

F-3 希少野生動物の遺伝的多様性とその保存に関する研究

F-3 (2) 希少野生動物の生息域外保全および増殖技術に関する研究

F-3 (2) ④ 鳥類始原生殖細胞の体外培養・凍結保存及び移植に関する研究

研究担当者 張 一國, 環境庁エコフロンティアフェロー  
高橋慎司, 国立環境研究所地域環境研究グループ 主任研究員  
渡辺 信, 国立環境研究所生物圏環境部 環境微生物研究室 室長  
共同研究者名 大野忠夫, 理化学研究所ジーンバンク室 室長  
日下部守昭, 理化学研究所細胞生物研究室  
Jae Yong Han, Ph.D., Dept. of Animal Science and Technology,  
College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University

[要 旨]

鳥類の受精卵は大きいために、凍結保存は極めて困難であることから、その遺伝資源の保存方法として初期の生殖細胞である始原生殖細胞(Primordial Germ Cells, PGC)の利用が考えられた。鳥類のPGCを分離・培養・保存ならびに移植することにより、鳥類における遺伝資源の保存が可能となるものと考えられる。鳥類のPGCは初期胚発生において、生殖巣以外の場所に起源し、血流に乗って移住し、生殖巣に定着・増殖し、そこで配偶子を形成する。本研究では、このようなPGCの性質を利用して生殖巣に定着した後のPGC (gonadal PGCs, gPGC) の培養および移植について検討した。

生殖巣間質細胞を培養し、均一に継代して培養1日目および5日目に、それぞれPAS染色を行い、gPGCを計測した結果、それぞれ平均868個および3347個であり、平均3.8倍に増加していたことが明らかになった。継代後5日目以降の培養観察においてgPGCはさらに増殖を続け、その中には大きなコロニーを形成するものも確認された。一方、培養中のPGCを簡便で効率的な凍結保存方法を開発し、低温保存(-80℃)して融解した結果、gPGCの生存率は約65%であった。

培養後のgPGCが生殖巣に移住し、増殖できるかを調べるために、gPGCの移植実験を行った。移植に用いたgPGCは、生殖巣間質細胞から酵素を用いない緩やかに攪拌する方法によって得られた。分離されたgPGCに対してはPAS染色によって、ほぼ純粋なgPGCであることを確認した。分離したgPGC(ドナー)を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した結果、レシピエント胚の生殖巣内に蛍光色素に標識されたドナーgPGCが観察され、生殖系列キメラになっていることが確認された。しかも、レシピエント生殖巣の中で移植後の3日間に平均約5倍に増加していた。現在、さらに培養後分離したニワトリおよびウズラのgPGCを移植し、生殖系列キメラニワトリとウズラを作製し、その後代を得る研究を行っている。

本研究の結果を基に野生鳥類における遺伝資源の保存技術を実用化することが期待される。

[キーワード] **Primordial germ cells (PGCs), Chick, Quail, Avian, Genetic stock.**

平成7年度予算額：7,001千円

## 1. 序

鳥類における遺伝資源の保存方法の開発ならびに生殖腺キメラ動物の作製技術の開発は、現在、大きな課題となっている。哺乳動物においては、遺伝資源を保存する手段として受精卵の凍結保存や胚の移植技術が実用化されているのに対して、鳥類においては卵が極めて大きく、多量の卵黄を含むため受精卵の凍結保存が困難であり、哺乳動物における受精卵移植に相当する技術も存在しない。このような現状の中で、鳥類における遺伝資源の保存手段として考えられたのが、始原生殖細胞 (Primordial Germ Cells, PGC) の利用である。PGCを、分離、培養、保存および移植することができれば鳥類における遺伝資源の保存と生殖腺キメラ動物の作製技術の開発に大きな道を拓くことができるものと考えられる。

