

が示唆された。中間群と高陰性症状群、中間群と高陰性症状群との比較では、標準偏差、0度数ともに優位差はなかった。

考察：高陰性症状群では高陽性症状群と比較し、活動がスムーズに進まず、突然の制止と突発的な活動を繰り返していることを定量化した。Frith,CDらは陰性症状の病態を認知行動学的に、自発的活動の貧窮化と外的刺激に対する反応性の抑制欠如の2つの過程を仮定したがアクチグラフの測定はそれを支持するものであった。統合失調症患者には活動と制止において行動学的な精神病理があり、社会的な生活に適応できず、非生産的な生活を余儀なくされていることを客観的な定量化に基づき評価することができた。今後はアクチグラフを用いることにより、慢性期統合失調症に対するリハビリテーションの効果判定などへの応用も期待できる。

本学位論文は、アクチグラフを使用して統合失調症の陰性症状と陽性症状の定量的評価を行い、その認知行動学的特徴を明らかにすることにより、リハビリテーションの効果判定などへの応用可能性を示唆した臨床的意義の高い論文である。よって本論文は医学博士の学位論文に値すると判断される。

氏名	安 齋 政 幸 <small>あん さい まさ ゆき</small>
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	生 第 7 号
学位授与の日付	平成 18 年 9 月 15 日
学位授与の要件	学位規程第4条第2項該当
学位論文題目	マウス及びラットにおける生殖工学・発生工学的技術開発に関する研究
論文審査委員 (主 査)	教授 松 本 和 也
(副主査)	教授 細 井 美 彦
(副主査)	教授 佐 伯 和 弘

論文内容の要旨

実験動物の分野においては、研究に有用な動物を創出し育成すること、作り出された動物の系統の形質、遺伝的特性を変化させないように維持し、そしていつでも同じ形質をもつ動物を安定して生産することが重要である。このような育種・育成の過程で発見された突然変異マウスの多くは、現在病態もしくは症状モデルといわれている。一方、近年の遺伝子工学の目覚ましい進歩により、人為的に遺伝子を操作した様々な遺伝子改変動物の作出が可能になった。この技術の確立により、遺伝子の生体内における機能解析が可能となり、更に責任遺伝子が明らかで病因の明確な疾患モデルマウスを計画的に作出できる新たな可能性が開かれた。同時に、その技術を適用することで生殖細胞などの体外顕微操作が可能となり、そして体細胞クローン動物の作出に至るまで飛躍的に技術革新が計られている。現在、このような発生工学・生殖工学により作出される遺伝子改変マウスなどは膨大な数に昇っている。この状況は、2005年末の日本実験動物協同組合により報告された、国内生産販売数によっても明らかであり、それによると2004年度には、前回調査の2001年度と比較し45.1%増にあたる15,232匹の遺伝子改変マウスが生産・販売されている。また、日本のみならず世界各国において様々な疾患モデルマウスが作製され、遺伝子の機能を研究する重要な素材として用いられている。しかし、これら多量に生産されるマウスの維持や系統管理に関する環境が遅れていることが示された。特に、飼育管理に要するスペース、労力と費用などの観点から、発生工学的研究を支える周辺技術である生殖工学的研究技術の開発が急務となっている。そこで、本研究では、1) ガラス化保存法を用いた遺伝子改変動物の系統保存及び保存されたマウス卵子からの効率的な遺伝子改変マウスの作製の検討、2) 遺伝子改変マウスの胚・配偶子バンクのための基盤技術の普及、3) 核移植技術を用いたクローンマウス作出に関する検討を行った。

第2章では、発生工学的手法にて作出されたトランスジェニック動物の系統保存を初期胚のガラス化保存法を用いて検討した。さらにトランスジェニックマウス作製に掛かる作業の効率化を図るため、ガラス化保存法にて保存した卵子からのトランスジェニックマウスの作製を検討した。まず、トランスジェニックマウス2種類の系統を体外受精によって得られた2細胞期胚をガラス化保存により凍結を行い、それらを融解した結果、生存率に差はなくトランスジェニックマウス初期胚のガラス化保存が可能であることが示された。しかしながら、産仔への発生能についてはマウスの系統による差が生じたと考えられた。続いて、トランスジェニックラットでの初期胚のガラス化保存効果を検討した。その結果、トランスジェニックラット体外受精由来前核期受精卵を用いたガラス化保存による融解後の生存率は約40%とマウス初期胚のガラス化保存と比べて低率であった。融解後の正常な胚を移植した結果、体外受精により得られたトランスジェニックラット前核期受精卵における、産仔の獲得を世界で初めて成功させた。さらに、作出されたトランスジェニックラットから系統の再構成が可能であることが示された。次に、トラトランスジェニックマウスの作製をより効率的にすることを目的に、緩慢凍結保存

