

が必要である。

## E. 結論

本年度の研究から、0日齢からの人工哺育により、SRV/D、SFV、EBV、CMV未感染ザルを高率に分離できることが明らかとなった。SRV/DのTPCカニクイザルコロニー内の感染状況調査では、人工哺育および母ザル哺育の離乳仔ザル、各年齢層で唾液中、血液中にSRV/Dが検出され、垂直感染と水平感染の両面からコロニーSPF化対策が必要であると考えられた。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Michishita M, Nakamura S, Sakakibara I, Ono F, Fujimoto K, Kamiya K, Ishii Y, Hayashi K, Yoshikawa Y, Takahashi K. : Spontaneous T-cell-rich B-cell lymphoma in a cynomolgus monkey

(*Macaca fascicularis*). Exp Anim, 2003, 52: 339-44

2) 光永総子、藤本浩二、中村伸。Bウイルス(*Cercopithecine Herpesvirus 1*)感染の予防、緊急対応および治療に関するガイドライン(翻訳)「Recommendations for Prevention of and Therapy for Exposure to B Virus of and Therapy for Exposure to B Virus (*Cercopithecine herpesvirus 1*)」。Clinical Infectious Diseases, 2002, 35: 1191-1203. Cohen JI et. al.」. 霊長類研究, 2004, 20: 147-164

3) Takano J, Narita T, Fujimoto K, Mukai R, Yamada A: Detection of B virus infection

in cynomolgus monkeys by ELISA using simian agent 8 as alternative antigen. Exp Anim, 2002, 50: 345-347

### 2. 学会発表

1) 藤本浩二、寺尾恵治： 実験用サル類の微生物学的試験(シンポジウム) 第1回アジア実験動物学会連合大会、2004年、5月、長崎

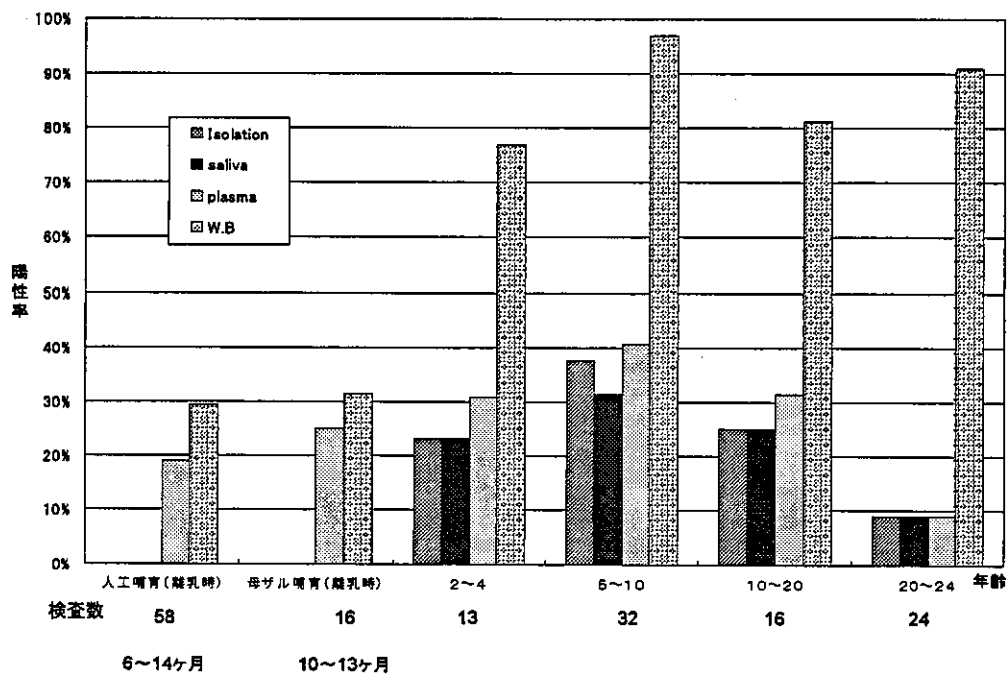
2) 高野淳一郎、成田豊子、橘裕司、清水利行、小松崎博文、寺尾恵治、藤本浩二： 輸入カニクイザルからの赤痢アメーバ(*Entamoeba histolytica*)の分離(ポスター)、第51回実験動物学会、2004年、5月、長崎

3) 成田豊子、高野淳一郎、小野文子、藤本浩二、寺尾恵治： 筑波医学実験用霊長類センター(TPC)カニクイザル繁殖コロニーにおけるEBV、CMV、SFVの感染状況調査とSPF化に関する研究(ポスター)、第20回日本霊長類学会、2004年、7月、犬山

表1. 離乳ザルのSRV/D、EBV、SFV、CMV感染状況

|         | SRV/D          | EBV           | SFV          | CMV          | いずれかが<br>陽性    |
|---------|----------------|---------------|--------------|--------------|----------------|
| 人工哺育ザル  | 21/58<br>(36%) | 0/58<br>(0%)  | 1/58<br>(2%) | 0/58<br>(2%) | 21/58<br>(36%) |
| 母ザル哺育ザル | 7/16<br>(43%)  | 9/16<br>(56%) | 1/16<br>(6%) | 0/16<br>(0%) | 13/16<br>(81%) |

図1. 年齢別 SRV/D 陽性率



## 医科学研究用リソースとしてのカニクイザルの基盤高度化に関する研究 高齢メスカニクイザルでの骨組織形態と骨強度との関係に関する研究

分担研究者 吉田高志（感染研・筑波医学実験用霊長類センター） 室長

**研究要旨** 我々は、霊長類センターのカニクイザルを対象として物質代謝状況を総合的に解析する一環として糖尿病等を症状とする糖代謝、肥満・高脂血症等を症状とする脂質代謝、そして閉経後骨粗鬆症等を症状とするカルシウムを主にする無機塩類代謝の解析を行ってきた。それらの研究の一環として本年はメスカニクイザルの下肢の骨である脛骨を対象としてその形態学的特徴と骨の力学的強度の関係について解析を加えたので報告する。

