

199900362A・B

厚生科学研究費

ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業

実験動物の胚・精子及びそれらの品質保証技術開発等に関する研究

総合研究報告書

平成12年3月

代表 浅野敏彦
国立感染症研究所 動物管理室

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
（総括）研究報告書

実験動物の胚・精子の保存方法及びそれらの品質保証技術開発等に関する研究

主任研究者 浅野敏彦 国立感染症研究所動物管理室 室長

研究要旨 本研究の目的は厚生行政に寄与するための厚生科学研究に利用される実験動物有効利用の為に実験動物胚・配偶子の凍結保存、保存される胚・配偶子の品質保証の為に技術開発を行うことにある。すでに大略の技術開発がなされているマウス・ラットにあつては、効率の向上を目的とし、マウス・ラット以外の動物種（マストミスとスナネズミ）にあつては、胚凍結保存のための基礎研究をおこなった。また、遺伝子改変動物においては、改変された遺伝子保存のために精子凍結保存技術の開発を行った。一方、これら凍結保存された胚・配偶子の品質保証技術に関しては、保存胚の取り違い事故、あるいは汚染動物からの胚採取や胚採取時の汚染事故の可能性を考慮し、高感度で簡便なモニタリング技術の開発に努めた。

分担研究者 小倉淳郎 国立感染症研究所
獣医科学部 主任研究官、松田潤一郎 国立
感染症研究所獣医科学部 主任研究官、鈴木
治 国立感染症研究所獣医科学部 研究員、
葛西孫三郎 高知大学農学部 教授、横山峯
介 三菱化学生命科学研究所 室長、笠井憲
雪 東北大学医学部 教授、勝木元也 東京
大学医科学研究所 教授、中瀬直巳 熊本大
学動物資源開発研究センター 教授、高橋明
男 国立精神神経センター神経研究所 室
長、加藤秀樹 浜松医科大学医学部 助教授、
山田靖子 国立感染症研究所動物管理室
主任研究官

A 研究目的

厚生科学研究基盤整備の一環として、疾患モデル動物等実験動物の RRB 設立に向け、胚、精子の保存方法の開発並びに標準的な操作手順書の作成及びそれらの品質保証技術開発を行うことを目的とした。

B 研究方法

1 胚凍結保存に関する研究

マウス胚の凍結保存に関する研究

マウス胚の凍結保存技術、並びに凍結保存された胚を融解し、生体に移植・産仔を得る技術はほぼ確立されている。しかしながら、マウスの系統によっては凍結・融解が困難である場合がある。これらは主として、凍結過程で胚に傷害が生ずることが原因であろうと推定されており、各種凍結保護材による傷害の程度を、継時的に観察し傷害要因の判別を試みた。

ラット胚の凍結保存に関する研究

ラットもマウスと同様に多く使用されている実験動物ではあるが、胚凍結保存技術に関してはマウスほど進展していない。特に、胚を採取する際のホルモンを用いた過排卵誘起反応は系統あるいは日齢による差が大きい。まして、疾患モデルラットにあつては、採卵が困難な場合が多い。そこで、体外受精方法の確立と卵巣移植技術を応用することを考え、まずマウスを用いて試みた。体外受精方法の確立に関しては、精巣上体尾部より

採取した精子を 10^6 個/ml に調整し、5 時間培養し受精能獲得を行い、定法により採取した未受精卵を加えて体外受精を行った。一方、卵巣移植に関しては、感染研で確立された、ネフローゼモデルマウスである ICGN 系卵巣を ICR 系の卵巣嚢内に移植し、その後、雄マウスと交配させ産仔を得て、自然交配群との間で比較検討を行った。

モルモット胚の凍結保存に関する研究

現時点まで、モルモットに過排卵を誘った報告はない。自然排卵される卵の数が極めて少ないために、凍結保存を試みることは困難である。従って、モルモットに過排卵誘起技術の開発を行った。各種ホルモン剤を投与し、その後雄と交配させ黄体数並びに胚の状態を観察した。また、胚移植技術の開発を目指して、自然排卵により得られた 8 細胞期または胚盤胞を、種々の時期の未経産雌の子宮に移植し、妊娠・分娩を観察した。

スナネズミ胚の凍結保存に関する研究

過排卵誘起：各種性腺刺激ホルモンを組み合わせて投与し、採卵された卵子と胚の数を調べた。

胚移植：過排卵処置を施した雌と精管結紮を施した雄を五日間同居させ、膣栓を観察することで偽妊娠動物を作出し、胚移植用のレシピエント動物とした。このレシピエント動物に、各段階の胚を卵管あるいは子宮に移植し、妊娠・分娩を観察した。

胚の急速凍結保存：採卵した各時期の胚を EFS20 液中で 2 分間平衡させ、プラスチックストロー内の EFS40 液中に移し、30 秒後に液体窒素タンク中で急速凍結した。融解は室温の水浴にて行い、0.25M シュークローズ PB1 液中で回収し、培養あるいは移植に供した。

精子の凍結保存：精巣上体尾部より採取した精子を、18%ラフィノース+3%スキムミルクをベースとした精子凍結液に浮遊させ、液体窒素中に保存した。融解後、顕微鏡下で精子の運動性を調べた。

体外受精：精子の受精能獲得は、透明帯除去ハムスター卵子との媒精により、精子侵入を観察することで調べた。また、受精の確認は、雌雄前核の形成と精子尾部の観察により行った。さらにマウスに準じた卵子細胞質内精子注入法(ICSI)による体外受精法も試みた。

ゴールデンハムスター胚の凍結保存に関する研究

排卵日の午前中に PMSG を 10-25IU 投与し、3 日後に雄と同居させた。膣栓を確認した動物から採卵し、修正 HECM-3 培養液で 7.5%CO₂、37.5°Cにて培養した。この培養胚を急速凍結保存した。凍結保護材としてはエチレングリコールおよび DMSO を用いた。

マストミス胚の凍結保存に関する研究

膣栓確認あるいは膣垢中の精子を確信して、1 細胞期から胚盤胞期の各胚を採取した。胚凍結保護材としてはエチレングリコール、フィコール、スクロースよりなる EFS20 液および EFS40 液を用いて急速凍結を試みた。融解後に子宮あるいは卵管に移植した。

