

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 医薬基盤研究所 生物資源研究部 主任研究員

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。本研究では、シリアンハムスターにおける幼若個体卵巣の移植技術を検討するとともに、過排卵誘起の分子的基础を拡充するため実験用ハムスター4種について性腺刺激ホルモンの配列決定を行った。

A. 研究目的

実験用ハムスターへの生殖技術の応用は、マウス・ラットに比べ困難であるのが現状である。そこで、マウス系統保存法の一つとして有用な卵巣移植技術のハムスターへの適用を検討した。本来、卵巣移植では移植免疫の点から移植を受ける系統の制約が厳しいが、シリアンハムスターでは移植免疫の制約がほとんど無いことが知られており、本研究はその確認も兼ねている。また、実験用ハムスター4種について過排卵誘起の分子的基础を拡充するため性腺刺激ホルモンの配列決定を行った

B. 研究方法

1) 幼若（2週齢）HAW系雌シリアンハムスター（毛色：白）より卵巣を採取した。3週齢の野生色シリアンハムスター（Slc:Syrian）をキシラジン・ケタミンにより麻酔し、卵巣を半分除去後、卵巣嚢内へHAW卵巣を挿入した。卵巣移植を受けた個体が術後回復し、成熟日齢に達した時点でHAW雄と交配し、得られた産仔の毛色を調べることにより、移植卵巣の正着を判定した。

2) 性腺刺激ホルモンのcDNA配列の決定は、シリアン（Slc:Syrianより下垂体採取）、アルメニアン（オリエンタル酵母より下垂体のみ購入）、チャイニーズ（三菱化学生命研、上條先生より下垂体のみ分与）、ジャンガリアン（日獣大、池先生より下垂体のみ分与）の4種のハムスターより下垂体cDNAを作成し、RACE法とPCR産物の直接配列決定法により行った。

動物実験については医薬基盤研究所動物実験指針に則って行なった。

C. 研究成果

1) 手術を11例行った。報告書作成時点で2匹が出産に至ったが、毛色が野生色の産仔のみ、すなわち、移植を受けた個体本来の卵巣に由来する産仔のみで、移植された卵巣由来の産仔は得られなかった。残りは交配中・術後回復中である。

2) 性腺刺激ホルモンの共通 α サブユニット、FSH- β サブユニット、LH- β サブユニットが、ハムスター4種全てで決定でき、遺伝子データバンクへ登録した。登録番号を以下の表に示す。

	Common- α	FSH- β	LH- β
Syrian	AF307148	AB241062	AY353074
Armenian	AB235912	AB235911	AB233028
Chinese	AB248597	AB248599	AB248598
Djungarian	AB250761	AB252645	AB250762

D. 考察

現時点では移植卵巣由来産仔は得られていない。シリアンハムスターにおける卵巣移植手術は、マウスの方法に準じて行ったが、麻酔の調節が難しく、止血剤（ノルエピネフリンによる血管収縮を利用）もマウスほど有効ではないため、手術法の改良を要すると思われた。一方、ハムスター4種の性腺刺激ホルモンは、過排卵誘起に汎用されるヒト由来ホルモンとの相同性が低く、実験用齧歯類動物に合ったホルモン製剤の必要性を痛感した。

E. 結語

卵巣移植によるハムスター産仔の作出を試みたが、現時点では成功しておらず、更なる改良が必要だと思われる。一方、ハムスター4種の性腺刺激ホルモンの配列情報は過排卵技術の分子的基础として有用であろう。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

● **Suzuki O**, Hata T, Takekawa N, Koura M, Takano K, Yamamoto Y, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. 2006. Transgene insertion pattern analysis using genomic walking in a transgenic mouse line. *Exp Anim* 55:65-69.

● Noguchi Y, Takano K, Koura M, Uchio-Yamada K, Matsuda J, **Suzuki O**. 2006. Sequence analysis of cDNA encoding rabbit follicle-stimulating hormone β -subunit precursor protein. *Gen Comp Endocrinol* (in press).

2) 学会発表

● **鈴木治**、秦朋子、竹川奈穂、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。ゲノムウォーキングによる遺伝子導入動物の導入遺伝子挿入形式の解析。第52回日本実験動物学会総会、2005年5月、東京。

● **Suzuki O**, Hata T, Takekawa N, Koura M, Takano K, Yamamoto Y, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Effect of ascorbic acid 2-*o*- α -glucoside and alanyl-glutamine on in vitro growth culture of preantral follicles from cryopreserved mouse ovaries. 38th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, Quebec, Canada, July 2005.

● **Suzuki O**, Koura M, Takano K, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Insertion pattern analysis of transgenes in a transgenic mouse line by genomic walking. 55th Annual Meeting of the American

Society of Human Genetics, Salt Lake City, USA,
October 2005.

- **鈴木治**、金井孝夫, 拡張型心筋症モデルの可能性 : 心拡張を呈するシアル酸転移酵素遺伝子導入マウスの解析、第27回心筋生検研究会、2005年11月、東京
- **Suzuki O**, Koura M, Noguchi Y, Takano K, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Characterization of the Luteinizing Hormone β -Subunit Precursor Protein cDNA in the Rabbit. 45th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, San Francisco, USA, December 2005.
- **Suzuki O**, Koura M, Noguchi Y, Takano K, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Sequence comparison of the pituitary gonadotropin subunit precursor proteins of the Syrian, Armenian, and Chinese hamsters. Genetic Analysis: Model Organisms to Human Biology, A Genetics Society of America Meeting. San Diego, USA, January 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

実験動物の系統保存および開発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

実験動物の系統保存および開発のための新規生殖工学技術の開発、今年には特に顕微授精技術の応用開発および新規幹細胞の樹立を行った。精巣および精巣上体の精子・精子細胞は、組織あるいは全身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保存を行えることを明らかにした。新規幹細胞としては、極めて増殖力の高いウサギ ES 様細胞を樹立し、またマウス卵巣由来の莢膜幹細胞（あるいは前駆細胞）の分離を行った。

A. 研究目的

顕微授精技術や胚・精子凍結技術などの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。また、遺伝子改変動物作出に重要な役割を果たす胚性幹細胞（ES細胞）は、実験動物ではマウスのみで開発されており、ラットやマウスなど他の実験動物の利用を著しく遅らせている。今年度は、1) マウス系統の輸送・保存・復活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、2) ウサギES細胞の作出、および3) 新規組織特異的幹細胞の樹立を試みた。

B. 研究方法

1) 組織あるいはマウス丸ごと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：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。凍結チューブを凍結用コンテナへ納めてから -80℃ディープフリーザー中で凍結（約 -1℃/分で冷却）した。あるいは、マウス死体を丸ごと凍結した。融解は凍結チューブあるいはマウス死体を室温水に漬けることにより行った。融解後、常法に従い精子あるいは精巣細胞を分離した。融解後の雄性生殖細胞は正立顕微鏡下で形態観察およびトリパンブルー染色による生存の確認を行った。その後、マウス未受精卵へ顕微注入を行い、胚の体外発生および胚移植後の産子への発生を検討した。精子は東部のみ注入、伸張精子細胞および円形精子細胞は細胞全部を注入した。

2) ウサギES細胞の樹立：成熟雌ウサギに FSH を投与48時間後にhCGを投与し、同時に雄と交配することにより受精卵を得た。交配翌日あるいは3日後にそれぞれ卵管と子宮から RD培養液の灌流により胚を回収した。必要な場合は体外培

養を行い、得られた胚盤胞に酸性タイロイド液およびプロナーゼ処理を行い、透明帯を除去した。透明帯除去胚盤胞をマウス胎児線維芽細胞のフィーダー上で12 well dish で培養を開始した。