### A. 研究目的

筑波霊長類センターではカニクイザルを対象とする加齢ファームを作成し、メスカニクイザルを対象として糖尿病を中心とする糖代謝疾患、肥満の発生を防ぐための脂質代謝の解析、さらに閉経後骨粗鬆症モデルの作成等の多様な研究を行っている。日本人の場合、閉経は50歳齢頃に到来すると言われていた。霊長類センターでの調査によるとカニクイザルの場合、20歳齢をすぎた頃から閉経を呈する個体が現れており、寿命は30歳齢以上にも及ぶ。閉経という現象が確認され、その後も長期間にわたって生きるというヒトに似た生涯を送る実験動物である。我々はこのようなカニクイザルを対象として骨量の測定を継続し、閉経後の骨粗鬆症のモデル化をはかってきた。ところで、成長過程を終えたヒトやカニクイザルの骨量の維持は、破骨と造骨を並行して行うリモデリング（再構築）型であり、造骨速度が低下するのみで、原則的に破骨の見られないとされるラットのようなモデリング（構築）型の骨量の維持とは異なったものである。このようなリモデリング型の高齢の動物を対象として、骨量と骨強度、さらにその背景にある骨の組織形態との相互関係を解析した例は認められない。そこでメスカニクイザルの脛骨を摘出し、それらの関係について解析した。

### B. 研究方法

他の実験目的でケタミンHClによる深麻酔下で、目的とする臓器が摘出された個体を材料とした。摘出後に残された全身を10%中性ホルマリンで固定した。13.3～22.6歳齢にわたる17頭のメスカニクイザル（年齢16.8±2.6歳、体重4.6±1.1Kg；平均値±標準偏差）の脛骨を摘出し、70%アルコールで再固定した。抹消骨用定量的コンピューター画像解析装置（pQCT）法で右脛骨幹部の全皮質骨密度を測定するとともに脛骨幹部の断面を4分割し、前方の1/4及び後方の1/4領域に分割し各領域の皮質骨密度を測定した。また3点曲げ試験によって右脛骨の力学的特性を求めた。試験により断面二次モーメントおよび断面係数を求め破断応力を算出した。また可逆的に変形できる能力である弾性率およびエネルギーを吸収できる能力である強靱性も求めた。さらに左脛骨幹部をVillanueva bone stainをおこなった後、メタクリン酸メチルに包埋し、厚さ20μmの組織切片とし、脛骨幹部横断面前方1/4および後方1/4領域の骨単位面積、ハーバース間面積、類骨面積、類骨幅、骨単位数および皮質骨面積を計測した。計測に当たっては光学顕微鏡下で視野をデジタル信号化した後に画像解析装置によって行った。

#### (倫理面への配慮)

動物は倫理委員会の了承の元で別の実験目的で、深麻酔の上、放血殺されたもので、本来の実験目的の材料採取の後、骨標本を入手したものであり倫理上の問題は無いと考えられる。

#### C. 研究結果

皮質骨密度は、前方領域よりも後方領域の方が有意に高値を呈した。また、骨単位面積、ハーバース管面積、類骨面積、類骨幅、および骨単位数は前方領域で有意に高値を呈した。脛骨皮質骨密度と破断力及び最大応力は有意に正に相関した。

#### D. 考察

低骨密度の前方領域では骨単位面積、ハーバース管面積、類骨面積、類骨幅、および骨単位数は有意に高値を呈しており骨のリモデリングが活発であることが示された。高骨密度の後方領域でもリモデリング行っている組織像は認められるものの、骨面積に対して活動骨単位の占める割合が少なく、骨リモデリングよりも骨強度の維持が図られているものと判断される。すなわち、カニクイザルの場合も、検討に用いた最高齢の個体でもリモデリングを示していることが認められ、ラットのようなモデリング動物とは明らかに異なるものであった。

以上のようにカニクイザルの場合脛骨の前方領域と後方領域とでは骨の形成状態ならびに皮質骨密度に違いが認められた。本研究に相当するヒトでの詳細な検討はなされていないようでありカニクイザルとの比較は困難である。しかし脛骨前面領域と後部領域との骨組織の違いは二足歩行と関連するものと容易に推測することが出来る。四足歩行を行う他の実験動物と異なったカニクイザルの有用性を指摘できよう。

今後は、骨量回復のための治療的検討や運動量の負荷の影響等についても検討を加えて行きたい。

#### E. 結論

本研究により高齢メスカニクイザルの脛骨の標準像が得られたものと評価される。そしてそのような高齢の個体であっても骨組織のリモデリングが行われていることが実証された。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nonaka K, Fukuda S, Aoki K, Yoshida T, Iida H, Ohya K: Regional distribution in cortical bone mineral density measured by pQCT can predict the alteration in mineral property at the tibial diaphysis of cynomologus monkey. Bone (in press)
- 2) Chen Y, Ogawa H, Narita H, Ohtoh K, Yoshida T, Yoshikawa Y: Ratio of leptin to adiponectin as an obesity index of cynomologus monkeys (*Macaca fascicularis*). Exp Anim. 2003, 52:137-143.
- 3) Chen Y, Ono F, Yoshida T, Yoshikawa Y: Relationship between body weight and hematological and serum biochemical parameters in female cynomologus monkeys (*Macaca fascicularis*). Exp Anim. 2002, 51:125-131

##### 2. 学会発表

- 1) 野中希一・青木和広・福田俊・吉田高志・飯田治三・大谷啓一(2004) カニクイザル脛骨骨幹皮質骨における局所的な骨密度値の相違は骨リモデリング活性と力学的特性のバランスの差を反映している。第24回日本骨形態計測学会、6月23-26日。高松

## 霊長類の細胞株リソース整備

分担研究者 明里宏文（感染研・筑波医学実験用霊長類センター）主任研究官  
研究協力者 李永仲、飯島沙幸（感染研・筑波医学実験用霊長類センター）

研究要旨：Herpesvirus saimiri 不死化法を用いることにより種々の霊長類由来 T リンパ球細胞株を樹立した。現在までに 9 種類 26 細胞株が樹立された。これらは同一の方法で不死化されていることから、遺伝子や蛋白の比較解析を初めとした研究に特に有用であり、リソースメリットが高いと考えられる。また今回新たに霊長類研究のためのリソース拡充を目的として、新世界ザルであるタマリン CD 抗原を検出可能な抗ヒト CD 抗体のスクリーニングを行った。その結果、タマリンリンパ球における主要な分化マーカーが検出可能となった。本成果は新世界ザルを用いた免疫学的研究を行なう上で重要な知見であると考えられる。

### A. 研究目的

医科学研究用の霊長類リソース整備の一環として、昨年度は霊長類機能細胞の不死化技術を開発・確立するとともに、その特性を明らかにした。本技術を応用して、今年度はカニクイザルを初めとする多様な霊長類由来不死化細胞株を樹立し、研究基盤の高度化を目指す。さらに今年度は、霊長類研究のためのリソース拡充を目指して、新世界ザル CD 抗原を検出しようとするような抗ヒト CD 抗体のスクリーニングを行った。これによりこれまで困難であった新世界ザルを用いた感染症研究等における免疫学的解析を可能とすることを目的とした。

