

ブタにおける顕微授精とその応用

菊 地 和 弘

独立行政法人 農業生物資源研究所
遺伝子資源研究グループ 生殖質保全研究チーム

顕微授精は、運動能力の劣るあるいはない精子から受精卵を作製する技術であり、ヒトの産婦人科領域では生殖補助医療技術の一つとして、家畜・実験動物では発生工学技術の一つとして確立しつつある。広義には、細胞質内精子注入法(ICSI; Intracytoplasmic sperm injection)、透明帯下授精(媒精)法(SUZI; Subzonal insemination)ならびに透明帯部分切開法(PZD; Partial zona dissection)がある。一般的には、顕微授精というとICSIを指す。ICSIにより産仔が得られたという成功例は、ウシ(Goto *et al.* 1991)、ヒト(Van Steirteghem *et al.* 1993; Tesarik 1996)、マウス(Ahmadi *et al.* 1995; Kimura & Yanagimachi 1995; Lacham-Kaplan & Trounson 1995)、ヒツジ(Catt *et al.* 1996)ならびにブタ(Kolbe & Holtz 2000; Nartin 2000)で報告されている。ブタでの2報告は、体内で成熟した卵子(排卵卵子)へ精子を注入し子豚が得られたというものである。一方、屠場由来の卵巣から採卵し体外で成熟させた卵子への顕微授精では、子豚が出生したものの直ちに死亡したという報告にとどまっている(Lai *et al.* 2001)。これまでは体外成熟卵子は体内成熟卵子に比べて発生能が低いとされていたが、受精後の初期発生の条件を整えれば高品質の胚が得られることが示された(Kashiwazaki *et al.* 2001; Kikuchi *et al.* 2002)。最近、私たちは体外成熟卵子にICSIを行い、子豚を得ることに成功した(Nakai *et al.* 2003)。一連の手法は、体外成熟卵子に比べて、経済的・省力的に成熟卵子を作製しそれを利用できるため、様々な技術に応用が期待されている。以下、期待される技術について記述する。

①遺伝資源の保存・利用に貢献する。つまり、受精能力の劣る稀少動物・稀少品種の精子の利用が可能

となる。例えば、農業生物資源研究所のジーンバンク事業では、家畜・家禽精子の凍結保存が行われているが、ブタでは融解後の精子の受精能には個体差・ロット差(耐凍性の違い)が認められている。中には運動性が劣るあるいは全く認められない精子があり、人工授精や体外受精を行っても、受精・受胎せず、事業の展開に制約を与えていた。ICSIによる受精の成立・子豚の生産は、遺伝子資源の維持・利用に必要・不可欠な技術として期待されている。②未成熟な精子細胞を利用したICSIが期待されている。マウスでは精祖細胞や精子細胞のICSIにより産仔が得られている(Kimura & Yanagimachi 1995)。ブタでも精子細胞のICSIにより初期発生が進行することが確認されており(Lee *et al.*, 1998; Kim *et al.* 1999)、子豚の生産が期待されている。また、精巣組織の異種間移植により、異種動物(マウス)において精子形成が進展することが報告されており(Honaramooz *et al.* 2002)、ICSIの技術との連携が期待されている。③凍結乾燥法や複雑な操作を必要としない簡便な精子の保存法などが期待されている。現在広く行われているブタ精子の凍結法は厳密な温度・時間管理など経験や設備が必要である。直接凍結したり固定により保存された精子をICSIにより受精させ子豚が得られれば、遺伝資源の保存には有益である。また、マウスでは凍結乾燥精子のICSIにより産仔が得られており(Wakayama & Yanagimachi 1998)、液体窒素や超低温設備がなくとも精子の保存が可能となる技術として期待されている。④精子を介した形質転換(SMGT; Sperm-mediated gene transfer)による形質転換ブタの効率的な作製が期待されている。SMGTはマウスにより確立された技術である(Lavitrano *et al.* 1989)。ブタにおいてもそ

の効果が確認されている (Lavitrano *et al.* 1997; Lazzereschi *et al.* 2000)。マウスでは SMGT と ICSI を組み合わせて成功例が報告されている (Perry *et al.* 1999)。形質転換ブタの作製法としては、受精卵 (前核) への外来 DNA の顕微注入法が主流であり、ICSI を組み合わせた効率的な SMGT の確立が望まれている。⑤哺乳動物における受精・発生現象の究明に貢献する。ICSI により人為的に受精を成立させることが可能となる。特に、受精のタイミングを制御し、受精時のロマチンの remodeling 機序や多精子受精寛容の機序の解明に貢献するものと考えられる。

ブタにおける体外成熟卵子を用いた ICSI 技術は、効率といった点からは改善の余地が残されている。今後、応用面を視野にいれた技術の確立が望まれる。

文 献

- Ahmadi *et al.*, 1995. Hum Reprod 10: 431-435.
Catt *et al.*, 1996. Vet Rec 139: 494-495.
Goto *et al.*, 1991. Theriogenology 35: 205.
Honaramooz *et al.*, 2002. Nature 418: 778-781.
Kashiwazaki *et al.*, 2001. J Reprod Dev 47: 303-310.
Kikuchi *et al.*, 2002. Biol Reprod 66: 1033-1041.
Kim *et al.*, 1999. Theriogenology 51: 1141-1149.
Kimura & Yanagimachi, 1995. Biol Reprod 53: 855-862.
Kolbe & Holtz, 2000. Anim Reprod Sci 64: 97-101.
Lacham-Kaplan & Trounson, 1995. Hum Reprod 10: 2462-2469.
Lai *et al.*, 2001. Zygote 9: 339-346.
Lavitrano *et al.*, 1989. Cell 57: 717-723.
Lavitrano *et al.*, 1997. Transplant Proc 29: 3508-3509.
Lazzereschi *et al.*, 2000. Transplant Proc 32: 892-894.
Lee *et al.*, 1998. Mol Reprod Dev 50: 221-228.
Martin, 2000. Biol Reprod 63: 109-112.
Nakai *et al.*, 2003 Biol Reprod 68: 1003-1008.
Perry *et al.*, 1999. Science 284: 1180-1183.
Tesarik, 1996. Rev Reprod 1: 149-152.
Van Steirteghem *et al.*, 1993. Hum Reprod 8: 1061-1066.
Wakayama & Yanagimachi, 1998. Nat Biotechnol 16: 639-641.