

knockout mice. *J. Physiol.*, 553:203-212, 2003.

8) Takiguchi-Hayashi, K., Sekiguchi, M., Ashigaki, S., Takamatsu, M., Hasegawa, H., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Nakanishi, T. and Tanabe, Y.: Generation of reelin-positive marginal zone cells from the caudomedial wall of telencephalic vesicles. *J. Neurosci.*, 24:2286-2295, 2004.

9) Takahashi, M., Kojima, M., Nakajima, K., Kubota, M., Suzuki-Migishima, R., Motegi, Y., Yokoyama, M. and Takeuchi, T.: Cardiac abnormalities cause early lethality of *jumonji* mutant mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 324:1319-1323, 2004.

10) 右島富士男・横山峯介・西島正博：ガラス化法による卵巣凍結保存の検討。産婦人科の実際, 52:2379-2382, 2003.

著書

1) 横山峯介 東 貞宏:体外受精. シリーズ・バイオサイエンスの新世紀. 第15巻 生命工学：新しい生命へのアプローチ. (浅島 誠、山村研一 編), 共立出版, 東京, pp.138-146, 2002.

2) 横山峯介：生殖細胞の操作・生殖細胞および胚の保存. 動物発生工学 (岩倉洋一郎ら, 編), 朝倉書店, 東京, pp.132-142, 2002.

3) 横山峯介：胚バンク. バイオ・ゲノムを読む事典. (三菱総合研究所・三菱化学生命科学研究所 編著), 東洋経済新聞社, 東京, pp.211-213, 2004.

2. 学会発表

1) 右島富士男・横山峯介・西島正博：ガラス化法によるマウス卵巣凍結保存の検討. 第48回日本不妊学会総会, 2003年10月, 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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 熊本大学生命資源研究・支援センター 教授 中瀬直己

研究要旨

本研究では、1 熊本大学生命資源研究・支援センターに寄託されているマウスのデータベース (CARD R-BASE) の構築。2 マウス生殖工学技術マニュアル CD の作製。3 レーザーによる透明帯穿孔卵作製システムの開発について行った。その結果、CARD R-BASE の構築により、アクセス数やマウス供給件数が増加した。また、生殖工学技術マニュアル CD の配布により、これら技術の普及に大いに貢献した。さらに、透明体穿孔卵子を用いることにより、受精能の低い C57BL/6 凍結精子の受精率を飛躍的に向上させることが可能となった。

A. 研究目的

本研究は、以下の3つを目的として行った。

- 1 熊本大学生命資源研究・支援センター動物資源開発研究部門に寄託されているマウスのデータベース (CARD R-BASE) の構築。
- 2 マウス生殖工学技術マニュアル CD の作製。
- 3 レーザーによる透明帯穿孔卵作製システムの開発。

B. 研究方法

1 CARD R-BASE の構築：熊本大学生命資源研究・支援センター動物資源開発研究部門が開発者からの寄託を受けて維持・管理・供給している遺伝子改変マウスのデータベースを構築した。疾患モデルとしての可能性や応用分野に関する情報は、フリーテキスト形式で記載されている。

2 マウス生殖工学技術マニュアル CD の作製：技術の解説だけでなく、作業手順のイラスト・作業中の写真・動画を盛り込んだマルチメディアによるマニュアルの CD を作製した。本 CD では、体外受精、胚・精子の凍結保存、透明帯切開術、精管結紮雄の作製、卵管灌流 (2 細胞期胚の採取)、経卵管壁卵管内胚移植、子宮内胚移

植、帝王切開、共培養法によるキメラマウスの作製および 2 細胞期胚の低温輸送などの技術のみならず、受容雌および産子の観察についても、わかりやすく解説した。

3 レーザーによる透明帯穿孔卵作製システムの開発：実験には、卵丘細胞除去した C57BL/6J 卵子を用いた。透明帯の穿孔は、卵子を 0.5M シュウクロースに入れ、卵細胞を収縮させた後、透明帯にレーザーを照射することにより行った。透明体穿孔卵子を作製後、融解した凍結 C57BL/6J 精子との間で体外受精を行った。

C. 研究結果

1 CARD R-BASE の構築：現在、寄託されたマウスのうち、約 400 系統分のデータベースを構築した。このデータベースは、系統、遺伝子および疾患などの項目からの検索が可能であり、データベースへのアクセス数は月平均 1000 件を上回っている。

2 マウス生殖工学技術マニュアル CD の作製：全国の実験動物関係の研究者および技術者など、多くの方から多数のリクエストを頂き、これまで

に約1800枚のCDを配布した。

D. 考察

1 CARD R-BASE の構築：データベースは逐次更新され、データ数も増えてきたことから、これにアクセスする件数やマウスの供給件数も増加するものと考えられる。

2 マウス生殖工学技術マニュアル CD の作製：数多くの研究者や技術者からの依頼により多くの CD を配布した。従って、これら生殖工学技術の日本全国への普及に大いに貢献するものと思われる。

3 レーザーによる透明帯穿孔卵作製システムの開発：本透明体穿孔卵子作出システムは、作製作業が容易である、大量作製が可能、穴の大きさが均一、成功率が極めて高いなどの特長があり、これにより作製された透明体穿孔卵子は、今後、受精能の低いさまざまな精子への応用が期待される。

E. 結論

1 CARD R-BASE の構築：熊本大学生命資源研究・支援センター 動物資源開発研究部門に寄託されているマウスのデータベースの構築を行ったことにより、これらマウスの供給件数も飛躍的に増えつつある。

2 マウス生殖工学技術マニュアル CD の作製：全国の実験動物関係の研究者および技術者などに約1800枚のCDを配布したことにより、これら技術の普及に大いに貢献した。

3 レーザーによる透明帯穿孔卵作製システムの開発：本透明体穿孔卵子作出システムは、作製作業が容易である、大量作製が可能であるなどさまざまな特長があり、これにより作製された透明体穿孔卵子を用いることで、受精能の低いC57BL/6凍結

精子の受精率を飛躍的に向上させることが可能であった。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Matsuoka, S., Takubo, K., Hamaguchi, I., Nomiya, K., Hosokawa, K., Sakurada, K., Nakagata, N., Ikeda, Y., Mak, T.W., Suda, T. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*. 431(7011): 997-1002. 2004
- 2) Nitta, Y., Yoshida, K., Satoh, K., Senba, K., Nakagata, N., Peters, J., Cattanch, B.M. Spontaneous and Radiation-induced Leukemogenesis of the Mouse Small Eye Mutant, Pax6(Sey3H). *J. Radiat. Res. (Tokyo)*. 45(2): 245-251. 2004.
- 3) Nishizono, H., Shioda, M., Takeo, T., Irie, T., Nakagata, N. Decrease of fertilizing ability of mouse spermatozoa after freezing and thawing is related to cellular injury. *Biol Reprod.* 71(3):973-978. 2004.
- 4) Nitta, Y., Yoshida, K., Nakagata, N., Harada, T., Ishizaki, F., Nitta, K., Torii, M. Effects of a hemizygous deletion of mouse chromosome 2 on the hematopoietic and intestinal tumorigenesis. *J Toxicol Pathol* 17:105-112, 2004
- 5) 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.

- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Shaw, JM., Nakagata, N. Cryopreservation of transgenic mouse lines. *Methods Mol. Biol.* 180: 207-228, 2002.

2 学会発表

- 1) 中潟直己：遺伝子改変マウスの胚・精子バンクシステム 北陸実験動物研究会第8回総会・第22回研究会、2004.5、金沢
- 2) 中潟直己：熊大 CARD における生殖工学技術研修について 第51回日本実験動物学会総会、2004.5、長崎

- 3) 山村綾子、柳田朋子、竹市美和子、井手幸恵、小川真美、金子武人、中潟直己：10年間凍結保存されたマウス精子の受精能の検討 第51回日本実験動物学会総会、2004.5、長崎
- 4) 井手幸恵、山村綾子、小川真美、柳田朋子、竹市美和子、中島竜之、金子武人、中村直子、吉住正等美、浦野 徹、中潟直己：種々の凍結法による凍結マウス胚の融解後の成績について 第51回日本実験動物学会総会、2004.5、長崎
- 5) 小川真美、山村綾子、柳田朋子、井手幸恵、竹市美和子、中島竜之、金子武人、城石俊彦、中潟直己：JF1/Ms の過排卵処理におけるホルモン濃度と週齢の検討 第51回日本実験動物学会総会、2004.5、長崎
- 6) 柳 美穂、坂本亘、中島竜之、小原めぐみ、清原友美、井上聖也、中潟直己：透明帯穿孔卵子を用いたマウス凍結融解精子の体外受精成績について 第51回日本実験動物学会総会、2004.5、長崎
- 7) 金子武人、山村綾子、小川真美、井手幸恵、柳田朋子、竹市美和子、中島竜之、中潟直己：遺伝子改変雄マウスを用いた体外受精と得られた胚の凍結保存および移植成績 第45回日本哺乳動物卵子学会、2004.5、大津
- 8) 西園啓文、中潟直己：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 第95回日本繁殖生物学会大会、2002.9、岩手

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
中潟直己	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
中潟直己	胚操作実験施設 精子凍結保存室	有馬朗人	これからの大学 等研究施設第 2編「生命科学 編」	社団法人 文教施設 協会 株 式会社科 学新聞社	東京	2003	6.24-26 6.27-28
中潟直己	遺伝子改変マ ウスの胚・精 子バンク	山村研一	別冊・医学のあ ゆみ 疾患モデル 動物一病因 解析での役 割と限界	医歯薬出 版	東京	2004	24-27

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
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 transferrin 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, N W., 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

Kyuwa,S, Nishikawa,T, Kaneko,T, Nakashima,T, Kawano,K, Nakamura,N, Noguchi,K, Urano,T, Itoh,T, <u>Nakagata,N.</u>	Experimental evaluation of cross-contamination between cryotubes containing mouse 2-cell embryos and pathogens in liquid nitrogen tanks.	Exp. Anim.	52	67-70	2003
Oike,Y, Yasunaga,K, Ito,Y, Matsumoto,S, Maekawa,H, Morisada,T, Arai,F, <u>Nakagata,N.</u> , Takeya,M, Masuho,Y, S u d a , T .	Angiopoietin-related growth factor (AGF) promotes epidermal proliferation,remodeling, and regeneration.	Proc. Natl. Acad. Sci. USA.	100	9494-9	2003
K a m i m u r a , E , Nakashima,T, Ogawa,M, Ohwada,K, <u>Nakagata,N.</u>	Study of low-temperature (4 degrees C) transport of mouse two-cell embryos enclosed in oviducts.	Comp. Med.	53	393-6	2003
Ito,K., Hirao,A., Arai,F., Matsuoka,S.,Takubo,K., H a m a g u c h i , I . , N o m i y a m a , K . , H o s o k a w a , K . , S a k u r a d a , K . , <u>Nakagata,N.</u> , Ikeda,Y., Mak,TW., Suda,T.	Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells.	Nature	431	997-1002	2004
Nitta Y, Yoshida K, Satoh K, Senba K, <u>Nakagata N</u> , Peters J, Cattanach BM.	Spontaneous and Radiation-induced Leukemogenesis of the Mouse Small Eye Mutant, Pax6(Sey3H).	J. Radiat. Res.	45	245-251	2004
Nishizono H, Shioda M, Takeo T, Irie T, <u>Nakagata N</u> .	Decrease of fertilizing ability of mouse spermatozoa after freezing and thawing is related to cellular injury.	Biol. Reprod.	71	973-978	2004
Nitta Y, Yoshida K, <u>Nakagata N</u> , Harada T, Ishizaki F, Nitta K, Torii M.	Effects of a hemizygous deletion of mouse chromosome 2 on the hematopoietic and intestinal tumorigenesis.	J. Toxicol. Pathol	17	105-112	2004

分担研究者研究報告書

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

卵巣，特に若齢時の卵巣には多量の卵子がある。この卵子の効率的な利用法は系統保存や生殖工学技術の開発・利用に大いに役立つものと考えられる。こうした卵子活用の基礎および応用のため、本研究では1) 卵子発育ステージの差による卵子発生能関連遺伝子の検索、2) 凍結保存幼若マウス卵巣の卵胞発育培養を応用した胚作成法、という2つのテーマについて検討した。

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、本研究では卵巣内卵子活用の基礎および応用を見据えた研究を行なった。まず、より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。一方、卵巣内卵子活用の応用としてガラス化保存卵巣から卵巣移植を経ずに胚を得る方法を検討した。Migishima *et al.* (2003) により、マウス系統保存法の一つとして卵巣ガラス化保存と卵巣移植を併用した産仔作出法の有用性が示された。しかし、仮親選択に比較的自由度がある胚移植に比べ、卵巣移植では移植免疫の点から仮親系統の制約が厳しい。そこで、本研究では卵胞発育培養系を用いて、ガラス化保存卵巣から卵巣移植を経ずに胚を得る方法を検討し、産仔の作出を試みた。

