

創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究

所属 国立感染症研究所 獣医科学部
研究者 松田潤一郎

研究要旨 新規発生工学技術として、レンチウイルスベクターを用いた遺伝子改変動物作出技術、核移植クローン技術、生殖幹細胞樹立、異種間クローン技術によるES細胞の樹立、ウサギ生殖幹細胞からのES様細胞株の樹立、ラットの有用幹細胞株の樹立などの開発研究を行った。

分担研究者

- (1) 理化学研究所バイオリソースセンター
小倉淳郎
- (2) (株)ワイエス研究所 上田正次
- (3) 北山ラベス(株) 竹入修二

A. 研究目的

ゲノム情報の解読の進展により、いわゆるポストゲノムの遺伝子機能解析やゲノム医学、さらにはゲノム創薬を推進するためには、目的の遺伝子を動物で発現させ、その機能解析を個体レベルで行うことが必須である。そこで、本研究では、各種の新規発生工学技術を開発し、遺伝子改変動物や疾患モデル動物を簡便・迅速に作出するなどによって、創薬研究の共通基盤とすることを目的とする。具体的には、高効率の遺伝子導入法として注目されているレンチウイルスベクターを用いた遺伝子改変動物作出技術の開発、核移植クローン技術の開発と生殖幹細胞(germline stem cell; GS細胞)樹立、異種間クローン技術によるES細胞の樹立およびウサギ生殖幹細胞からのES様細胞株の樹立、さらに、創薬研究には必須であるラットについては、とくに有用幹細胞株の樹立を目的に、ES細胞を含む様々な胚性の幹細胞の樹立を目指した。

B. 研究方法

- 1) レンチウイルスベクターによる遺伝子改変動物作製法開発(松田)

第3世代レンチウイルスベクターの作製のため、SINベクタープラスミド(CMV-EGFP, CAG-EGFP)、パッケージングプラスミド、Revプラスミド、VSV-Gエンベローププラスミドを293T細胞にコトランスフェクトし、約 10^{10} I.U.(Infectious Unit)/mlの高タイトーのウイルスベクターを作成し、各濃度のベクターを透明帯除去胚(1、2及び8細胞期胚)へ感染させ、37°C、5% CO₂、の気相条件下で24時間

毎に胚の発生段階と緑色蛍光を観察した。

- 2) 生殖幹細胞の樹立(小倉)

ICRの新生仔より卵巣あるいは精巣を取り出し、酵素により分散させた後に、適切な成長因子を加えた培養液で培養を実施した。樹立途上のコロニーあるいは分化させた細胞を用いて、幹細胞や生殖細胞のマーカーを用いた免疫染色および遺伝子発現検査を行い、さらにはBrdUの取り込みによる分裂能の検査を実施した。

- 3) 核移植クローン技術の開発(小倉)

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。

- 4) ウサギ卵子を用いた異種間クローンによるサルES細胞樹立の試み(竹入)

ウサギ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、卵子の電気による活性化後に胚培養および胚移植を行った。

ドナー核: カニクイザル線維芽細胞、卵丘細胞および白血球

レシピエント卵子: ウサギ卵子(FSH-hCG投与による過排卵)

ドナー細胞質: ドナー核と同種細胞からの分離細胞質

胚盤胞からのES細胞の樹立: 適切なフィーダー(共培養)細胞と培養条件を設定した。

- 5) ウサギES様生殖幹細胞樹立の試み(竹入)

新生仔ウサギより卵巣あるいは精巣を取り出し、酵素により分散させた後に、適切な成長因子を加えた培養液で培養を実施した。樹立途上のコロニーあるいは分化させた細胞を用いて、幹細胞や生殖細胞のマーカーを用いた免疫染色を実施した。そして浮遊状態に発達したコロニーを再度定着培養させることでES様株の分離を行う。また、遺伝子導入の試みも実施した。

- 6) ラットES細胞樹立の試み(上田)

(1) 内部細胞塊(ICM)の培地組成の検討

内部細胞塊(ICM)を安定して増殖させるには培地組成の適正化が不可欠である。マウスES細胞用の培地組成をラットICM細胞の培養を適用した場合には、安定してICMを増殖させることは困難であり、ICMの安定した増殖には添加する血清が大きく影響することから、血清組成に着目して培地組成に検討・改良を加えた。

