

厚生労働省 ヒトゲノム・再生医療等研究事業

疾患関連遺伝子の機能解明のための実験動物研究資源の  
基盤整備に関する研究

課題番号 H14-ゲノム-008

平成14年度 研究報告

主任研究者 松田潤一郎

(国立感染症研究所)

平成15年3月

# 目 次

## 統括研究報告

- 疾患関連遺伝子の機能解明のための実験動物研究資源の基盤整備に関する研究・・・1  
主任研究者 松田潤一郎 国立感染症研究所 獣医科学部 第四室長

## 分担研究報告

- 疾患モデル動物研究資源の維持管理、胚・配偶子等の保存に関する研究・・・4  
松田潤一郎 国立感染症研究所 獣医科学部 第四室長
- 疾患関連遺伝子の機能解明のための実験動物研究資源の基盤整備に関する研究・・・6  
葛西 孫三郎 高知大学農学部教授
- マウス胚、配偶子および卵巣の保存技術の開発・・・9  
横山 峯介 三菱化学生命科学研究所マウスゲノム工学センター長
- 遺伝子改変マウスの保存供給体制の確立に関する研究・・・11  
中潟直己 熊本大学動物資源開発研究センター 資源開発分野 教授
- 卵巣内卵子の有効活用による新規生殖工学技術の開発・・・13  
鈴木 治 国立感染症研究所 獣医科学部 主任研究官
- 実験動物の体細胞核移植クローン技術の開発に関する研究・・・14  
小倉 淳郎 理化学研究所バイオリソースセンター室長
- 胚・配偶子の遺伝学的モニタリング技術の開発・・・17  
加藤秀樹 浜松医科大学医学部附属動物実験施設 助教授
- 胚・配偶子の微生物学的モニタリング技術の開発・・・18  
山田靖子 国立感染症研究所 動物管理室 主任研究官
- 研究成果の刊行に関する一覧表・・・28
- 文献・・・32

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
総括研究報告書

疾患関連遺伝子の機能解明のための実験動物研究資源の基盤整備に関する研究

主任研究者 松田潤一郎 国立感染症研究所獣医科学部 室長

**研究要旨**

本研究では、疾患モデル動物を中心とした実験動物研究資源の基盤整備を目的とし、各種実験動物の胚・配偶子等の保存、新規生殖工学技術の開発、遺伝学的及び微生物学的品質管理などに関する総合的研究を行った。（１）保存に関しては、①疾患モデルとして重要であるマストミス及びスナネズミの精子凍結保存法の開発を行った。②マウス卵母細胞に水チャンネルを発現させ、耐凍性を向上させることに成功した。③マウス卵巣の凍結保存に簡便なガラス化法が有効であることを示した。④凍結マウス精子の耐凍性に系統差があり、融解後の受精能と形態的異常精子の割合に強い相関があることを示した。（２）新規生殖工学技術として、①良質な卵子を得るために幼若期の卵胞発育の基礎研究を行った。②マウスおよびウサギの体細胞クローンの解析および技術改良を行った。（３）遺伝学的及び微生物学的品質管理については、①精子細胞の核 DNA を用いたマイクロサテライト DNA マーカーの検出が可能であることを示した。②ウサギ、ハムスター、スナネズミの病原体検査法について、２次抗体を選択することにより市販の抗原、抗体を用いて ELISA 法が可能であることが示唆された。

**分担研究者**

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マウスゲノム工学センター長
中潟直己	熊本大学動物資源開発研究センター教授
鈴木治	国立感染症研究所獣医科学部主任研究官
小倉淳郎	理化学研究所バイオリソースセンター室長
加藤秀樹	浜松医科大学医学部附属動物実験施設助教授
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**

ヒトゲノム解析が急速に進展することにより、ゲノム情報に基づいた病気の発症機構の解明、治療法開発、予防医学などのゲノム医学、あるいは画期的な治療薬を開発するなどのゲノム創薬の発展が期待されている。これらを強力に推進するためには個体レベルの研究が必須であり、ヒトのモデルとなる疾患モデル動物を用いた研究が不可欠である。そこで本研究では、疾患モデル動物を中心として、ゲノム医学、ゲノム創薬などの研究にスムーズに有効に利用されるための実験動物研究資源の基盤整備を目的とし、実験動物研究資源の開発、維持管理、胚・配偶子等の保存、供給、遺伝学的及び微生物学的品質管理などに関する総合的

研究を行った。また本研究では、マウスのみならずスナネズミ、マストミスなど各種動物についても疾患モデルとして貴重であることから、研究対象として積極的に取り上げた。これらにより、ヒトの疾患関連遺伝子の機能が解明され、予防法、治療法、治療薬などの開発に結びつき、国民の健康、福祉の一層の向上に寄与することが期待される。

**B. 研究方法**

１）マストミス及びスナネズミ精子の凍結保存法の開発：マストミス及びスナネズミの精巣上体精子を用い、凍害保護剤としての各種糖、卵黄などの検討、凍結融解方法の検討を行った。（松田、協力研究者：明治大学太田昭彦）

２）水チャンネル発現による卵母細胞の凍結保存：凍結保存が困難な卵子などの凍結保存法の改良の一環として、卵母細胞にアクアポリン（AQP）3 の cRNA を注入して発現させ、グリセロールによる凍結を試みた。（葛西）

３）マウス卵巣凍結保存法の開発：発光タンパク質 GFP を全身に発現するトランスジェニックマウスの卵巣をマウス初期胚用の簡易ガラス化法を修正して凍結した。融解卵巣を野生型雌の卵巣嚢内に移植し、雄と交配させ産仔を得た。（横山）

４）凍結マウス精子の形態的障害に関する研究：マウス精子における凍結融解後の受精能低下の原因を追求する目的で、受精能が極めて低い C57BL/6J など 3 系統の精子を凍結融解し、運動性、電子顕微鏡による形態学的観察、

体外受精による受精能の検討を行った。(中瀉)

5) 卵巣内卵子の有効活用に関する研究: 良質な卵子を得るための基礎研究として、マウス(BDF1)幼若期の卵胞発育を利用し、幼若期卵巣から得た卵子を体外成熟・体外受精させるとともに、採取日齢の異なる体外成熟卵子をディファレンシャルディスプレイ(DD)法により解析し差次的発現遺伝子を検索した。

(鈴木)

6) 体細胞核移植クローン技術の開発: マウスクローン作製は、除核卵子へドナー細胞核を注入あるいは電気融合により移植し、卵子のストロンチウムによる活性化後に胚培養および胚移植を行った。ウサギクローン作製はマウスと基本的に同じ方法であるが、除核は卵子の遠心による可視化、活性化はIP3により行った。(小倉)

7) 遺伝性疾患動物の遺伝的品質検査: 遺伝性疾患マウスとして C57BL/6J-*ob* 等 6 系統を用い、遺伝的背景の検査法では *Akpl* 等 18 項目の生化学マーカーを検査し、*ob* (*obese*) および *db* (*diabetes*) 遺伝子は特異的なプライマーを用いた PCR 法により、また *fsn* (*flaky skin*) 遺伝子についてはマイクロサテライト DNA マーカーを用いた間接的な遺伝子診断を試みた。精子からの核 DNA 抽出は常法により行った。(加藤)

8) 各種実験動物の血清抗体検査-ELISA 法の確立: 市販の病原体検出法がない動物種、ウサギ、モルモット、ハムスター、スナネズミの ELISA 法による抗体検出系を確立することを目的とし、各動物種にワクシニアウイルスを接種し感染血清を得、感染血清または過免疫血清(ウサギ)を陽性コントロールとして、最適な 2 次抗体の検討を行った。(山田、協力研究者: 感染研動物管理室 滝本一広、矢部美機子)

