

分担 研究報告書

マウス胚バンクシステムに関する研究

分担研究者 中瀧直己 熊本大学動物資源開発研究センター 教授

研究要旨

熊本大学動物資源開発研究センターは、遺伝子改変（トランスジェニック、ノックアウト）マウスの作製、保存、供給などを行う全国共同利用施設として開設され、その中で胚の凍結保存は、きわめて重要な役割を果たしている。そこで、本年度は当センターにおける胚バンクシステムについて紹介する。

A 研究目的

熊本大学動物資源開発研究センターは、遺伝子改変マウスの作製やそれに伴う技術開発を行う「技術開発分野」、作製した遺伝子改変マウスの飼育や解析を行う「病態遺伝分野」、作製したこれらマウスの胚および精子の凍結保存とデータベースの構築を行なう「資源開発分野」の3部門から成り、資源開発分野では、既に、遺伝子改変マウスを中心とした胚および精子の凍結保存を開始している。そこで、今回は、私たちの行っている胚バンクシステムについて紹介する。

B 研究方法

①胚の作製：遺伝子改変マウスの雄（ホモあるいはヘテロ）から採取した精巢上体尾部精子と市販の同系統の雌マウスから採取した過排卵卵子を用いて、体外受精を行い、2細胞期胚を作製する。

②胚の凍結保存：作製した胚を簡易ガラス化法（Nakao, Nakagata and Katsuki, 1997）により、1系統当たり約400～500個凍結保存する。

③胚の生存性の検討：凍結した一部の胚(40個)を融解し、偽妊娠雌マウスに移植して産仔への生存性について検討する。

④産仔のチェック：生後4週齢で尾の組織からDNAを抽出し、明らかに元の遺伝子改変マウス由来の産仔であるか否かのチェックを行うと共に、それら産仔の病原微生物のモニタリングを行う。

C 結果

現在、上述したシステムにより、25系統、約10000個の胚およびストロー数約750本分の精子の凍結保存を行っている。また、一部の系統については、約40個の胚を融解・移植して、産仔への発生ならびに導入遺伝子・病原微生物のチェックを完了している。

D 考察

現在、上述したシステムにより、遺伝子改変マウスの胚の凍結保存を精力的に行っている。

今後は、国内外からのマウス胚の凍結保存を積極的に行い、より多くの研究者に広く遺伝子改変マウスを供給して行きたいと考えている。

E 結論

凍結した胚の一部を融解・移植して、産仔への発生ならびに産仔への導入遺伝子・病原微生物のチェックを行うことにより、品質管理が十分になされた胚バンクシステムを確立した。

F 研究発表

1 論文発表

- 1.M.Okamoto, N.Nakagata, O.Ueda, N.Kamada and H.Suzuki :
Cryopreservation of gene disrupted mouse spermatozoa. J.Mamma. Ova Res. 15 : 77 - 80, 1998
- 2.K.Nakao, N.Nakagata and M.Katsuki :
Production of chimeric mice from cryopreserved blastocysts. Exp. Anim. 4 : 167-171, 1998
3. 中潟直己 : マウス胚および配偶子の凍結保存とその応用
実験動物ニュース、47 : 131-138, 1998
4. 中潟直己 : マウスにおける生殖工学技術
九州実験動物学会雑誌、14 : 3-7, 1998

2 学会発表

1. ドライアイスによる凍結マウス精子の輸送方法の検討
第45回日本実験動物学会、1998
中潟直己、中尾和貴、勝木元也
2. 凍結透明帯除去8細胞期胚とES細胞との集合キメラの作成
第45回日本実験動物学会、1998
中尾和貴、中潟直己、勝木元也

3. 実験動物・野生動物精子の凍結保存
日本アンドロロジー学会第17回学術大会、
1998 中潟直己

4. マウス精子の凍結保存
大阪大学蛋白質研究所セミナー、
1998 中潟直己

疾患モデルマウス胚の凍結保存と移植成績

(分担) 研究者 松崎哲也 国立精神神経センター神経研究所
実験動物管理室

研究要旨：疾患モデルマウスの胚の凍結保存及び移植再生について検討した。胚の凍結保存では、ダウン症モデルマウスTs-65Dn系やFabry病モデルの α -gal A欠損マウスGAA系、腎糸球体不全マウスFGS/Nga系を新たに加えて、計20系統から5,501個の2細胞期胚が保存された。また、筋ジス8系統とミエリン形成不全1系統の凍結胚を融解した結果、正常胚回収率は76.5-95.0%の範囲にあった。これら回収した正常胚610個を32匹のレシビエントマウスに移植した結果、144匹の産子が得られ、その再生率は24.2%であった。

A. 研究目的

神経、筋疾患および発達障害等の治療や原因解明のための研究資材に疾患モデル動物は不可欠である。これらのモデル動物を収集し、胚を凍結保存することによって、必要に応じていつでも凍結胚を融解・移植し再生子を供給することが可能となる。更に遺伝子資源の確保と飼育管理の省力化がはかれる。これら一連の作業をシステム化することによって研究支援体制が確立される。

本年度は当研究所で汎用されている疾患モデルマウスの受精卵の凍結保存と移植再生に伴う凍結卵融解後の卵の性状や再生率について検討する。

B. 材料および方法

マウスの過排卵誘起には性腺刺激ホルモンを用いた。ホルモン投与量はマ

ウス1匹当たりPMSGおよびhCG各々5.0IUとし、PMSGとhCGの投与間隔を48時間とした。またhCG投与後16時間で卵を回収した。体外受精はTYH培地を用い雄の精巢上体尾部から採集した精子を卵子に媒精し24時間後に2細胞期胚を回収した。胚の凍結保存はPBI培地に回収した2細胞期胚を洗浄後、凍結用のクライオチューブに移し、緩慢冷却法によりプログラムフリーザーにて-70°Cまで冷却した。冷却されたクライオチューブをケーンに装着し、液体窒素タンクに収容した。

凍結胚の融解は、液体窒素タンクからクライオチューブを取り出し室温で12-13分静置後チューブ内にPBIを段階的に加えてDMSOを希釈した。シャーレにチューブの保存液を移し更にPBI培地に移し換え胚の形態を観察した。

