

<お願い>  
(独)農業生物資源研究所の省略形として「生物研」を使用願います。

プレスリリース

平成25年8月12日  
独立行政法人農業生物資源研究所  
麻布大学

**世界初！超低温保存した子豚の精巣をもとに子豚が誕生  
—希少な家畜遺伝資源の新たな保存・利用の基盤技術として期待—**

**ポイント**

- ・液体窒素内に保存した子豚の精巣をヌードマウスに移植し、発育した精巣から生きた精子を作り出すことに成功しました。
- ・さらに、採取した精子を卵に顕微授精した受精卵から、正常な子豚を誕生させることに世界で初めて成功しました。
- ・本成果は、豚を始め、様々な希少な家畜遺伝資源の保存・利用に応用できる基盤技術として期待されます。

**概要**

1. 独立行政法人農業生物資源研究所（生物研）と麻布大学は、組織へのダメージが少ない**ガラス化冷却法<sup>1)</sup>**によって超低温保存した子豚の精巣をヌードマウス<sup>2)</sup>に移植し、そこから生きた精子を発生させることに成功しました。
2. 発生させた精子を卵に注入（**顕微授精<sup>3)</sup>**）して作った受精卵を雌豚に移植する方法（**受精卵移植<sup>4)</sup>**）で、正常な子豚の生産に世界で初めて成功しました。
3. この技術の開発により、幼若な豚の精巣を長期間保存し、そこから必要な時に次世代を生産することが可能となりました。本技術を活用することで、成体になりにくい**疾患モデル豚<sup>5)</sup>**の系統を維持することが可能になります。また、成体からの精液採取が難しいアジアなどの貴重な豚品種や他の希少家畜種の新たな保存・利用法の基盤技術としても期待されます。
4. この成果は、7月30日に米国科学雑誌 PLOS ONE に発表されました。

予算：運営費交付金

**問い合わせ先など**

研究代表者：	(独)農業生物資源研究所 理事長	廣近 洋彦
研究推進責任者：	(独)農業生物資源研究所 動物研究領域長	栗田 崇
	：(独)農業生物資源研究所 動物科学研究領域 動物発生分化研究ユニット長	徳永 智之
研究担当者：	(独)農業生物資源研究所 動物科学研究領域 動物発生分化研究ユニット 上級研究員	金子 浩之
	電話：029-838-7447 E-mail :kaneko@affrc.go.jp	
	動物発生分化研究ユニット 上級研究員	菊地 和弘
		E-mail :kiku@affrc.go.jp
	麻布大学 獣医学部 教授	柏崎 直巳
広報担当者：	(独)農業生物資源研究所 広報室長	井濃内 順
	電話：029-838-8469	

本資料は文部科学記者会、科学記者会、筑波研究学園都市記者会、農政クラブ、農林記者会、農業技術クラブに配付しています。

## 開発の社会的背景

家畜の遺伝資源の保存は、雄では成長した個体から採取した精子（精液）を超低温で保存することで行われ、保存した精液は融解後に人工授精に利用されています。しかし、この従来手法では対応しきれないケースが出てきました。たとえば、医療研究に用いられる疾患モデル豚の中には、幼若な時期の死亡率が高く成体に達せず次世代が得られない事例があります。また、近年、アジア各国の様々な貴重な豚品種の減少が著しく遺伝資源として保存する必要性が増しています。このような豚は精液採取のトレーニングを受けていないことが多いため、成体からの精液の採取が困難な場合が多く、採取が容易な子豚の精巣を保存し、これから精子を得るための技術の開発が望まれていました。

## 研究の経緯

精子のもとになる精祖細胞は成体ばかりでなく、幼若な動物の精巣にも含まれ、精子に分化する能力を秘めています。精祖細胞から何らかの方法で精子を作らせ子を作ることができれば、幼若な動物からも子を得ることが可能になります。これまで本研究グループでは、子豚の精巣を採取後すぐにヌードマウスに移植することで豚精子を発生させ、この精子を用いて作った顕微授精卵を雌豚に移植することで、大型動物では初めて子を得ることに成功しました（2010年）。しかし、精巣を採取後直ちに移植しなければならないという実用上の大きな制約がありました。そこで、その制約を解決するために、超低温保存した精巣から同様の手法によって子が得られるかを試みました。精巣は、組織のダメージを最小限に抑えられるガラス化冷却を用いて液体窒素内で超低温保存しました。

