

# 第11回哺乳動物生殖工学研究会

プログラム・抄録集

会期：平成11年12月4日（土）

午後1時00分～5時30分

会場：北里本館大會議室

港区白金5-9-1

TEL 03-3444-6161

開会の辞

会長 横山峯介

特別講演

哺乳類のゲノムインプリントング研究から見えてくるもの

石野史郎（東京工業大学 遺伝子実験施設）

司会 中瀬直己

シンポジウム

1.マウス胚の培養と現状

安齋政幸（三菱化学生命科学研究所）

2.ラット胚の培養の現状と問題点

高橋利一（(株) ウイエヌテクノロジー研究所）

3.ブタ体外成熟・体外受精胚の発生能の検討

菊池和弘（農林水産省 農業生物資源研究所）

4.既知組成培地によるウシ体外成熟・体外受精卵の体外培養

桃沢健二・福田芳詔（北里大・獣医畜産）

5.ヒト胚の体外培養　—妊娠率向上への試み—

雀部豊（東邦大学医学部第1産科婦人科）

総　　会

# 哺乳類のゲノムインプリンティング研究から見えてくるくもの

石野史敏

東京工業大学遺伝子実験施設  
科学技術庁振興事業団  
戦略的基礎研究「ゲノムの構造と機能」領域研究代表者

哺乳類のゲノムは、父親、母親由来の違いで個体発生、成長、行動に関する機能が異なることが、発生工学的手法を用いた雌性単為発生胚、雄性（雄核）発生胚作製の実験および片親性2倍体マウスを用いた遺伝学的実験から示されている。ゲノムが由來した親の生別を記憶しているように振る舞うことから、父親、母親由来のゲノムの違いに由来する現象をゲノムインプリンティング（ゲノムの刷込み）と呼んでいる。

最近の研究により、このような親の生別に由来する機能的差異の原因は父親のゲノムからのみ発現する遺伝子群と母親のゲノムからのみ発現する遺伝子群という2群のインプリンティング遺伝子の存在に起因することが明らかになってきた。私達はこれら遺伝子群を体系的に *Paternally expressed genes Peg* および *Maternally expressed genes Meg* と呼ぶことを提唱している。

私達の開発した極微量の生物材料からの遺伝子サブストラクション法を用いた体系的な *Peg*、*Meg* 遺伝子群の分離の結果、染色体上の12カ所のインプリンティング領域の8ヶ所に13のインプリンティング遺伝子を同定できた。そして、これらのインプリンティング遺伝子の発現の発現部位の総合的な解析や、発生工学を用いて作製した特殊発生胚における発現解析によって見えてきたゲノムインプリンティング生物学的意義、進化的意義に関しておよび遺伝子発現の分子機構モデルについて紹介したい。

マウス胚の培養と現状  
安齋政幸  
三菱化学生命科学研究所

近年、遺伝子改変動物の作成に関わる実験系を有効に行う上で、生殖工学技術は欠くことの出来ないものになっている。それに伴いマウスの体外受精や初期胚培養に用いる培養液、胚・配偶子の保存に用いる凍結基準液などを多種類準備することになる。しかしこれらの溶液はあまり市販されておらず、また実験を行う際の使用量は少量であるため、現状では研究者が各自で作成し使用しているところが多い。

本講演では、私達がマウスの体外受精と胚培養に用いる培養液や凍結基準液を作成した後、大量にアンプル封入・管理することによりキット化を図り、それら各種溶液の長期保存の可能性を検討して実用化の目処をつけたので紹介する。