移植に際しては、正常な2細胞期胚をmW培地に移し換えて移植に供した。レシピエントマウスは、移植前日に精管結紮雄と偽妊娠交配させて得たプラグ確認雌を用いた。移植マウスはネンブータルで麻酔し、背部外皮を脊髄に沿って切開し卵巣・卵管及び子宮角の上部を体外に引き出しガーゼに固定した。卵巣膜をノエス剪刀で切開し移植ピペットで左右の卵管采より胚を挿入した。挿入後は直ちに外皮をオートクリップで縫合した。移植マウスはホットプレートに乗せ体温の維持と覚醒を待って飼育ラックに収容した。

なお、移植後19日目まで自然分娩のみなれない母体は帝王切開にて胎子を摘出し里子哺育させた。

C. 研究結果

胚の凍結保存では、筋ジストロフィ-5系統から654個、コントロール2系統から563個が保存された。C57BL/6JdyやC57BL/10nuのホモ雄の精子採取がやや困難で体外受精率は55.8%と低値であった。weaver系やshiverer系は60-76%の範囲であった(表1)。

染色体異常のTs-65Dn系マウスはダウン症のモデルとして、そのコントロール系にTc-65Dnを新たに導入した。両系統の排卵数は19-23個と多く受精率も60-65%であった(表2)。Tc-65Dnの染色体からトリソミー遺伝子が検出できなかった。SOD(抗酸素酵素)の系統の差意においてもTs-65Dnは11.4-

19.2%の範囲であるのに対しTc-65Dnは14.0-21.5%であり、両者に有意差はみられなかった(表3)。

腎系球体不全のFGS/Nga系は平均排卵数が4.5個と極めて少なく、Fabry病モデルのGAA系も、自然交配では5.6個に対し過排卵誘起でも11.2個と少なかった。また、体外受精率もGAA系は30%と低値であった(表4)。近交系のIQIやトランスジェニックのCAT系は体外受精率が低く、自然交配で受精卵を回収した。自然交配の受精卵は異常卵が少なく回収率は高値であった。

凍結胚の融解・移植再生では、融解した凍結胚をチューブより回収し顕微鏡観察した結果、胚ゲノム構成からみた9系統の正常胚の回収率は76.5-95.0%であった(表5)。異常胚には卵の萎縮や極体が小さいもの、透明体や細胞塊に張りのないものなどがみられた。回収した正常胚610個をレシピエントマウス32匹に移植した結果、144匹の再生子が得られた(表6)。

D. 考察

IQI系やTg-CAT系は体外受精率が低いため自然交配で回収した受精卵を保存した。この方法ではプラグ付着雌の準備等の作業も加わるが灌流により回収した受精卵の数は産子数の範囲であり正常胚が多かった。また、新たに導入したGAA系やその他の系統においても排卵数が少なく受精率の低い系統では胚の保存を体外受精と自然交配を

併用することも必要であり、今後こうした遺伝子改変マウスの増加に伴い併用保存は増加してくると思われる。

ダウン症モデルのTs-65Dn系は原因遺伝子の検出や系統によるSODの有意差がみられなかったことから、保存中のTs-65DnC3B6F1凍結胚を移植再生し再度検索する予定である。

胚ゲノム構成からみた9系統の凍結胚を融解したときの正常胚の回収率は76.5-95.0%と比較的良好であった。これらの胚を移植しその再生子数を見ると極めて低値であった。この原因として考えられることは1腹に20個の胚を左右の卵管采に移植し平均4-5匹が再生されている。従って、必ずしも移植技術の要因だけではなく胚自身の能力も充分考えられる。今後は融解後の正常胚を胚盤胞まで発生させ、その経過を観察することが重要であると考えられた。

E. 結 語

胚の凍結保存では、筋ジストロフィー系をはじめ、新たにダウン症モデルTs-65Dn系やFabry病モデルGAA系、腎糸球体不全マウスFGS/Nga系を加え計20系統から5,501個の2細胞期胚を保存することができた。また、徐々にではあるが胚の凍結保存から移植・再生に至る一連のシステムが機能しはじめた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1 Matsuzaki T., Saito M., Sakai A., Matsumoto T., Ganzorig S., and Maeda Y. Rearing of plateau pika (*Ochotona daurica*) captured in Mongolia. *Exp. Anim.* 47(3), 203-206, 1998.

2. シンポジウム

1 松崎哲也、田谷順子. 実験動物としての開発：ナキウサギの繁殖生理. 「ナキウサギの生理学的特性 高地・寒冷適応モデル動物としての実験動物化をめざして」第76回日本生理学会大会 (長崎). 平成11年3月30日.

3. 学会発表

1 渋谷誠二、若山吉弘、鬼本宏明、江袋 進、斎藤宗雄、松崎哲也. 筋ジストロフィーハムスター心筋および骨格筋細胞膜微細構造の比較検討 (第2報) 第39回日本神経学会総会 (京都). 平成10年5月20日.

2 中江良子、Peter J. Stoward、松崎哲也. Localization of succinate and lactate dehydrogenase activities in mdx skeletal muscle fibres.

第40回歯科基礎医学会総会 (名古屋). 平成10年10月18日.

3 松崎哲也、松崎香苗、早坂久美、三好敏保. スンクス(*Suncus murinus*)の人工受精の試み. 第30回成長談話会 (伊勢崎). 平成10年11月1日.

