

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：72611

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06005

研究課題名（和文）人工的な精子と卵子の細胞膜融合による非侵襲的な顕微授精法の研究

研究課題名（英文）Study of non-invasive artificial insemination method by artificial cell membrane fusion in sperm and oocyte.

研究代表者

江藤 智生（ETO, Tomoo）

公益財団法人実験動物中央研究所・生殖工学研究室・室長

研究者番号：30370175

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：マウスやラットへの顕微授精（ICSI）は、産子獲得の為に受精卵作製に用いるが、体外受精に比べ胎子発生率は低い傾向である。要因として物理的障害や化学的な毒性が考えられる為、人工的な細胞膜融合を介した授精法を研究した。まず、精子の先体除去法を検討した。次に、オートマニピュレーターを用いて、顕微授精の動作を電動化・自動化した。また、顕微授精するマウス卵子の凍結保存法を新規開発した。卵子と精子を圧着して電圧印可と、精子を振動させる自然現象の再現では授精は確認されなかった。しかし、卵子に先体除去精子を圧着したまま1分間保持させると、卵子の一部に授精と発生が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マニピュレーターの電動化・自動化は、顕微授精を含む顕微操作全体の、再現性の向上につながる。マウス卵子の新規凍結保存法は、体外受精・顕微授精に良好な状態の卵子提供がいつでも出来、遺伝子資源の保存や個体の計画生産および生殖補助医療につながる。今回の研究では、低率ながら膜融合を介した授精から発生が確認された。この結果は、物理的障害や化学的な毒性を廃した顕微授精法の第一歩を示す。さらに研究が進み、膜融合授精法が確立すれば実験動物の、個体の計画生産や遺伝子資源の保存に貢献できる。さらにヒトの不妊治療や、家畜の計画生産、愛玩動物および絶滅危惧種の繁殖などへ応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in mice and rats is used to produce fertilized oocytes for offspring, but the rate of fetal development tends to be lower than that of in vitro fertilization. Because physical obstacles and chemical toxicity are thought to be factors, we studied a microinsemination method that uses artificial cell membrane fusion. First, we examined a method for removing the acrosome of sperm. Next, we used an automanipulator to motorize and automate the operation of microinsemination. We also developed a new method for freezing and preserving mouse oocytes for microinsemination. Fertilization was not observed when the method of applying voltage to the oocyte and sperm by pressing them together, or when reproducing the natural phenomenon of vibrating the sperm, was used. However, when acrosome-removed sperm was held pressed against the oocyte for one minute, fertilization and development were confirmed in some of the oocytes.

研究分野：生殖工学、発生工学、実験動物学

キーワード：膜融合 顕微授精 電圧の印可 精子 アクロソーム 卵子 凍結保存 電動・自動

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ラットやマウスに対する顕微授精法として汎用される ICSI は、凍結精子からの個体復元や、繁殖困難な系統の経代に用いる重要な生殖工学技術である。しかしラットでは、挿入するインジェクションピペットの直径が細くないと ICSI 後の卵子の生存率と胎子発生率は低下する[1]。またマウスでは、遺伝子改変に汎用される C57BL/6 系統を含め近交系の複数系統の胎子発生率は[2]、体外受精で得られる受精卵よりも低い傾向にある。

これらの要因として、卵子へのピペットの挿入による物理的障害や、挿入したピペットから精子と共に注入する培地の化学的な毒性が考えられる。しかし ICSI 法では、これらの問題点への有効な対処法は無い。そのため我々は、透明帯を通過した精子の運動を人工的に再現した授精、または精子と卵子の細胞膜を高電圧で融合させる授精を考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ラット・マウスの不動精子からの個体復元を効率よく行う為に、新たな顕微授精法を開発し、胎子発生率を向上させることである。

不動精子を卵子内に注入せずに授精させる方法は無い。したがって、人工的な精子運動の再現による授精法や、人工的な膜融合による授精法も無い。そのため両方法の成功は、新規なものとなる。本方法が確立すれば、実験動物の遺伝子資源の保存に貢献できる。さらに本方法が確立できると、実験動物への利用だけでなく、ヒトの不妊治療や、家畜や愛玩動物および絶滅危惧種の繁殖への応用が期待できる。