3) マウス卵巣由来幹細胞の樹立：生後13日の雌マウス新生仔より卵巣を取り出し、各種成長因子を含む、Kanatsu-Shinohara (1993)の雄生殖幹細胞 (male germline stem cell; GS細胞)樹立用の培養液で培養を開始した。継代の途上で、stem cell factor あるいは牛胎児血清を添加し、細胞の反応を観察した。適宜、免疫染色あるいはRT-PCRによるタンパク発現および遺伝子発現解析を実施した。得られた幹細胞様細胞は、体外に取り出した卵巣の表面へガラスピペットを用いてコロニーごと注入し、その卵巣を体内へ戻すことにより、卵巣組織への再分布を観察した。

(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) 組織あるいはマウス丸ごと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：

マウス精巣をフリーザーで1年間保存した後、融解して精子および精子細胞を回収して顕微授精に用いた。凍結融解後の細胞生存率は11-25%であった。精巣精子および精子細胞のいずれを用いても産子を得ることができた(Table 1)。

次に15年間-20℃フリーザーで保存したマウス死体から精巣を回収し、その精子を用いて顕微授精を行った。約80-90%の注入卵子が分割し、胚移植後、12-20%が産子に発生した。これらの産子は外見上の異常はなく、そのほとんどが通常通り離乳後まで生存している。

2) ウサギ ES 細胞の樹立：

ウサギ胚盤胞を well 中に数個単位で培養したところ、約 1 週間で扁平な未分化細胞様のコロニーが出現した。酵素を使わずに、機械的に継代を続けることにより、現在 14 代まで順調に増殖している。コロニー細胞はアルカリフォスファターゼ強陽性、Nanog および Oct4 陽性である。単離した細胞の形状は、核/細胞質比が高く、核小体も存在し、マウスの ES 細胞に類似している。また、体外で胚様体も効率よく作出できることがわかった。一部のバッチは、レンチウイルスベクター法により普遍的発現プロモーター+EGFP 遺伝子を導入した。約半数以上の細胞が蛍光を発生し、蛍光コロニーを選択的にピックアップすることにより、これらの EGFP コロニーも順調に継代が続いている。

3) マウス卵巣由来幹細胞の樹立:

マウス雄 GS 細胞株樹立用の培養液で培養を続けると、約 1 日で球状のコロニーが形成され、培養日を経るにつれてその大きさと数を増加させた。そこで stem cell factor を添加すると、コロニー表面より球形の未熟な卵子が放出されてきた。そこで、これらのコロニーの細胞が想定上の卵子の幹細胞である可能性を見極めるために、コロニーの切片を作成し、抗 BrdU 染色(細胞増殖の指標)と抗 vasa 染色を実施した。同一切片上で二重染色を行ったが、二重に染色されている細胞は存在せず、増殖細胞は体細胞であることが示唆された。

全身が蛍光を発する EGFP マウス(green mouse)から上記と同様にコロニーを作出し、通常のマウスの卵巣へ移植したところ、卵胞の外膜に分布し、莖膜細胞に分化したことが示された。コロニーの遺伝子発現を観察したところ、いくつかの莖膜細胞特異的のマーカ―遺伝子を発現しており、本研究で得られた細胞は、莖膜細胞の幹細胞あるいは前駆細胞であることが示唆された。しかし、LH レセプターは発現せず、FSH レセプター(顆粒膜細胞で発現)を発現していた点については、検討を要する。

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。本研究で示したように、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)を簡易に凍結保存できることが示された。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、死体を丸ごとフリーザーへ 15 年もの間保存されていても、その精巢中の細胞は受精能を保つことがわかり、今後の系統保存だけでなく、これまで途絶した系統の復活も視野に入れられることが明らかになった。

本研究のもう一つの課題である、多分化能幹細胞技術は、小型実験動物ではマウスだけで確立されており、これが他の小型実験動物種の利用を妨げている。本研究では、ウサギの ES 様細胞株を樹立し、体外で遺伝子導入が可能であることを示すことができた。真の ES 細胞としては、キメラ形成能と多分化能を示す必要がある。胚様体までは分化できることが明らかなので、今後の結果に期待したい。最終的にはマウスと同様のキメラ經由法で、ジーンターゲットイングウサギを作出を目指す予定である。

E. 結論

マウス顕微授精技術を用いることにより、組織あるいは全身凍結保存により精子・精子細胞が長期間保存可能であることがわかった。また、ウサギの ES 様細胞の樹立、およびマウス卵巣由来莖膜細胞幹細胞の分離に成功した。これらの成果は今後の実験動物の発生工学技術の基礎として、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. Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Hirose M, Noda S, Kim J-M, Aoki F, Miyoshi H, Ogura A. Inefficient reprogramming of the hematopoietic stem cell genome following nuclear transfer. *J Cell Sci* (in press) 2006.
2. Miki H, Ogonuki N, Inoue K, Baba T, Ogura A. Improvement of cumulus-free oocyte maturation in vitro and its application to microinsemination with primary spermatocytes in mice. *J Reprod Dev* (in press) 2006.
3. Ono R, Nakamura K, Inoue K, Naruse M, Usami T, Wakisaka-Saito N, Hino T, Suzuki-Migishima R, Ogonuki N, Miki H, Kohda T, Ogura A, Yokoyama M, Kaneko-Ishino T, Ishino F. *Nat Genet* 38:101-106, 2006.
4. Inoue K, Wakao H, Ogonuki N, Miki H, Seino K, Nambu-Wakao R, Noda S, Miyoshi H, Koseki H, Taniguchi M, and Ogura A. Generation of cloned mice by direct nuclear transfer from natural killer

- T cells. **Curr Biol**, 15: 1114-1118, 2005.
5. Kohda T, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Naruse M, Kaneko-Ishino T, Ogura A, Ishino F: Variation in gene expression and aberrantly regulated 1 chromosome regions in cloned mice. **Biol Reprod** 73:1302-1311, 2005.
 6. Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, Miki H, Ogonuki N, Toyokuni S, Ogura A, Shinohara T. Anchorage-independent growth of mouse male germline stem cells in vitro. **Biol Reprod.** (in press).
 7. Ogura A, Ogonuki N, Miki H, and Inoue K Microinsemination and nuclear transfer using male germ cells. **Int Rev Cytol**, 246: 189-229, 2005
 8. 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.**, 72: 985-991, 2005
 9. Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Inoue K, Ogonuki N, Toyokuni S, Ogura A, and Shinohara T Germline niche transplantation restores fertility in infertile mice. **Hum Reprod**, 20: 2376-2382, 2005
 10. Tanemura K, Ogura A, Cheong C, Gotoh H, Matsumoto K, Sato E, Hayashi Y, Lee HW, and Kondo T Dynamic rearrangement of telomeres during spermatogenesis in mice. **Dev Biol**, 281: 196-207, 2005
 11. Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Iwano T, Lee J, Kazuki Y, Inoue K, Miki H, Takehashi M, Toyokuni S, Shinkai Y, Oshimura M, Ishino F, Ogura A, Shinohara T Genetic and epigenetic properties of mouse male germline stem cells during long-term culture. **Development**, 132: 4155-63, 2005.
 12. Kwon J, Mochida K, Wang YL, Sekiguchi S, Sankai T, Aoki S, Ogura A, Yoshikawa Y, and 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.**, 73: 29-35, 2005
 13. Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Mochida K, Hatori M, Okada H, Takeiri S, Shimosawa N, Nagashima H, Sanakai T, and Ogura A Differential development of rabbit embryos following microinsemination with sperm and spermatids **Mol Reprod Dev**, 72: 411-417, 2005
 14. Ogura A, Inoue K, Ogonuki N, and Miki H The present status of somatic cell cloning. **In: Genetically Engineered Mice**, Sundberg JP and Ichiki T (eds), CRC Press, Boca Raton, U.S.A., pp125-130, 2005
 15. Yamagata K, Yamazaki T, Yamashita M, Hara Y, Ogonuki N, and Ogura A Noninvasive visualization of molecular events in the mammalian zygote. **Genesis**, 43: 71-79, 2005
2. 学会発表
- Narumi Ogonuki, Keiji Mochida, Akie Shinmen, Mika Ohkawa, Hiromi Miki, Kimiko Inoue, Martin Fray, Kazuo Moriwaki, Yuichi Obata, Atsuo Ogura: Microinsemination using male germ cells from epididymides and testes stored in freezers. International Embryo Transfer Society, Jan. 2006, Orlando, U.S.A.