法に比べ簡易かつ短時間で操作の完了するガラス化保存法にて体外受精由来前核期受精卵の凍結保存を行い、融解後、それら受精卵を用いてトランスジェニックマウスの作製を検討した結果、遺伝子を注入した卵子の約71%が生存し、それらを移植したところ約14%の産仔を得た。サザンブロット解析から、得られた産仔の約12%がトランスジェニックマウスであること、そして、それらのトランスジェニックマウスでは導入遺伝子が発現していることを認めた。以上のことから、ガラス化法にて保存された体外受精由来前核期受精卵よりトランスジェニックマウスの作製が可能であることが世界で初めて明らかにされた。これらの結果、ガラス化保存技術を利用した、トランスジェニック動物の系統保存による胚・配偶子バンクやガラス化保存した初期胚を材料とした遺伝子改変動物の作製方法が確立された。今後この技術を普及させることで、動物実験に費やす時間の大幅な短縮と実験の簡略化が可能になるとと思われる。

第3章では、疾患モデル動物を研究材料とした胚・配偶子バンクを有機的に共同利用できる研究基盤を整備し、その実験システムを広く普及させることを目的に、使用する培養液や保存液をキット化且つ量産化の確立とその長期保存性の検討を行った。さらに、遺伝子改変マウスに広く用いられるC57BL/6系マウスのあらたな供給開発を目的とした体外受精ならびにガラス化保存による基礎的評価を行った。また、低受精能を呈すトランスジェニックマウス由来産仔獲得方法の確立を目的に、レーザー照射で作製した透明帯穿孔卵子を供試した体外受精卵の大量作出を試みた。その結果、胚・配偶子の凍結保存法の標準化の一環として、体外受精用TYH培地、胚操作用mW培地ならびに胚凍結保存用基礎培地PB1培地とそのガラス化保存溶液として1M DMSO、DAP213、0.25M Sucrose液の合計6種類を硝子アンプルに封入することによりキット化できることを明らかにした。また、それらに関するマニュアルを整備しホームページに公開した(<http://www.mitils.co.jp/site/index2.html>)。さらに、このキット作製に関するノウハウを外部試薬メーカーへ譲渡し量産化をはかり、その実験システムを基本技術として広く普及させることができた(http://www.mk-iatron.jp/products/06_04.html)。次に、国内において日本チャールスリバー(株)から新しく販売されることになったJAX|MICE C57BL/6Jマウスを生殖工学技術の検証を行ったところ、従来から生産されている他メーカーの系統と遜色なく使用可能であることを明らかにした(<http://www.crj.co.jp/3membr/12data/index.htm>)。さらに、通常交配や通常体外受精で低受精能あるいは産仔の獲得の困難な遺伝子改変マウスの系統の体外受精ならびに産仔作出に、レーザー照射による透明帯穿孔卵子は広く利用できることを初めて明らかにした。

第4章では、近年、新しい遺伝子改変マウス作製技術として期待されている体細胞クローン技術の開発を行った。本章では、体細胞クローンマウス作製技術の基盤構築のた

論文審査結果の要旨

め、Wakayama らが報告したピエゾマイクロマニピレーターを用いた染色体除去方法と新しく考案した電気融合法による体細胞核移植技術を用いて、クローン胚の作製ならびに産仔の作出方法を検討した。高電圧パルス式細胞融合法を用いて、繊維芽細胞をドナー細胞とした核移植実験をしたところ、その融合効率は 80%以上と高率であり、活性化処置後の核の形成率は 95%以上であった。また、再構築胚をレシピエント雌マウスへ移植した結果、低率ながら 1%のクローンマウスが得られた。これらの結果から、今後改善の余地があるものの電気融合法による体細胞核移植技術は有効であることが示された。