図1 マウス受精卵の凍結保存

系統名	配遇子		胚ゲノム構成	使用雌数	排卵総数	数平均	凍結2細胞期胚数	%
	雌	雄						
筋ジストロフィー								
C57BL/6J dy	+/+	-/-	ハテロ	9	124	13.7	72	55.8
C57BL/6J dy2J	+/+	-/-	ハテロ	25	313	12.5	203	64.8
B6C3Fe a/a myd	-/-	-/-	ホモ	2	21	10.5	16	76.2
C57BL/10mdx	+/+	+/+	ホモ	20	203	10.1	121	59.6
C57BL/10	+/+	+/+	ホモ	5	70	14.0	51	72.9
C57BL/10mdxnu	-/-	-/-	ホモ	10	127	12.7	87	68.5
	+/-	-/-	ホ/ハ	12	220	18.3	155	70.4
C57BL/10nu	-/-	-/-	ホモ	6	65	10.8	48	73.8
	+/+	-/-	ハテロ	37	831	22.4	464	55.8
小脳変性症								
weaver	+/-	-/-	ホ/ハ	10	204	20.4	132	64.7
ミリン形成不全								
shiverer	-/-	-/-	ホモ	2	12	4.5	9	75.0

図2 マウス受精卵の凍結保存

系統名	配遇子		胚ゲノム構成	使用雌数	排卵総数	凍結2細胞期胚平均数	凍結2細胞期胚数	%
	雌	雄						
腎系球体不全								
FGS/Nga	-/-	-/-	ホモ	10	45	4.5	27	60.0
染色体異常								
Ts-65Dn	+/?	+/?	ホ/ヘ/ワ	53	1018	19.2	613	60.2
Tc-65Dn	+/+	+/+	ホモ	79	1873	23.7	1221	65.2
ウイルス感受性								
FVB/N	+/+	+/+	ホモ	3	60	20.0	54	90.0
近交系								
IQJ	+/+	+/+	ホモ	7	88	12.5	28	31.8
NC	+/+	+/+	ホモ	20*	243	12.1	228	93.8
	+/+	+/+	ホモ	21	410	19.5	295	72.0

* : Natural mating

図3 ダウン症モデルマウスのスーパーオキシドジスムターゼ値

系 統	性・匹数	SOD値(%) Mean±SD	範囲	性・匹数	SOD値(%) Mean±SD	範囲
モデル Ts-65Dn	♂21	15.43±2.00	11.4-19.2	♀21	15.73±1.46	12.8-18.2
	♂♀42	15.60±1.73	11.4-19.2			
コントロール Tc-65Dn	♂2	15.5	14.0-17.0	♀2	19.35	17.2-21.5
	♂♀4	17.42±3.08	14.0-21.5			

図4 マウス受精卵の凍結保存

系統名	配遇子		胚ゲノム構成	使用雌数	排卵総数	平均	凍結2細胞期胚
	雌	雄					
KO(ノックアウト)							
DYS (exon52)	-/-	+/-	ホ/ハ	44	928	21.1	608 65.5
	+/-	+/-	ホ/ハ/ワ	26	673	25.9	417 61.9
GAA (exon6)	-/-	-/-	ホモ	8	90	11.2	27 30.0
	-/-	-/-	ホモ	3*	17	5.6	16 94.1
Tg(トランスジェニック)							
CAT 33(N8)	+/+	+/+	ホモ	7	106	15.1	42 39.6
				2*	25	12.5	25 100
CAT 34(N8)	+/+	+/+	ホモ	6	98	16.3	58 59.1
				20*	226	11.3	220 97.3
CAT 35(N10)	+/+	+/+	ホモ	9	114	12.6	37 32.4
				18*	243	13.5	227 93.4

* : Natural mating

図5 マウス凍結2細胞期胚融解後の形態的正常胚数

系統	凍結胚数	胚ゲノム		回収胚		回収胚の形態		正常胚		
		♀	♂	胚数	%	正常胚数	%	異常胚数	%	回収率
B6-dy (♂/△)	200	+	-	192	96.0	153	79.7	39	20.3	76.5
dy-2J (♂)	28	-	-	27	96.4	23	85.2	4	14.8	82.1
dy-2J (△)	40	BL/6J	-	40	100	33	82.5	7	17.5	82.5
mdx (♂)	40	+	+	39	98	31	79.5	8	20.5	77.5
B10(♂)	40	+	+	40	100	38	95.0	2	5.0	95.0
mdx-nu (♂)	176	-	-	173	98.3	148	85.5	25	14.5	84.1
mdx-nu (♂/△)	20	-	-	20	100	18	90.0	2	10.0	90.0
B10-nu (♂/△)	125	+	-	123	98.4	112	91.1	11	8.9	89.6
Sv (♂)	67	-	-	66	98.5	57	86.4	9	13.6	85.1

図6 マウス凍結2細胞期胚の移植再生率

系統	胚ゲノム		移植 比		移植 再生 子					
	♀	♂	胚数	エト数	産子数	%	離乳数	%	♂	♀
B6-dy (♂/△)	+/-	x -/-	153	8	34	22.2	32	94.1	14	18
dy-2J (♂)	-/-	x -/-	20	1	4	20.0	4	100	2	2
dy-2J (△)	BL/6J	x -/-	33	2	11	33.3	10	90.9	6	4
mdx (♂)	+/+	x +/+	31	2	10	32.3	10	100	3	7
B10(♂)	+/+	x +/+	38	2	13	34.2	13	100	5	8
mdx-nu (♂)	-/-	x -/-	148	7	26	17.5	26	100	14	12
mdx-nu (♂/△)	-/+	x -/-	18	1	3	20.0	3	100	1	2
B10-nu (♂/△)	+/-	x -/-	112	6	31	27.6	30	96.7	14	16
Sv (♂)	-/-	x -/-	57	3	16	29.6	16	100	7	9

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
分担研究報告書

胚および配偶子の遺伝的モニタリング技術の開発

分担研究者 加藤 秀樹 浜松医科大学医学部附属動物実験施設・実験動物中央研究所

研究要旨

(1) 1種類のマイクロサテライトマーカーの検出に必要な胚数は、2細胞期胚で10個、8細胞期胚で5個、桑実期胚で1個であった。

(2) 2細胞期あるいは8細胞期胚を桑実期胚まで培養した5個の胚を用いることにより5種類のマイクロサテライトマーカーが検査でき、系統の識別が可能であった。

A. 研究目的

実験動物の胚および配偶子（卵子及び精子）の凍結はミュータント系統やトランスジェニックおよびノックアウト系統など、貴重な実験動物の遺伝資源の保存法として実用化の段階に入っている。

胚バンクの運用においては、胚・配偶子の取り違え事故などが予想されることから、本研究では個体へ還元することなく、胚の早期発生段階で系統を判別できる検査システムを確立するための基礎的研究を行った。