(2) 内部細胞塊(ICM)の培養条件の検討

内部細胞塊(ICM)の培養には、培地組成に加えて培養温度、培養中の酸素濃度、支持細胞の種類、細胞の単離方法なども重要な因子にあげることができる。これらの諸条件を検討するには多数のICM細胞を安定して取得しなければならない。平成16年度においてはICM細胞採取に適切な胚日数を検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験については、動物福祉に配慮し、各機関の動物実験委員会等で許可を受け、動物実験に関する講習を受けた専門家が研究にあたった。

C. 研究結果

1) レンチウイルスベクターによる遺伝子改変動物作製法開発

1細胞期および2細胞期胚からレンチウイルスベクターを添加した実験区では、今回検討した濃度(1×10^5 I.U./ml $\sim 1 \times 10^{10}$ I.U./ml)では、緑色蛍光が認められる胚は存在しなかった。また、ウイルスタイターが 1×10^{10} I.U./mlの実験区では培養24-48時間の間ですべての胚の発生が停止し、高タイターでは毒性のため発生が抑制されるものと考えられた。8細胞期胚にレンチウイルスベクターを添加した実験区においては、ウイルスタイターが $1 \times 10^{8-9}$ I.U./mlの場合において緑色蛍光を呈する細胞を一部モザイク状に有する胚がCAGおよびCMVのどちらのプロモーターのウイルスベクターを用いた場合においても観察された(表1)。しかし、ウイルスタイターが 1×10^7 I.U./ml以下の実験区では蛍光発色する胚は認められず、また、ウイルスタイターが $0.5 \times 10^{9-10}$ I.U./mlの実験区では培養72時間後に胚が形態的に異常な状態を呈し、蛍光発色する胚は認められず、死亡あるいは退行していると考えられた。CMVプロモーターを用いた場合と比較してCAGプロモーターを用いたレンチウイルスベクターの方が、比較的強く蛍光発色していた。

2) 生殖幹細胞の樹立

新生仔精巣からは、安定してコロニーの作出に成功し、増殖も安定していた。また、*vasa* など生殖細胞のマーカーも陽性であった。一方、卵巣からのコロニーは、増殖が遅いものの、BrdUの取り込みが

見られ、増殖が安定して進んでいることが証明された。また、*vasa* や *Oct* などの遺伝子も RT-PCR で陽性が確認された。さらに、分化誘導を行うと、極めて急速に卵子への分化が始まり、2-3週間で透明帯を持つ卵子が得られるようになった。BrdU 取り込み後に9日ほどの時間をおくことで、卵子においてもBrdU陽性が確認され、*in vitro* において増殖と分化の双方が再現されることが証明できた(図1)。第一減数分裂前期染色体像も確認できた。これらの卵子を用いて、連続核置換法により二倍体胚を作製し、胚移植を行ったが、産子は得られなかった。

3) 核移植クローン技術の開発

雄(B6x129)F1 系統より分離あるいは樹立した神経幹細胞、間葉系幹細胞、helper T細胞、NKT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(表2)。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。NKT細胞クローン個体は、そのDNAおよび末梢血のリンパ球構成により、NKT細胞由来のクローンであることが確認できた。さらにはfertilityも確認でき、現在T-cell receptor完全ホモ個体系統を樹立中である。

4) ウサギ卵子を用いた異種間クローンによるサルES細胞樹立の試み

まず、核移植のレシピエントとなるウサギ卵子の活性化条件を検討し、2回の電気パルスの付加およびその後の6-dimethylaminopurine処理が前核形成に有効であることがわかった。また、異種間クローンの最大の効率低下要因の核ミトコンドリアゲノムの不一致を改善するためには、再構築胚へのドナー種(サル)のミトコンドリア導入が必要である。ミトコンドリアを含むサイトプラストを培養細胞の脱核により作出する技術を開発した(図2)。実際に異種間核移植クローンを実施した結果、各実験で20-60%の卵子が分割して4細胞期へ発生したが、8細胞期以降への発生は約10%に低下した。これまで計12個の胚盤胞を作出できた。これらをES樹立用の培養で継代を試みたが、2-3回継代をしたところで分裂を停止した。ウサギのドナー細胞を用いた同種間クローン実験では、20-30%が胚盤胞へ発生しており、以上の結果は、核移植そのものの技術的な不備ではないと思われる。

5) ウサギES様生殖幹細胞樹立の試み

最初にウサギ卵巣および精巣の細胞からGS細胞様のコロニーの樹立ができた。雌の方が分裂能が高かった。その雌株より、形態的にサルやウシES細胞に類似したES様細胞株を分離した。アルカリフ