2 遺伝子改変マウスの保存および遺伝的背景均一化に関する研究

遺伝子改変マウスの胚バンクシステムに関する研究

体外受精により 2 細胞期胚を作製し、急速凍結保存した。融解後、移植し生存率ならびに産仔をチェックした。

遺伝的背景均一化に関する研究

凍結精子を用いた体外受精法により戻し交

配を行い、自然交配による戻し交配法との比較検討を行った。

3 胚の品質保証に関する研究

微生物学的モニタリング

生体の微生物学的モニタリングと異なり、微小な胚のモニタリング方法として、RT-PCR 法を用いる方法が可能かどうかを試みた。材料として MHV 汚染コロニーから得られた糞塊を用い、MHV 遺伝子の検出を試みた。

遺伝的モニタリング

5 種類のマイクロサテライトマーカーを選択し、1 種類のマイクロサテライトマーカーを PCR 法で検出するのに、いくつの胚が必要かを検討した。

4 実験動物胚の採取と保管

国立精神・神経センターと国立感染症研究所で、疾患モデルマウス並びに近交系マウス胚を採取し、液体窒素中に保存した。

(倫理面への配慮)

それぞれの施設における動物実験委員会による実験計画書の審査を受けることにより、倫理・動物福祉への配慮がなされた。

研究結果と考察

1 胚凍結保存に関する研究

マウス胚は凍結・融解過程における各種の障害を人工的に与えて、胚を観察すると傷害特有の形態を示した。例えば、細胞外氷晶に圧迫された胚は、回収直後は透明帯が伸張して歪んでいた。また、細胞内凍結した胚は、Sucrose 液中では正常な形態で収縮していたが、PB1 液中では輪郭が不透明となった。このように、凍結融解した胚は、処理過程で受ける障害により形態が異なるため、融解後

の胚を観察することによりどのような障害を受けたかを知ることができる。従って、凍結融解方法の改善が可能となった。

疾患モデル動物では、その疾患が若いときから発症する場合、産仔を得ることが困難となる。卵巣が正常であれば、その卵巣を正常動物に移植することにより、卵を得ることが出来、疾患モデル動物の胚保存にも有意義である。そこで、ICGN マウスの卵巣を、ICR マウスの卵巣嚢に移植した後、雄 ICGN マウスと交配させ産仔を得た。この成績を ICGN マウスの繁殖成績と比較したところ、雌親一匹あたりの産仔数、離乳率共に好成績であった。このことは、ある種の疾患モデル動物の胚採取、または系統維持に卵巣移植法は有意義であることが判った。

ラットの卵子や精子はマウスのそれと比較して弱く、受精能獲得に長時間を要する。WI と SD の 2 系統のラットに過排卵処理を施し、採卵するといずれも平均 22 個の卵を得た。体外受精を行った場合、平均 31% の卵が受精した。しかしながら、実験群によるバラツキが大きく、安定した体外受精成績は得られなかった。受精条件のさらなる検討が必要である。

自然交配によりマストミス胚を得て、ガラス化法により凍結・融解を行ったところ、形態学的に正常な胚が高い割合で存在していた。この正常胚を培養に供したところ、桑実期胚あるいは胚盤胞期に達した。凍結融解した 2 細胞期胚および胚盤胞をマストミス卵管あるいは子宮に移植したところ、移植胚の約半数が産仔として分娩された。従って、マウスとほぼ同様のガラス化法を用いて、2 ステップ法を応用することでマストミスは効率よく保存できることが判った。今後は、過

排卵誘起と体外受精の方法を検討する必要がある。

シリアンハムスター胚は、8細胞期以降で耐凍性が高まることは過去の成績から判っていたので、これらの胚を用いて凍結を試みたが、いずれの耐凍剤を用いても、融解後培養すると発生を停止してしまった。発生停止の原因は、凍結時の傷害や耐凍剤の毒性ではなく、融解時の傷害であろうと推測している。今後の課題である。

スナネズミに関しては、過排卵誘起、人工授精、精子の凍結保存、胚のガラス化保存、胚移植、体外受精について調べてきた。このうち、体外受精に関しては改良が必要であり、卵細胞質内精子注入法(ICSI)を用いて、体外受精を試みた。128個のスナネズミ卵のうち103個が生存し、81個(63%)に雌雄前核が観察され受精が確認された。また、ICSI操作後、偽妊娠雌の卵管内に移植し、5日後の卵管・子宮より回収して、胚の発育状況を観察した。移植胚(57個)のうち15個が回収され、7個が桑実胚～胚盤胞へと発育していた。今後、通常の体外受精法の開発・改良を進めていく必要があるが、スナネズミにおいては大きな問題は存在しない。

インヒビンで能動免疫したモルモットは、非免疫群と比べて、黄体数、採取胚数、正常胚数は共に有意に高く、インヒビンはモルモットの過排卵法として有効であることが判った。インヒビン処理により得られた胚を、モルモットに移植することで、産仔を得ることが出来た。効率はまだ低く改良する点は残されている。モルモットのFSHリセプターの核酸配列を決定し、他の種と比較したところ、マウスやラットよりヒトに対する相関性が高いことが判った。

胚バンクシステムとしては、過排卵卵子を用いて、体外受精を行い、2細胞期胚をガラス化法により凍結保存する方法を開発した。この方法では、均一な胚を数多く得ることができ、省力化にもなっており、胚バンクに有効なシステムであることが判った。

精子の保存とその利用に関しては、凍結保存精子の受精成績は系統間で差があるが、凍結精子を用いた体外受精を行い、胚移植による個体への発生はいずれの系統でも良好な成績であった(50%以上)。遺伝子改変動物作出にあつては、作出された遺伝子改変動物の遺伝的背景の均一化は重要な手段である。従来に戻し交配法では遺伝的背景の均一化に約三年かかるが、凍結保存精子を用いることで、約一年で8世代の戻し交配を行うことができた。

2 品質保証に関する研究

微生物学的モニタリング方法は、RT-PCR法を用いることで、胚の汚染検出が可能であることが判った。このことから、凍結保存された胚の直接的な汚染検査が可能であることが示唆された。

遺伝学的モニタリング方法は、8細胞期の胚1～2個あれば、5種類のマーカーの検査が可能であり、このことは15系統の近交系を識別出来ることを示している。

結論

マウスの胚凍結保存に関しては、システムはほぼ完成した。但し、系統によるわずかな修正が出来るようになれば、さらによい成績が得られるであろう。マウス以外の実験動物に関しては、凍結胚で産仔が得られたのは、ラット、スナネズミ、採取胚を移植して産仔が得られたのはモルモットである。また、採

取胚を移植して、移植胚の発育が確認されたのはマストミスである。一方、ハムスターに関しては、依然として困難な局面にある。

品質保証に関しては、高感度モニタリングシステムの開発はほぼ完成し、今後はこれらの応用面での開発が必要になってくる。

F 研究発表

1. 論文発表

Yamada, Y. K., and Yabe, M. (2000): Sequence analysis of major structural proteins of newly isolated mouse hepatitis virus. *Exp. Anim.*, 49, 61-66.

