

第19回 動物生殖工学研究会  
プログラム・抄録集

平成18年12月2日(土)

北里本館 大会議室

---

## プログラム

開会挨拶

会長 横山峯介

### 一般講演

- 1 遺伝子改変マウス精子の体外受精系における ZIP の効果  
川瀬洋介<sup>1</sup>・立部貴典<sup>1</sup>・羽仁俊夫<sup>1</sup>・立石浩己<sup>1</sup>・寺社下浩一<sup>1</sup>・鈴木宏志<sup>2,3</sup>  
(<sup>1</sup>樹中外医学研究所、<sup>2</sup>帯広畜産大学原虫病研究センターゲノム機能学分野、<sup>3</sup>東大院・医学系研究科発生・医療工学)
- 2 低受精能を示すトランスジェニックマウス由来精子を用いたガラス化保存卵子の体外受精におけるレーザー透明帯穿孔法の適用  
安齋政幸<sup>1)</sup>、西脇 恵<sup>2)</sup>、柳 美穂<sup>3)</sup>、中島竜之<sup>3)</sup>、金子武人<sup>4)</sup>、松本和也<sup>1,2)</sup>、中瀧直己<sup>4)</sup>、入谷 明<sup>1,2)</sup>  
(近畿大学先端技術総合研究所<sup>1)</sup>近畿大学生物理工学部<sup>2)</sup>アーク・リソース(株)<sup>3)</sup>、熊本大・CARD・資源開発分野<sup>4)</sup>)
- 3 ラット凍結精子からの産子作出を目的とした生殖工学技術の開発  
金子武人、木村信哉、今川隆成、中瀧直己  
(熊本大学生命資源研究・支援センター 動物資源開発研究部門資源開発分野)
- 4 ウシにおける体外胚生産系の確立に関する研究  
桃沢健二(北里大・獣医畜産)
- 5 牛肉の生産履歴を探索的場理子((独)家畜改良センター)
- 6 盲導犬適性と性格関連遺伝子多型との関連性  
柳本(植田) 佳子<sup>1</sup>・李 晶淵<sup>1</sup>・諏訪 義典<sup>2</sup>・鈴木 宏志<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>帯広畜産大・原虫病研セ・ゲノム機能学、<sup>2</sup>(財)北海道盲導犬協会、<sup>3</sup>東大院・医学系研究科・発生・医療工学)
- 7 イヌ GV 期卵母細胞および胚のガラス化保存の試み  
阿部靖之<sup>1</sup>、諏訪義典<sup>2</sup>、李 東洙<sup>1</sup>、金 相根<sup>3</sup>、鈴木宏志<sup>1,4</sup>  
(<sup>1</sup>帯畜大・原虫研セ・ゲノム機能学、<sup>2</sup>(財)北海道盲導犬協会、<sup>3</sup>忠南大・獣医、<sup>4</sup>東大院・医学系研究科・発生・医療工学)

特別講演

染色体工学・発生工学的手法を用いた  
筋ジストロフィーモデルマウスの作成と病因解析  
花岡 和則先生  
(北里大学理学部生物科学科)

総 会

懇 親 会

---

## 遺伝子改変マウス精子の体外受精系における ZIP の効果

川瀬洋介<sup>1</sup>・立部貴典<sup>1</sup>・羽仁俊夫<sup>1</sup>・立石浩己<sup>1</sup>・寺社下浩一<sup>1</sup>・鈴木宏志<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> 榊中外医科学研究所

<sup>2</sup> 帯広畜産大学 原虫病研究センター ゲノム機能学分野

<sup>3</sup> 東京大学大学院 医学系研究科 発生・医療工学講座

### 【目的】

マウス精子の凍結保存は、遺伝子改変マウスを作出・維持している多くの施設において、遺伝子資源の保存法として利用されている。しかしながら、作出される多くの遺伝子改変マウスの遺伝的背景は C57BL/6J であり、C57BL/6J マウスをはじめとした近交系に由来する精子における凍結融解後の受精率は極めて低いことが課題となっていた。我々は、この問題の克服にはピエゾマイクロマニピュレーターを用いた透明帯部分切開術(ZIP: Zona Incision by Piezo- micromanipulator)を併用した体外受精が有効であることを報告した(Kawase et al., 2002)。今回、凍結保存された遺伝子改変マウス精子からの産仔作出に ZIP 法を併用した体外受精を利用した実施例について報告する。さらに、ZIP 法が凍結融解精子を用いた体外受精のみならず、通常の体外受精では受精卵がほとんど得られない遺伝子改変マウス由来精子を用いた体外受精系にも適用した実施例を報告する。

