリ生殖巣キメラでは胚78(白色レグホン12, チャボ66)へ移植し、白色レグホン4羽, チャボ17羽が孵化し、14羽(雄10, ♀4)が性成熟した。ニホンキジ/ウズラの生殖巣キメラでは、胚85へ移植、32羽が孵化し、20羽(♂13, ♀7)が性成熟に達した。加えて、ニワトリ(白色レグホン)/ウズラ生殖巣キメラの場合は胚41へ移植、8羽が孵化(♂4, ♀4)し、全て性成熟した。

2.2.2.2 異種間生殖巣キメラ個体の後代検定並びにDNA配列による異種間生殖巣キメラの検出・評価(橋本光一郎, 今里栄男)

前記2.2.1で作製する異種間生殖巣キメラ個体の性成熟段階で精子、卵巢のドナー寄与率を検定する。具体的



図2-45 異種間での生殖巣キメラ個体作製

にはドナーとホスト側のゲノム DNA (Met proto-oncogene) の一部配列と、 mtDNA の ND2 配列の全長を決定、比較して特異的プライマーを作製した。これを用いて生殖巣キメラ個体の精液中のドナー精子を PCR で識別した。同様に、 卵巣についても識別を行ってドナー始原生殖細胞由来の卵細胞の存在を検出・評価した。

また、 異種始原生殖細胞は微量にしか生殖巣内に存在しない可能性があるため、 通常の PCR 法より高感度・ 確実な方法として、 種特異的に増幅した配列内部に種特異的なプライマーを設計した 2nd PCR による入れ子式の PCR 法を用いた判別も試みた。

この様な検出手法を用いて生殖巣キメラ個体の評価を行った結果、 雌雄共に精子、 卵巣にドナー細胞の存在が証明された。また、 一部ではあるがドナー始原生殖細胞由来の細胞が精液中に大量に含まれることを示唆するデータを得ることが出来た (図2-46)。

ライチョウ始原生殖細胞をニワトリ (チャボ) へ移植したキメラ胚のうち死亡胚 4 例から遺伝子を調整して調べたところ、 4 胚中の 3 胚がキメラであった (図2-47)。

生存している♂キメラ精液ではライチョウ遺伝子を検知できなかった。 ♀キメラ 2 羽のうち 1 羽はこれまで 264 個産卵し、 238 個から DNA を調製、 PCR の結果、 すべてからライチョウ遺伝子を検知することができなかった (図2-48)。 他の 1 羽は 12 個産卵し、 11 個から DNA を調製して PCR の結果、 同様に全てからライチョウ遺伝子は検出できなかった。

ニホンキジ始原生殖細胞をニワトリ (チャボ) へ移植し作成したキメラ♂14羽の精液からの DNA から、 7 羽にニホンキジの DNA を検知した (図2-49)。

キメラ♀ 4 羽のうち 3 羽が産卵している。 61 個のうち 24 個から DNA を調整、 PCR を実施したが、 ニホンキジ DNA は検知できなかった。 ニホンキジ始原生殖細胞をウズラに移植したキメラ♂での精液の検査はまだ行っていない。 キメラ♀ 7 羽では、 それぞれがすでに 100 個以上の産卵をみている。 このうちの 6 羽について各ほぼ半数の 40~50 個を調べた結果、 これまでにキジの遺伝子を検知することができなかった。

精液中の精子は、 億単位の細胞数があるため、 キメラ

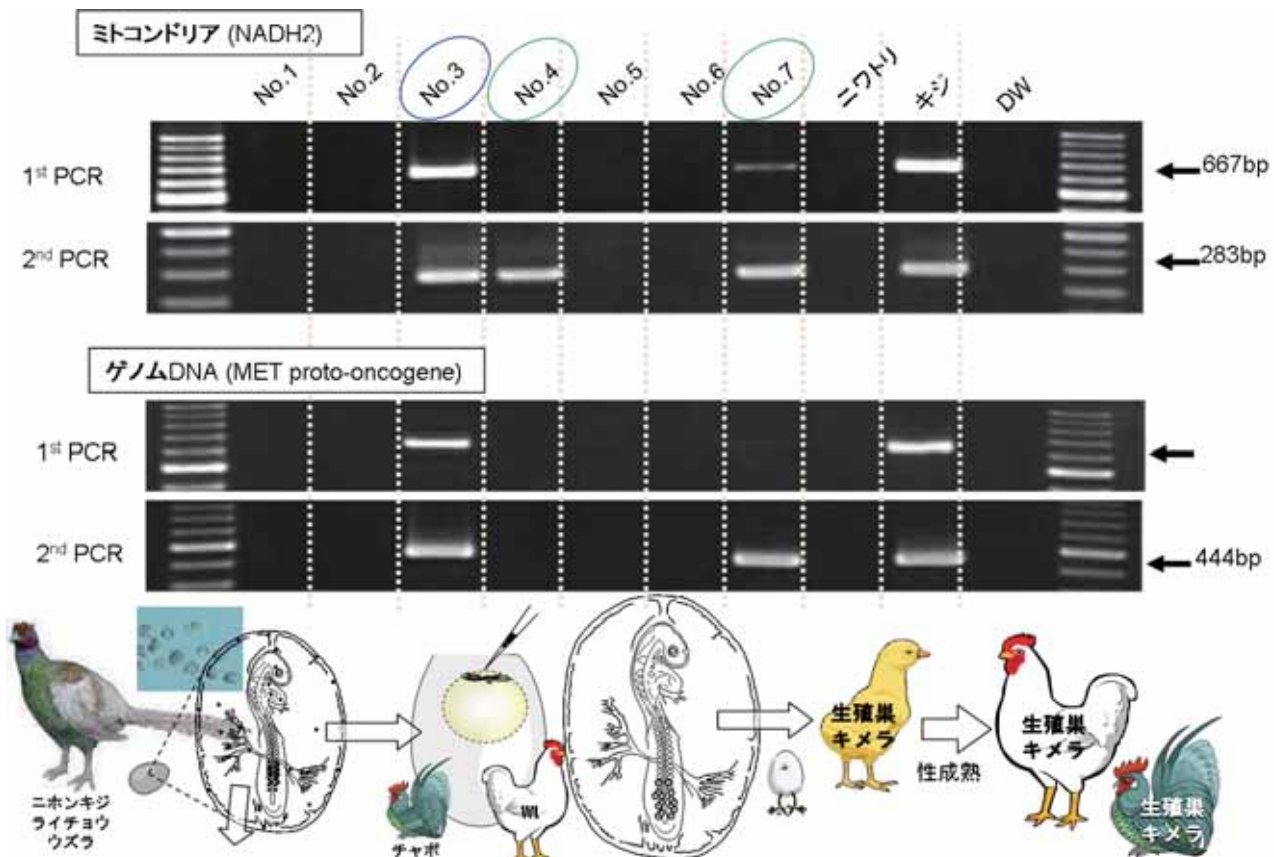


図2-46 精液の DNA 解析による異種間生殖巣キメラ評価

ミトコンドリア及びゲノムに種特異的なプライマーを作成し、 検出を行った。さらに、 微量な DNA を検出可能なように、 入れ子式にプライマーを作成し、 特異性と感度を向上させた。

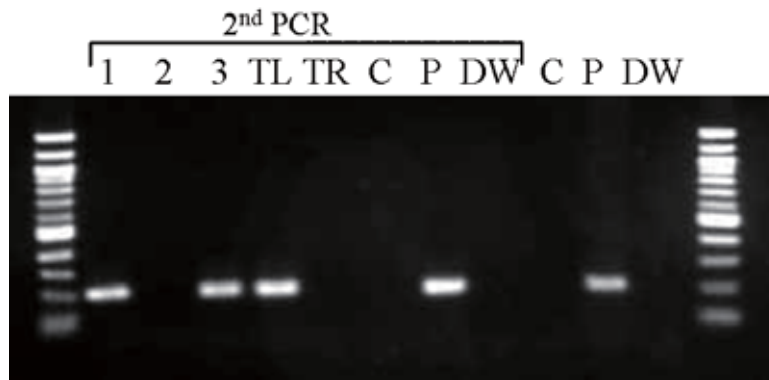


図2-47 ライチョウ／チャボの生殖巣キメラ検定
 1～3: 個体番号 TR: 右精巣 TL: 左精巣 P: ライチョウ (対照) C4: ニワトリ (対照)
 キメラの確認を行った4個体中3個体でライチョウのDNAを確認できた。その中の左右の精巣それぞれの確認では左側のみでDNAが確認された。

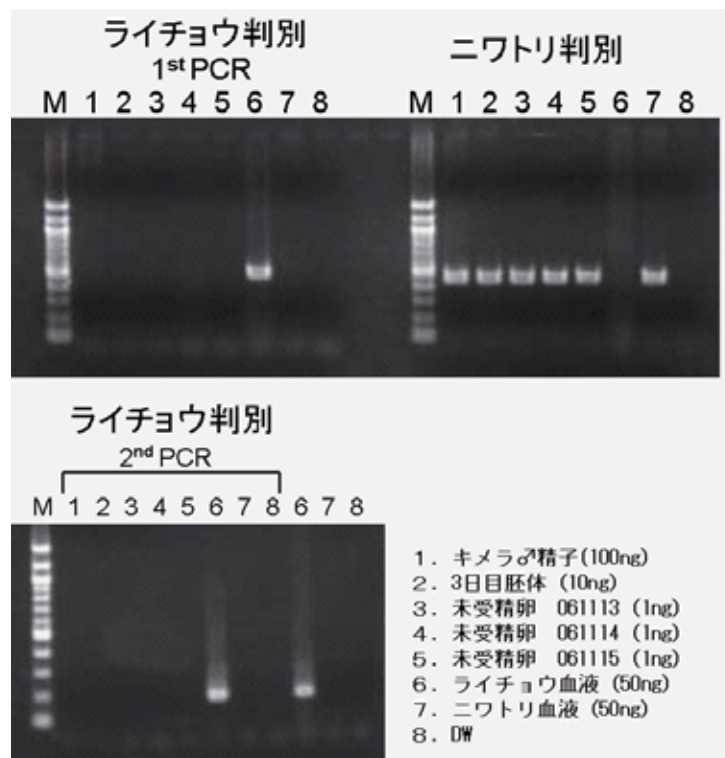


図2-48 ライチョウ／チャボの生殖巣キメラ検定
 今回採取した精子及び卵にはライチョウDNAは含まれていなかった。また、未受精卵においても、ニワトリ mtDNA の検出には成功していることから、DNeasyを用いた未受精卵の卵割部位からのDNA抽出によるキメラ検出は充分に可能である。PCRはGold Taqを使用。Total 20μl アニール温度は全て60℃で35サイクル。

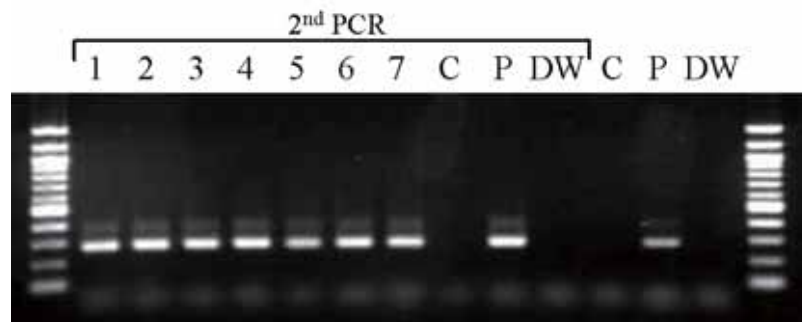
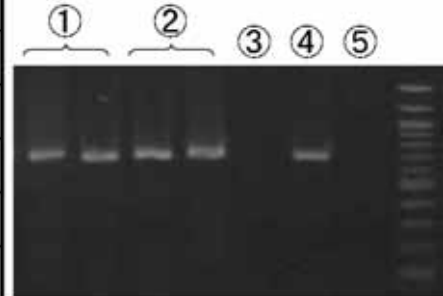


図2-49 ニホンキジ／ニワトリの生殖巣キメラ検定
 1～7: 個体番号 P: ニホンキジ (対照) C: ニワトリ (対照)
 キメラ判別を行った7個体中7個体で、キジのDNAを確認できた。