## ラット胚の培養の現状と問題点

(株) ウィエスニューテクノロジー研究所

高橋利一

ラットは毒性・薬理試験を始めとする様々な分野に広く用いられてきた実験動物である。しかし、ラット胚及び配偶子の培養技術は様々な面において未開発の部分が多い。近年に至るまでの時代背景として、マウスの培養技術は Tg / KO 動物の作出に代表される発生工学的手法の確立と共に重要度が増し、急速な進展を遂げた。マウス胚の体外培養における研究は、培養から個体発生まで一貫して考えられているといえる。一方ラットは、Tg 動物作出の報告例も（マウスに比べれば）極めて少数であり、ES 細胞による遺伝子欠損動物作出の成功例もないことから、個体発生まで一貫した培養技術の整備と言う点ではマウスに大きく遅れをとっていると言える。本演題では、ラット胚培養を精子・卵子（体外受精）及び受精卵の体外における培養の広義に捕らえて、ラット胚培養の近年までの現状を紹介し、培養基礎技術の確立のための課題を整理したいと考える。

### ・ 2-cell block

ラット胚の培養においての大きな問題は 2-cell block による発生停止である。この問題は 1991 年に Kishi らによってリン酸不含を特徴とする HECM 培地によって克服が可能となった。その後 1994 年 Miyoshi らによる R1ECM 培地なども開発されてきており、現在 90%以上の胚を胚盤胞まで培養することが可能となっている。Glucose 濃度、リン酸の有無、浸透圧、を中心に改良されてきたこれら培養法を紹介する。

### ・ 胚移植後の個体発生率

1974 年に Toyoda らによって報告された体外受精 2 細胞期胚の移植成績は、移植胚のうち 58%が着床せず、17%が着床後に発生停止し、25%が産子へと発生している。1986 年の Vanderhyden らの報告によれば体外受精胚は初期発生が遅延することで個体発生率が低下している。

一方、1995 年 Miyoshi らによってラットの R1ECM 培地で培養させた胚盤胞期胚の移植成績についても、移植胚のうち 32%が着床せず、55%が着床後に発生停止し、13%が産子へ発生したと報告している。2 細胞期胚、胚盤胞期胚いずれのステージにおいても、*in vivo* 胚の個体発生の成績は移植胚あたり 60-70%であることから、体外培養由来胚の個体発生率は低いと考えられる。この問題について関連するレポートを収集し、課題と対策の可能性を考察する。

・精子保存に関する報告

ラットでは不可能であった精子の凍結保存の成功例が報告された。これについて紹介する。

・ラット ICSI に関する報告

近年マウスで成功例が報告されたクローンの作出は、新しい遺伝子改変動物作出の新しい手段として注目されている。作出のための基礎技術となるラット ICSI の報告を紹介する。

## ブタ体外成熟・体外受精胚の発生能の検討

菊地 和弘（農林水産省 農業生物資源研究所）

近年、哺乳動物において、発生工学技術の進展に伴い、体外成熟卵を利用した体外受精、顕微受精あるいは核移植によるクローニングの機会が増えており、これらの技術を利用した効率的な家畜生産、育種あるいは形質転換動物作出が期待されている。家畜では、ウシにおいてこれらの技術が確立しつつある。ブタにおいては体外成熟・体外受精により作出された胚を移植して産仔が得られているものの、顕微受精や核移植は成功しておらず、基礎的な研究には体内成熟卵（体内受精胚）を利用していているという現状がある。これらの利用にはドナーとなる雌豚を多数揃える必要があり、供試胚の数に制限が生じる。したがって、今後は、屠場材料を活用した体外成熟・体外受精胚を積極的に利用することが期待されている。しかしながら、ブタの体外成熟・体外受精胚の発生能に関しては、そのまま体外で継続培養した場合は胚盤胞期胚にまで進展するものの、胚を構成する細胞数は 30 から 39 個程度と極端に少なく (Abeydeera and Day, 1997; Wang *et al.*, 1997; Kikuchi *et al.*, 1999)、移植を行ってもその後の発生能の回復は認められない。これらの貧弱な胚発生能は、第一点はブタ卵においては多精子受精が高率に起こり得ること、第二点は発生培養法に改良の余地が残されていることに起因すると考えられる。多精子受精に関しては重要な課題であるが別の機会に述べることとして、本シンポジウムでは、体外成熟・体外受精胚について、受精直後に本当に発生能が備わっているのか、あるいは培養法の改良の余地があるのかなどを検討したい。