### 【材料および方法】

精子は成熟雄マウスの精巣上体尾部から採取し、Nakagata & Takeshima の方法(1993)に従い凍結融解を行った。卵子は、成熟雌マウスに過排卵処理を施し、hCG 投与後約 15 時間に採取して、ヒアルロニダーゼ処理によって卵丘細胞の除去を行った。ZIP は、既法(Kawase et al., 2002)に従って行った。つまり、内径約 5  $\mu\text{m}$  のガラスピペットの先端 (blunt-end) を透明帯に軽く触れ、piezo のパルス (speed: 1, intensity: 2) を与えながらピペットを移動させることにより、 $\pi r / 6 \mu\text{m}$  の長さの切開を加えた。体外受精は、凍結精子を融解後 TYH 培地で約 0.5 時間インキュベートを行い、この精子懸濁液に ZIP を施した卵子を移すことによって行った。媒精後 4~5 時間後に、卵子を 100  $\mu\text{M}$  EDTA 添加 Whitten's 培地に移し換え、媒精後 24 時間における 2 細胞期胚への発生を観察した。さらに、得られた 2 細胞期胚を受容雌の卵管内に移植し、産仔への発生能についても検討した。

### 【結果および考察】

凍結保存された 15 系統の遺伝子改変マウス精子の ZIP を併用した体外受精による 2 細胞期胚への発生率は、22-74% であり、当施設では凍結保存していた精子から産仔を得る際、積極的に ZIP を併用した体外受精が利用されている。この 15 系統の内、4 系統について透明帯に切開を施していない卵子を用いた体外受精と比較したところ、3 系統において ZIP を用いることで有意に体外受精率を向上させることが可能であった。残りの 1 系統は透明帯に切開を施していない実験区で得られた受精卵から産仔を得る

ことができなかつたのに対し、ZIPを施した実験区からは産仔を得ることができた。

一方、通常の体外受精では受精卵がほとんど得られない遺伝子改変マウス 2 系統の体外受精に ZIP を併用した場合、体外受精率を 2% から 45%、1% から 22% に有意に向上させることが可能であった。さらに、得られた受精卵を受容雌に移植したところ、産仔を得ることも可能であった。

以上のことから、ZIP を併用した体外受精は受精率の低い遺伝子改変マウスの体外受精成績を向上させ、遺伝子改変マウスの生産・維持・保存に対して、効果的なツールであることが示された。さらに、ピエゾマイクロマニピュレーターシステムを持ち合わせている研究室においては、ZIP 法を用いることで、透明帯を部分的に穿孔するために新たに 500 万円以上する高価なレーザーシステム装置の導入を必要としないことから ZIP 法が有効なツールであると言える。

【文献】

Nakagata N, and Takeshima T. (1993): *Exp Anim* 1993; 42:317-320.

Kawase, Y., Iwata, T., Ueda, O., Kamada, N., Tachibe, T., Aoki, Y., Jishage, K. and Suzuki, H. (2002): *Biol. Reprod.*, 66, 381-385.

Kawase, Y., Kamada, N. and Suzuki, H. (2002): *J. Mamm.Ova. Res.*, 19, 26-31.

