

95%Air)し、胚盤胞への発生を観察した。

(3) 近交系ラットからの採卵

SHR系およびLEW系の成熟メス(9~14週齢)を用い、それぞれ無処理自然排卵群とホルモン処理群に分けて採卵成績を比較した。すなわち、自然排卵群は発情前期に同系成熟オスと同居させ、ホルモン処理群は発情後期にPMSG 150 i.u./kg(B.W.)を投与し、48時間後にhCG 75i.u./kg(B.W.)を投与した後に、オスと同居させた。同居の翌日に交尾の有無を確認し、2日後にPB1溶液のフラッシングにより、卵管から卵を回収した。LEW系では性周期が不安定になる個体の割合が多く、自然排卵群においては常時オスと同居させ、交尾が確認されたものから採卵した。

(倫理面への配慮)

すべての動物実験は新潟大学動物実験指針ならびに動物実験規則に則り実施した。

C. 研究結果

(1) 幼若Wistarラットからの採卵

4週齢(PMSG 50-250i.u./kg)、5週齢(PMSG 100-250i.u./kg)および6週齢(PMSG 200-350i.u./kg)の幼若ラットにおいて最も平均排卵数の多かったPMSG投与量(平均排卵数)は、それぞれ200i.u.(36.0個)、250i.u.(45.2個)および200i.u.(36.2個)であった。また、ホルモン処理個体数に対する排卵個体数の割合は、それぞれ67-100%、75-100%および66-100%と各週齢とも少数ではあるが、排卵しない個体がみられた。一方、幼若群の対照として過排卵処理を行った12週齢成熟ラット(PMSG 50-250i.u./kg)において

最も平均排卵数の多かったPMSG投与量(平均排卵数)およびホルモン処理個体数に対する排卵個体数の割合は、それぞれ250i.u.(34.1個)、83-100%であった。幼若の各週齢とも成熟個体と同等以上の排卵数が得られた。

(2) 過排卵誘起幼若ラット由来2細胞期胚の培養

採卵時、形態的に良好であった164個の2細胞期胚を培養し、胚盤胞に発生した割合は75%(123/164)であった。

(3) 近交系ラットからの採卵

無処理自然排卵群における平均排卵数および受精率は、SHR系でそれぞれ9.6個、98.7%、LEW系でそれぞれ8.2個、75.0%と平均排卵数に大きな差はみられなかったが、受精率はLEW系の方が低かった。また、SHR系のホルモン処理群における平均排卵数および受精率は、それぞれ41.8個、61.7%と自然排卵群に比較し、受精率が低下したものの、排卵数は4.3倍に増加し、受精卵数も2倍以上であった。一方、LEW系ではほとんどの個体がホルモン処理を行っても交尾しないか、あるいは交尾しても排卵せず、受精卵は得られなかった。

D. 考察

4~6週齢のWistar系幼若ラットのホルモン処理により、成熟ラットと同等もしくはそれ以上の数の排卵(自然排卵数の3~4倍)がみられ、初期発生能においても良好な成績を得た。PMSG投与量は200~250i.u.が適量と思われるが、排卵数にかなりのバラツキがみられ、全く排卵しない個体もいることから、これまでのところ、各

週齢における PMSG-hCG 投与量の最適な組み合わせは明らかとなっていない。今回用いた系統が繁殖性の良いクローズドコロニーであったため、ホルモン処理に対して良好な成績が得られたものと考えられるが、今後は他のクローズドコロニーや近交系ラットへの応用についても検討する必要がある。排卵に関する系統特性を明らかにするため、SHR 系と LEW 系の近交系 2 系統の成熟個体にホルモン処理を行い、自然排卵と比較した。SHR 系ではホルモン処理により、自然排卵の 4 倍に当たる排卵数が得られた。また、高週齢(20~22 週齢)になっても自然排卵における排卵数と受精率の低下は認められず、ホルモン処理による誘起排卵においては排卵数の低下が認められたものの、受精率は低下しなかった。一方、対照的に LEW 系ではホルモン処理が無効であり、高週齢になっても同様であった。近交系の中にはホルモン低感受性系統と高感受性系統が存在することが示唆された。

E. 結論

週齢に応じた適切なホルモン投与量を選択することによって、幼若ラットからの効率的採卵が可能であることが確認された。採取した受精卵を培養した結果、正常な発生能を有することが示唆された。これらの結果は、ラットの生殖工学における基盤技術の構築に寄与するものと考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ono, R., Nakamura, K., Inoue, K., Naruse, M., Usami, T., Wakisaka-Saito, N., Hino, T., Suzuki-Migishima, R., Ogonuki, N., Miki, H., Ogura, A., Yokoyama, M., Kaneko-Ishino, T. and Ishino, F.: Deletion of Peg10, an imprinted gene acquired from a retrotransposon, causes early embryonic lethality. Nat Genet. 38:101-106.2006.

2) Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N.:Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. Nature. 441:885-889, 2006

3) Migishima F, Suzuki-Migishima R, Quintero RB, Yokoyama M, Behr BR.: Successful pregnancies after transplantation of frozen-thawed mouse ovaries into chimeric mice that received lethal-dose radiation. Fertility and Sterility. 86:1080-1087, 2006

4) Narai, S., Kodama, Y., Maeda, Y., Yokoyama, M., Takagi, R. and Kominami, R.: Trp53 affects the developmental anomaly of clefts of the palate in irradiated mouse embryos but not clefts of the lip with or without the palate. Radiat. Res., 166:877-882, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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。本研究では採取する卵子の高品質化を目指して品質（発生能）に影響を与える分子（遺伝子・蛋白質・microRNA）の探索を行った。

A. 研究目的

近年、疾患モデル動物の作出や系統保存が疾病研究に非常に重要となっており、配偶子の高品質化や採取法の効率化が求められている。卵巣内には多量の卵子が存在しており、この卵巣内卵子から高品質な（＝発生能が高い）成熟卵子を効率良く得る方法が開発できれば、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。そこで幼若マウスの初回卵胞発育由来体外成熟卵子の発生能の差（既に確認済み）を元に、卵巣レベル、卵子レベルのmicroRNA, mRNA, 蛋白質の組成・量の関係をアレイ等で調べることによって発生能に関与する分子の探索を行った。

B. 研究方法

1) 体外成熟卵子の作成

Waymouth培地にピルビン酸 (0.23 mM), 抗生物質, ポリビニルピロリドン (3 mg/mL), ヒト卵胞刺激ホルモン (リコンビナント, 0.5 iu/mL) を添加した培地を用いてBDF1系幼若マウス卵巣より得た卵子卵丘細胞複合体を17~18時間培養することにより、成熟卵子（＝卵核胞崩壊卵子）を得た。

2) オリゴDNAアレイによる解析

17日齢と24日齢雌より得られた体外成熟卵子（それぞれ803個と784個）をTrizol (Invitrogen) にてRNAを抽出後、T7-Based RNA増幅を2段階行ってRNAを増幅した後、Filgen Oligo DNA array Mouse 32K（プローブ数：31,769）により2色比較による発現パターンの比較を行った。

3) 卵子蛋白質の二次元電気泳動プロファイリング

17日齢から25日齢の9つの日齢の雌から得られた体外成熟卵子（200~400個）をReadyPrep 2D Starter kit (Bio-Rad) を用いて二次元電気泳動 (pH3-10で等電点電気泳動後、幅8cm x 長さ7.3cmの10-20%のグラディエントゲルでSDS-PAGE) を行い、SYPRO Ruby染色した像を観察した。いくつかのスポットについてはPeptide Mass Fingerprinting分析により、蛋白質を同定した。

4) 卵巣microRNAのアレイ解析

17日齢と24日齢雌から約50mgの卵巣を集め、それぞれTrizolによりTotal RNAを抽出し、さらにmicroRNAを分取した後、Filgen Array miRNA384を用いて2色比較を行った。

5) 卵子microRNAのクローニング

C57BL/6CrSlc (21日齢雌) 由来体外成熟卵子 (693個)

から200塩基長以下のRNAを抽出し (miRNeasy, QIAGEN), Small RNA cloning kit (タカラバイオ) によりmicroRNAのクローニングを試みた。

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) オリゴDNAアレイによる解析

17日齢由来卵子 (低発生能) に比べ24日齢由来卵子 (高発生能) では、4倍以上の発現しているものが4遺伝子、3~4倍以上が21遺伝子であった。特に転写因子、代謝、細胞膜/核膜関連、糖鎖修飾などが増加していた。一方、4分の1以上低い発現を示したものは4遺伝子、3分の1以下は24遺伝子であった。そのうち、15遺伝子がリボソーム蛋白質遺伝子であった。

2) 卵子蛋白質の二次元電気泳動プロファイリング

9つの日齢毎 (17日齢から25日齢由来) の二次元電気泳動プロファイルを得た。それら日齢を通して高い発現を示しているものとしてLactate dehydrogenase B (分子量37kDa, pI=5.7) など7スポットの蛋白質を質量分析にて同定した。また、17日齢と24日齢由来卵子のスポット比較から差次的発現が見られるスポットの蛋白質について質量分析を行ったが、同定には至らなかった。

3) 卵巣microRNAのアレイ解析

卵巣レベルでは17日齢卵巣に比べ24日齢卵巣で1.5倍以上のmicroRNAが11種、3分の1以下のmicroRNAが8種あることがわかった。

4) 卵子microRNAのクローニング

得られた113クローンのうち、18~25塩基長のは10種類 (23クローン) であった。既知のmicroRNAとは一致しておらず新規microRNAの可能性もあるが、マウスゲノムデータベース検索ではマウスゲノム上に完全一致する配列が見つからないことから、さらに検討を要すると思われる。

D. 考察

本研究では発生能に関与する分子を探索するため、幼若マウスの初回卵胞発育から得た体外成熟卵子を用いて、卵子内のmRNA, 蛋白質, microRNAの動態について調べた。まずオリゴDNAアレイによりmRNAの変化のリストを作成したが、一般的傾向がつかみにくく、検討と定量PCR等の検証を要すると思われる。次に蛋白質の二次元

プロファイリングにより、調べた全期間を通して強発現している蛋白質の同定を行った。今後二次元プロファイリングを行う上でLandmark的に使えるものと思われる。一方、発生能に関与するであろう差次的発現蛋白質については質量分析に適用可能な蛋白量を得ることが難しかった。microRNAについては、まず卵巣レベルで関与の可能性を確認し、そのうえで卵子におけるmicroRNAをクローニングした。得られたmicroRNAは既知のものとは一致せず、卵子特異的な新規microRNAの可能性もあるが、これもさらなる検討が必要であろう。

一連の分子検索を行った上で気づいた点として、「刻々と変化する対象を比較する困難さ」を痛感した。つまり、培養細胞や臓器などでは、おそらくmRNAや蛋白質等の構成成分の状態は定常状態にあると思われる、mRNAと蛋白質の分布の関係も整合性が取りやすいと思われるが、発育卵胞内の卵子に含まれるmRNAや蛋白質等の構成成分の状態は卵胞発育とともに刻々と変化しており、mRNAの構成と蛋白質の構成とは必ずしも一致しない可能性が高い。それ故、mRNAの分布・構成がすぐさま蛋白質の分布・構成に反映しないと考えられる。データの解釈にはこれらを考慮する必要がある。