3. 研究の方法

卵子にピペットを挿入しない低侵襲な顕微授精法を構築するため、ピペットに保定した精子を卵子に接触して振動させメス体内で受精する際の精子の動きを再現する方法と、精子を卵子に圧着した後に高電圧を印加して人工的な細胞膜の融合をおこなう授精法を研究する。研究は下記の 1) から 4) を検討した。

1) アクロソームキャップの除去

メスの体内では、頭部のアクロソームキャップ (AC) が外れた精子が卵子と膜融合して受精が行われる。しかし、精巣上体尾部から採取する精子は AC に覆われているので、顕微授精前に AC を除去する。AC の化学的な除去法として、Lysolecithin または非イオン系界面活性剤の Triton X-100[3]、アルカリ溶液[4]での処理法を検討する。また超音波で物理的に除去する方法についても検討する[5]。AC の除去は精子頭部を染色して確認する。精子頭部に低侵襲で、かつ広範囲の AC が除去可能な最適な方法を選定して顕微授精に用いる。

2) 顕微授精操作の自動化

本研究での顕微操作は、精子を三次元で複雑に移動させ、さらに振動または電圧を印加させるため、従来のマイクロマニピュレーターを用いた手法では対応出来ない。そのため我々が開発した、顕微操作が自動化できる総合自動胚操作システム (IAEMS) を用いる。そして IAEMS を本研究仕様にする為に、透明帯の穿孔、精子を保定して透明帯穿孔位置へ移動、および精子を圧着させる動作を自動で行うコンピューターソフトを開発する。さらに完成した自動動作設定ソフトは、低侵襲な顕微操作法の検討の際に調整をおこなう。

3) 低侵襲な顕微授精法の検討

(1) 精子の運動の再現による授精

タイムラプスで精子の運動を撮影し、運動パターンを解析して、ピエゾ駆動で振動させる際の周波数と振幅の動作設定を開発する。精子運動の再現では、アクロソームキャップを除去した精子を、ピペットで保定して卵子に接触させる。次にピエゾで精子を振動させて、卵管内で受精する精子の運動を再現し、細胞膜の融合を促進する。

(2) 精子と卵子の細胞膜の融合の促進による授精

高電圧の印加による細胞膜の融合は、2細胞期胚を用いた4倍体胚の作製などに使用されている[6]。しかしこの方法は、基本的に同じ面積の細胞膜同士でおこなうため、面積が著しく違う卵子と精子には使用困難である。そのためピペットを電極にして、精子直径程度の狭い面積に限定した印加を考えた(図1)。始めに、高電圧を印加させる為の、金属を接着又は蒸着したピペットを開発する。既に蒸着タイプのピペットは試作を行っている。次に、細胞膜融合をおこなう為の印加の条件検討を行う。

4) 受精卵の体外培養と胎子発生

低侵襲な顕微授精法で受精卵が得られたら、体外培養による体外発生と胚移植による体内発生を確認する。操作を行った卵子は培養条件の向上のため、5% O₂・5% CO₂・5% N₂の気相内で培養を行う。また、体外発生に使用する培養培地の選択または開発も行う。実験材料は、マウスおよびラットの新鮮または凍結保存した精子と卵子を使用する。

4. 研究成果

1) アクロソームキャップの除去

自然現象ではACが外れた後、卵子と膜融合して受精が起こる。人工的にACを除去するが、精子本体の細胞膜に損傷を与えて膜融合が阻害されてはならない。そのため、細胞膜の損傷とAC除去の有無が分かる蛍光染色法を導入し、処置した精子を検査できる様にした。AC除去の処置は、化学的なLysolecithin、非イオン系界面活性剤のTriton X-100、アルカリ溶液での処理、超音波または液体窒素へ浸漬して物理的に取り除く方法を検討し、80%以上の精子でAC除去が確認できた。