---

低受精能を示すトランスジェニックマウス由来精子を用いた  
ガラス化保存卵子の体外受精におけるレーザー透明帯穿孔法の適用

安齋政幸<sup>1)</sup>、西脇 恵<sup>2)</sup>、柳 美穂<sup>3)</sup>、中島竜之<sup>3)</sup>、金子武人<sup>4)</sup>、松本和也<sup>1,2)</sup>、  
中瀬直己<sup>4)</sup>、入谷 明<sup>1,2)</sup>

近畿大学先端技術総合研究所<sup>1)</sup>、近畿大学生物理工学部<sup>2)</sup>  
アーク・リソース (株)<sup>3)</sup>、熊本大・CARD・資源開発分野<sup>4)</sup>

【目的】現在、遺伝子操作マウスの系統維持には、胚・配偶子の凍結保存が有効な技術ではあるが、C57BL/6系をバックグラウンドにもつ精子の凍結保存、個体作製や繁殖性の低いトランスジェニックマウス系統をして加齢に伴う低運動能精子には、その精子の凍結保存はもとより、体外受精による大量な初期胚の確保が困難な場合もある。本実験では、熊本大・CARDとアーク・リソース(株)で共同開発された、透明帯穿孔卵子をガラス化保存した状態で輸送し加温(融解)後、低受精能トランスジェニックマウスとの体外受精を行い受精卵の作出を検討した。

【材料および方法】透明帯穿孔卵子の作製には、C57BL/6J(日本クレア)を用いた。常法により過剰排卵処置を施した未受精卵を0.1%ヒアルロニダーゼ処理にて卵丘細胞を除去後、レーザー装置を用い透明帯に穿孔(直径約12 $\mu$ m)処置を施し、作製した透明帯穿孔卵子は簡易ガラス化法にて保存を行い、近畿大学先端技術総合研究所へ輸送した。一方、体外受精に供する遺伝子操作マウス雄は、低受精能を示し、繁殖・育成率の低い、トランスジェニックマウス(C57BL/6-Tg(UCP/fad2)U8系統)を用いた。透明帯穿孔卵子を加温後、体外受精は豊田らの方法に準じて行い、受精能の確認ならびに2細胞期胚への発生を確認した。

【結果】凍結した透明帯穿孔卵子の加温(融解)成績は、90%以上の回収率、80%以上の生存率であった。体外受精率は、60%(55/91)であり、透明帯穿孔を施していない体外受精成績(11%(81/768))と比較して差が認められた( $P<0.01$ )。体外受精によって得られた2細胞期胚を再びガラス化保存しその一部の胚を加温操作し、受容雌へ移植した結果、透明帯穿孔卵子区と透明帯穿孔無処置卵子区で産子への発生率に差はみられず(13%(6/45) vs. 16%(6/38))。さらに、双方の実験区の全ての産子において導入遺伝子のゲノムへの組込みが確認された。

以上の結果より、透明帯穿孔を行った卵子を用いることによって、低運動能・低受精能を示すトランスジェニックマウス由来精子を用いた体外受精による受精卵の大量作出が可能であることが示唆された。

【参考文献】

- Anzai M, et al., (2006), J. Reprod. Develop. 52:601-606.  
Kaneko T, et al., (2006), Reprod. Med. Biol. in press.  
Nakao K, et al., (1997), Exp. Anim. 46:231-234.  
Saeki K, et al., (2004), Proc. Natl. Acad. USA, 101:6361-6366.  
立部ら., (2004), 静岡実験動物研究会会報, 30:6-7.  
豊田ら., (1971), 家畜繁殖誌, 16:147-151.

## ラット凍結精子からの産子作出を目的とした生殖工学技術の開発

金子武人、木村信哉、今川隆成、中潟直己  
熊本大学 生命資源研究・支援センター  
動物資源開発研究部門 資源開発分野

精子による凍結保存は、増加するミュータント、コンジェニックおよびトランスジェニックラット系統を遺伝資源として効率的に保存することが可能である。しかしながら、ラット精子においてもマウス同様に、凍結操作により受ける傷害は系統間あるいは個体間で異なる。ラット精子からの産子作出において生殖工学技術の利用は不可欠であり、特に凍結操作により低受精能を示す精子においてその重要性は大きい。現在、私たちは低受精能精子からの産子作出を目的とし、レーザーを用いた卵子透明帯穿孔法 (LM) および卵細胞質内精子注入法 (ICSI) の技術開発および改良を行っている。

私たちは、マウス凍結融解精子において透明帯穿孔卵子を用いることで受精率が向上することを報告した (Kaneko et al., 2006)。そこで、ラットにおいて透明帯穿孔卵子を作製後、凍結融解精子と体外受精した結果、Zona-intact 卵子に対して受精率の向上 (LM vs. Zona-intact = 50% vs. 29%) が認められた。