E. 結語

本研究では採取する卵子の高品質化を目指して品質（発生能）に影響を与える分子（遺伝子・蛋白質・microRNA）の探索を行い、差次的に発現される遺伝子のリストが得られた。蛋白質についても強発現分子のリストを得たが、量的問題から差次的蛋白質については同定できなかった。卵子に存在するmicroRNAも同定した。ただし、これら分子と卵子発生能との関連についての検証・解釈にはさらなる研究が必要と思われる。

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, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Analyses of the cDNA and genomic DNA sequences encoding the luteinizing hormone β -subunit precursor protein in the rabbit. *Gen Comp Endocrinol.* 2007, 150(3):514-9.
- Kawai Y, Hata T, **Suzuki O**, Matsuda J. The relationship between sperm morphology and in vitro fertilization ability in mice. *J Reprod Dev.* 2006, 52(4):561-8.
- Noguchi Y, Takano K, Koura M, Uchio-Yamada K, Matsuda J, **Suzuki O**. Sequence analysis of cDNA encoding rabbit follicle-stimulating hormone β -subunit precursor protein. *Gen Comp Endocrinol.* 2006, 147(2):231-5.
- **鈴木治**, 卵子発育, 日本臨牀, 2006, 64 Suppl 4:174-8.
- **鈴木治**, 各種実験動物の性腺刺激ホルモン配列比較と過排卵技術の改良, 関西実験動物研究会会報, 2006, 27:72-75

2) 学会発表

- **鈴木治**, 小浦美奈子, 高野 薫, 野口洋子, 山田-内尾こずえ, 松田潤一郎, 「心拡張を呈するシアル酸転移酵素多発現マウスの心臓糖蛋白質の解析」, 日本実験動物学会, 2006年5月, 神戸

- 河合康洋, 鈴木治, 松田潤一郎, 「マウスの精子の細胞質小滴におけるユビキチンの発現」, 日本実験動物学会, 2006年5月, 神戸
- **鈴木治** 「各種実験動物の性腺刺激ホルモン配列比較と過排卵技術の改良」, 関西実験動物研究会, 2006年6月, 大阪
- 小浦美奈子, 高野 薫, 野口 洋子, 山田-内尾 こずえ, 松田潤一郎, **鈴木治**, 「シリアンハムスターの卵巣移植による産仔の作出」, 日本繁殖生物学会, 2006年9月, 名古屋
- **鈴木治** 「生殖工学における基礎的な統計処理」, 日本実験動物技術者協会関東支部 REG 部会, 2006年11月, 東京
- **Suzuki O**, Koura M, Takano K, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Tissue difference of protein sialylation in transgenic mice harboring Gal β 1,3GalNAc α 2,3-sialyltransferase II (ST3GalII) transgenes. Annual meeting of American Society for Molecular Biology and Biochemistry, April 2006, San Francisco, USA
- **Suzuki O**, Koura M, Takano K, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Sequence comparison of α - and β -subunit precursor proteins of follicle-stimulating hormones in laboratory animals, 88th annual meeting of the Endocrine Society, June 2006, Boston, USA.
- **Suzuki O**, Koura M, Takano K, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Sequence comparison of α - and β -subunit precursor proteins of luteinizing hormones in laboratory animals. the 39th annual meeting of the society for the Study of Reproduction, Omaha, USA, July 2006.
- **Suzuki O**, Koura M, Takano K, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. MicroRNA profiling of ovaries during the first wave of folliculogenesis in mice. 46th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, San Diego, USA, December 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

鈴木治と国立循環器センター岩田祐子先生との共同発明（特許申請）「筋障害の簡便検査方法および筋障害検査用キット」, 特願2006 - 114385, (独)医薬基盤研究所のTLO機関であるヒューマンサイエンス財団に譲渡の上, 申請中

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、今年には特にマウスおよびウサギ卵子のガラス化凍結保存、核移植クローン胚の技術開発、卵子胎外発育系の実験を行った。マウス卵子は、単為発生を指標に条件検討を行い、多数の近交系マウスへの応用を可能にした。核移植クローンでは、胚性遺伝子発現の解析を行い、最上流の転写因子遺伝子の異常を明らかにした。また、マウス卵子を指示細胞非存在下で体外で卵子特異的ゲノム刷込みが生じるまで発育させることに成功した。

A. 研究目的

顕微授精技術・核移植クローン技術や胚・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。今年度は特に1) マウス卵子のガラス化凍結保存、2) 核移植クローン胚の技術開発、3) 卵子胎外発育系の開発を行った。

B. 研究方法

1) マウス卵子のガラス化凍結保存技術の開発：マウスおよびウサギから成熟未受精卵（マウス：hCG投与後15-17時間、ウサギ：13-15時間）を採取し、酵素処理により卵丘細胞を除去して用いた。ガラス化保存は、8% ethylene glycol (EG) +8% DMSO-PB1（平衡液）に1、3または5分間平衡させてから、16% EG+16% DMSO+10 mg/ml Ficoll+0.65 M sucrose-PB1（ガラス化液）に1分間平衡後、液体窒素に直接浸漬して行った。加温は室温の0.25、0.5、0.75、1.0 M sucrose-PB1で行ない、回収後マウス卵では活性化処理（2.5-10 mM SrCl₂、0.5-2.5時間）により単為発生（haploidまたはdiploid）を誘起し、CZB培養液中での発育を120時間後まで観察することで適したガラス化・加温条件を検討した。更に、ICSIにより胚を作出し、個体への発生能を確認した。同様にガラス化したウサギ卵でも加温後ICSIを行い、RD培養液中で体外での発育を観察した。