Yamada, Y. K., Yabe, M., Ohtsuki, T., and Taguchi, F. (2000): Unique N-linked cosylation of murine coronavirus MHV-2 membrane protein at the conserved O-linked glycosylation site. *Virus Research*, in press.

Ikeda, M., Sugiyama, T., Suzuki, K., Moriya, T.,

Shibata, S., Katsuki, M., Allen, and Yoshioka, T. PLC-independent Ca²⁺ rise via muscarinic receptors in the mouse suprachiasmatic nucleus. (1999) *Neuroreport* in press

Sugiyama, T., Hirono, M., Suzuki, K., Nakamura, Y., Aiba, A., Nakamura, K., Nakao, K., Katsuki, M., and Yoshioka, T. Localization of phospholipase C₁ isozymes in the mouse cerebellum. (1999) *Biochem Biophys Res Commun* 265 473-478

Naito, A., Azuma, S., Tanaka, S., Miyazaki, T.,

Takaki, S., Takatsu, K., Nakao, K., Takamuru, K., Katsuki, M., Yamamoto, T.

and Inoue, J. Severe osteopetrosis, defective interleukin-1 signalling and lymph node organogenesis in TRAF6-deficient mice. (1999) *Genes to Cells* 4 353-362

Nozawa, H., Oda, E., Nakao, K., Ishihara, M.,

Ueda, S., Yokochi, T., Ogasawara, K., Katsuru, Y., Shimizu, S., Ohira, Y., Hioki, K., Aizawa, S.,

Ishikawa, T., Katsuki, M., Muto, T.,

Taniguchi, T. and Tanaka, N. Loss of the transcription factor IRF-1 affects tumor susceptibility in mice carrying Ha-ras transgene or nullizygosity for p53. (1999) *Gene Dev* 15 1240-5

An TZ, Wada S, Edashige K, Sakurai T, Kasai M. Viable spermatozoa can be recovered from refrigerated mice up to 7 days after death. *Cryobiology* 38, 27-34 (1999).

An TZ, Ikegami K, Edashige K, Sakurai T, Kasai M. Freeze preservation of spermatozoa recovered from male mice that had been refrigerated after death. *J Reprod Dev* 45, 191-196 (1999).

葛西孫三郎, 哺乳動物卵子の凍結保存: 基礎と応用, *細胞培養工学* 26 (2), 4-7 (2000).

横山峯介: マウス胚の凍結保存. *実験医学別冊. 新訂 新遺伝子工学ハンドブック*. pp.263-267, 1999.

Matsumoto, M., Iwamasa, K., Rennert, P., Yamada, T., Suzuki, R., Matsushima, A., Okabe, M., Fujita, S. & Yokoyama, M. Involvement of distinct cellular compartments in the abnormal lymphoid organogenesis in

lymphotoxin - α -deficient mice and alymphoplasia (aly) mice define by the chimeric analysis. J.Immunol., 163:1584-1591, 1999.

Miyado, K., Yamada, G., Yamada, S., Hasuwa, H., Nakamura, Y., Ryu, F., Suzuki, K., Kosai, K., Inoue, K., Ogura, A., Okabe, M., and Mekada, E. Requirement of CD9 on the Egg Plasma Membrane for Fertilization. Science, 287: 321-324, 2000.

Mochida, K., Wakayama, T., Takano, K., Noguchi, Y., Yamamoto, Y., Suzuki, O., Ogura, A., and Matsuda, J. Successful cryopreservation of Mongolian gerbil embryos by vitrification. Theriogenology, 51: 171, 1999.

Ogura, A., Inoue, K., Ogonuki, N., Noguchi, A., Takano, K., Nagano, R., Suzuki, O., Lee, J., Ishino, F., and Matsuda, J. Production of male clone mice from fresh, cultured, and cryopreserved immature Sertoli cells. Biol. Reprod., inpress 2000.

Ogura, A., Inoue, K., Ogonuki, N., Suzuki, O., Mochida, K., Matsuda, J., and Sankai, T. Recent advances in the microinsemination of laboratory animals. International Journal of Andrology, 2000.

Mochida, K., Yamamoto, Y., Noguchi, Y., Takano, K., Matsuda, J., and Ogura, A. Survival and subsequent development in vitro of hamster embryos after exposure to cryoprotectant solutions. J. Assist. Reprod. Genet., in press, 2000.

小倉淳郎, 井上貴美子, 越後貫成美 雄性生殖細胞を用いた顕微授精と核移植。蛋白質核酸酵素 増刊「再生医学と生命科学」印刷中

小倉淳郎 顕微授精法—マウス。「卵子研究法」佐藤英明 編:養賢堂; 東京, 印刷中.

小倉淳郎 精子形成. 「哺乳類の生殖生物学」, 高橋迪雄 編 東京:学窓社, 1999, p. 97-102.

小倉淳郎, 井上貴美子 クローン動物—齧歯類. バイオサイエンスの新世紀—第14巻「生命工学」, 山村研一 編 東京:共立出版, 印刷中.

小倉淳郎, 井上貴美子, 越後貫成美 性分化をめぐる最近の話題 「4. 哺乳類精細胞の受精能」. 産科と婦人科, 66: 1023-1030, 1999.

小倉淳郎, 井上貴美子, 越後貫成美 哺乳類の顕微授精. 「哺乳類の生殖生化学」 中野實、荒木慶彦 編 :アイピーシー, 1999, p.387-406.

小倉淳郎, 井上貴美子, 越後貫成美 顕微授精および核移植クローンをを用いたマウス胚の構築. 「遺伝学の挑戦 - 阿蘇シンポジウム 1999」, 山村研一 編 東京:南山堂, 印刷中.

小倉淳郎, 井上貴美子, 越後貫成美, 鈴木治, 持田慶司, 松田潤一郎 雄性生殖細胞の胚形成能. J. Reprod. Dev., in press 2000.

Ogura, A., Inoue, K., and Matsuda, J. Spermatid nuclei can support full term development after premature chromosome condensation within mature oocytes. Hum. Reprod., 14: 1294-1298, 1999.

Usui, N., Ogura, A., and Yanagimachi, R. Morphological modifications in hamster spermatogenic cell nuclei incorporated into homologous oocytes by electrofusion. Mol. Reprod. Dev., 23: 66-73, 1999.

Ogura, A. and Yanagimachi, R. Microinsemination using spermatogenic cells in mammals. In: Male Sterility for Motility

Disorders., edited
by Hamamah, S. Heidelberg,
Germany: Springer-Verlag, 1999, pp. 189-
202.