Table 1. In vivo development of embryos following microinsemination with male germ cells from testes which had been stored for one year (ICR strain).

Germ cells	No. embryos transferred	Recipient females		No. (%) implant	No. (%) offspring
		No. used	No. pregnant		
Testicular sperm	31	2	2	16 (51.6)	7 (22.6)
Elongated spermatids	32	2	2	9 (28.1)	6 (18.8)
Round Spermatids	61	3	3	26 (42.6)	7 (11.5)

Male germ cells were frozen in freezing containers and stored at -80°C .

The results within the same column were not significantly different ($P > 0.05$) (Fisher's exact probability test).

Table 2. In vitro and in vivo development of embryos following microinsemination with male germ cells from frozen mice which had been stored for 15 years.

Strain of male	No. oocytes that survived injection	No. (%) oocytes cleaved	No. embryos transferred	Recipient females		No. (%) implant	No. (%) offspring
				No. used	No. pregnant		
BALB/c-nude	106	81 (76.4)	81	6	4	42 (51.9)	17 (21.0)
C3H/He	108	97 (89.8)	97	7	4	34 (35.1)	12 (12.4)

相同組換えマウスの効率的作製のための生殖細胞保存・人工授精法の開発

分担研究者 岡部 勝 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨

ES 細胞の germline transmission の効率を上げる可能性について研究した。X-GFP マウスを用いることで着床前の胚で雌雄の識別を行った。その結果、雌胚を用いて作製した ES キメラマウスの雄からは ES 細胞由来のアレルを持つ仔のみが誕生することが確かめられた。しかし、雌胚を用いて作製した ES キメラマウスは雄の胚を用いて作製した ES キメラマウスよりも不妊になりやすいことも分かった。

A. 研究目的

遺伝子相同組換えマウス作製における長期にわたる緻密かつ継続した作業を生殖細胞の凍結保存と人工授精を組み合わせることにより、簡便化および短縮化できる系をつくり、遺伝子改変動物の遺伝子資源の開発に寄与したい。

B. 研究方法

C57BL/6 または BDF1 の雌に過排卵処理を行い、X-GFP マウスの雄と交配させて、採取した胚を胚盤胞（胎生 3.5 日）になるまで kSOM で、37°C、5% CO₂ の条件で 2 日間培養した。胚盤胞は蛍光実体顕微鏡（Olympus, SZX12）を用いて、EGFP 蛍光を持つ雌性胚と光らない雄性胚に分別して ES キメラ胚の作製に用いた。

調製した ES 細胞は FHM 中で、ピエゾドライブ（Prime Tech LTD, PMAS-CT150）を用いて胚盤胞内へ注入した。ES 細胞の注入を終えた胚は偽妊娠マウスに移植するまで、kSOM 内で、37°C、5% CO₂ の条件で培養した。

ES 細胞の注入を終えた胚は妊娠 2.5 日目の

偽妊娠 ICR マウスに移植し、妊娠 19.5 日目に自然分娩もしくは、帝王切開によって産仔を得た。

誕生したマウスが ES キメラマウスであることは、毛色によって判定した。すなわち、用いた D3-ES は 129Sv 系統のマウス由来で、(AABBCC) のアグーチ色の毛色遺伝子を持ち、胚盤胞に用いた C57BL/6 系統または BDF1 x C57BL/6 系統は (aaBBCC) の黒色の毛色遺伝子を持つので、1 週令以降にアグーチ色の混在により ES キメラマウスであることを判定した。

マウスを用いるため特別な倫理的配慮は必要としない。

C. 研究結果

全身から GFP を発現するようなトランスジーンを X 染色体上にもつ “X-GFP マウス” 6 ラインのなかから蛍光を指標に雄性を判別できるラインを特定した。次いで雌性と判定された胚に雄性の ES 細胞を注入して雌雄キメラ胚を作製した。キメラマウスが雄であればその個体の産生する精子はすべて ES 細胞由来になるはず

であるが、実際にそのようになるかどうかを検討した。

Germline transmission の効率化を検討するためには雄の ES キメラマウスを得る必要がある。そこで、C57BL/6 の雌と X-GFP マウスの雄の交配によって得られた胚盤胞 (以下、B6*)と、C57BL/6 系統よりも排卵数が多く、誕生率が高い BDF1 の雌と X-GFP マウスの雄の交配によって得られた胚盤胞 (以下、BDF1*) を用いて、ES キメラを作製し、産仔数と性比に差があるかどうかを検討した。

雌の胚盤胞に D3-ES を注入した計 106 個の胚 (B6* が 51 個、BDF1* が 55 個) を移植したところ、計 12 匹 (B6* から 5 匹、BDF1* から 6 匹) の産仔が得られた。産仔には全てアグーチ色の毛の混在が確認され、ES キメラマウスとして誕生していることが分かった。これら、雌の胚盤胞を用いて誕生した ES キメラマウス (以下、XX*↔XY D3-ES キメラマウス) の性は 10 匹が雄、1 匹が雌で、XX*↔XY D3-ES キメラマウスのほとんどは雄として誕生することが分かった。

得られた雄の D3-ES キメラマウスの ES 由来アレルの germline transmission 効率を評価した結果 XX*↔XY D3-ES キメラマウス 4 匹のうち 2 匹から産仔が得られ、全てアグーチ色であることが確認できた。予想通り XX*↔XY D3-ES キメラマウスの雄からは 100% の確率で ES 細胞由来のアレルが遺伝することが明らかになった。

D. 考察

ES 細胞とのキメラマウスから ES 細胞由来の F1 マウスを誕生 (germline transmission) させることは遺伝子ノックアウト研究の最も重要な部分である。今回の検討により、ホスト卵子をあらか

じめ雌卵子にしておくと、理論どおりに生まれたキメラが子供をうめば必ず ES 細胞由来のものができると実証された。ただし、雌の卵子を用いることにより不妊になるキメラがいることが問題である。このような場合に精巣内に精子が認められれば ICSI により問題なく産仔がえられるとおもわれるのでこのような可能性についても今後検討を重ねてゆきたいと考えている。

E. 結論

① X-GFP マウスを用いると容易に雌雄キメラマウスを作製することができる。

② 雌胚と ES とのキメラマウスからは ES 細胞由来のアレルを持つ仔だけが誕生する。

③ 雌胚を用いて作製した ES キメラマウスは雄の胚を用いて作製した ES キメラマウスよりも不妊になりやすい。

④ この系をさらにリファインすることにより効率的な germline transmission が可能になると思われる。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

S. Kobayashi, A. Isotani, N. Mise, M. Yamamoto, Y. Fujihara, K. Kaseda, T. Nakanishi, M. Ikawa, H. Hamada, K. Abe and M. Okabe, Comparison of gene expression in male and female mouse blastocysts revealed imprinting of the x-linked gene, *rhox5/pem*, at preimplantation stages, *Curr Biol*, 16(2), 166-72, 2006

