

し、4週後に全採血して血清を得た。SPF動物を入手後すぐに全採血して得た血清を陰性血清とした。ウサギ過免疫の陽性血清は感染研上田良昭先生から分与していただいた。陽性及び陰性血清を100倍から2倍段階希釈して抗原プレートに注入し、室温で1時間反応させた。

(3)ペルオキシダーゼ標識2次抗体反応及び発色

抗ウサギ、モルモット、ハムスター、マウス標識抗体は市販のものを購入した。各種動物のIgGに反応すると報告のあるProtein A及びGの標識試薬を購入し、抗動物IgG抗体と発色の特異性などについて比較した。スナネズミに対する抗体は市販されていないので、各種動物IgG抗体との交叉性を検討した。血清反応後、3回洗浄したプレートに2次抗体を注入し、室温で1時間反応させた。3回洗浄後、発色試薬を注入し、暗所で30分反応させた。反応停止液を入れ、プレートリーダーで吸光度を測定した。

C. 研究結果

ウサギ過免疫陽性血清はワクシニアウイルス抗原に対して非常に高い特異反応を示した。2次抗体としてはProtein Gが最も反応が強く、次にProtein A、抗ウサギ抗体の順であった。陰性血清、陰性抗原にはどの2次抗体も非特異反応は見られなかった。ウイルス感染動物ではマウス、スナネズミ、ハムスターで陽性血清の特異的反応が得られたが、モルモットでは反応が認められなかった。マウスでは抗マウス抗体が最も良好な反応で、Protein A及びGでは非常に低い反応しか得られなかった。ハムスターでは抗ハムスター抗体が最も良好な反応で、Protein Gでも反応が見られたが、Protein Aでは反応が見られなかった。スナネズミには市販の抗体がないが、抗マウス抗体で良好な交

叉反応が得られた。Protein Gで弱い反応が認められたが、やはりProtein Aでは反応が見られなかった。

D. 考察

抗ワクシニアウイルス抗体はウイルス接種細胞の溶解上清を陽性抗原としてELISA法で検出が可能であった。未接種細胞溶解上清を陰性抗原とすること、陰性血清を対象に置くことで非特異反応の有無を観察し、より正確な判断を出すことができる。ELISAキットが市販されていないウサギ、ハムスター、スナネズミについて抗ワクシニア抗体のELISAによる検出が2次抗体を選択すれば可能であることが判明した。これらの動物種ではHVJやTyzzer菌に対する陽性血清は市販されていない。また感染が広がりやすいので感染血清を作製することも難しい。しかし、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。また、市販のあるキットではラット以外の動物種にProtein Aを2次抗体として使用しているが、今回の結果ではウサギは良好な反応を示すもののマウス、スナネズミ、ハムスターでは非常に低い反応しか得られず、市販キットの反応性に疑問が持たれた。モルモットについては今回陽性血清が得られなかったので、異なる方法で検討する予定である。

E. 結論

実験動物特有の病原体に対する抗体のELISA検出キットが市販されていないウサギ、ハムスター、スナネズミでも2次抗体を選択すれば、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. 研究発表

1. 論文発表

山田靖子(2002): MHV汚染コロニーからの動物の受け入れ—胚移植による清浄化における汚染除去確認法— 実験動物と環境、10巻、24-27。

2. 学会発表

小柳 充、加藤 明子、佐藤 俊哉、山田 靖子、佐藤 徳光：MHVのモニタリング：フィルターダストからRT-nested PCR-SSCP 法による遺伝子型分類。第25回日本分子生物学会年会。平成14年12月、横浜。

ELISA抗原 陽性抗原：Vaccinia virus Lister株感染Vero細胞 溶解液
陰性コントロール：Vero細胞 溶解液

動物陽性血清 Vaccinia virus 大連株

マウス	1.8x10 ⁴		
スナネズミ	0.9x10 ⁵	i.p.	4週後全採血
ハムスター	1.8x10 ⁵		
モルモット	2.7x10 ⁵		
ウサギ	免疫血清		