2) 核移植胚の遺伝子発現解析：安定して異常を生じる体細胞核移植クローン技術を利用することにより体細胞ゲノムと（正常に再プログラム化される）生殖細胞ゲノムの相違が明らかされるはずであるとの前提のもとに、マウスの初期胚を解析対象とした。マウスの胚性遺伝子の発現は小規模ながら1-cell後期から始まる。Wakayamaらのマウス核移植クローン技術を応用する限り、この

タイミングと全体的な転写活性については大きな異常は生じない。よって我々は2-cellに始まる major zygotic gene activation (ZGA)の遺伝子発現パターンをドナーゲノムの再プログラム化の指標とした。各遺伝子の発現量解析では、1個の胚で安定して発現が定量できるDppa2、Dppa3、Dppa4、ERV-L、eIF-1A、Hdac1を解析した。常法通り、核移植を実施し、卵子活性化後24時間に各胚よりmRNA抽出、そしてcDNAを合成し、それをリアルタイムPCR法により、Gpdhを内部標準にして定量化した。

3) マウス卵子の体外発育系の開発：マウス新生仔卵巣を摘出し、酵素処理と物理的作用により解離してLIFを含むES細胞用の無血清培地を用いて培養を開始した。顆粒膜細胞などの体細胞成分が消失した後に、さまざまな成長因子を添加し、遺伝子発現、精子との膜融合能、刷込み遺伝子のメチル化パターン（bisulfite法）を解析した。

（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) マウス卵子のガラス化凍結保存技術の開発：BDF1未受精卵を3つの保存容器（cryotube、straw、cryotop）でガラス化・加温後にしたところ、cryotopで最良の結果が得られ（分割率85%、胚盤胞率54%）、以降の実験ではcryotopを用いた。BDF1卵を1-5分間の平衡液浸漬後にガラス化保存し、0.25-1.0 M sucrose-PB1で加温・回収した場合、生存率90-100%、分割率71-93%（新鮮卵子では97%）、胚盤胞率45-62%（同72%）であり、平衡液浸漬時間と加温の際のsucrose濃度は、回収後の生存性と発生に影響しなかった。C57BL/6、C3H/He、BALB/c、DBA/2の近交系マウスでは10 mM SrCl₂、2.5時間感作による活性化が効果的で

あり、平衡液浸漬時間 1-5 分、sucrose 濃度 0.5M でガラス化および加温後、diploid で単為発生させたところ、高い生存率（全ての系統・群で 98-100%）と分割率（平衡時間 3 分ではすべての系統で 92-99%）を示した。胚盤胞率は系統差が認められた。更にガラス化保存したマウス卵から同系統の凍結精子を用いた ICSI により、すべての系統で正常な産子が得られ、個体への発生能を有していることを確認した。また、ガラス化保存したウサギ卵と新鮮精子を用い、ICSI によって作出した胚を体外培養することにより、胚盤胞への発生を確認した。

2) 核移植胚の遺伝子発現解析：

体細胞クローン胚における Dppa2、Dppa3、Dppa4、ERV-L、eIF-1A、Hdac1 の発現を IVF コントロール胚と比較すると、いずれの遺伝子の発現量も遺伝子型（B6D2F1 および B6x129）およびドナー細胞種（卵丘細胞、線維芽細胞、神経幹細胞、造血幹細胞、始原生殖細胞）に依存して変化しており、そのパターンは 4-cell 以降の胚発生率や産子率と関連する傾向が見られた。最も低い発生率を示す造血幹細胞クローンはこれらの 6 つの遺伝子のうち 5 つの遺伝子で発現が低下していた。標準的なマウス体細胞クローンである B6D2F1 卵丘細胞クローンでは 4 つの遺伝子で発現が低下しており、一方良好な発生を示す B6x129 神経幹細胞クローンでは 1 つの遺伝子のみ有意に発現異常が見られた。興味深いことに始原生殖細胞 (PGC) クローンは、胎齢後期の PGC 由来になると徐々に発現が改善する傾向が見られ、ゲノム再プログラム化が正常に行われるようになることが示唆された。また、クローンに共通して低下する eIF-1A (initiation factor) の上流にある転写因子を明らかにし、統計学的な解析により、これらの発現異常が、総体的にクローン胚の異常に繋がることを示唆された。

3) マウス卵子の体外発育系の開発：

マウス新生仔卵巣を摘出し、酵素処理と物理的作用により解離して LIF を含む ES 細胞用の無血清培地を用いて培養を開始した。この培地に stem cell factor を添加したところ、コロニーから体細胞と相互作用していない裸の発育期卵子が多数発生した (500~1000 個/卵巣)。この卵子は stem cell factor の濃度依存的にコロニーから発生し、培養日数に応じて発育した。最近、卵子の幹細胞が生後のマウスにも存在し、分裂・分化しているという報告があるが、この卵子は BrdU を取り込まない事から培養中に幹細胞から分化したものである可能性は低い。この卵子は卵巣の体細胞コロニーと共培養することにより発育が促進され、顆粒膜細胞との複合体を形成しないまま、直径約 50~60 μm に達し明瞭な透明帯を持つまでに成長した。また、これら卵子は精子との融合能を有