(倫理面への配慮)

実験動物については、各施設に於ける実験動物委員会等の承認を得、適切な取り扱いを行った。

### C. 研究結果

1) マストミス及びスナネズミ精子の凍結保存法の開発: 両種の精子凍結には、ラフィノースと卵黄に界面活性剤を添加した保存液が有効であり、凍結融解精子の運動精子率は 15~50%程度を示し、活発な運動性を示す精子が得られた。

2) 水チャンネル発現による卵母細胞の凍結保存: 水を注入した対照区の卵子は、凍結融

解後全く生存しなかったのに対し、AQP3 cRNA を注入した卵子は約 70%が生存し、体外受精により約 40%の卵子が受精していた。

3) マウス卵巣凍結保存法の開発: 凍結保存した卵巣を移植した 11 匹のレシピエント雌のうち 6 匹 (54.5%) で妊娠が成立し、合計で 38 匹の産仔が得られた。このうちの 12 匹 (31.6%) が移植卵巣由来の GFP 陽性個体であった。

4) 凍結マウス精子の形態的障害に関する研究: 凍結融解精子において、運動性は調べた 3 系統においてほぼ一定であったが、電子顕微鏡で観察した形態異常精子の割合が高い C57BL/6J で体外受精率をもっとも悪かった。

5) 卵巣内卵子の有効活用に関する研究: 16 日齢から 24 日齢の間で、卵巣卵子の発生能獲得が徐々に起き、17 日齢由来に比べ 24 日齢由来卵子で Hepatoma-Derived Growth Factor (HDGF) が高い発現を示すことが新たに判明した。

6) 体細胞核移植クローン技術の開発: マウスでは、実験条件の改善による安定化に成功し、またドナーの細胞種と遺伝子背景を選択することより有意に出産効率が改善することを明らかにした。ウサギでは、核移植後の卵子活性化の方法を改良することにより、初めてクローン胎仔を得ることに成功した。

7) 遺伝性疾患動物の遺伝的品質検査: 遺伝的背景の検査の結果、*fsn* 遺伝子のコンジェニック系統を除いて正しいことが証明され、*ob* および *db* 遺伝子は PCR 法により判定可能であった。*fsn* 遺伝子はマイクロサテライトマーカーによる間接的遺伝子診断によりほぼ 100%の確率で行えた。凍結精子  $1\mu\text{l}$  から核 DNA が効率良く抽出された。

8) 各種実験動物の血清抗体検査-ELISA 法の確立: ELISA 法の 2 次抗体の検討を行ったところ、ウサギでは Protein G、ハムスターでは抗ハムスター IgG 抗体、スナネズミでは抗マウス IgG 抗体が最適であり、ELISA の条件が確立された。モルモットは今回は陽性血清が得られなかった。

### D. 考察

マストミス及びスナネズミの精子凍結には、糖としてはマウス精子と同様にラフィノースが有効であり、さらに卵黄を加えることで運動精子率の向上が得られた。今後、凍結融解精子の受精能力の確認が必要である。

AQP3 cRNA を注入することで卵子の耐凍性を向上させることが可能であることが明らかとなった。この手法を応用することにより、

従来凍結保存が困難な細胞の凍結保存が可能になることが期待される。

マウス卵巣凍結は、従来は2-3時間かけて緩やかに冷却する緩慢凍結法で実施されたものがほとんどであったが、本実験によって、簡易ガラス化法を修正した方法で、短時間で卵巣の凍結保存が可能であることが示された。

凍結融解後の形態異常精子の割合が、C57BL/6J 精子で極めて高い値を示したことから、C57BL/6J 凍結精子の低い受精能は、凍結融解過程による細胞障害に起因していることが強く示唆された。

B6D2F1 マウスの卵巣内卵子は、17日齢以降から卵子の発生能獲得が行われることが確認された。発生能を反映する遺伝子の検索をDD法を用いて行ったところ、新規にHDGFの差次的発現が観察され、良質卵子の採取のためには、こうした成長因子の関与を配慮する必要があると思われた。

クローンマウスを得るという実用面での改善は、ドナー細胞種と遺伝子型を選ぶことにより可能であった。解析用に多数のクローンマウスが必要になる場合には、極めて有効な方法である。ウサギクローンに関しては、卵子の正常な活性化が困難なため、この点で技術的改善を試み、まだ効率は低い、胎仔を得ることに成功した。

疾患モデル系統の遺伝背景の検査は従来のモニタリングシステムにより有効に行われることが示された。また、疾患遺伝子 *fsn* は間接的な遺伝子診断に有効なマイクロサテライトマーカーの選択により高い確率で診断が可能となったことから他の遺伝子についても広く適用できることが分かった。精子細胞からの核DNA抽出は常法により問題なく行うことができた。

市販の病原体検査 ELISA キットのない動物種、ウサギ、モルモット、ハムスター、スナネズミについて、今回の研究により ELISA の条件が確立されたので、市販の HVJ や Tyzzer 菌に対する抗原を用いて陽性血清コントロール無しでも抗体検出が可能であることが示唆された。モルモットについては今回陽性血清が得られなかったため、異なる方法で検討する予定である。

#### E. 結論

本研究では、疾患モデル動物を中心とした実験動物研究資源の基盤整備を目的とし、各種実験動物の胚・配偶子等の保存、新規生殖工学技術の開発、遺伝学的及び微生物学的品質管理などに関する総合的研究を行った。

(1) 保存に関しては、①疾患モデルとして重要であるマストミス及びスナネズミの精子凍結保存法の開発を行った。②マウス卵母細胞に水チャンネルを発現させ、耐凍性を向上させることに成功した。③マウス卵巣の凍結保存に簡便なガラス化法が有効であることを示した。④凍結マウス精子の耐凍性に系統差があり、融解後の受精能と形態的異常精子の割合に強い相関があることを示した。(2) 新規生殖工学技術として、①良質な卵子を得るために幼若期の卵巣発育の基礎研究を行った。②マウスおよびウサギの体細胞クローンの解析および技術改良を行った。(3) 遺伝学的及び微生物学的品質管理については、①精子細胞の核 DNA を用いたマイクロサテライト DNA マーカーの検出が可能であることを示した。②ウサギ、ハムスター、スナネズミの病原体検査法について、2次抗体を選択することにより市販の抗原、抗体を用いて ELISA 法が可能であることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

該当無し。

#### G. 研究発表

別掲。

#### H. 知的所有権の取得状況

該当無し。

疾患モデル動物研究資源の維持管理、胚・配偶子等の保存、供給に関する研究

主任研究者 松田潤一郎 国立感染症研究所獣医科学部 室長

研究要旨

疾患モデルとして重要であるマストミス及びスナネズミの有効な保存、供給法開発の一環として、精子の凍結保存法について基礎的検討を行った。両種の精子凍結には、ラフィノースと卵黄に界面活性剤を添加した保存液が有効であることが判明した。

A. 研究目的

疾患モデル動物としては、マウスやラットが多数用いられているが、他種の実験動物についても貴重な疾患モデル動物が存在し、それぞれの特徴を生かして利用されている。現在、国立感染症研究所では、マストミス (*Praomys coucha*) とスナネズミ (*Meriones unguiculatus*) の近交系をそれぞれ5系統、維持している。マストミスは、アフリカ原産で齧歯目ネズミ科に属し、感染症、腫瘍、毒性などの研究に用いられている。スナネズミは中国東北部原産で齧歯目キヌゲネズミ科に属し、脳梗塞、てんかん、寄生虫や細菌感染などの研究に用いられている。これら2種の動物は、疾患モデルとして重要であり、私達はいままでに胚凍結保存法を開発してきた。今回は、さらに有効な保存、供給法開発の一環として、精子の凍結保存法について基礎的検討を行った。