Peroxidase-conjugated ELISA 2 次抗体
Protein A, Protein G, anti-animal IgG

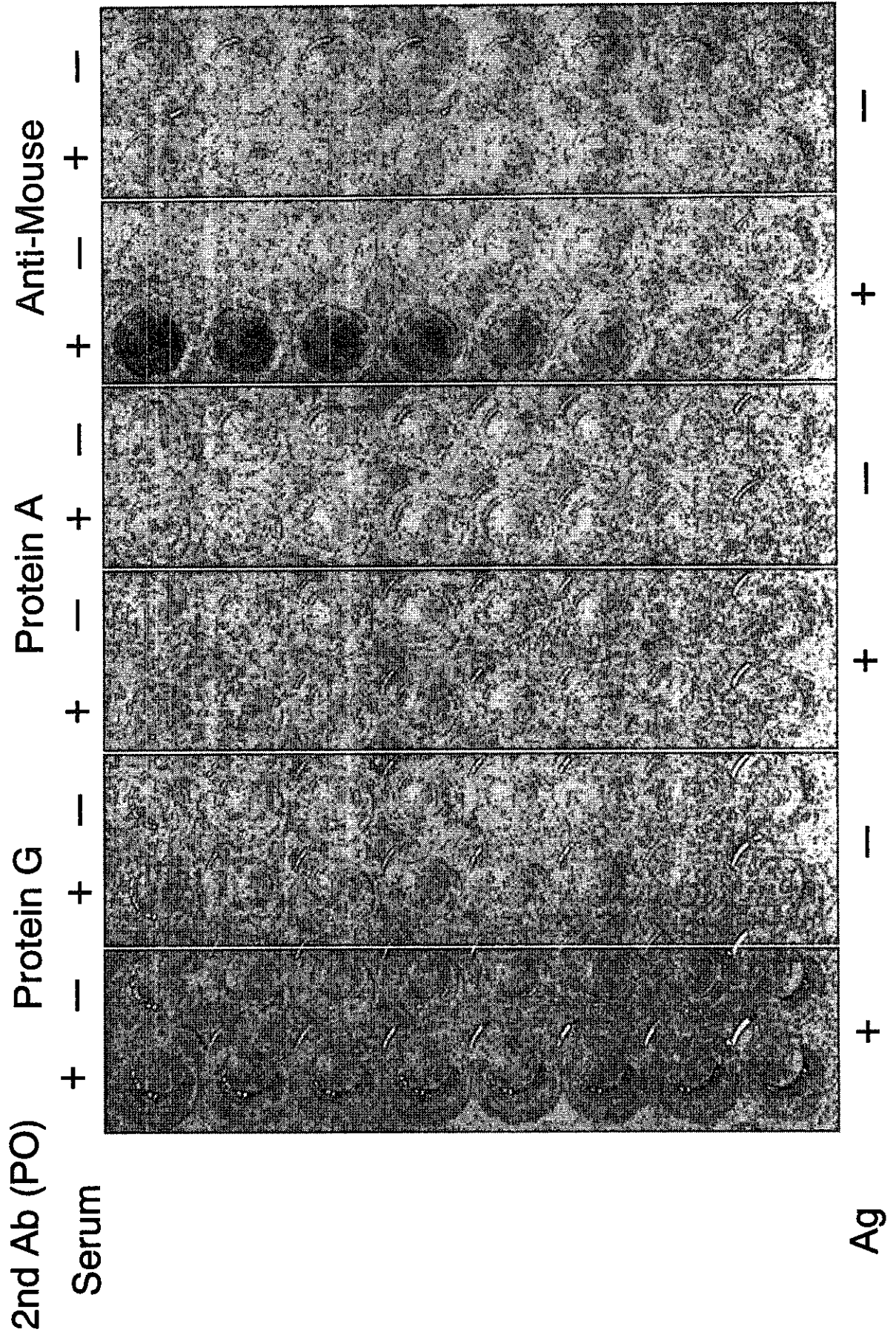
Peroxidase-conjugated ELISA 2 次抗体