していた。培地に血清を加えて培養したところ、卵子の大きさに依存したインプリント遺伝子 (Igf2r と Zac1) のメチル化も確認された。最終的には 70 μm 程度にまで成長する卵子も見られるようになるが、培養開始から 30 日ほどで退行像を示す卵子が増加した。以上のように、マウス新生仔卵巣から多数の発育期卵子を効率的に誘出し、顆粒膜細胞非依存的に液性因子のみで発育させることに成功した。

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。これらは核移植クローンや顕微授精技術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、卵子凍結保存と顕微授精技術の補助により、これらのマウス遺伝子 (卵子) を簡易に凍結保存できることが示された。特に、主な近交系で同系統の精子を用いて、産子が安定して得られたことは、今後の応用に期待されると言える。一方、ウサギの凍結卵子は、顕微授精後に胚盤胞へ高率に発生するが、まだ産子は得られていない (レシピエント雌数 = 2)。一般にウサギは胚移植後の妊娠率が必ずしも高くないので、さらに例数を増やして検討を行う予定である。

本研究のもう一つの課題である、核移植クローンは、相変わらず低効率に悩まされている。これは哺乳類の体の中で体細胞ゲノムと生殖細胞ゲノムが想像以上に極めて明確な形で区別されていることを示している。ということは逆に、この安定して異常を生じる体細胞核移植クローン技術を利用することにより体細胞ゲノムと (正常に再プログラム化される) 生殖細胞ゲノムの相違が明らかされるはずである。これまでの多くの核移植実験の結果を顧みるとこの問題点の理解への近道はおそらく、1) genetic な要因をできる限り排除して epigenetic な要因に限定でき、2) ランダムでなく定型的な異常であり、そして 3) 発生のできるだけ初期に現れる現象の解析にある。これらの条件を満たす解析対象の一つがマウスの初期胚である。今年度は、最初に major な胚性遺伝子の発現が開始される 2 細胞期で解析を行うことにより、最上流にある転写因子群の遺伝子発現が低下していることを明らかにした。今後は、この転写因子群の mRNA を注入するなどにより、その重要性を確認する予定である。

マウス新生仔卵巣には数千個の未発育卵子 (卵母細胞) が存在しており、性成熟と共に卵胞を形成して発育・成熟する。この系を体外で再現でき

れば、卵発育・細胞死および減数分裂の機序解析が可能になるだけでなく、動物やヒトの補助生殖への応用も期待できる。そこで今年度は、マウス未発育卵子の体外発育の新たな実験系確立を試みた。培養条件を整えることにより、マウス新生仔卵巣から多数の発育期卵子を効率的に誘出し、顆粒膜細胞非依存的に液性因子のみで発育させることに成功した。今後はより最適な培養条件を検討しつつ、顆粒膜細胞非依存的に発育・成熟させた卵子の胚発生能も解析したい。

E. 結論

マウス卵子のガラス化凍結保存は、単為発生を指標に条件検討を行い、多数の近交系マウスへの応用を可能にした。核移植クローンでは、胚性遺伝子発現の解析を行い、最上流の転写因子遺伝子の異常を明らかにした。また、マウス卵子を指示細胞非存在下で体外で卵子特異的ゲノム刷込みが生じるまで発育させることに成功した。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, Noda S, Ogonuki N, Miki H, Inoue S, Katayama K, Mekada K, Miyoshi H, Ogura A. Differential developmental ability of embryos cloned from tissue-specific stem cells. **Stem Cells**, (in press)
2. Takehashi M, Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Toyokuni S, Ogura A, Shinohara T. Adenovirus-mediated gene delivery into mouse spermatogonial stem cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, 104: 2596-2601, 2007
3. Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Yoshida S, Toyokuni S, Lee J, Ogura A, Shinohara T. Leukemia inhibitory factor enhances formation of germ cell colonies in neonatal mouse testis culture. **Biol Reprod** 76: 55-62, 2007
5. Ogonuki N, Mochida K, Miki H, Inoue K, Fray M, Iwaki T, Moriwaki K, Obata Y, Morozumi K, Yanagimachi R, Ogura A. Spermatozoa and spermatids retrieved from frozen reproductive organs or frozen whole bodies of male mice can produce normal offspring. **Proc Natl Acad Sci USA**, 103: 13098-13103, 2006
8. Shinmen A, Honda A, Ohkawa M, Hirose M, Ogonuki N, Yuzuriha M, Miki H, Mochida K, Inoue K, Abe K, Ito M, Ogura A. Efficient

production of intersubspecific hybrid mice and embryonic stem cells by intracytoplasmic sperm injection. **Mol Reprod Dev** (in press)

11. Kanatsu-Shinohara M, Ikawa M, Takehashi M, Ogonuki N, Miki H, Inoue K, Kazuki Y, Lee J, Toyokuni S, Oshimura M, Ogura A, Shinohara T. Production of knockout mice by random or targeted mutagenesis in spermatogonial stem cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, 103:8018-8023, 2006.
12. Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Miki H, Ogonuki N, Takehashi M, Morimoto T, Ogura A, Shinohara T. Clonal Origin of Germ Cell Colonies after Spermatogonial Transplantation in Mice. **Biol Reprod**, 75:68-74, 2006

2. 学会発表

(国際会議等)