オスファターゼ陽性を確認できた。レンチウイルスベクターによるEGFP遺伝子の導入を行ったところ、導入に成功し、安定的に蛍光を発することを確認した。

6) ラットES細胞樹立の試み

(1) 内部細胞塊(ICM)の培地組成の検討

ラット(F344/Jcl)の子宮内で可能な限りICMを増殖させた胎生5日目胚よりICMを分離してマウスES細胞用の培地組成を基本に改良した培地(表3)で培養したところES細胞様コロニーを認めた。アルカリフォスファターゼ活性を未分化の指標にして選抜したコロニーを継代したところ5回の継代でもアルカリフォスファターゼ陽性の未分化なES細胞様コロニーを得た。しかし、6回目の継代で得られたコロニーにアルカリフォスファターゼ陽性を示すコロニーを得ることはできなかった。

(2) 内部細胞塊(ICM)培養条件の検討

ラット胚盤胞期胚の内部細胞塊からの細胞樹立に与える培養温度の影響を調べた。37℃、38℃、39℃で培養した時にラット胚盤胞期胚細胞に由来するコロニーの出現数を継代ごとに観察した。コロニーを認めた胚数と継代可能なコロニーが得られた割合を表4に示した。37℃或は38℃で培養した場合の方が39℃で培養した場合に比べて継代可能なコロニーを得ることができた。引き続き、例数を増やしてデータを集積し培養温度の影響を精査する。

D. 考察

1) レンチウイルスベクターによる遺伝子改変動物作製法開発

高効率の遺伝子導入法として注目されているレンチウイルスベクター(第3世代)を用いた遺伝子改変動物作出技術の開発として、感染させるマウス胚の発生段階、胚培養液(M16, KSOM)、ウイルス濃度、プロモーターの種類などを検討した。約 10^{10} I.U./mlの高タイトーのウイルスベクターを作成し、各濃度のベクターを透明帯除去胚(1、2及び8細胞期胚)へ感染させた。その結果、培養液としてはKSOMを用いた場合の発生率が高く、8細胞期胚に感染させた場合に遺伝子導入、遺伝子発現が認められた。詳細は不明であるが、レンチウイルスベクターの感染しやすいマウス胚のステージがあるのかも知れない。また、高タイトーでは毒性のため発生が抑制される傾向が見られ、 10^8 から 10^9 I.U./ml程度が適しているものと考えられた。蛍光発現の強さから判断するとプロモーターはCAGがより強力であると考えられ、現在、胚移植トランスジェニックマウス作成効率を検討している。但し、

今回の実験では、既に報告のある1細胞期の感染は確認できず、また8細胞期胚への感染によっては、すべての細胞への遺伝子導入ではなく、モザイク状に一部の細胞にしか遺伝子導入が成立しなかった。今後、より効率良く遺伝子導入出来るような系を開発する必要がある。なお、疾患モデルマウスのレスキュー実験への応用として、YPC貧毛マウスの原因遺伝子と想定されるsgk3遺伝子を導入したレンチウイルスベクターを作成し、YPCマウスの胚を採取しレスキュー実験を開始した。今後、様々な方法による受精卵への感染法の改良、レポーター遺伝子と目的の遺伝子との融合遺伝子あるいは両遺伝子を個別に発現させるなどウイルスベクター構築の工夫、さらにレンチ以外の新規ベクター等も検討するなど、効率良く系統化可能な遺伝子改変マウスを得られる方法を開発するとともに、スナネズミなど遺伝子改変動物が得られていない他種の実験動物への応用などを目指す予定である。

2) 生殖幹細胞の樹立

GS細胞は、体外で安定的に増殖し、しかもES細胞に生じるような染色体異常が起きにくいという極めて有用な性質を持つ。さらには、遺伝子導入も確認されており、将来的には、ES-キメラ法、体細胞クローン法につづく第三のジーンターゲティング法になることが期待される。本研究では、これまで報告されていた雄のGS細胞だけでなく、初めて雌からもGS細胞が樹立できることを示すことができた。卵巣の幹細胞は昨年Nature誌に初めて紹介されたばかりであるが、その存在を実際に分離して証明できたのは極めて有意義な成果であると思われる。今後、卵巣への移植あるいは体外での胚作出に応用する予定である。