PGCは初期胚発生において、生殖巣以外の場所に起源し、血流に乗って移住し (circulating PGCs, cPGC) 、生殖巣に定着・増殖し (gonadal PGCs, gPGC) 、そこで配偶子を形成することが知られている。このPGCを、分離、保存および移植することができれば鳥類における遺伝資源の保存技術の開発に大きな道を拓くことができるものと考えられる。また、PGCやその他の段階の生殖細胞に対して遺伝子導入等の実験的操作を加えることが可能になれば、減数分裂や配偶子形成という生殖細胞の極めて重要な現象の解明を行うための実験系が提供されることになると同時に、動物個体の生殖系列に対して操作を加えるための新しい方法が得られることになる。このためには、遺伝子導入等の目的でPGC等の生殖細胞を体外で培養して増殖させる方法、また、こうして操作を加えられた生殖細胞から動物個体を作らせるための方法等が必要である。

現在までの研究によって、移植に用いるPGCは、数が多く、培養操作が比較的簡単であることから、5日目の生殖巣のgPGCが好ましいと思われた。生体内ですでに移住、定着が完了したgPGCが血管中に移植された場合、再び生殖巣に移住、定着および増殖し、最終的には精子または卵細胞へと分化することができるなら、遺伝資源を保存する有効な手段であるといえる。

## 2. 研究目的

本研究においては鳥類における遺伝資源を保存するための研究の一環として、(1) 生殖巣に定着した後のgPGCの体外培養方法について、(2) gPGCの凍結保存方法について、(3) 体外培養系で増殖したgPGCの移植方法について、ニワトリおよびウズラにおいてそれぞれ検討した。

## 3. 研究方法

(1) 受精卵：ニワトリの受精卵：ホワイトロック種 (アーバーエーカー) の受精卵を種鶏場から購入して、実験に供すまで15-20℃で保存し、購入後一週間以内に使用した。ウズラの受精卵：国立環境研究所で飼育している白卵系 (WE-NIES) のウズラの受精卵を採卵し、13-15℃で保存し、採卵後一週間以内に使用した。

(2) 受精卵の培養器：孵卵器 (P-03型、昭和フラン器研究所) またはIncubator (ISUZU, model 2-2183) を38℃に設定して使用した。

(3) 細胞移植用マイクロピペット：シリコンでコーティングした50  $\mu$ lのガラス製マイクロピペット (Disposable micropipettes, Drummond Scientific Co.) を微小電極製作器 (Type PN-3, No.8606, NARISHIGE Scientific Instrument Lab.) で内径30-50  $\mu$ mになるように伸ばし、斜めに切断して使

用した。これにつなぐアスピレーターチューブは先の方のゴムのチューブは切って間にポアサイズ0.2 $\mu$ mメンブレンフィルターを接続し、吸口からの細菌汚染を防いだ。

(4) 顕微鏡：血液採取用には実体顕微鏡(Type SZH10, Olympus)と無熱光源(Model LGPS, Fiber Optic Light Source, Olympus)を、細胞観察には倒立顕微鏡(Type BH-2, Olympus)を、写真撮影にはオリンパス全自動顕微写真撮影装置(Type PM-10 ADS, Olympus)等を使用した。組織切片の蛍光観察には共焦点レーザー顕微鏡 (Confocal Laser Scanning Microscopy, LSM310, Zeiss, Germany) を用いた。

(5) 培地と血清：洗浄用溶液は、カルシウム、マグネシウムを含まないリン酸緩衝生理食塩水（以下、PBS(-)と称する）を使用した。炭酸ガス培養器（37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> Incubator）中の培養用培地は、MEDIUM 199 with Earle salts (RIKEN Cell Bank, 以下M199と称する) およびM199に10% FBSの他, 10 ng/ml of receptor grade chicken insulin-like growth factor-1 (chick IGF-1, Gro Pep Pty. Ltd.), 10 ng/ml of recombinant human fibroblast growth factor basic (human FGF-b, PEPRO TECH Inc.)および10 units/ml of murine leukemia inhibitory factor (murine LIF, ESGRO Co.)を添加したもの（以下3 GF in M199(+)と略す）を使用した。血清はウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) を用いた。