1. Inoue K . ,Ogonuki N . ,Miki H . ,Noda S . ,Inoue S . ,Katayama K . ,Mekada K . ,Miyoshi H . ,and Ogura A . : "Differential developmental ability of embryos cloned from tissue-specific stem cells", 33rd Annual Conference of International Embryo Transfer Society , Kyoto , Jan. (2007).
2. Ogura A . : "Microinsemination using male germ cells", 10th International Symposium on Spermatology , Madrid , Spain , Sept. (2006).
3. Ogonuki N . ,Mochida K . ,Miki H . ,Inoue K . ,Iwaki T . ,Morozumi K . ,Yanagimachi R . ,and Ogura A . : "ICSI using male germ cells retrieved from reproductive organs and whole bodies stored in freezers", Cell Signaling in Gamete Activation: from Basic Research to ART , (Tokyo Women's Medical University), Tokyo , Nov. (2006).
4. Ogura A . ,Inoue K . ,Ogonuki N . ,and Miki H . : "Differential cloning efficiency following NT using different donor cell types and genotypes in mice", 3rd Annual Conference of Asian Reproductive Biotechnology Society, 2006 , Hanoi , Vietnam , Nov. (2006).
5. Ogonuki N . ,Mochida K . ,Miki H . ,Inoue K . ,Iwaki T . ,Morozumi K . ,Yanagimachi R . ,and Ogura A . : "Spermatozoa retrieved from male mice frozen for 15 years can produce normal offspring", The Annual Conference of the International Embryo Transfer Society , Kyoto , Jan. (2007).

(国内会議等)

1. 井上 貴美子,越後貫 成美,三木 洋美,野田 慎

- 一,井上 信一,形山 和史,目加田 和之,三好 浩之,小倉 淳郎: "マウス交雑系(C57BL6x129/Sv-ter)F1由来組織幹細胞クローンの発効率の比較", 第54回日本実験動物学会総会, (社団法人日本実験動物学会), 東京, 5月(2007).
2. 小倉 淳郎: "実験動物の核移植クローンの意義とその現状", 第24回日本ヒト細胞学会, 東京, 7月(2006).
3. 小倉 淳郎: "哺乳類における生殖細胞の特殊性について", 第99回大会日本繁殖生物学会, 名古屋, 9月(2006).
4. 小倉 淳郎: "実験動物のクローン研究の現状について", 第25回未来医療セミナー, (大阪大学医学部未来医療センター), 大阪, 10月(2006).
5. 小倉 淳郎: "実験動物の核移植クローンから何がわかるか", 近畿大学21世紀COEプログラム「食資源動物分子工学研究拠点」第7回国際シンポジウム, 泉佐野市, 12月(2006).
6. 小倉 淳郎: "実験動物の生殖工学技術の現状と今後の可能性", 東京大学疾患生命工学センターセミナー, 東京, 12月(2006).

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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 の効率を上げる新規手法の開発を試み、雌雄キメラマウスに着目した実験を行なった。X-GFP マウスを用いることにより選別した、雌の胚盤胞を受容卵として ES細胞を打ち込んで、作製したキメラマウスの雄からは ES細胞由来の仔のみが誕生することが確かめられた。さらに、顕微授精を併用することによって、未成熟なキメラマウスや不妊となったキメラマウスから ES細胞由来のアレルを持つ仔を作出し、ノックアウトマウス作製における、効率化・迅速化の可能性を示した。

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)になるまで培養した。胚盤胞は蛍光実体顕微鏡を用いて、GFP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XY型の性染色体を持つES細胞(D3-ESまたは、pCXN-mtDsRed2遺伝子を持つD3-ES)はFHM中で、ピエゾドライブ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。

ES細胞の germline transmission は、BDF1の雌とESキメラマウスを交配させて得られる、胚盤胞期のDsRed2蛍光もしくは、産仔の毛色(アグーチ)によって判定した。

顕微授精はBDF1の未受精卵にESキメラの精子または、精子細胞を注入し、翌日まで培養し、2細胞期胚になったものを妊娠0.5日目の偽妊娠マウスに移植した。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。

(倫理面への配慮)

実験動物としてマウスを使用するが、大阪大学の動物実験規則にのっとり、実験計画の審査を受けた上で実施した。

C. 研究結果

雄の雌雄キメラでは雌性由来の細胞は精子にならない。従って、雌性胚に雄性の ES 細胞を注入して作製した ES 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。実際にそのようになるかどうかを検討した。

胚盤胞の雌雄を識別するために、全身から GFP を発現するようなトランスジーンを X 染色体上にもつ雄の“X-GFP マウス”を用いた。GFP 蛍光によって光る雌性と判定された胚を選び、雄性の ES 細胞を注入して雌雄キメラ胚を作製した。雌の胚盤胞に D3-ES を注入した計 106 個の胚を移植したところ、計 11 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 キメラマウスの性は 10 匹が雄、1 匹が雌で、ほとんどは雄として誕生することが分かった。雄性胚を用いて作製した ES キメラマウスの誕生率と顕著な差は見られなかった。

雌性胚を用いて作製した雄のキメラマウスの ES 由来アレルの germline transmission 効率を評価した結果、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 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。

また、円形精子細胞を用いた顕微授精によって 3 週齢という精子を持たないような未熟なキメラマウスからも効率的に、ES 細胞由来のアレルを持つ産仔が得られた。

雄の XX \leftrightarrow XY ES キメラマウスから得られる産仔や受精卵は 100% ES 細胞由来のアレルを持つことが分かったが、しばしば、交配しても仔が全く得られなかったり、受精卵が得られな

かったりするケースが見られた。このようなケースは雄性胚に ES 細胞を注入して作製した ES キメラマウスよりも、雌性胚を用いたときに多く見られた。このことをヒントにノックアウトマウス作製のために定法で作られたものの、全く仔が得られない ES キメラマウスを用い、精巣内に精子または、精子細胞が存在していたものについて、顕微授精を行ったところ、15 例中 9 例において、ES 細胞由来のアレルを持つ産仔が得られ、ES 細胞の germline transmission をレスキューできる可能性を示した。