B. 研究方法

CB6F1マウスの精子および卵子をmWM培地内で体外受精し、37℃、5% CO₂の条件下で培養した。23、54および71時間後にそれぞれ2細胞期、8細胞期、桑実胚期に達した。各発生段階の胚をそれぞれ1、5、10個ずつサンプルチューブに入れ、-80℃に保存した。

DNA調製法として4種類の手法、すなわち、標準法（フェノール/クロロフォルム法）、A社キット、B社キットおよび我々の簡易抽出法について検討した。

マウス15系統の系統識別が可能となる5種類のマイクロサテライトマーカー、D3Mit54、D5Mit18、D6Mit15、D7Mit77およびD8Mit50を我々のデータベースから選択した。PCRはResearch Genetics社より購入したプライマーを用いて常法により行った。PCRプロダクトはアガロースゲルを用いて電気泳動し、エチジウムブロマイド染色を行って検出した。

C. 結果

1. DNA調製法

少数の細胞からのDNA調製に適した方法をマウスリンパ球を用いて検討した。その結果、標準法、A社およびB社のキットではPCRプロダクトを検出できなかったが、簡易抽出法ではリンパ球40個で検出できた

ので、胚からの核DNA抽出法として本方法を採用した。

2. 胚の遺伝的モニタリング方法の検討

まず、1種類のマイクロサテライトマーカーを検出するために必要な最少胚数を決定するための実験を行った。3種類(2細胞、8細胞および桑実)の胚を1個群、5個群および10個群に分け、D3Mit54の検出を試みた。その結果、2細胞期胚では10個群、8細胞期胚では5個群、桑実胚では1個でプロダクトが検出された。次に、遺伝的モニタリング（系統識別）に必要な5種類のマーカーを検査するために必要な最少胚数について桑実胚を用いて検討した。その結果、少なくとも5個を必要とすることが分った。

D. 考察

本研究では桑実期胚1個が1種類のマイクロサテライトマーカーを検出するために必要とする結果であったが、それ以前、すなわち、桑実胚期よりも早期の発生ステージでも検出できるようなDNA調製方法や泳動法ならびに染色法を見いだすことにより、遺伝検査に使用する胚数をできるだけ少なく押さえることができると考える。

E. 結論

桑実期胚5個を用いることにより5種類のマイクロサテライトマーカーを検出し、系統の識別が可能になった。

F. 研究発表

加藤秀樹 マウス、ラットの遺伝子地図、アニテックス、Vol. 10 (2): 67-74

本研究は、実中研の六車香里、小田晃司および飼育技術研究室との共同研究として行われた。

受精卵移植によるマウス肝炎ウイルス汚染除去の実例におけるPCR法の有用性

分担研究者 山田 靖子 国立感染症研究所主任研究官

協力研究者 滝本一広、矢部美機子、小浦美奈子、松田潤一郎、
持田慶司、山本美江、中山一栄、神山恒夫（国立感染症研究所）
窪崎敦隆、小野寺節（東京大学農学部応用免疫学講座）

研究要旨 マウス肝炎ウイルス(MHV)汚染が認められたトランスジェニックマウスコロニーから受精卵移植によるコロニーの清浄化を試みた。各段階での汚染の状態を RT-nested PCR法によるマウス肝炎ウイルス遺伝子の増幅を用いて検査した。汚染コロニー内で交尾により受精させ、卵を採取した♀の糞便中に MHV 遺伝子の排出が認められ、MHV に汚染していることが判明した。しかし、卵を採取した卵管卵巣からは MHV 遺伝子は検出されなかった。受精卵を移植した里親および新生仔の糞便からは MHV 遺伝子は検出されなかった。以上のことから、今回の受精卵移植は MHV に自然感染した♀から採取した卵を使用した。各段階でのウイルスの混入を RT-nested PCR法で検査することにより清浄化が可能であった。

A. 研究目的

近年、トランスジェニックマウスコロニーでのマウス肝炎ウイルス(MHV)の汚染が多発している。微生物汚染コロニーの清浄化の方法は子宮切断術が従来より確実な方法として採用されているが、近年ではより簡便であるため受精卵移植による方法が多く利用され始めている。しかし、汚染コロニーから採取した受精卵を使用して清浄化が正しく行われるかについての確証は出されていない。今回の研究では MHV 汚染コロニーから受精卵移植による清浄化を試み、各段階でのウイルスの混入を RT-nested PCR法により検査することにより、清浄化が可能であったので報告する。

B. 研究方法

Actin-Oprp transgenic (Tg) mouse を感染研動物施設へ導入するにあたり、微生物モニタリングを行った結果、抗 MHV 抗体が陽性であり、コロニーが MHV に汚染

していることが判明した。そのため導入に際しては清浄動物の作出が必要となった。清浄化及び RT-nested PCR の採材、一般モニタリングの計画を別紙 1 に示した。まず、汚染コロニー内で Tg ♂ と B6 ♀ を交尾させ、翌日感染研で♀より卵管卵巣を摘出し受精卵を採取した。この段階で交尾に使用した♂の糞便、受精卵を採取した♀の大腸内容物及び卵管卵巣を RT-nested PCR の材料とした。次に SPF の偽妊娠 ICR ♀ に受精卵を移植し、アイソレーター内で出産、離乳まで飼育した。離乳時に里親の大腸内容物、新生仔の糞便を RT-nested PCR で検査した。RT-nested PCR に使用したプライマーの位置を別紙 2 に、糞便あるいは大腸内容物及び卵管卵巣からの RT-nested PCR の方法を別紙 3 及び 4 に示した。糞便あるいは大腸内容物からは RNaid kit を、卵管卵巣からは Catrimox を用いて RNA を抽出し、1,25µg の RNA から Oligo-dT を primer とし逆転写酵素を用いて