(6) 手術道具：眼科用手術はさみ、ピンセット、マイJECTター等を使用した。

(7) 培養器具：96穴プレート(96 well culture plate, Falcon), 24 well culture plateを使用した。

(8) 染色液：ニワトリPGCの同定のための染色にはPeriodic Acid Schif (PAS)染色試薬キット(武藤化学薬品株式会社)を使用した。

上述の全ての機材については、滅菌処理済みのもの以外はアルコールで消毒するか、またはオートクレーブで滅菌して使用した。

また、下記の実験はすべてクリーンブース(OR-2667, 199, Japan Air Filter Co.), またはクリーンベンチの中で無菌的に行った。

38 $^{\circ}$ Cの孵卵器で5日間孵卵した受精卵の表面を70%のアルコールにつけた綿で拭いた後、割卵し、卵黄と卵白を100mmの培養皿に入れた。これから胚を取り出し、別の100mmの培養皿に入っているPBS(-)で洗浄した。これらの胚は一個ずつチャコールで黒く染めた歯科用ワックスを敷いた培養皿に入っているPBS(-)の中で虫ピンで仰向けに止め、眼科用はさみを用いて開腹し、まず腸間膜を分離した後マイJECTターとピンセットを用いて原始腎臓側に付いている白色で細長い生殖巣を注意深く分離した。この段階の生殖巣の直径は0.1-0.2mm, 長さが1-1.5mmほどであった。生殖巣をスライドガラス(HTCS)に乗せて二つのマイJECTターの先端で小さく細分化し、培養用培地が入った96穴プレートのウェルにいれた。培養用培地は10% FBSを含むM199 (M199(+))を0.15ml/well添加したものである。7-8個以上の生殖巣の場合は24穴プレートのウェルに入れても初代培養は可能である。

これを3-4日間培養すると、生殖巣から付着性の生殖巣間質細胞が伸びてきて底面に一杯になる。この細胞は、通常の細胞培養技術によって、2-3回までの継代培養が可能であり、しかも浮遊系に近いgPGCが多く含まれている。生殖巣間質細胞の増殖とともにgPGCの増殖も観察されるが、しかし大きな生殖巣組織の塊が多く存在しているのでそれらの数を正確に計測することは困難であった。本研究ではこれらの細胞を生殖巣ストローマ細胞（生殖巣間質細胞）と命名した。この細胞は、通常の細胞培養技術によって、継代培養が可能であり、しかも浮遊系のPGC(gPGC)が多く存在することがPAS染色によって確認することができる。このgPGCを含む生殖巣間質細胞を緩やかなピペッ

ティングを段階的に行ってから、Cell Strainer (Cat. No. 2350, Falcon)を用いることによって生殖巣の間質組織の塊を除き、ほぼ完全なシングル細胞サスペンションにした。このシングル細胞サスペンションは0.1-0.2mlの同一培地とともに、96穴培養プレートの上ウエルに継代し、さらに5日間の培養を行った。継代後1日と5日目にそれぞれ3.5%フォルマリンで固定してPAS染色を行いその数を計測した。この実験は計7回繰り返した。

培養後のgPGCは、24穴プレートに直にfreezing medium (RIKEN)を入れ、-80℃のフリーザーで凍結保存し、融解後0.25%のトリパンブルーでその生存率を調べた。実験は計5回繰り返した。

付着系の細胞を剥がさないように注意しながら、このgPGCを0.1mlの培養用培地M199とともに、96穴プレートの上ウエルに継代することによって、ほぼ純粋なgPGCを得た。継代する前後のgPGCは同じくPAS染色によって同定した。サスペンションに際しては、ピペティングの勢いで付着系の間質細胞が剥がれてくる場合がある。このような場合は、この細胞懸濁液を培養皿のまま培養器に1-2時間入れて培養すると、付着系の細胞が再び伸びてきて培養皿の底面に付着するので、次のピペティングによってほぼ純粋なPGCのみを得るようにした。

gPGCの移植は下記の方法で行った。

(1) ドナーPGCの準備：培養後のgPGCを実験1の方法で分離し、レシピエント生殖巣の中に含まれていたPGCと区別するために無毒性の蛍光色素で標識した。蛍光色素標識は、細胞蛍光標識キットC (PKH26 fluorescent staining kit C for general membrane labeling, Cat. No. Z-PKH26-GL, ZINAXIS, Horan *et al.*, 1990) を使用した。キット構成は下記の通りである。