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、理論どおりに生まれたキメラが仔を産ませることができれば、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ったが、今回、顕微授精によって、レスキューできる可能性を示した。このことにより、組み換えアレルを持つ ES 細胞をまた作り直し、キメラマウスを作製するという多大な労力と時間を減らすことができるかもしれない。

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た。
- ② 胚盤胞を雌胚、雄胚どちらを用いても ES キメラマウスの誕生率、成長率に顕著な差は見られなかった。
- ③ 雌胚と ES 細胞からなるキメラマウスの雄からは ES 細胞由来のアレルを持つ仔だけが

誕生した。

- ④ 未成熟な ES キメラマウスから効率よく ES 細胞由来のアレルを持つ仔が得られた。
- ⑤ 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が、顕微授精によって、germline transmission をレスキューできる可能性を示した。
- ⑥ 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

Complementation of placental defects and embryonic lethality by trophoblast-specific lentiviral gene transfer, Y. Okada, Y. Ueshin, A. Isotani, T. Saito-Fujita, H. Nakashima, K. Kimura, A. Mizoguchi, M. Oh-Hora, Y. Mori, M. Ogata, R. G. Oshima, M. Okabe and M. Ikawa, *Nat Biotechnol*, 25(2), 233-7, 2007

Aberrant Distribution of ADAM3 in Sperm from Both Angiotensin-Converting Enzyme (Ace)- and Calmegin (Clgn)-Deficient Mice, R. Yamaguchi, K. Yamagata, M. Ikawa, S. B. Moss and M. Okabe, *Biol Reprod*, 75(5), 760-6, 2006

受精のメカニズム -イズモを中心に卵子と精子の結合に必要な因子とその異常に関連した受精異常について-, 井上 直和, 伊川 正人, 岡部 勝, *産科と婦人科*, 73(6), 735-42, 2006

受精の膜融合における必須分子Izumoの同定, 井上 直和, 岡部 勝, *Medical Science Digest*, 32(10), 416-7, 2006

遺伝子操作マウスを用いて見る卵子と精子の

相互作用, 岡部 勝, *生化学*, 78(11), 1062-72, 2006

精子の成熟と受精能獲得, 岡部 勝, *新編精子学*(編者:森沢 正昭, 星 和彦, 岡部 勝), 153-173, 2006

2. 学会発表

遺伝子操作マウスが明らかにする受精のメカニズム, 岡部 勝, 大阪薬科大学ハイテク・リサーチ・センター平成18年度公開シンポジウム (大阪), 2006年12月9日

遺伝子改変動物を通してみる性決定や受精のメカニズム, 岡部 勝, 井上 直和, 磯谷 綾子, 小林 慎, 山口 亮, 伊川 正人, 第23回日本疾患モデル学会総会 (群馬), 2006年11月30日-12月1日

Observation of sperm-egg interaction through gene-manipulated animals, Masaru Okabe, International Symposium "Cell signaling in gamete activation: from basic research to ART" (Tokyo), 2006/11/13-15

Sperm-egg interaction examined by gene-manipulated mouse lines, Masaru Okabe, 10th International Symposium on Spermatology (Madrid, Spain), 2006/9/17-22

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

該当事項なし

コモンマーモセットの酵素・タンパク遺伝的多型に関する研究

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

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、酵素・タンパクの遺伝的多型に関する基礎的研究を行った。

A. 研究目的

酵素やタンパクの遺伝的多型は、実験動物の集団(系統)維持や個体識別において有用である。今回、血液のみをサンプルとして酵素、タンパクの遺伝的多型の検索を行った。

B. 研究方法

試料: 導入経路が異なる5集団から無作為に選んだ24頭のコモンマーモセットを使用した。採血後血漿を分離し、血球洗浄を行った後3量の蒸留水(DW)で赤血球溶血液を調製した。

電気泳動: セルロースアセテート膜(CA膜)、等電点ゲル(IEF)およびポリアクリルアミドゲル(PAG)を用いて電気泳動を行い、各種酵素、タンパク染色を行った。CA膜電気泳動については、5 μ lの溶血液または血漿を20 μ lのDWで希釈したものを試料とし、コームでCA膜に塗布後、TEBを緩衝液として100Vで1時間泳動した。IEF電気泳動については、pH3.5-10.0、5.0-7.0、7.0-9.0のゲルを作製、使用した。試料は1~5mm \times 7mmの濾紙に染み込ませてゲル上に置き、1000Vで1~2時間、泳動を行った。PAG電気泳動については、10%ゲルを作成、使用した。血漿試料は12.5 μ lのDW、2.5 μ lのBPB溶液および5.0 μ lの血漿を混合し、その2 μ lを、また、RBC試料は、5 μ lのDW、5 μ lのBPB溶液、10 μ lの溶血液を混合し、その5 μ lをサンプルウェルに入れた。ゲル一枚あたり10mAの定電流で約2時間泳動した。

酵素・タンパクの検出: 電気泳動後、Es (Esterase)、EsD (Esterase D)、GPD (Glucosephosphate dehydrogenase)、GPI (Glucose phosphate isomerase)、IDH (Isocitrate dehydrogenase)、MOD (Malic enzyme)、PEP (Peptidase) および PGM (Phosphoglucomutase) をマウスの方法に準じて検査した。また、Hb (Hemoglobin) および TRF (Transferrin) はタンパク染色により検査した。