### B. 研究方法

多様な霊長類培養細胞株を網羅的に樹立するため、比較的入手可能である血液細胞に着目した。霊長類末梢血は、当センター及び京都大学霊長類研究所で現在保有している、広範なサル類より採取した。不死化の方法としては、昨年度の研究により多様な霊長類の末梢血リンパ球細胞に感染してその T 細胞を不死化することが知られている Herpesvirus saimiri (HVS) を用ることとした。新世界ザル CD 抗原の検出には、タ

マリン末梢血リンパ球を抗原として用いた。抗ヒト CD 抗体としては主要なリンパ球分化抗原を認識する蛍光標識抗体を使用した。これらの組み合わせによる細胞への抗体処理後、蛍光強度を Flowcytometry にて解析した。

### C. 研究結果

#### 1) 霊長類細胞株ライブラリーの構築

昨年度の研究により確立した HVS 不死化法に基づく霊長類機能細胞の不死化技術を応用して、今年度はカニクイザルを初めとする多様な霊長類由来不死化細胞株の樹立を試みた。霊長類末梢血は、当センター及び京都大学霊長類研究所で現在保有している多様な霊長類より採取した（京都大霊長類研究所・平井啓久先生との共同研究）。その結果、今年度は新たに旧世界ザルとしてブタオザル（3 株）、新世界ザルとしてコモンマーモセット（2 株）、アカテタマリン（1 株）、コモンリスザル（1 株）、ヨザル（1 株）の樹立に成功した。昨年度までに樹立した分と合わせて、これまでに 9 種類 26 細胞株が樹立されている。

2) 新世界ザル CD 抗原を検出可能な抗体の同定

今年度は、これまで困難であった新世界ザルの免疫学的解析を可能とすることを目的として、新世界ザル CD 抗原を検出可能な抗ヒト CD 抗体のスクリーニングを行った。まず抗ヒトリンパ球 CD マーカー抗体の中でカニクイザルに交差反応することが判っているもの 16 抗体についてタマリン末梢血リンパ球への反応性を flowcytometry にて解析したところ、わずか 4 抗体が交差反応するのみであった (data not shown)。そこで、交差反応を示さなかった CD マーカーについてさらに多数の抗体を入手し検討を行った。その結果として、タマリン CD2, CD3, CD4, CD8, CD16, CD20, CD25, CD29, CD38 が初めて定量的に検出可能となった。

#### D. 考察

昨年度の研究により確立した HVS 不死化法に基づく霊長類機能細胞の不死化技術を応用して、今年度はカニクイザルを初めとする多様な霊長類由来不死化細胞株の樹立を試みた。その結果、今年度は新たに 5 種類 8 株の樹立に成功した。昨年度までに樹立した分と合わせて、これまでに 9 種類 26 細胞株が樹立されている。また、現在アフリカミドリザル、ヨザル、コモンリスザル、テナガザル、フサオマキザル等の不死化細胞株の樹立を進めているところである。本研究は、サル類による動物モデル研究・開発等トランスレーショナルリサーチにおいて、現在樹立されつつある霊長類細胞株ライブラリーによる細胞レベルの解析が可能となる点で意義深い。このことは、動物実験を極力避けるべきとする国際的傾向とも合致する。さらに、サル種におけるゲノム解析、プロテオーム解析を比較霊長類学的手法により行う上でも、非常に強力なツールとなるものと期待される。

今年度は、これまで解析が困難であった新世界ザル CD 抗原を検出するシステム作成を試みた。その結果タマリン CD2, CD3, CD4, CD8, CD16, CD20, CD25, CD29, CD38 が初めて定量的に検出可能となった。本成果は新世界ザルを用いた免疫学的研究を行なう上で非常に有意義であると考えら

れる。

今後は、検出可能な新世界ザル CD 抗原数の拡充を計ると共に、本研究により確立された各種霊長類細胞株を用いた上記抗 CD マーカー抗体の交差反応性の解析を進めていきたい。

#### E. 結論

昨年度の研究により確立した霊長類機能細胞の不死化技術を応用して、今年度は多様な霊長類由来不死化細胞株の樹立に成功した。昨年度までに樹立した分と合わせて、これまでに 9 種類 26 細胞株が樹立されている。また今回新たに霊長類研究のためのリソース拡充を目的として、これまで解析が困難であった新世界ザル CD 抗原を検出するシステム作成を試みた。その結果一連の主要なリンパ球 CD マーカーが初めて定量的に検出可能となった。本成果はサル類を用いたトランスレーショナルリサーチを行なう上で非常に有用であると考えられた。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Uda A, Tanabayashi K, Yamada YK, Akari H, Lee YJ, Mukai R, Terao K, Yamada A: Detection of Fourteen Alleles Derived from MHC Class I A Locus in Cynomolgus Monkeys. *Immunogenetics* 56, 155-163, 2004.

##### 2. 学会発表

なし

## Cross-reactivity to tamarin PBL of anti-human mAbs cross-reactive with macaque CDs

| CD marker | Clone name          | Provider   | Reactivity to tamarin PBL |
|-----------|---------------------|------------|---------------------------|
| CD2       | Nu-T <sub>ER</sub>  | Nichirei   | -                         |
|           | Leu-5b              | B/D        | +                         |
| CD3       | FN-18               | Biosource  | -                         |
|           | SP-34               | Pharmingen | +                         |
| CD4       | Nu-T <sub>H17</sub> | Nichirei   | -                         |
|           | Leu-3a              | B/D        | +/-                       |
|           | MT310               | DAKO       | +/-                       |
|           | T4                  | Coulter    | +/-                       |
|           | Coulter             | 1388.2     | -                         |
|           | L200                | Pharmingen | ++                        |
| CD8       | Nu-TS/C             | Nichirei   | -                         |
|           | Leu-2a              | B/D        | -                         |
|           | DK25                | DAKO       | -                         |
|           | LT8                 | Serotec    | -                         |
|           | RPA-T8              | Pharmingen | ++                        |
| CD16      | Leu-11b             | B/D        | -                         |
|           | 3G8                 | Pharmingen | ++                        |
| CD20      | Leu-16              | B/D        | -                         |
|           | H299                | Coulter    | ++                        |
| CD25      | M-A251              | Pharmingen | -                         |
|           | B1.49.1             | Coulter    | -                         |
|           | 1HT44H3             | Coulter    | ++                        |
| CD28      | CD28.2              | Coulter    | -                         |
| CD29      | 4B4                 | Coulter    | +                         |
| CD38      | OKT10               | Ortho      | ++ (not available)        |
|           | HIT2                | Pharmingen | -                         |
|           | LS198-4-3           | Coulter    | +                         |
|           | T16                 | Coulter    | ++                        |