体外成熟・体外受精胚を体外で培養すると胚盤胞期胚にまでに発生し (Matiolli *et al.*, 1989)、24 から 36 時間体外培養した 2 ないし 4 細胞期胚を移植することにより産仔が得られている (Matiolli *et al.*, 1989; Yoshihda *et al.*, 1993; Funahashi *et al.*, 1996, 1997)。これらの報告からブタ体外成熟・体外受精胚に発生能があることが初めて確認された。最近になって 96 時間培養後の 8 細胞期胚 (Day *et al.*, 1998) の移植により産仔が得られたとの報告がなされたが、胚盤胞期胚の移植による産仔の報告はない。これまでの報告では、少なくとも 24 時間培養した分割胚を移植することでその発生能が確認されているが、体外培養後の胚盤胞期胚が低品質であるという状況を

考え合わせると、体外成熟・体外受精胚そのものが発生培養に供する以前に既に質が悪いのか、あるいは不適当な体外培養により発生能が低下してしまうのかが依然として不明瞭であった。そこで、次に述べる二つの実験を行い体外成熟・体外受精胚の品質と体外培養条件について検討することにした。1) 移植時期による検討：媒精直後 (Day0)、24 時間培養後 (Day1) あるいは 48 時間培養後 (Day2) に移植して胎仔 (29 日齢) ならびに産仔への発生能を検討した。Day0 では 6.7% の胚が胎仔にまで発生・発育したが、Day1 ならびに Day2 では 1.7% ならびに 2.0% であった。また、Day0 ならびに Day1 では 4.5 % ならびに 4.0% の胚が産仔にまで発生・発育したが、Day2 では仔ブタが得られなかった。以上のことから、体外培養時間の経過にともない発生能が低下することが示唆された (Kikuchi *et al.*, 1999)。2) 初期発生能の検討：Day0 で移植し第 6 日目 (Day6) で胚を回収した。対照区として移植せずに Day6 まで体外培養を行った。移植したものでは回収胚の 25% が、培養区では 9% が胚盤胞期胚まで発生した。移植区の胚盤胞期胚の総細胞数は平均 187 であったのに対し、培養区では 37 であった。以上のことから、Day0 で移植したものは胚盤胞期胚への発生率ならびに細胞数とも有意 ( $p < 0.05$ ) に増加することが判明した。特に、細胞数については体内山來胚にほぼ同じであった (鈴木ら, 1999)。

これらの実験結果から、ブタ体外成熟・体外受精胚には発生能が具備されていることが判明した。ブタ胚の培養には NCSU 培養液 (Petters and Wells, 1993) を基礎培養液としているが、培養液の選択を含めて体外培養系の改良が求められる。また、最近の私たちの研究では、Day2 の移植胚を移植し Day6 で回収すると胚の品質が低下することが示唆されており (未発表)、受精後 2 日間 (4 細胞期) までの培養条件がその後の胚発生を低下させることも考えられることから、発生停止 (cell block) や胚ゲノムの遺伝子発現 (embryonic genome activation) とも関連づけることが必要である。

#### (参考文献)

- Abeydeera LR, Day BN. Fertilization and subsequent development in vitro of pig oocytes inseminated in a modified Tris-buffered medium with frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *Bio Reprod* 1997; 57:729-734.  
Day BN, Abeydeera LR, Johnson LA, Welch GR, Wang WH, Cantley TC, Rieke A. Birth of piglets preselected for gender following in vitro fertilization of in vitro

