

帰国後 2 週間以内に提出してください（厳守） A4 用紙 4 枚以内

（海外・国内）インターンシップ報告書

2018 年 10 月 31 日提出

氏名	坂口 謙一郎
所属	獣医学研究科 診断治療講座 繁殖学教室
学年	博士課程 3 年
活動先名	Institute of Cell Biology、エジンバラ大学、イギリス
期間 ① （出発日―帰礼日） ② （インターンシップ 実施開始日―終了日）	① 2018 年 10 月 6 日-10 月 24 日 ② 2018 年 10 月 8 日-10 月 22 日

・活動目的及びインターンシップ先を選択した理由

活動目的

1. 牛における原始卵胞由来卵子の培養技術を習得する。
2. 先端機器を用いた卵巣・卵胞・卵子の機能評価法を習得する。
3. 海外で博士研究員として働くための情報収集および受け入れの交渉を行う。

インターンシップ先を選択した理由

私は、将来、哺乳動物の卵胞発育や卵子発生能および人工繁殖技術に関する研究を通して、酪農畜産のみならずヒトや野生動物の生殖補助医療に貢献する研究を行うと共に、同じ志を持つ後進の育成に取り組みたいと考えている。また、自身の専門である繁殖学の知識や臨床技術といった専門性を活かし、国際協力にも携わりたいと考えている。これらの目標を達成するために、10 年後の具体的なキャリアパスとして、大学において Principal Investigator となることを志望している。その上で、卒業後は海外の研究機関に博士研究員として身を置き、国内外問わずあらゆるバックグラウンドを持った人とコミュニケーションを図ることができる能力や、ラボをセッティングしマネジメントする能力および最先端の研究や臨床技術を身に付け、日本に持ち帰りたいと考えている。これまで私は、牛の初期胞状卵胞由来卵子の体外発育培養について研究を行ってきた。初期胞状卵胞期は、牛において採取した卵子により産子が生産されている最も早期のステージで、その報告は申請者の所属教室によるものを含め 3 例のみであり、いずれも日本の研究グループによるものである。申請者は牛等の大型家畜を用いて将来初期胞状卵胞よりも早期の発育ステージにある卵胞および卵子を用いた研究に挑戦したいと考えている。エジンバラ大学の Dr. Evelin Telfer は、今年、ヒトの原始卵胞由来卵子を体外で発育させ、成熟卵子を作出したことを報告しており、牛の原始卵胞を用いた研究においても実績のある研究者である。Dr. Telfer のラボの原始卵胞培養技術と、当研究室で培われた世界的にも高いレベルの初期胞状卵胞由来卵子の培養技術を組合せることで、世界で初めて原始卵胞から牛の成熟卵子および産子の作出が可能となるのではないかと考えた。

・活動内容・成果（2,000 字程度、活動内容が判る様な写真や図表を加えて下さい）

牛の原始卵胞活性化のための卵巣組織の培養

食肉検査場由来の卵巣の皮質をメスで薄切した後、1-2 mm 程度の短冊状に切り（図 1）、実体顕微鏡下で 40 μ m 以上の卵胞が皮質上にないことを確認した後、24 穴プレート内で個別に培養に供した。培養途中の卵巣を確認したところ、卵巣皮質上に二次卵胞の形成を確認できた（図 2）。培養 7 日目に実体顕微鏡下で観察しながら、25 ゲージの注射針を用いて二次卵胞の単離を行った（図 3）。単離後、それぞれの卵胞を個別に 96 穴プレートで培養した。卵巣皮質の薄切については、所属教室で初期卵胞採取のために行っているものと類似しており、問題なく行うことが出来た。一方、短冊状に切る過程で細かく切りすぎてしまうと、培養過程で間質細胞の成長により、皮質が丸まってしまい卵胞の観察および単離が難しくなるということを学ぶことができた。渡航機関の関係で、二次卵胞内の卵子を回収し、培養に供するステップについては実施できなかったが、これらの卵子については、ポスドクの方が培養を継続し、体外成熟培養および体外受精を実施し、フェローシップの申請書作成のための予備データとして提供して下さるとのことであった。