B. 研究方法

1) マストミス精子の凍結保存

動物は、MST、MCC、RI-7 の3近交系の4~8か月令成熟雄を用いた。精巣上体尾部を切開し注射針にて精子塊を採取し、凍結保存液 50  $\mu$  l 中に希釈、数分浮遊させた後、精子用ストローに封入し、液体窒素気相下で5分間静置後、液体窒素に投入し保存した。融解は10秒間 37℃温水中にて行い、融解した精子液 1  $\mu$  l を 200  $\mu$  l の HEPES 添加修正 Whittingham メディウムに導入し、37℃にて運動精子率と

運動性を観察した。各種の糖を凍害保護剤として予備実験で検討した結果、18%ラフィノースに有効性が認められた。そこで、凍結保存液として18%ラフィノースをベースとし、他の凍害保護剤（グリセロール、卵黄、Equex Stem 等）との組み合わせと濃度を検討した。

2) スナネズミ精子の凍結保存

動物は、近交系スナネズミ MG-B（黒色）の6~8か月令成熟雄を用いた。精巣上体精子の採取、凍結法などはマストミスの方法に準じた。凍結保存液として、3%スキムミルク添加18%ラフィノース液 (R18S3)、18%ラフィノースと0.7% Equex Stem を含む25%卵黄液 (25%卵黄液) などを検討した。

（倫理面への配慮）

実験動物については、実験動物委員会の承認を得、適切な取り扱いを行った。

C. 研究結果

マストミス精子の凍結保存については、検討した凍結保存液中もっとも成績の良かったものは、18%ラフィノース+0.7% Equex Stem + 卵黄 (12.5%及び25%) であり、運動精子率は融解直後が15~18%、1.5時間後が10~15%であった。また運動性は融解後1~2時間で最大となり、活発な動きを示す多数の精子が精子液ドロップの周辺部に認められた。

スナネズミ精子の凍結保存については、R18S3 と25%卵黄液が比較的良好な成績を示した。R18S3 の場合、融解直後から3時間後まで30~50%の運動精子率を示し、多くは特徴的な

回転運動を示すが、3時間後には約3%の精子が hyperactivation 様の鞭打ち運動を示した。25%卵黄液では、融解直後の運動精子率は10%以下であるが、15分後から3時間後まで40~50%を示し、1時間後には運動精子の半数以上が鞭打ち運動を示した。

#### D. 考察

マストミス及びスナネズミの精子凍結には、糖としてはマウス精子と同様に18%ラフィノースが有効であり、さらに卵黄を加えることで運動精子率の向上と、hyperactivation 様の活発な動きを示す精子の割合が増える傾向が認められた。今回開発された方法によって、運動精子率は15~50%程度とやや低いが、活発な運動性を示す精子が得られ、両種の精子凍結の可能性が示された。マストミス及びスナネズミの安定した体外受精系は確立されておらず、凍結融解精子の受精能力の *in vitro* での判定は困難を伴う。従って、今後、*in vitro* 受精系、精子の受精能獲得 (capacitation) や先体反応の判定法などの開発が必要である。また人工授精法を応用して、*in vivo* での受精確認も必要である。

#### E. 結論

マストミス及びスナネズミの精子凍結には、ラフィノースと卵黄に界面活性剤を添加した保存液が有効であり、凍結融解精子の運動精子率は15~50%程度を示し、活発な運動性を示す精子が得られ、両種における精子凍結保存の可能性が示された。

#### F. 健康危険情報

該当無し。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Suzuki O, Koura M, Noguchi Y, Takano K, Yamamoto Y, Matsuda J.: Optimization of superovulation induction by human

menopausal gonadotropin in guinea pigs based on follicular waves and FSH-receptor homologies. *Mol Reprod Dev*, 2003, 64:219-225.

Higuchi T, Aiba Y, Nomura T, Matsuda J, Mochida K, Suzuki M, Kikutani H, Honjo T, Nishioka K, Tsubata T.: Cutting Edge: Ectopic expression of CD40 ligand on B cells induces lupus-like autoimmune disease. *J Immunol*, 2002, 168:9-12.

Suzuki O, Mochida K, Yamamoto Y, Noguchi Y, Takano K, Matsuda J, Ogura A.: Comparison of glycoprotein hormone  $\alpha$ -subunits of laboratory animals. *Mol Reprod Dev*, 2002, 62:335-42.

##### 2. 学会発表

持田慶司、松田潤一郎、高野薫、鈴木治、山本美江、野口洋子、小浦美奈子、中山一栄、越後貫成美、井上貴美子、小倉淳郎：近交系マウス初期胚の最適な凍結保存法の検討（緩慢法とガラス化法の比較）、第49回日本実験動物学会総会、2002年5月、名古屋。  
鈴木 治、持田慶司、高野薫、野口洋子、山本美江、松田潤一郎、小倉淳郎：第一波卵胞発育における B6D2F1 マウス卵子の発生能獲得、第49回日本実験動物学会総会、2002年5月、名古屋。

#### H. 知的所有権の取得状況

該当無し。

厚生労働科学研究費補助金(ヒトゲノム再生医療等研究事業)

分担研究報告書

疾患関連遺伝子の機能解明のための実験動物研究資源の基盤整備に関する研究

分担研究者 葛西 孫三郎 高知大学農学部教授

## 研究要旨

グリセロール透過性の極めて低いマウス卵母細胞に、水やグリセロールを透過させるチャンネルであるアクアポリン(AQP)3のcRNA、あるいは水(対照区)を注入したのち成熟させた。AQP3 cRNAを注入した卵子は、対照卵子に比べて、水透過性とグリセロール透過性が著しく上昇し、グリセロールをベースとしたガラス化溶液で凍結しても、生存できるようになった。また、生存卵子は受精能力を保持していた。AQP cRNAを注入するこの手法は、耐凍剤透過性が低いために本来凍結保存が困難な卵子や胚を凍結保存する有効な手段になると思われる。

## A. 研究目的

近年、哺乳動物で次々に水チャンネルであるAQPの遺伝子が同定され、細胞内外の水の透過に重要な役割を果たしていることが明らかにされた。AQPの中には、AQP3、AQP7、AQP9のように水だけでなくグリセロールなどの中性低分子物質も透過させるものがあることから、AQPが耐凍剤の透過にも関係している可能性がある。従って、本来凍結保存が困難なタイプの卵子や胚に、これらの水チャンネルを人為的に発現させれば、凍結保存ができるようになるかもしれない。そこで、グリセロール透過性の低いマウス卵母細胞をモデルとして用い、AQP3のcRNAを卵細胞に注入することによって、AQPを一時に大量発現させて水透過性や耐凍剤透過性を上昇させ、グリセロールを用いて凍結保存できるようになるかどうかをしらべた。

## B. 研究方法

ラット腎臓からRNAを抽出し、ラットAQP3のDNA配列をもとに作成したプライマーを用いてRT-PCR反応により、完全長のAQP3のcDNAを得た。SP64TベクターにcDNAを組み込み、制限酵素で切断してから、*in vitro*でSP6 RNAポリメラーゼを用いてcapを付加したcRNAを合成した。PMSGを投与したICR系雌マウスの卵巣からGV期の卵母細胞を回収し、ピペッティングで卵丘細胞を除去した。卵母細胞に、AQP3 cRNAあるいは対照として水を約20 plずつ注入した。cRNA注入卵子は修正MEM液中で12時