# 樹立された細胞株一覧

## OLD WORLD MONKEY

|                            |        |                   |  |
|----------------------------|--------|-------------------|--|
| <i>Pan troglodytes</i>     | チンパンジー | chimpanzee        | HSP-239<br>HSP-250                                       |
| <i>Macaca fascicularis</i> | カニクイザル | cynomolgus monkey | HSC-F<br>HSC-2015<br>HSC-1<br>HSC-3<br>HSC-4<br>HSC-3028 |
| <i>Macaca mulatta</i>      | アカゲザル  | rhesus monkey     | HSR-1<br>HSR-1.4<br>HSR-4<br>HSR-5<br>HSR-5.4<br>HSR-5.8 |
| <i>Macaca nemestrina</i>   | ブタオザル  | pigtail monkey    | HSMn-4613<br>HSMn-3943<br>HSMn-3942                      |

## NEW WORLD MONKEY

|                           |           |                               |                                  |
|---------------------------|-----------|-------------------------------|----------------------------------|
| <i>Callithrix jacchus</i> | コモンマーモセット | common marmoset               | HSCj-110<br>HSCj-109             |
| <i>Saguinus midas</i>     | アカテタマリン   | yellow-handed (midas) tamarin | HST-1                            |
| <i>Saguinus labiatus</i>  | シロクチタマリン  | white-lipped tamarin          | HST-3<br>HST-4<br>HST-5<br>HST-6 |
| <i>Saimiri sciureus</i>   | コモンリスザル   | squirrel monkey               | HSQ-115                          |
| <i>Aotus trivirgatus</i>  | ヨザル       | owl monkey                    | HSAat-1                          |



## 医科学研究用リソースとしてのカニクイザルの基盤高度化に関する研究 発生工学的技術のリソース研究への応用を目指したマウスを用いた検討

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  
研究協力者 井上貴美子、越後貴成美、三木洋美  
（理化学研究所バイオリソースセンター）

研究概要：マウスの体細胞クローンに関する詳細な検討を実施してきた。マウスにおいても用いる個体の系統、細胞の種類によりその結果が大きくかわることを応用してゲノム、再プログラム化などに関する基礎データを着実に蓄積してきた。これまでに得られた成果は、サル類の体細胞クローンを作出するうえで有用な情報であると考えられた。本年度はドナー細胞種のクローン作出効率の比較と始原生殖細胞クローン産子の作出をマウスを用いて試みた。その結果、終末分化したドナー細胞ゲノムも核移植クローン作出技術により再プログラム化されることが明らかになった。未分化度のことなる細胞をドナーとして検討したが、クローン作成効率に顕著な差を見いだせなかった。さらに、生殖隆起に達した生殖細胞（PGC）ゲノムを用いた核移植クローン技術により産児を得ることができた。すなわち、本細胞においても再プログラム化されることが確認された。

### A. 研究目的

サル類の発生工学的基盤技術の高度化への基礎情報を提供することを目的とした。本研究を遂行するにあたりサル由来の卵の採取や胚移植の条件設定は未だ完成されたものではなく多くの研究者により施行錯誤されているのが現状である。そこで他の小型実験動物をモデルとして、サル類に適用できる新たな発生工学技術の開発を試みるという戦略を計画した。小型実験動物としては最も情報が豊富なマウスを用いた。本年度はドナー細胞の未分化の度合いがクローン作出効率に影響を及ぼすか否かについて検討した。また、始原生殖細胞をドナー細胞としたときにクローン産児を得ることができるか検討を加えた。

### B. 研究方法

1) ドナー細胞種のクローン作出効率の比較  
すでに確立している体細胞を用いたクローン動物作出技術を用いて除核、細胞核の移植、卵活性化、卵培養および胚移植を実施した。ドナー細胞核には分化の度合いがことなると思われる4種類の細胞を用いた。ドナー細胞にはセルトリ細胞、成熟個体から採取した繊維芽細胞、造血幹細胞およびNKT

(natural killer T) 細胞を選抜した。

2) 始原生殖細胞クローン産子の作出

1)と同様の方法でクローン個体の作出を試みた。ドナーには始原生殖細胞を用いた。本細胞は始原生殖細胞が特異的にGFPで光るOct-4 promoterをもったマウスから採取した。

倫理面への配慮：動物に対しては動物福祉上の配慮を十分に行い、研究内容およびその方法については理化学研究所の審査を経て実施した。

### C. 研究結果

1) ドナー細胞種のクローン作出効率の比較

セルトリ細胞、成熟個体から採取した繊維芽細胞、造血幹細胞およびNKT細胞をドナーとしたときの4細胞期への発生率はそれぞれ59、69、47および84%であった。また、NKT細胞をドナーとしたときのmorula/blastocystへの発生率は約70%という顕著に高率を示した。

2) 始原生殖細胞クローン産子の作出

始原生殖細胞をドナーとして用いたクローンマウスの作成を試みた結果、4細胞期への発生率は63%であった。441個の構築卵を移植したところ57%の着床が確認され4匹

(1%)の産児を得ることができた。産児に至った構築卵はいずれも day 10.5 の胎児から採取した始原生殖細胞を用いたものであり、day 11.5 のそれでは産児は得られなかった。

#### D. 考察

セルトリ細胞、成熟個体から採取した繊維芽細胞、造血幹細胞およびNKT細胞をドナーとしたときの発生率を比較し、NKT細胞での発生率が顕著に高い数値を示したが、未分化度が高い造血幹細胞では47%とむしろ低値を示した。細胞間によりクローン作成の成功率に差が生じることは明らかになったが、未分化の度合いとの関係を明確にとらえることはできなかった。

また、本研究により生殖隆起に達した生殖細胞 (PGC) ゲノムにおいても再プログラム化されることが確認された。この構築卵から産児を得ることができたことは大きな成果と考えている。しかし、day 10.5 の胎児から採取した始原生殖細胞を用いたものから産児が得られたにもかかわらず、day 11.5 のそれでは産児には成長できないという興味ある知見が得られた。このことは始原生殖細胞が day 11.5 ころからインプリンティングが消去されてしまうことが原因と考えられる。

#### E. 結論

終末分化したドナー細胞ゲノムも核移植クローン作出技術により再プログラム化されることがマウスを用いた実験で明らかになった。また、未分化の組織特異的幹細胞を用いて核移植クローンの作出を試みたが効率は改善しなかった。さらに、生殖隆起に達した生殖細胞 (PGC) ゲノムは核移植クローン技術により再プログラム化されることが確認された。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Ohgane, J., Wakayama, T., Senda, S., Yamazaki, Y., Inoue, K., Ogura, A., Marh, J., Tanaka, S., Yanagimachi, R., and Shiota, K. The Sall3 locus is an epigenetic hotspot of aberrant DNA methylation associated with placentomegaly of cloned

mice. *Genes Cells*, 9: 253-60, 2004.