2. 学会発表

K. Matsumoto, M. Anzai, N. Nakagata,
K. Miyata, H. Kato, K. Saeki, Y. Hosoi and
A. Iritani : Possible usage of the firefly
luciferase gene as a gene expression
marker in preimplantation embryos from
transgenic mice. Mem. Research Inst.

B.O.S.T. Kinki University. 2 : 11-18,
1999

中瀬直己 : マウス胚・精子バンクの動向
バイオサイエンスとインダストリー、
57(12) : 34-35, 1999

中瀬直己、西川尊樹、土山修治、山田 源、
中村直子、野口和浩、久和 茂、浦野 徹、
大田美香、野口博光、山村研一 熊本大学
動物資源開発研究センターにおける胚バン
クシステムについて 第45回日本実験動
物学会、1999

N. Nakagata, T. Nishikawa, S.
Tsuchiyama, G. Yamada, N. Nakamura,
K. Noguchi, S. Kyuwa, T. Urano, K.
Yamamura

Mouse embryo bank system at the center
for animal resources and development,
Kumamoto University, Japan ICLAS
(ferasa) , 1999

西川尊樹、中瀬直己 マウスにおける生殖工
学技術の応用 受精着床学会、1999

中瀬直己、西川尊樹、川野佳代 中瀬直己、
下田 剛、山田 源、中村直子、野口和浩、久

和 茂、浦野 徹、山村研一 熊本大学動
物資源開発研究センター・マウス胚/精子バ
ンクについて

第92回日本繁殖生物学会、1999

中瀬直己、西川尊樹、川野佳代、 中瀬直己、
下田 剛、山田 源、中村直子、野口和浩、
久和 茂、浦野 徹、山村研一 熊本大学動
物資源開発研究センター・マウス胚バンク
について 第128回日本獣医学会、1999

Naomi Nakagata, Takaki Nishikawa,
Tatsuyuki Nakashima, Kayo Kawano,
Tsuyoshi Shimoda, Shuji Tsuchiyama, Gen
Yamada, Naoko Nakamura,

Kazuhiro Noguchi, Shigeru Kyuwa, Toru
Urano, Ken-ichi Yamamura

Establishment of mouse embryo/sperm
bank at the center for animal resources
and development, Kumamoto University,
Japan. The 13th International
Mouse Genome Conference, 1999

中瀬直己 マウスの生殖工学技術について
第16回九州実験動物研究会、1999

下田 剛、西川尊樹、中瀬直己、川野佳代、
土山修治、香山敬志、川内 勝、中瀬直己
過排卵処理マウスの排卵数および体外受精
率 に及ぼす輸送の影響について 第16
回九州実験動物研究会、1999

川野佳代、下田剛、土山修治、中瀬直己、西
川尊樹、香山敬志、川内 勝、中瀬直己 輸
送したレシピエントを用いた胚移植成績

第16回九州実験動物研究会、1999

遺伝子改変マウス精子と C57BL/6J 卵子間で
の体外受精成績

中瀬直己、西川尊樹、川野佳代、下田 剛、
土山修治、中瀬直己 第16回九州実験動物
研究会、1999

土山修治、下田剛、西川尊樹、中島竜之、川野佳代、山田源、中瀧直己 体外受精による遺伝子改変マウスの大量作出 第16回九州実験動物研究会、1999

西川尊樹、川野佳代、中島竜之、下田剛、中村直子、中瀧直己
マウス胚バンクシステムについて 第16回九州実験動物研究会、1999

長谷川太郎、鈴木堅太郎、小松義広、神川真美、中村誠司、荻野由紀子 原口竜摩、一鬼勉、中瀧直己、山田源

ノックアウトマウスを用いた歯の発生過程における遺伝子発現階層性 — Mx-1 knockout mouse を中心にして — 第16回九州実験動物研究会、1999

小倉淳郎:顕微授精および核移植クローン技術によるマウス胚の構築。阿蘇シンポジウム1999-遺伝学の挑戦、1999年8月、熊本市

小倉淳郎:精細胞の胚形成能の獲得。第92回繁殖生物学会ジョイントシンポジウム、1999年9月、仙台市

長嶋比呂志、高萩陽一、村上博、藤村達也、栗原隆、小倉淳郎、山本美江、松田潤一郎:ウサギとブタの体細胞クローン。第92回繁殖生物学会ミニシンポジウム、1999年9月、仙台市

宮戸健二、山田源、山田秀一、蓮輪英毅、中村康弘、劉文憲、鈴木健太郎、小財健一郎、小倉淳郎、岡部勝、目加田英輔:CD9欠損マウスは精子と卵子の融合過程に顕著な異常を示す。日本細胞生物学会、1999年、

小倉淳郎:マウスの顕微授精および核移植クローン技術について。第16回九州実験動物研究会、1999年11月、熊本県阿蘇郡

小倉淳郎:顕微授精技術および核移植クロ

ーン技術を用いた雄性生殖細胞からのマウス胚の作出。生殖工学研究会、1999年11月、川崎市

Ogura, A.:Recent Advancement of Gamete/Embryo Engineering in the Mouse。1st Japan-Korea Science and Technology Forum、1999年11月、韓国ソウル市

小倉淳郎:マウスの顕微授精および核移植クローン技術。TARA センターアспект交流会「マウスジェネティクスの新展開」、2000年1月、つくば市

小倉淳郎:マウスの顕微授精技術と核移植クローン技術。第二回比較医学仙台セミナー、2000年2月、松島

G.知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

1999年度
分担研究報告書

小動物の受精卵・胚・精子の保存方法及びモニタリング技術開発等に関する研究

分担研究者 小倉 淳郎 国立予防衛生研究所獣医科学部 室長

研究要旨 実験動物の研究資源としての特性を高めるために、発生工学技術（顕微授精、核移植クローン、遺伝子導入動物作成の開発を行った。顕微授精により、不妊系統マウスの産子を得た。また核移植クローン技術を用いて、卵丘細胞、セルトリ細胞、線維芽細胞から産子を得ることに成功した。

本研究では、実験動物の研究資源としての特性を高めるために、発生工学技術（顕微授精、核移植クローン、遺伝子導入動物作成）の開発を行った。

A. 研究目的

胚や配偶子の顕微操作技術は、系統の保存や新しい実験動物作成のために有効な手段である。本研究では、顕微操作技術のうち、特に未受精卵を用いる技術である顕微授精と核移植クローン技術を用いて、マウス系統の保存・継代、およびトランスジェニックマウス作出の可能性について検討した。