間成熟培養した後、極体の放出が見られた卵子を実験に用いた。卵母細胞の水透過性と耐凍剤透過性を調べるために、卵母細胞を25℃の10%グリセロール添加PB1液に浸して10分間タイムラプスビデオで撮影し、細胞の断面積の変化から相対的体積変化を計算した。これを元に、Two-parameter formalismを用いて水とグリセロールの移動をシミュレートして、水透過係数(Lp)とグリセロール透過係数(Pgly)を算出した。次に、マウス卵母細胞の透過性が極めて低いグリセロールを耐凍剤に用いて、AQP3 cRNA注入卵子を凍結保存できるかどうかをしらべた。cRNA注入後成熟させた卵母細胞を、25℃で10%グリセロール添加PB1液と、20%グリセロールを含むGFS20で前処理後、40%グリセロールを含むGFS40に導入し、液体窒素中に保存した。融解後、M16培養液で1-3時間培養し、形態が正常な卵子を生存とした。一部の試験では、個々の卵子について10%グリセロール液での前処理中の体積変化を測定し、Lp値とPgly値を求めた。さらに、凍結融解後に生存したAQP3 cRNA注入卵子の受精能を調べるために、融解した卵子の透明帯をpH 2.5のPB1液で除去したのち体外受精させた。

(倫理面への配慮)

マウスは安楽な手法(頸椎脱臼法)で屠殺した。屠殺方法を含む実験計画は、高知大学農学部の動物実験委員会に申請し、承認を受けた。



### C. 研究結果

マウス卵母細胞を 10% グリセロール液に浸すと、水を注入した卵子は元の体積の約 35%までゆっくり収縮してその後ほとんど体積が回復しなかったのに対し、AQP3 cRNA を注入した卵子は、約 50%まで急速に収縮した後、10 分間でほぼ元の体積まで回復した。この体積変化から算出された cRNA 注入卵子の Lp 値 (3.1  $\mu\text{m}/\text{min}/\text{atm}$ ) と Pgly 値 (0.0037  $\text{cm}/\text{min}$ ) は、いずれも対照区の卵子の値 (それぞれ 0.9  $\mu\text{m}/\text{min}/\text{atm}$  および 0.00008  $\text{cm}/\text{min}$ ) と比べて著しく高かった。水を注入した対照区の卵子は、凍結融解後全く生存しなかったのに対し、cRNA を注入した卵子は約 70%が生存した。しかし、Lp と Pgly の値は個々の卵子で大きく異なり、両値の高い卵子で生存率が高かった。凍結融解した cRNA 注入卵子を体外受精させた結果、媒精 24 時間後に約 30%が 2 細胞に分裂した。また、媒精 6 時間後に固定してしらべた結果、約 40%の卵子が受精していた。これらの値は、凍結保存しなかった水注入卵子の値と比べて有意な差はなかった。

### D. 考察

マウス卵母細胞内では、AQP3 や AQP7 の mRNA が発現していることが明らかにされている。しかし、対照として水を注入したマウス卵子の Lp 値が低かったこと、およびマウス卵母細胞の透過性の温度依存係数が高いことが報告されていることから、マウス卵母細胞の水の透過は、チャンネルではなく脂質二重膜を介した単純拡散に大きく依存していると推測される。従って、AQP のタンパクとしての発現量はかなり少ないものと考えられる。一方、AQP3 cRNA を注入した卵子では、Lp と Pgly の値は個々の卵子で大きく異なっており、AQP の発現量も異なると考えられる。しかし、Lp や Pgly の値と凍結保存後の生存率との間には相関がみられることから、水や耐凍剤を透過するチャンネルを人為的に発現させることにより、耐凍性を向上させることが可能であることが明らかとなった。この手法を応用することにより、従来凍結保存が困難な細胞の凍結保存が可能になることが期待される。

### E. 結論

マウス卵母細胞に AQP3 の cRNA を注入して発現させることにより、細胞膜の水透過性とグリセロール透過性を向上させ、さらに卵子の耐凍性も向上させることができた。また AQP3 cRNA を発現させた卵子は、凍結融解後も高い受精能を有していた。AQP の cRNA を注入する手段は、凍結保存が困難な細胞の凍結に有効と考えられる。

### F. 健康危険情報

該当なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Edashige K, Yamaji Y, Kleinhans FW, Kasai M. Artificial expression of aquaporin-3 improves the survival of mouse oocytes after cryopreservation. *Biology of Reproduction* 68 (1): 87-94, 2003.

Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T, Wada S, Oka C, Kasai M, Takahashi K. Vitrification of human blastocysts using cryoloops: clinical outcome of 223 cycles. *Human Reproduction* 18 (2):384-91, 2003.

Han MS, Niwa K, Kasai M. Vitrification of rat embryos at various developmental stages. *Theriogenology*. 59 (8): 1851-63, 2003.

Kasai M, Ito K, Edashige K. Morphological appearance of the cryopreserved mouse blastocyst as a tool to identify the type of cryoinjury. *Human Reproduction* 17 (7): 1863-74, 2002.

葛西孫三郎. 生殖医療における凍結技術. *Hormone Frontier in Gynecology* 9 (2): 183-188 2002.

葛西孫三郎. 卵細胞と初期胚の凍結保存. *産婦人科の世界* 54 (6): 593-601, 2002.

#### 2. 学会発表

山地洋平・葛西孫三郎・枝重圭祐. 水チャンネルを発現させたマウス卵子の凍結融解後の受精・発生能. 第95回日本繁殖生物学会. 2002. 9.

関信輔・山地洋平・Valdez Delgado Jr・枝重  
圭祐・葛西孫三郎. 水チャンネルの人為  
的発現によるゼブラフィッシュ胚の水と耐  
凍剤に対する透過性向上. 第 95 回日本  
繁殖生物学会. 2002. 9.

田中光信・山地洋平・市丸奈津子・葛西孫  
三郎・枝重圭祐. マウス卵子および桑実  
胚における水チャンネルの発現. 第 101  
回日本畜産学会. 2003. 3.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

マウス胚、配偶子および卵巣の保存技術の開発

分担研究者 横山 峯介 三菱化学生命科学研究所マウスゲノム工学センター長

研究要旨：マウス系統の新しい維持・保存の手法としての卵巣凍結保存を検討した。マウス初期胚で実施されている簡易ガラス化法によって凍結した卵巣をレシピエント雌の卵巣嚢内に移植し、雄と交配したところ移植卵巣由来の産仔を得ることに成功した。

A. 研究目的

卵巣移植は、何らかの異常を有するために性成熟前に死亡したり、性成熟に達しても交尾行動をとれないために繁殖障害を呈する雌の個体から産仔を得る方法として有用である。マウスにおいては、これまでに多くの突然変異個体が見つけたされ、また近年はいろいろな人為的操作によって様々な遺伝子操作マウスがつぎつぎと作出されている。これらの系統を保存するために現在は、初期胚ならびに精子の凍結保存が実用化されて大きな成果を挙げている。本研究では、系統保存の新たな方法としての卵巣凍結法を検討した。

B. 研究方法

卵巣を提供する雌としては、オワンクラゲ由来の発光タンパク (GFP: Green fluorescent Protein) を全身に発現する遺伝的背景が C57BL/6 系統のトランスジェニックマウスを使用した。卵巣の凍結保存は、マウス初期胚で実施されている簡易ガラス化法を修正して行った。すなわち、性成熟個体（8 週齢以上）から摘出した卵巣を mW 培地で洗浄し、室温下で 1 M DMSO 溶液に 5 分間浸した後、クライオチューブ内の 0℃ DAP213 保存液に移してさらに 5 分間処理後に液体窒素中（- 196℃）に投入した。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て約 2 分間室温に静置し、さらに 37℃ シュークロス溶液を加えて行った。回収した卵巣は、あらかじめ卵巣の一部を摘出した 4 週齢の C57BL/6 の野生型雌の卵巣嚢内に移植した。これらの雌は 4 週間後から雄と交配した。得られた産仔は UV 照射を行って GFP の発現で移植卵巣由来であるかを判定した。なお、凍結を行わない新鮮卵巣を移植する対照群もあわせて設定した。