表2-9 ニホンキジ/白色レグホン系鶏のキメラ率評価

発生段階	PCR反応		キジ(+) 率 (%)
	キジ(+)	総数	
初期～中期停止	-	21	判別不能
中期停止	6	6	100.0
死ごもり	4	7	57.1
ヒナ	19	19	100.0
成鳥♂ 精子	3	5	60.0
成鳥♂ 精巢	7	7	100.0
成鳥♂ 精巢	4	4	飼育中
成鳥♀ 卵巣	2	2	100.0
成鳥♀ 卵巣	-	7	飼育中

- ① 成鳥♂ 精巢
- ② 成鳥♀ 卵巣
- ③ DW
- ④ キジDNA
- ⑤ 白色レグホンDNA

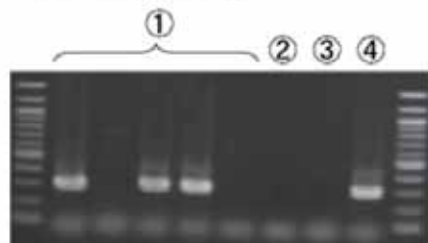


孵化率54.1% (74個体制製, 40個体孵化)

表2-10 ニホンキジ/チャボのキメラ率評価

発生段階	PCR反応		キジ(+) 率 (%)
	キジ(+)	総数	
初期～中期停止	-	30	判別不能
中期停止	2	2	100.0
死ごもり	14	14(+3)	100.0
ヒナ	2	2(+1)	100.0
成鳥♂ 精子	5	10	50.0
成鳥♂ 精巢	-	10	飼育中
成鳥♀ 卵巣	-	4	飼育中

- ① キジPGC移植チャボ精子
- ② DW
- ③ チャボDNA
- ④ ニホンキジDNA



孵化率25.8% (66個体制製, 17個体孵化)

表2-11 ニホンキジ/ウズラのキメラ率評価

発生段階	PCR反応		キジ(+) 率 (%)
	キジ(+)	総数	
初期～中期停止	-	11	判別不能
中期停止	1	2	50.0
死ごもり	37	40	92.5
ヒナ	6	7	85.7
ヒナ	-	2	判別不能
成鳥♂ 精子	0	13	0
成鳥♂ 精巢	1	1	100.0
成鳥♂ 精巢	-	10	飼育中
成鳥♀ 卵巣	1	2	50.0
成鳥♀ 卵巣	-	7	飼育中

- ① キジPGC移植ウズラ卵巣
- ② DW
- ③ キジDNA
- ④ ウズラDNA



孵化率37.6% (85個体制製, 32個体孵化)

検定が1回のサンプルリングでも評価することは可能であるが、♀では産卵数は多くても1日1個（細胞）であるため、キメラ率の検定が困難となっている。

本研究で作製したニホンキジ/白色レグホーン系ニワトリの生殖巣キメラ個体のDNA解析、ニホンキジ/チャボの生殖巣キメラ個体のDNA解析、及びニホンキジ/ニホンウズラの生殖巣キメラ個体のDNA解析の結果をそれぞれ表2-9、表2-10、表2-11にまとめた。いずれの生殖巣キメラも高いキメラ率を示しており、発生と成長（雛から性成熟個体まで）によるキメラ効率には顕著な増減は無いことから、ホストにとって異種であるニホンキジの始原生殖細胞は免疫的排除を逃れて生存を続けていると考えられる。また、図2-45に示したNo.3の個体のように始原生殖細胞由来の細胞が大量に精液中に存在しているものがあり、長期間にわたって精液中の強いニホンキジDNA反応が継続していることから（表2-12）、戻し人工交配による後代検定を今後も長期に継続する必要性が高い。

表2-12 キメラ個体精液中のキジDNA出現の変遷

	孵化後1年8ヶ月					2年4ヶ月		2年8ヶ月
	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	1回目	2回目	
1	—	—	—	—	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—	—	—	—
3	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
4	—	—	○	—	○	○	○	○
5	—	—	—	—	—	—	—	—
6	—	—	—	—	—	—	—	—
7	○	○	○	○	○	○	○	—

◎：非常に強い反応，○：反応有り，—：反応無し，空白：採取なし

2.3 ドナー体細胞の増殖培養と標識遺伝子の導入

モデルとして、ニワトリの体細胞（stage 27 胚由来）を選び、特に単離した際に細胞径が小さい（10μm程度）となるものを選抜した。この細胞に非ウイルスベクターを用いてGFP遺伝子を導入し、GFP発現によってpEGFP-N1をリニアールで使用し、リポフェクションを行った。試薬はリポフェクトアミン2000、Fugene6を使用した。試薬と遺伝子の混合比は最終的には2:3とした。細胞数は105と106を検討し、生存数の多い106個を用いて遺伝子導入を行った結果、使用した試薬による導入効率に特に差はなかった。薬剤耐性による選別で細胞系統の樹立が困難であったために、結局は蛍光顕微鏡下で

GFP陽性細胞を選別して2系統の細胞株を樹立することができたため、その後はこの細胞系統を研究に使用した。

2.3.1 材料と方法

ニワトリ白色レグホーン胚（stage 27）から肢芽、尾部、頭部、内臓を除いた主として体腔壁を細切した組織片をKAv-1培地で培養し、遊走してくる胚性繊維芽細胞を継代培養することにより樹立した。遺伝子導入には、この胚性繊維芽細胞の対数増殖期のものを使用した。非ウイルスベクターによる遺伝子導入法としてリポフェクションを採用した。リポフェクション用脂質試薬として、Lipofectamine2000（Invitrogen）、FuGENE6（Roche）を検討した。リポフェクション試薬とDNAの混合比率として、1:3、1:2、3:3を検討した。また使用する細胞数については、 1×10^5 と 1×10^6 で検討した。なお、無血清培地を使用する場合は、Opti-MEMを使用した。DNAとして、pEGFP-N1をリニアールで使用した。G418を20μl/1mlの濃度でKAv-1培地に添加した選択培地を使用し、導入遺伝子が組み込まれた株の樹立を行った。

プロトコール

- 第1日目・・・CEFへのGFP6プラスミドDNA導入
 - ・無血清，無抗生物質培地41μlにFuGENE6を9μl加える（5分静置）—（A液）
 - ・無血清，無抗生物質培地44μlにDNAを6μl加える（5分静置）—（B液）
 - ・A液とB液を混合する—（C液）
 - ・室温にて15分静置
 - ・対数増殖期のニワトリ初代胚性繊維芽細胞（ 1×10^6 個/2ml）に（C液）を添加
 - ・35mmディッシュに播く
- 第3～5日目・・・GFPプラスミドDNA導入細胞の分離
 - ・細胞がコンフルエントになったら，G418添加培地（20μl/1ml）に培地交換
- 第10日目前後
 - ・細胞が選択され，コロニーを形成した時点で継代する（この時を継代回数P0とする）
 - ・以降，2～3日おきに細胞数をカウントして継代する
 - ・ 1×10^6 個になれば凍結保存

2.3.2 結果と考察

リポフェクション試薬とDNAの混合比率を検討した結果、2:3が最も導入効率が高かった(図2-50)。使用細胞数の検討では、いずれのリポフェクション試薬とも 1×10^6 の方が細胞の生存率は高く、 1×10^5 では3日後の生存率はきわめて悪かった。混合比率2:3、使用細胞数 1×10^6 の条件では、Lipofectoamine2000とFuGENE6のDNA導入効率には差を認められなかった。G418薬剤耐性による選別培養を行い、GFP遺伝子発現

株の樹立を目指した(図2-51)。ただ最終的には、GFP陰性細胞の排除ができなかったことから、蛍光顕微鏡下でGFP陽性細胞の選別を行い、2系統の細胞株を樹立することが出来た。