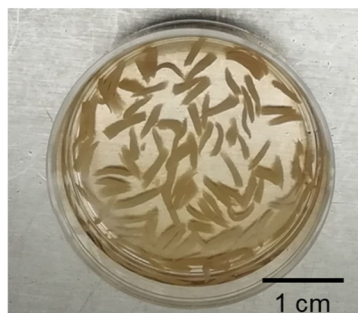


図 1. 培養前の卵巣薄片

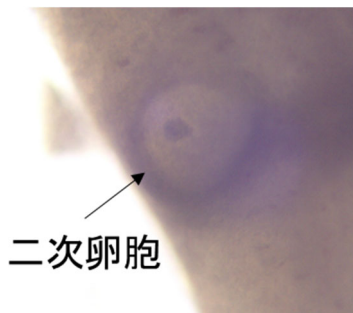


図 2. 培養 2 日目の卵巣薄片

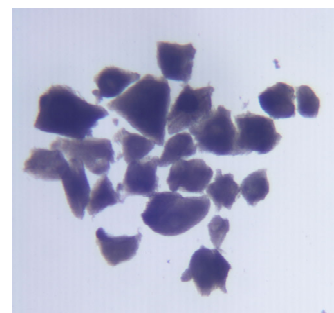


図 3. 培養 7 日目に単離された二次卵胞

フローサイトメトリーによる卵巣内細胞の評価

Dr. Telfer のラボでは、卵巣幹細胞の分離のための Fluorescence-activated cell sorting (FACS) を行っている。卵巣幹細胞とは、卵巣内に存在し、卵子への分化能を有する幹細胞である。これまでの生殖学・繁殖学の歴史において、女性の卵巣内の卵子数は増えることはなく、出生後に減少し続けると考えられてきたが、2004 年にマウスで、2012 年に成人女性でその存在が確認され、注目が集まっている。Dr. Telfer のグループは、FACS により選



図 4. 凍結融解後のヒトの卵巣組織片

別したヒト卵巣幹細胞とヒト胎児卵巣由来体細胞を合わせて培養することで、卵子様構造物を作製することに成功している。今回、FACS を効率的に行う上で重要な、細胞の分離過程および染色のステップを中心に、帝王切開した患者から寄付されたヒト卵巣組織片（図 4）を用いた実験に立ち合わせていただき、実験手技と実験原理を学習した。ヒト卵巣組織内の細胞分離は、複数の酵素を用いた処理と、鉗と Disociator を用いた機械的処理を組み合わせたものであり、どの程度まで卵巣組織を刻まなければならないのかなど、文献からは読み取れない情報を得ることができた。卵巣幹細胞の標識に用いられるマーカーは、DEAD-box helicase 4 (DDX4) という生殖細胞特異的

なペプチドであり、卵巣幹細胞では、C 末端が細胞膜外に存在する一方、分化後の卵子では細胞内に存在するため、C 末端に結合する抗体を用いて卵巣幹細胞を標識できるということを教わった。また、Dr. Telfer のグループは、これまで牛やアジアゾウ、アフリカゾウ、ハダカデバネズミにおいて卵巣内の DDX4 陽性細胞を検出しているとのことであった。

卵巣組織切片の標本作製ならびに顕微鏡観察

二次卵胞以前の卵胞の発育の評価には、卵巣組織の薄切標本を作成し、顕微鏡下で観察することが必要である。そこで、卵巣組織のホルマリン固定、パラフィン包埋、マイクロトームを用いた薄切、脱パラフィン処理、染色という一連の過程を学んだ。基礎的な実験手技ではあるが、私にとっては初めての経験であり、不慣れで上手くいかない点もあったので、帰国後も牛卵巣を用いてトレーニングしたいと考えている。また、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、免疫蛍光染色した卵巣組織の観察も見学した。Dr. Telfer のラボでは、牛を用いて抗がん剤を用いた化学療法が卵巣組織における DNA 損傷に及ぼす影響について研究を行っており、DNA 修復マーカーの局在を確認しているとのことであった。また、Dr. Telfer のラボは、ヒトや牛の卵巣組織の標本を大量に所有しており (図 5)、ゾウやオポッサムといった野生動物の標本も所有していた (図 6)。「ポスドクになるなら、卵巣組織の観察になれた方がいい」という助言を受け、空き時間を利用して卵巣組織の観察を行った。

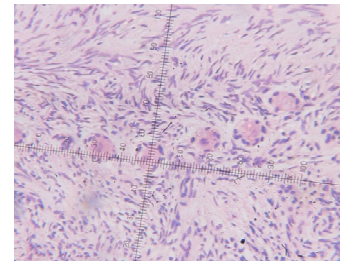


図 5. 牛の卵巣組織 (HE)

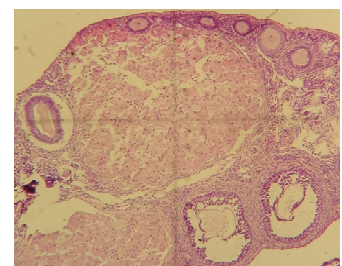


図 6. オポッサムの卵巣組織 (HE)