Protein G Protein A Anti-animal IgG

マウス	+	+	+++
スナネズミ	+	-	+++*
ハムスター	++	+	++
ウサギ	+++++	+++++	+++
モルモット	-	-	-

* anti-mouse IgG

マウスのELISA

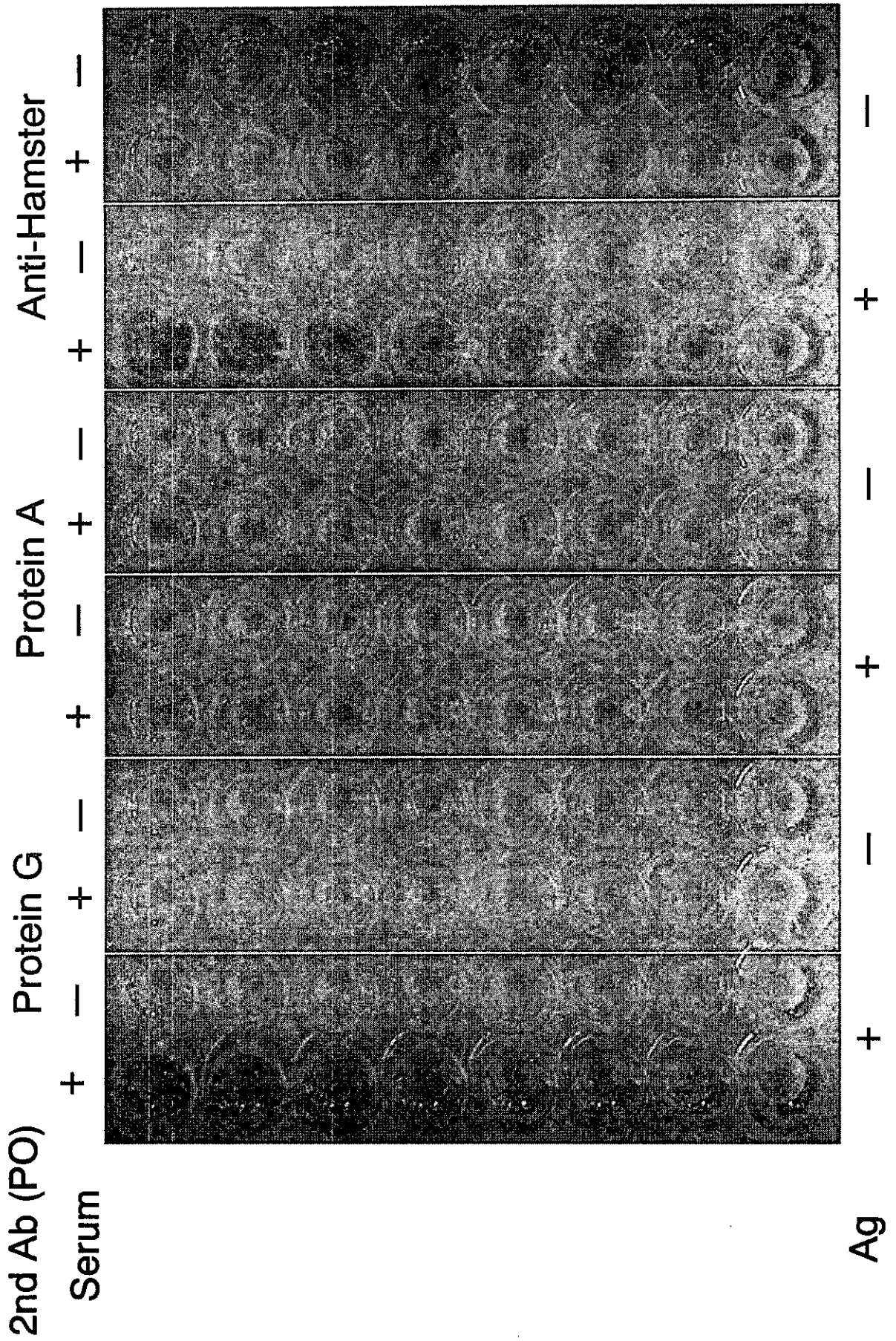