2) 顕微授精操作の自動化

自動でDNAインジェクションする機能を応用した[7]。その結果、半自動で精子をピペット内に吸引せずに透明帯を穿孔した後に、ピペット先端に保定して卵細胞膜に圧着する方法を構築した。

3) 低侵襲な顕微授精法の検討

電圧印可ではLysolecithin、Triton X-100、アルカリ溶液、超音波および液体窒素浸漬の4区を試みたが、高電圧では細胞が崩壊し、低電圧では細胞の形状は保たれたが前核は確認されなかった。ACを除去しない対照区またはAC除去した5区の精子を卵子に接触させ、ピエゾで精子を振動させたが、受精は確認できなかった。

しかし電圧印可もピエゾ振動もさせずに、卵子にAC除去した精子を圧着したまま1分間保持させると、卵子の一部に受精と発生が確認された。超音波を用いた区では、前核は確認できなかった。精子を液体窒素に1回浸漬してACを物理的に除去する区(以下、LN2区)では、供試卵の11%に前核と細胞分裂が確認でき、2細胞期胚の2/3が胚盤胞まで発生した。3回浸漬の区も設けたが、前核形成と細胞分裂は16%で、発生は8細胞期迄に停止した。以降の区では液体窒素1回浸漬に他のAC処理を加えた。Triton X-100区では、14%の前核と細胞分裂が確認できたが、発生は2細胞期で停止した。リゾレシチン区では、12%の前核と細胞分裂を確認したが、発生は2細胞期で停止した。アルカリ溶液区では、前核確認が56%だが細胞分裂は32%で、発生は4細胞期迄に停止した。

電圧印可より圧着が受精・発生に有利だったので、よりマイルドなAC除去を試みた。体外受精培地に運動精子と透明帯を入れ、透明帯に付着した精子を採取し、卵子の細胞膜に圧着する区を設けた。供試卵に対し41%の細胞分裂を確認したが、発生は8細胞期迄に停止した。現在、実験結果を元にして圧着後に高い受精率と発生率が得られる方法を検討している。

4) 受精卵の体外培養と胎子発生

胚の培養技術では、5%CO₂・95%Airと5%O₂・5%CO₂・90%N₂の気相を比較したが同様の結果となった。そのため、簡易な5%CO₂・95%Airの気相で培養をおこなう事とした。体外に取り出した卵子は時間の経過と共に劣化し、授精後の発生率が低下する。卵子の時間を止めるため、我々が開発した受精卵保存を応用して[8]、卵子凍結を研究した。その結果、マウス凍結卵子を体外受精しても顕微授精しても、新鮮卵子と同様の受精率と発生率を得る方法ができた。そのため、少数の凍結卵子を融解してはICSIする事とした。現在、卵子保存の論文を作成している。