2.4 体細胞核を持つ始原生殖細胞の創出

本サブテーマでは、始原生殖細胞核の不活化条件の検討と細胞融合条件の検討を行って体細胞核を導入した始原生殖細胞の創出法の開発にあたった(図2-52)。

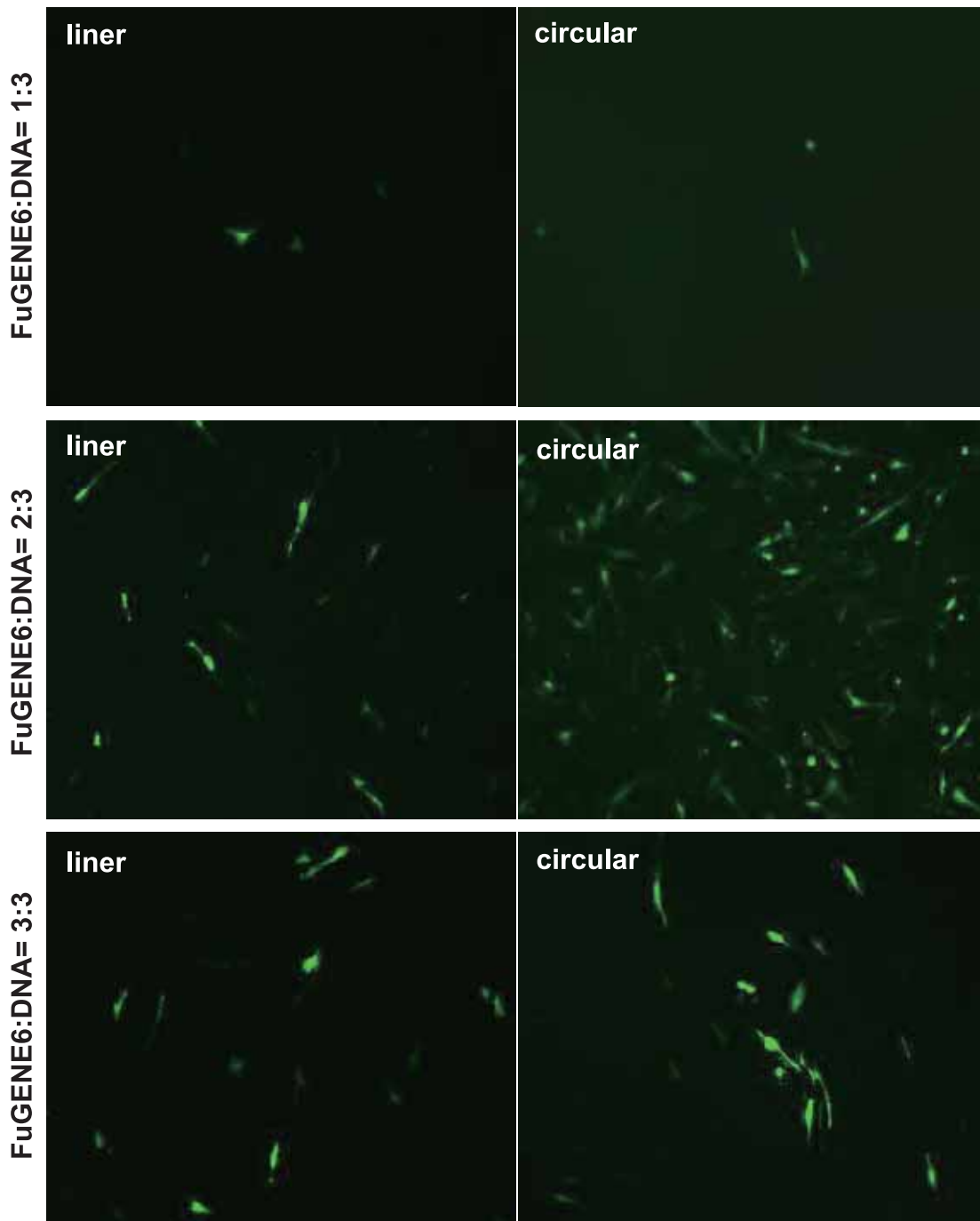


図2-50 リポフェクション試薬とDNA比率の検討
FuGENE6でのDNAとの濃度比率は2:3が最も導入効率は高かった。

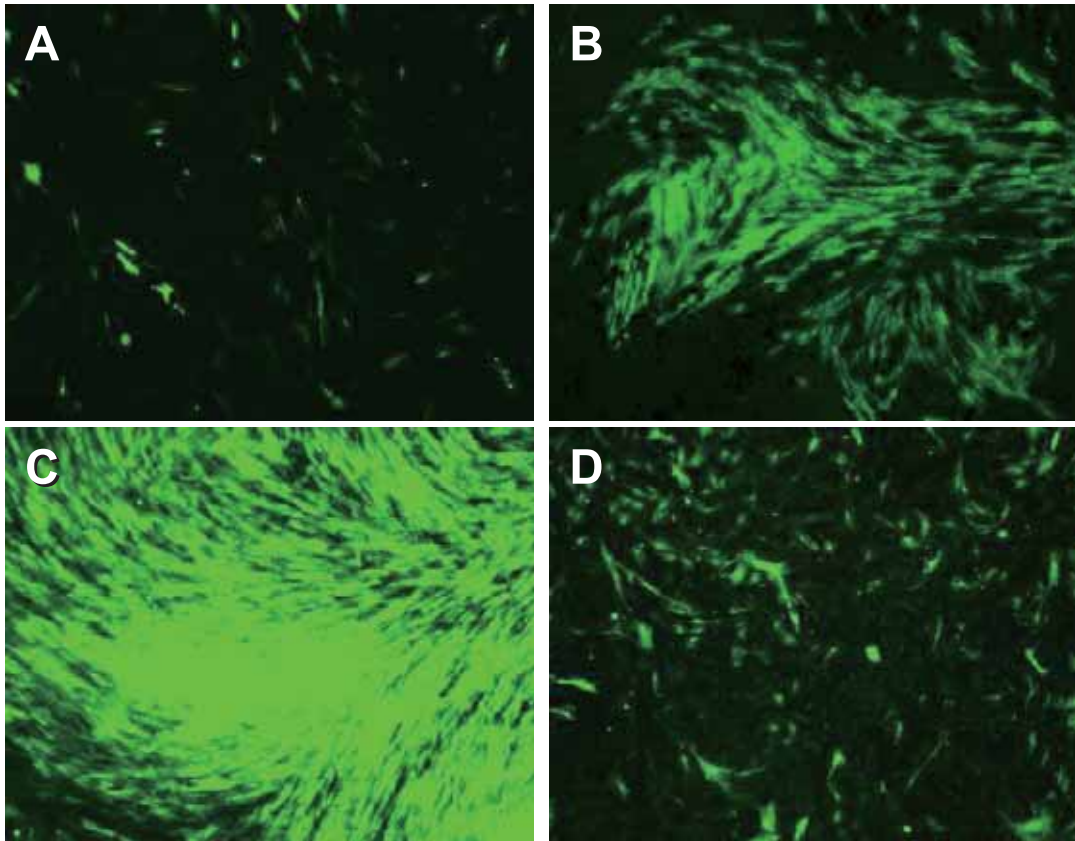


図2-51 GFP導入胚性繊維芽細胞株の樹立
FuGENE6=2:3でDNAはcircularを用いて、G418薬剤耐性遺伝子による選別培養によって、目的とするGFP遺伝子導入ニワトリ胚性繊維芽細胞株の樹立を行った。

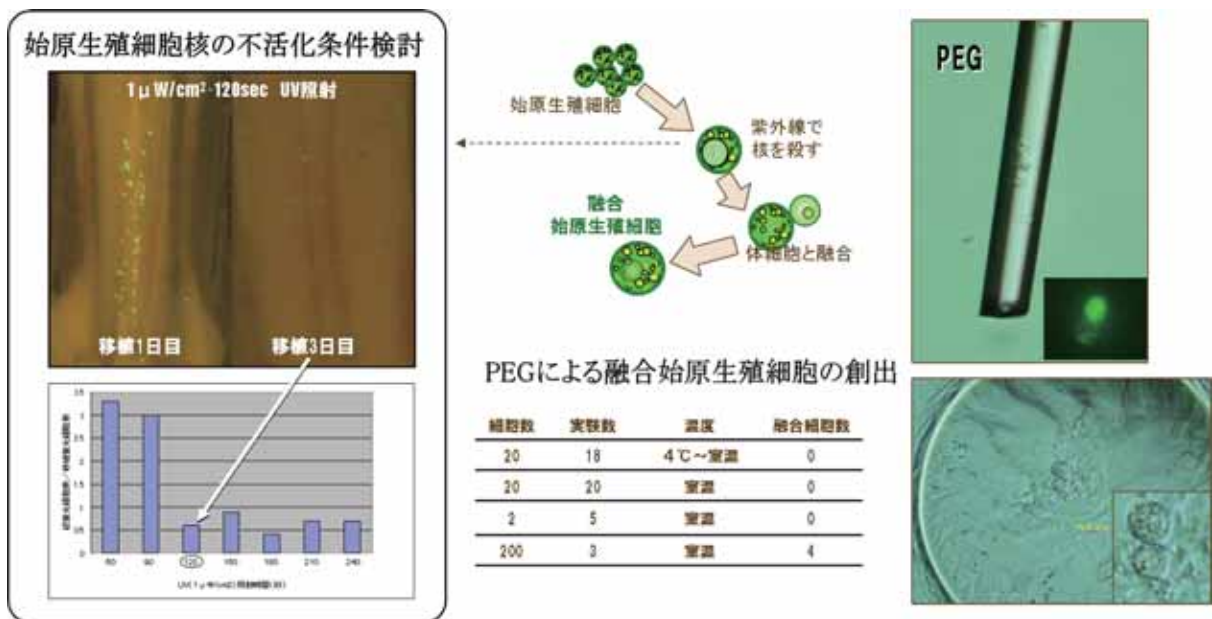


図2-52 体細胞核を持つ始原生殖細胞の創出

2.4.1 始原生殖細胞核の不活化条件の検討と細胞融合条件の検討 (川嶋貴治, 橋本光一郎)

2.4.1.1 材料と方法

条件設定の再現性の高い紫外線照射処理による始原生殖細胞核の不活化条件(波長及び線量条件)を検討して、細胞質及びミトコンドリアへの損傷を最小限に留めながら細胞核を不活化するための条件を検討した。

始原生殖細胞の核が細胞質に対して大きく、始原生殖細胞の平均直径が約16 μm 前後と哺乳類細胞と比較しても小さいために、マニピュレーターを用いた物理的除核は困難で、生存の面からも非現実的である。

2.4.1.1.1 核の不活化のためのUV照射条件の検討

核DNAに加えて、ミトコンドリアDNAの不活化も期待するために、物理的除核以外の方法の検討が必要であることから、本課題では紫外線照射による除核条件を検討・確立する。この条件検討に際しては、始原生殖細胞核のDNA損傷度をSCG法(コメットアッセイ)を用いて評価した。

また、*in vivo*での判定のために、白色レグホーン2.5日胚から血液を採取し、血液循環期の始原生殖細胞を単離した。UV照射装置は、始原生殖細胞の位置で1 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ あるいは200 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ となるように設置し、UV照射時間10秒と120秒を照射した。また、対照群としてUV未照射の始原生殖細胞を用いた。

未照射あるいは照射した血液循環期の始原生殖細胞は、いずれもPKH67で蛍光染色を行った後、白色レグホーン2.5日胚の血管中に注入移植して3日間孵卵した。5.5日胚の時期に胚を採り出し、蛍光実体顕微鏡下で観察した。

まず単離した始原生殖細胞を50 μl のKAv-1に懸濁し、ドロップを作成、ドロップを平坦にし、出来るだけUVが細胞へ直接照射されるようにした。UV照射は、細胞と光源間の距離を一定にして(254nm, 100 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$)、照射時間を10秒, 60秒, 5分, 10分照射として行った。AD生死判定試薬(Calcein-AMとPropidium Iodide (PI)を使用するCellstain-Double Staining Kit, DOJINDO)による評価とコメットアッセイキット(Trevigen)を使用し、以下に記載のプロトコールに則り評価した。

2.4.1.1.1.1 生死判定試薬のプロトコール

①精製したPGCを50 μl のKav-1に懸濁し、ドロップを

作成する。

- ②UV照射装置に入れ、UV照射を行う。(10秒, 60秒, 5分, 10分照射)
- ③AD生死判定試薬を等量(50 μl)加える
- ④暗所で15分静置
- ⑤蛍光顕微鏡下で観察

2.4.1.1.1.2 コメットアッセイのプロトコール

- ①Lysis液を用意し、使用する20分前に4 $^{\circ}\text{C}$ に冷やしておく。
- ②LMアガロースゲルの蓋を緩めて熱湯で5分溶かす。その後37 $^{\circ}\text{C}$ の湯に20分は置いて冷ます。ゲルの温度によっては細胞がheat shockを受ける。
- ③UV照射により核を不活化したPGCと37 $^{\circ}\text{C}$ のLMアガロースゲルを1:10(v/v)で混ぜる。すぐに75 μl をコメットスライドに移して、満遍なくサンプルエリアに広げる。サンプルが広がりにくい場合は、あらかじめスライドを37 $^{\circ}\text{C}$ に暖めておくとも良い。
- ④スライドを4 $^{\circ}\text{C}$ 遮光で10min静置。5mmのリングがスライドの端に現れる。
- ⑤冷やしておいたLysis液にスライドを浸し、4 $^{\circ}\text{C}$ で30分静置。
- ⑥スライドを軽くたたき、余分なバッファーを落とす。アルカリ溶液に浸す。(手袋着用)
- ⑦コメットスライドをアルカリ液中に30分浸す。(室温・遮光)
- ⑧アルカリ液からスライドを取り出し、バッファーを軽く落とす。1 \times TBEバッファーに5分間浸して洗浄する。($\times 2$)
- ⑨泳動装置にスライドを移し、ゲルトレイに電極から直線方向に等間隔で並べる。サンプルをちょうど覆う程度の1 \times TBE Bufferを流し、1v/cmにセットする。10min電圧をかける。
- ⑩TBE液からスライドを取り出し、70%エタノールに5分浸す。
- ⑪空乾する。乾かすと細胞は1つの平面になり、観察しやすくなる。この段階でサンプルは室温で、乾燥剤と一緒に保存できる。
- ⑫50 μl のSYBR Green I希釈液を各、乾燥させたゲルのサークルに置き、蛍光顕微鏡下で観察する。
- ⑬写真撮影、画像処理へと続く。

2.4.1.1.2 脱核条件の検討

サイトカラシンBを培地に添加することにより、培養細胞の核が突出し、長時間の暴露あるいは遠心処理あるいはマニピュレーターによる操作によって核を単離できることが報告されている。そこで、ニワトリ胚性繊維芽細胞を使用し、サイトカラシンB処理後遠心により脱核が可能であるかについて検討した。

カバーガラス上に播種・培養してサブコンフルエントとなったニワトリ胚性繊維芽細胞 (CFE) を、核生体染色のため、Hoechst 33342 (DOJINDO) で染色後、サイトカラシンB (Sigma) の濃度を10 μ g/mlになるように培地 KAv-1 に添加し、遠心した。脱核した核体であるかカバーガラスからはがれ落ちた細胞であるかの判定は、ヘキスト染色による青蛍光の核をもつ細胞と核体とのサイズの違いで行った。

2.4.1.1.2.1 脱核操作のプロトコール

- ①実験 2 日前に18mm カバーガラスに CEF を播種し、60%程度のサブコンフルエントの状態にする。(コンフルエントでは、遠心操作にて細胞がシート状に剥がれ落ちる)
- ②ヘキスト溶液 (2 μ g/ml, PBS に溶かす) に浸す (10 min)
- ③核の染色を確認
- ④あらかじめ37 $^{\circ}$ Cにした脱核用培地 (サイトカラシン B 10 μ g/ml 添加 KAv-1) 10ml を50ml 遠沈管に用意し、CEF を接着させた18mm カバーガラスを遠沈管に縦に挿入する。
- ⑤37 $^{\circ}$ Cで30 min 培養
- ⑥あらかじめ34 $^{\circ}$ Cに暖めておいた遠心機で、5000G, 34 $^{\circ}$ C, 40 min 遠心する。
- ⑦遠沈管から18mm カバーガラスを静かに取り出し、培地を除く。
沈殿を200 μ l のKav-1で懸濁し、蛍光顕微鏡下で核をガラスマイクロピペットで拾いあげる単離する。

