

# ブタの卵細胞質内精子注入技術の確立と応用

中井 美智子(農業・食品産業技術総合研究機構 本部)

nakai3@affrc.go.jp

近年、ブタは、食用としてだけではなく、大型実験動物としての利用も期待され開発が進められてきた。しかし、野生動物や他の畜種と同様にブタも悪性伝染病の脅威に曝されており、種や系統の保持、品種改良のための遺伝資源の保存、及びその効率的な利用技術の確立の重要性が高まっている。その一つとして、本稿では卵細胞質内精子注入法 (intracytoplasmic sperm injection: ICSI)を用いたブタの雄性遺伝資源の新たな保存法、利用法の開発および今後の展望について述べる。

## はじめに

近年、家畜やヒトの生殖補助技術の一つとして、精子を卵細胞質内に直接注入することで受精卵を作出する ICSI が発達してきた。ICSI 技術の主な利点としては、運動性の乏しい精子を用いた受精卵作出を可能とすることが挙げられる。有用な形質の家畜精液は、その効率的利用、遺伝資源保持のために凍結保存されているが、精子の耐凍性に個体差が大きいブタでは、凍結融解後の精子運動性の顕著な低下が認められることがある。そのような場合、ICSI 技術は遺伝資源保存、個体再生方法として非常に有用である。また、ブタのように体外受精時に多精子受精が頻発する動物種では、単精子受精卵の効率的な作出をも可能とする。しかし、ICSI を行ったブタ卵(ICSI 卵)では、受精および発生能の低さが問題となっている。そこで、ブタにおける ICSI 技術の確立を目的として、体外受精卵と ICSI 卵で生じる受精現象の違いに着目し、ブタ ICSI 卵の受精および発生効率の低下要因を究明した。さらに、受精成立に精子の運動性を必要としない ICSI の利点を活かした新たな精子保存法および作出法(凍結乾燥法、精巣片異所異種間移植法)の確立にも取り組んだ。

## ブタ ICSI 卵の受精および発生効率の低下要因の究明

### ブタ体外成熟卵由来ICSI卵の個体への発生能の確認

体外成熟卵は、体内成熟卵よりも容易に多く作製でき、実験に供しやすいため、体外成熟卵を用いたブタICSIの確立が望まれていた。そこで、体外成熟卵を用いて作製したICSI卵のレシピエントブタへの移植実験を行った。その結果、世界初の個体作出に成功した<sup>1)</sup>。

### ブタ精子先体が受精および胚発生に及ぼす影響

通常の受精では、精子は卵丘細胞や透明帯通過時に精子頭部前方にある先体から酵素を放出しその構造が消失する”先体反応”を起こすので、卵細胞質内に到達した精子には先体がない。しかし、ICSIでは先体反応を経ることなく卵内に到達できてしまうため、先体に含まれる様々な加水分解酵素が卵の受精成立・発生能に影響を及ぼしている可能性が考えられる。そこで、ICSIに用いる精子の先体の有無が、受精や発生に及ぼす影響を検討した。先体の除去は、Calcium-ionophore (Ca-I) 処理により行った。Ca-I処理区と無処理区の間で受精ならびに体外発生率に差は認められなかった。

このことから、精子先体の存在は、受精や発生に影響を及ぼさないことが示唆された<sup>1)</sup>。

#### ブタ精子への脱凝縮誘起、卵への活性化誘起処理が雄性前核形成に及ぼす影響

精子のクロマチンは、核タンパク質であるprotaminのdisulfide bond (S-S結合)により高度な凝縮状態にある。それが受精後、卵細胞質内glutathioneによりS-S結合が還元されることで脱凝縮し雄性前核を形成する。しかし、ブタICSI卵では、雌性前核は正常に形成されているにもかかわらず注入精子が凝縮状態で残存している場合が多い。このことからICSI卵では精子核脱凝縮の過程に何らかの不具合が生じている可能性が考えられる。そこで、還元剤の一種であるdithiothreitolにより人為的に脱凝縮を誘起した精子頭部を用いてICSIを行った。また、ブタのICSIにおいては、精子を注入しただけでは卵の活性化現象が誘起されない場合が多いため、人為的な卵活性化誘起処理が必要とされている。そこで、卵の活性化誘起を電気刺激により行い、精子核の形態変化に及ぼす影響も合わせて調べた。その結果、精子核の雄性前核への移行と胚発生に重大な影響を及ぼす要因として、注入される精子核の凝縮状態よりも人為的な活性化誘起処理が重要であることを明らかにした<sup>2)</sup>。

#### ICSIに用いる精子への前処理が精子由来卵活性化誘起因子に及ぼす影響

精子は、卵活性化誘起因子phospholipase C- $\zeta$  (PLC $\zeta$ )を有しており、受精過程において、これを卵細胞質内へ放出し、卵細胞質内カルシウム濃度変動を誘起することで卵活性化現象を進行させる<sup>3)</sup>。それに対し、ブタを含む家畜のICSI卵では、精子の注入だけでは十分な卵活性化を誘起できないため、受精や発生には人為的な活性化誘起処理が必要とされることを明らかにした<sup>2)</sup>。しかし、注入精子が卵活性化を十分に誘起できない原因は明らかにされてこなかった。上述のように、ブタICSIでは精子への前処理が多く試みられてきた。そこで、精子への膜損傷処理がPLC $\zeta$ 量およびICSI後の卵活性化誘起能に及ぼす影響を調べた。その結果、精子への膜損傷処理は、精子内PLC $\zeta$ 量の減少、卵活性化誘起能低下を引き起こすことが示唆された<sup>4)</sup>。