B. 研究方法

以下の動物実験については国立感染症研究所動物実験指針に則って行なった。

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。

3) ガラス化保存卵巣由来卵子の培養

Migishima *et al.* (2003) の方法で13日齢のB6D2F1雌マウスの卵巣をDAP213液を用いて液体窒素内にて保存後、

解凍した。コラゲナーゼとピペッティングにより卵胞を単離し、5%FBS添加Waymouth培地（発育培地）で、コラーゲンコート・ウェルインサート上にて10日間培養した（Eppigの方法による）。さらに改変群として5%FBS添加Waymouth培地に替えて、5%FBS添加 α -MEM培地（MEM）で、コラーゲンコート・ウェルインサート上にて10日間培養した。さらにAscorbic acid 2-*O*- α -Glucoside（A α G）とAlanyl-glutamine（AlaGln）を添加した培養群（MEM+A α G+AlaGln）も設定した。その後、体外成熟培養し、成熟卵子（=卵核崩壊卵）をICR成熟雄マウスの精巣上体精子を用いてMEM/BSA培地にて体外受精し、KSOM/AA+BSA培地にて媒精後120時間まで培養した。培養は全て、37℃、5% CO₂、5% O₂、90% N₂の気相下で行った。1回の実験には2匹分の卵巣を用い、3~5回反復実験を行った。

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 \pm 10.8、164.0 \pm 3.5、161.0 \pm 7.6、132.0 \pm 11.6個（実験3回の平均 \pm 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 \pm 11.1、130.6 \pm 6.1、136.0 \pm 7.4、118.7 \pm 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 \pm 7^a、25 \pm 3^a、66 \pm 3^b、84 \pm 3^b%で、培養4日目における桑実胚への発生率は6 \pm 4^a、10 \pm 3^a、60 \pm 1^b、79 \pm 7^b%、培養6日目における胚盤胞への発生率は2 \pm 1^a、9 \pm 3^a、49 \pm 1^b、70 \pm 7^b%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。

3) ガラス化保存卵巣由来卵子の培養

a) 解凍方法の検討

解凍後5分間発育培地内に静置した後コラゲナーゼ処理した群に比べ（103.7 \pm 20.1、実験1回当たり卵巣2匹分の平均 \pm 標準誤差）、30分静置した群の方が得られる卵子数が多かった（210.7 \pm 28.6）。また、卵子成熟率も後者が高かった（3.0 \pm 1.3% vs. 6.4 \pm 0.9%）。30分静置群の成熟卵子を体外受精・体外培養に供したところ、2細胞期へ61.7 \pm 7.3%、胚盤胞へ9.9 \pm 1.6%が発生した。

b) 卵胞発育培養条件の検討

MEM群とMEM+ α G+AlaGln群ではa)で用いた5%FBS添加Waymouth培地での採卵数と比べ差はなかったが(238.0 \pm 22.3, n=3および249.6 \pm 17.9, n=5)、卵子成熟率は有意に高かった(18.6 \pm 0.8%および40.6 \pm 6.6%)。MEM+ α G+AlaGln群の成熟卵子を体外受精・体外培養に供したところ、2細胞期へ54.9 \pm 5.9%、2細胞から胚盤胞へ29.6 \pm 6.5%が発生し、昨年度実績よりも胚盤胞形成率が有意に高かった。しかし、得られた2細胞期胚(101個)や桑実胚+胚盤胞(32個)を偽妊娠雌へ移植しても着床すらしなかった。

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法により行ったところ、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。

卵巣のガラス化保存における卵胞卵子の生存性は、解凍方法と培養液の組成に強く影響を受けることがわかった。特に、ビタミンC様物質とグルタミン様物質の添加により卵子の体外成熟率が向上したことから、卵胞発育培養時の酸化ストレスが卵子の性状を悪化させる一因であることが示唆された。しかし、酸化ストレスの軽減を行っても生存産仔が得られないことから、卵巣のガラス化保存においては、多様な凍害が卵子に生じている可能性が考えられた。

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。

ガラス化保存卵巣由来卵胞の卵胞発育培養を利用することにより胚盤胞が得られ、卵巣移植によらない胚の入手が可能であることがわかった。しかし、得られた2細胞期胚や胚盤胞を偽妊娠雌へ移植しても着床すらしないため、今後更に改良を要すると考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

- 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 α -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).
- Noguchi A, Takekawa N, Einarsdottir T, Koura M, Noguchi Y, Takano K, Yamamoto Y, Matsuda J, and

Suzuki O Chromosomal mapping and zygosity check of transgenes based on flanking genome sequences determined by genomic walking. *Exp. Anim.* 53:103-111, 2004.

- Koura M, Handa H, Noguchi Y, Takano K, Yamamoto Y, Matsuda J, and Suzuki O. Sequence analysis of cDNA encoding follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone β -subunits in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 136:406-410, 2004.
 - 野口 章, 鈴木 治, 小浦美奈子, 高野 薫, 野口 洋子, 山本美江, 松田潤一郎, 「シアル酸転移酵素遺伝子ホモ導入マウスに見られた拡張型心筋症」, 日本疾患モデル学会記録 19:31-37, 2003.
 - Suzuki O, Hata T, Koura M, Noguchi Y, Takano K, Yamamoto Y, and Matsuda J. Search for genes involved in developmental competence in mouse oocytes using suppression subtractive hybridization. *Reprod. Fert. Dev.* 16:245-246, 2004.
 - Suzuki O, Hata T, Koura M, Noguchi Y, Takano K, Yamamoto Y, and Matsuda J. Differential display analysis for genes relating to developmental competence of mouse oocytes. *Mol. Biol. Cell* 14:108a, 2003.
 - Takano K, Koura M, Noguchi Y, Yamamoto Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J, Suzuki O. Sequence analysis of cDNA encoding follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone β -subunits in the Mastomys (*Praomys coucha*). *Gen Comp Endocrinol* 138: 281-286, 2004.
- ### 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
 - 鈴木 治, 小浦美奈子, 野口洋子, 高野 薫, 山本美江, 松田潤一郎: ディファレンシャル・ディスプレイ法によるマウス卵子発生能獲得遺伝子の検索, 第50回日本実験動物学会総会, 大宮, 2003年5月
 - 鈴木 治, 小浦美奈子, 野口洋子, 高野 薫, 山本美江, 松田潤一郎, 幼若マウスの一過性卵胞成熟由来卵子を用いた胚発生能関与遺伝子の検索, 第96回日本繁殖生物学会大会, 帯広, 2003年9月
 - 鈴木 治, 秦 朋子, 小浦美奈子, 高野 薫, 山本美江, 野口洋子, 山田-内尾こずえ, 松田潤一郎, 右島富士男, 横山峯介: ガラス化保存卵巣より得た卵胞の体外発育培養法の検討, 第51日本実験動物学会総会, 長崎, 2004年5月
 - Suzuki, T Hata, N Takekawa, M Koura, K Takano, Y Yamamoto, Y Noguchi, K Uchio-Yamada, J Matsuda, In vitro growth culture of preantral follicles from mouse ovaries cryopreserved using vitrification, 37th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, Vancouver, Canada, 2004年8月
 - Suzuki, M. Koura, Y. Noguchi, K. Takano, K. Uchio-Yamada, Y. Yamamoto, and J. Matsuda, Characterization of the follicle stimulating hormone β -subunit precursor protein cDNA in the rabbit, 44th annual meeting of the American Society for Cell Biology, Washington D.C., USA, 2004年12月。