- G. Kondoh, H. Tojo, Y. Nakatani, N. Komazawa, C. Murata, K. Yamagata, Y. Maeda, T. Kinoshita, M. Okabe, R. Taguchi and J. Takeda, Angiotensin-converting enzyme is a GPI-anchored protein releasing factor crucial for fertilization, *Nat Med*, 11(2), 160-6, 2005
- N. Inoue, M. Ikawa, A. Isotani and M. Okabe, The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs, *Nature*, 434(7030), 234-8, 2005
- A. Isotani, T. Nakanishi, S. Kobayashi, J. Lee, S. Chuma, N. Nakatsuji, F. Ishino and M. Okabe, Genomic imprinting of XX spermatogonia and XX oocytes recovered from XX \rightarrow XY chimeric testes, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(11), 4039-44, 2005
- K. Yahata, H. Kishine, T. Sone, Y. Sasaki, J. Hotta, J. D. Chesnut, M. Okabe and F. Imamoto, Multi-gene Gateway clone design for expression of multiple heterologous genes in living cells: Conditional gene expression at near physiological levels, *J Biotechnol*, 118(2), 123-34, 2005
- H. Tanaka, N. Iguchi, A. Isotani, K. Kitamura, Y. Toyama, Y. Matsuoka, M. Onishi, K. Masai, M. Maekawa, K. Toshimori, M. Okabe and Y. Nishimune, HANP1/HIT2, a Novel Histone H1-Like Protein Involved in Nuclear Formation and Sperm Fertility, *Mol Cell Biol*, 25(16), 7107-19, 2005
- X. Wang, S. Inoue, J. Gu, E. Miyoshi, K. Noda, W. Li, Y. Mizuno-Horikawa, M. Nakano, M. Asahi, M. Takahashi, N. Uozumi, S. Ihara, S. H. Lee, Y. Ikeda, Y. Yamaguchi, Y. Aze, Y. Tomiyama, J. Fujii, K. Suzuki, A. Kondo, S. D. Shapiro, C. Lopez-Otin, T. Kuwaki, M. Okabe, K. Honke and N. Taniguchi, Dysregulation of TGF-beta1 receptor activation leads to abnormal lung development and emphysema-like phenotype in core fucose-deficient mice, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(44), 15791-6, 2005
- 岡部勝, 遺伝子操作動物を通して見る受精のメカニズム, 関西実験動物研究会会報, 26, 74-7, 2005
- 井上直和, 岡部勝, 受精の膜融合必須分子 Izumo の発見, 細胞工学, 24(5), 490-1, 2005
- 蓮輪英毅, 岡部勝, RNAiによる哺乳動物個体レベルでのノックダウン, RNA工学の最前線, 67-76, シーエムシー出版, 東京都千代田区, 2005
2. 学会発表
蓮輪英毅、松村寛行、井上直和、伊川正人、岡部勝、第52回日本実験動物学会総会「cre-loxPシステムを用いた組織特異的欠損マウスの作製」2005年5月、東京
- Naokazu Inoue, Masahito Ikawa, Ayako Isotani, Masaru Okabe, 8th International Congress of Andrology “The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs” 2005 June, Seoul, Korea

Naokazu Inoue, Masahito Ikawa, Ayako Isotani, Masaru Okabe, Gordon Research Conference -Fertilization & Activation of Development, "The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs" 2005 July, New Hampshire, USA

Ayako Isotani, Tomoko Nakanishi, Shin Kobayashi, Jiyong Lee, Shinichiro Chuma, Norio Nakatsuji, Fumitoshi Ishino, Masaru Okabe, Society for the Study of Reproduction Annual Meeting "GENOMIC IMPRINTING OF XX GERM CELLS RECOVERED FROM XX \leftrightarrow XY CHIMERIC TESTES." 2005 July, Quebec, Canada

Shin Kobayashi, Masaru Okabe, Shirokane International Symposium, "Sexually dimorphic gene expression in preimplantation embryo before gonadal sex differentiation" 2005 July, Tokyo

Masaru Okabe, Gordon Research Conference -Fertilization & Activation of Development, "Observation of sperm-egg interaction through gene-manipulated animals", 2005 July, New Hampshire, USA

岡部勝、伊川正人、井上直和、山口亮、第78回日本生化学会大会「遺伝子組換え動物を通して見る受精のメカニズム」2005年10月、神戸

Ayako Isotani, Shin Kobayashi, Nathan Mise, Tomoko Nakanishi, Masahito Ikawa, Kuniya

Abe, Masaru Okabe, International Symposium on Germ Cells, Epigenetics, Reprograming and Embryonic Stem Cells, "Differentiation of XX germ cells in testicular environment" 2005 November, Kyoto

Shin Kobayashi, Ayako Isotani, Nathan Mise, Yoshitaka Fujihara, Kazuhiro Kaseda, Tomoko Nakanishi, Masahito Ikawa, Masaru Okabe, International Symposium on Germ Cells, Epigenetics, Reprograming and Embryonic Stem Cells, "Comparison of gene expression in male and female blastocysts revealed a novel X-linked imprinted gene" 2005 November, Kyoto

井上直和、伊川正人、磯谷綾子、岡部勝、第28回日本分子生物学会年会「受精の膜融合に必須な分子Izumoの同定」2005年12月、福岡

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

特許出願 2005-234258:栄養外胚葉細胞特異的遺伝子導入法, 2005年8月12日出願

コモンマーモセットのミトコンドリア DNA における SNPs

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
研究協力者 谷岡 功邦 財団法人実験動物中央研究所主任研究員

新たな霊長類の実験動物として財団法人実験動物中央研究所において開発が進められているコモンマーモセットの遺伝的マーカーとして、ミトコンドリア DNA マーカーの SNPs に関する基礎的研究を行った。

A. 研究目的

近年、新たな霊長類の実験動物として財団法人実験動物中央研究所で開発されているコモンマーモセット (*Callithrix jacchus*, 以下マーモセット) を集団として遺伝的に統御するためには母系遺伝するミトコンドリア DNA がマーカーとして適切である。本研究では、その基礎的研究として、他の動物種等で遺伝的多型の存在が知られる D-loop のシーケンスを行った。

B. 研究方法

他のマーモセット種で報告されている mtDNA の D-loop における DNA シーケンスからコンセンサスシーケンスを選び、約 1kb を増幅するようにプライマーを設定した。プライマー合成はインビトロジェン株式会社に依頼した。一方、財団法人実験動物中央研究所から分与を受けたコモンマーモセット 40 個体の肝臓から次の方法により total DNA を抽出した。肝臓をエッペンドルフチューブにとり、Lysis buffer (100mM Tris-HCl:pH7.5, 12.5mM EDTA, 2Na, 150mM NaCl, 1.0% SDS, 50µg/ml Proteinase K) を 500µl 加え、55°C で 1 時間振盪した。続いて、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (株式会社ニッポンジーン) を 500µl 加えて混和後、15,000rpm で 10 分間遠心した。上清を別のエッペンドルフチューブに移し、100%エタノールを 1,000µl 加えて混和後、15,000rpm で 10 分間遠心し、DNA を沈殿させた。最後に、70%エタノールを用いて DNA を洗浄し、エッペンドルフチューブ内で DNA を乾燥させた。100mM TE (株式会社ニッポンジーン) に溶解し、DNA 溶液として、以後の実験に用いた。

PCRにより増幅された DNA を当大学機器センターに依頼し、シーケンスが行われた。

C. 研究結果

40 個体のコモンマーモセットを対象に D-loop をシーケンスした結果、33 箇所塩基置換が観察された。それぞれについて制限酵素サイトの有無を調べたところ、*Tsp* EI(*AATT)、*Acc* I(GT*MKAC)、*Mva* I(CC*WGG)、*Mwo* I(GCNNNN*NNGC) および *Mse* I(T*TAA)