3) 核移植クローン技術の開発

核移植クローン技術は、系統動物の保存および新規開発に非常に有効な手段である。しかし、マウスは未受精卵が体外での操作に敏感であるために、これらの技術は家畜に比べて高度な技術が必要であると言える。本研究では、用いるドナー細胞の種類の見直しや各種実験条件の適正化をすることにより核移植クローン技術を実用レベルまで上げ、さらに核移植技術由来胎児および産子の解析のさらなる高度な応用の可能性を示すことができた。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。そこで今年度は新たに5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

バククローンの報告から、効率が悪いことが予想されていた。すでに発表したように、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。

4) ウサギ卵子を用いた異種間クローンによるサル ES 細胞樹立の試み

異種間核移植クローンは、その種が系統分類学的に離れると再構築胚の発生能が低下することが知られている。しばしばこの原因として、卵子ミトコンドリアゲノムと核のミトコンドリア構造遺伝子の種間不一致に起因すると言われている。我々の前実験では、マウス卵子を用いた場合、マウス以外のあらゆる動物種の体細胞で再構築してもほとんど発生しないことが明らかであった。そこで本実験では、ウサギ卵子を用いた系の確立を試みている。マウス卵子を用いた場合よりも分割は正常であったが、予想通りやはり多くの再構築胚が途中（4-8細胞期）で発生を停止した。しかし、この4-8細胞期という時期での停止がミトコンドリアの種間不一致に起因するかどうかは疑問である。一般に、ミトコンドリアが増殖を開始する時期は着床前期胚の後期である。むしろ、maternal から embryonic への遺伝子発現の転換に支障があるのかもしれない。今後、この点に関わる実験を進める予定である。

5) ウサギ ES 様生殖幹細胞樹立の試み

GS 細胞は、ES 細胞などと異なり、本来生体に存在する細胞であるので、マウス以外の動物でも樹立できることが期待される。実際本研究においても、雌および雄のウサギ新生仔よりコロニーを分離できた。問題は、ウサギの場合は *in vivo* へ戻す手段が確立していないことである。そこで本研究では、マウスの mGS 細胞と同様の細胞株が樹立できることを期待し、実験を行った。予想外に、ウサギの場合は雌の細胞の方が分裂能が高く、それが ES 細胞様のコロニー樹立につながった。今後は、このコロニーのキメラ形成能およびテラトマ形成能について検討する予定である。

6) ラット ES 細胞樹立の試み

本年度はラット ICM 細胞の培養条件を血清に着目した培地組成を中心に検討した。諸検討の結果 5 回まで継代培養に耐える培地組成を見出すことはできたが、6 回目の継代では ES 細胞様コロニーを得ることはできたが、未分化の指標となるアルカリフォスファターゼ活性の陽性を示す細胞は得られなかった。また、ICM 細胞の増殖が良好な培養条件では、増殖が高まる一方で様々な形態のコロニー（図 3）が出現した。引き続き、培養条件を検討

して継代培養に耐える培地組成の構築を目指す。

E. 結論

遺伝子改変動物の高効率の作出技術の開発として、高タイトーのレンチウイルスベクターを製し、マウス胚への感染条件を検討したところ、 10^8 から 10^9 I. U. /ml のタイトーで 8 細胞期胚を用いた場合に胚盤胞での遺伝子導入・発現効率が高かった。

マウス GS 細胞が、雌雄両方から樹立できる可能性を示した。NKT 細胞がこれまでに報告された成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。

サル ES 細胞樹立を目的にサルドナー細胞とウサギレシピエント卵子を用いた異種間クローンを行ったが、多くの再構築胚が発生が途中で停止した。ウサギ GS 細胞が、雌雄両方から樹立できる可能性を示した。さらには、雌 GS 細胞から ES 細胞様のコロニーを樹立できた。

樹立困難とされているラットの胚性幹 (ES) 細胞を中心に多能性幹細胞を樹立することを目的に、マウス ES 細胞用培地を基本に血清添加濃度等の培養条件を検討し、内部細胞塊 (ICM) から ES 細胞様コロニーを安定的に取得した。

F. 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.

9) 小倉淳郎: "動物の核移植クローン技術の現状". *Medical Science Digest* 30. 410-413 (2004).

10) 井上貴美子, 小倉淳郎: "核移植技術". 実験医学別冊: クロマチン・染色体実験プロトコール, 押村光雄, 平岡 泰 (編), 羊土社, 東京, pp. 213-223 (2004).