2) Miki, H., Inoue, K., Ogonuki, N., Mochida, K., Nagashima, H., Baba, T., and Ogura, A. Cytoplasmic Asters are Required for Progression past the First Cell Cycle in Cloned Mouse Embryos. *Biol. Reprod.* 71:2022-2028, 2004.

3) Mochida, K., Ohkawa, M., Inoue, K., Valdez Jr, D. M., Kasai, M., and Ogura, A. Birth of mice after in vitro fertilization using C57BL/6 sperm transported within epididymides at refrigerated temperatures. *Theriogenology*, (in press).

4) Mochida, K., Wakayama, T., Takano, K., Noguchi, Y., Yamamoto, Y., Suzuki, O., Matsuda, J., and Ogura, A. Birth of offspring after transfer of Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) embryos cryopreserved by vitrification. *Mol. Reprod. Dev.*, 70: 464-470, 2005.

5) Chuma, S., Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, K., Ogonuki, N., Miki, H., Toyokuni, S., Hosokawa, M., Nakatsuji, N., Ogura, A., and Shinohara, T. Spermatogenesis from epiblast and primordial germ cells following transplantation into postnatal mouse testis. *Development*, 132: 117-122, 2004.

6) Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, M., Lee, J., Yoshimoto, M., Ogonuki, N., Miki, H., Baba, S., Kato, T., Kazuki, Y., Toyokuni, S., Oshimura, M., Heike, T., Nakahata, T., Ishino, F., Ogura, A., and Shinohara, T. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell*, 119: 1001-1012, 2004.

7) Kanatsu-Shinohara, M., Miki, H., Inoue, K., Ogonuki, N., Toyokuni, S., Ogura, A., and Shinohara, T. Long-term culture of mouse male germline stem cells under serum- or feeder-free conditions. *Biol. Reprod.*, (in press).

8) Miki, H., Inoue, K., Kohda, T., Honda, A., Ogonuki, N., Yuzuriha, M., Mise, N., Matsui, Y., Baba, T., Abe, K., Ishino, F., and Ogura, A.: Birth of Mice Produced by Germ Cell Nuclear Transfer. *Genesis* 41: 81-86, 2005.

2. 学会発表

1) Inoue, K., Noda, S., Ogonuki, N., Miki, H., Kim, JM., Aoki, F., Miyoshi, M., Ogura, A. Inefficient development of embryos cloned from hematopoietic stem cells. The 37th Annual Meeting of SSR. August 2004, Vancouver, Canada.

## 医科学研究用リソースとしてのカニクイザルの基盤高度化に関する研究 発生工学的技術のリソース研究への応用

分担研究者 山海 直（感染研・筑波医学実験用霊長類センター）主任研究官  
協力研究者 下沢律浩、岡田浩典、羽鳥真功  
（感染研・筑波医学実験用霊長類センター）

研究概要：サル類の生殖生理の把握の一環として性ステロイドを中心としたホルモン動態の解析を進めてきた。現在までに、カニクイザルの個体ごとの特性を把握するための方法をほぼ確立している。また、来年度にはケージの大型化にともなう大規模施設改変が終了し、これまでと異なった環境での飼育が開始され繁殖状況の比較検討が可能となる。また、すでに成功している体外受精、顕微授精等による受精卵の作出技術もほぼ確立されてきた。胚移植による産児作出技術についてはレシピエントの選抜方法が安定しつつあり今後の成績の向上が期待される。これらの基盤技術を用いて先端医科学研究の実施が可能な環境がほぼ整ってきたといえる。本年度は、サル類精子の凍結保存、とくにアフリカミドリザル精子の新しい凍結法の開発に取り組んだ。その結果、従来の方法では融解後に全く運動精子が回収できなかったアフリカミドリザル精子にも有効な方法として超急速凍結法の開発に成功した。また、サル類の卵胞卵の成熟に関する研究として妊娠カニクイザルの卵巣から採取した卵の成熟培養を試みた。回収時に卵丘細胞が付着した卵核胞期の卵を体外培養により 24 あるいは 48 時間後に成熟させることに成功した。

### A. 研究目的

次世代の医科学研究用サル類のリソースとしてカニクイザルの個体レベルおよび細胞レベルでの質的向上とリソース整備を目的とする。種々の形態でのリソースが研究対象となるがそれらのもっとも基本となる形が個体レベルでの繁殖育成である。サル類を対象とした繁殖育成を効率的に実施するためにはサル類飼育を専用とした施設と管理システムが必要であり、当センターはこれらの条件をみたした施設である。本研究では飼育繁殖および育成管理の効率化を目指す。また、生殖細胞を対象とした新規先端技術の開発を試みることで基礎データの蓄積と技術の高度化が期待できる。本年度は発生工学的技術の開発として、とくに精子の新しい凍結法の開発を試みた。マカカ属サル類精子の凍結保存についてはいくつかの報告がある。しかし、我々はマカカ属サル類精子に有効な TTE (Tes, Tris, Egg yolk base) 溶液

を用いた方法でオナガザル属のアフリカミドリザル精子を凍結したとき融解後の精子は運動性を失うことを見いだしている。そこで、凍害保護剤との平衡時間を短縮する変法によりアフリカミドリザル精子の凍結を試みた。さらに、卵胞卵の成熟培養に取り組んだ。発生工学的研究を行ううえで、卵子は無くてはならない重要な研究材料である。しかしながら、マウスなどの実験動物とは異なりサル類へのホルモン投与による成熟卵子の採取は決して容易ではないのが現状である。成熟卵子の採取高率が向上することでサル類の発生工学研究も推進され、出生日が同じ個体や妊娠日齢が同じ胎児の作出など、さらには遺伝子操作個体の作出へもつながるものと考えられる。そこで、成熟卵子の確保を目指して、妊娠カニクイザルの卵巣から採取した卵子の体外成熟培養による成熟卵子の作出について検討を行った。

## B. 研究方法

### 1) サル類精子の凍結保存に関する研究: アフリカミドリザル精子の新しい凍結法

アフリカミドリザルの射出精子を検体とした。TTE 溶液および TTE-G 溶液 (TTE 溶液 + 10% グリセリン) を凍結保存液に用いた。方法 1: 室温で精子懸濁液を TTE 溶液で 10 倍希釈し、2 時間かけて 4℃ まで緩慢冷却後、等量の TTE-G 溶液で希釈。方法 2: 室温で精子懸濁液を TTE 溶液で 10 倍希釈後、等量の TTE-G 溶液で希釈。方法 3: 2 の方法を全て 4℃ で実施。これらの精子懸濁液をストローに封入後 LN2 気相中に 5 分置き、LN2 中に保存した。方法 4: 前処理は方法 2 に同じ。次いで、懸濁液をメッシュに含ませた後、LN2 気相中に 30 秒置き、LN2 中に保存した。方法 5: 室温で精子懸濁液を TTE 溶液で 10 倍希釈。以下、方法 4 の凍結処理に準ずる。融解は全て急速法で行った。