## 研究の内容

1. 本研究では、精巣組織のガラス化冷却、超低温保存、ヌードマウスへの精巣組織の移植、卵の体外成熟培養、顕微授精による受精卵の作製、受精卵の移植という多様な技術を組み合わせました（図1）。

2. 生後10日齢前後の子豚の精巣を約1mm角に切り、ガラス化冷却後に液体窒素内で超低温保存しました。140日以上保存した後でも、保存前と同じく精祖細胞の存在が確認されました（図2）。

3. ニードマウスの背部の皮下に約20個の精巣組織を移植したところ精巣組織が発育しました。移植後230～350日にマウスから組織を回収して細切したところ精子が回収されました（図3）。また顕微鏡観察により精巣組織で多数の精子が作られていることを確認しました（図4）。

4. この精子を、別に用意した体外成熟卵に顕微授精させ受精卵を作りました。受精卵を発情周期を同期化させた雌豚の卵管に、外科的に受精卵移植をしました。その結果、8頭の雌豚のうち2頭が妊娠し、合計7頭（雌4頭、雄3頭）の子豚を出産しました（図5）。生まれた子豚は健康に発育し、性成熟に達したことを確認しました。

5. これまで、ヌードマウスに異種の動物の新鮮な精巣組織を移植した場合（異種間移植）、精巣組織から採取した精子が産子に至った例はウサギ（2002年）と豚（2010年）で報告されています。今回の研究は、超低温保存した異種の動物の精巣組織から個体を再生した最初の報告で、実用に向けて精祖細胞の利用性をより高めたものと考えられます。

## 今後の予定・期待

1. この技術は、まだ繁殖能力を持たない幼若な個体や事故等により死亡した希少な動物の雄から精子を得られることから、今回使用した豚だけでなく、他の希少な家畜遺伝資源の保全にも役立つことが期待できます。今後は、疾患モデル豚やアジア各国の豚品種でも本技術が活用できるかの実証研究を進め、豚遺伝資源の効果的な保存に資する新たな技術として確立することを目指します。さらにニーズに応じて、他の家畜に応用するための研究を行うことを検討します。

2. 雄側に加えて、さらに雌側の卵巣組織の異種移植・成熟技術が確立できれば、雌雄両方に利用できる技術となり、遺伝資源の保存効果がさらに高まります。今後、卵巣の異種移植・成熟技術の開発を目指します。

## 発表論文

Kaneko H, Kikuchi K, Nakai M, Somfai T, Noguchi J, Tanihara F, Ito J, Kashiwazaki N. **Generation of live piglets for the first time using sperm retrieved from immature testicular tissue cryopreserved and grafted into nude mice.** PLOS ONE 2013, 8(7): e70989. DOI: 10.1371/journal.pone.0070989.

## 用語の解説

### 1) ガラス化冷却

高濃度の耐凍剤（グリセリンやエチレングリコール）を含む液（ガラス化液）中に、卵や胚・組織を入れると急速に脱水され、細胞質の水分が耐凍剤と置換されます。この状態で超急速に冷却すると、細胞内に氷の結晶が生成されることなく細胞をガラスのように固化できます。これによって、氷晶による卵や胚・組織の破壊を招くことなく超低温保存することが可能となります。

### 2) ノードマウス

免疫不全動物の一種。胸腺を欠如する突然変異体で、免疫担当細胞の一つである T 細胞がありません。この T 細胞機能が欠如するマウスを固定した系統で、被毛が欠如する外貌からノードマウスとして市販されています。免疫機能が極度に低く、他の動物の細胞および組織を拒絶しないため、ヒト癌細胞等の移植に使用されます。今回の研究では、豚の精巣組織を移植しました。

### 3) 顕微授精

顕微鏡下で卵に精子を注入して受精させる技術。微小なガラス管（マイクロピペット）に精子を吸い込み、顕微鏡下で、成熟卵の細胞質に穿孔し、精子を注入することで授精を行います。ヒトでは、精子の運動性がない場合など不妊治療の一環として行われています。

