

数の比率は 33.1～95.3%であったが、系統差以外にも、同一系統（GAA, CAT）において、IVFと自然交配では2細胞期胚への発育において顕著な差が認められ、GAA系統ではドナーマウス1匹当りの平均排卵数がIVFで12.7個であったのに対し、自然交配では同様に4.9個であった。逆に2細胞期胚への発育の比率はIVFで13.1%、自然交配では同様に92.3%とその差が明らかであった。また、CAT系統でも同様の結果が認められた。

最終的には病因遺伝子ホモおよびヘテロ別で計30系統（うち平成11年度は10系統）、総計で6403個の2細胞期胚を凍結保存した。なお、これら凍結保存を行った系統のうち7系統が遺伝子改変マウス、他の23系統が自然発症モデルマウスであった。また、例数は2件と少ないが、ドライシッパーを使用してこれら凍結胚を他の研究機関へ運搬した結果も良好であった（データ未掲載）。

#### D. 考察

本研究で試みた疾患モデルマウス胚の凍結保存は、過排卵処置から凍結保存・融解、個体再生に至るまでの技術的側面において、基本的に本領域における研究と同等の成績が示されたと考えられる。

一方で、過排卵処置に対する反応性、同一系統でのIVFと自然交配の場合の排卵数や2細胞期胚への生育率の顕著な差等は、疾患モデルマウスにおける凍結保存・個体再生において系統差や選択手技が最終的な個体再生成績に大きく影響することを示している。また、出産親による喰殺はおそら

くは疾患モデルマウスであるゆえの産児の脆弱性によると考えられ、離乳期までを含めた育種学的なケアについても慎重な対応が求められることが示される。

#### E. 結論

以上の結果から、貴重な遺伝資源であり、かつ医学・生物学的領域において有用な実験材料である疾患モデルマウスの効率的な系統維持および安定した材料供給方法として、本研究で実施した凍結保存が実用的な技術として活用できるものであることを示した。

また疾患モデルマウスにおいては、中核技術である胚の凍結・融解・移植以外にも、交配・過排卵処置・育種といった周辺技術についても一般系統とは異なり、慎重かつ幅広い対応が求められることが明かとなった。従って、今後の疾患モデルマウスの凍結保存に関しては、保管しようとする系統毎に各種技術の組み合わせや飼育管理方法まで含めた慎重な対応が必要である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

##### 2. 学会発表

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

表 1

## Results of Thawing and Transplantation

Strain	Genomic background or Genom type	Thaeing	Num. of		Recip.	Offspring		Weaning		Retio	
			recov.	transp.		neonates	neonates /transp.	M / F	total	weaning /transp.	weaning /stock
C57BL/6J	C57BL/6J	90	79	79	5	38	48.1	20 / 17	37	46.8	41.1
C57BL/10	C57BL/10	100	91	91	5	36	39.6	17 / 17	34	37.4	34.0
IQI/Jic[Gf] (ICR)	IQI/Jic[Gf] (ICR)	7	6	6	1	1	16.7	0 / 0	0	0.0	0.0
C4W	C4W	82	64	64	4	25	39.1	0 / 0	0	0.0	0.0
FVB/N	FVB/N	60	49	49	3	20	40.8	8 / 10	18	36.7	30.0
SJL/J	SJL/J	25	22	22	1	6	27.3	3 / 3	6	27.3	24.0
C57BL/10-nu	<i>nu/nu</i>	205	186	186	10	61	32.8	27 / 31	58	31.2	28.3
C57BL/10-mdx	<i>mdx/mdx</i>	161	133	133	8	50	37.6	11 / 11	22	16.5	13.7
C57BL/10-mdx-nu	<i>mdx/mdx-nu/+</i>	78	60	60	4	28	46.7	14 / 13	27	45.0	34.6
	<i>mdx/mdx-nu/nu</i>	176	148	148	7	26	17.6	14 / 12	26	17.6	14.8
	<i>mdx/mdx-nu/nu,</i> <i>mdx/mdx-nu/+</i>	20	18	18	1	3	16.7	1 / 2	3	16.7	15.0
C57BL/6J-dy	<i>dy/dy, dy/+, +/+</i>	264	205	205	11	48	23.4	20 / 36	56	27.3	21.2
C57BL/6J-dy-2J	<i>dy<sup>2J</sup>/dy<sup>2J</sup>, dy<sup>2J</sup>/+</i>	62	50	50	3	23	46.0	13 / 10	23	46.0	37.1
	<i>dy<sup>2J</sup>/dy<sup>2J</sup></i>	28	23	20	1	4	20.0	2 / 2	4	20.0	14.3
	<i>dy<sup>2J</sup>/+</i>	40	33	33	2	11	33.3	6 / 4	10	30.3	25.0
B6C3Fe-a/a-myD	<i>myd/myd, myd/+</i>	80	69	69	4	26	37.7	14 / 9	23	33.3	28.8
shiverer	<i>sv/sv</i>	67	57	57	3	16	28.1	7 / 9	16	28.1	23.9
staggerer	<i>sg/sg, sg/+</i>	50	44	44	3	18	40.9	6 / 12	18	40.9	36.0
reeler	<i>rl/rl, rl/+, +/+</i>	71	63	63	4	22	34.9	10 / 9	19	30.2	26.8
weaver	<i>wv/wv, wv/+, +/+</i>	40	35	35	2	16	45.7	7 / 8	15	42.9	37.5
quacking	<i>qk/qk, qk/+, +/+</i>	16	12	12	1	4	33.3	2 / 2	4	33.3	25.0
nmd	<i>nmd/+</i>	35	28	28	2	10	35.7	0 / 0	0	0.0	0.0
pygmy	<i>pg/pg, pg/+, +/+</i>	40	36	36	2	14	38.9	5 / 8	13	36.1	32.5
dwarf	<i>dw/dw, dw/+, +/+</i>	40	31	31	2	14	45.2	4 / 3	7	22.6	17.5