<引用文献>

- [1] Hirabayashi M, et al. Transgenic Res. 2002, 11: 221-8.
- [2] Endoh K, et al. J Reprod Dev. 2007, 53:1199-206.
- [3] Morozumi K, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2006, 103:17661-6.
- [4] Li C, et al. Reproduction. 2009, 137:779-92.
- [5] Kuretake S, et al. Biol Reprod. 1996, 55:789-95.
- [6] Kubiak JZ, et al. Exp Cell Res. 1985, 157:561-6.
- [7] Eto T, et al. Sci Rep. 2021 11:11770.
- [8] Seki S, Eto T, et al. Sci Rep. 2023 13:20903.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Establishment of an integrated automated embryonic manipulation system for producing genetically modified mice.	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 Eto T, Ueda H, Ito R, Takahashi T, Watanabe T, Goto M, Sotomaru Y, Tanaka N, Takahashi R.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 scientific reports	6. 最初と最後の頁 11770
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-91148-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Seki S, Kawabe T, Yamazaki W, Matsumura K, Oikawa T, Obata T, Higashiya M, Yano M, Eto T.	4. 巻 13(1)
2. 論文標題 Cryopreservation of rat embryos at all developmental stages by small-volume vitrification procedure and rapid warming in cryotubes.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 scientific reports	6. 最初と最後の頁 20903
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-47394-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 江藤智生	4. 巻 208
2. 論文標題 生殖工学の基礎知識 実験動物への目的・実施・影響	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 日本実験動物技術者協会関東支部会報	6. 最初と最後の頁 6-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 江藤智生, 植田裕基, 伊藤亮治, 高橋司, 渡部聡朗, 後藤元人, 外丸祐介, 田中伸明, 高橋利一.
2. 発表標題 全自動マイクロマニピュレーターを用いたマウスの遺伝子改変.
3. 学会等名 第69回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関信輔, 川辺敏晃, 及川剛宗, 山崎渉, 福田康義, 小畑孝弘, 東谷美沙子, 矢野愛美, 江藤智生.
2. 発表標題 最小容量ガラス化法と急速融解によるラット1細胞期胚ガラス化保存法の高度化.
3. 学会等名 Cryopreservation Conference 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 江藤智生, 植田裕基, 伊藤亮治, 高橋司, 渡部聡朗, 後藤元人, 外丸祐介, 高橋利一, 田中伸明
2. 発表標題 全自動マイクロインジェクションによる遺伝子改変マウスの作製.
3. 学会等名 日本実験動物技術者総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 江藤智生.
2. 発表標題 生殖細胞に施すマイクロマニピュレーションの電動化・自動化.
3. 学会等名 広島大学医学部学際的研究推進部会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 関信輔, 川辺敏晃, 及川剛宗, 山崎渉, 小畑孝弘, 東谷美沙子, 矢野愛美, 江藤智生.
2. 発表標題 最小容量ガラス化法と急速融解によるラット胚ガラス化保存法の高度化.
3. 学会等名 第70回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 関信輔, 川辺敏晃, 山崎渉, 小畑孝弘, 及川剛宗, 東谷美沙子, 矢野愛美, 江藤智生.
2. 発表標題 最小容量ガラス化法と急速融解によるラット胚ガラス化保存法の高度化.
3. 学会等名 第116回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 関信輔, 川辺敏晃, 山崎渉, 小畑孝弘, 及川剛宗, 東谷美沙子, 矢野愛美, 江藤智生.
2. 発表標題 最小容量ガラス化法と急速融解によるラット胚ガラス化保存法の高度化.
3. 学会等名 第57回日本実験動物技術者協会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Eto T, Ueda H, Ito R, Takahashi T, Watanabe T, Goto M, Sotomaru Y, Tanaka N, Takahashi R.
2. 発表標題 Fully Automated Micromanipulation: Genetic Modification of Mice by Automated Solution Injection.
3. 学会等名 AALAS 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 江藤智生.
2. 発表標題 生殖工学の基礎知識 実験動物への目的・実施・影響 .
3. 学会等名 実技協関東支部REG部会第22回特別講演会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 関信輔, 川辺敏晃, 小畑孝弘, 東谷美沙子, 矢野愛美, 及川剛宗, 山崎渉, 江藤智生.
2. 発表標題 最小容量ガラス化法と急速融解によるLong-Evans, SDおよびF344系統ラット1細胞期胚ガラス化保存法の開発.
3. 学会等名 第71回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 小林達也, 樋口香子, 江藤智生, 藏本吾郎, 小川誠司, 及川彰太, 松山依里子, 石川珠帆, 古川博, 大場 敬生, 高根沢 聡太, 宮村浩徳, 西尾永司, 西澤春紀, 浜谷敏生.
2. 発表標題 オートマチックマイクロマニピュレーターを使用したマウスICSIの成績.
3. 学会等名 第42回日本受精着床学会総会・学術講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Eto T, Tanaka N, Sotomaru Y, Takahashi R.
2. 発表標題 Motorization and automation of micromanipulation for microinsemination and blastomere biopsy.
3. 学会等名 AALAS 2024 (国際学会)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高橋 利一 (Takahashi Riichi) (90206863)	公益財団法人実験動物中央研究所・動物資源技術センター・センター長 (72611)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	外丸 祐介 (Sotomaru Yusuke) (90309352)	広島大学・自然科学研究支援開発センター・教授 (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関