2.4.1.2 結果と考察

UV 照射を行って後に SCG 法で DNA 不活化を判定したところ、明らかに細胞死が起きるはずの照射量でも細胞死を捉えることが出来なかった。これは照射直後では DNA の破壊が未だ進んでいないためと考えられたために、生殖巣への到達能および細胞の生死判定を以下のよ

うに、*in vivo*で行うことにした。

*In vivo*での判定では、移植後1日目での観察では各実験群共に対照群との相違は認められず、いずれも蛍光を発する移植始原生殖細胞が生殖巣に到達していた。

移植後3日目での生殖巣の観察を行うと、1 μ W/cm²の強さで10秒照射群と未照射群では、蛍光を発する移植した血液循環期の始原生殖細胞の生殖巣への能動的移動能に違いは認められず、多くの細胞が生殖巣内へ移動していた。これに対して、照射秒数を120秒とした場合、200 μ W/cm²の強さで120秒照射群と同様に、蛍光を放つ移植した血液循環期の始原生殖細胞は生殖巣とその近傍にはほとんど認めることができなかった。このことから、血液循環期の始原生殖細胞の生殖巣への移動能を保持しつつ細胞核の機能を破壊する条件は1 μ W/cm²、120秒照射条件で十分であることが判明した。

2.4.1.2.1 UV 照射条件

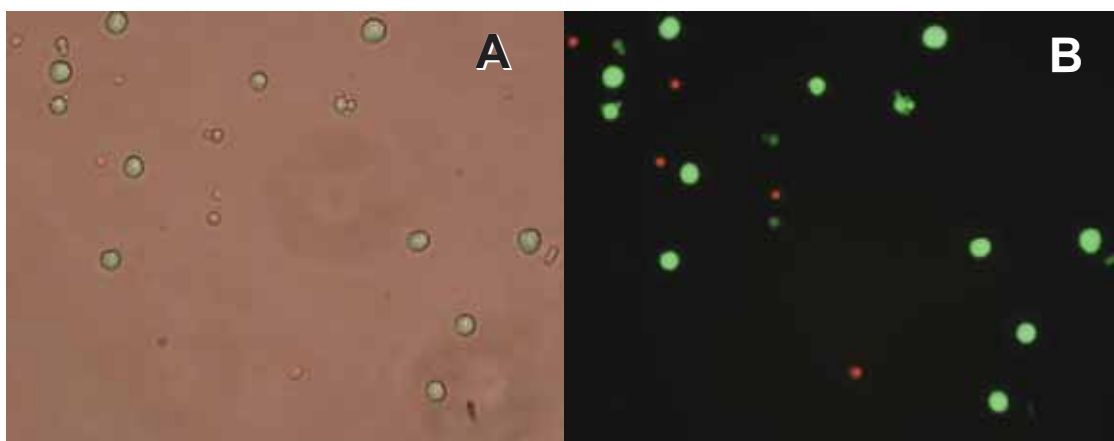
UV 照射は始原生殖細胞核を不活化する照射量である必要がある。ただ、UV 照射による細胞死を確認するのに長時間を要すると、単独培養だけでも細胞死が起こりうるために UV 照射の影響が性格に判定できなくなる。そのために、UV 照射直後に細胞の生死判定が可能なが最も理想的である。もしも短時間での UV 照射影響判定が困難であれば、UV 照射量を変えた始原生殖細胞を *in vivo* で胚に移植して始原生殖細胞の数日後の生存率を評価することで最も効果的な UV 照射量 (始原生殖細胞は生殖巣原基に移動するものの、その後核が不活化して細胞死を起こす照射量) を確定する必要がある。

2.4.1.2.1.1 生死判定試薬を用いた生死判定

判定法は、AD 生死判定試薬を添加し、蛍光顕微鏡下で観察し、赤く光る細胞を死細胞。緑に光る細胞を生細胞と判定した。UV 照射15分経過時での AD 生死判定試薬による評価では、非照射群と UV 照射群間での蛍光顕微鏡下の死細胞 (赤蛍光) と生細胞 (緑蛍光) 判定は、照射時間が長くなっても差が認められないことから、照射後15分程度では UV 照射による細胞死がまだ起こってこず、この方法を迅速な判定法として使用できないことが分かる (図2-53)。

2.4.1.2.1.2 コメットアッセイ

コメットアッセイでは、非照射細胞と UV 照射30秒、



UV 照射時間	死細胞数 / 供試細胞数	細胞死率
0 秒 (コントロール)	2/89	2.25%
10秒照射	0/41	0%
60秒照射	2/63	3.17%
5分照射	1/79	1.27%
10分照射	5/419	1.19%

図2-53 生死判定試薬によるUV照射量評価

A: 10分間の UV 照射を行って15分後の始原生殖細胞 (位相差顕微鏡像) B: 同じ視野の生死判定試薬染色像 (蛍光像)
生細胞は緑に、死細胞は赤の蛍光を見せる。

下段は各 UV 照射時間毎の死細胞率 (照射15分後) を示す。対照群や各照射量による顕著な変化は認められない。

60秒サンプルで比較したところ、画像処理を必要とするレベルでの差が認められるかどうかという結果であった (図2-54)。画像処理では、 comet アッセイ計算ソフトに写真を取り込み、写真画像の解析および解析データの数値 (comet length 等) を統計処理することにより、DNA 損傷度を測定することになるものの、いずれにしても照射細胞をより長い期間培養した後の評価が必要と考えられた。

2.4.1.2.1.3 *in vivo* での評価

以上の2.4.1.2.1.1と2の結果を踏まえて、単離した始原生殖細胞に UV 照射を行った後、始原生殖細胞が血液循環をしている同じ発生段階である stage 14 (孵卵2.5日胚) の血管中に細胞を戻し、3日後までの被照射始原生殖細胞の生存と存在部位を観察することで UV 照射による始原生殖細胞の細胞核の不活性化の程度を評価した。

移植後1日目では、各実験群と未照射対照群との相違は認められず、蛍光を発する移植始原生殖細胞は生殖巣原基に到達していた。移植後3日目の生殖巣の観察を行うと、 $1 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ の線量で UV 未照射群 (図2-55) と10秒照射群 (図2-56) との相違は認められず、くの始原生殖細胞が生殖巣内に到達定住しており、UV 照射を

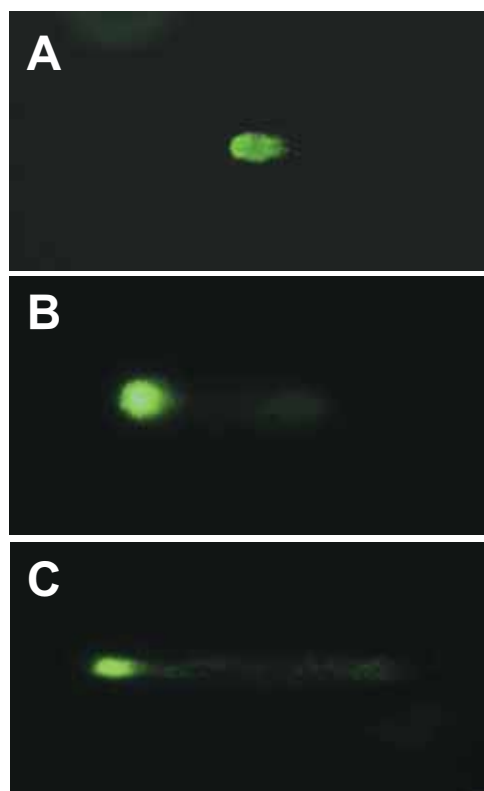


図2-54 コメットアッセイでのUV照射量評価

A: UV 照射 0 秒 (対照) B: UV 照射30秒
C: UV 照射60秒

照射時間に比例して DNA 分断が認められるものの、画像処理によらなければ定量的な評価ができないレベル。

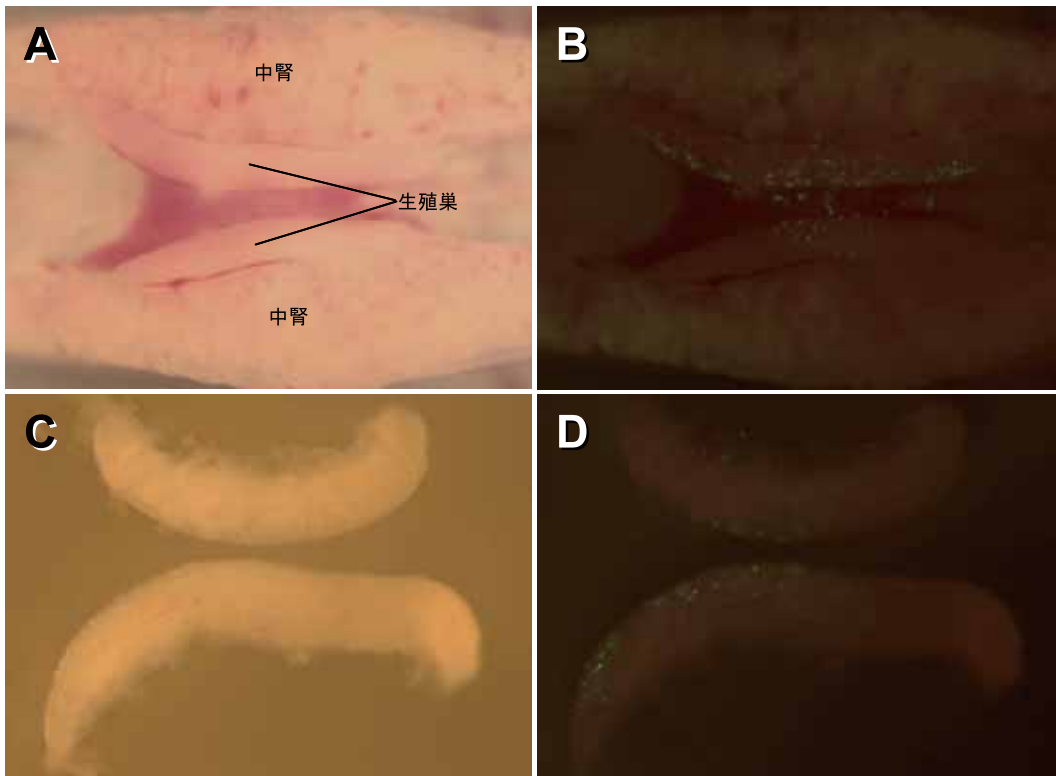


図2-55 UV非照射の始原生殖細胞の生殖巣原基への移動能（対照実験）
 PKH67による生体蛍光染色（緑）したニワトリ始原生殖細胞200個をニワトリ2.5日胚の血流中に移植すると、3日後の5.5胚では生殖巣内及びその近傍に到達しているのが分かる。
 A: 始原生殖細胞移植後3日後の中腎・生殖巣領域の実体顕微鏡像 B: 同視野の蛍光実体顕微鏡像
 C: 切り出した左右生殖巣 D: Cの蛍光実体顕微鏡像