### 2) サル類の卵胞卵の成熟に関する研究: 妊娠カニクイザルの卵巣から採取した卵の成熟培養

当霊長類センターで維持している妊娠カニクイザルの実験殺個体由来する卵巣を 2% FBS を含む平衡塩類溶液に採取した。採取した卵巣はメス刃で細切し、成熟卵子と同等なサイズの卵子を回収した。回収した卵子は、20% FBS、9.4 IU/ml hFSH および 40.2 IU/ml hCG を含む TCM-199 培地にて体外成熟培養を行った。また卵子は、卵丘細胞で厚く覆われているもの (A 区)、卵丘細胞の層が薄いあるいは一部欠落しているもの (B 区)、卵丘細胞で覆われていないもの (C 区) の 3 区に分けた。成熟培養開始から 24 時間に卵子は、ヒアルロニダーゼ処理で卵丘細胞を除去し、成熟卵、卵核胞期卵、卵核胞崩壊期卵に分類した。この際、成熟卵以外は継続して体外成熟を行い、48 時間さらに 72 時間目に観察を行った。

倫理面への配慮: 動物に対しては動物福祉上の配慮を十分に行い、研究内容およびその方法については国立感染症研究所の動物実験委員会の審査を経ている。

## C. 研究結果

### 1) サル類精子の凍結保存に関する研究: アフリカミドリザル精子の新しい凍結法

方法 1 では融解後に精子の運動性が認められなかった。方法 2 では融解後 0.5 時間の時点で高い運動性を示したが 1 時間後には運動性が急激に低下した。方法 3 では融解後 2 時間の時点で高い運動性を示したが 4 時間で運動性の低下を認めた。方法 4、5 では融解後 3 時間まで少数の直進運動する精子を認め、特に方法 5 では 6 時間目まで直進運動精子を認めた。

### 2) サル類の卵胞卵の成熟に関する研究: 妊娠カニクイザルの卵巣から採取した卵の成熟培養

卵巣から採取直後の A および B 区、計 9 個の卵子は全て卵核胞期であった。A 区、B 区および C 区の成熟後 24 時間での成熟卵の割合は、それぞれ 18%、20% および 17% であり、成熟率に差は見られなかった。同様に積算して 48 時間目では、それぞれ 45%、30% および 25%、ならびに 72 時間目ではそれぞれ 50%、30% および 29% であり、A 区において成熟率が高い傾向にあった。

## D. 考察

TTE 溶液を用いたアフリカミドリザル精子の凍結においては、凍害保護剤との平衡時間を短くすることで融解後に高い運動性を保持した精子を回収できることが明らかとなった。また、LN2 気相中で瞬間的に凍結した場合、凍害保護剤を用いなくても運動性を保った精子が回収でき、凍害保護剤の有無による大きな差は認められなかった。しかし、融解後の運動精子数は少なく、実用化に向けた改良が必要である。本研究によりアフリカミドリザル精子の凍結保存法が開発できる可能性が示唆された。

卵胞卵の成熟培養について検討した結果、卵丘細胞の重要性と未成熟卵子の体外成熟には 24 時間以上の時間を必要とすることが示された。今後、成熟した卵の受精能・発生能などについて検討するとともに、未だ体外での成熟率は低いため、培養条件の改善が必要であると考えられた。

## E. 結論

本研究によりこれまで凍結融解後、運動精子が回収できなかったアフリカミドリザル精子の保存技術が大きく進展した。また、卵巣から

採取した卵核胞期の卵の成熟培養が可能となりサル類の卵を確保するための一手段と成りうる結果を得た。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kwon JK, Mochida K, Wang YL, Sekiguchi S, Sankai T, Aoki S, Ogura A, Yoshikawa Y, Wada K, Ubiquitin C-terminal hydrolase L-1 is essential for the early apoptotic wave of germinal cells and for sperm quality control during spermatogenesis : Biol. Reprod. (in Press)
- 2) Okada H, Ito M, Hirose Y, Yoshida T, and Sankai T, Buffalo rat liver cells produce proteins that support the preimplantation development of mouse embryos cultured *in vitro* : Comp. Med., in press
- 3) Okada H, Hirose Y, Manonmani P, Ito M, Sankai T, Characterization of an immortalized oviduct cell established from the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) : J. Med. Primatol., in press
- 4) Manonmani P, Okada H, Ogonuki N, Uda A, Ogura A, Yoshida T, Sankai T, Fertilization and preimplantation development of mouse oocytes after prolonged incubation with caffeine : Reproductive Medicine and Biology, 2004, 3: 245-251
- 5) Okada, H Hirose Y, Manonmani P, Ito M, Sankai T, Zona-froast method for separating mouse eggs from other cells : Exp. Anim., 2004, 53:355-359.
- 6) Miyamoto S, Chen Y, Nakamura S, Sankai T, Machida T, Yoshida T, Synthesis and release of steroids in intestines from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) : Zoological Science, 2004, 21:639-648.

##### 2. 学会発表 (含 : シンポジウム)

- 1) 前田るい、寛山 隆、須藤和寛、三原田賢一、

山海 直、小倉淳郎、中村幸夫、マウス核移植ES細胞の造血細胞への分化能、第27回日本分子生物学会(神戸) 2004年12月

- 2) Okada H, Hatori M, Shimozawa N, Sankai T, Development of the cryopreservation method of spermatozoa in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) and African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*) -Comparison of cynomolgus monkey and African green monkey freeze-thawed spermatozoa-, 10<sup>th</sup> International Workshop of Primate Diseases (Tsukuba, Japan) December, 2004
- 3) Hatori M, Okada H, Shimozawa N, Ebisawa T, Sankai T, Development of the new cell culture system under a microscope and observation of the cells by the animation built using a digital photography equipment, 10<sup>th</sup> International Workshop of Primate Diseases (Tsukuba, Japan) December, 2004
- 4) Shimozawa N, Okada H, Hatori M, Yoshida T, Sankai T, Collection of mature oocytes and the intracytoplasmic sperm injection in the African green monkey (*Cercopithecus aethiops*) and cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*), 10<sup>th</sup> International Workshop of Primate Diseases (Tsukuba, Japan) December, 2004
- 5) 揚山直英、鯉江 洋、小野文子、金山喜一、酒井健夫、山海 直、アフリカミドリザルにおける循環器心機能検査および認められた心疾患、10<sup>th</sup> International Workshop of Primate Diseases (Tsukuba, Japan) December, 2004
- 6) 鯉江 洋、揚山直英、小野文子、佐藤常男、金山喜一、酒井健夫、山海 直、心エコー図で見られたサル類の心疾患、10<sup>th</sup> International Workshop of Primate Diseases (Tsukuba, Japan) December, 2004
- 7) 土田順子、吉田高志、小野孝浩、山海 直、室内繁殖コロニーで育成されたカニクイザルの哺育態度に関する統計学的解析、第20回日本霊長類学会(犬山市) 2004年7月
- 8) 岡田浩典、下澤律浩、山海 直、アフリカ