表 2. 1

## Results of Hyperovulation and Cultures for 2-cell cryo-preservation (1)

Strain	Genomic background or Genom type	Number of donors	Insemination	Hyperovulation		normal 2 cells	Percentage of 2cells
				oocytes	mean		
C57BL/6J	C57BL/6J	72	IVF	1337	18.6	789	59.0
C57BL/10	C57BL/10	19	IVF	260	13.7	235	90.4
IQI/Jic[Gf] (ICR)	IQI/Jic[Gf] (ICR)	9	IVF	110	12.2	50	45.5
	IQI/Jic[Gf] (ICR)	32	NM	385	12.0	367	95.3
FVB/N	FVB/N	3	IVF	60	20.0	54	90.0
FGS/N	FGS/N	20	IVF	181	9.1	157	86.7
NC/Jic	NC/Jic	10	IVF	348	34.8	295	84.8
C.B-17/lcr-scid	<i>lcr<sup>scid</sup> / lcr<sup>scid</sup></i>	9	IVF	145	16.1	48	33.1
C57BL/10-nu	<i>nu/nu</i>	6	IVF	65	10.8	48	73.8
	<i>nu/+</i>	37	IVF	831	22.5	464	55.8
C57BL/10-mdx	<i>mdx/mdx</i>	34	IVF	373	11.0	143	38.3
C57BL/10-mdx-nu	<i>mdx/mdx-nu/+</i>	107	IVF	2237	20.9	975	43.6
	<i>mdx/mdx-nu/nu, mdx/mdx-nu/+</i>	12	IVF	220	18.3	155	70.5
	<i>mdx/mdx-nu/nu</i>	8	IVF	117	14.6	46	39.3
C57BL/6J-dy	<i>dy/+</i>	9	IVF	124	13.8	72	58.1
C57BL/6J-dy-2J	<i>dy2J/+</i>	25	IVF	313	12.5	203	64.9
B6C3Fe-a/a-myd	<i>myd/myd</i>	2	IVF	21	10.5	16	76.2
Shiverer	<i>sv/sv</i>	6	IVF	27	4.5	18	66.7
Weaver	<i>wv/wv, wv/+, +/+</i>	10	IVF	204	20.4	132	64.7
				7358	4.5 - 34.8	4057	33.1 - 95.3

表 2. 2

Results of Hyperovulation and Cultures for 2-cell cryo-preservation (2)

Strain	Genomic background or Genom type	Number of donors	insemination	Hyperovulation		normal 2 cells	Percentage of 2cells
				oocytes	mean		
Ts65Dn	torisomy	53	IVF	1018	19.2	613	60.2
Tc65Dn	torisomy ( control )	79	IVF	1873	23.7	1221	65.2
DYS (exon52)	hetero, wild	49	IVF	1039	21.2	652	62.8
	homo, hetero, wild	26	IVF	673	25.9	417	62.0
GAA (exon6)	homo	48	IVF	610	12.7	80	13.1
	homo	8	NM	39	4.9	36	92.3
CAT33 (N8)	homo	7	IVF	106	15.1	42	39.6
	homo	3	NM	36	12.0	36	100.0
CAT34 (N8)	homo	6	IVF	98	16.3	58	59.2
	homo	25	NM	277	11.1	266	96.0
CAT35 (N10)	homo	9	IVF	114	12.7	37	32.5
	homo	18	NM	243	13.5	227	93.4
				6090	4.9 - 25.9	3685	13.1 - 100.0
				7358	4.5 - 34.8	4057	33.1 - 95.3
				13348	4.5 - 34.8	7427	13.1 - 100.0