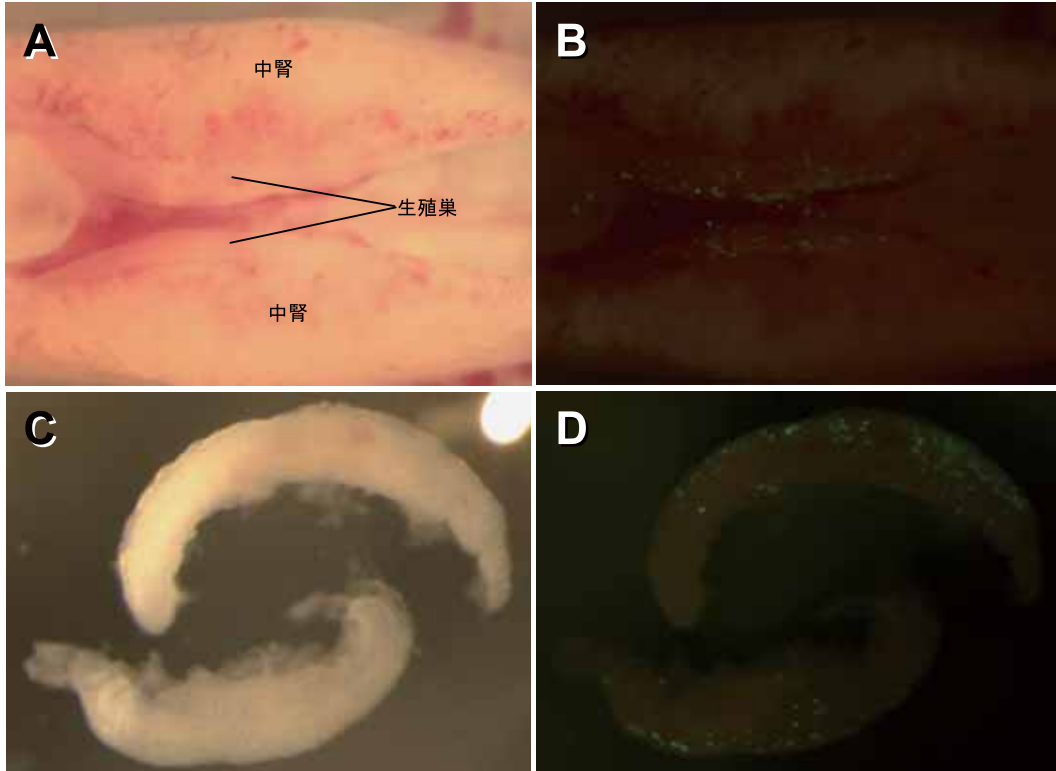


図2-56 UV非照射の始原生殖細胞の生殖巣原基への移動能（10秒照射群）
 $1\mu\text{W}/\text{cm}^2$ のUV照射を10秒間受けた200個の始原生殖細胞をニワトリ2.5日胚の血流中に移植した場合、3日後の5.5胚では生殖巣内及びその近傍に対照群と同様に到達していた。
 A: 始原生殖細胞移植後3日後の中腎・生殖巣領域の実体顕微鏡像 B: 同視野の蛍光実体顕微鏡像
 C: 切り出した左右生殖巣 D: Cの蛍光実体顕微鏡像

受けた始原生殖細胞の生殖巣への能動移動能に差は認められなかった。これに対して、照射時間が120秒の場合は、 $1\mu\text{W}/\text{cm}^2$ の線量でも、蛍光を発する移植した始原生殖細胞を生殖巣とその近傍にほとんど認めることが出来なかった（図2-57）。このことから、血液循環期の始原生殖細胞の生殖巣への能動的移動能を保持しつつ細胞核の機能を破壊する条件は、 $1\mu\text{W}/\text{cm}^2$ の線量を120秒照射という条件であると結論づけた。

2.4.1.2.2 脱核条件

UV照射により核内のDNAは断片化することが知られているが、細胞内に一定時間存在していることの影響は不明であるため、核を除去する方法についても検討した。

図2-58に示すように、対照Aと比較して、サイトカラシンBを処理したBとCでは共に、核が浮き上がって丸くなっている像が観察された。細胞は核を有していることから分かるように完全に脱核しておらず、細胞

質体 (cytoplasm) から突出した状態にある。観察した限りでは、BおよびCの間で目立った違いは見られなかった。また、Dに示すように、遠心後の18mmカバーガラスに接着したニワトリ繊維芽細胞 (CEF) は核が浮き上がっているものの、完全に脱核していない細胞も多数観察された。また、遠心の影響で細胞自体がガラスから多数剥がれ落ちていた。これは遠心速度 (3000gと5000g)、遠心時間 (40分、50分、60分) を変えてもほぼ違いは見られなかった。なお、ガラスに接着したCEFがコンフルエントに近いと、サイトカラシンB処理の段階でCEFがシート状に剥がれてしまう。60%程度のサブコンフルエントの状態ですべてサイトカラシンB処理した場合の方が細胞が剥がれる率は低かった。

一方、図2-59に示したように、サイトカラシンB処理後遠心操作して得られた沈殿サンプルには、サイトカラシンB処理遠心操作をせずにトリプシンにて遊離させたコントロールの細胞 (A) に比べ、明らかに細胞サイズが小さく、また全体がヘキストにより青く染まった

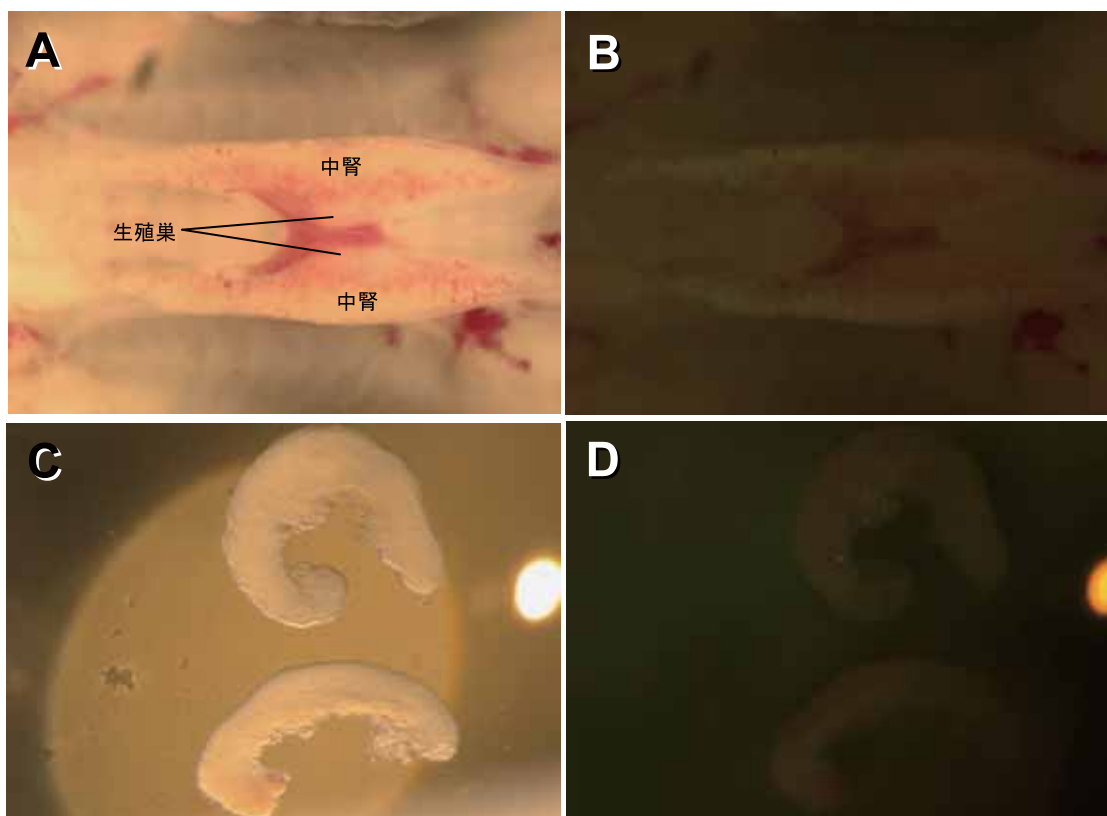


図2-57 UV非照射の始原生殖細胞の生殖巣原基への移動能 (120秒照射群)

$1\mu\text{W}/\text{cm}^2$ のUV照射を120秒間受けた200個の始原生殖細胞をニワトリ2.5日胚の血流中に移植した場合、3日後の5.5胚では生殖巣内及びその近傍にはほとんど観察されなかった。また、胚体の他の領域にも観察できなかった。

A: 始原生殖細胞移植後3日後の中腎・生殖巣領域の実体顕微鏡像 B: 同視野の蛍光実体顕微鏡像

C: 切り出した左右生殖巣 D: Cの蛍光実体顕微鏡像

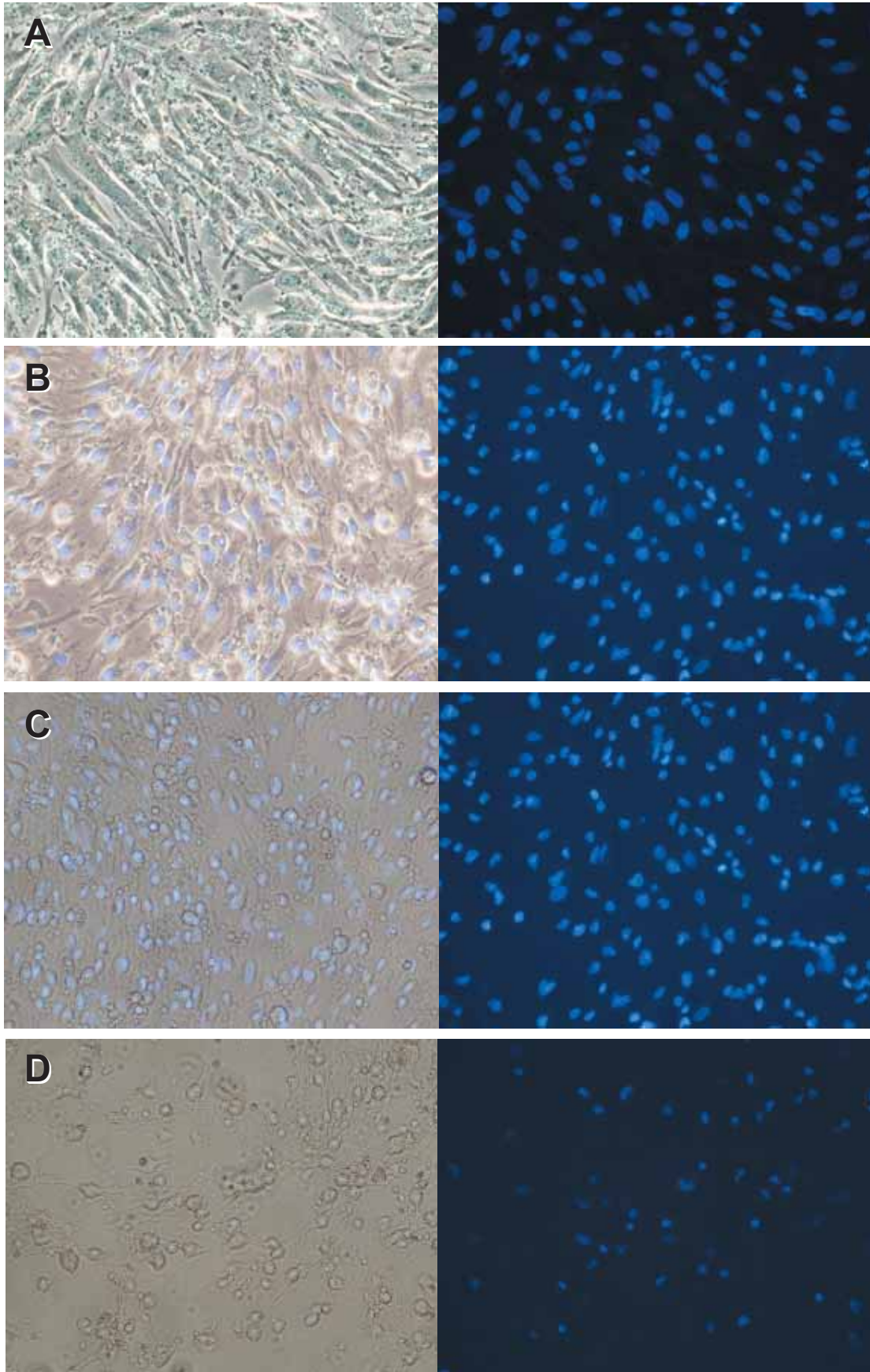


図2-58 サイトカラシンBによるニワトリ繊維芽細胞の脱核
 A: 対照 B: サイトカラシン処理30分 C: サイトカラシン処理1時間
 D: サイトカラシン処理後、遠心してカバーグラスに残った細胞
 A~Dの組み写真の左側は位相差顕微鏡像で、右側はヘキスト染色後の蛍光像

核が観察された (B, C)。これらは、核のみが細胞から細胞膜に包まれて脱核した核体であると思われる。ただ、沈殿物の中にはガラス片や、剥がれ落ちた CEF の細胞塊も多数混入していることから、沈殿中の核体を回収・精製する必要がある。

また、遠心操作によって細胞がガラスから剥がれ落ちないようにする工夫や、サイトカラシン B 濃度、遠心速度や遠心時間の検討も更に必要である。加えて、核体の精製の際にかなりのロスが有ることから、核体を直接