11) 小倉淳郎: "クローンマウス". マウスラボマニュアル改訂版. 東京都臨床医学総合研究所実験動物研究部門編. Springer-Verlag, Tokyo, pp. 311-316 (2004).

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.

2) Miki, H., Inoue, K., Kohda, T., Honda, A., Ogonuki, N., Mise, N., Matsui, Y., Abe, K., Ishino, F., Ogura, A.: "In vitro development of embryos cloned from primordial germ cells in mice." The First Workshop of the Asian

Reproductive Biotechnology Society, Ho Chi Minh City, Vietnam, April (2004).

3) Miki, H., Inoue, K., Ogonuki, N., Mochida, K., Nagashima, H., Baba, T., Ogura, A.: "Cytoplasmic asters are required for progression of the first cell cycle in mouse cloned embryos" 37th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, Vancouver,

Canada, August (2004).

4) Ogura, A.: "ICSI in laboratory animals", *Current Status and Perspectives in Reproductive Biology and Biotechnology*. Kyoto, Japan, September (2004).

5) 井上貴美子, 越後貫成美, 三木洋美, 野田慎一, 金鎮文, 青木不学, 三好浩之, 小倉淳郎: "造血幹細胞をドナーとしたクローン胚発生効率の検討", 第51回日本実験動物学会, 長崎, 5月 (2004).

6) 井上貴美子, 越後貫成美, 三木洋美, 本多新, 持田慶司, 信賀順, 古関明彦, 小倉淳郎: "マウス体細胞クローン胚に観察される初期胎盤形成不全について", 第97回日本繁殖生物学会, 広島, 9月 (2004).

7) 小倉淳郎: "何が体細胞クローンの効率を決めるのか", 文部科学省特定領域研究「生殖細胞の発生プロセス・再プログラム化とエピジェネティクス」公開シンポジウム, 京都, (2004).

8) 小倉淳郎: "サル類の発生工学的研究に期待すること", 第51回日本実験動物学会総会, 長崎, 5月 (2004).

9) 小倉淳郎, 三木洋美, 越後貫成美, 井上貴美子: "マウス核移植クローンに見るゲノムの可塑性". 文部科学省特定領域研究「生殖細胞の発生プロセス・再プログラム化とエピジェネティクス」公開シンポジウム, 豊中, 11月 (2004).

10) 三木洋美, 井上貴美子, 幸田尚, 本多新, 越後貫成美, 三瀬名丹, 松居靖久, 馬場忠, 阿部訓也, 石野史敏, 小倉淳郎: "始原生殖細胞 (PGC) を用いた核移植による産仔の作出", 第97回日本繁殖生物学会, 広島, 9月 (2004).

11) Narumi Ogonuki, Kimiko Inoue, Hiromi Miki, Keiji Mochida, Yoshihiro Hirose, Hironori Okada, Nobuhiro Shimozawa, Shuji Takeiri, Hiroshi Nagashima, Tadashi Sankai, and Atsuo Ogura: Differential development of rabbit embryos following microinsemination using sperm and spermatids. Annual Meeting of IETS, Copenhagen, Denmark, January 2005.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

表1. 種々の濃度のLenti-virusを添加した8細胞期胚の発生成績と蛍光発現頻度

Lenti-virus 濃度 ^a	供試胚数	発生率(%)							Transgene 発現率(%) ^b
		24h後		48h後		72h後			
		桑実期	胚盤胞	死・異	胚盤胞	死・異	胚盤胞	死・異	
0.5x10 ⁹⁻¹⁰	64	6.3	85.9	7.8	89.1	10.9	34.4	65.6	0.0
1.0x10 ⁸⁻⁹	64	1.6	98.4	0.0	98.4	1.6	98.4	1.6	29.4

^aLenti-virusは、CAGプロモーターを用いた。

^bTransgene の発現率は、培養96h後に蛍光顕微鏡を用いて観察した。

表2. CAGおよびCAGプロモーターを用いたLenti-virusを添加した8細胞期胚の発生成績と蛍光発現頻度

Lenti-virus promoter	供試胚数	発生率(%)							Transgene 発現率(%) ^a
		24h後		48h後		72h後			
		桑実期	胚盤胞	死・異	胚盤胞	死・異	胚盤胞	死・異	
CAG	96	18.8	76.0	5.2	92.4	7.6	92.4	7.6	17.9
CMV	57	17.5	77.2	5.3	95.1	4.9	95.1	4.9	19.4