一方、ICSI を用いてラット凍結融解精子を導入した卵子は、15% が胚盤胞へ発生し、移植した 2 細胞期胚の 9% が産子にまで発生した。さらに、Tris-EDTA 溶液 (Kaneko and Nakagata, 2006) を用いて簡易凍結保存した精子を ICSI により導入した。その結果、受精した卵子の 40% が胚盤胞へ発生し、移植した 2 細胞期胚の 11% が産子にまで発生した。

このことから、凍結保存したラット精子が融解後低受精能であった場合においても、透明帯穿孔卵子や ICSI を用いることで産子の作出が可能であることが確認できた。これらの技術は、今後のさらなる検討によりラットバイオリソースの基盤技術としての利用が期待される。

## ウシにおける体外胚生産系の確立に関する研究

桃沢健二  
(北里大・獣医畜産)

### はじめに

今日、家畜等に牛においては、体外胚生産 (IVP) 系が、家畜繁殖の重要な技術となっている。この IVP 系は、体外で排卵卵子と同等の成熟卵子を作出する体外成熟 (IVM)、体外で正常な受精卵を作出する体外受精 (IVF) および体外で受精卵を培養して胚盤胞を作出する体外胚培養 (IVC) からなる。したがって、IVP の確立とは、1) 正常な成熟卵子を作出する IVM、2) 正常な受精卵を作出する IVF、3) 正常な胚盤胞を作出する IVC の3つを確立することである。なかでも IVM、IVF、IVC にはそれぞれ最適な培地が求められる。しかし、IVM-IVF-IVC および ET を一貫して検討した IVP 系の研究はない。

本研究は、高い耐凍性を持ち、ET 後正常な産子へ発生する胚盤胞へ、凍精卵の 50% 以上が発生するウシ IVP 系の確立に関する研究である。

### 1. ウシ体外受精 (IVF) 系の確立

1) イオノホア・ヘパリン・前培養法による受精能獲得誘起で、受精能獲得精子を安定して得るための培地について検討した。その結果、BO を修正し、改良した HEPES-BO という、性状の安定した受精能獲得精子と 7500 精子(150 精子/ $\mu$ l) の低い精子数でも、高い単精子受精率が得られることを明らかにした。2) 微小滴法においても、低い精子濃度で受精能獲得精子の運動性が維持され、高い受精率が得られる IVF 系の確立を目的に、受精と受精能獲得精子の運動性に及ぼす受精培地中カフェイン濃度の影響について検討した。その結果、受精能獲得精子をカフェイン不含の受精培地に媒精した時 (最終カフェイン濃度 0.27~0.35 mM) の受精率は、5 mM カフェインを含む受精培地よりも有意に高くなった。受精の場の最終カフェイン濃度を 0.02~0.03 mM に低めても有意な改善はなかった。2 mM 以上のカフェインを含む培地に導入した受精能獲得精子の運動性は、カフェイン不含の受精培地に導入した時よりも有意に低下した。よって、微小滴法では、受精培地はカフェイン不含が適することを明らかにした。

### 2. 体外成熟培養 (IVM) 系の確立

ウシ IVM 培地には、ウシ卵胞液 (bFF) やウシ胎仔血清 (FBS) が添加されるが、これらを超遠心分離することにより、卵子成熟に有効な成分をある分画に集めることができるかを検討した。超遠心分離で bFF は上から 1st~3rd、FBS は上から 1st~4th の分画を得た。bFF と FBS の 4th を除く各 3 分画を検討した結果、胚盤胞への発生率は、bFF 分画については、卵細胞質が均一な卵母細胞 (以下、均一) では、1st と 2nd が bFF より有意に高く、卵細胞質が不均一な卵母細胞 (以下、不均一) では、2nd が bFF より有意に高かった。また、FBS 分画については、均一では 1st が FBS より有意に低く、2nd と 3rd は FBS と差がなく、不均一では 3rd は FBS より有意に高かった。よって、成熟培地へ添加するのは、いずれも bottom (bFF-3rd, FBS-4th) 分画に接す