### 4) 受精卵移植

レシピエント（「借り腹」とも呼ばれる）豚に、ホルモン製剤を投与することで発情周期を同期化させて、受精卵を卵管に注入します。豚では外科手術により行います。2細胞期以降の胚についても、発生段階に応じて卵管や子宮に注入する胚移植が行われます。

### 5) 疾患モデル豚

疾患モデル豚は、人の難治性の疾患の解明・診断・治療への応用のために、動脈硬化症や血友病など、人と同様の症状を示すように遺伝子組換え等によって開発された豚です。既にマウスでは多くの疾患モデルが作製されていますが、マウスと人とは種差が大きいため、必ずしもマウスで得られた成果が人に応用できない例が知られています。そのため、ヒトに生理的な特徴に近い豚や猿等の疾患モデル動物の開発が望まれています。

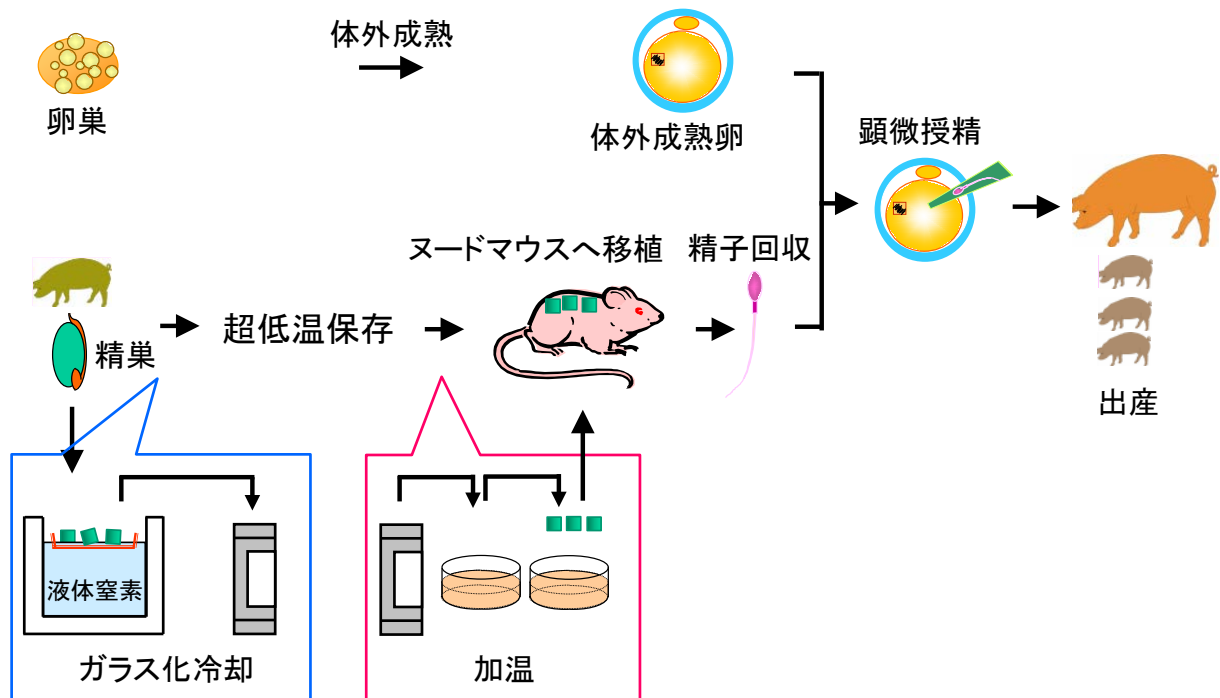