- matured pig oocytes by X and Y bearing spermatozoa stored by high speed flow cytometry (abstract). Theriogenology 1998; 49:360.
- Funahashi H, Kim NH, Stumpf TT, Cantley TC, Day BN. Presence of organic osmolytes in maturation medium enhances cytoplasmic maturation of porcine oocytes. Bio Reprod 1996; 54:1412-1419.
- Funahashi H, Cantley TC, Day BN. Synchronization of meiosis in porcine oocytes by exposure to dibutyryl cyclic adenosine monophosphate improves developmental competence following in vitro fertilization. Bio Reprod 1997; 57:49-53.
- Kikuchi K, Kashiwazaki N, Noguchi J, Shimada A, Takahashi R, Hirabayashi M, Shino M, Ueda M, Kaneko H. Developmental competence, after transfer to recipients, of porcine oocytes matured, fertilized, and cultured in vitro. Biol Reprod 1993; 60:336-340.
- Mattioli M, Bacci MI, Galeati G, Seren E. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized in vitro. Theriogenology 1989; 31:1201-1207.
- Petters RM, Wells KD. Culture of pig embryos. J Reprod Fertil 1993; supple 48: 61-73.
- 鈴木薫, 菊地和弘, 柏崎直巳, 野口純子, 金子浩之, 紫野正雄. ブタ体外成熟(IVM)/体外受精(IVF)胚の発生能の検討. 繁殖生物学会講要 1999;83.
- Yoshida M, Mizoguchi Y, Ishiaki K, Kojima T, Nagai T. Birth of piglets derived from in vitro fertilization of pig oocytes matured in vitro. Theriogenology 1993; 39:1303-1311.
- Wang WH, Abeydeera LR, Cantley TC, Day BN. Effect of oocyte maturation media on development of pig embryos produced by in vitro fertilization. J Reprod Fertil 1997; 111:101-108.

## 既知組成培地によるウシ体外成熟・体外受精卵の体外培養

桃沢健二・福田芳詔（北里大・獣医畜産）

〔目的〕 ウシ体外成熟・体外受精卵の優れた既知組成培地の開発を目的にウシ体外受精卵の胚盤胞への発生と孵化に及ぼす m-KSOM/aa への RD 培地添加の効果および既知組成 m-KSOM/aa + RD 培地中のイノシトール濃度の効果について検討した。〔方法〕 ウシ卵丘卵母細胞複合体は、屠場卵巢から吸引採取し、卵細胞質が均一なもの（均一）と不均一なもの（不均一）に分け、24 時間成熟培養を行った。媒精は、受精培地にイオノホア・ヘパリン前培養法により受精能獲得誘起した精子を導入した後、体外成熟卵子を導入して行った。媒精後 6 時間に卵子は卵丘細胞を除去して発生培地に移し換え、39 ℃、5 % CO<sub>2</sub>・5 % O<sub>2</sub>・90 % N<sub>2</sub> の気相下で培養した。実験 1：1 % BSA 含 m-KSOM/aa + 10 % RD（実験区）、1 % BSA 含 m-KSOM/aa（対照区）、実験 2：BSA の代わりに 0.1 % PVP + 0.5mM クエン酸 Na を添加した m-KSOM/aa + 10 % RD（実験区）、1 % BSA 含 m-KSOM/aa + 10 % RD（対照区）、実験 3：イノシトール濃度を 11.7、23.4、46.8、70.2 および 93.6 μ M にした 0.1 % PVP + 0.5mM クエン酸 Na 含 m-KSOM/aa + 10 % RD、を検討した。〔結果〕 実験 1：不均一では、実験区の胚盤胞への発生率(64.0 %)および孵化率(82.2%)は、それぞれ対照区の 53.9 %と 71.0 %を上まわったが差がなかった。均一では、実験区の胚盤胞への発生率(35.1%)は対照区(40.6%)と差がなかったが、孵化率(90.9%)は対照区(67.9%)より有意に高かった( $P<0.01$ )。実験 2：不均一では、実験区の胚盤胞への発生率(50.5%)と孵化率(19.6%)は、それぞれ対照区の 64.0%と 82.2%より有意に低下した( $P<0.01$ )。均一では、実験区の胚盤胞への発生率(33.3%)は対照区(35.1%)と差がなかったが、孵化率(20.0%)は対照区(90.9%)より有意に低かった( $P<0.01$ )。実験 3：不均一では、イノシトール濃度が 70.2 μ M の時に、最も高い胚盤胞への発生率(56.9%)と孵化率(45.5%)が得られ、孵化率はイノシトールを追加しなかった 11.7 μ M 区(19.6%)より有意に高かった。均一では、胚盤胞の発生率は各イノシトール濃度間に有意差はなかった。