近年、人為的に遺伝子を操作した様々な遺伝子改変動物の作出技術開発により、遺伝子の生体内における機能解析が可能となり、更に責任遺伝子が明らかで病因の明確な疾患モデルマウスを計画的に作出できるようになった。一方で、このような研究進展に伴い多量に生産されるマウスなどの実験動物の維持や系統管理に関する環境が遅れていることが指摘されている。本研究では、飼育管理に要するスペースや労力と費用など抑制効果を志向した発生工学的研究及びそれを支える周辺技術である生殖工学的研究技術の開発を目的に、マウス及びラットにおける (1) ガラス化保存法を用いた遺伝子改変動物の系統保存及び保存されたマウス卵子からの効率的遺伝子改変マウスの作製の検討、(2) 遺伝子改変マウスの胚・配偶子バンクのための基盤技術の開発、(3) 核移植技術を用いたクローンマウス作出に関する検討を行っている。

まず、多くの研究機関で開発され膨大な系統数が作出されているトランスジェニック動物の系統保存方法の確立を目的に行った研究では、操作の簡便なガラス化保存法を用いたトランスジェニックマウス由来胚ならびにトランスジェニックラット前核期卵の凍結保存技術の検討を行った。その結果、トランスジェニックマウス由来初期胚のガラス化保存は有効であることを示し、さらにトランスジェニックラット由来体外受精由来前核期受精卵を用いたガラス化保存からの産仔獲得を世界で初めて成功させた。また、トランスジェニックマウスの作製をより効率的にすることを目的に、緩慢凍結保存法に比べ簡易かつ短時間で操作の完了するガラス化保存法にて体外受精由来前核期受精卵の凍結保存を行い、融解後のそれら受精卵を用いてトランスジェニックマウスの作製を検討した。その結果、ガラス化法にて保存された体外受精由来前核期受精卵を供試してトランスジェニックマウスの作製が可能であることを世界で初めて明らかにした。以上、前核期受精卵を使ったガラス化保存技術の確立により、今後飼育スペースの観点のみならず、経費の節減や実験スケジュールの立案等をより効率化できることを明らかにしている。

次に、マウス胚・配偶子バンクにおいて、遺伝子改変マウス由来胚・配偶子に対して高い再現性があり一般化した方法を提供するため、マウス体外受精などに用いる培養液ならびに凍結操作に用いる各種保存液の標準化の確立を目的として、それら各種溶液を

アンブル封入によってキット化を試み、その実用化を検討した。その結果、胚・配偶子の凍結保存法の標準化の一環として、胚操作溶液および胚保存溶液合計6種類を硝子アンブルに封入することによって長期保存を可能にし、体外受精や初期胚の保存操作に資する様々な生殖工学の開発に適用できる可能性を明らかにした。さらに、それらに関するマニュアルを整備しホームページに公開しており、このキット作製に関するノウハウを外部試薬メーカーへ譲渡し量産化をはかり、その実験システムを基盤技術として広く普及するものと考えられた。また、遺伝子改変マウスの遺伝的背景として多く使用されているC57BL/6J系統、特に国内において新たに生産を開始したJAX | MICE C57BL/6Jマウスにおける体外受精および簡易ガラス化法に関する基礎的な評価を検討した。その結果、従来から生産されている他メーカーの系統と遜色なく使用できることを明らかにした。さらに、低受精能を呈するトランスジェニックマウスからの産仔獲得を目的として透明帯穿孔卵子を利用した体外受精方法の確立についても成功した。

発生工学技術の展開として近年、報告されている体細胞クローンマウスの作製技術の基盤構築のため、ピエゾマイクロマニピュレーターを用いた卵子の染色体除去操作技術と新しく考案した電気融合法による体細胞核移植技術の確立を行った。その結果、再構築胚をレシピエント雌マウスへ移植することにより、1%と低率ながらクローンマウスの作製に成功した。これらの結果から、今後改善の余地があるものの電気融合法による体細胞核移植技術は有効である可能性が示唆されている。

上記本研究によって得られた知見は、今後の遺伝子改変マウスおよびラットを開発するための発生工学的そして生殖工学を支える実用的な基盤研究として重要な意味を持つと考えられる。

以上のように、本論文は博士（工学）論文として価値のあるものと認められる。

氏名	木村雅晴
学位の種類	博士（工学）
学位記番号	生第11号
学位授与の日付	平成19年3月22日
学位授与の要件	学位規程第4条第2項該当
学位論文題目	核磁気共鳴分光法による液晶及び有機低分子結晶の相転移に関する研究

論文審査委員（主査）	教授	赤坂	一之
	（副主査）	教授	岩村 俣
	（副主査）	教授	泉井 桂