スナネズミのELISA

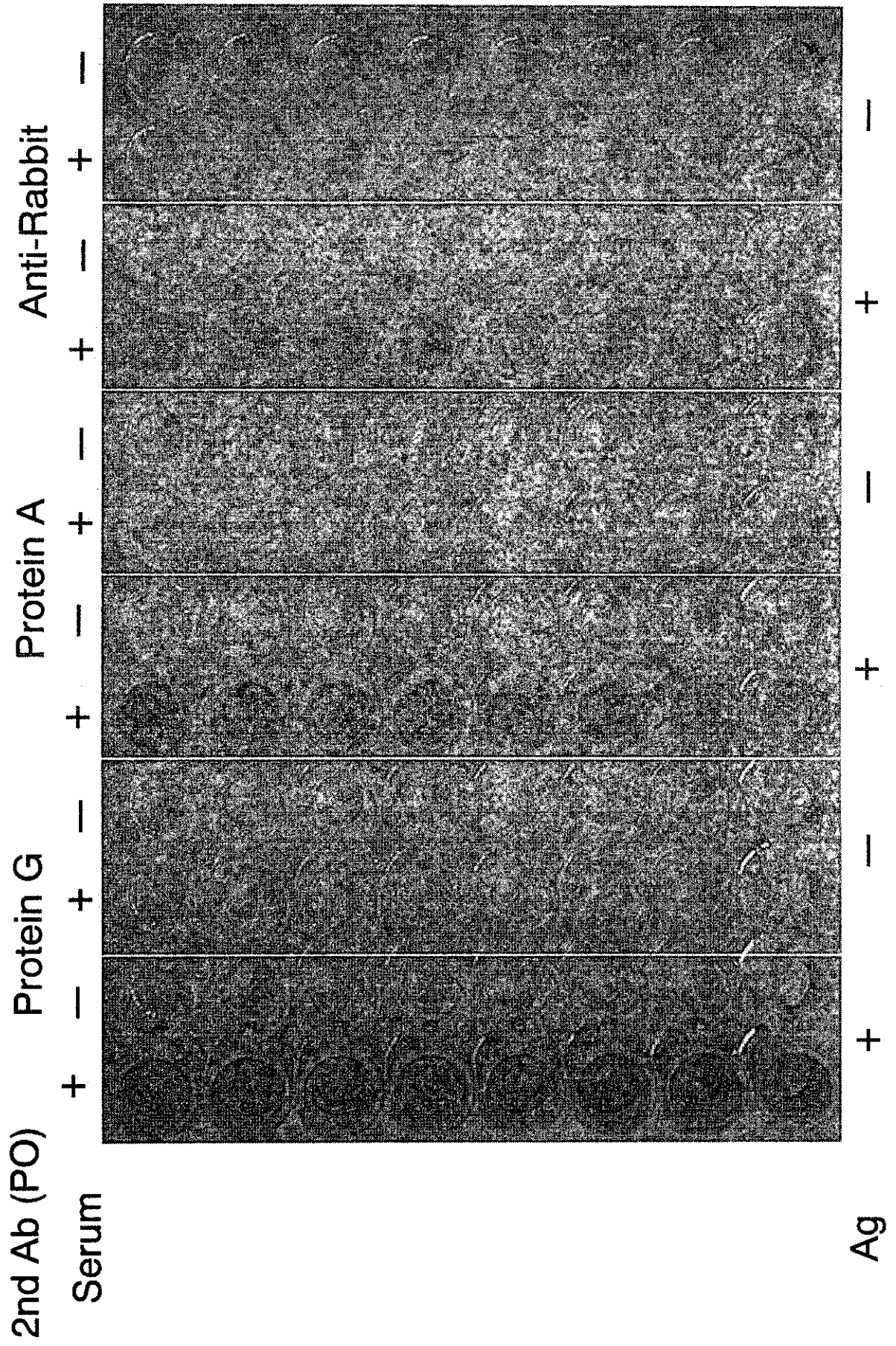
2nd Ab (PO)	Protein G	Protein A	Anti-Mouse
+	-	+	-
+	+	-	+
+	-	+	-
+	+	-	+
+	-	+	-
+	+	-	+