による切断サイトが示唆された。この 5 種類の制限酵素サイトの組み合わせは個体によって異なっており、40 個体のコモンマーモセットを 8 グループに分けることができることが判明した。

D. 考察

コモンマーモセットのミトコンドリア DNA マーカーの開発を目的に、その基礎的研究としての D-loop の DNA シーケンスを行った。その結果、33 箇所 SNPs が観察された。そのうち 5 箇所が制限酵素サイトであることが判明したことから、今後は、シーケンスに依らない制限酵素切断による多型検査、いわゆる RFLPs (restriction fragment length polymorphisms) について検討する予定である。

E. 結論

財団法人実験動物中央研究所で維持されてきているコモンマーモセット集団を遺伝育種学的に管理する目的で指標となるマーカー開発に関する基礎的研究を行った結果、ミトコンドリア DNA の SNPs が検出された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Katoh H, Yoshino S, Inui Y, Honda S, Takabayashi S. Microsatellite genotyping for genetic quality testing using sperm cells in the mouse. *Exp. Anim.* 54: 373-376, 2005.

Takabayashi S and Katoh H. A mutant mouse with severe anemia and skin abnormalities controlled by a new allele of the flaky skin (fsn) locus. *Exp. Anim.* 54: 339-347, 2005.

Katoh H. Genetic monitoring of mice. In *Handbook of genetically engineered mice* (eds Sundberg JP, Ichiki T), 143-156, CRC Press, FL, 2005.

2. 口頭発表

高林秀次ら. コモンマーモセットのマイクロサテライトマーカーの開発. 第 52 回日本実験動物学会総会、東京、2005.

高林秀次ら. クローズドコロニー ICR マウスからの遺伝資源の探索研究. (3) 矮小精巣突然変異遺伝子の同定. 第 22 回日本疾患モデル学会、群馬、2005.

組換え LCM-NP 抗原を用いた ELISA 法

ー実験動物施設で発生した LCMV 汚染検査で得られた実践的評価ー

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（国立感染症研究所）

森川 茂（国立感染症研究所 ウイルス第一部）

池 郁生（理研バイオリソースセンター）

研究要旨 リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（LCMV）の汚染検査には ELISA および IFA 等の抗体検査や RT-PCR が行われている。今回の研究では、実験動物施設で発生した LCMV 汚染検査を通じて、組換え LCM-NP を抗原として用いた ELISA と他の検査方法の結果を比較し、その有用性や問題点を検討した。検査は、SPF 化の為の帝王切開時の里親 BALB/c-nu/+、帝王切開により得られた産子、産子と同居させた BALB/c-nu/+、およびバリア施設で飼育されていた他系統のマウスから採取した血清について行った。LCMV lysate 抗原あるいは精製 LCMV 抗原を用いた ELISA で陽性であったマウス血清は、組換え LCM-NP 抗原での ELISA でも陽性で、抗 LCMV 抗体に対する反応性は同等であることが確認された。しかし、ELISA で陰性の血清が IFA で陽性的場合もあり、二次抗体等の検討を要することが示唆された。RT-PCR では、帝王切開によって得られた全産子が陽性であったが、抗 LCMV 抗体が検出されたのは産子 22 匹（10 週齢：7 匹、18～24 週齢：15 匹）中 9 匹のみであった。これは垂直感染により免疫寛容状態にある為で、このようなマウスの LCMV 汚染検査をする場合には抗体検査と RT-PCR を合わせて行う必要性が示された。しかし、帝王切開時の里親（産子と 6 週間同居）では ELISA でも IFA でも抗 LCMV 抗体が検出され、免疫寛容状態のマウスと数週間以上同居させた 4 マウスの抗体検査を適切に実施することで LCMV 汚染を確認できる可能性もあると思われた。

A. 研究目的

リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（LCMV）は人獣共通感染症の原因として重要である。LCMV 汚染検査には ELISA および IFA 等の抗体検査や RT-PCR が行われている。特に、バキュロウイルスで発現させた組換え LCM-NP を抗原として用いる ELISA は、抗体との高い反応性や LCMV を使用しない安全性から、有用な

検査方法の一つである。

日本国内ではヒトの LCMV 感染例の報告はなく、実験動物施設でもほとんど例がなかった。しかし、昨年 7 月、国内の実験動物施設で LCMV 汚染が発生し、淘汰時に採取されたマウス血清の抗体検査に携わる機会を得た。今回の研究では、LCMV 自然感染マウスおよび感染が疑われるマウスの LCMV 汚染検査を通

じて、組換え LCM-NP を抗原として用いた ELISA と他の検査方法の結果を比較し、その有用性や問題点を検討することを目的とする。

B. 研究方法

1. 検査したマウス血清

LCMV 感染が認められたマウスは野生由来近交系の系統で、海外の研究所からこの実験動物施設に導入された。一時繁殖施設で繁殖後、帝王切開により産子を得、一部をバリア施設内へ導入した。尚、導入元の研究所では、垂直感染によって LCMV に感染したマウスを 8 年間も維持してきたことが発覚した。今回検査した血清はマウス 43 匹分で、帝王切開時の里親 BALB/c-nu/+ (産子が 6 週齢になった時点で淘汰、2 匹)、帝王切開により得られた産子 (10 週齢：7 匹、18-24 週齢：15 匹)、任意の産子 1 匹ずつと 12 日間同居させた BALB/c-nu/+ (3 匹)、およびバリア施設で飼育されていた他系統のマウス (16 匹) から採取したものである。検査には 0.1% アジ化ナトリウム / 生理食塩水で 10 倍希釈されたマウス血清を使用した。

2. ELISA

(1) ELISA 抗原

○組換え LCM-NP 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。

○LCMV lysate 抗原：LCMV 弱毒株 (Armstrong 株) を接種した Vero E6 細胞を、100%感染した時点で PBS で洗浄し、1%NP40/PBS で溶解後、12,000rpm、5 分遠心して得られた上清を陽性抗原、同様に処理した非感染 Vero E6 細胞溶解液の遠心上清を陰性抗原として使用した。

○精製 LCMV 抗原：LCMV 弱毒株 (Armstrong 株) を Vero E6 細胞に接種し、凍結融解によりウイルスを回収した。遠心により細胞残渣を除去し、8%PEG6000 および 0.5 M NaCl を加えてウイルスを沈殿させた。この遠心沈渣を PBS に懸濁し、30/60 (W/V) % sucrose cushion に重層し、30,000rpm、2 時間遠心した。30% sucrose と 60% sucrose の間の層のウイルス粒子を回収し、1%NP40/PBS で溶解して陽性抗原として使用した。

(2) 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 (精製 LCMV 抗原の陰性対照にはコーティング溶液のみを加えた)。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 倍に希釈したマウス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、市販のペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 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。

3. IFA

(1) IFA 抗原

Vero E6 細胞に LCMV 弱毒株 (Armstrong 株) を感染させ、EDTA/ Trypsin 処理して細胞を回収し、洗浄後、スポットスライドグラスに分注した (13,000 cells/10 μ l/スポット)。アセトンで固定後、UV 照射によりウイルスを不活化して IFA 陽性抗原スライドとして使用した。非感染 Vero E6 細胞を同様に処理して分注・固定したものを陰性スライドとした。

(2) IFA 法

PBS で 20 倍および 100 倍希釈したマウス血清を IFA スライドの固定細胞と室温で 30 分反応させ、PBS で洗浄後、FITC 標識抗マウス IgG と 37°C、暗所にて 30 分反応させた。PBS で洗浄後、封入剤を載せ、カバーグラスをかけて蛍光顕微鏡で観察した。