C. 研究結果

凍結保存した卵巣を移植した 11 匹のレシピエント雌のうち 6 匹（54.5%）で妊娠が成立し、合計で 38 匹の産仔が得られた。このうちの 12 匹（31.6%）が移植卵巣由来の GFP 陽性個体であった。また、新鮮卵巣を移植した対照群では 8 匹のレシピエント雌のうち 5 匹（62.5%）で妊娠が成

立し、合計で29匹の産仔が得られた。このうちの11匹(37.9%)がGFP陽性であった。

#### D. 考察

これまで報告されているマウス卵巢の凍結保存は、プログラムフリーザーを使用して2～3時間かけて緩やかに冷却する緩慢凍結法で実施されたものがほとんどであった。本実験によって、マウス初期胚で実施されている簡易ガラス化法を修正した方法で、卵巢の凍結保存が可能であることが示された。なお、雌性生殖器官である卵巢は、卵子を生産することと、性ホルモンを産生する2つの役目を担っており、凍結保存の処理はこの2つの機能を失わせないかたちで行わなければならない。このことを考慮して、移植を受ける野生型C57BL/6雌の卵巢を一部残して、排卵とホルモン産生が正常に行われるように配慮した。しかし、移植した凍結保存卵巢も正常の機能を発揮することが確認できたので、移植を受ける雌の卵巢摘出を完全に行っても、問題ないことが示唆された。

#### E. 結論

操作が極めて簡便なガラス化法で、マウス卵巢の凍結保存が効能であることを実証した。この成果をもとに、さらに検討を進めることによって、各種系統の維持・保存の新しい手法として実用化されることが期待される。

#### F. 健康危険情報

特に問題となるようなことはなかった。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Migishima, F., Suzuki-Migishima, R., Song, S-Y., Kuranochi, T., Azuma, S., Nishijima, M. & Yokoyama, M. : Successful Cryopreservation of mouse ovaries by vitrification. *Biol. Reprod.*, 68:881-887, 2003.

##### 2. 学会発表

右島富士男、西島正博、右島理可、倉持隆司、日野敏昭、高部美穂、茂手木淑子、宋時栄、横山峯介、東貞宏：ガラス化法による卵巢凍結保存の検討. 第47回日本不妊学会学術講演会. 2002年10月、(岐阜市) .

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

疾患関連遺伝子の機能解明のための実験動物研究資源の基盤整備に関する研究

分担研究者 動物資源開発研究センター 教授 中瀧直己

研究要旨

融解後の凍結マウス精子について、体外受精による受精能の検討と電子顕微鏡による形態学的観察を行った。融解後の凍結マウス精子の受精能と形態的異常精子の出現頻度には、有意な相関が認められ異常精子の頻度が高い系統ほど、受精能が低い傾向が認められた。

A. 研究目的

現在、熊本大学動物資源開発研究センターでは、遺伝子改変マウスの保存供給体制の確立を目指し、マウス精子の凍結保存に関する研究を精力的に行っている。しかしながら、遺伝子改変マウスの主な系統である C57BL/6J 凍結精子においては、融解後の運動性は高い値を示すにもかかわらず、その受精能はきわめて低く、さらなる凍結法の改良、開発が望まれている。

そこで、私達は凍結保存法改善の第一歩として、マウス精子における凍結融解後の受精能低下の主な原因を追求する目的で、凍結融解マウス精子の形態学的な観察を行ない、そのデータとそれら精子の運動性、透明帯-精子結合の頻度および受精能との相関について検討を行なった。

B. 研究方法

C57BL/6J（凍結精子の受精能が極めて低いもの）、BALB/cA（中程度のもの）および DBA/2N（比較的良好のもの）の 12 週齢雄マウス精巣上体尾部から精子を採取し、ストロー法（Nakagata N, 2000）を用いて凍結した。融解後、それら精子について、運動性、電子顕微鏡による形態学的観察を行うとともに体外受精による受精能の検討を行った。

C. 研究結果

凍結融解精子において、運動性は 3 系統においてほぼ一定であったが、それら精子の体外受精率は系統によってまったく異なっており、運動性と受精率に相関は認められなかった。

走査型・透過型電子顕微鏡下で観察した形態異常精子の割合は、DBA/2N、BALB/cA、C57BL/6J の順に高い値を示した。また、形態異常は精子頭部、特にアクロソームと中片部ミトコンドリアに局在していることも明らかになった。

D. 考察

3 系統において、凍結精子の融解後の運動性には差がなかったこと、また、走査型・透過型電子顕微鏡下で観察した形態異常精子の割合が、C57BL/6J 凍結精子で極めて高い値を示したことから、C57BL/6J 凍結精子の低い受精能は、凍結融解過程による細胞障害に起因していることが強く示唆された。

E. 結論

凍結マウス精子において、融解後の受精能と形態的異常精子の割合に強い相関が見られた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Noguchi, H., Kaname, T., Sekimoto, T., Senba, K., Nagata, Y., Araki, M., Abe, M., Nakagata, N., Ono, T., Yamamura, K., Araki, K. Naso-maxillary deformity due to frontonasal expression of human transthyretin gene in transgenic mice. *Genes Cells.* 7: 1087-1098, 2002.
- 2) Noguchi, H., Ohta, M., Wakasugi, S., Noguchi, K., Nakamura, N., Nakamura, O., Miyakawa, K., Takeya, M., Suzuki, M., Nakagata, N., Urano, T., Ono, T., Yamamura, K. Effect of the intestinal flora on amyloid deposition in a transgenic mouse model of familial amyloidotic polyneuropathy. *Exp Anim.* 51: 309-316, 2002.
- 3) Oike, Y., Ito, Y., Hamada, K., Zhang, XQ., Miyata, K., Arai, F., Inada, T., Araki, K., Nakagata, N., Takeya, M., Kisanuki, Y., Yanagisawa, M., Gale, NW., Suda, T. Regulation of vasculogenesis and angiogenesis by EphB/ephrin-B2 signaling between endothelial cells and surrounding mesenchymal cells. *Blood.* 100: 1326-1333, 2002.
- 4) Ohtsuka, S., Takaki, S., Iseki, M., Miyoshi, K., Nakagata, N., Kataoka, Y., Yoshida, N., Takatsu, K., Yoshimura, A. SH2-B is required for both male and female reproduction. *Mol. Cell. Biol.* 22: 3066-3077, 2002.
- 5) Shaw, JM., Nakagata, N. Cryopreservation of transgenic mouse lines. *Methods Mol. Biol.* 180: 207-228, 2002.