H. 知的財産権の出願・登録状況 該当なし

胚・配偶子保存のための新規生殖工学技術の開発

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

マウス系統の継代のための顕微授精技術と核移植クローン技術の開発を行った。顕微授精技術を各種マウス系統へ応用し、すべての実験例において産子を得ることに成功し、その有効性を確認できた。また、精巣および精巣上体の簡易凍結保存と顕微授精技術を組み合わせることにより、極めて容易にマウス雄性遺伝子の運搬を行えることを明らかにした。核移植クローンでは、途絶が危ぶまれる系統マウスの胸部線維芽細胞から核移植由来ES細胞の作出に成功した。6種類の細胞種をドナーとして体細胞移植を実施し、造血幹細胞、神経幹細胞、NKT細胞、始原生殖細胞から産子を得ることに成功した。

A. 研究目的

顕微授精技術と核移植クローンに代表されるマウスの新規生殖工学技術は、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、再生医療実験モデルとしての応用など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、マウスの生殖工学技術、特にクローン技術の開発は極めて遅れている。そこで、1) 顕微授精技術の改良による系統保存への応用、2) バンクや研究者間のマウス系統の提供を容易にするための精巣・精巣上体簡易凍結法と顕微授精技術を組み合わせによる産子作出、3) 途絶が危ぶまれる系統からの体細胞核移植由来ES細胞 (ntES細胞) の作出、および4) 新規細胞種によるクローン作出を試みた。

B. 研究方法

顕微授精：ピエゾマイクロマニピュレーターによる注入法により実施した。円形精子細胞を用いた顕微授精では、卵子を予めストロンチウムにより活性化を行った。精巣・精巣上体簡易凍結法と顕微授精技術を組み合わせによる産子作出では、雄マウスより精巣と精巣上体尾部を摘出し、そのまま組織ごと凍結チューブに入れた。

核移植クローン：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。系統保存実験用のntES細胞は、CXDD-P (リコンビナント近交系-自然繁殖停止) の雌個体より胸骨付近線維芽細胞を用いて電気融合法による核移植を行い、得られた胚盤胞より作出を試みた。

(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

1) 顕微授精技術のマウス系統保存への応用

以下のマウスへ応用し、顕微授精由来胚を胚移植し、産子の作出を試みた。

①挿入突然変異による精子形成不全マウス

使用細胞：伸長精子細胞
顕微授精後受精卵子：194 個
分割卵子：106 個(54.6%)
産子：17 匹(16%, 17/106)

②海外からの凍結不良精子

使用細胞：凍結精子 (不動)
顕微授精後受精卵子：166 個
分割卵子：150 個(90.0%)
産子：28 匹(18.7%, 28/150)

③精細管内移植幹細胞由来精細胞

使用細胞：伸長精子細胞
顕微授精後受精卵子：138 個
分割卵子：116 個(84.1%)
産子：51 匹(44.0%, 51/116)

④卵丘細胞機能不全マウス

使用細胞：精子
顕微授精後受精卵子：6 個
分割卵子：6 個(100%)
産子：3 匹(50.0%, 3/6)

⑤自然繁殖不能リコンビナント近交系 (B6xDBA/2)

使用細胞：精子
産子：5 匹(13%, 5/39)

⑥精子形成不全ノックアウトマウス

使用細胞：伸長精子細胞
顕微授精後受精卵子：133 個
分割卵子：122 個(91.7%)
産子：33 匹(30.0%, 33/122)

⑦セルトリ細胞移植由来精細胞

使用細胞：伸長精子細胞

顕微受精後受精卵子：225 個
分割卵子：102 個(45.0%)
産子：4 匹(3.9%, 4/102)

2) 精巣・精巣上体簡易凍結法と顕微授精技術を組み合わせによる産子作出：

凍結融解後の細胞生存率は 11-25%であった。精巣精子および円形精子細胞の顕微授精では、凍結コンテナを用いることにより、すべての実験区で産子が得られた。精巣上体精子を用いた顕微授精では、精巣精子や円形精子細胞と比べ、着床しないレシピエントが多くみられた。海外から同様の方法で凍結した B6 系統由来のサンプルをドライアイス便で受け取り、顕微授精を行った結果、凍結精巣由来精子細胞から産子が得られた。

3) 途絶が危ぶまれる系統からの体細胞核移植由来 ES 細胞 (ntES 細胞) の作出：

CXDD-P 系統の線維芽細胞を用いた核移植は融合率が 73.7% (112/152)であり、培養胚あたり 47.4% (72/152) が胚盤胞へ発生した。100 個の胚盤胞を用いて、5 株の ES 細胞(雌 4 株、雄 1 株)を樹立した。

4) 新規細胞種によるクローン作出：

雄(B6x129)F1 系統より分離あるいは樹立した造血幹細胞、神経幹細胞、間葉系幹細胞、helper T 細胞、NKT 細胞、始原生殖細胞を用いて、核移植クローンを行った。その結果、神経幹細胞および NKT 細胞は再構築胚の半数以上が胚移植可能な 4-cell 以降へ発生し、胚移植後に健康な産子を得ることができた。特に NKT 細胞は、70%が morula/blastocyst へ発生し、ES 細胞も容易に樹立することができた。

