

氏名(国籍)	張 一 国 (中 国)
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	博 甲 第 1,336 号
学位授与年月日	平成 7 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
審査研究科	農 学 研 究 科
学位論文題目	ニワトリ始原生殖細胞の分離, 培養および移植に関する研究
主 査	筑波大学教授 農学博士 近 宗 千 城
副 査	筑波大学教授 農学博士 正 野 俊 夫
副 査	筑波大学助教授 農学博士 田 島 淳 史
副 査	筑波大学教授 工学博士 片 岡 廣
副 査	理化学研究所 ジーンバンク室長 薬学博士 大 野 忠 夫

論 文 の 要 旨

鳥類における遺伝資源の保存および遺伝子転換 (Tg) 動物作製技術の開発は大きな課題となっている。その方法としては、初期の生殖細胞である始原生殖細胞 (Primordial Germ Cell, PGC) の利用が考えられる。ニワトリ PGCは胚発生の初期に胚対外域で出現し、その後血流に乗って生殖巣に移住・定着・増殖することにより配偶子を形成する。本研究はこのような PGCの性質を利用して、PGCの分離、培養および移植の方法について検討したものである。

〔血液中始原生殖細胞 (cPGC) の分離〕ニワトリの受精卵を 2 日間孵卵し、直径約 40-50 μ m のガラスマイクロピペットを用いて胚体の血管から採血した。血液サンプルを ficoll 溶液で混合・重層・遠心分離することにより、16% ficoll 溶液と 6.3% ficoll 溶液の境界面から細胞を回収・洗浄し PAS 染色を行った結果、cPGC 含有率約 90% (平均 42 PGCs/Egg) の細胞群を入手することができた。

〔cPGC の培養〕分離・回収した cPGCを、新たに開発した「点滴培養系」(20 μ l of medium-well) を用いて培養した。すなわち、合成培地の M 199 に 0, 0.5 および 10% FBS を添加した場合の cPGC の生存率を調べた結果、培養 4 日目の cPGC の生存率はそれぞれ 43%, 65% および 97% であった。また培養 8 日目の生存率はそれぞれ 31%, 52% および 92% であった。このことから、基礎培地 (M 199) に添加した 10% FBS が、cPGC の生存を支えていることが示された。次に、ニワトリ 5 日胚生殖細胞由来の間質細胞を支持細胞とした場合の cPGC の増殖培養系について検討した。すなわち、孵卵開始 5 日目のニワトリ胚から生殖巣を分離して細分化し、10% FBS を添加した M 199 に chick IGF, human FGF-b および murine LIF 等を加え、3-4 日間初代培養を行った。こうして得た生殖巣間質細胞を点

滴培養系上で継代して支持細胞とし、蛍光標識された cPGC を培養した。その結果、培養 5 日目の cPGC 数は 1 日目に比べて平均 4.8 倍 ($p < 0.05$) に増加した。この生殖巣間質細胞の PGC に対する効果は、直接接触することによって生ずる可能性が高い事も示唆された。また、雌と思われる胚の右側の生殖巣間質細胞を支持細胞として培養した場合は増殖効果が認められないが、左側の生殖巣間質細胞を用いた場合は cPGC が増加する傾向が認められた。

〔生殖巣中始原生殖細胞 (gPGC) の培養〕生殖巣間質細胞を初代培養および継代培養し、均一に継代された間質細胞について培養 1 日目および 5 日目に gPGC 数を計測した結果、それぞれ 868 個および 3347 個で、平均 3.8 倍に増加していることが明らかになった ($p < 0.05$)。

〔培養後の gPGC の分離および移植による生殖系列キメラの作製〕培養後の gPGC が生殖巣に移住・増殖しうることを確認するために、gPGC の移植を行った。移植に用いた gPGC は、培養された生殖巣間質細胞から緩やかに攪拌する方法によって得た。この gPGC を無毒性の蛍光色素 (PKH 26) を用いて標識し、孵卵 2.5 日目の胚の血管内に注入して、その胚をさらに 3 日間孵卵した。このレシピエント胚を固定して連続切片を作製し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した結果、生殖巣内に蛍光色素によって染色されたドナー 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。ドナー gPGC 数は移植後の 3 日間に平均約 5 倍に増加していることも明らかになった。この結果は、すでに生殖巣に定着した gPGC を移住期の胚血管に移植すると、再び生殖巣に移住・増殖する能力をもつようになることを示している。

審 査 の 要 旨

この研究は(1)改良した ficoll 濃度勾配遠心分離法を用いてニワトリ初期胚の血液からほぼ純粋の cPGC を取り出し、(2)対外培養系で血液由来および生殖巣由来の PGC を分裂・増殖させることに成功し、(3)対外培養系で増殖した gPGC を移植することによって、生殖腺キメラを作製することができた、というもので独創性に富んだ内容を含んでいる。本研究で得られた結果は、鳥類における遺伝資源保存技術の実用化、遺伝子転換トリ作製技術の開発につながるものであり、また、鳥類における性分化の機構、配偶子分化の機構、PGC の生物学的性質の解明等、広い分野での応用が期待される。

よって、著者は博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。