^aTransgene の発現率は、培養96h後に蛍光顕微鏡を用いて観察した。

表3 (B6 x129)F1 遺伝子型の各種ドナー細胞を用いた核移植クローンの成績

Cell type	No. cultured	2-cell (%)	4-cell (%)	Embryo Transfer (ET)	Implanted (% per ET)	Offspring (% per ET)
Sertoli	175	155 (88.6)	104 (59.4)	81	36 (44.4)	6 (7.4)
Fibroblast	182	172 (94.5)	126 (69.2)	93	63 (67.7)	2 (2.2)
Hematopoietic st	637	563 (88.4)	302 (47.4)	252	90 (35.7)	2 (0.8)
NKT	572	534 (93.4)	482 (84.3)	272	161 (59.2)	4 (1.5)

表4. ラットES細胞用培養液の組成

	標準培養液	修正培養液
基本培地 (DMEM)	80.0 mL	—
血清軽減基本培地 (Advanced-DMEM or Opti-MEM)	—	90.0 mL
ES細胞用血清 (FBS)	20.0 mL	10.0 mL
非必須アミノ酸溶液 (NEAA)	1.0mL	
2-メルカプトエタノール [7 μL/10mL 希釈液]	1.0mL	
ヒト LIF	0.1 mL	
	[最終濃度 : 1000U/mL]	

表5. ラット胚盤胞期胚由来細胞の樹立に対する培養温度の影響

培養温度 (°C)	初代培養 に供した 胚の数	継代数		
		1	2	3
37	16	8 (50%)	4 (25%)	1 (6%)
38	16	11 (69%)	4 (25%)	0 (0%)
39	23	1 (4%)	0 (0%)	0 (0%)

* 括弧内は継代培養できた胚の割合

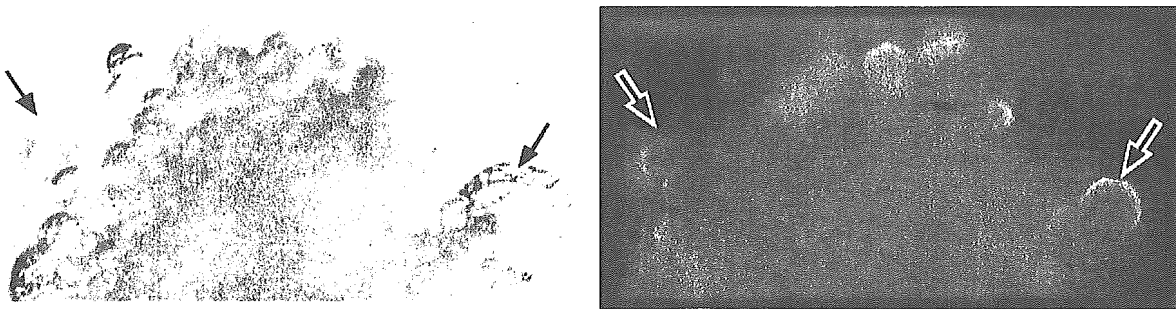


図1 体外で分化させた雌性生殖幹細胞。分化した卵子にも BrdUが認められ、体外で増殖と分化の再現ができたことが証明できた。(抗BrdU染色用のアルコール固定により、細胞の形態は壊れている)

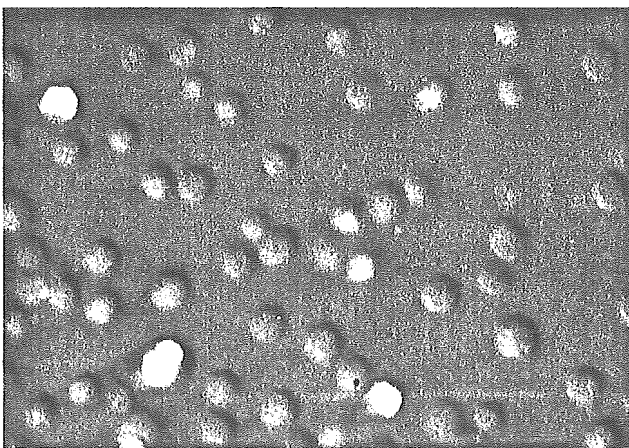


図2. 脱核後の線維芽細胞。小型の細胞のほぼすべてがサイトプラストとなっている。核染色の蛍光は、大型の3つの細胞に残っている。