る bFF-2nd 分画か FBS-3rd 分画が有効であることを明らかにした。

### 3. 体外胚培養系 (IVC) の確立

ウシ体外受精卵/胚培養用の半既知組成培地 (ウシ血清アルブミンを含む培地をこのように呼ぶ) として、マウス胚発生培地の KSOM/aa を基に改良した mKSOM/aa をベースにして、この半既知組成培地の既知組成化を目指した。胚盤胞への発生率に及ぼす 1) mKSOM/aa への RD 培地添加の効果、2) 10%RD・mKSOM/aa の既知組成化の影響、3) 既知組成 10%RD・mKSOM/aa 中の最適イノシトール濃度、4) 既知組成 RD・mKSOM/aa の最適 RD 濃度、5) 既知組成 20%RD・mKSOM/aa への N-アセチル D グルコサミンの最適添加濃度、6) 既知組成 10~20%RD・mKSOM/aa で作出した胚盤胞の耐凍性と産子への発生能について検討した。

その結果、1) 10%RD・mKSOM/aa はウシ体外受精卵の胚盤胞への発生率を改善した。2) BSA を PVP とクエン酸 Na に置き換えた既知組成 10%RD・mKSOM/aa の胚盤胞への発生率は有意に低下したが、イノシトール濃度を  $70.2 \mu\text{M}$  に高めると孵化率が有意に改善された。3) さらにこの培地の RD 濃度を 20% に高めると胚盤胞への発生率が高まった。4) さらにこの培地への  $1.0 \text{ mM}$  N-アセチル D-グルコサミンの添加は、胚盤胞への発生率を BSA を含む半既知組成 10%RD・mKSOM/aa まで高めた。5) 既知組成 10~20%RD・mKSOM/aa を基礎とした発生培地で作出した胚盤胞は耐凍性が高く、移植後正常な生存産子へ発生した。

### 4. ウシ胚盤胞の細胞外溶液を伴わないガラス化法の確立

胚と平衡後の細胞外ガラス化液を伴わない新しいガラス化法を検討した。供試胚 20 個すべてが、加温・ガラス化液除去後の培養開始時に形態的に無傷で、培養 48~96 時間後に孵化した。ガラス化超低温保存した 22 個のうち、ガラス化の順に加温・ガラス化液除去した 3 個すべてが形態的に無傷で、これらの胚の移植を受けた 3 頭の受胎牛のうち、1 頭が正常な子牛を自然分娩した。よって、この細胞外溶液を伴わないガラス化法の超低温保存法としての有効性を明らかにした。

本研究により確立されたウシにおける高度化した IVP 系およびこの IVP 系で生産した胚盤胞のガラス化超低温保存法は、ウシ生殖工学に貢献すると考えられる。

## 牛肉の生産履歴を探る

的場 理子  
独立行政法人 家畜改良センター

### 1. 背景

平成 13 年 9 月に初めて日本で BSE（牛海綿状脳症）が発生した。BSE の発生に伴って牛肉の安全性に対する消費者の関心が高まった。それを受けて牛の誕生から移動、流通等の記録が追跡できるトレーサビリティシステムが構築された。

### 2. 法律の整備

平成 15 年に「牛肉の個体識別のための情報の管理及び伝達に関する特別措置法」（牛トレーサビリティ制度）が制定され、牛の耳標装着、生年月日、移動履歴が義務となった。平成 16 年 12 月からは誰でも牛肉から牛の生産履歴を調べることが可能となった。

### 3. トレーサビリティシステムとは

牛肉と牛の情報は次のように管理される。

(1) 日本生まれの子牛と輸入牛に、「10桁の個体識別番号のついた耳標」を装着する。

(2) 生産者等の届け出により、個体識別台帳（\*）のデータを記録する（2003年12月）。

（家畜改良センターが管理）。

(3) と畜後の牛肉の流通における移動を記録する（2004年12月）。

(4) 食肉店やスーパーの牛肉ラベルに個体識別番号が表示される。

\* 個体識別番号、生年月日（または輸入日）、性別、品種、母牛の個体識別番号、飼養地、移動年月日、移動情報（譲受、譲渡、死亡、と畜、輸出）、と畜場名、連絡先等

### 4. 実際の検索方法

コンピュータのインターネット検索が可能である。

- ・携帯電話 <http://www.nlbc.go.jp/mobile/>
- ・Web <http://www.nlbc.go.jp/>

独立行政法人 家畜改良センター 個体識別部  
〒961-8511 福島県西白河郡西郷村小田倉字小田倉原1  
E-mail: [id@nlbc.go.jp](mailto:id@nlbc.go.jp) Tel: 02-48-48-0596