PKH26 stock	(蛍光色素原液：色素濃度 0.001M)	500 $\mu$ l	x 1
DILUENT C	(希釈液)	10ml	x 6

本色素分子の一部が細胞膜の脂質層に選択的に入り込むことによって、細胞が染色される。また本色素の励起波長は551nm、測定波長は567nmである。分裂しない細胞の場合、蛍光色素の半減期は約100日にもおぼり、この高い安定性は体内での長期の実験に有用である。

色素の使用は、PGCの数が微量であるため、各種試薬の液量は以下のように約1/16に減量し1.5mlのエッペンドルフチューブで行うようにした。

DILUENT C	1mlを	0.0625 ml に、
PKH26 stock	1mlを	0.0625 mlに、
MEDIUM	2mlを	0.152 mlに、
SERUM	4mlを	0.250 mlに。

このようにして蛍光標識したcPGCは、蛍光顕微鏡を用いて生存状態で観察可能である。

(2) レシピエント胚の準備：2.5-3日間解卵した卵の殻を割って、100mmの培養皿に入れ、移植操作までの間37℃の炭酸ガス培養器の中に保存した。

(3) 細胞移植：移植用ガラスピペットでドナーPGCの懸濁液からgPGC約150個前後(2-3 $\mu$ l, 5 $\mu$ l以下の培地中に入るようになる)を拾い上げレシピエント胚の背動脈に注入した。注入後、胚が入っている培養皿は蓋をして、そのまま37℃の炭酸ガス培養器に入れてさらに2-3日間解卵した。

(4) キメラの確認：計5.5日間培養した胚を4個選んでフォルマリン固定後、2.5%, 5%, 7%, 10%のゼラチン(gelatin)で段階的(1日ずつ)に包埋し、厚さ50 $\mu$ m(Emb. No.: 56004)または100 $\mu$ m(Emb. No.: 56005-56007)の連続切片を作製し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

#### 4. 実験結果

分離前の間質細胞の培養系における観察によると、間質細胞の増殖に伴ってgPGCが増殖していることが確認できた。しかし大きな生殖巣組織の塊が多く存在しているので、それらの数を正確に計測することは困難であった。培養系におけるgPGCは、明らかに他の細胞と形態が異なり、また位相差顕微鏡下で強い屈折率を示すことによっても容易に識別できた。すなわち、形状はcPGCと同様ほぼ球形で大きく、直径12-20 $\mu\text{m}$ であった。一部に、楕円形のものや間質細胞の間に偽足を伸ばしているものがあることも観察できた。細胞核は細胞の中心からずれた位置に存在することが多く、直径は8-12 $\mu\text{m}$ で細胞のかなりの部分を占めているが、観察できない場合が多かった。ニワトリPGCはPAS染色によって赤色に染色され、細胞質内に多糖類の顆粒が豊富であることを示している。

酵素等を使わないサスペンション方法によって分離されたgPGCは、形態的に血球中のcPGCとほとんど相異は認められなかった。浮遊系の細胞のほとんどは、PGCであった。小型で球形の浮遊系の細胞が多少含まれる場合もあるが、PGCの観察および計数への影響は無視できるものであった。

ウズラのPGCは、染色（アルカリフォスファターゼ活性）による同定は行わなかったが、形態的にPGCであると識別できた。

生殖巣間質細胞の中に存在するgPGCは著しい増殖を示していたが、組織の塊との共存下ではそれらの増殖を定量的に計測することができなかった。正常な胚発生段階において、孵卵2.5日以降の胚の血管内を循環していたPGCは、ほとんどがすでに生殖巣への移住が完了しており、そこでPGCの増殖が始まる。このことは、生殖巣間質細胞がPGCに対して何らかの増殖に有利な環境を提供していることを示唆しているように思われる。ニワトリの生殖巣間質細胞を組織の塊だけ除いて継代し、PAS染色陽性(gPGC)の細胞数の経時的変化を調べたが、gPGCの数は培養1日目には868個であったが、培養5日目には3347と平均3.84倍に増えた( $P < 0.05$ )。継代後5日以降の培養観察においてgPGCはさらに増殖を続け、その中には大きなコロニーを形成するものも確認され、さらにこれらのコロニーはPAS染色陽性を示した。しかし間質細胞の増殖とPGCコロニーが大きいいため、PGC総数を正確に計測することは困難であった。