4. RT-PCR

(1) RNA の抽出

マウス腎組織より市販の RNA 抽出キットを用いて RNA 抽出した。

(2) cDNA の合成

cDNA の合成は、市販の逆転写酵素とランダムプライマーを用いて行った。ddH₂O (1.25 μ l)、5 \times Buffer (2 μ l)、2.5 mM dNTP (1.25 μ l)、0.1 M DTT (1 μ l)、ランダムプライマー (500 μ g/ml) 0.5 μ l、RNA 溶液 3 μ l を作製し、70°C で 3 分間、55°C で 90 秒間、37°C で 1 分間処理した。その後、逆転写酵素 1 μ l を添加し、37°C で 20 分間、98°C で 5 分間処理し、cDNA を合成した。

(3) プライマー

LCMV の nucleoprotein (NP) 領域を増幅するプライマーセット NP5-001:5'-tccatragwgacagtggygggtgat-3'、NP3-001:5'-gcatgggaraayacracaattgacyc-3' (r = a または g, w = a または t, y = c

または t) を使用した。

(4) PCR 反応

PCR は市販の PCR キット (QIAGEN Multiplex PCR kit) を用いて行った。ddH₂O (6 μ l)、プライマー (10 μ M) NP5-001 (1 μ l)、プライマー (10 μ M) NP3-001 (1 μ l)、cDNA 溶液 (2 μ l)、2X QIAGEN Multiplex Master mix (10 μ l) を作製し、下記の条件で PCR を行った。

95°C 15 分
↓
94°C 30 秒
60°C 90 秒
72°C 90 秒
×30 サイクル
↓
72°C 10 分

(5) 電気泳動

PCR 産物は、2% アガロースで 1 \times TAE、100 V、30 分間泳動した。

C. 研究結果

ELISA では、「陽性抗原での OD \geq 0.5」かつ「陽性抗原での OD-陰性抗原での OD > 0.3」の場合を陽性、「陽性抗原での OD \geq 0.5」かつ「陽性抗原での OD-陰性抗原での OD < 0.3」の場合を非特異反応とした。帝王切開時の里親 BALB/c-nu/+ (2 匹) では、組換え LCM-NP 抗原および LCMV lysate 抗原での ELISA、IFA のいずれの方法でも全例が陽性と判定された。帝王切開により得られた産子 (22 匹) では、組換え LCM-NP 抗原での ELISA で 8 匹が陽性と判定されたが、精製 LCMV 抗原での ELISA ではその内 6 匹が非特異反応で、2 匹のみが陽性と判定された。しかし、組換え LCM-NP 抗原での ELISA で陽性と判定された 8 匹の中で、3 匹 (精製 LCMV 抗原での ELISA で陽性だった 2 匹を含む) が IFA で陽性と

判定された。また、組換え LCM-NP 抗原および精製 LCMV 抗原での ELISA で陰性であった 14 匹の中で、1 匹が IFA で陽性と判定された。産子と 12 日間同居させた BALB/c-nu/+ (3 匹) では、組換え LCM-NP 抗原および精製 LCMV 抗原での ELISA では全例が陰性と判定された。しかし、ELISA では陰性で IFA で陽性であった産子と同居していた 1 匹が IFA で陽性と判定された。バリア施設で飼育されていた他系統のマウス (16 匹) では、組換え LCM-NP 抗原での ELISA で 4 匹が陽性と判定されたが、精製 LCMV 抗原での ELISA および IFA では全例が陰性と判定された。

RT-PCR では、帝王切開により得られた産子では全例で陽性であったが、他のマウスではすべて陰性であった。

D. 考察

LCMV lysate 抗原あるいは精製 LCMV 抗原を用いた ELISA で陽性と判定されたマウス血清については、組換え LCM-NP 抗原を用いた ELISA でもすべて陽性と判定され、LCMV 抗体に対する反応性は従来の ELISA 法と同等であることが確認された。しかし、精製 LCMV 抗原での ELISA では非特異反応あるいは陰性を示す血清に対して陽性と判定される場合もあるので、IFA 等による確認試験をする必要があるが、一次スクリーニングとしての有用性は高いと思われた。

IFA では 7 匹が陽性と判定されたが、組換え LCM-NP 抗原での ELISA で陽性と判定されたのはその内の 5 匹のみであった。IFA で陽性、ELISA で陰性であったのは、帝王切開によって得られた産子 1 匹とその産子と同居させた BALB/c-nu/+ 1 匹であった。抗 LCMV 抗体が産生されているにもかかわらず ELISA で検出できなかった原因として抗原または二次抗体

の不適が考えられるが、精製 LCMV 抗原での ELISA でも陰性であったことから、抗原ではなく二次抗体が原因であるのかもしれない。

RT-PCR では、帝王切開によって得られたすべての産子が陽性であった。一方、産子 22 匹の中で ELISA あるいは IFA で抗 LCMV 抗体が検出されたのは 9 匹のみであった。これは、垂直感染したことで LCMV に対し免疫寛容状態になっているために抗体産生が微弱になっていることが原因と思われる。また、LCMV が帝王切開では除去されないことが確認された。このような野生由来マウスの繁殖コロニーについて LCMV 汚染検査をする場合、抗体検査のみでは不十分であり、RT-PCR を合わせて行うことが必要であろう。産子 1 匹と 12 日間同居させた BALB/c-nu/+ では効率良く抗体を検出できなかったが、産子と 6 週間同居していた帝王切開時の里親の BALB/c-nu+ では ELISA でも IFA でも抗 LCMV 抗体を検出することが可能であったことから、そのような繁殖コロニーに一定期間以上同居させた囲マウスの抗体検査をすることで LCMV 汚染を検査できる可能性もあると思われた。

E. 結論

今回の結果より、組換え LCM-NP 抗原を用いた ELISA は従来の LCMV lysate 抗原あるいは精製 LCMV 抗原を用いた ELISA と比べて LCMV に対する反応性は同等以上であり、安全性の面からも一時スクリーニング検査としての有用性は高いと思われた。しかし、垂直感染した免疫寛容状態のマウスの LCMV 汚染検査をする場合、抗体検査と RT-PCR を合わせて行うべきであろう。ただし、そのようなマウスと数週間以上同居させた囲マウスの抗体検査を適切に実施することで LCMV 汚染を確認できる可能性もあると