B. 研究方法

卵子は成熟 B6D2F1 ハイブリッドマウス (C57BL/6 x DBA/2) から得た。過排卵処理は常法通り、PMSG - hCG を48時間間隔で各 7.5 IU 腹腔内投与した。hCG後15-18時間で成熟卵子を採取し、卵丘細胞を除去後、実験に用いた。卵子および胚の培養液には、CZB 液を用いた。顕微授精の場合は、精子は精巣上体から、精細胞は精細管から採取した。核移植クローン用のドナー細胞は、排卵卵子の卵丘細胞、新生仔のセルトリ細胞、成体の尾線維芽細胞、胎仔線維芽細胞、胎仔雄性原始生殖細胞を用いた。また、トランスジェニックマウス作出への応用を目的に、セルトリ細胞および胎仔線維芽細胞に *in vitro* でクラゲ由来緑蛍光遺伝子 (green fluorescent protein, GFP) を導入し、それを核移植クローンに用いた。

顕微授精および核移植クローンは、既報通りの方法で実施した。

C. 研究結果と考察

1) 顕微授精

まず、他大学にてトランスジェニック作成過程で得られた挿入変異による精子形成不全マウスの継代を試みた。精巣上体精子はほとんど採取不能のため、精巣内精細胞を凍結保存し、感染研に搬入、融解後に顕微授精に用いた。顕微操作作用ステージ上で8個の伸張精子細胞を発見し、これを顕微授精に用いて8個の受精卵を得、胚移植後に2匹の産子を得た。2匹からはPCR 法にて導入遺伝子の存在を確認した。

別の大学で得られたノックアウトマウスは、卵子上に精子との膜融合因子を欠くため、自然交配および体外受精でも雌性不妊になる。そこで正常精子でこの不妊雌から得た卵子に顕微授精により受精をさせたところ、14匹の産子を得た。これによりこのノックアウトマウス卵子の異常は膜上に限定されること、および顕微授精により継代が可能であることが示された。

これらは、今後増加すると予想されるトランスジェニックあるいはノックアウトマウスの作成により不妊の発現型が生じた場合でも遺伝子を維持する方法として有効であると期待される。

2) 核移植クローン

卵丘細胞：新鮮卵丘細胞から産子を得た。

セルトリ細胞：新鮮、培養、および凍結保存セルトリ細胞から産子を得た。

尾部線維芽細胞：尾部組織の培養後に dish 表面に現れた線維芽細胞から産子を得た。

胎仔線維芽細胞：飢餓培養(starvation)

後に得た線維芽細胞から産子を得た。

胎仔雄性原始生殖細胞：胎齢12.5-15.5日の原始生殖細胞から胎仔を得たが、産子は得られなかった。これはこの時期の原始生殖細胞がゲノム刷込みを消去されているため、胎仔発生に必要な遺伝子が発現していないためであることを確認した。

遺伝子導入動物作成の試み：遺伝子導入したセルトリ細胞および胎仔線維芽細胞から GFP 特異蛍光を発する胚および胎盤を得られたが、産子は得られなかった。遺伝子導入過程での長期化した細胞培養が染色体異常を引き起こしている可能性がある。今後、いかに培養期間を短くするなどの対応が必要であろう。

D. 結論

顕微授精技術を用いることにより、雄性および雌性不妊個体から産子を得ることができた。この方法は、通常の飼育条件で繁殖が困難な系統の保存に用いることができるであろう。核移植クローンにより4種類の細胞から正常個体を得た。遺伝子導入細胞でのクローン作成が今後の課題である。

E. 研究発表

- 1) Miyado, K., Yamada, G., Yamada, S., Hasuwa, H., Nakamura, Y., Ryu, F., Suzuki, K., Kosai, K., Inoue, K., Ogura, A., Okabe, M., and Mekada, E. Requirement of CD9 on the Egg Plasma Membrane for Fertilization. *Science*, 287: 321-324, 2000.
- 2) Mochida, K., Wakayama, T., Takano, K., Noguchi, Y., Yamamoto, Y., Suzuki, O., Ogura, A., and Matsuda, J. Successful cryopreservation of Mongolian gerbil embryos by vitrification. *Theriogenology*, 51: 171, 1999.
- 3) Ogura, A., Inoue, K., Ogonuki, N., Noguchi, A., Takano, K., Nagano, R., Suzuki, O., Lee, J., Ishino, F., and Matsuda, J. Production of male clone mice from fresh, cultured, and cryopreserved immature Sertoli cells. *Biol. Reprod.*, inpress 2000.
- 4) Ogura, A., Inoue, K., Ogonuki, N., Suzuki, O., Mochida, K., Matsuda, J., and Sankai, T. Recent advances in the microinsemination of laboratory animals. *International Journal of Andrology*, 2000.
- 5) Mochida, K., Yamamoto, Y., Noguchi, Y., Takano, K., Matsuda, J., and Ogura, A. Survival

and subsequent development in vitro of hamster embryos after exposure to cryoprotectant solutions. *J. Assist. Reprod. Genet.*, in press, 2000.

- 6) 小倉淳郎, 井上貴美子, 越後貫成美 雄性生殖細胞を用いた顕微授精と核移植。蛋白質核酸酵素 増刊「再生医学と生命科学」印刷中
- 7) 小倉淳郎 顕微授精法—マウス。「卵子研究法」佐藤英明 編:養賢堂; 東京, 印刷中.
- 8) 小倉淳郎 精子形成。「哺乳類の生殖生物学」, 高橋迪雄 編 東京:学窓社, 1999, p. 97-102.
- 9) 小倉淳郎, 井上貴美子 クローン動物—齧歯類. バイオサイエンスの世紀—第14巻「生命工学」, 山村研一 編 東京:共立出版, 印刷中.
- 10) 小倉淳郎, 井上貴美子, 越後貫成美 性分化をめぐる最近の話題 「4. 哺乳類精細胞の受精能」. 産科と婦人科, 66: 1023-1030, 1999.
- 11) 小倉淳郎, 井上貴美子, 越後貫成美 哺乳類の顕微授精. 「哺乳類の生殖生物学」 中野實, 荒木慶彦 編 :アイピーシー, 1999, p.387-406.
- 12) 小倉淳郎, 井上貴美子, 越後貫成美 顕微授精および核移植クローンを用いたマウス胚の構築. 「遺伝学の挑戦 - 阿蘇シンポジウム1999」, 山村研一 編 東京:南山堂, 印刷中.
- 13) 小倉淳郎, 井上貴美子, 越後貫成美, 鈴木 治, 持田慶司, 松田潤一郎 雄性生殖細胞の胚形成能. *J. Reprod. Dev.*, in press 2000.