一方、培養中PGCの簡便で効率的な凍結保存方法を開発し、低温保存(-80 $^{\circ}\text{C}$ )して融解した結果、gPGCの生存率は約60%であった。

分離したgPGCを移植し、計5.5日間培養した4個のレシピエント胚を、厚さ50 $\mu\text{m}$  (Emb. No.: 56004)または100 $\mu\text{m}$  (Emb. No.: 56005-56007)の連続切片を作製し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した結果、器官および組織の位置関係を区別することができ、しかも、蛍光染色したドナーPGCが生殖巣組織の中に存在することを確認することができた。ただし、組織学的に生殖巣あるいは生殖上皮の境界は連続的なものであるため、本実験ではドナーPGCの定着した数と部位の計測と確認の便宜上、生殖巣と他の組織（腎臓または腸間膜）の境界を生殖巣と他組織の連結部位で最も薄い部位とした。キメラ生殖巣に存在する蛍光を持つPGCの数は平均748.8個と注入した150のPGCの数の約5倍と大幅に増加していたことも確認され、分裂像を示すPGCが随所に現れていることがわかった。つまり移植してから胚を固定するまでの3日間にPGCが生殖巣に移住して定着し、さらに増殖したものであると思われた。

Emb. No.: 56004-56006は左右の生殖巣の大きさから見て明らかに左側の方が右側より大きく、雌の胚であると判断されるが、PGCの分布状況も明らかに左側の方が多かった。Emb. No.: 56007は形態的に左右の区別がはっきりせず、雄の胚と思われ、PGCの分布に雌の胚と思われる他の3つの胚

のような極端な差は見られなかった。

なお、ウズラとニワトリのgPGCを培養、分離した後、同じ方法で移植し後代を得、そのキメリズムを調べる実験を共同で行っているが、その結果は、後日得られると期待される。

## 5. 考察

受精卵に培養操作を加えることによって、酵素を用いることなく5日胚の生殖巣からgPGCが大量に分離できることが明らかになった。生殖巣に定着しているgPGCはcPGCに比べてより成熟しており、しかも増殖期を迎えていると考えられる。本実験の培養系においても、gPGCの分裂が観察されること、また酵素を使わないことからgPGCの損傷も少ないことが考えられる。このことはgPGCが体外培養や移植に適していることが期待できることを意味するものかもしれない。

PGCの培養に用いた方法は、血液中の移住期または生殖巣での増殖期のPGCを生殖巣間質細胞の上で共培養するという方法である。すなわち、生殖巣間質細胞は胚発生途上の解卵5日直後の胚より分離・培養した上で、その中に含まれているgPGCを計測するという共培養方法を用いた。本培養実験では、gPGCが生殖巣間質細胞と共培養することによって、体外培養系で増殖することが明らかになった。また著者らの研究（未発表）では生殖巣間質細胞の培養上清の効果は認められなかった。これらの結果からは、PGCの増殖は生殖巣組織から何らかの可溶性の因子による可能性は少なく、間質細胞との物理的な接着または接着による化学的な物質伝達によるものである可能性が示唆された。本研究では、細胞の密度（単位面積当たりの細胞の数）によってPGCの生存および増殖の割合が変化することも観察された（未発表）が、繊維芽細胞(CEF)を支持細胞として使用した実験結果を総合的に分析すると、単に細胞の密度による増殖効果だけではなく、生殖巣間質細胞特有のPGC増殖効果があるものと考えられる。生殖巣間質細胞の効果は、支持細胞としての効果を含め、PGCに対する作用機構については現段階では分析困難である。また、生殖巣間質細胞の増殖因子の物質的な同定もできていない。生体内で生殖巣に定着したPGCはそこで分裂を繰り返し、配偶子へと分化が進むことになる。本培養実験ではその生殖巣を体外で培養して支持細胞として用いることによって、PGCを増殖させる一部の条件を満たしたものと考えられる。

PGCの移住および定着に必要な期間については、本実験の結果からみて、およそ2日以上かかるものと思われる。すなわち移植後2日まではまだわずかな割合でしか生殖巣に定着していないのが、3日後には多くのPGCが定着していることを示唆している。

