

# マウス初期胚の発生における微小重力の影響

若山清香<sup>1</sup>、河原裕美<sup>2</sup>、李羽中<sup>1</sup>、山縣一夫<sup>1</sup>、弓削類<sup>2</sup>、若山照彦<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター

<sup>2</sup> 広島大学大学院保健学研究科

## Detrimental effects of microgravity on mouse preimplantation development in vitro.

Wakayama S, Kawahara Y, Li C, Yamagata K, Yuge L, Wakayama T.

Laboratory for Genomic Reprogramming, RIKEN, Center for Developmental Biology, Kobe, Japan.

### Abstract

Sustaining life beyond Earth either on space stations or on other planets will require a clear understanding of how the space environment affects key phases of mammalian reproduction. However, because of the difficulty of doing such experiments in mammals, most studies of reproduction in space have been carried out with other taxa, such as sea urchins, fish, amphibians or birds. Here, we studied the possibility of mammalian fertilization and preimplantation development under microgravity (microG) conditions using a three-dimensional (3D) clinostat, which faithfully simulates 10<sup>-3</sup> G using 3D rotation. Fertilization occurred normally in vitro under microG. However, although we obtained 75 healthy offspring from microG-fertilized and -cultured embryos after transfer to recipient females, the birth rate was lower than among the 1G controls. Immunostaining demonstrated that in vitro culture under microG caused slower development and fewer trophectoderm cells than in 1G controls but did not affect polarization of the blastocyst. These results suggest for the first time that fertilization can occur normally under microG environment in a mammal, but normal preimplantation embryo development might require 1G.

**【目的】** 将来人類が地球を離れ宇宙空間に進出し、スペースコロニーなどで生活を営むようになった場合、ヒトの繁殖に宇宙環境がどういった影響が出てくるかは解明しなければいけない問題の一つである。しかし、哺乳動物を直接宇宙空間へ打ち上げ実験を行うには大変な労力と時間がかかる。そこでわれわれは広島大学弓削類教授が開発した3Dクリノスタットを用い地球上で人工的に宇宙空間シャトル内と同じ微小重力状態を作り、マウスの受精能（IVF）を検討した。

**【方法と結果】** 我々は、宇宙空間への打ち上げを行うことなく地上で微小重力実験を行うために、3次元重力分散型模擬微小重力装置（3D-クリノスタット：以下、クリノスタット）を用いることにした。この装置は、重力を正確に打ち消す回転を3次元で行うことで、人工的にスペースシャトル内と同じ微小重力環境（10<sup>-3</sup>G）を高精度につくり出すことが可能となる。培養細胞を用いた研究では、クリノスタットで行った実験と実際に宇宙で行った実験と同じ結果になることが確かめられている。また面白いことに、この装置を用いた微小重力環境下では、幹細胞の分化が抑制されることがあきらかとなり、再生医学への応用が考えられている。我々はこの装置を用いて、マウスの微小重力状態での繁殖実験を行った。

クリノスタットは微小重力を発生させるために、特殊な実験器具と培養条件を必要とする。我々は、マウスの体外受精および初期胚の培養をこの装置内で行うために、従来の方法を大幅に改変しなければならなかった。実際、この改変方法を確立するために検討に検討を重ね多大な時間を費やした。最初に我々は、マウスの卵子と精子を用いて微小重力環境下で体外受精を試みた。実験開始から6時間後にクリノスタットから卵子を回収して、微小重力環境でも受精可能かどうか、可能だった場合正常な受精だったのかどうか詳しく調べた。その結果、微小重力区でも84%の卵子は正常な受精をしており、クリノスタットを使わなかった1Gのコントロール区（81%）と有意な差はみられなかった。また、受精卵の核の性質を詳しく調べたところ、微小重力に起因する異常は見られなかった。従って精子の卵子への侵入能力、および卵子内での雌雄前核の形成には微小重力の影響は見られず、微小重力のもとであっても受精は可能であることがあきらかとなった。

次に初期発生への重力の影響を調べるために、体外受精から24時間あるいは96時間連続でクリノスタットでの培養を行った。その結果、2細胞期胚への発生率には差が見られなかったが、96時間培養を続けると胚盤胞期への発育は1G区が57%だったのに対し、微小重力区は30%に低下していた（図1）。

微小重力区で培養した胚盤胞に対して免疫染色を行い、細胞数や内部構造を調べたところ、形態や胎児側の細胞数には異常はなかったが、胎盤側への分化が抑制されていることがあきらかとなった(図2)。この結果は、重力は細胞の分化に重要な影響を及ぼしている可能性を示唆している。