cDNA を合成した。MHV の N 蛋白コード遺伝子の 989bp を 1 次増幅し、1 次増幅産物からさらにその内側 575bp を 2 次増幅した。

増幅された DNA を精製し、ABI の sequencer を用いて dyeterminator 法で遺伝子配列を解析し、MHV の他株の配列と比較した。

C. 研究結果

PCR によって得られた DNA 増幅像を別紙 5 に示した。陽性では非常にはっきりしたバンドが認められた。しかし、3 回の PCR の結果で陽性と陰性の混在するサンプルがあり、3 回とも陽性と出たものを陽性と判定した (別紙 6)。その結果、受精卵を採取した ♀ 2 匹の大腸内容物及び 1 匹の卵管卵巣が陽性であった。卵管卵巣の汚染が確実とすると受精卵が汚染している可能性が強いので、さらに増幅された DNA の遺伝子解析を行った。その結果、大腸内容物から増幅された DNA は他株とは異なった遺伝子配列を持っており、今回の流行株由来と思われるが、卵管卵巣から増幅された DNA は当研究室で使用している株 (MHV-2) の遺伝子配列と酷似していたため、実験室内でクロスコンタミしたものと思われる (別紙 8)。今回の流行株は N 蛋白の系統樹で判断するかぎりでは、腸管系に感染する株と近い遺伝子配列であった (別紙 9)。

離乳時の里親の大腸内容物及び新生仔の糞便は陰性であった (別紙 7) ので、離乳後の新生仔はアイソレーターより施設内清浄区域に移して飼育を開始した。

D. 考察

受精卵を採取した ♀ は抗体検査では陰性であったが、大腸内容物からは MHV 遺伝子

が検出され、RT-nested PCR が抗体上昇前の汚染検出に有効であることが証明された。しかし、Nested PCR は感度が非常に高いため、クロスコンタミを起こしやすいと言われている。今回の結果では、サンプルによって 3 回の PCR の結果にばらつきが認められ、RT-nested PCR の判定の難点が示された。また、卵管卵巣のサンプルは明らかに実験室内クロスコンタミであったので、実験器材の滅菌を徹底し、フィルター付きチップを使用するなどの注意が必要と思われた。

大腸内容物からの PCR で陽性と近い大きさにかすかなバンドが認められたが、これは SPF の陰性コントロールでも認められたので、腸管にたまたま MHV のプライマーに合致する遺伝子配列が内在していたためと思われた。よって、このかすかなバンドは陰性と判断した。

今回の流行株はその N 蛋白遺伝子の系統樹および糞便からの検出から判断して、腸管系感染の株と思われる。そのため、感染が腸管系に限定されていて、血液や他臓器に MHV が存在しなかったために受精卵の移植による清浄化が可能であったと思われる。全身感染を引き起こす株の場合にこの方法で清浄化が可能であるかはさらなる研究が必要と思われた。

E. 結論

MHV 汚染コロニー内で交尾により受精させた受精卵を用いて、受精卵移植による清浄化を試みた。卵を採取した ♀ の糞便中に MHV 遺伝子の排出が認められ、MHV に自然感染していたことが判明したが、卵管卵巣からは MHV 遺伝子は検出されなかった。受精卵を移植した里親および新生仔の糞便からは MHV 遺伝子は検出されなかつ

た。以上のことから、今回の受精卵移植はMHVに自然感染した♀から採取した卵を使用した。各段階でのウイルスの混入をRT-nested PCR法で検査することにより清浄化が達成出来たことが確認された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Takimoto, K., Nakayama, K., Yabe, M., Ami, Y., Yamada, Y. K., Tamura, S., Suzuki, Y., Asano, T., and Saito, M. (1998) : Contamination of mouse-adapted influenza virus with sendai virus. *Exp. Anim.*, 47, 137-140.

Yamada, Y. K., Takimoto, K., Yabe, M., and Taguchi, F. (1998) : Requirement of proteolytic cleavage of the murine coronavirus MHV-2 spike protein for fusion activity. *Coronaviruses and Arteriviruses*, Edited by L. Enjuanes, S. G. Siddell and W. Spaan, pp. 89-93, Plenum Press, New York.

Ohtsuka, N., Yamada, Y. K., and Taguchi, F. (1998) : Differential receptor-functionality of the two distinct receptor proteins for mouse hepatitis virus. *Coronaviruses and Arteriviruses*, Edited by L. Enjuanes, S. G. Siddell and W. Spaan, pp. 77-80, Plenum Press, New York.

Yamada, Y. K., Yabe, M., Takimoto, K., Nakayama, K., and Saitoh, M. (1998): Application of nested polymerase chain reaction to detection of mouse hepatitis virus in fecal specimens during a natural outbreak in an immunodeficient mouse colony. *Exp. Anim.*, 47, 261-264.