## 盲導犬適性と性格関連遺伝子多型との関連性

○柳本 (植田) 佳子<sup>1</sup>・李 晶淵<sup>1</sup>・諏訪 義典<sup>2</sup>・鈴木 宏志<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>帯広畜産大・原虫病研セ・ゲノム機能学

<sup>2</sup>(財)北海道盲導犬協会

<sup>3</sup>東大院・医学系研究科・発生・医療工学

現在、我が国では、盲導犬希望者約4800人に対し、実働盲導犬約950頭と、慢性的な盲導犬不足が続いており、盲導犬の十分な確保が重要な課題となっている。我々はこの問題の克服のため、生殖工学を応用した効率的繁殖についての研究を進めているが、訓練開始前における盲導犬としての適性把握は、その効率的育成に大きく寄与するものと考えられる。ヒトにおいては、情動に深く関わっているとされる脳内神経伝達物質ドーパミン・セロトニン・ノルアドレナリンに關係する物質をコードする遺伝子の多型と気質・精神病との関連性が数多く報告されている。そこで我々は、既にイヌで多型解析がなされている dopamine receptor D4; DRD4 exon I (short, long) と III (435, 447a, 447b)・catechol O-methyltransferase: COMT (G39A, G216A, G482A)・monoamine oxidase B: MAOB (T199C)・5-hydroxytryptamine receptor 1B; 5-HTR1B (A157C, G246A, C660G, T955C) の遺伝子多型と盲導犬適性との関連性を検討した。その結果、COMT 遺伝子の G216A と G482A 多型、そして 5-HTR1B 遺伝子の A157C と G246A 多型において盲導犬群 (COMT: n=100, 5-HTR1B: n=122) と非盲導犬群 (COMT: n=68, 5-HTR1B: n=90) との間に有意な差が認められた ( $p < 0.05$ )。盲導犬において、環境適応性や集中力などが要求される場合、これらの遺伝子の影響を大きく受ける可能性があると推測される。今後は、候補遺伝子を追加するとともに、関連解析などによる盲導犬に適する遺伝子型の同定を行う予定である。さらに、遺伝学的背景に基づいた繁殖犬の選別、あるいは適切な種雄・台雌の組合せを選択することで、候補犬の適性試験合格率の向上へとつながる効率的な盲導犬育成を目指したいと考える。

## イヌ GV 期卵母細胞および胚のガラス化保存の試み

阿部靖之<sup>1</sup>, 諏訪義典<sup>2</sup>, 李 東洙<sup>1</sup>, 金 相根<sup>3</sup>, 鈴木宏志<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> 帯畜大・原虫研セ・ゲノム機能学