刊行書籍又は雑誌名(雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日	刊行書店名	執筆者名
Chromosomes of mouse primary spermatocytes undergo meiotic divisions after incorporation into homologous immature oocytes. <i>Zygote</i> , 5: 177-182	1997		Ogura, A., Wakayama, T., Suzuki, O., Shin, T.-Y., Matsuda, J., and Kobayashi, Y.
卵子活性化の機序(特集「生殖医学Today」)。産婦人科の実際, 12: 1803-1808,	1997		小倉淳郎。
マウス、ラットの遺伝子地図、アニテックス、Vol. 10 (2): 67-74,	1998		加藤秀樹
Rac1 is required for the fomatation of three germ layers during gastrulation. (1998) <i>Oncogene</i> 17 3427-3433	1998		Sugihara,K., Nakatsuji,N., Nakamura,K., Nakao, K., Hashimoto,R., Otani,H., Sakagami,H., Kondo,H., Nozawa,S., Aiba,A. and Katsuki,M.
Assessment of human CD4+ and CD8+ T lymphocyte responses in experimental viral vaccine studies. <i>Preclinical and Clinical Development of New Vaccines</i> , Edited by S. Plotkin, F. Brown and F. Horaud, vol 95, pp. 95-104, <i>Developments in Biological Standardization</i> , Basel, Karger.	1998		Rothman, A. L., Yamada, Y., Jameson, J., Cruz, J., West, K., Green, S., and Ennis, F. A.
Application of nested polymerase chain reaction to detection of mouse hepatitis virus in fecal specimens during a natural outbreak in an immunodeficient mouse colony. <i>Exp. Anim.</i> , 47, 261-264.	1998		Yamada, Y. K., Yabe, M., Takimoto, K., Nakayama, K., and Saitoh, M.
Differential receptor-functionality of the two distinct receptor proteins for mouse hepatitis virus. <i>Coronaviruses and Arteriviruses</i> , Edited by L. Enjuanes, S. G. Siddell and W. Spaan, pp. 77-80, <i>Plenum Press</i> , New York.	1998		Ohtsuka, N., Yamada, Y. K., and Taguchi, F.
In vivo detection of mutations induced by Aflatoxin B1 using human CYP3A7/HITEC hybrid mice. (1998) <i>Biochem Biophys Res Commun</i> 250 150-153	1998		Yamada,A., Fujita,K., Yokoi,T., Muto,S., Suzuki, A., Gondo,Y., Katsuki,M. and Kamataki,T.
The high susceptibility of heterozygous p53(+/-) mice to malformation after foetal irradiation is related to sub-competent apoptosis. (1998) <i>Int J Radiat Biol</i> 74 419-429	1998		Nomoto,S., Ootsuyama, A., Shioyama, Y., Katsuki,M., Kondo,S. and Norimura,T
Rac1 is required for the fomatation of three germ layers during gastrulation. (1998) <i>Oncogene</i> 17 3427-3433	1998		Sugihara,K., Nakatsuji,N., Nakamura,K., Nakao, K., Hashimoto,R., Otani,H., Sakagami,H., Kondo,H., Nozawa,S., Aiba,A. and Katsuki,M.
In vivo detection of mutations induced by Aflatoxin B1 using human CYP3A7/HITEC hybrid mice. (1998) <i>Biochem Biophys Res Commun</i> 250 150-153	1998		Yamada,A., Fujita,K., Yokoi,T., Muto,S., Suzuki, A., Gondo,Y., Katsuki,M. and Kamataki,T.
Contamination of mouse-adapted influenza virus with sendai virus. <i>Exp. Anim.</i> , 47, 137-140.	1998	日本実験動物学会	Takimoto, K., Nakayama, K., Yabe, M., Ami, Y., Yamada, Y. K., Tamura, S., Suzuki, Y., Asano, T., and Saito, M.
Severe osteopetrosis, defective interleukin-1 signalling and lymph node organogenesis in TRAF6-deficient mice. (1999) <i>Genes to Cells</i> 4 353-362	1998		Naito,A., Azuma,S., Tanaka,S., Miyazaki,T., Takaki,S., Takatsu,K., Nakao,K., Nakamura,K., Katsuki,M., Yamamoto,T. and Inoue,J
Mice lacking smooth muscle calponin display increased bone formation that is associated with enhancement of bone morphogenetic protein responses. (1998) <i>Gene to Cells</i> 3 685-695	1998		Yoshikawa,H., Taniguchi,S., Yamamura, H., Mori,S., Sugimoto,M., Miyado,K., Nakamura,K., Nakao,K., Katsuki,M., Shibata,N. and Takahashi,K.
哺乳類精細胞の受精卵形成能。蛋白質 核酸 酵素増刊「生殖細胞の発生と性分化」43: 522-529,	1998		小倉淳郎, 松田潤一郎, 鈴木 治
Production of chimeric mice from cryopreserved blastocysts. <i>J.Exp Anim</i> 47 167-171	1998		Nakao,K., Nakagata,K. and Katsuki,M.
Microtubule organization in hamster oocytes after fertilization with mature spermatozoa and round spermatids. <i>J. Reprod. Dev.</i> , 44: 185-189,	1998		Shin, T.-Y., Noguchi, Y., Yamamoto, Y., Mochida, K., and Ogura, A.
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		中瀧直己
Cryopreservation of gene disrupted mouse spermatozoa <i>J. Mamma.Ova Res.</i> 15:77-80,	1998		M.Okamoto,N.Nakagata,O.Ueda,N.Kamada and H.Suzuki