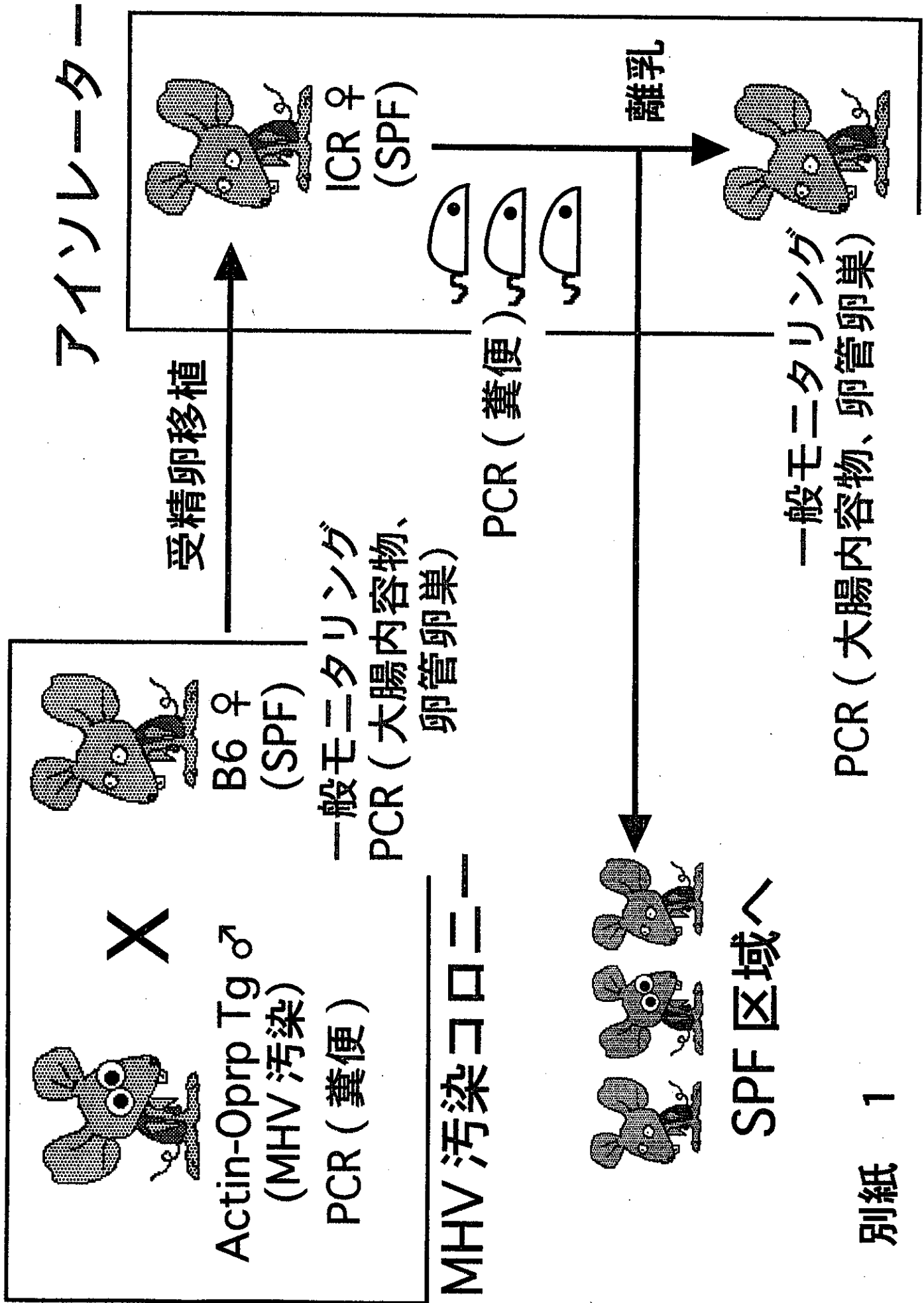
Rothman, A. L., Yamada, Y., Jameson, J., Cruz, J., West, K., Green, S., and Ennis, F. A. (1998): Assessment of human CD4+ and CD8+ T lymphocyte responses in experimental viral vaccine studies. *Preclinical and Clinical Development of New Vaccines*, Edited by S. Plotkin, F. Brown and F. Horaud, vol 95, pp. 95-104, *Developments in Biological Standardization*, Basel, Karger.