Ag
+
-
+
-
+
-
+

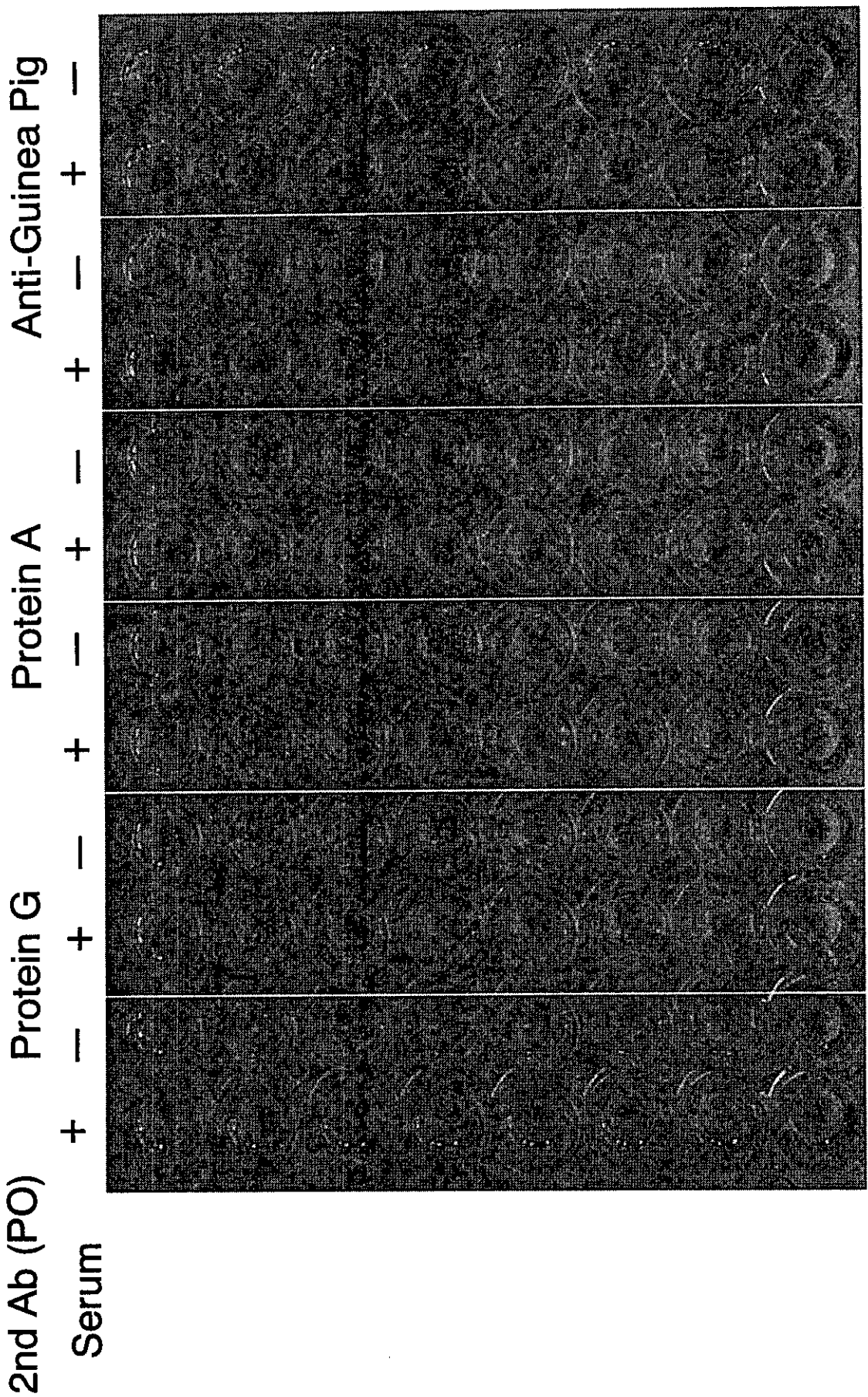
ハムスターのELISA



ウサギのELISA



モルモットのELISA



Ag

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Shaw, J.M., Nakagata, N.	Cryopreservation of transgenic mouse lines.	Alan R. Clarke	Methods Mol. Biol.	HUMANA PRESS	New Jersey USA	2002	207-228
中瀬 直己	胚の凍結保存 配偶子・受精卵の凍結保存	浅島 誠 山村研一	生命工学 新しい生命へのアプローチ	共立出版	東京	2002	123-129 130-137
Ogura, A., Ogonuki, N., and Inoue, K.	Microinsemination and nuclear transfer with male germ cells.	Cibelli, J. B., Lanza, R., Campbell, K., and West, M. D.	Principles of Cloning	Academic Press	San Diego	2002	175-186

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	4	219-225	2003
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	168	9-12	2002
Suzuki O, Mochida K, Yamamoto Y, Noguchi Y, Takano K, Matsuda J, Ogura A.	Comparison of glycoprotein hormone α -subunits of laboratory animals.	Mol Reprod Dev	62	335-42	2002
Edashige K, Yamaji Y, Klein Hans FW, Kasai M	Artificial expression of aquaporin-3 improves the survival of mouse oocytes after cryopreservation	Biol. Reprod	68	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)	384-391	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)	384-391	2003
Han MS, Niwa K, Kasai M.	Vitrification of rat embryos at various developmental stages.	Theriogenology	59 (8)	1851-1863	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)	1638-1674	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
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
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
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
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
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

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	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
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
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 <i>Mastomys (Praomys coucha)</i> .	Biol. Reprod.	(in press)		2003.
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 (<i>Macaca fascicularis</i>).	Hum. Reprod.	(in press)		2003
Ogura, A., Ogonuki, N., Inoue, K., and Mochida, K.	New microinsemination techniques for laboratory animals.	Theriogenology	59	87-94	2003
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
Inoue, K., Ogura, A., and Hayashi, J	Production of mitochondrial DNA transgenic mice using zygotes.	Methods	26	358-63	2002
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
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

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.	Int'l Congress Series	1246	151-159	2002
Ogura, A., Inoue, K., Ogonuki, N., Lee, J., Kohda, T., and Ishino, F.	Phenotypic effects of somatic cell cloning in the mouse.	Cloning Stem Cells	4	397-405	2002
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
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
小倉淳郎.	クローンは正常か?.	遺伝	56	24-26	2002
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
加藤秀樹	遺伝的モニタリング	医学のあゆみ	Vol.204, No.3	221-224	2003
山田靖子	MHV 汚染コロニーからの動物の受け入れ一胚移植による清浄化における汚染除去確認法	実験動物と環境	10巻	24-27	2002

20020407

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.28-P.31の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。