D. 考察

マウスゲノムプロジェクトの進展および胚操作技術の改良と共に、遺伝子改変マウスが作出されてきている。その一部は完全な不妊あるいは不妊傾向のある系統である。また、凍結技術の不備により、融解後の精子が完全不動となり、体外受精による産子の作出が不可能な場合も多い。これらは顕微授精などの生殖補助技術により継代が必要である。本研究により、近交系であっても産子作出することに問題が無いことを明らかにした。このマウス系統の授受の際に最も障害になるのが、凍結胚および精子の液体窒素中での輸送である。そこでさらに、顕微授精技術の補助により、これらのマウス遺伝子 (配偶子) を簡易に凍結そして運搬する技術を開発した。その結果、精巣上体および精巣を丸ごと -80°C で凍結するという超簡便凍結で良好な結果を得た。これは 1) 複雑な精子採取や凍結の技術を必要とせず、2) 液体

窒素でなくドライアイスでマウス系統の授受ができるという大きなメリットを保つ。今回は特に、雄 B6 精巣を英国からドライアイス中で輸送し、そこから産子を得ることで、この方法の安定性および有効性を確認することができた。

本研究のもう一つの課題である、体細胞核移植クローン技術は、マウスで成功はしているものの、世界中のいずれの研究室においても安定した成績は得られていない。特にドナー細胞として F1 交雑系を使わなければ産子が得られないという点は、安定したマウスバンク事業を進める上で極めて大きな欠点である。そこで本研究では、Wakayama らが発表したように、体細胞核移植胚を胚移植するのではなく、いったん ES 細胞化して系統を保存する方法の応用を試みた。その結果、理研 BRC で系統途絶が確定していた近交系統より雌雄の ES 細胞の樹立に成功した。今後、これらの雌雄 ES 細胞より系統の再興が可能であるか確認をする予定である。

これまでマウス体細胞核移植クローンは、卵丘細胞、セルトリ細胞、線維芽細胞のみが主なドナー細胞であったため、よりクローンをしやすい体細胞を探索する必要があった。そこで本研究では新たに 6 種類のドナー細胞を用いた。極めて意外な結果であったが、NKT 細胞クローンから体外および体内の胚発生とも最も良好な成績を得た。NKT 細胞は、他のリンパ球同様に DNA の再構成が終了しており、これまでのリンパ球クローンの報告から、効率が悪いことが予想されていた。一方、その幹細胞である造血幹細胞は逆に効率が悪く、細胞の分化度とクローンの効率には相関関係がないことが示された。今後は、クローンの効率が何によって決定されるのか、様々な条件下でのクローン実験を行い、調べる必要がある。

E. 結論

マウス顕微授精技術を用いることにより、近交系から安定して産子が得られることを明らかにした。精巣および精巣上体の丸ごとの凍結および保存が可能であり、産子を作成することが示された。また、途絶の危機にある近交系からも雌雄 ntES 細胞を樹立できた。また、NKT 細胞がこれまでに報告された成体体細胞で最も良好なクローン効率をもたらすことを明らかにした。これらの成果は今後のマウスバンク事業の安定的および発展的運営に大きな基盤技術になると期待される。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.*, 68:1821-1827, 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.*, 18:1273-1280, 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) Fulka Jr., J., Miyashita, N., Nagai, T. and Ogura, A. Do cloned mammals skip a reprogramming step? *Nat Biotechnol.* 22: 25-26, 2004.
- 14) Inoue, K., Ogonuki, N., Mochida, K., Yamamoto, Y., Takano, K., Kohda, T., Ishino, F. and Ogura, A. Effects of Donor Cell Type and Genotype on the Efficiency of Mouse Somatic Cell Cloning. *Biol Reprod.* 69: 1394-1400, 2003.
- 15) Inoue, K., Ogonuki, N., Yamamoto, Y., Takano, K., Miki, H., Mochida, K., and Ogura, A. Tissue-specific distribution of donor mitochondrial DNA in cloned mice produced by somatic cell nuclear transfer. *Genesis*. 39:79-83, 2004.
- 16) Kai, M., Irie, M., Okutsu, T., Inoue, K., Ogonuki, N., Miki, H., Yokoyama, M., Migishima, R., Muguruma, K., Fujimura, H., Kohda, T., Ogura, A., Kaneko-Ishino, T. and Ishino, F. The Novel Dominant Mutation Dspd Leads to a Severe Spermiogenesis Defect in Mice. *Biol Reprod.* 70:1213-1221 2004.
- 17) Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Inoue, K., Miki, H., Ogura, A., Toyokuni, S. and Shinohara, T. Long-Term Proliferation in Culture and Germline Transmission of Mouse Male Germline Stem Cells. *Biol Reprod.* 69: 612-616, 2003.
- 18) Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Inoue, K., Ogura, A., Toyokuni, S. and Shinohara, T. Restoration of fertility in infertile mice by transplantation of cryopreserved mal germline stem cells. *Hum Reprod.* 18: 2660-2667, 2003.
- 19) Miki, H., Lee, J., Inoue, K., Ogonuki, N., Noguchi, Y., Mochida, K., Kohda, T., Nagashima, H., Ishino, F. and Ogura, A. Microinsemination with first-wave round spermatids from immature male mice. *J Reprod Dev.* 50: 131-137, 2004.
- 20) Nakamura, T., Yao, R., Ogawa, T., Suzuki, T., Ito, C., Tsunekawa, N., Inoue, K., Ajima, R., Miyasaka, T., Yoshida, Y., Ogura, A., Toshimori, K., Noce, T.,

Yamamoto, T., and Noda, T. Oligo-astheno-teratozoospermia in mice lacking CCR4-associated factor 1, a novel regulator of RXR β . *Nat Genet*, 36:528-533, 2004.

21) 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.

22) 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.

23) 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).

24) 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.

25) 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.

26) 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.

27) 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).

28) 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) 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.

3) 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.