以上から、ブタ ICSI 卵の受精や発生において、ICSI に用いる精子の状態よりも卵の活性化状態が大きく影響することが示唆された。そして、注入精子の卵活性化誘起能は、精子への膜除去などの処理によって損なわれることが明らかとなった。今後は、家畜における ICSI 効率の向上を目的として、通常受精時に生じる卵活性化現象が ICSI 卵においても生じているかを、特に卵細胞質内カルシウム濃度変動の様式に着目して研究を進めていきたい。

#### 新たな精子保存法の確立

##### ブタ精子の凍結乾燥(FD)保存用メディウムおよび ICSI 後の体外・体内発生能の検討

新たな精子の保存法として期待されている FD 法は、液体窒素を必要とせず、室温あるいは低温での長期保存を可能とする方法である。しかし、ブタ FD 精子に関する情報は少ない。また、FD 処理により DNA の断片化を招き、受精・胚発生に重要な精子 DNA の機能性を担保できないとの報告もある。精子 DNA の断片化には、二価の陽イオン依存的に活性化する endonuclease が関与している。そこで、精子 DNA 断片化を抑制する目的で FD 用メディウムへのキレート剤 (EGTA,ならびに EDTA)添加の効果および、FD 精子を用いて作製した ICSI 卵の体外・体内発生能

の検討を行った。その結果、FD 用メディアムへの EGTA の添加が精子 DNA 保護および ICSI 卵の体外発生率において有効であった。また、体内発生においては、ブタで初めて 39 日齢胎仔まで発生することを確認した<sup>5)</sup>。

#### 異所異種間移植法によるブタ精子作出および ICSI 後の体外・体内発生能の検討

異所異種間移植法は、未成熟個体の精巣から精子を作出できるため、絶滅危惧種や有用個体の雄性生殖資源の保護に有用である。しかし、この技術を用いた個体発生はマウスとウサギでしか報告されていない<sup>6)</sup>。そこで、ヌードマウス背部皮下にブタ新生仔精巣組織を移植し発育させた後、組織から回収した精子を ICSI し、その後の体外・体内発生能を調べた。その結果、体外培養後に二倍体の胚盤胞の形成が確認された。さらに、胚移植後、家畜において世界で初めて個体の作出に成功した<sup>8)</sup>。これらの成果は、家畜雄性配偶子の新たな保存・増殖法の確立に大きく貢献するものである。

#### おわりに

一連の研究により、ブタの ICSI 卵における発生効率を改善するための重要な要因は、卵の活性化誘起であることが示唆された。今後、生理的な卵活性現象を再現しうる人為的卵活性化誘起法の開発がブタにおける ICSI 技術を発展させることが期待できる。また、新たな精子の作出や保存技術の開発に伴い、正常な DNA を保持している精子を選抜する方法も確立していく必要がある。

本研究で得られた知見は、ブタだけではなくウシやウマなど他の大型家畜へも応用可能なものであり、有用遺伝資源の保全やその効率的な利用という観点から、今後の日本における畜産の発展を支えるものとなりうる。

#### 謝辞

農業・食品産業技術総合研究機構 菊地和弘 博士、麻布大学 柏崎直巳 教授、伊藤潤哉 准教授をはじめとして、多くの関係者の皆様方からの御助言、御助力に深く感謝申し上げます。

#### 引用文献

- 1) Nakai M., Kashiwazaki N., Takizawa A., Hayashi Y., Nakatsukasa E., Fuchimoto D., Noguchi J., Kaneko H. and Kikuchi K.: Biol Reprod 68: 1003-1008 (2003).
- 2) Nakai M., Kashiwazaki N., Takizawa A., Maedomari N., Ozawa M., Noguchi J., Kaneko H., Shino M. and Kikuchi K.: Reproduction 131: 603-611 (2006).
- 3) Saunders C.M., Larman M.G., Parrington J., Cox L.J., Royse J., Blayney L.M., Swann K., and Lai F.A.: Development 129: 3533-3544 (2002).
- 4) Nakai. M., Ito J., Sato K., Noguchi J., Kaneko H., Kashiwazaki N., and Kikuchi K.: Reproduction 142: 285-293 (2011).
- 5) Nakai M., Kashiwazaki N., Takizawa A., Maedomari N., Ozawa M., Noguchi J., Kaneko H., Shino M., and Kikuchi K.: Zygote 15: 15-24 (2007).
- 6) Shinohara T., Inoue K., Ogonuki N., Kanatsu-Shinohara M., Miki H., Nakata K., Kurome M.,

Nagashima H., Toyokuni S., Kogishi K *et al.*: Human Reproduction 17 3039–3045 (2002).

- 7) Schlatt S., Honaramooz A., Boiani M., Scholer H.R., and Dobrinski I.: Biol Reprod 68: 2331-2335 (2003).
- 8) Nakai M., Kaneko H., Somfai T., Maedomari N., Ozawa M., Noguchi J., Ito J., Kashiwazaki N., and Kikuchi K.: Reproduction 139: 331-335 (2010).