2. 学会発表

- 1) 小倉淳郎 : 「精細胞を用いた胚の構築」。熊本大学動物資源開発研究センター開設記念講演会、1999年1月、熊本市
- 2) 小倉淳郎:顕微授精および核移植クローン技術によるマウス胚の構築。阿蘇シンポジウム1999-遺伝学の挑戦、1999年8月、熊本市
- 3) 小倉淳郎:精細胞の胚形成能の獲得。第92回繁殖生物学会ジョイントシンポジウム、1999年9月、仙台市
- 4) 長嶋比呂志、高萩陽一、村上博、藤村達

也、栗原隆、小倉淳郎、山本美江、松田潤一郎:ウサギとブタの体細胞クローン。第92回繁殖生物学会ミニシンポジウム、1999年9月、仙台市

5) 宮戸健二、山田源、山田秀一、蓮輪英毅、中村康弘、劉文憲、鈴木健太郎、小財健一郎、小倉淳郎、岡部勝、目加田英輔:CD9欠損マウスは精子と卵子の融合過程に顕著な異常を示す。日本細胞生物学会、1999年、

6) 小倉淳郎:マウスの顕微授精および核移植クローン技術について。第16回九州実験動物研究会、1999年11月、熊本県阿蘇郡

7) 小倉淳郎:顕微授精技術および核移植クローン技術を用いた雄性生殖細胞からのマウス胚の作出。生殖工学研究会、1999年11月、川崎市

8) Ogura, A. :Recent Acvancement of Gamete/Embryo Engineering in the Mouse。1st Japan-Korea Science and Technology Forum、1999年11月、韓国ソウル市

9) 小倉淳郎:マウスの顕微授精および核移植クローン技術。TARA センターアспект交流会「マウスジェネティクスの新展開」、2000年1月、つくば市

10) 小倉淳郎:マウスの顕微授精技術と核移植クローン技術。第二回比較医学仙台セミナー、2000年2月、松島

配偶子のマウス肝炎ウイルス汚染検出及び MHV 国内流行株の遺伝子解析

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（国立感染症研究所）

研究要旨 マウス肝炎ウイルス(MHV)感染動物の配偶子がMHVに汚染しているかを調べる目的で、MHVを腹腔内投与したマウスの配偶子及び生殖器を採取した。RT-PCR法によりMHV遺伝子の検出を行ったところ、配偶子、生殖器ともにMHV遺伝子が検出された。これは投与したウイルスが解剖時に腹腔内に残存しており、採取した組織に付着していたためと思われた。付着したウイルスでもこの方法によって検出できることが判明したが、今後は自然感染に近い経口感染でも配偶子及び生殖器が汚染しているかを調べる必要があると思われた。また、近年国内で流行したMHV株（3施設計9株）のN蛋白コード遺伝子の配列を比較した。遺伝子改変動物コロニーで異なった時期に同一施設で流行した6株はほぼ同一の配列であり、汚染源が同一であると判断した。また、他施設の遺伝子改変動物からの1株がその6株に非常に近い配列を有していた。

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。今回の研究では感染動物から採取した配偶子及び生殖器が清浄であるか否かを検討した。

B. 研究方法

1) 配偶子の汚染検出: 実験1日目午前中にBDF1マウスの腹腔にMHV-JHM株を接種。午後♀に妊馬血清性腺刺激ホルモンを投与。実験3日目午後♀にヒト胎盤性性腺刺激ホルモンを投与し、♂と♀を同居させた。実験5日目に解剖して血液、肝臓、♂

の精子、精巣上体、精巣、♀の卵、卵採取後の卵管、卵巣を採取。組織total RNAをRNaid kitを用いて抽出し、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(図1)。

2) 国内流行株の遺伝子解析: MHVの流行のあった施設から糞便材料を採材し、上記と同様にN蛋白コード遺伝子の全長をRT-PCR法により増幅した。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、現在までに報告されているMHV株の遺伝子配列と比較した。

C. 研究結果

1) 実験に使用したマウスの肝臓からは1次増幅で、血液からは2次増幅で全例からMHV遺伝子が増幅されたので、配偶子を

採材した実験5日目にはマウスはウイルスが血液中に存在するいわゆるウイルス血症の状態であった。♂の精子、精巣、♀の卵、卵管、卵巣からは1次増幅でMHV遺伝子が増幅された(図2,3)。

2) 国内流行株のN蛋白コード遺伝子配列の比較を図4-6に示した。トランスジェニックマウスを扱っている某施設で異なった時期に6回のMHVの流行があったが、この6株(KX1~Ku)は遺伝子配列が非常に近縁であった。この施設と全く接触のない施設のトランスジェニックマウスコロニーで流行した株(O-Pr)の遺伝子配列がこの6株と比較的近い配列であった。また、他施設で異なった時期に2回のMHVの流行があったが、この2株(TY, TM5)は全く異なった遺伝子配列であった。

D. 考察

1) 両性の配偶子及び生殖器からMHV遺伝子が検出された理由として、第1にマウスはウイルス血症の状態であったので、MHVが全身感染を起こしていたために配偶子、生殖器にも感染が成立していた、という解釈が考えられる。しかし、血液中のウイルス遺伝子は2次増幅でのみ検出されたことから、全身感染を起こしているウイルス量は少ないと思われた。一方、配偶子、生殖器からは1次増幅ではっきりしたバンドが認められており、血液中のMHV量に比較して多量のMHVが存在していた。このことから、配偶子、生殖器から検出されたMHVは、おそらく実験開始日に腹腔内接種したウイルスが腹腔内に稽留し、採材時に臓器に付着したことに因ると思われた。以上のようにMHVの起源ははっきりしないが、配偶子のような微量な材料からでもMHV遺伝子が検出可能であることが判明した。今後は、自然感染に多い腸管系のMHV感染の場合

に、配偶子に汚染が認められるか否かを検討する必要があると思われた。

2) 同一施設でくり返し起ったMHVの流行は、その遺伝子配列が非常に近似していることから、同一の汚染源があると思われた。一方、この施設と接触のない施設から採取された株もそれらと比較的近縁であったが、どちらの施設もトランスジェニックマウスを扱っているのも動物の授受等で間接的に接点があったことも考えられる。TYとTM5は同一の施設で異なった時期に流行した株であるが、この2株の遺伝子配列は異なったものであり、2回の流行の汚染源が異なることが示唆された。

E. 結論

1) 各個体から得られる配偶子の核酸量は微量であるが、RT-PCR法によれば配偶子の汚染検出が可能であることが判明した。これにより、凍結保存された配偶子の直接的な汚染検査が可能であることが示唆された。

2) MHV流行株のN蛋白コード遺伝子を解析することにより、株の近縁関係が解明できることが判明した。遺伝子配列の比較は流行の汚染源の解明に有用な手段であると思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yamada, Y. K., and Yabe, M. (2000): Sequence analysis of major structural proteins of newly isolated mouse hepatitis virus. *Exp. Anim.*, 49, 61-66.