- 6) 胚の凍結保存, 配偶子・受精卵の凍結保存 「生命工学 新しい生命へのアプローチ」 123-129, 130-137  
浅島誠・山村研一編集 共立出版

2. 学会発表

第95回 日本繁殖生物学会大会

(岩手大学、2002/9/13~2002/9/15)

凍結マウス精子における融解後の運動性、形態的傷害および受精率との相関について

○西園 啓文 1, 中潟 直己 2

(1 熊本大学大学院自然科学研究科, 2

熊本大学 CARD 資源開発分野)

講演要旨 111 ページ, IA-23

## 卵巣内卵子の有効活用による新規生殖工学技術の開発

分担研究者 鈴木 治 国立感染症研究所 獣医科学部 主任研究官

今回の研究により、卵胞発育に伴って卵子は受精後の胚発生能を徐々に獲得し、その際にさまざまな遺伝子の発現が生じることが確かめられた。特に本研究でHDGFが新たに候補として見出された。胚発生能の高い卵子の形成に関する遺伝子の情報は、発生工学技術の高度化には非常に重要であり、今後も追及する必要があると思われる。

### A. 研究目的

発生工学技術は現時点では卵子に依存している。そこで、本研究では良質な卵子を得るための基礎として、胚発生能獲得過程における遺伝子発現を調べた。特に、マウスでは幼若期にほぼ同調した卵胞発育が見られ、その発育に従い卵子は胚発生能を獲得することが知られている。本研究では、この幼若期における卵胞発育（First wave）を利用し、まず、B6D2F1マウスを用いて日齢、すなわち卵胞発育段階と卵子の発生能との関係を確認した。次に、発生能が大きく異なる17日齢及び24日齢に由来する体外成熟卵子より得たcDNAライブラリについてディファレンシャル・ディスプレイ（DD）法により差次的発現遺伝子を検索した。

### B. 研究方法

1) B6D2F1マウスのFirst waveにおける胚発生能獲得過程の観察

16、17、18、および24日齢のSlc:B6D2F1マウス卵巣から卵子を採取し、Waymouth 培地で体外成熟させたのち、B6D2F1精巣上体精子を用いて体外受精し(培養1日目)、6日間培養した。

2) DD法による差次的発現遺伝子の検索

17日齢及び24日齢のB6D2F1マウスに由来する体外成熟卵子、それぞれ538個と531個からTotal RNAを抽出し、逆転写反応によりcDNAライブラリを作成した。両ライブラリについて10種類のデカマープライマーと8種のオリゴdTプライマーを1つずつ組み合わせたPCRを行い、差次的に増幅された産物を分別・回収し、核酸配列を決定した。得られた配列についてNCBI Blast検索により既知配列との比較を行った。

### C. 研究成果

1) First Waveにおける胚発生能獲得過程の観察

16、17、18、および24日齢の4匹の卵巣あたり、それぞれ140.0±10.8、164.0±3.5、161.0±7.6、132.0±11.6個（実験3回の平均±標準誤差; 分散分析で有意差なし）の卵子が得られ、各々84.3±11.1、130.6±6.1、136.0±7.4、118.7±9.5個の成熟卵子を得た（分散分析で16日齢のみ有意に低い）。体外受精後の2細胞への発生率は、13±7<sup>a</sup>、25±3<sup>a</sup>、66±3<sup>b</sup>、84±3<sup>b</sup> %で、培養4日目における桑実胚への発生率は6±4<sup>a</sup>、10±3<sup>a</sup>、60±1<sup>b</sup>、79±7<sup>b</sup> %、培養6日目における胚盤胞への発生率は2±1<sup>a</sup>、9±3<sup>a</sup>、49±1<sup>b</sup>、70±7<sup>b</sup> %であった（角度変換後の分散分析で異なる肩字間で有意差あり）。

2) DD法による差次的発現遺伝子の検索

回収した差次的増幅産物の68個のうち、22個のシーケンスが判明した。Blast検索の結果、そのうち11個が既知

であった。すでに報告のあるGDF-9やβ-catenin以外に、Hepatoma-Derived Growth Factor (HDGF)が17日齢由来に比べ24日齢由来卵子で高い発現を示し、G3PDH mRNA量を内部標準とした比較で約4倍であった。

### D. 考察

各日齢のマウスから得られた体外成熟卵子の受精後の胚発生率の結果により17日齢以降からB6D2F1卵子の発生能獲得が行われることが確認された。このことを踏まえて、発生能を反映する遺伝子の検索をDD法を用いて行ったところ、GDF-9やβ-catenin、HDGF等の差次的発現が観察された。良質卵子の採取のためには、こうした成長因子の関与を配慮する必要があると思われる。

### E. 結論

本研究で胚発生能に関与する遺伝子の候補が幾つか見出されたが、さらなる検索が必要であろう。

### F. 健康危険情報

該当なし。

### G. 研究発表

1) 論文発表

- Suzuki O, Koura M, Noguchi Y, Takano K, Yamamoto Y, Matsuda J. Optimization of superovulation induction by human menopausal gonadotropin in guinea pigs based on follicular waves and FSH-receptor homologies. *Mol Reprod Dev*, 64:219-225, 2003.
- Suzuki O, Mochida K, Yamamoto Y, Noguchi Y, Takano K, Matsuda J, Ogura A. Comparison of glycoprotein hormone alpha-subunits of laboratory animals. *Mol Reprod Dev*, 62:335-42, 2002.
- Suzuki O, Mochida K, Takano K, Noguchi Y, Yamamoto Y, Matsuda J, Ogura A. Acquisition of developmental competence in mouse oocytes during the first wave of follicular growth. *Theriogenology* 57:628,(2002).

2) 学会発表

- 鈴木 治、持田慶司、高野薫、野口洋子、山本美江、松田潤一郎、小倉淳郎：第一波卵胞発育におけるB6D2F1マウス卵子の発生能獲得、第49回日本実験動物学会総会、名古屋、2002年5月

### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

実験動物の体細胞核移植クローン技術の開発に関する研究

分担研究者 小倉 淳郎 理化学研究所バイオリソースセンター室長

研究要旨

実験動物の体細胞核移植クローン技術の開発を目的として、マウスとウサギを用いて核移植実験の条件設定を行った。マウスでは、実験条件の改善による安定化に成功し、またドナーの細胞種と遺伝子背景を選択することより有意に出産効率が改善することを明らかにした。ウサギでは、核移植後の卵子活性化の方法を改良することにより、初めてクローン胎仔を得ることに成功した。

A. 研究目的

核移植クローン技術は、基礎細胞生物学に貴重な情報をもたらすのみならず、品種改良、遺伝子保存、生物製剤生産、臓器移植などへの応用の期待も高まっている。家畜で安定してクローン動物が作出され、次々とクローン技術の利用が進んでいるのに対し、実験動物のクローン技術の開発は極めて遅れている。今年度は、マウスおよびウサギの核移植技術の効率改善と安定化の試みを行った。

B. 研究方法

マウス：除核卵子へドナー細胞核を注入あるいは電気融合により移植し、卵子のストロンチウムによる活性化後に胚培養および胚移植を行った。

ウサギ：マウスと基本的に同じ方法であるが、除核は卵子の遠心による可視化、活性化はIP3により行った。

（倫理面への配慮）

動物実験はすべて理化学研究所動物実験規則に準じて実施した。

C. 研究結果

マウス

1) ドナーの細胞種および遺伝子型の検討

2種類のドナー細胞（卵丘細胞および新生仔セルトリ細胞）と9種類の遺伝子型の18通りの組合せでクローンを行い、その結果を2x9 factorialの2-way ANOVAで解析した。胚移植後に細胞種による有意差が観察され（セルトリ細胞で高効率）、また2要因間に交互作用が観察された。セルトリ細胞で4種類の遺伝子型を組み合わせた時に胚移植当たり約10%の産子率を得るまでに改善した。

2) 着床後の胚の脱落原因の解明

マウス核移植クローン胚は、およそ半数が桑実期胚/胚盤胞に達し、そのまた約半数が着床するが、実際に産子まで発生するのは数%に過ぎない。そ

こで Day 9.5 日のレシピエント子宮を組織学的に観察したところ、i) 約 60%の着床部位に栄養膜細胞浸潤 (trophoblastic invasion) が見られず、実質的な着床をしていない (脱落膜反応のみ)、ii) 残りの多くは卵黄囊胎盤および尿膜絨毛膜胎盤を形成するが、未分化の二倍体栄養膜細胞の数が著しく少ないため、胎盤基底層 (basal layer) が発達していないことが判明した。よって着床直後の栄養膜層の増生低下がクローン胚の着床直後の致死発生低下の大きな原因であると考えられた。この栄養膜層の増生低下を補償する目的で、通常受精卵四倍体胚とクローン胚のキメラを作製し、胚移植を行って正常なクローン胎仔を得た。3) DNA マイクロアレイ解析によるクローンマウスおよびその胎盤の異常発現遺伝子の同定