## ヒト胚の体外培養－妊娠率向上への試み－

雀部 豊（東邦大学医学部第1産科婦人科）

1978年7月25日、世界初の体外受精児ルイーズ・ブラウン誕生から21年が経った。21年間に生殖補助技術 Assisted Reproductive Technology (ART) は急速に普及し、1999年3月現在本邦では448の施設が体外受精・胚移植(IVF-ET)およびGIFTの臨床実施を日本産科婦人科学会に登録しており、1997年度には新鮮胚を用いた治療31,959周期、顕微授精を用いた治療16,333周期が行われた<sup>1)</sup>。日本におけるヒトIVF-ETは、すべて採卵同一個体移植である。調節過排卵刺激後に採卵を行い、通常の媒精または顕微授精を行う。その後2~3日間の体外培養を行い、3個以下の4~8細胞期胚を子宮内に移植する。1997年に東邦大学で行われた新鮮胚を用いた治療174周期と顕微授精を用いた治療122周期の成績は、移植当たりの妊娠率がそれぞれ30.9%, 32.0%であった。この妊娠率は我々にとって決して満足のいくものではなく、世界中のART施設において妊娠率向上を目指した様々な取り組みが行われている。

その取り組みのひとつとして胞胚移植が挙げられる。分割期胚を非生理的環境である子宮内に移植しても、15~30%の妊娠率を得られることは、ヒトIVF-ETのひとつの特徴である。しかし、他の哺乳動物のIVF-ETを検討するまでもなく、桑実胚または胞胚を子宮に移植する方がより生理的であり妊娠率の向上が期待できる。胞胚移植の初期の試みとして、Boltonらは1989年に317個の胚をEarle's balanced salt solutionで培養し、55個(17%)が拡張期胞胚に到達したと報告している<sup>2)</sup>。我々も1991年に82個の胚をHuman Hubal Fluid (HTF)とHam's F10で培養し、それぞれ15%と27%が胞胚期に到達したことを報告した<sup>3)</sup>。胚は発育につれて代謝に必要な物質が変化していくことが知ら

れているが、この当時は1種類の培養液で胞胚期まで培養しており、胚の代謝の変化に対応できていなかったことが成績不振の原因と考えられる。その後共培養システムにより高い胞胚発生率が報告されたが、手技が複雑であり普及には至らなかった。1998年Gardnerら<sup>4)</sup>は新しい培養システムによる66%の胞胚発生率と45%の着床率(胎児心拍確認による)を報告した。彼らが用いた培養システムとは、compaction前後で組成の異なる培養液 sequential culture media (compaction前:G1, 後:G2)を用いる方法である。G1はヒト卵管内液の組成、G2は子宮内液の組成を参考に作成されており、より生理的な体外環境を実現したものである。G1&G2以外にも数種類のsequential mediaが開発されており、東邦大学では現在のところHTFとD3 medium(両者ともIrvine Scientific)を組み合わせたsequential mediaを用いている。そして、過去3回以上の反復ART不成功例を中心に採卵4または5日目に胚移植を行い移植当たり40%の妊娠率を得ている。

胞胚移植の優れている点として、(1)胚をより生理的環境に移植できる。(2)培養期間延長により胚の選別が期待でき、より生存性の高い胚を移植することができる。(3)2個以下の胚移植で十分に高い妊娠率が期待でき、以前のように3個以上の胚を移植したために起こる多胎妊娠を防ぐことができる。(4)着床前診断症例において、胚生検から移植までの時間的余裕を増やすことができる。などが挙げられる。