次に、それら微小重力下で培養した胚をメスマウスの卵管あるいは子宮に移植し、産仔への発育能を調べた。マウスをクリノスタット内で飼育することは動物愛護の観点から不可能であるため、移植後は通常の飼育室(1G)で行った。その結果、24時間微小重力で培養した胚は、2細胞期への発生率には差がなかったにもかかわらず、産仔率は1G区の63%に対して35%に低下した。96時間微小重力で培養した胚は、胚盤胞への発生率が落ちるだけでなく出産率に関しても、1G区の38%に対して微小重力区ではわずか16%まで低下してしまった。しかし、生まれたマウスは外見も繁殖能力も正常であった。低率ではあるが正常な産仔が生まれたことは、宇宙での繁殖が不可能ではないことを示している。

この実験は、広島大のクリノスタットで受精、胚発生を行い、メスマウスへの胚移植は神戸の理研 発生・再生科学総合研究センターで行った。そのためマウスの胚は、クリノスタットによる微小重力を停止してから、神戸へ運びメスマウスの子宮に着床するまでの約半日ほどを1Gで過ごすことになる。胚は生き物であり、たとえ微小重力環境が胚に対して深刻なダメージを与えたとしても、着床するまでの半日間を1G環境に置かれたことで、それらのダメージが修復されてしまった可能性がある。その可能性を考慮すると、着床も含め全行程を微小重力環境で行った場合、すなわち本当の宇宙では、産仔率ももっと低い可能性があるかもしれない。なぜ魚類や両生類は宇宙で問題なく発育出来、ほ乳類は難しいのだろうか。その答えの1つに胎盤が上げられる。胎盤はほ乳類特有の臓器であり、魚類や両生類はもっていない。その胎盤だけが、微小重力により発育阻害されていたからである。胎盤は生物の進化の中で一番最後に出来た臓器であり、最も地球という環境に適応しているからではないだろうか。

**【今後の課題】** 今回の実験で我々は、宇宙空間ではほ乳類が正常に繁殖するのは困難である可能性を初めて示した。では、どのくらいの重力があれば正常に発生可能なのだろうか。本研究で使用した3D-クリノスタットは、従来型のものより微小重力環境をより正確に再現しているが、これはあくまで模擬的な微小重力環境での実験である。本当の答えは実際に宇宙で実験をしなければ分からない。これまでの宇宙開発の技術では、ほ乳類の受精および初期発生に関する実験を宇宙で行うことは不可能であったが、国際宇宙ステーションに取り付けた日本実験棟の

「きぼう」が完成し、実験環境施設が整いつつある今、これまで難しかった宇宙での繁殖実験に本格的に取り組むことが可能となってきた。月面基地計画や火星までの有人宇宙飛行、さらにはその先の深宇宙への探索など人類が宇宙空間で自在に活躍する可能性を模索する必要性が高まっている。人類が長期間宇宙で生きていくためにも日本実験棟の「きぼう」などを利用した、宇宙空間での生物研究がより進展することを期待している。

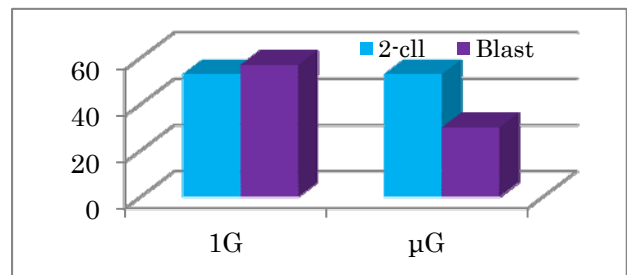


図1 2細胞期および胚盤胞期への発生率をグラフ化したもの。青は2細胞期胚、紫は胚盤胞期胚への発生率。

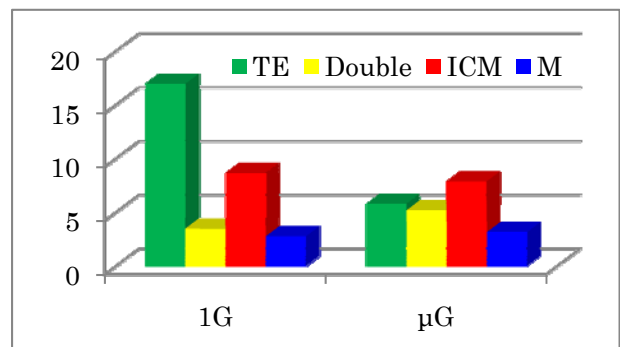


図2 胚盤胞内の各種細胞数を数えたもの。緑 (TE) は胎盤側の細胞数、赤 (ICM) は胎児側の細胞数、黄色 (緑と赤の両方に染まったもの) は胎盤側の細胞へ分化している途中のもの。青 (M) は細胞分裂中で染色できなかったもの。