上に述べたようにクローン胚の発生能低下の表現型に一定のパターンが存在することから、その上流に何らかの特定の異常（正常胚との相違）が介在することが示唆される。その異常を検索するためにクローン胎仔および胎盤を用いて DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。その結果、一群の遺伝子に過剰発現が観察され、これらの遺伝子の特性からその周囲の遺伝子発現に干渉が生じ、これがクローン特有の異常に至っていることが示唆された。

4) ドナー細胞由来ミトコンドリア DNA (mtDNA) の消長解析

ドナー細胞を除核卵子に導入する際には、ドナー細胞由来のmtDNAも共に卵子内に導入されていると考えられる。しかし、卵細胞質中のmtDNA（約10<sup>5</sup>コピー）に対して、体細胞質中のmtDNA（約10<sup>3</sup>コピー）は極少数であるため、クローンマウス成体内にドナー細胞由来のmtDNAが残存しているかどうかは明らかではない。そこで、mtDNA多型を有するマウス由来の体細胞を利用してクローンマウスを作製し、脳、肝臓、腎臓、尾におけるドナー細胞由来mtDNAの有無をPCR法を用いて解析したところ、解析に使用したクロ



ーンマウス26個体中25個体にドナー細胞由来のmtDNAが確認された。この結果から多くのクローンマウス個体においてドナー細胞由来のmtDNAが残存していると考えられる。また、作出されたクローン動物が雌の場合には残存しているmtDNAが次世代へ伝達する可能性もある。今後は残存するドナー細胞由来mtDNAの割合や次世代への伝達などを含めて引き続き解析を行っていく予定である。

#### ウサギ

##### 1) 核移植のための卵子活性化法の改良

ウサギのクローン胚は、胚移植後にほとんど着床しないことが知られている。そこで卵子活性化法方として、受精卵と同じカルシウムオシレーションを生じる IP3 (inositol 1,4,5-trisphosphate) の電気穿孔法を試みた。その結果、クローン胚の着床が認められ、妊娠中期以降の臓器クローン胎仔を初めて得ることができた。

#### D. 考察

マウスの核移植クローンは、その初めての成功が1998年に報告されたにもかかわらず、極めて限られた研究室のみで再現されているに過ぎない。その原因は、本研究で明らかになったように、着床直後の大規模な胚致死である。その原因は不明であるが、これは定型的な表現型であることから、特定の原因があるはずである。マイクロアレイの結果から示唆された特定の部位の遺伝子の過剰発現がこれに関連しているかどうか今後調査が必要である。クローンマウスを得る、という実用面での改善は、ドナー細胞種と遺伝子型を選ぶことにより可能であった。解析用に多数のクローンマウスを必要になる場合には、極めて有効な方法である。

ウサギの体細胞クローンの状況もマウスと似ている。2002年にフランスのグループにより成功が報告されたにもかかわらず、現在(2003年3月)に至るまで他研究室での追試が成功していない。マウスと異なり、ウサギ卵子の正常な活性化は困難であり、そこが原因と考えて技術的改善を試みた。その結果、まだ効率は低いが、クローン胚の着床が得られ、そのうちの一部分が胎仔に発生した。今後は例数を増やして産子までの発生を確認する予定である。

#### E. 結論

マウスおよびウサギの体細胞クローンの解析および技術改良を行い、マウスでは産子作出効率の改善、ウサギでは初のクローン胎仔を得ることができた。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Inoue, K., Ogura, A., Toyokuni, K., Kogishi, T., Honjo, T., and Shinohara, T. Allogeneic offspring produced by male germ line stem cell transplantation into infertile mouse testis. *Biol. Reprod.*, 68: 167-173, 2003.

2) Ogonuki, N., Mochida, K., Inoue, K., Matsuda, J., Yamamoto, Y., Takano, K., and Ogura, A. Fertilization of Oocytes and Birth of Normal Pups Following intracytoplasmic Injection with Spermatids in *Mastomys (Praomys coucha)*. *Biol. Reprod.*, (in press), 2003.

3) Ogonuki, N., Tsuchiya, H., Hirose, Y., Okada, H., Ogura, A., and Sankai, T. Pregnancy by the tubal transfer of embryos developed after injection of round spermatids into oocyte cytoplasm of the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Hum. Reprod.*, (in press), 2003.

4) Ogura, A., Ogonuki, N., Inoue, K., and Mochida, K. New microinsemination techniques for laboratory animals. *Theriogenology*, 59: 87-94, 2003.

5) Ikawa, M., Tergaonkar, V., Ogura, A., Ogonuki, N., Inoue, K., and Verma, I. M. Restoration of spermatogenesis by lentiviral gene transfer: Offspring from infertile mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 7524-7529, 2002.

6) Inoue, K., Ogura, A., and Hayashi, J. Production of mitochondrial DNA transgenic mice using zygotes. *Methods*, 26: 358-63, 2002.

7) Kashiwabara, S., Noguchi, J., Zhuang, T., Ohmura, K., Honda, A., Sugiura, S., Miyamoto, K., Takahashi, S., Inoue, K., Ogura, A., and Baba, T. Regulation of spermatogenesis by testis-specific, cytoplasmic poly(A) polymerase TPAP. *Science*, 298: 1999-2002, 2002.

8) Kim, J. M., Ogura, A., Nagata, M., and Aoki, F. Analysis of the mechanism for chromatin remodeling in the embryos reconstructed by somatic nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, 67: 760-766, 2002.

9) Kohda, T., Lee, J., Inoue, K., Ogonuki, N., Wakisaka-Saito, N., Kaneko-Ishino, T., Ogura, A., and Ishino, F. Epigenetic regulation in mammalian development and dysfunction; the effects of somatic cloning and genomic imprinting. *International Congress Series*, 1246: 151-159, 2002.

10) Ogura, A., Inoue, K., Ogonuki, N., Lee, J.,

Kohda, T., and Ishino, F. Phenotypic effects of somatic cell cloning in the mouse *Cloning Stem Cell*, 4: 397-405, 2002.

11) Ogura, A., Ogonuki, N., and Inoue, K. Microinsemination and nuclear transfer with male germ cells. In: *Principles of Cloning*, edited by Cibelli, J. B., Lanza, R., Campbell, K., and West, M. D. San Diego:Academic Press, 2002, p. 175-186.

12) Shinohara, T., Inoue, K., Ogonuki, N., Kanatsu-Shinohara, M., Miki, H., Nakata, K., Kurome, M., Nagashima, H., Toyokuni, S., Kogishi, K., Honjo, T., and Ogura, A. Birth of offspring following transplantation of cryopreserved immature testicular piece and in vitro microinsemination. *Hum. Reprod.*, 17: 3039-3045, 2002.

13) 井上貴美子, 越後貫成美, 持田慶司, 小倉淳郎 体細胞クローンマウスの異常. 蛋白質核酸酵素, 47: 1789-1796, 2002.

14) 小倉淳郎 クローンは正常か?. 遺伝, 56: 24-26, 2002.

15) 小倉淳郎 疾患モデルとしてのクローンマウス. 医学のあゆみ, 203: 499-502, 2002.

## 2. 学会発表

1) Ogura, A. Cloned mice. 2003 Pre-Conference Symposium, January 2003, Auckland, New Zealand.