胚・配偶子を用いた遺伝的品質検査法の開発および改良

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
研究協力者 高林 秀次 浜松医科大学医学部附属動物実験施設助手

マウス胚および精子の凍結保存(バンク)における系統の遺伝的保証のための細胞レベルでの遺伝的品質検査システムを確立することを目的として、精子を用いたマイクロサテライトマーカーの検出について基礎的研究を行い、その検査法を確立した。

A. 研究目的

近年、遺伝子改変動物としてのトランスジェニックやノックアウトが多数作出され、医学、生物学の基礎研究に使われている。こうした現状に伴い、系統の保存形態と輸送形態が個体から凍結保存胚や凍結精子へと移りつつあり、それらの遺伝的品質管理に関する技術開発が急務となっている。生後の個体レベルではなく、凍結した状態の胚や配偶子(精子、卵子)レベルで検査が行われれば、迅速に品質の正しさを確認し、保証できる。こうした観点から我々は胚および精子を材料としてマイクロサテライトDNAマーカーによる遺伝的品質検査法の基礎的研究を行った。

B. 研究方法

マウス初期胚(2-8細胞期)からの核DNAの調製は、まず、ピペットで遠心チューブに必要な個数を移し、遠心して上清を除き、そこにProteinase Kを含む1xPCR reaction バッファー10 μ lを加え、55 $^{\circ}$ Cで1時間加熱した後、95 $^{\circ}$ Cで10分のPK不活化処理を行った。次に、精子細胞からの核DNAの精製については、カウントした精子をエッペンドルフチューブに採り、遠心後、上清を捨て、Proteinase Kを含む1xPCR reaction バッファー10 μ lを加え、もう一方にはPK加非イオン性界面活性剤(0.45%NP40, 0.45%TW20)を含む1xPCR reaction バッファー10 μ lを加え、55 $^{\circ}$ Cで1時間加熱した後、95 $^{\circ}$ Cで10分のPK不活化処理を行った。上記のように処理して得られた粗抽出DNAの2 μ lをtemplate DNAとして用いて、5種類のマイクロサテライトマーカーの検出をPCRで行った。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

初期胚を用いたマイクロサテライトジェノタイプングについては、8細胞期胚3個(24細胞)から得られた粗抽出DNAを用いることにより、判定に十分な量のPCR産物が得られることが判明した。次に、精子細胞を用いたマイクロサテライトジェノタイプン

グの基礎的研究を行った。その結果、1マーカーの検出に必要な細胞数は、粗抽出したDNAの場合は1,500個、PKに非イオン活性剤を加えた場合は約800個であった。なお、通常のPCRプロダクトの検出はアガロースゲル電気泳動後、SYBR Goldを用いて行ったが、銀染色などのより感度の高い染色法を用いることも有効であった。

D. 考察

胚および精子を用いたマイクロサテライトジェノタイプングについて基礎的研究を行った。その結果、1種類のマイクロサテライトマーカーを検出するために必要な最低細胞数は、8細胞期胚を用いた場合6個、凍結精子を用いた場合は1,500個であった。チューブ1本あたりの凍結胚数は、2細胞期胚では20個と言われる。そのうちの2個について体外培養により16細胞期胚まで発生させてジェノタイプングを行うこと、また、精子の場合体外授精後に残る精子を用いてジェノタイプングを行うことが現実的であることが示された。

E. 結論

本研究は、現在実用化されている胚および精子バンクにおいて必要なマウスの遺伝背景ならびに導入遺伝子のジェノタイプング法について開発研究を行うことであった。結果で示したように、胚および精子を直接用いることにより、マイクロサテライトジェノタイプングが可能であることがわかり、当初の目的が達成された。

F. 研究発表

Katoh H, Oda K, Hioki K, Muguruma K. A genetic quality testing system for early stage embryos in the mouse. *Exp Anim*, 52: 397-400, 2003.

Katoh H, Watanabe Y, Ebukuro M, Muguruma K, Takabayashi S, Shiroishi T. Chromosomal mapping of the peroneal muscular atrophy (pma) gene in the mouse. *Exp Anim*, 52: 433-436, 2003.

Abe K, Hazama M, Katoh H, Yamamura K, Suzuki M. Establishment of an efficient BAC transgenesis protocol and its application to functional characterization of the mouse brachyury locus. *Exp Anim*, 53: 311-320, 2004.

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
加藤秀樹	遺伝と育種	社団法人日本実験動物協会	実験動物の技術と応用:入門編	アドスリー	東京	2004	28-33
加藤秀樹	遺伝と育種	社団法人日本実験動物協会	実験動物の技術と応用:実践編	アドスリー	東京	2004	52-65
加藤秀樹	選択交配	森脇和郎、山村研一、米川博通	モデル動物の作製と維持	エルアイシー	東京	2004	100-108

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
Katoh H, Oda K, Hioki K, Muguruma K.	A genetic quality testing system for early stage embryos in the mouse.	Exp Anim,	52	397-400	2003
Katoh H, Watanabe Y, Ebukuro M, Muguruma K, Takabayashi S, Shiroishi T.	Chromosomal mapping of the peroneal muscular atrophy (pma) gene in the mouse.	Exp Anim	52	433-436	2003
Yagasaki Y, Yamaguchi T, Watahiki J, Konishi M, Katoh H, Maki K.	The role of craniofacial growth in leptin deficient (ob/ob) mice.	Orthod Craniofacial Res	6	233-241	2003
Abe K, Hazama M, Katoh H, Yamamura K, Suzuki M.	Establishment of an efficient BAC transgenesis protocol and its application to functional characterization of the mouse brachyury locus.	Exp Anim	53	311-320	2004

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 国立感染症研究所室長

協力研究者 滝本 一広、田原口 元子（国立感染症研究所）

研究要旨 実験動物に特有な病原体の ELISA 法による検出キットはマウス、ラットについては市販されているが、その他の動物種について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、マストミス、スナネズミの ELISA 法による抗体検出法を確立することを目的とした。各種動物にワクシニアウイルス、センダイウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルスを接種して感染血清を得た。感染血清あるいは免疫血清を陽性コントロールとして ELISA を実施し、各種動物に最適な二次抗体について検討した。ウサギ、モルモットでは ProteinG、マストミス、スナネズミでは抗ラット抗体が最適であった。ハムスターでは抗マウス IgG、抗ハムスターIgG および ProteinG で同程度に良好な反応を示した。本研究により、マストミス、スナネズミ、ハムスター、モルモット、ウサギについても、適切な二次抗体を選択することで、ウイルス、細菌の血清抗体検査を ELISA 法により実施可能であることが示唆された。

A. 研究目的

実験動物の取扱いに当たり、実験動物に特有の病原体の汚染状況は常に把握する必要がある。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に対しては血清抗体検査が有効である。ELISA 法は高感度かつ簡便で実用性が高く、マウス、ラットの ELISA 法については主要な 3 種類のウイルスと 2 種類の細菌に対して既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ワクシニアウイルス、センダイウイルス (HVJ)、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) に対する感受性を調べると共に、ELISA 法による抗体検出法の確立を目的とする。