ミドリザルおよびカニクイザル精子の凍結保存, 第20回日本霊長類学会(犬山市)2004年7月

9) 下澤律浩、岡田浩典、冷岡昭雄、吉田高志、山海直, 年齢によるカニクイザルの排卵時期の比較, 第20回日本霊長類学会(犬山市)2004年7月

10) Okada A, Shimozawa N, Baba S, Yokofujita J, Murakami K, Igarashi H, Nimori S, Sankai T, Kuroda M, Effect of magnetic fields on mammalian spermatozoa : 16th international Congress of the FAA (International federation of association of anatomists) Anatomical Science 2004 from gene to body (Kyoto, Japan) August, 2004

11) 山海直, サル類の飼育・繁殖現場が最新医療研究を支えている, シンポジウム:サル類の飼育・繁殖現場から生まれる最新医療研究(オーガナイザー:鳥居隆三、山海直), 第51回日本実験動物学会(長崎)2004年5月

12) 下澤律浩、広瀬良宏、岡田浩典、吉田高志、山海直, アフリカミドリザルにおける顕微授精に関する検討, 第51回日本実験動物学会(長崎)2004年5月

13) 岡田浩典、広瀬良宏、下澤律浩、伊藤雅夫、山海直, アフリカミドリザルのES細胞樹立の試み, 第51回日本実験動物学会(長崎)2004年5月

14) 下澤律浩、広瀬良宏、岡田浩典、吉田高志、山海直, アフリカミドリザルおよびカニクイザルにおけるグリセリン溶媒を用いたFSHによる卵胞発育誘起の試み, 第45回日本哺乳動物卵子学会(大津市)2004年5月

15) 揚山直英、鯉江洋、小野文子、山海直, 室内繁殖カニクイザルコロニーでの循環器疾患に関する大規模巣クリーニング, シンポジウム:サル類における循環器疾患モデル(オーガナイザー:山海直、小野文子、山本博), 第137回日本獣医学会(藤沢)2004年4月

16) 鯉江洋、揚山直英、小野文子、佐藤常男、酒井健夫、金山喜一、山海直, 心エコー図でみられたサル類の心疾患, シンポジウム:サル類における循環器疾患モデル(オーガナイザー:山海直、小野文子、山本博), 第137回

日本獣医学会(藤沢)2004年4月

## カニクイザル脳組織における軸索輸送関連蛋白の加齢性変化

分担研究者 吉川泰弘（東京大学大学院農学生命科学）教授

協力研究者 木村展之（感染研・筑波医学実験用霊長類センター）研究官

研究要旨：カニクイザルはヒトに近縁な霊長類であるとともに、アルツハイマー病（AD）主病変である老人斑が自然発症的に大脳皮質に形成される動物種であることから、AD 研究に有用な動物モデルとなる可能性がある。我々は過去の検索において、カニクイザル脳内では加齢に伴い AD 関連蛋白群が神経終末（シナプス）に蓄積することを明らかにした。この加齢性蛋白蓄積の原因には蛋白代謝能および蛋白輸送機能の低下が考えられるが、老人斑構成蛋白アミロイドβ（Aβ）の前駆体蛋白 APP が軸索輸送に関与していることから、本研究においてはまず軸索輸送関連蛋白の検索を行った。

### A. 研究目的

我々は過去の検索において、アミロイド前駆体蛋白（APP）や細胞内アミロイドβ（Aβ）を含む AD 関連蛋白群が神経終末分画に蓄積することを明らかにした。そこで本研究では神経細胞の軸索輸送関連蛋白に注目し、同様にフラクシオン化した材料を用いて生化学的検索を行った。軸索輸送は Anterograde（順方向：細胞体→シナプス）と Retrograde（逆方向：シナプス→細胞体）という2つの流れによって維持されている。前者は Kinesin 蛋白複合体によって、後者は Dynein 蛋白複合体によって担われており、その両者のスイッチの切り替えを果たす因子として Dynactin（DYN）が存在する。今回の検索では、DYN と結合して輸送機能発現に関わると考えられている Kinesin heavy chain（KHC）、Dynein intermediate chain（DIC）および DYN そのものに注目して westernblotting 法による生化学的検索を行った。さらに我々は、免疫沈降法を用いてこれら3分子の結合（=複合体形成）に関する加齢性変化も併せて検索した。

### B. 研究対象および方法

生化学的検索には、国立感染症研究所・筑波医学実験用霊長類センターに由来する若齢個体（4歳齢）4例、成熟個体（20および

21歳齢）4例および老齢個体（30および36歳齢）2例の計10個体の後頭葉を用いた。各脳組織はホモジナイズ後、シヨ糖濃度勾配法によってマイクロゾーム分画および神経終末分画にフラクシオン化し、westernblotting を行った。

KHC-DYN および DIC-DYN 複合体形成に関する検索は、若齢個体（4および6歳齢）および成熟個体（21および24歳齢）の後頭葉を用いて、Co-immunoprecipitation 法による免疫沈降後、westernblotting を行った。

### C. 結果

シヨ糖濃度勾配法を用いてマイクロゾーム（MS）、サイトゾル（CZ）および神経終末（NE）分画化したサンプルを生化学的に検索した結果、カニクイザル脳内では加齢と共に軸索輸送蛋白が CZ 分画で減少し、NE 分画で蓄積することが明らかになった。これは KHC、DIC あるいは DYN に関わらず同一の傾向を示し、加齢と共に軸索輸送蛋白群が神経終末に蓄積することが示唆された。また、特に DYN に関しては加齢と共に MS 分画での蛋白量が有意に上昇していた。