図1. 豚精巣組織の超低温保存、ヌードマウスへの移植（異種間移植）による豚精子発生および顕微授精卵の移植による子豚の生産

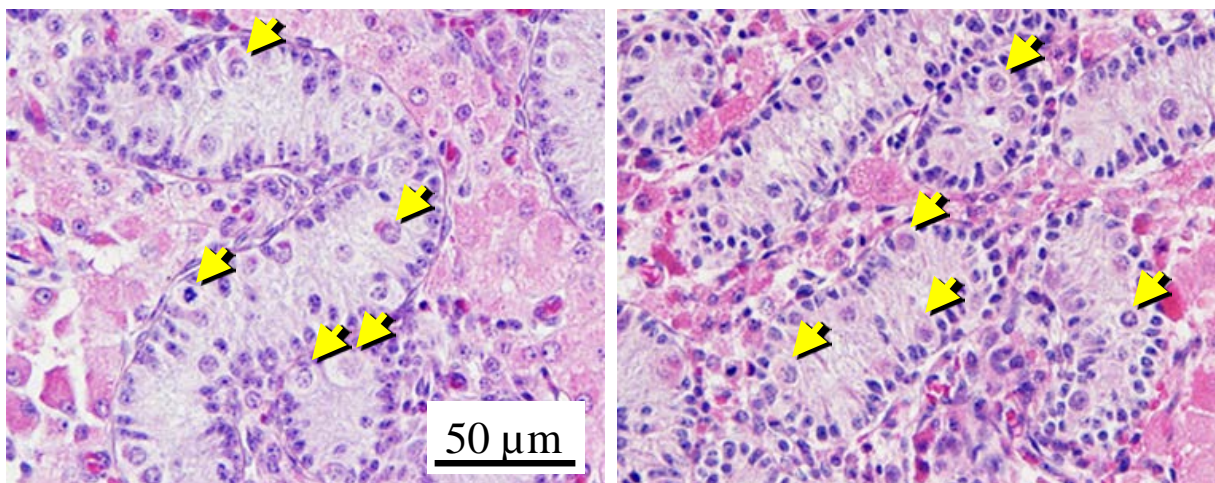


図2. 超低温保存前（ガラス化前）の精巣の顕微鏡像（左）と、保存後（加温後）で移植前の精巣の顕微鏡像（右）  
いずれにも円形の精祖細胞が見られる（矢印）。



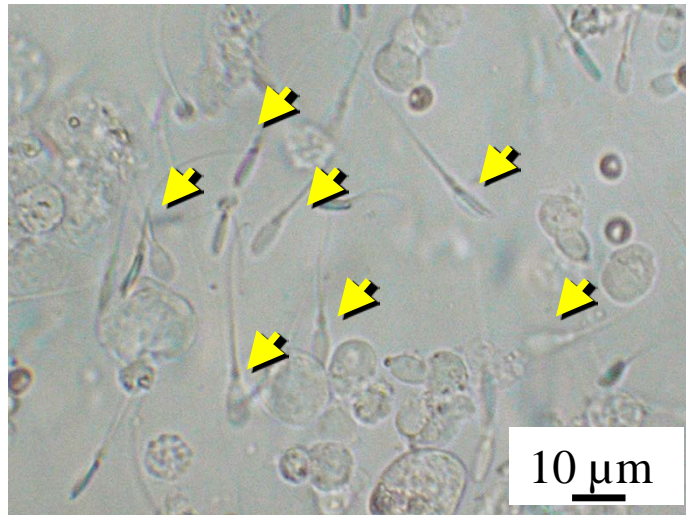


図 3. 移植組織から回収した豚精子（矢印）（移植後 254 日）

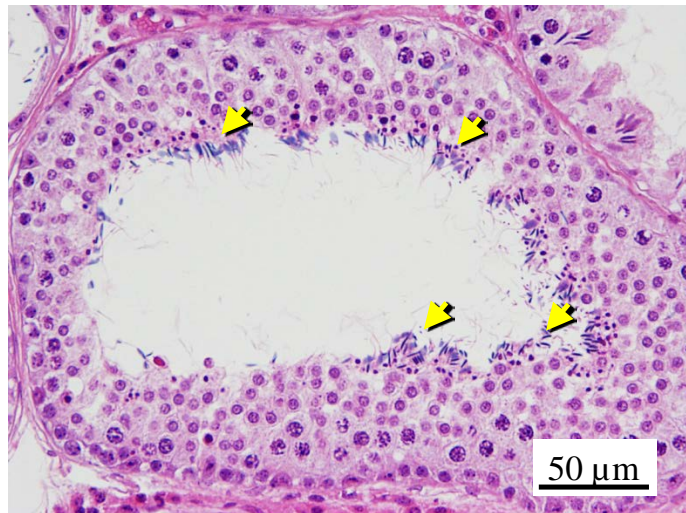


図 4. 移植後の精巣の顕微鏡像（移植後 254 日）  
精巣組織中（精細管）に多数の精子が見られる（矢印）



図 5. 分娩した子豚（雄 2、雌 3 頭、分娩後 5 日）