マイクロピペットで回収・精製することも検討すべきかも知れない。

2.4.2 細胞融合条件の検討

体細胞として血球細胞と始原生殖細胞の電気融合の条件検討を行い、低率ながら融合細胞が得られている。体細胞として繊維芽細胞を使用し、始原生殖細胞との融合効率の効率的な条件を開発するとともに、細胞融合に使われる PEG (ポリエチレングリコール) による細胞融

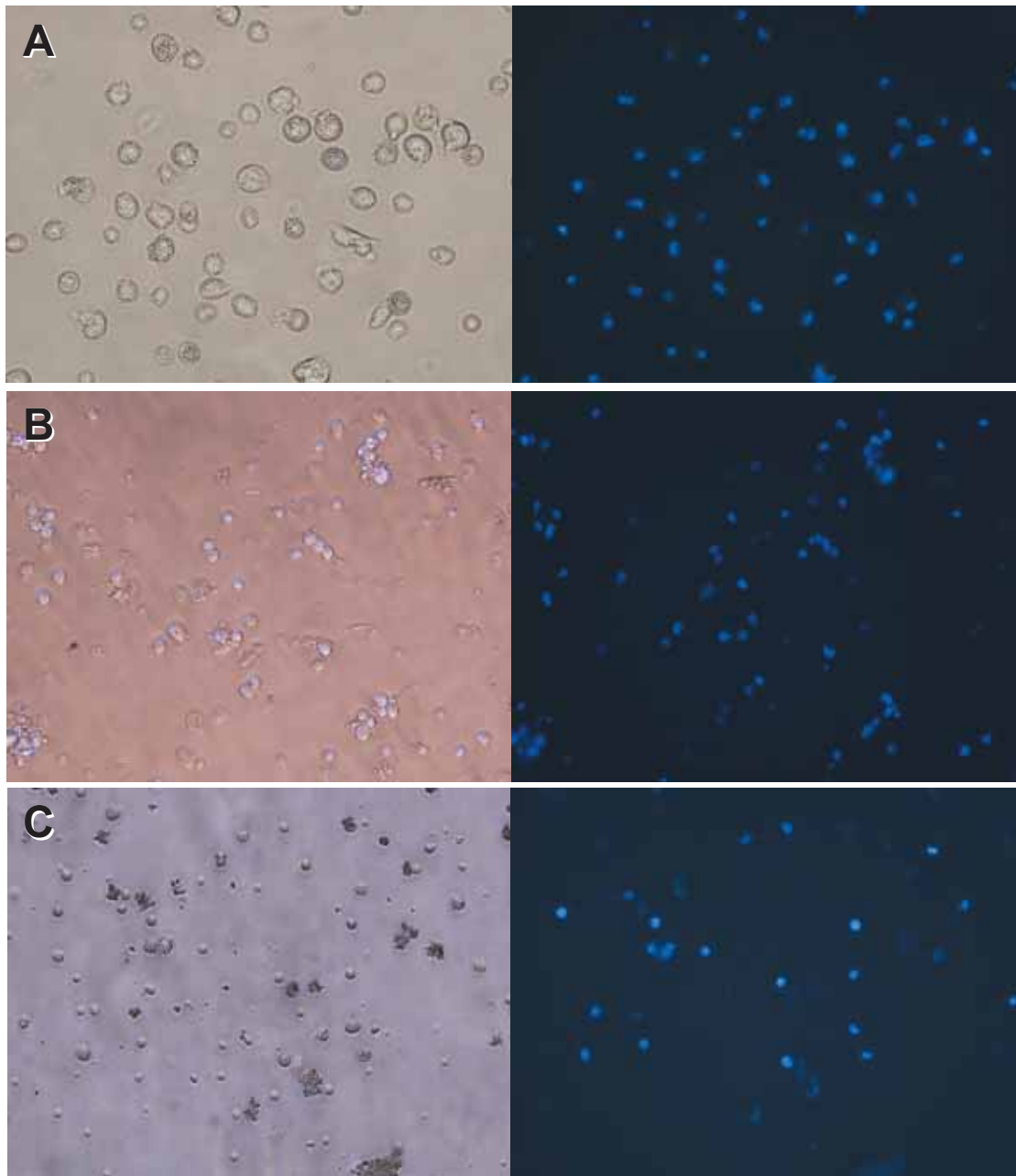


図2-59 サイトカラシン B によるニワトリ繊維芽細胞核の回収
A: 対照 (サイトカラシン無処理の際の沈殿) B: 10 μ g/ml サイトカラシン処理後の沈殿 C: 20 μ g/ml サイトカラシン処理後の沈殿
A~C の組み写真の左側は位相差顕微鏡像で、右側はヘキスト染色後の蛍光像

合条件についても検討した。

2.4.2.1 GFP 導入ニワトリ胚性繊維芽細胞とニワトリ始原生殖細胞との PEG による細胞融合

2.4.2.1.1 材料と方法

プロトコール

- ・ニワトリ始原生殖細胞を PKH26 にて生体蛍光染色しておく
- ・GFP 導入ニワトリ胚性繊維芽細胞：ニワトリ始原生殖細胞の細胞数を 2 : 1 準備し、Opti-MEM 無血清培地 100 μ l に別々に懸濁したドロップを作製する
- ・PCR チューブにて混合
- ・遠心 (3000 rpm, 5 min) し、上清を捨てる

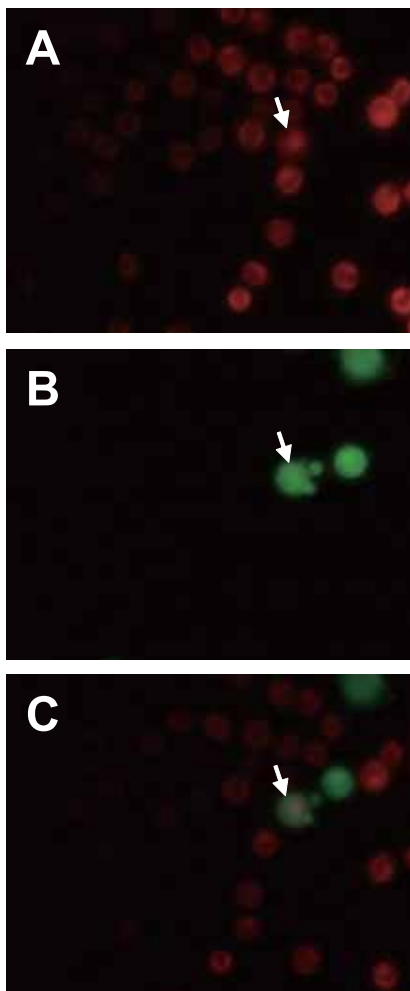


図2-60 PEG を用いた始原生殖細胞とニワトリ繊維芽細胞との融合

- A: 赤フィルターを用いて始原生殖細胞を観察
- B: 緑フィルターを用いて繊維芽細胞を観察
- C: A, B 画像を重ね合わせたもの
白矢印の細胞が始原生殖細胞と繊維芽細胞との融合細胞である

- ・ 37°C の PEG 溶液原液 100 μ l を加え、3 分間処理
- ・ 150 μ l の Opti-MEM を添加し、十分に懸濁した後、遠心 (3000 rpm, 5 min) し、20 分間 37°C にてインキュベーションする
- ・ 10 ml の KAV-1 培地を加え、遠心洗浄する
- ・ 20 μ l の KAV-1 培地で懸濁し、蛍光顕微鏡にて検鏡
- ・ 核数を検討する場合、Hoechst 33342 にて核の生体染色を行う

2.4.2.1.2 結果と考察

融合細胞であるとの判定は、蛍光顕微鏡下で、同一細胞において緑の蛍光と赤の蛍光を持つものとした。16 回実施した。図2-60 に挙げた例では、細胞の形態、サイズを無視すると、回収した細胞中の融合細胞の率、融合率はおおよそ 14.6% であった。細胞の形態が若干ながら異常をきたしており、加えて細胞が 1 : 1 で必ずしも融合しているとは限らなかった。この場合の 72 細胞の細胞核数を測定した結果、核数 1 の細胞が 40 個 (55.6%)、核数 2 の細胞が 19 個 (26.4%)、核数 3 の細胞が 10 個 (13.9%)、核数 4, 5, 6 の細胞が各々 1 個 (1.4%) で

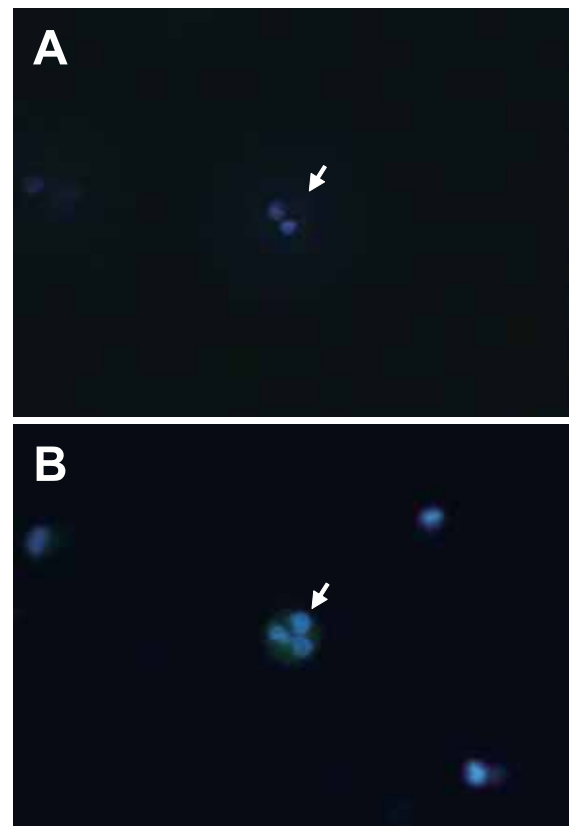


図2-61 PEG による融合細胞

- A: 細胞内に 2 核が確認できる
- B: 細胞内に 3 核が見えるもの

あった (図2-61)。

この様に、細胞融合処理によって複数の細胞が融合していることが核数により確認できた。

2.4.2.2 脱核で得た胚性繊維芽細胞の核と始原生殖細胞との PEG による融合

2.4.2.2.1 材料と方法

予備試験として、遺伝子導入を行っていないニワトリ胚製繊維芽細胞をサイトカラシン B 脱核処理により得られた核体 (karyoplast, 別称 minicell) と、核の不活性化処理をしていないニワトリ始原生殖細胞の細胞融合を試みた。始原生殖細胞の細胞質を PKH26 により赤色に生体蛍光染色した。また、胚性繊維芽細胞の核を Hoechst 33342 にて青色に蛍光染色した後、サイトカラシン B により脱核処理をしてミニセルを得た。これらを用いて PEG による細胞融合を行った。

2.4.2.2.2 結果と考察

融合が起こった際には、赤色蛍光で染まった始原生殖細胞に青蛍光を持つミニセル核が認められる (図2-62)。融合処理に使用した細胞総数に対する融合細胞数の割合 (融合効率) は不明であるが、現時点では精製したミニセルを多数調整することが困難であるため、融合効率がきわめて低い。多数のミニセルを調整するプロトコールを作るか、或いは、少数のミニセルを用いて高融合率の融合細胞作出法を開発する必要がある。本実験では、始原生殖細胞の核の不活性化処理を実施していない。これらの処理が加わると融合効率は更に低下すると思われるため、高融合効率が得られる細胞融合法の開発が必須となる。

2.4.2.3 マイクロピペット、マイクロウェルによる PEG 細胞融合

融合細胞を作製する組み合わせは 1 : 1 での融合であれば最低それぞれ 1 細胞ずつ、計 2 細胞である。この条件で融合が可能であるならば、融合効率は 100% となる。そこで、マイクロピペット或いはマイクロウェルを作製し、細胞 2 個以上 10 個以内で PEG による細胞融合を試みた。予備試験として実施。

2.4.2.3.1 材料と方法

2.4.2.3.1.1 マイクロピペット

10 cm のボロシリケートガラスのキャピラリー (外径 1,000 μm 内径 750 μm) (Sutter Instrument) を、プーラー (Flaming/Brown Micropipette Puller P-97/IVF, Sutter Instrument) を使用し、マイクロピペットを作製し、内径 15~20 μm の部分で切断してマイクロピペットを作製