Requirement of proteolytic cleavage of the murine coronavirus MHV-2 spike protein for fusion activity. <i>Coronaviruses and Arteriviruses</i> , Edited by L. Enjuanes, S. G. Siddell and W. Spaan, pp. 89-93, Plenum Press, New York.	1998	Yamada, Y. K., Takimoto, K., Yabe, M., and Taguchi, F.
Development of a successful in vitro fertilization procedure and partial characterization of the gamete in the <i>Mastomys</i> ( <i>Praomys coucha</i> ): a new species for laboratory research in reproductive biology. <i>Biol. Reprod.</i> , 58: 226-233	1998	Nohara, M., Hirayama, T., Ogura, A., Hiroi, M., and Araki, Y.
Analysis of CpG island of trophoblast giant cells by restriction landmark genomic scanning. <i>Dev. Gen.</i> , 22: 132-140,	1998	Ohgane, J., Aikawa, J., Ogura, A., Ogawa, T., and Shiota, K.
Overexpression of a minor component of myelin basic protein isoform (17.2kDa) can restore myelination in transgenic shiverer mice.(1998) <i>Brain Res</i> 785 245-252	1998	Kimura,M., Sato,M., Akatsuka,A., Saito,S., Ando,K., Yokoyama,M. and Katsuki,M.
Development of normal mice from metaphase I oocytes fertilized with primary spermatocytes. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 95: 5611-5615	1998	Ogura, A., Suzuki, O., Tanemura, K., Mochida, K., Kobayashi, Y., and Matsuda, J.
Fertilizing ability of spermatogenic cells in mammals. In: <i>Reproductive Biology Update</i> , edited by Miyamoto, H. and Manabe, N. Kyoto, Japan:Shoukadoh Booksellers, 1998, p. 199-205.	1998	Ogura, A.
Birth of pups by transfer of <i>mastomys</i> embryos cryopreserved by vitrification. <i>Biol. Reprod.</i> , 58: Abs.348, 1998.	1998	Mochida, K., Matsuda, J., Noguchi, Y., Yamamoto, Y., Nakayama, K., Takano, K., Suzuki, O., and Ogura, A.
Successful cryopreservation of Mongolian gerbil embryos by vitrification. <i>Theriogenology</i> , 51: 171	1999	Mochida, K., Wakayama, T., Takano, K., Noguchi, Y., Yamamoto, Y., Suzuki, O., .. Ogura, .. A., and Matsuda, J.
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
Restoration of resistance to osmotic swelling of vitrified mouse embryos by short-term culture. <i>Cryobiology</i> 38, 273-280	1999	Edashige K, Asano A, An TZ, Kasai M.
Involvement of distinct cellular compartments in the abnormal lymphoid organogenesis in lymphotoxin- $\alpha$ - deficient mice and alymphoplasia (aly) mice define by the chimeric analysis. <i>J.Immunol.</i> , 163:1584-1591,	1999	Matsumoto,M.,Iwamasa,K.,Rennert,P.,Yamada, T.,Suzuki,R.,Matsushima,A.,Okabe,M.,Fujita,S. & Yokoyama,M.
Possible usage of the firefly luciferase gene as a gene expression marker in preimplantation embryos from transgenic mice. <i>Mem. Researc hInst. B.O.S.T. Kinki University</i> . 2 : 11-18	1999	K.Matsumoto, M.Anzai, N.Nakagata,K.Miyata, H.Kato, K.Saeki, Y. Hosoi and A.Iritani
Spermatid nuclei can support full term development after premature chromosome condensation within mature oocytes. <i>Hum. Reprod.</i> , 14: 1294-1298,	1999	Ogura, A., Inoue, K., and Matsuda, J.
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.	1999	小倉淳郎, 井上貴美子, 越後貫成美
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	横山峯介
精子形成.「哺乳類の生殖生物学」, 高橋迪雄 編 東京:学窓社, p. 97-102.	1999	小倉淳郎