Yamada, Y. K., Yabe, M., Ohtsuki, T., and Taguchi, F. (2000): Unique N-linked Glycosylation of Murine Coronavirus MHV-2 Membrane Protein at the Conserved O-linked Glycosylation Site. *Virus Research*, in press.

2. 学会発表

山田靖子、矢部美機子、浅野敏彦：NODscidマウスのマウス肝炎ウイルス持続感染。第46回日本実験動物学会、平成11年5月、市川。

山田靖子：MHVの遺伝子診断-ウイルス遺伝子検出におけるRT-PCR法の長所と短所及び実際の流行時における実用性-。第12回実験動物医学会教育セミナー、平成11年10月、熊本。

山田靖子、矢部美機子、浅野敏彦、佐藤由子、倉田 毅：マウス肝炎ウイルスのscidマウスにおける持続感染と遺伝子変異について。第128回日本獣医学会、平成11年10月、熊本。

山田靖子、矢部美機子、田口文広：マウス肝炎ウイルス MHV-2 型株に特有な M 蛋白の N 型糖鎖付加について。第 47 回日本ウイルス学会、平成 11 年 11 月、横浜。

図1

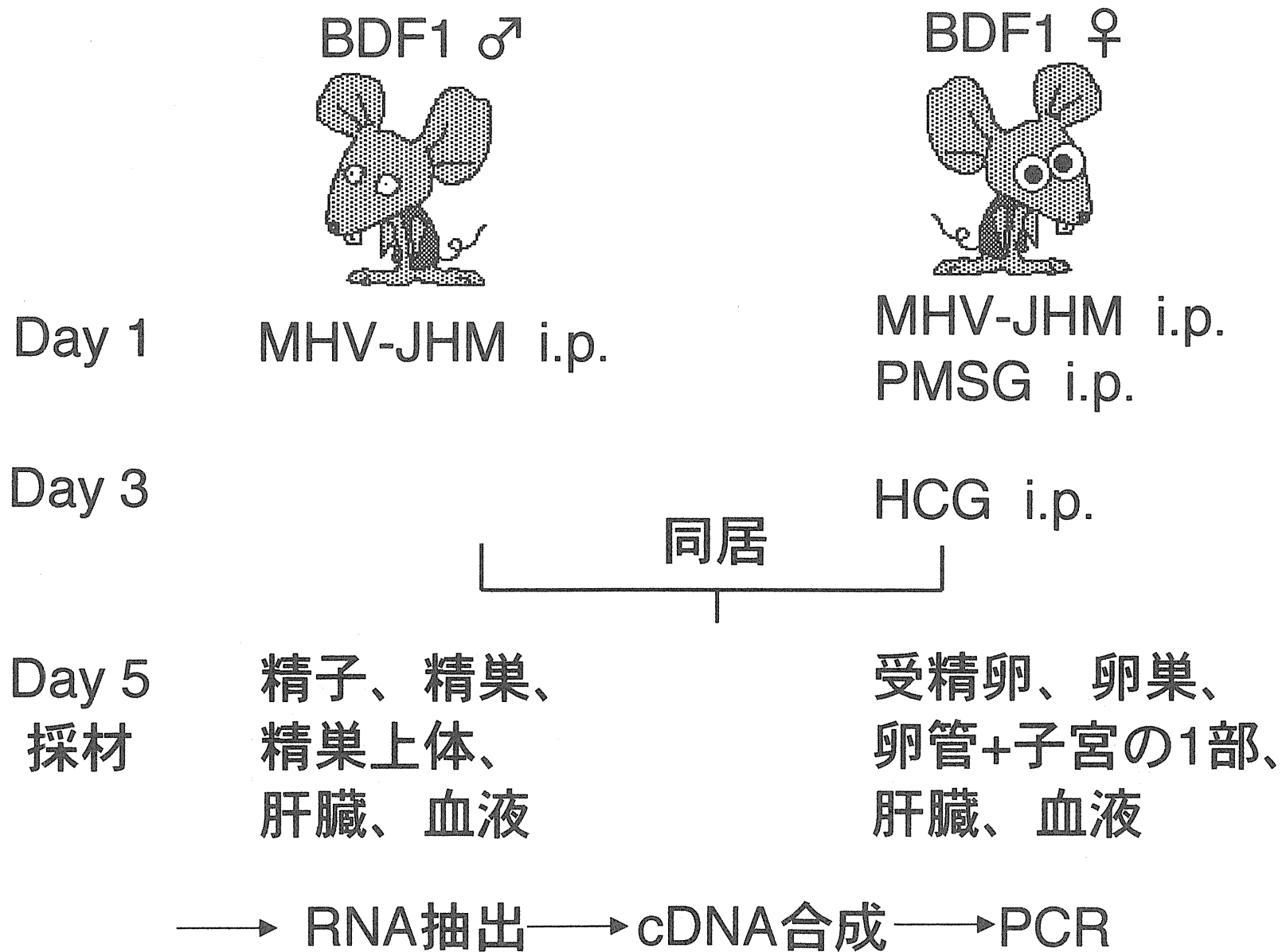
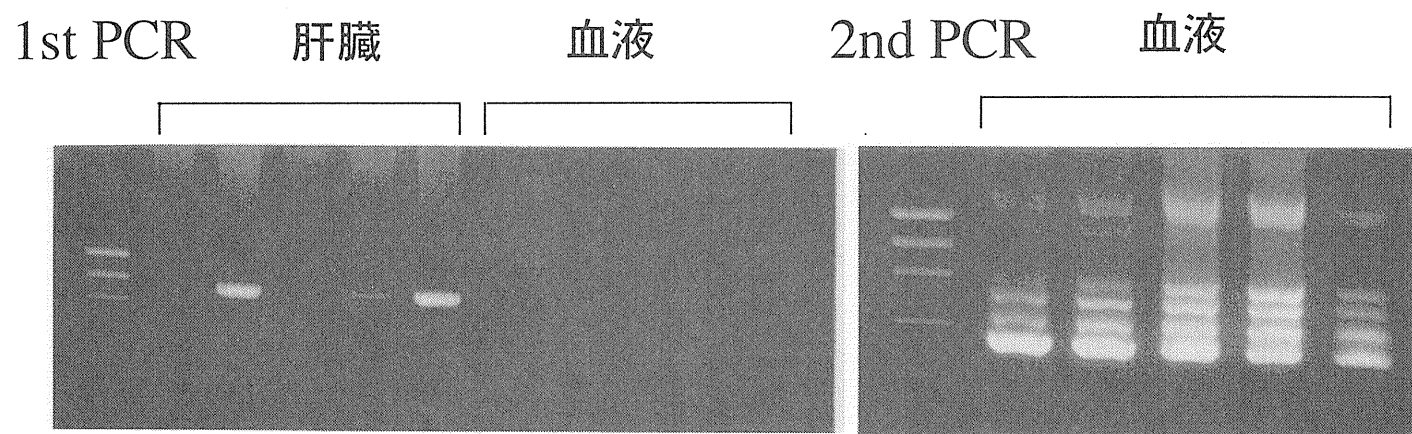
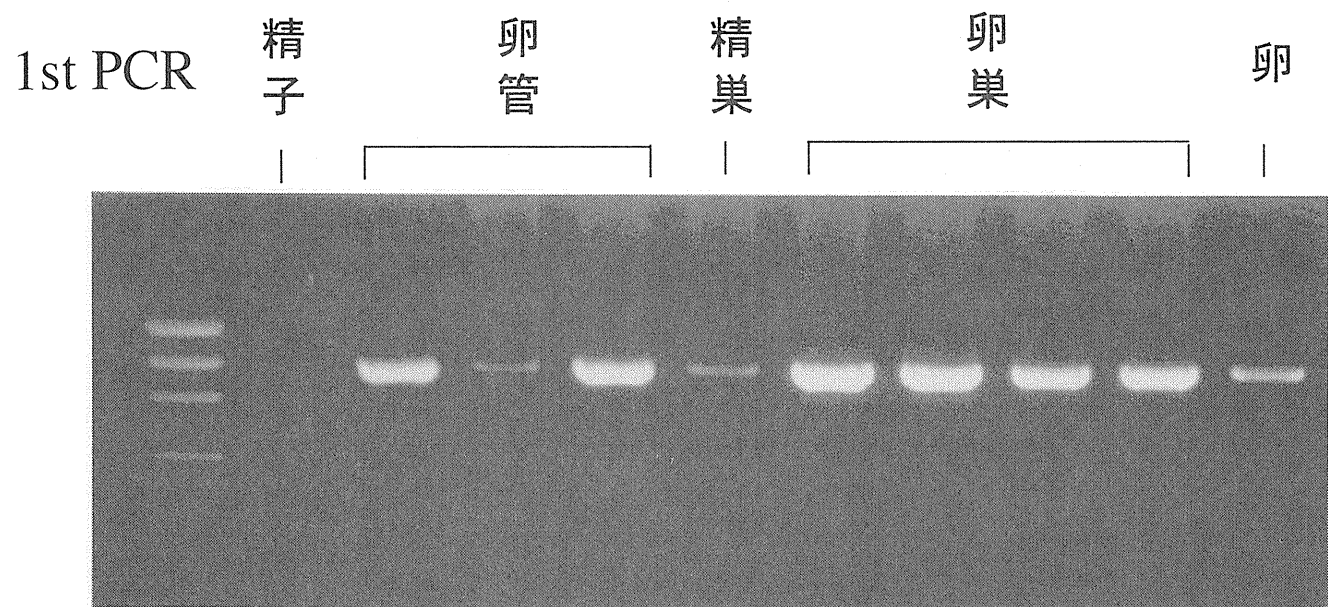