2. 学会発表

山田靖子、矢部美機子：マウス肝炎ウイルス流行株の性状及び構成蛋白の遺伝子解析。第45回日本実験動物学会、平成10年5月、松本。

山田靖子、矢部美機子、田口文広：マウスコロナウイルスS蛋白のアミノ酸置換による病原性の変化について。第46回日本ウイルス学会、平成10年10月、東京。

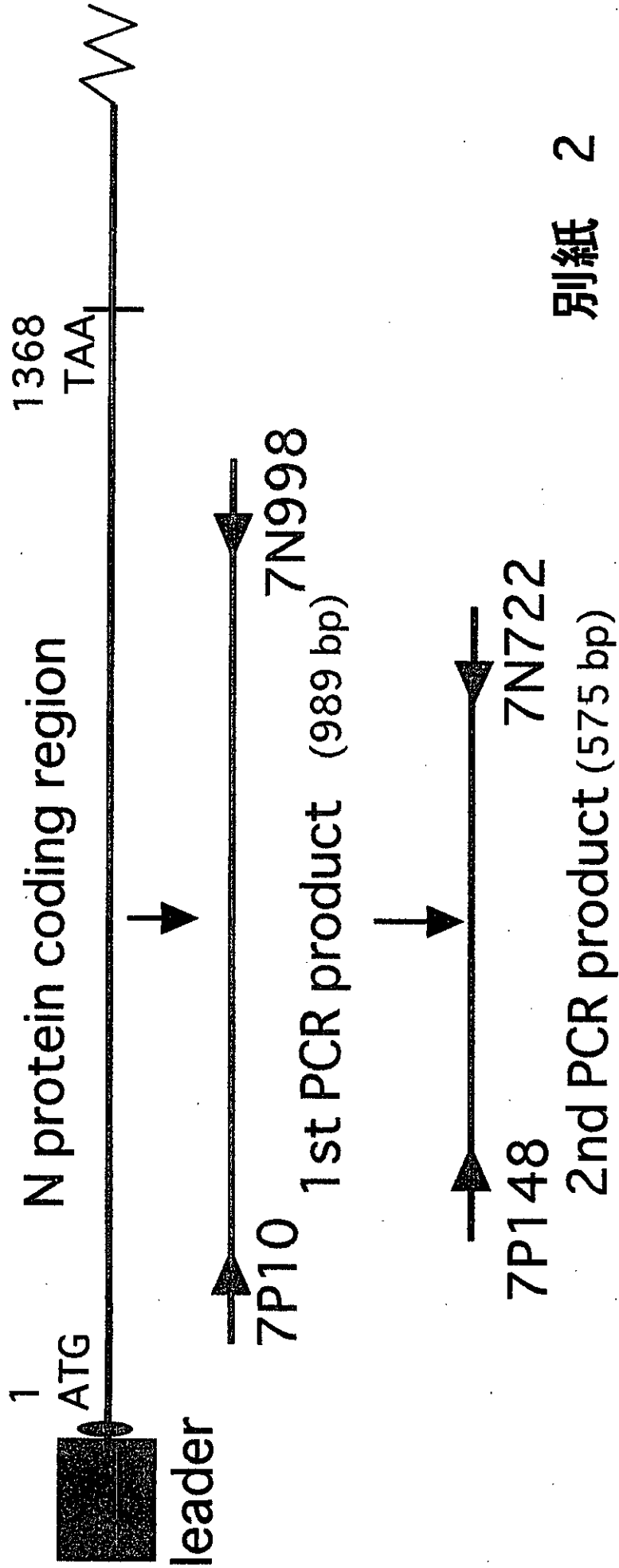
アイソレーター



MHV 汚染コロニ

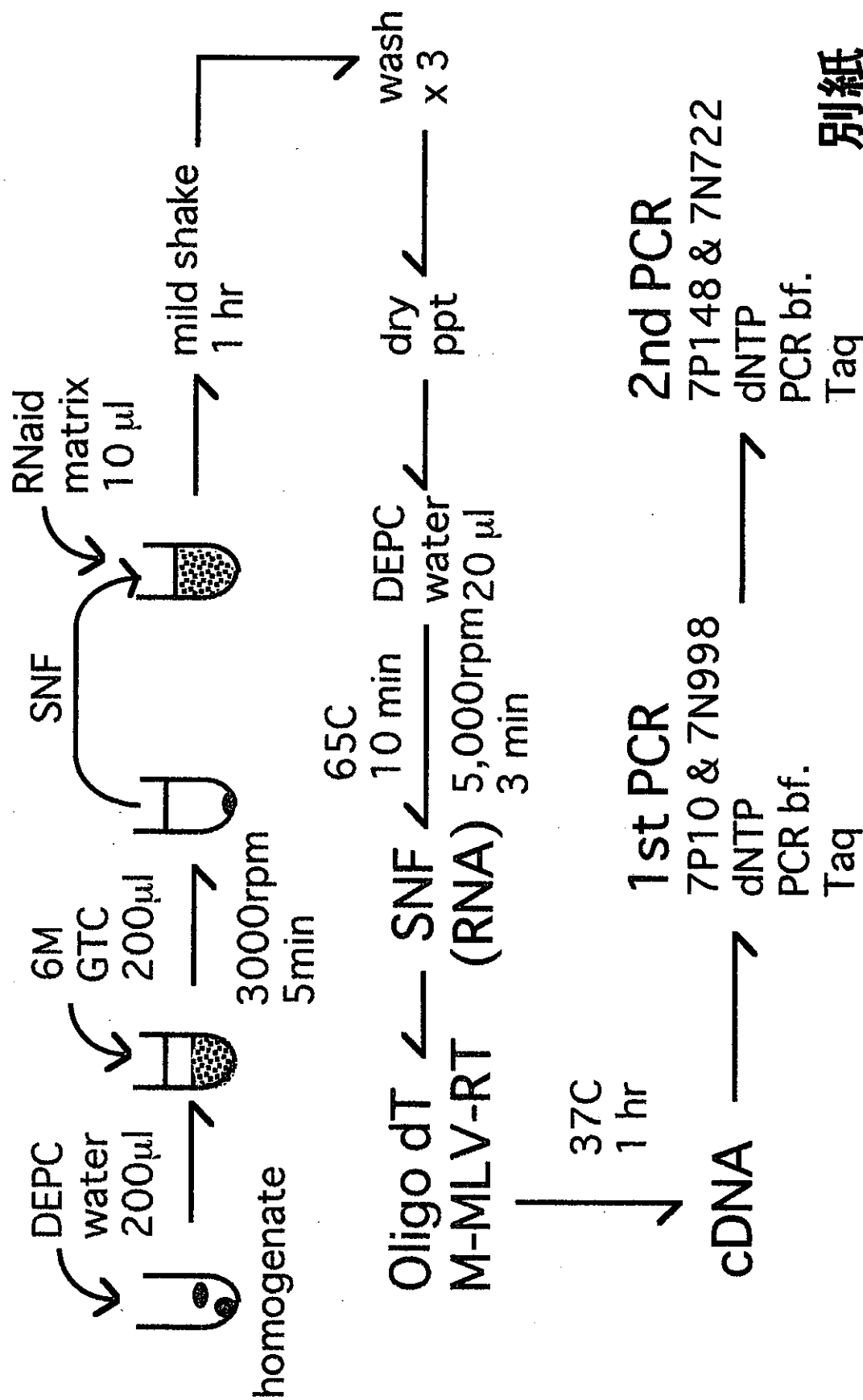
SPF 区域へ

MHV mRNA7



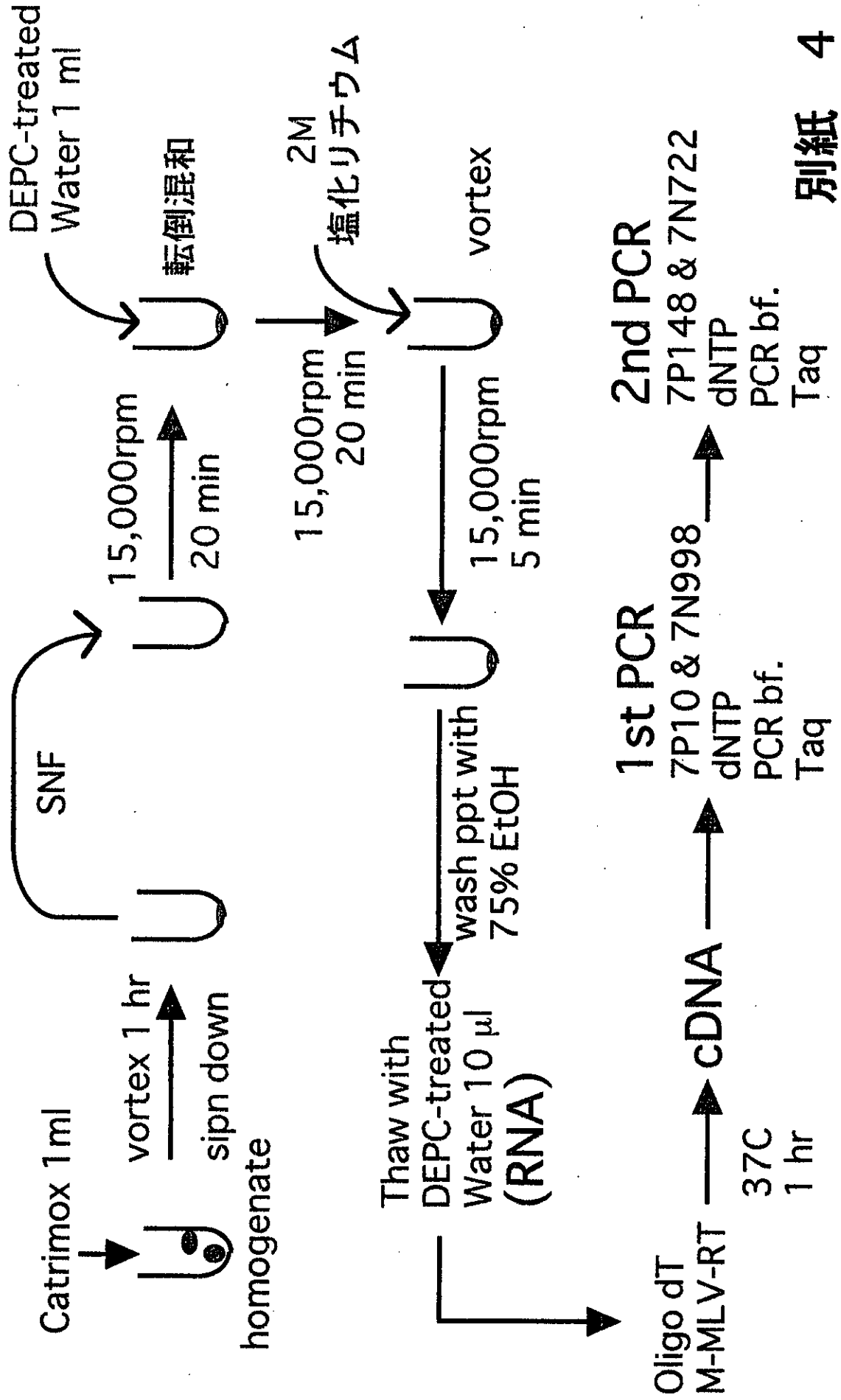
別紙 2

糞便からの nested PCR



別紙 3