B. 研究方法

ELISA 法は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二次抗体を反応させ発色させる。ELISA 法の条件検討のためには各動物の陽性および陰性血清、適切な二次抗体が必要である。そのため、各ウイルスの感染動物血清を作製し、陽性血清として使用した。この陽性血清との反応性を比較することにより最適な二次抗体を検討した。また、各動物から得た組換え LCM-NP 蛋白免疫血清の反応性を LCMV 感染血清と比較し、その有用性について検討した。

(1) ELISA 抗原

ワクシニアウイルス抗原：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%NP40/PBS で細胞を溶解した。その遠心上清を陽性抗原とし、同様に処理した未接種の細胞溶解液の遠心上清を

陰性抗原とした。

HVJ 抗原: 市販されている HVJ 抗原を使用した。

LCMV 抗原: LCM-NP 発現バキュロウイルスを Tn5 昆虫細胞に接種し、CPE を確認後 1%NP40/PBS で細胞を溶解した。遠心沈渣を 1M Urea in 1% NP40/PBS、2M Urea/PBS、8M Urea/PBS の順に溶解・遠心し、最後に得られた上清（組換え LCM-NP 蛋白）を陽性抗原、同様に処理した polyhedrin(-)バキュロウイルス感染 Tn5 昆虫細胞溶解液の遠心上清を陰性抗原として使用した。これらの抗原は感染研 森川茂先生より御分与いただいた。

(2) 各種動物陽性血清の作製

ワクシニアウイルス: マウス、スナネズミ、ハムスター、モルモットにワクシニアウイルス大連株あるいは Lister 株を腹腔内接種し、4 週後に血清を採取した。ワクシニアウイルス過免疫ウサギ血清は感染研 上田良昭先生より御分与いただいた。

HVJ: マストミス、スナネズミ、ハムスター、モルモットに HVJ (Z 株) を経鼻接種し、4 週後に血清を採取した。HVJ 免疫ウサギ血清は感染研 加藤 篤先生より御分与いただいた。HVJ 免疫マウス血清は市販のものを使用した。

LCMV: マウス、マストミス、スナネズミ、ハムスターに LCMV (Armstrong 株) を腹腔内接種し、4 週後に血清を採取した。

LCM-NP 免疫血清: マウス、ハムスター、マストミス、スナネズミに組換え LCM-NP 蛋白をアジュバント (Titer Max Gold) と共に筋肉内接種した。4 週後にブースター免疫として組換え LCM-NP 蛋白を筋肉内接種し、その 4 週後に血清を採取した。

陰性血清: 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。マストミス、ハムスター陰性血清は感染研で系統維持されているものから得た。

(3) ペルオキシダーゼ標識二次抗体

抗マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ IgG の標識抗体は市販のものを使用した。各種動物の IgG に反応性が認められている ProteinG および ProteinA の標識試薬を購入し、発色の特異性について抗動物 IgG 抗体と比較した。マストミス、スナネズミの抗 IgG 抗体は市販されていないので抗マウス IgG 抗体あるいは抗ラット IgG を使用し、交叉性を検討した。

(4) ELISA 法

上記の陽性または陰性抗原をコーティング溶液で希釈し、100 μ l ずつ ELISA 用プレートに加え、4°C で一晩静置した。3 回洗浄後、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。100 倍から 2 倍段階希釈した陽性・陰性血清を抗原プレートに加え、室温で 1 時間反応させた。3 回洗浄後、上記の二次抗体を加え、室温で 1 時間反応させた。3 回洗浄後、OPD 試薬を加え、暗所で 30 分反応させた。反応停止液を加え、吸光度を測定した。

C. 研究結果

マウスでは、いずれのウイルス陽性血清でも抗マウス IgG で最も顕著な特異反応が認められた。ウサギのワクシニアウイルスおよび HVJ 免疫血清は各抗原に対し特異反応を示し、二次抗体としては抗ウサギ IgG より ProteinG を使用した場合に強い反応を示した。モルモットはワクシニアウイルスの感染が成立しなかったが、HVJ には感受性が認められた。ProteinG で明確な特異反応が得られたが、抗モルモット IgG では反応が弱かった。マストミスは HVJ、LCMV に対し感受性

が認められた。抗 HVJ 抗体検出では抗マウス IgG と ProteinG を使用し、ProteinG が強い特異反応を示したが、抗 LCMV 抗体検出に抗ラット IgG も使用したところ、ProteinG より強い反応を示した。尚、追試により、抗ラット抗体で抗 HVJ 抗体の特異反応が高感度に検出されることを確認した。スナネズミはいずれのウイルスにも感受性を示した。抗マウス IgG を二次抗体として使用することによりワクシニアウイルス感染血清では特異反応が認められたが、HVJ 感染血清では反応が見られなかった。抗 LCMV 抗体検出に抗ラット IgG を使用したところ、非常に強い特異反応を示した。尚、追試により、抗ラット抗体で抗 HVJ 抗体の特異反応が高感度に検出されることを確認した。ProteinG ではいずれのウイルス感染血清でもほとんど反応が認められなかった。ハムスターはいずれのウイルスにも感受性が認められ、抗マウス IgG、抗ハムスター IgG および ProteinG に良好な特異反応を示した。ProteinA は各動物の抗ワクシニアウイルス抗体の検出に使用したが、良好な特異反応を示したのはウサギのみであった。各動物から得た LCM-NP 蛋白免疫血清と感染血清の反応性を、抗動物 IgG を用いて比較した。抗マウス IgG を使用した場合、全動物種の免疫血清で感染動物と同等以上の強い反応が認められ、陰性抗原に対する非特異反応も少なかった。ハムスターの免疫血清に対して抗ハムスター抗体を使用した場合も、感染血清より強い反応を示し、非特異反応も少なかった。マストミス、スナネズミの免疫血清に対して抗ラット抗体を使用した場合は、感染血清とほぼ同等の反応を示したが、非特異反応が顕著であった。