图2



PCR陽性サンプル数

♂			♀		
	1st PCR	2nd PCR		1st PCR	2nd PCR
精子	1/1	1/1	受精卵	2/2	2/2
精巣上体	0/1	0/1	卵管+子宮	3/4	3/4
精巣	1/1	1/1	卵巢	4/4	4/4
血液	0/1	1/1	血液	0/4	4/4
肝臓	1/1	1/1	肝臓	4/4	

図4

マウス肝炎ウイルスN蛋白遺伝子配列の比較 (401-480)

KX1	401	GGCCCCATGCTGGAGCCAGTTACGGAGACAGCATTGAAGGAGTCTTCTGGGTTGCAAACAGTCAAGCGGACACCAACACC	480
KV306	401	480
KQKF3	381T.	460
KQ6E	401	480
KQT2	401	480
Ku	401T.....	480
O-Pr	401C.....	480
RI	401T.....C.....	480
TY	401T.....A.A.....T.....G.....C.....GT	480
A59	401T.....T.....C.....T...	480
MHV3	401T.....C.....T...	480
DVIM	401C...T.....	480
Nu67	401T.....C.....	480
Y	401C...T.....	480
TM5	401T.C.....C..GGAA..T..C..TG.T..C.....GT.....C..C..T..A.....C.....T..G..A.	480
MHVS	401C..AGAG..T..C..GAT..C.....TG.....C.....G.CAA..G..C.....T..G...	480
MHV1	401C..AGAG..T..C..GAT..C..C.....TG.....C.....G.CAA..G..C.....T..G...	480
JHM	401T.....C..AGAG..T..C..GAT..C.....TG.....C.....G.CAA..G..C..G..T.GG...	480
MHV2	389C..AGAG..T..C..GAT..C.....TG.....C.....G.CAA..G..C.....T..G...	468

図5

マウス肝炎ウイルスN蛋白遺伝子配列の比較 (481-560)

KX1	481	CGCGCTGATATTCTTGAAAGGGACCCAAGTAGCCATGAGGCTATTCCTACTAGGTTTGCGCCCGGTACGGTTTTGCCTCA	560
KV306	481	560
KQKF3	461	540
KQ6E	481	560
KQT2	481	560
Ku	481	560
O-Pr	481	560
RI	481G.....T.....C.....A.....	560
TY	481C...GC.....T..A.T.....C.....A.....	560
A59	481	...T.....G.C.....C..T.....C.....A.....	560
MHV3	481	...T.....G.C.....C..T.....C.....A.....	560
DVIM	481	...T.....G.....C.....A.....	560
Nu67	481	...T.....G.....A.....	560
Y	481G.....T.....C.....A.....	560
TM5	481	TC.....GC.....T..C.....	560
MHVS	481	ACT..C.....G.....	560
MHV1	481	ACT..C.....G.....A.....	560
JHM-	481	TCT..C.....G.....A.....	560
MHV2	469	ACT..C...G..G...G.....C..T.....C.....A.....	548