この胞胚移植に対して、1998年Scottら<sup>5)</sup>は前核期胚を25点満点で評価して、15点以上の胚を媒精24~26時間後に移植を行い、症例当たり71%の妊娠率を報告している。彼らは、媒精16-18時間後に雌雄前核の近接度、核小体の極性、細胞質の状態を15点満点で評価し、さらに媒精22~26時間後に核膜崩壊や第1卵割が起きている胚にさらに10点を追加し、合計25点満点で評価している。彼らは、胚の長期体外培養の有害性を指

摘し、前核期胚の評価で生存性の高い胚を選別可能であると主張している。Edward ら<sup>6)</sup>は、ヒト IVF-ETにおいては、生存性の高い胚を選んで移植することが最も重要であり、現在のところ、2つのアプローチ(胞胚移植と前核期胚の評価)を同時に用いる必要があると主張している。

これら非侵襲的な方法に対して、胚生検を行い、割球の染色体を FISH 法で調べる侵襲的なアプローチも検討されている。1997 年 Gianaroli ら<sup>7)</sup>は、女性が 38 才以上または過去に 3 回以上の反復 IVF 不成功例の IVF28 周期において、採卵 3 日目に割球生検を行い X,Y,13,18,21 染色体に特異的な FISH プローブを用いた着床前診断を行っている。61 個の胚を診断した結果、55%に染色体異常を認め、コントロールの 11.9%に対して 28.0% の着床率が得られた報告している。現在日本では、日本産科婦人科学会から着床前診断の臨床研究の許可を得ている施設は無く、この方法は臨床的に用いることができない。我々は基礎的検討として、Gianaroli らが用いた X,Y,13,18,21 染色体に加えて、16,22 染色体に特異的な FISH プローブを用いて 20 個の胚を診断した<sup>8)</sup>。その結果、18 個(90%)の胚を正しく診断できることを示した。

ヒト胚は他の哺乳動物の胚と比較して染色体異常率が高いことが知られている<sup>6)</sup>。ヒト IVF-ET において妊娠率向上に最も寄与するのは、生存性の高い胚を効率よく選別することにあると考える。本演題では、そのための新しい取り組みをいくつか取り上げたが、現在多くの施設で胞胚移植が試みられており、妊娠率の向上が学会等で報告されている。今後、胞胚移植に前核期胚の評価を組み合わせた方法も検討を進めていく必要がある。また将来的には、侵襲的ではあるが胚の染色体を診断する方法も有望と考える。

## 文 献

- 1) 藤本征一：平成 10 年度 診療・研究に関する倫理委員会報告(平成 9 年度分の体外受精・胚移植等の臨床実施成績および平成 11 年 3 月における登録施設名). 日産婦誌 51(6), 361-94, 1999
- 2) Bolton VN, Hawes SM, Taylor CT et al.: Development of spare human preimplantation embryos in vitro : an analysis if the correlations among gross morphology, cleavage rates, and development to the blastocyst. J In Vitro Fertil Embryo Transfer 6(1) 30-5, 1989
- 3) 雀部 豊, 安部裕司, 白井 彰 他：ヒト体外受精卵の後期胞胚への発達過程について. 第 32 回哺乳動物卵子学会, 東京, 1991, 4
- 4) Gardner DK, Vella P, Lane M et al.: Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfer. Fertil Steril 69(1) 84-8, 1998
- 5) Scott LA, Smith S: The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. Hum Reprod 13(4), 1003-13, 1998
- 6) Edwards RG, Beard H: Is the success of human IVF more a matter of genetics and evolution than growing blastocysts. Hum Reprod 14(1), 1-6, 1999
- 7) Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP et al.: Preimplantation genetic diagnosis increases the implantation rate in human in vitro fertilization by avoiding the transfer of chromosomally abnormal embryos. Fertil Steril 68(6), 1128-31, 1997
- 8) Sasabe Y, Katayama KP, Nishimura T et al.: Preimplantation diagnosis by fluorescence *In situ* hybridization using 13-, 16-, 18-, 21-, 22-, X-, and Y-chromosome probe. J Assist Reprod Genet 16(2) 92-5, 1999