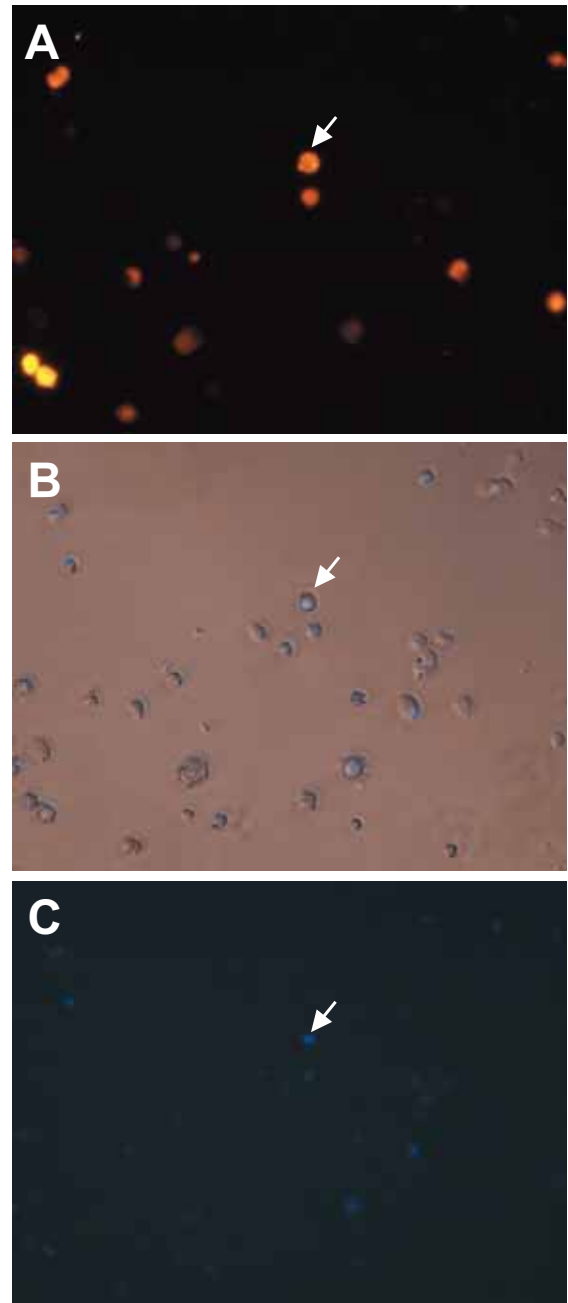


図2-62 PEG を用いた始原生殖細胞とニワトリミニセルとの融合

A: 赤色の始原生殖細胞蛍光像

B: 青フィルターを通した明視野像

C: 青色のミニセル核の蛍光像

A の赤色の始原生殖細胞内に C の青色ミニセル核が認められる

した。ニワトリあるいはウズラ始原生殖細胞を PHK26 (赤色) あるいは PHK67 (緑色) にて生細胞蛍光染色をおこない、融合相手であるニワトリあるいはウズラの胚性繊維芽細胞は始原生殖細胞と異なる PHK67 (緑色) あるいは PHK26 (赤色) にて生細胞蛍光染色して使用した。

プロトコール

- ・培養皿に無血清培地20~100 μ lに別々に蛍光染色を行った細胞を懸濁したドロップを作製する
- ・倒立顕微鏡で、一方のドロップから1~3, 4細胞を吸い上げる
- ・同一マイクロピペットにて他方のドロップから1~3, 4細胞を吸い上げる
- ・マイクロピペット中の無血清培地量とほぼ等量の37 $^{\circ}$ CのPEG溶液原液をマイクロピペットに吸入する
- ・マイクロピペット一端をシーラーにて封じ、遠心(3000 rpm, 5 min)し、20分間37 $^{\circ}$ Cにてインキュベーションする
- ・シーラーを取り除き、20 μ lの血清添加 KAv-1 培地ドロップ中に、マイクロピペット内容物を排出する
- ・マイクロピペットにて、細胞を新鮮な20 μ lの KAv-1 培地(10%血清添加)のドロップへ移し、蛍光顕微鏡にて検鏡
- ・核数を検討する場合、Hoechst 33342にて核の生体染色を行う

2.4.2.3.1.2 マイクロウェル

ES細胞用 aggregation needle (Type: DN-09, Biological Laboratory Equipment, Hungary) を使用してプラスチック培養皿底面に、直径200~250 μ mの時計皿状のマイクロウェルを作成する。

プロトコール

- ・無血清培地に懸濁した融合させるための細胞を、それぞれ1個ずつピックアップしてマイクロウェルに入れる
- ・倒立顕微鏡下で、2細胞をコンタクトさせた状態で、ウェル内の培地をマイクロピペットにて吸い上げ取り除く
- ・マイクロピペットにて、両細胞がコンタクトを維持するようにマイクロウェル内に37 $^{\circ}$ CのPEG溶液原液のドロップを作製する
- ・およそ3分間37 $^{\circ}$ Cにてインキュベーションする



図2-63 PEGによるマイクロピペット内細胞融合
ピペット内で始原生殖細胞と繊維芽細胞が並んでいる

- ・細胞を含むドロップに細胞のコンタクト損なわないように、マイクロピペットにてほぼ同量の新鮮な無血清培地を添加する
- ・細胞のコンタクトを維持した状態で、37 $^{\circ}$ C 20分間インキュベートする
- ・血清添加 KAv-1 培地のドロップへ移し、蛍光顕微鏡にて検鏡

2.4.2.3.2 結果と考察

マイクロピペット法(図2-63)及びマイクロウェル法(図2-64)では、いずれも細胞を個々に扱うために、時間的な制約や習熟が必要となる問題が起こる。個々で述べた手法は、習熟によって十分に実用性がある程度の実験時間内に収まるようになるものである。ただし、プロトコールを全て実行するには最低でも20分程度の時間が必要となるなど、未だに問題点が残っている。

ニワトリを緑色、ウズラを赤色に生体蛍光染色してマイクロピペットにおよそ100細胞を吸引し、遠心処理にて細胞融合を試みた。図2-65は、融合処理1~4時間後、蛍光顕微鏡下で細胞融合の成否の観察結果である。今後、より高倍率での細胞融合過程あるいは融合像の観察が必要であると同時に、培養による細胞の生死の判定、融合細胞の増殖など、より詳しい観察が必要である。

2.4.2.4 微小電極を用いた電気刺激による細胞融合

1979年に Sendaらにより、接着した2個の植物細胞のプロトプラストをそれぞれに微小電極を接着させて電気刺激を与えたところ、高率で細胞融合が起こることを報告した。通常細胞融合は10~30分で完了した。本方

法の利点は、細胞を1:1でマニピュレーションにより操作することから、求める組み合わせでの融合であるか否かを識別する過程、たとえば上記のような生細胞蛍光染色、核染色、マーカーを導入する等の過程を省略できること、そして報告通りの結果が得られれば融合効率は40~80%と言う高率となる。本方法を試験するシステムの構築を含めて実施した。

2.4.2.4.1 材料と方法

組み合わせた細胞間でpoint-adhesionが生じた組を使い、電気生理学で使用する微小電極を接着した細胞それぞれに押しつけ、2本の電極間で通電する、あるいは、微小ホールディングピペット電極を作製し、細胞をホールディングした電極を操作して細胞と細胞を人為的に接着させ、通電する。電極は、日本光電製電気刺激装置 (SEN-3401, NIHON KOHDEN) にアイソレーター (SS-

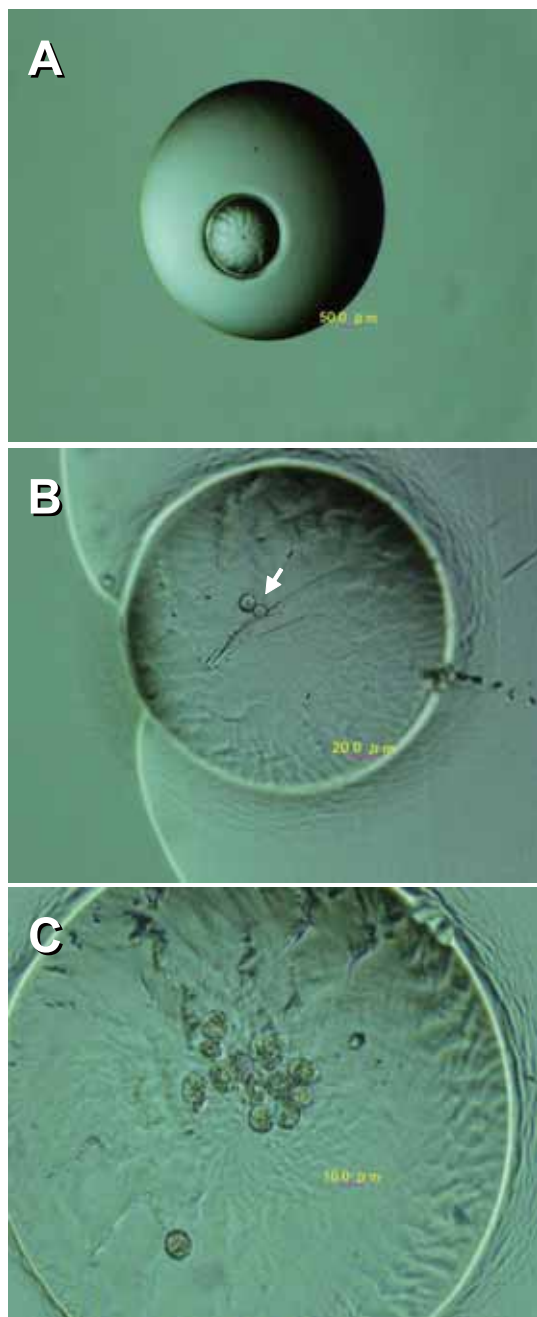


図2-64 PEGによるマイクロウェル内細胞融合
A: 低倍でのマイクロウェルが培養液のドロップの中に見える B: マイクロウェル内の2個の始原生殖細胞 C: マイクロウェル内の幾つかの始原生殖細胞が互いに接触している状態 (高倍率)

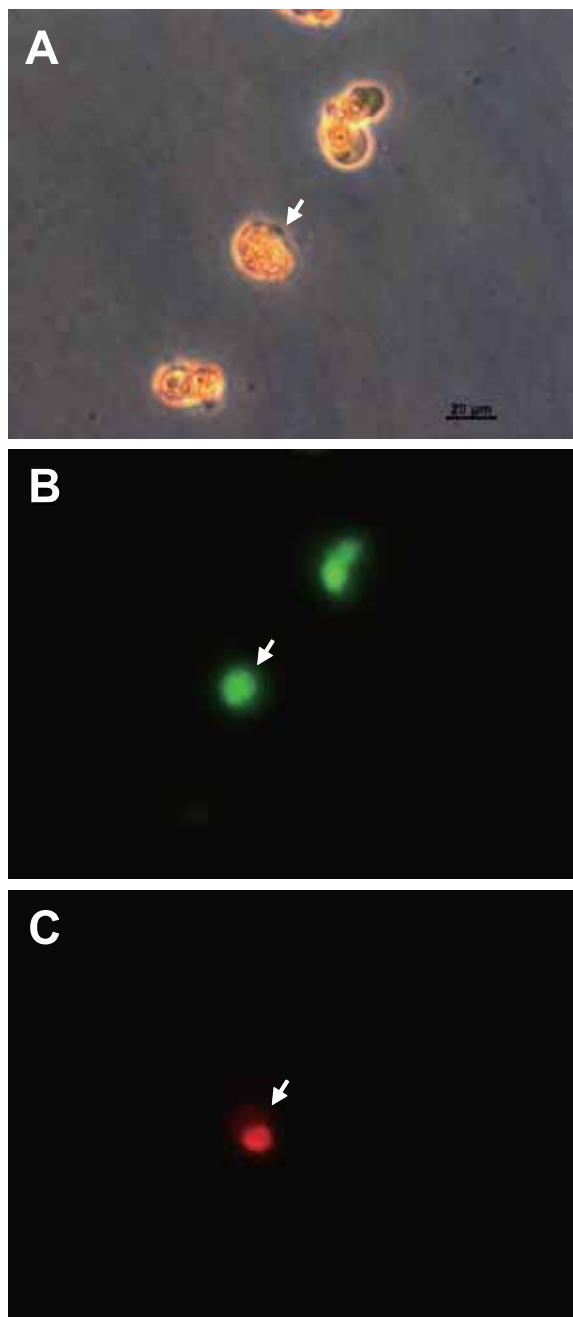


図2-65 1:1での細胞融合 (鶏/鶉細胞)
A: 位相差顕微鏡像で白矢印の細胞が融合細胞
B: 緑色に光るニワトリ細胞
C: 赤く光るウズラ細胞核

203J, NIHON KOHDEN) を接続させて使用した。上記報告による電気刺激条件で通電した。電極内液、および細胞懸濁液は通電のため、 Ca^{++} イオンなど通電に必要な条件は、無血清 KAv-1 培地では Ca リッチであることからそのまま使用した。または生理食塩水を使用した。