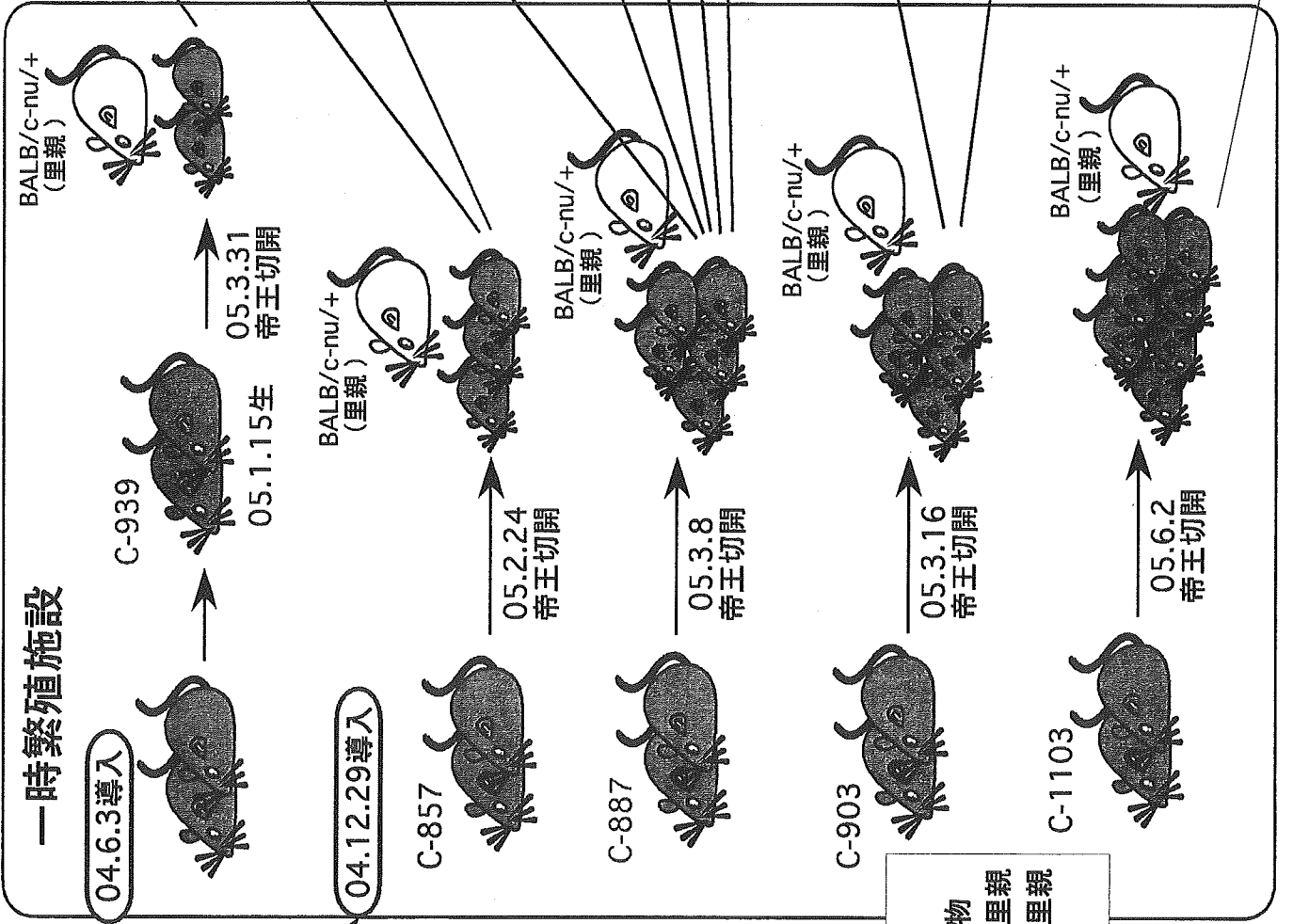
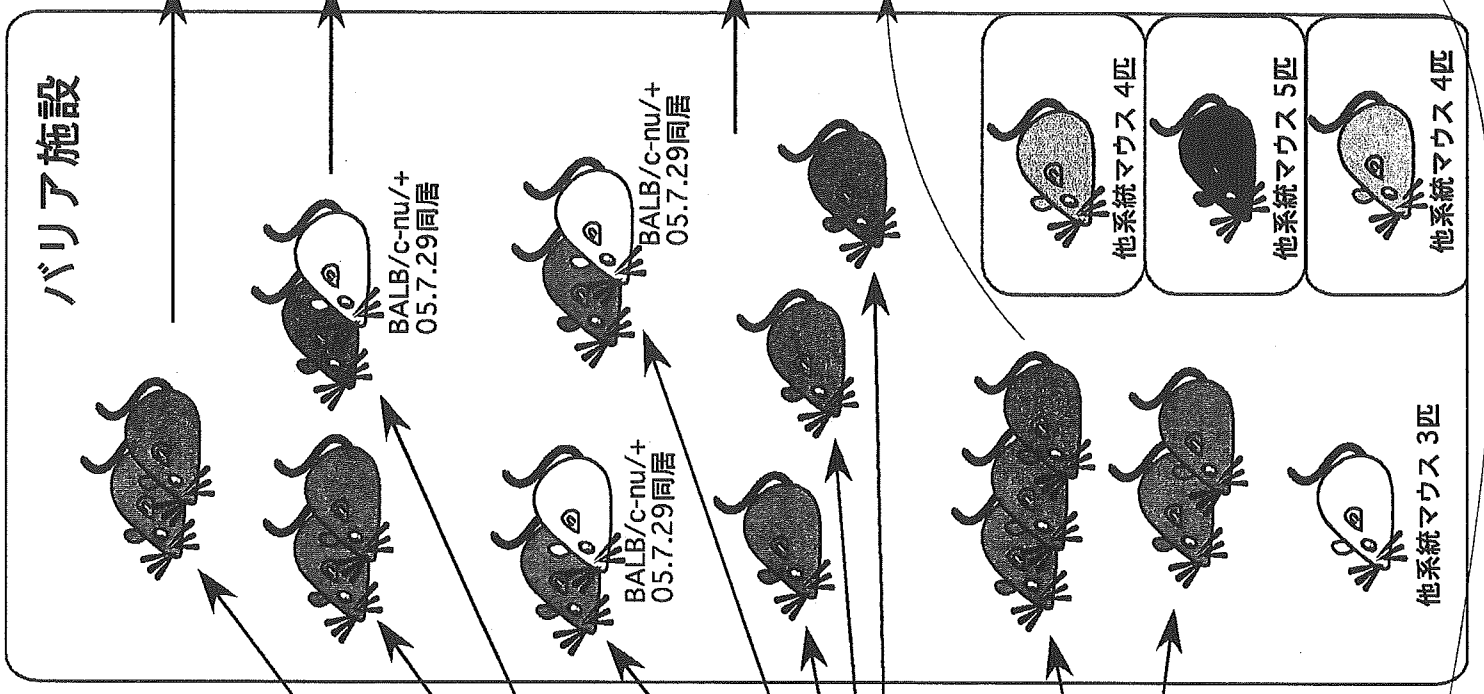
思われた。