博士研究員として働くための情報収集および受け入れの交渉

Dr. Telfer に直接、体外発育培養系を用いた牛の原始卵胞由来の産子生産に挑戦したい旨を伝え、ポスドクとしての受け入れが可能か交渉を行ったところ、快諾していただいた。また、「もし原始卵胞で成功したら、次のステップは卵巣幹細胞」という助言もいただいた。また、次年度申請したいと考えている日本学術振興会海外特別研究員についても、研究計画についての助言も含めて申請書の作成の協力も了承いただいた。さらに、イギリス国内のフェローシップ制度についても質問を行い、外国人でも応募できる「Darwin trust」という制度を教えていただいた。そして、「ポスドクに求める必要条件は何か」という質問も行ったところ、「Show your advantage, and start your project independently」という回答を得た。この言葉を肝に銘じてポスドク生活に臨みたい。

Royal (Dick) School of Veterinary Studies の見学

エジンバラ大学の Royal (Dick) School of Veterinary Studies は、ヨーロッパおよびアメリカの国際認証を双方取得している世界でも有数の獣医学部である。今回、Farm Animal Health and Production の Prof. Alastair Macrae にコンタクトを取り、講師である Dr. Issa Robson の案内のもと、獣医学部、動物病院、附属酪農場である Langhill Farm を見学した。キャンパス内の学生の自習室には、大型の牛・馬の模型や、羊のボディコンディションスコア (BCS) の判定基準を示した模型 (図 7) な

ど、教材が多数取り揃えられていた。動物病院には産業動物の入院施設もあり、二次診療を主体に週 10-20 頭程度の患者の受け入れがあるとのことだった。最終学年の学生は、Clinical rotation に入り、診療時には、まず学生が稟告・所見を取り、教員に確認するという手順で行われるとのことであった。Langhill Farm には、250 頭程の乳牛が飼養されており、泌乳牛は乳量によって飼養管理を分けていた。高泌乳牛はフリーストール牛舎内でグラスサイレージ主体の混合飼料を給餌し、低泌乳牛は放牧主体で管理しているとのことであった。農場内には、学生用の実習施設もあり (図 8)、直腸検査用枡場や、屠体由来の足を固定し、削蹄実習を行う装置があった。獣医学部の見学を通して、症例数の多さや設備の充実に加え、手をかけて工夫された数々の教材を見ることができ、改めてヨーロッパの獣医学教育のレベルの高さを感じた。



図 7. 羊の BCS 判定基準の模型



図 8. 農場内の実習施設

・今後のキャリアパスを考える上でどのようにプラスになったか。

実際にラボを訪れたことで、「このラボで研究がしたい」という気持ちが強くなった。特に、野生動物に関する研究も行っているという情報は渡航以前には全く知らなかったため、大きなモチベーションとなった。また、ポスドクとしての受け入れを了承いただいたことも、実際に現場に行って直接交渉を行うことが出来たことが効果的に働いたのではないかと考えている。また、学ばせていただくことが多かった一方、牛の体外受精や胚移植に関する知識など、こちらから相手に提供できる内容があることも分かり、自分自身の強みを発見できる機会にもなった。

・後輩へのアドバイス

私にとって今回のインターンシップは、卒業後の進路を考えるうえで重要な機会となった。18 日間という長期間の渡航に掛かる費用を負担していただける機会は希少であり、リーディング大学院の手厚いサポートに心から感謝している。これからインターンシップ先を検討する後輩たちにも、この機会を有意義に使って、卒業後のキャリアパスに直接繋げる気持ちで活動先を選択してほしい。また、私の場合は、Dr. Telfer との面識は全くなかったが、それでも今回のインターンシップの受け入れおよびポスドクとしての了承をいただいた。興味がある研究室であれば、コネクションがないからと躊躇せずに、連絡を取ってみてほしい。

指導教員確認欄	指導教員所属・職・氏名 繁殖学教室・教授・片桐成二
---------	------------------------------

- ※ 1 電子媒体を国際連携推進室・リーディング大学院担当に提出して下さい。
- ※ 2 インターンシップ先の担当者が活動内容を証明した文書（署名入り）を提出して下さい。
- ※ 3 本報告書はリーディングプログラムキャリアパス支援委員会で内容を確認します。その後、教務委員会で単位認定を受けることになります。

提出先：VETLOG

内線：9545 e-mail: leading@vetmed.hokudai.ac.jp