卵管・卵巣からの nested PCR



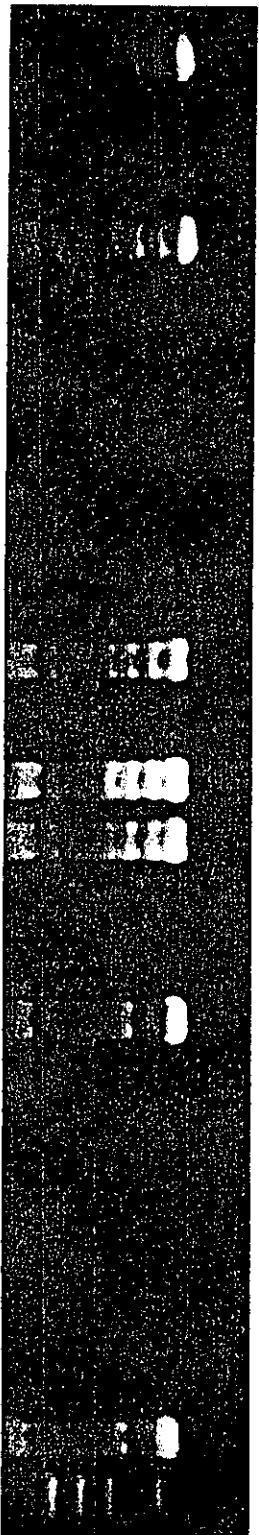
受精卵採取

♂糞便

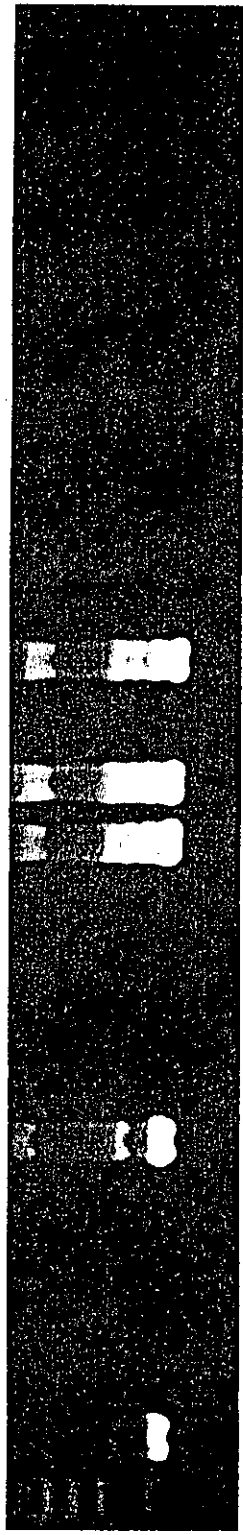
♀大腸内容物

♀卵管卵巣

1 2 3 4 5 6 7 8 1 2 3 4 5 6 7 8



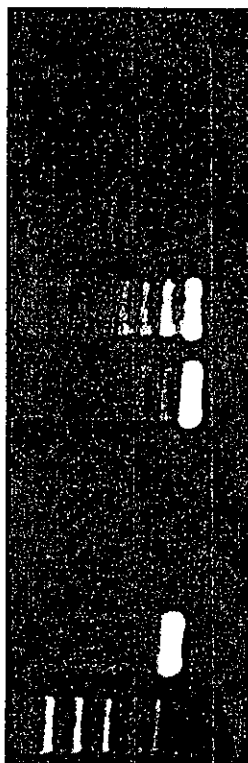
1回目
2nd



2回目
2nd

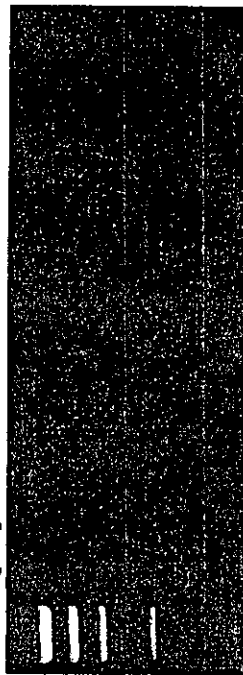
1st PCR ++

1 6 8 3 4 6 5 8



3回目
2nd

1 2 3
(-) 小 大 小 大 小 大



1回目
2nd

里親

別紙 5