

一般講演 4

ウシ精巣からの精原幹細胞採取の試み

永原知樹、若井拓哉、舟橋弘晃
岡山大学大学院環境生命科学研究科

【目的】精原幹細胞は、精子形成を半永久的に遂行するために必要不可欠な細胞であり、未分化な精原細胞中に混在しており、自己複製能および精原細胞への分化能を合わせ持っている。また、精原幹細胞の胚盤胞内への注入によって、生殖系列キメラを産生することが可能であることが報告されており、ES細胞が未樹立の家畜種で特異的遺伝子ノックアウト個体作出への適用が期待されている。しかし、精巣中の精原幹細胞の割合は0.02~0.03%と極めて少ないことが推定されており、精巣から効率よく精原幹細胞を単離する手法の確立が課題となっている。そこで本研究では、ウシ精巣から精原幹細胞を効率良く採取する方法の検討を行った。

【方法】精巣は4~6ヶ月齢の雄ウシから採取した。採取した精巣は白被膜を除去後に精細管を細切し、各種酵素（1 mg/ml collagenase、1 mg/ml hyaluronidase、1 mg/ml trypsin、5 µg/ml DNase）処理を行った。得られた細胞懸濁液を70 µm径及び40 µm径のフィルターを用いて過分離後に、Differential Plating (DP)による体細胞除去処理を行い、不連続密度勾配遠心法 (Percoll 法) によって精原細胞を濃縮した。実験1：酵素処理液へのhyaluronidase添加が精原細胞濃縮前の生存細胞数に及ぼす影響を検討した。実験2：hyaluronidaseを含む酵素懸濁液での処理後、異なる濃度勾配 (A 20%/28%/40%の3段階：B、20%/28%/30%/40%の4段階) を用いたPercoll法が生存精原細胞の採取効率に及ぼす影響について検討した。精原細胞の生存はTrypan Blue染色により評価した。実験3：実験1及び2で検討した条件下で分離した精原細胞を未分化マーカーであるOct-3/4の発現に対して同抗体を用いて免疫蛍光染色を行い、採取した精原細胞中のOct-3/4陽性細胞の含有率を調べた。

【結果】実験1：hyaluronidase添加区の生存細胞数($9.72 \pm 1.51 \times 10^5$ cells/ml)は、無添加区のそれ($4.33 \pm 0.32 \times 10^5$ cells/ml)より有意に高かった ($P < 0.05$)。実験2：Percollの濃度勾配A法の28/40%分画から $2.48 \pm 0.80 \times 10^3$ cells/ml、B法の28/30%分画および30/40%分画からそれぞれ $3.82 \pm 0.64 \times 10^3$ cells/mlおよび $1.78 \pm 0.62 \times 10^3$ cells/mlの生存精原細胞を回収することができたが、A法とB法での生存精原細胞採取効率に有意な差はなかった ($P > 0.05$)。実験3：採取した生存精原細胞中に占めるOct-3/4陽性細胞率は、hyaluronidaseを含む酵素処理後に $8.7 \pm 1.1\%$ であったのに対して、DPによる体細胞除去処理後には $14.7 \pm 4.5\%$ 、Percoll法による濃縮分離後にはB法の28/30%分画で $75.5 \pm 5.8\%$ および30/40%分画で $50.8 \pm 12.5\%$ であった。

以上の結果から、若齢ウシ由来の精細管を細切して得た懸濁液をhyaluronidase含有酵素混和液にて処理後に、DPによる体細胞除去処理を行い、更に4段階(20%/28%/30%/40%)のPercoll法による濃縮分離を実施することによって、未分化精原細胞を効率よく採取できることが明らかになった。今後は、Oct-3/4だけでなく精原幹細胞特有の抗体も用いてさらなる同定とこれらによって得られた精原幹細胞の継代培養系の確立を目指す予定である。