Loss of the transcription factor IRF-1 affects tumor susceptibility in mice carrying Ha-ras transgene or nullizygosity for p53. <i>Gene Dev</i> 15 1240-5	1999	Nozawa,H., Oda,E., Nakao, K., Ishihara,M., Ueda,S., Yokochi,T., Ogasawara,K., Nakatsuru, Y., Shimizu,S., Ohira,Y., Hioki,K., Aizawa,S., Ishikawa,T., Katsuki,M., Muto,T., Taniguchi,T. and Tanaka,N.
Localization of phospholipase C isozymes in the mouse cerebellum. <i>Biochem Biophys Res Commun</i> 265 473-478	1999	Sugiyama,T., Hirono,M., Suzuki,K., Nakamura, Y., Aiba,A., Nakamura,K., Nakao,K., Katsuki,M. and Yoshioka,T.
Morphological modifications in hamster spermatogenic cell nuclei incorporated into homologous oocytes by electrofusion. <i>Mol. Reprod. Dev.</i> , 23: 66-73,	1999	Usui, N., 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.	1999		Ogura, A. and Yanagimachi, R.
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
Viable spermatozoa can be recovered from refrigerated mice up to 7 days after death. Cryobiology 38, 27-34 (1999).	1999		An TZ, Wada S, Edashige K, Sakurai T, Kasai M.
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 印刷中	2000	東京:南山堂	小倉淳郎, 井上貴美子, 越後貫成美
Expression of mRNAs of the aquaporin family in mouse oocytes and embryos. Cryobiology 40, in press	2000		Edashige K, Sakamoto M, Kasai M.
PLC-independent Ca <sup>2+</sup> rise via muscarinic receptors in the mouse suprachiasmatic nucleus. (1999) Neuroreport in press	2000		Ikedo, M., Sugiyama, T., Suzuki, K., Moriya, T., Shibata, S., Katsuki, M., Allen, C.N. and Yoshioka, T.
Requirement of CD9 on the Egg Plasma Membrane for Fertilization. Science, 287: 321-324	2000		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
雄性生殖細胞の胚形成能. J. Reprod. Dev., in press	2000		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
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		葛西孫三郎
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.	2000		小倉淳郎
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	2000		小倉淳郎, 井上貴美子, 越後貫成美
Unique N-linked glycosylation of murine coronavirus MHV-2 membrane protein at the conserved O-linked glycosylation site. Virus Research, in press.	2000		Yamada, Y. K., Yabe, M., Ohtsuki, T., and Taguchi, F.
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	2000	東京: 共立出版	小倉淳郎, 井上貴美子
Survival and subsequent development in vitro of hamster embryos after exposure to cryoprotectant solutions. J. Assist. Reprod. Genet., (in press).	2000		Mochida, K., Yamamoto, Y., Noguchi, Y., Takano, K., Matsuda, J., and Ogura, A.
Sequence analysis of major structural proteins of newly isolated mouse hepatitis virus. Exp. Anim., 49, 61-66.	2000		Yamada, Y. K., and Yabe, M.
Recent advances in the microinsemination of laboratory animals. Int. J. Androl., (in press).	2000		Ogura, A., Inoue, K., Ogonuki, N., Suzuki, O., Mochida, K., Matsuda, J., and Sankai, T.
Production of male clone mice from fresh, cultured, and cryopreserved immature Sertoli cells. Biol. Reprod., (in press).	2000		Ogura, A., Inoue, K., Ogonuki, N., Noguchi, A., Takano, K., Nagano, R., Suzuki, O., Lee, J., Ishino, F., and Matsuda, J.
Birth of mice after nuclear transfer by electrofusion using tail tip cells. Mol. Reprod. Dev., in press	2000		Ogura, A., Inoue, K., Takano, K., Wakayama, T. and Yanagimachi, R.