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、抗 LCMV 抗体は LCM-NP

発現バキュロウイルス接種細胞の溶解上清を陽性抗原とした ELISA 法で高感度に検出することが可能であった。ウイルス未接種細胞あるいは polyhedrin(-)バキュロウイルス感染細胞の溶解上清をそれぞれ陰性抗原とすることで非特異反応を排除することができる。この ELISA 法により LCMV 汚染の有無を正確に判定することができる。また、ワクシニアウイルスはマウスエクトメリア、ウサギポックスウイルスと抗原的に交叉するので、それらの汚染検査にこの ELISA 法が適用できる。マストミス、スナネズミは HVJ および LCMV に感受性があることが示唆された。実験動物施設ではこれら動物種も汚染源となる可能性があるため、マウス等と同様に定期的な検査が必要である。マストミス、スナネズミ、ハムスター、モルモット、ウサギについては ELISA キットが市販されていないが、適切な二次抗体を選択すれば、ELISA 法により動物オルソポックスウイルス、HVJ、LCMV の汚染検査を実施できることが、本研究により示唆され、その他のウイルスや細菌の血清抗体検査への適用も期待される。組換え LCM-NP 蛋白免疫血清は、全動物種において感染血清と同等以上の強い反応を示し、特に抗マウス IgG 抗体を使用した場合には陰性抗原に対する非特異反応も少なく、感染血清の代替として使用可能であることが示唆された。しかし、マストミス、スナネズミで抗ラット抗体を使用した場合に陰性抗原への非特異反応が認められ、免疫抗原の精製法について検討する必要性が示唆された。

E. 結論

実験動物特有の病原体に対する抗体を検出する為の ELISA キットが市販されていないマストミス、スナネズミ、ハム

スター、モルモット、ウサギについても、適切な二次抗体を選択することで、ウイルス、細菌の血清抗体検査を ELISA 法により実施可能であることが示唆された。組換え LCM-NP 蛋白免疫血清は ELISA の陽性コントロールとして使用可能であることが示唆された。

髄膜炎ウイルスに対する感受性と ELISA 法による抗体検出」第 52 回実験動物学会総会、2005 年 5 月、東京

F. 健康危険情報

該当なし

G. 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。

Oyanagi, M., Kato, A., Yamada, Y. K., and Sato, N. L. (2004): Detection of MHV-RNAs in mouse intestines and in filter dust in mouse room ventilation duct by modified RT-nested PCR. *Experimental Animals*, 53, 37-41.

2. 学会発表

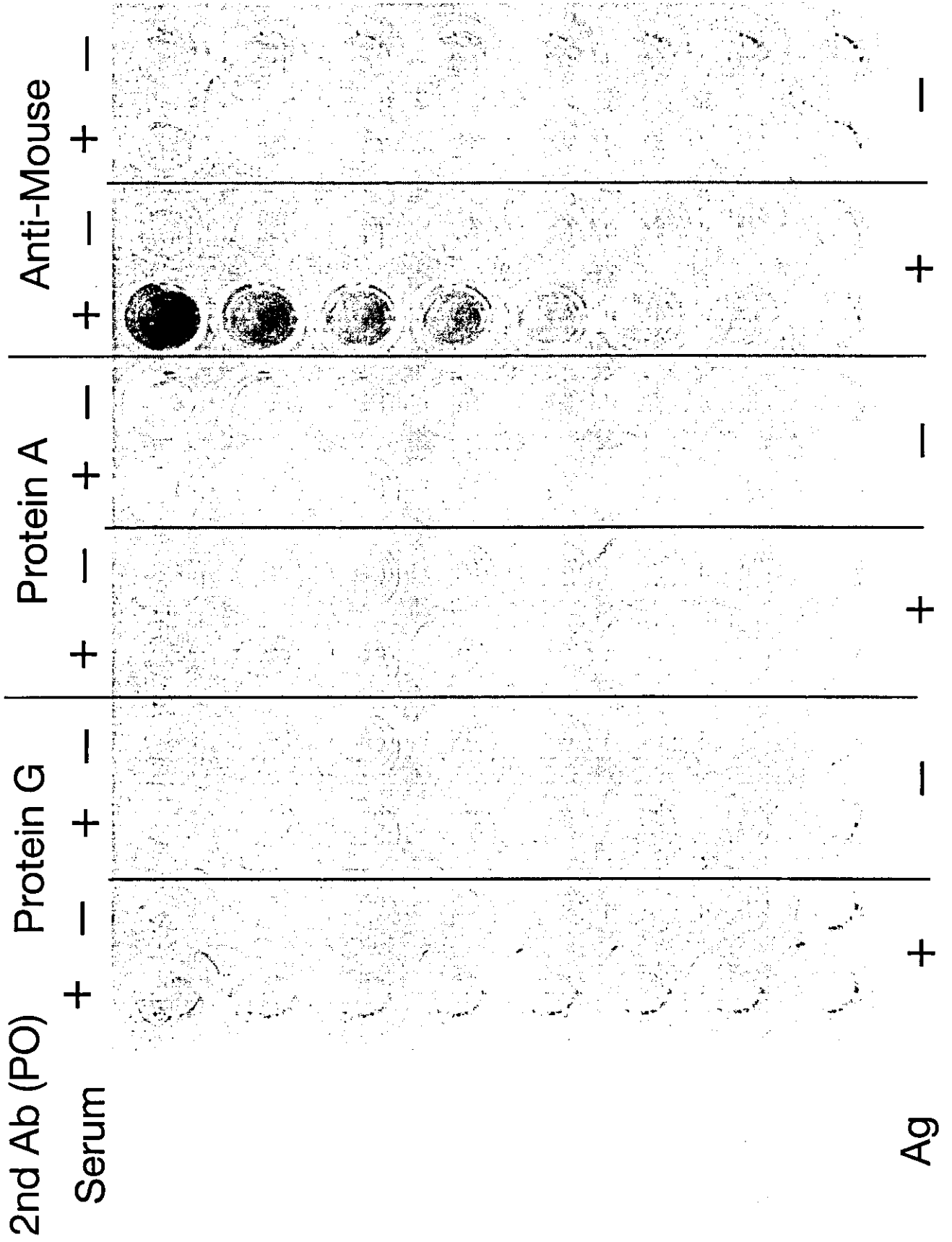
「MHV のモニタリング: フィルターダストからの RT-nested PCR SSCP 法による遺伝子型分類」第 25 回日本分子生物学会年会、2002 年 12 月、横浜

「抗オルソポックスウイルス抗体の ELISA による測定法」第 50 回実験動物学会総会、2003 年 5 月、大宮

「マウス・ラット以外の小型齧歯類実験動物におけるセンダイウイルスに対する感受性と抗体検出法の検討」第 51 回実験動物学会総会、2004 年 5 月、長崎

「小型齧歯類実験動物のリンパ球性脈絡

マウス(ワクシニアウイルス感染血清)のELISA



スナネズミ(ワクシニアウイルス感染血清)のELISA