<sup>2</sup> (財)北海道盲導犬協会

<sup>3</sup> 忠南大・獣医

<sup>4</sup> 東大院・医学系研究科・発生・医療工学

【目的】イヌにおいて、生殖工学的研究は世界的にも立ち遅れており、様々な生殖工学技術の開発が望まれている。そこで、本研究では効率的な個体作出を行う上で重要な技術の一つである、卵母細胞および胚のガラス化保存法を検討した。また、ガラス化・融解後の胚を非外科的にレシピエント個体へ移植し、産子獲得を試みた。【方法】実験1：屠場由来の卵巣から細切法により GV 期卵母細胞を採取し、2つのガラス化法を用いて凍結保存した。1) DAP213 法：GV 期卵母細胞を 1 M DMSO 溶液に 1 分間暴露した後、5  $\mu$ l の溶液とともにクライオチューブに移し、氷上にて 5 分間冷却した。その後、冷却した 2 M DMSO, 1 M アセトアミド, 3 M プロピレングリコール溶液 (DAP213) を 95  $\mu$ l 添加し、5 分間静置した後液体窒素へ投入した。保存後、0.25 M スクロース溶液を 950  $\mu$ l 添加し、PB1 で洗浄した。2) Step-wise 法：5, 10 および 20% エチレングリコール (EG) 溶液に、それぞれ 5, 2 および 2 分間暴露した後、30% EG, 0.5 M スクロース溶液に 1 分間暴露し、クライオトップに載せ液体窒素へ投入した。保存後、0.5, 0.25 および 0.125 M スクロース溶液にそれぞれ 1 分間暴露した後、PB1 で洗浄した。実験2：人工授精後 7-10 日のドナー個体から抽出した子宮・卵管を PB1 で灌流し、胚を採取した。胚は、Step-wise 法によりガラス化保存・融解し、ヒト用膀胱鏡を用いて非外科的に妊娠雌へ移植した。【結果】GV 期卵母細胞をガラス化保存した結果、DAP213 区では卵丘細胞が剥離したものや、細胞膜が崩壊した卵母細胞が観察されたが、Step-wise 区では卵丘細胞が密に付着し、正常な形態を維持した卵母細胞が多く観察された。一方、胚を回収およびガラス化保存 (Step-wise 法) した結果、8 細胞-拡張胚盤胞期の胚が子宮および子宮・卵管接合部位から得られ、融解後のガラス化胚の多くは新鮮胚と同様な形態であった。また、7 個のガラス化胚を移植し、11 日後のエコー検査では黄体 5 個に対し胎嚢 10 個が観察された。これらの結果より、イヌ GV 期卵母細胞および胚のガラス化保存には、Step-wise 法が有効であり、ヒト用膀胱鏡を用いることで、非外科的な移植が可能であることが示された。

染色体工学・発生工学的手法を用いた筋ジストロフィー  
モデルマウスの作成と病因解析

北里大学理学部生物科学科・教授 花岡 和則

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) は、骨格筋の変成と壊死を主病変とし、臨床的には進行性の筋力低下を特徴とする、新生男児 3500 人に 1 人の割合で生じる X 染色体性劣性遺伝病である。この疾患の原因遺伝子である *DMD* 遺伝子はヒトの遺伝子の中で最も大きく、2.5Mb のゲノムサイズを持ち (マウスでは 2.4Mb)、7 つのプロモーターおよび選択的スプライシングにより、分子量の異なる多数のアイソフォームが組織特異的に産生されることが報告されている。DMD は、427kDa のジストロフィンタンパクの異常により発症することが明らかにされ詳細な研究がなされているが、他のジストロフィンアイソフォームの生体内での機能・生理的意義についてはほとんど不明である。DMD 患者では、ジストロフィン遺伝子領域の様々な部位に点突然変異、欠失や重複などの変異が生じており、ジストロフィンアイソフォームの発現は、その変異の状況に対応して患者毎に異なっていると思われる。

本研究は、染色体操作技術や発生工学技術を用いることにより、ヒトジストロフィン遺伝子領域を保持した新しい筋ジストロフィーモデル動物の作成し、根本的治療法を開発するための基本技術の確立を目標とするものである。まず、ヒト培養細胞から分離したジストロフィン遺伝子領域を含む X 染色体断片を、既に作成されているヒト人工染色体 HAC-SC20 に Cre-loxP システムを利用して転座させた人工染色体 HAC-DMD を作成し、マウス ES 細胞に導入しその発現を解析した。一方で、Cre-loxP システムを用いてジストロフィン遺伝子領域を完全に欠失したマウスを作成した (DMD-null マウス)。現在、DMD-null マウスに HAC-DMD を導入することにより、「ヒト」と「マウス」のジストロフィンをゲノムレベルで置き換えたマウスの作製に取り組んでいる。この実験系が確立すれば、DMD 患者個々のゲノム変異に対応したモデルマウスを作製することが可能になり、筋ジストロフィーの根本治療法の開発に極めて有用であるだけでなく、ヒトジストロフィンアイソフォームの機能解析にも有用な実験系となると期待できる。

本研究会では、研究の現状について報告するとともに、DMD-null マウスの解析によって明らかになった、ジストロフィンアイソフォームの機能についての知見も紹介する予定である。