F. 健康危険情報
該当なし

G. 研究発表
該当なし

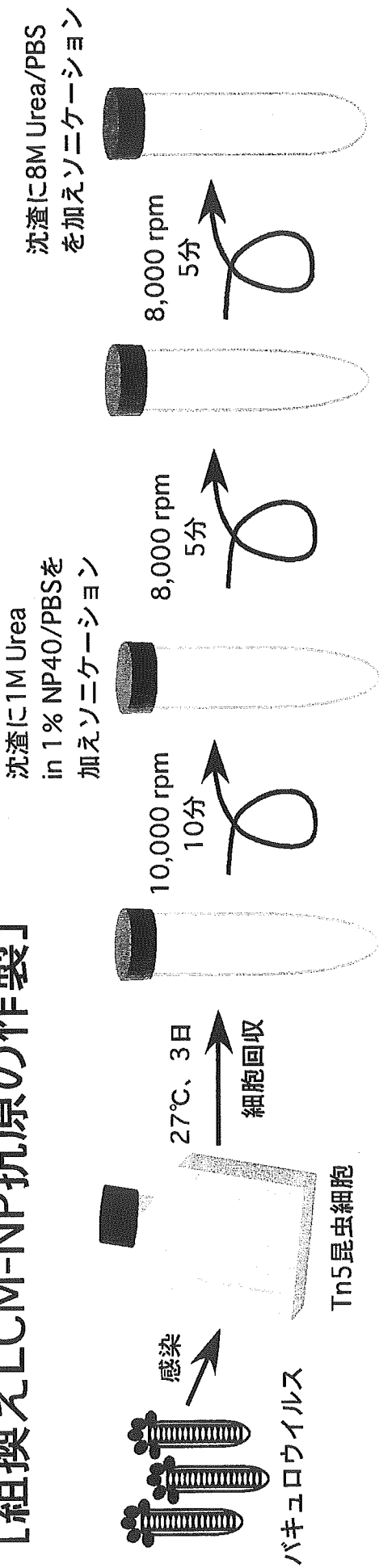
LCMV汚染検査マウス

05.8.10
採血時の
産子の週齢

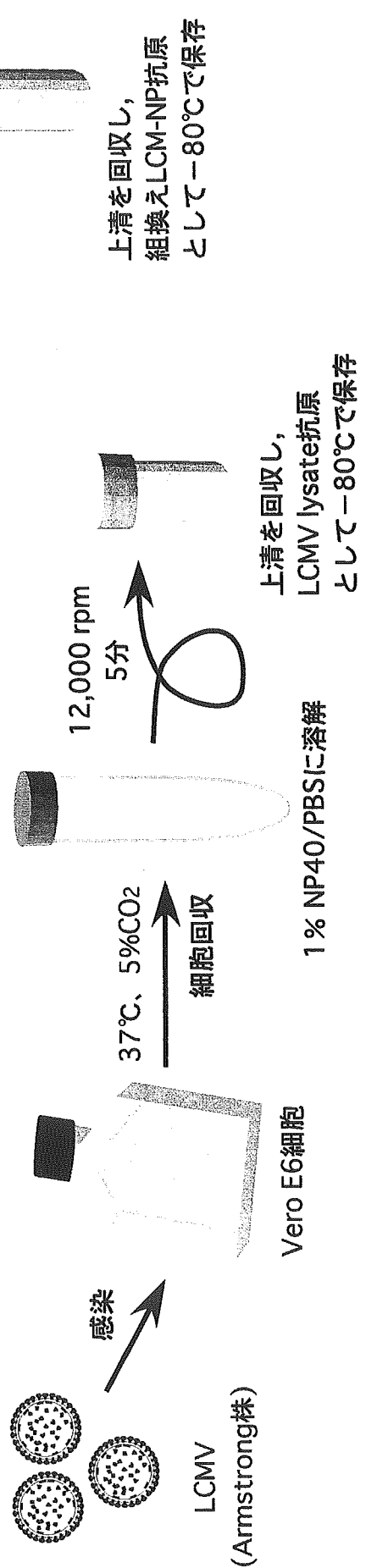


検査したのは
バリア施設の動物
C-939の産子の里親
C-887の産子の里親
C-1103の産子

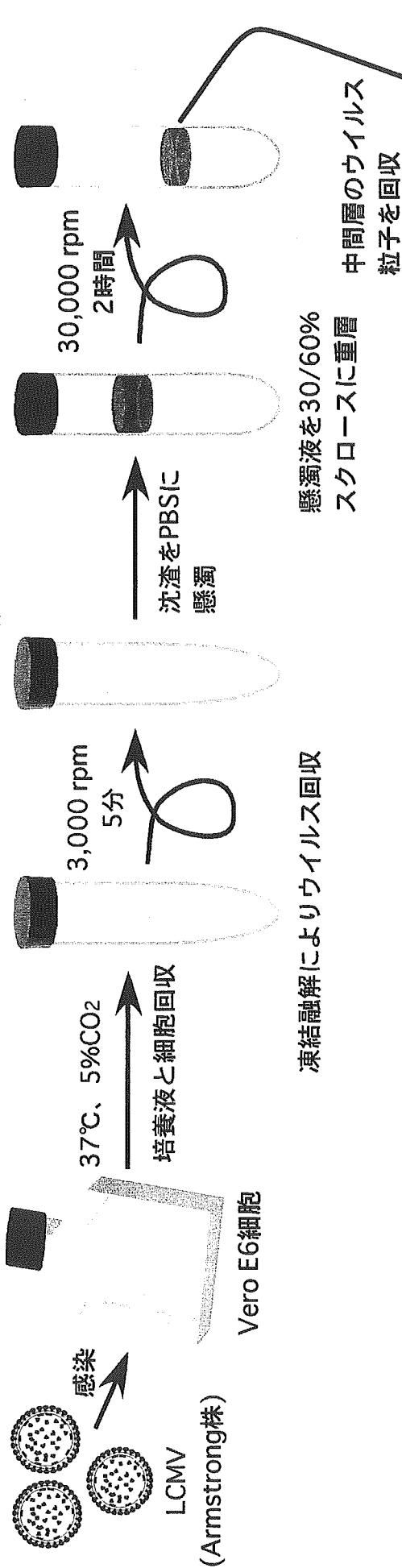
[組換えLCM-NP抗原の作製]



[LCMV lysate抗原の作製]

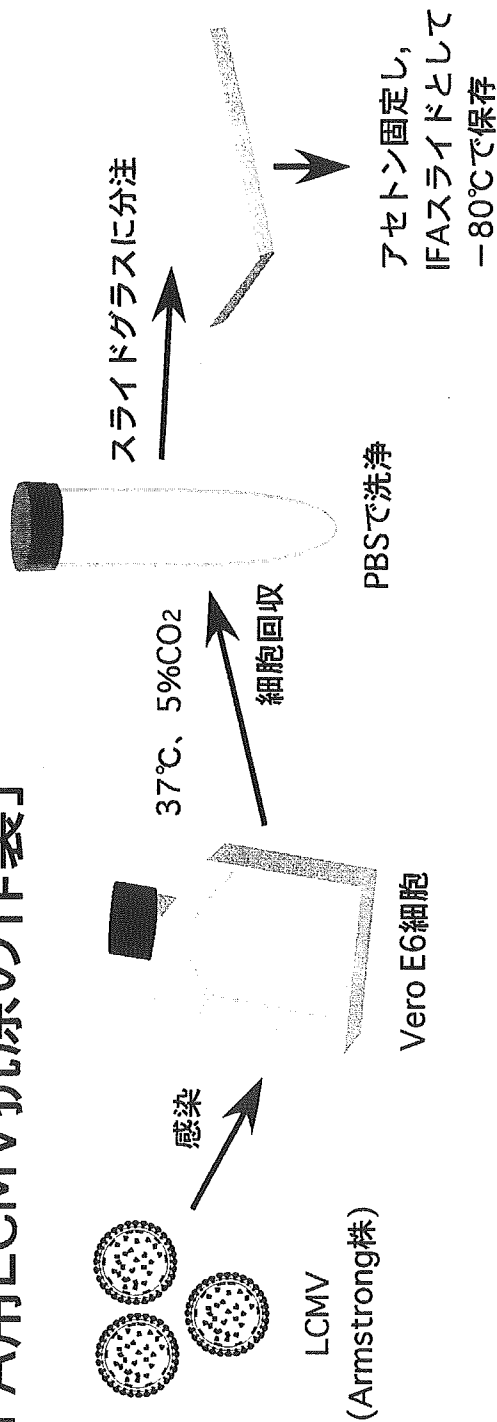


[精製LCMV抗原の作製]



1%NP40/PBSに溶解し、精製LCMV抗原として-80°Cで保存

[IFA用LCMV抗原の作製]



ELISA、IFAおよびRT-PCRによるLCMV検査結果

組換えLCM-NP抗原	ELISA		IFA	RT-PCR	帝王切開時の里親 BALB/c-nu/+ (RT-PCRは実施せず)	帝王切開で 得られた産子	産子と同居させた BALB/c-nu/+	バリア施設の 他系統マウス
	+	-						
+	+		+	+	0	2	0	0
+	+		+	-	2	0	0	0
+	-		+	+	0	1	0	0
+	-		-	+	0	5	0	0
+	-		-	-	0	0	0	4
-	-		+	+	0	1	0	0
-	-		+	-	0	0	1	0
-	-		-	+	0	13	0	0
-	-		-	-	0	0	2	12
合計					2	22	3	16