10 cm のボロシリケートガラスのキャピラリー (外径 1000 μm 内径 750 μm) (Sutter Instrument) を、プーラー



図2-66 作製したガラス製ホールディングピペット
先端は外径が10~20 μm で、長軸に対して直角とする



図2-67 電気融合のためのセットアップ装置外観

(Flaming/Brown Micropipette Puller P-97/IVF, Sutter Instrument) を使用し、マイクロピペットを作製し、内径 5~10 μm の部分で切断してマイクロピペットを作製し、微小電極として使用した。また、上記10 cm のボロシリケートガラスのキャピラリーを、同プーラーでマイクロピペットを作製し、マイクロフォージ (DeFonbrune) にて内径10~20 μm の部分で切断して切断面を加熱してホールディングピペットを作製した (図2-66)。

融合させる細胞を、ホールスライドガラス (一穴, TOSHINRIKO) の凹部に作製したマイクロドロップ中に移した。細胞を含む培地の蒸発を防ぐために、流動パラフィン液にて封じた。これを細胞融合チェンバーとして、顕微鏡ステージに装着した。微小電極あるいはホールディングピペット電極を装着したホルダー (電極ホルダー EH-108, NIHON KOHDEN) を正立顕微鏡 (LAB OPHTHO, NIKON) の左右に配したマニピュレーター (成茂) に固定した (図2-67)。ホルダーは吸引装置に接続し、細胞をピペット先端に保定した。

2.4.2.4.2 結果と考察

細胞をホールディングピペットにて保持した 2 細胞をマニピュレーター操作によって任意に移動、圧着させることが可能であった (図2-68)。

2 細胞を圧着させて電気刺激を行い、細胞融合が起こる条件を探すことになる。参考とした植物プロトプラストを使った報告では、5~12 μA の電流を 1~5 msec 通電する電気刺激を 1 回与えるだけで細胞融合が起こることが報告されている。そこで、ポポホワイト胚 stage 14 から得られた胚性繊維芽細胞を使い、12 μA , 5 msec の条件の電気刺激を 6 組の細胞セットに対して行ったが、細胞融合は観察できなかった。今後、単回刺激だけでなく、複数回刺激も含めて、詳細な融合条件の探索を予定している。

ここでの詳細記載はしていないが、PEG 法、電気刺激法の他にも不活化 HVJ による細胞融合も試みた。これらの実験の結果に加え、PEG による毒性から細胞の生存率が高いことを考慮して、今後は電気刺激法による細胞融合の効率化を追求するべきと考えられた (図2-69)。

2.4.3 体細胞由来始原生殖細胞の生体内移動能の評価

融合始原生殖細胞の細胞学的特性を検討するために、少数ではあるが得ることの出来た融合始原生殖細胞を用いて胚への注入移植実験を行い、生殖巣原基への到達を観察したところ、数例ではあるが移植融合始原生殖細胞

が生殖巣原基に到達していることが確認できた。体細胞では生殖巣原基への移動は起こらないことから、融合始原生殖細胞でも始原生殖細胞としての細胞特性を保持していると考えられる。

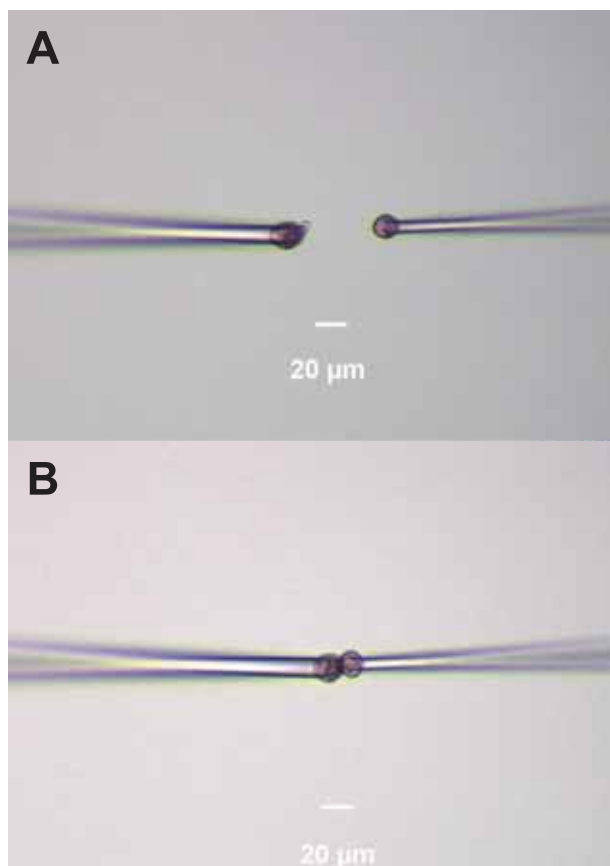


図2-68 ホールディングピペットによる2細胞の圧着
A: ホールディングピペットで左右の2細胞が同じ深度に保持されている。 B: 左右のピペットを操作して2細胞を精確に圧着させる。

2.4.3.1 UV照射始原生殖細胞の生殖巣原基への能動的遊走能による *in vivo* 評価

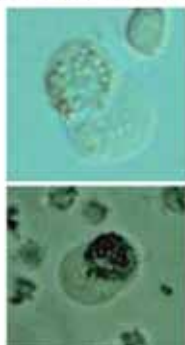
白色レグホーン2.5日胚から採血し、血液循環期の始原生殖細胞を単離した。一定数の単離 PGC を35 mm 培養皿の KAv-1 マイクロドロップ中に移し、ドロップを平坦にした。培養皿の蓋を取り去ってUV照射 (254nm) した。始原生殖細胞の位置の線量は、 $1 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ あるいは $200 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ となるように設定し、UV照射時間10秒と120秒を照射した。対照として、UV未照射の始原生殖細胞を用いた。

これら未照射あるいはUV照射した血液循環期の始原生殖細胞は、いずれも PHK67 で蛍光生体染色を行った後、白色レグホーン2.5日胚の血管中に注入移植して、3日間孵卵した。5.5日胚の時期に胚を単離して解剖した。蛍光実体顕微鏡下で蛍光を観察した。

2.5 体細胞由来の生殖巣キメラ個体の創出

融合始原生殖細胞をホスト鳥類胚に移植することによって生殖巣キメラ個体を作成する予定であったが、融合始原生殖細胞の作出効率が極めて低いために現状では生殖巣キメラ個体を作成するに至っていない。早急に融合始原生殖細胞作出効率を向上させて生殖巣キメラ個体を作成予定である。

融合用溶液 (0.3M Mannitol, 0.1mM CaCl_2 , 0.1mM MgSO_4) に PGCs (1×10^3) と EBCs (5×10^5) を分散 (AC, 400V/cm, 20 sec, DC, 1.5kV/cm, 99 μ sec pulse width, 3 times)



手法による細胞融合効率の比較

融合法	実験回数	PGC数	融合細胞数	融合効率
PEG	n = 232	20,000	2,300	11.5
不活化HVJ	n = 17	8,500	82	0.96 ± 0.64
電気刺激	n = 10	5,000	260	5.2 ± 2.5

図2-69 電気刺激法による細胞融合の効率と優位性

電気刺激法による始原生殖細胞と体細胞の細胞融合は現段階で5.2%とPEGよりも低いものの、今後の改良で効率化は可能と考えられる。PEGでの細胞融合では高い確率で細胞死が起こることも無視できない要因である。

2.6 今後の研究展望

本研究では鳥類始原生殖細胞の大量培養法を開発し、長期培養後の始原生殖細胞由来細胞が細胞特性を保持して始原生殖細胞と全く同じように子孫個体を作出することが出来ることを実証した。また、異種間生殖巣キメラ個体では種を越えて精子、卵が生殖巣内で分化することもPCR 識別によって確認できた。ただし、後代検定による異種子孫個体を得るには至っておらず、今後も後代検定の継続が必要である。

細胞融合による始原生殖細胞の創出に関しては、ホスト始原生殖細胞の生殖巣への移動能を確保しながら細胞核を不活化するUV 照射量を確定できた。また、ホスト始原生殖細胞と体細胞との融合は低率ながら成功している。ただし、1:1での細胞融合の成功率が 10^{-6} と低率で

あることから、この点での技術的問題を克服して更に研究を進める必要がある。少数の融合始原生殖細胞が生殖巣へと到達することが確認できているため、今後は大量に融合始原生殖細胞を確保して本研究を完成させることが必要と考える。

本研究の最終目標は、鳥類体細胞を用いて子孫個体を得る新規手法を開発である。この手法はクローン技術とは異なり、得られる子孫個体は遺伝的多様性を維持している。加えて、本研究所で推進している「環境試料タイムカプセル化事業」の一環で収集・凍結保存した多くの絶滅危惧鳥類の体細胞の重要な将来的活用法を提供することとなり、絶滅危惧鳥類細胞の保存事業の意義及び価値を高めることとなる。

[資 料]

I 研究の組織と研究課題の構成

1. 研究の組織

[A 研究担当者] (現在の職員の現職, 転出者は転出時の職)

環境研究基盤技術ラボラトリー

生物資源研究室

桑名 貴
川嶋貴治
大沼 学
橋本光一郎
今里栄男
大場麻生
長濱麻美
石黒 進
渡辺由美子
石濱佐代子
美濃口祐子
酒井翔子
川嶋理香

[B 共同研究員]

上仲一義

財団法人化学及血清療法研究所

(平成17~19年度)

平嶋正樹

財団法人化学及血清療法研究所

(平成17~19年度)

2. 研究課題と担当者

サブテーマ1. 生殖巣キメラ個体による子孫作出

桑名 貴・川嶋貴治・大沼 学・橋本光一郎・今里栄男・大場麻生・長濱麻美・石濱佐代子・
美濃口祐子・渡辺由美子・川嶋理香

サブテーマ2. 異種間生殖巣キメラ作製法の開発研究

桑名 貴・川嶋貴治・大沼 学・橋本光一郎・今里栄男・大場麻生・石黒 進・長濱麻美・
石濱佐代子・美濃口祐子・渡辺由美子・酒井翔子・川嶋理香

サブテーマ3. ドナー体細胞の増殖培養と標識遺伝子の導入

桑名 貴・川嶋貴治・橋本光一郎・今里栄男・長濱麻美・川嶋理香・石濱佐代子・美濃口祐子・
川嶋理香

サブテーマ4. 体細胞核を持つ始原生殖細胞の創出

桑名 貴・川嶋貴治・橋本光一郎・石濱佐代子・美濃口祐子・川嶋理香

II 研究成果発表一覧

研究の成果物については、成果を特許化する方針のために現時点で記載できるものではありません。

REPORT OF SPECIAL RESEARCH FROM
THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES, JAPAN

国立環境研究所特別研究報告
SR-81-2008

平成 20 年 12 月 26 日発行

編 集 国立環境研究所 編集委員会

発 行 独立行政法人 国立環境研究所

〒305-8506 茨城県つくば市小野川16番2
電話 029-850-2343 (ダイヤルイン)

印 刷 株式会社コームラ

〒501-2517 岐阜市三輪 ぷりんとびあ3

Published by the National Institute for Environmental Studies
16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506 Japan
December 2008

無断転載を禁じます