本実験ではドナーおよびレシピエントの両方の胚の性別については確認を行わなかったが、雌雄2種類のPGCを移植した場合には、左右の生殖巣にそれぞれ移住する可能性がある。さらに、雌の胚に移植されたZZ染色体を持つPGC（卵へ分化する）と、雄の胚に移植されたZW染色体を持つPGC（精子へ分化する）が、どのように分化するかは今後の検討課題であろう。

キメラ胚生殖巣において、移植されたドナーPGCとレシピエント胚固有のPGCの間に競合的關係があるものと考えられる。このことから、ドナーPGCの割合を高めることによってドナーPGC由来の後代の産生される確率を大きくする目的で、レシピエント胚のPGCを減少させるいくつかの試みがなされている。将来の移植研究ではPGCを移植する前に、レシピエントが保有するPGCを除去するまたは減少させることによって、高いキメラの作製率をめざす必要があるものと思われる。

近年になって、cPGCの凍結保存方法と移植したcPGC由来の後代が得るといった研究がなされている。さらに本研究で述べたPGCの分離・培養および移植の技術の開発は、野生の鳥類（例えば絶滅

寸前の、トキ等)の繁殖等への応用も可能であると考えられ、すでに注目を集めている。本実験で用いた生殖系列キメラを作製する技術は、鳥類におけるトランスジェニック(Tg)動物を生産することによって、育種期間を短縮させるだけでなく、新しい形質(繁殖性能の向上等)を発現させる点でも意義がある。これらの研究によって、近年、PGCを利用したニワトリの遺伝資源の保存技術とTgニワトリの作製技術が急速に実用化に向けて進められるようになった。今後、哺乳動物における受精卵移植技術に相当するか勝る、遺伝資源の保存技術の実用化が鳥類でも望まれる。

結論的に、(1)体外培養系で増殖した後の孵卵5日胚の生殖巣のgPGCを血管に移植することによって生殖系列キメラを作ることができること、(2)gPGCの凍結保存方法が一部されたこと、(3)移植したgPGCが生殖巣に移住後分裂増殖していること、が明らかになった。

## 研究発表の状況

### 論文発表

1. Simple method for isolation of primordial germ cells from chick embryos. **Chang I. K.**, A. Tajima, Y. Yasuda, T. Chikamune & T. Ohno. **Cell Biol. Int. Rep.** 16(9), 853-857 (1992).
2. Proliferation of chick primordial germ cells on stroma cells from the germinal ridge. **Chang I. K.**, A. Tajima, T. Chikamune & T. Ohno. **Cell Biol. Int.** 19(2), 143-149 (1995).
3. Germ-line chimera produced by transfer of cultured chick primordial germ cells. **Chang I. K.**, A. Yosiki, M. Kusakabe, A. Tajima, T. Chikamune, M. Naito & T. Ohno. **Cell Biol. Int.** 19(7), 569-576 (1995).

### 学会発表(予定を含む)

1. ニワトリ始原生殖細胞の体外培養法の開発。張一國, 田島淳史, 近宗干城, 大野忠夫。第48回日本細胞生物学会大会(1995年10月, 仙台)
2. Studies on isolation, cultivation and transfer of chick primordial germ cells. (Symposium). **Chang I. K.** National Live Stock Research Institute, Suwon, South Korea. Dec. 1995.
3. トリ原始生殖細胞を利用した雄雌の産分けについて(Symposium)。張一國, 高橋慎司, 渡辺信。第5回日本家畜バイオテクノロジー研究会・講演会(1996年2月, 東京)
4. Production of the germ line chimera in bird (Symposium). **Chang, I.K.**, First International Conference on Transgenic Animals (1st ICTA), Chinese TransGenic Animal Association (CTGAA), Beijing, China, Nov. 18-23, 1996

### 特許関連

1. 特許: 鳥類原始生殖細胞の分離方法。  
発明者: 大野忠夫, 張一國, 田島淳史, 理化学研究所。  
特願平4-4997号。  
特許許可番号: H05-227947.
2. 特許申請中: 鳥類原始生殖細胞の増殖培養法。  
発明者: 大野忠夫, 張一國, 田島淳史, 理化学研究所。  
特願平6-121100号。