免疫沈降試験を行ったところ、成熟齢カニクイザル脳内では DIC と DYN の複合体形成度が低下していることが明らかになった。KHC



と DYN との複合体形成度も、若干の低下が確認されたが、DIC-DYN 間ほどの低下ではなかった。

#### D. 考察:

Kinesin や Dynein は細胞体とシナプスを往復していることから、本来 CZ 分画と NE 分画における蛋白存在量がほぼ均等になっているはずである。しかしながら、本研究において軸索輸送蛋白群が CZ 分画で減少し、NE 分画において蓄積していたことから、カニクイザル脳内では加齢と共に Retrograde 能低下が生じている可能性が示唆された。この結果は、これまで我々が過去に報告してきた AD 関連蛋白群の神経終末における蛋白蓄積の原因となっている可能性が示唆された。また、MS 分画における DYN の蛋白量増加=蛋白発現量増加は、これら蛋白輸送機能低下の代償性発現上昇ではないかと考えられる。免疫沈降試験の結果からも、DYN と DIC の複合体形成低下が確認されたことは、先述した生化学的検索における Retrograde 能低下を裏付ける結果であることが考えられる。

Kinesin や Dynein は、その複合体形成因子 (KHC や DIC 等) のリン酸化等の蛋白修飾によって輸送機能の発現がコントロールされている可能性も報告されており、加齢によって生じる何らかの蛋白修飾 (あるいは修飾不全) によって、DYN との複合体形成度が低下し Retrograde 能低下を引き起こしているのかもしれない。

今後は、若齢カニクイザルの軸索輸送関連蛋白群と成熟齢もしくは老齢カニクイザルの軸索輸送関連蛋白群のプロファイリングを行い、どのような蛋白修飾の違いが生じているのかを明らかにする予定である。

また Retrograde 能低下によって、過去に明らかにしてきた AD 関連蛋白群の蓄積が再現されるのかどうかを証明するために、in vitro 系を用いて Retrograde 能低下と AD 病態との関係を検索する予定である。

#### E. 結論:

本研究において Retrograde 能の加齢性低下が確認されたことから、AD 関連蛋白群の神経終末における蓄積は軸索輸送機能低下に起因する可能性が示唆された。最近の AD 研

究においては、神経終末における Aβ の蓄積やそれに起因するシナプス障害機構が大きな注目を集めていることから、現在我々の行っている研究活動は AD 研究の主流となりつつある。また、全 AD 患者の 80% 以上は加齢性に発症する孤発性であることから、加齢と AD 病態との関係を明らかにすることは AD 治療法確立に向けた急務でもある。このことから、今後は軸索輸送機能関連蛋白群の分子レベルにおけるより詳細な加齢性変化を解析することは非常に重要な意義を持つと考えられる。また、本研究で見られた Retrograde 能低下が AD 病態にどのように関与しているのかを明らかにすることで、孤発性 AD 発症機構の解明に大きな貢献をすることが期待される。

#### F. 健康危険情報 特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Hayashi H, Kimura N, Yamaguchi H, Hasegawa K, Yokoseki T, Shibata M, Yamamoto N, Michikawa M, Yoshikawa Y, Terao K, Matsuzaki K, Lemere CA, Selkoe DJ, Naiki H, Yanagisawa K. A seed for Alzheimer amyloid in the brain. *Journal of Neuroscience* 2004; 24(20):4894-902.

2) Kimura N, Negishi T, Ishii Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y. Astroglial responses against Abeta initially occur in cerebral primary cortical cultures: species differences between rat and cynomolgus monkey. *Neurosci Res.* 2004;49(3):339-46

3) Kimura N, Nakamura Si, Ono F, Sakakibara I, Ishii Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y. Presenilin-2 in Cynomolgus Monkey Brain: Investigation of Age-Related Changes. *Primates.* 2004;45(3):167-75.

4) Kimura N, Tanemura K, Nakamura S, Takashima A, Ono F, Sakakibara I, Ishii Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y. Age-related changes of Alzheimer's disease-associated proteins in cynomolgus monkey brains. *Biochem Biophys Res Commun.*

2003;310(2):303-11.

2. 学会発表

1)The 9<sup>th</sup> International Conference on  
Alzheimer' s Disease and Related  
Disoorders (第9回国際アルツハイマー病及  
び関連疾患学会)

2004年7月 米国フィラデルフィア

2)日本痴呆学会 2004年10月 東京

### Ⅲ．研究成果の刊行物に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

| 発表者氏名  | 論文タイトル名  | 発表雑誌名            | 巻名  | ページ           | 出版年  |
|--|--|------------------|-----|---------------|------|
| Mochida, K.,<br>Wakayama, T., Takano,<br>K., Noguchi, Y.,<br>Yamamoto, Y., Suzuki,<br>O., Matsuda, J., and<br><u>Ogura, A</u>  | Birth of offspring after<br>transfer of Mongolian<br>gerbil ( <i>Meriones<br/>unguiculatus</i> ) embryos<br>cryopreserved by<br>vitrification. | Mol. Reprod. Dev | 70  | 464-470       | 2005 |
| Ohgane, J., Wakayama,<br>T., Senda, S.,<br>Yamazaki, Y., Inoue,<br>K., <u>Ogura, A.</u> , Marh, J.,<br>Tanaka, S.,<br>Yanagimachi, R., and<br>Shiota, K.   | The <i>Sall3</i> locus is an<br>epigenetic hotspot of<br>aberrant DNA<br>methylation associated<br>with placentomegaly of<br>cloned mice.      | Genes to Cells   | 9   | 253-260       | 2004 |
| Miki, H., Inoue, K.,<br>Ogonuki, N., Mochida,<br>K., Nagashima, H.,<br>Baba, T., and <u>Ogura, A</u>   | Cytoplasmic Asters are<br>Required for<br>Progression past the<br>First Cell Cycle in<br>Cloned Mouse Embryos.                                 | Biol. Reprod     | 71  | 2022-<br>2028 | 2004 |
| Miki, H., Inoue, K.,<br>Kohda, T., Honda, A.,<br>Ogonuki, N., Yuzuriha,<br>M., Mise, N., Matsui,<br>Y., Baba, T., Abe, K.,<br>Ishino, F., and <u>Ogura,<br/>A</u>  | Birth of Mice Produced<br>by Germ Cell Nuclear<br>Transfer.  | Genesis          | 41  | 81-86         | 2005 |
| Kanatsu-Shinohara, M.,<br>Inoue, M., Lee, J.,<br>Yoshimoto, M.,<br>Ogonuki, N., Miki, H.,<br>Baba, S., Kato, T.,<br>Kazuki, Y., Toyokuni,<br>S., Oshimura, M.,<br>Heike, T., Nakahata, T.,<br>Ishino, F., <u>Ogura, A.</u> ,<br>and Shinohara, T | Generation of<br>pluripotent stem cells<br>from neonatal mouse<br>testis.  | Cell             | 119 | 1001-<br>1012 | 2004 |