2) Ogura, A. New microinsemination techniques in laboratory animals. 2003 Annual Meeting, International Embryo Transfer Society, January 2003, Auckland, New Zealand.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし。

遺伝性疾患動物の遺伝的品質検査に関する研究

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助教授

本研究ではマウスおよびラットで行われている胚および配偶子（卵子・精子）の凍結保存（バンク）における系統の遺伝的保証を行うために必要な個体レベルならびに細胞レベルでの遺伝的品質検査システムを確立するための基礎的研究を行った。

A. 研究目的

遺伝性疾患動物(系統)や新たに確立される実験動物はそれぞれが固有の遺伝的性質(表現型)を有し、これら固有の表現型は、種々の要因(遺伝環境、発生環境および近隣環境)によって修飾を受ける。これら要因のうち遺伝環境はゲノム自身であり、遺伝的背景とも呼ばれ、最近では主遺伝子に対する修飾遺伝子として捉えられるようになってきた。遺伝的品質検査は遺伝的背景を検査するシステムであり、ヒトゲノム研究におけるモデル動物である遺伝性疾患動物に対して特に適用されるべきである。一方、マウスおよびラットで行われるようになってきた胚および配偶子の凍結保存(バンク)において系統の遺伝的保証を行うためにも遺伝検査品質検査は必要不可欠で、新たに細胞を用いたシステムを確立する必要がある。本研究は、遺伝的背景の検査システムならびに細胞レベルでの遺伝的品質検査システムの確立を目的に行われる。

B. 研究方法

C57BL/6J-*ob*, C57BL/6J-*db*, B6.Cg-*fsn<sup>Jic</sup>*, D2.Cg-*fsn<sup>Jic</sup>*, C3.Cg-*fsn<sup>Jic</sup>*およびC.Cg-*fsn<sup>Jic</sup>*を研究の対象とした。D2はDBA/2J, C3はC3H/HeJ, CはBALB/cAJの略記号である。遺伝的背景の検査法では血液、腎臓、尿、胸腺およびリンパ節を材料として*Akp1*, *Car2*, *Es1*, *Es2*, *Es3*, *Gpd1*, *Gpi1*, *H2D*, *H2K*, *Hbb*, *Hc*, *Idh1*, *Ldr1*, *Mod1*, *Mup1*, *Pep3*, *Pgm1*および*Thy1*を検査した。*ob* (*obese*)および*db* (*diabetes*)遺伝子の変異については正常と区別するためのプライマーを設定し、PCR法により検査を行った。*fsn* (*flaky skin*)遺伝子については第17染色体のマイクロサテライトDNAマーカーを用いた間接的な遺伝子診断を試みた。精子からの核DNA抽出はC57BL/6Jオスの精巢上体尾部の精子を用いて常法により行った。本研究は浜松医科大学の動物実験指針を基に計画され、動物実験委員会の審査によって承認され、実施された。

C. 研究結果

遺伝的背景の検査の結果、*fsn* 遺伝子のコンジュニク系統を除いて正しいことが証明された。*ob* (*obese*)および*db* (*diabetes*)遺伝子はPCR法により正常遺伝子と異常遺伝子が異なるサイズで増幅され、保因個体の区別が容易にできた。

*fsn* (*flaky skin*)遺伝子の間接的な遺伝子診断は新たに我々が設定したマイクロサテライトマーカーを用いることによりほぼ100%の確率で行えるようになった。R18S3で保存された精子からの核DNA抽出を試みた結果、約30,000個/ $\mu$ lの凍結保存精子1 $\mu$ l以上でDose dependentにDNAが抽出でき、また、D17Mit130が検出された。

D. 考察

疾患モデル系統の遺伝背景の検査は従来のモニタリングシステムにより有効に行われることが示された。また、疾患遺伝子*fsn*は間接的な遺伝子診断に有効なマイクロサテライトマーカーの選択により高い確率で診断が可能となったことから他の遺伝子についても広く適用できることが分かった。精子細胞からの核DNA抽出は常法により問題なく行うことができた。今後、今回行った常法の抽出効率について他の方法と比較する。

E. 結論

遺伝性疾患動物(系統)の遺伝的品質検査は従来の方法を有効に適用できることが示された。精子細胞の核DNAを用いたマイクロサテライトDNAマーカーの検出が可能で、胚・精子バンクでの遺伝的品質検査の可能性が強く示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

・加藤秀樹. 遺伝的モニタリング. Vol.204, No.3, 221-224, 2003.

2. 学会発表

・加藤秀樹、高林秀次、木村二郎. クローズドコロニーICRマウスに内在する新規突然変異遺伝子の探索システム. 第17回日本疾患モデル学会(伊香保, 2002)

・Katoh H, Kimura J, Takabayashi S. A Phenotype-Driven Approach to Development of Animal Models for Human Diseases. 2002 ICLAS Regional Scientific Meeting (Bangkok, 2002)

・Shinohara M, Katoh H, Ohura K. Genetic Studies on the Plaque Formation Susceptibility in the ODUS at. 14th International Workshop on Rat Genetic System (Kyoto, 2002)

## 各種実験動物の血清抗体検査：ELISA法の確立

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** 実験動物に特有な病原体の検出キット(ELISA法)はマウス、ラットについては市販されているが、その他の動物種には市販されていない。本研究ではウサギ、モルモット、ハムスター、スナネズミのELISA法による抗体検出の系を確立することを目的とした。各動物種にワクシニアウイルスを接種し感染血清を得た。感染血清または過免疫血清を陽性コントロールとして、最適な2次抗体の検討を行った。ウサギではProtein G、ハムスターでは抗ハムスターIgG抗体、スナネズミでは抗マウスIgG抗体が最適であった。これらの動物種については今回の研究によりELISAの条件が確立されたので、市販のHVJやTyzzer菌に対する抗原を用いて陽性血清コントロール無しでも抗体検出が可能であることが示唆された。モルモットは今回は陽性血清が得られなかった。

### A. 研究目的

実験動物の取り扱いにあたり、実験動物に特有の病原体の汚染状況は常に把握しなければならない。汚染検査には種々の方法があるが、コロニーのウイルス汚染を把握する目的には血清抗体検査が有効である。血清反応の中ではELISA法及び蛍光抗体法が感度が良好である。マウスラットのELISA法についてはすでにキットが市販されている。本研究ではマウスラット以外の実験動物のELISA法の条件を検討することを目的とする。

### B. 研究方法

ELISA法はまずプレートにコートした抗原に動物血清を反応させ、次にペルオキシダーゼ標識抗動物イムノグロブリン2次抗体を反応させ発色させる。条件検討には抗原に対する各動物の陽性及び陰性血清、さらに発色に最適な2次抗体を入手しなければならない。本研究ではオルソボックスウイルス属のワクシニアウイルスを抗原と

して使用した。オルソボックスウイルス属は各ウイルス間で強い抗体交叉性を示すので、同じ属のマウスエクトロメリアウイルス及びウサギボックスウイルスの抗原として利用出来る。また、ワクシニアウイルスは宿主域が広いので各種動物に対し感染が成立し、陽性血清の作製が容易である。

#### (1)抗原の作製

ワクシニアウイルス大連株またはLister株をHeLaまたはVero細胞に接種し、CPEが広がった時点で0.65%NP-40加PBSで細胞を溶解した。抗原の陰性コントロールとしてウイルス未接種の細胞を同様に処理した。遠心した上清を抗原とし、コーティング溶液で1000倍に希釈してELISA用プレートに100 $\mu$ lずつ注入し4 $^{\circ}$ Cに1晩静置した。3回洗浄した後ブロッキング溶液を室温で1時間反応させた。3回洗浄後、抗原プレートとして使用した。

#### (2)各種動物陽性血清の作製及び反応

マウス、スナネズミ、ハムスター、モルモットに大連株あるいはLister株を腹腔内接種