C. 研究結果

今回、血液をサンプルとして用いた泳動ならびに染色法では、IDH、MOD および PEP を観察することはできなかった。GPD については、RBC サンプルを使って CA 膜泳動および IEF (pH3.5-10) で確認できたが、バンドは

明瞭ではなかった。Hb、EsD および PGM については、今回それぞれ2本、3本および5本のバンドを観察することができたが、バンドの位置などについて明確な差異は認められなかった。GPI および Es については多型を検出できた。

血漿を試料として PAG 電気泳動を行い、タンパク染色をした結果、易動度に個体差が認められた。このバンドはトランスフェリン (TRF) と考えられた。その他の領域のバンドには明らかな個体差を認めることはできなかった。

24 個体を対象としてバンドが明確な酵素およびタンパクを検査したところ、血漿 Es については I 系では他系統に比べて+型の個体が少ない点が興味深い。なお、他4系統では一型は見られなかった。GPI の Hetero は I 系以外で、また、TRF の B 型は I 系のみに見られた。

D. 考察

血液のみをサンプルに用いた場合、調べられる項目も限られてくる。しかし幸運にもこの研究で GPI、TRF および Es に遺伝的多型が観察された。これらは、目的で述べたように集団や個体の識別に有用である。なお、今回は明確な差異の見られなかった Hb、EsD、PGM については、明瞭なバンドが観察できているので、今後多型が見出されることを期待したい。

E. 結論

財団法人実験動物中央研究所のコモンマーモセットの遺伝的マーカーとして、酵素・タンパクの遺伝的多型に関する基礎的研究を行った結果、GPI、TRF1 および Es に遺伝的多型が確認された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Takabayashi, S et al. A novel hypothyroid dwarfism due to the missense mutation Arg479Cys of the thyroid peroxidase gene in the mouse. Mol Endocrinol. 20:2584-90, 2006.

2. 口頭発表

高林秀次ら. コモンマーモセットにおけるミトコンドリア DNA D-loop 領域の RFLP. 第53回日本実験動物学会、神戸、2006.

加藤秀樹ら. マウスクローズドコロニーに内在する自然突然変異遺伝子. 第53回日本実験動物学会、神戸、2006.

平成18年度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
「疾患関連遺伝子の機能解明のための疾患モデル動物資源の開発と
高度化に関する総合的研究」
研究報告書

免疫寛容マウスにおける LCMV 汚染検査条件の検討

研究協力者 滝本 一広 国立感染症研究所 動物管理室

研究要旨 マウスが新生児期あるいは胎内でリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) に感染すると免疫寛容となるため、抗体検査では検出されにくく、適切な条件での検査が必要である。今回の研究では、免疫寛容マウスを作製し、その親マウスおよび同居成熟マウスとともに ELISA による抗体検出および RT-PCR によるウイルス遺伝子検出を行い、免疫寛容マウスの LCMV 汚染摘発に適切な条件を検討した。免疫寛容マウス作製の為、新生仔期に LCMV を感染させたが、特異抗体が認められ、免疫寛容にはならなかった。その為、免疫寛容マウスの ELISA への適応について検討できなかった。しかし、持続感染を起こし、各臓器および糞尿中にウイルス遺伝子が検出され、LCMV 汚染源となった。LCMV に持続感染しているマウスと同居した親マウスでは同居 6 週目に LCMV に対する特異抗体が検出されたが、同居成熟マウスでは 8 週目でも検出されない場合があった。一方、RT-PCR では、全同居マウスで 8 週目にウイルス遺伝子が検出された。これらの結果より、LCMV 汚染の可能性のあるマウスと同居し、ELISA により LCMV 汚染の有無を調べる場合には、複数のマウスを最低 6 週間同居させる必要がある事が示唆された。8 週間同居することにより RT-PCR でのウイルス遺伝子検出が可能になるので、抗体検査と合わせて実施することにより、より確実な検査が可能になると思われる。また、親マウスおよび同居マウスでは、抗 LCMV 抗体は IgG2a に最も多く、自然感染の場合には ELISA の二次抗体として抗 IgG2a も有用であることが示唆された。

A. 研究目的

リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) はマウス、ハムスターを自然宿主とし、人獣共通感染症の原因ウイルスとして重要である。マウスが新生仔期あるいは胎内で感染すると免疫寛容となり、ウイルスは持続感染して唾液や糞尿中に排泄される。免疫寛容マウスの LCMV 汚染は通常の抗体検査では検出されにくく、適切な条件で検査を行うことが必要である。

本研究では、免疫寛容マウスを作製し、免疫寛容マウス、親マウス、免疫寛容マウスと同居させたマウスおよび成熟後感染させたマウスにおける抗 LCMV 抗体産生の経時的推移を調べることにより、現在行っている ELISA の系での抗 LCMV 抗体検出の可否、同マウスの適切な同居期間を検討する。また、得られた抗体の IgG サブクラスの比率につい

て調べ、ELISA で使用する二次抗体を抗 IgG サブクラス抗体に変えることで、より確実な抗 LCMV 抗体の検出が可能になるか否かを検討する。さらに、前述のマウスの排泄物、臓器内のウイルス遺伝子検出を行い、汚染検査における有用性を抗体検査と比較検討する。

B. 研究方法

1. 免疫寛容マウスの作製

生後 18 時間以内の C3H/He の新生仔に LCMV (M1 株) 6.9×10^3 FFU を腹腔接種した。

2. 実験群の作製

上述の新生仔 (3~5 匹) を親に戻し、翌日に C3H/He (♀, 6 週齢) 2 匹を同居させた。これを 5 群作製し、感染 1,2,4,6,8 週目に 1 群ずつ、血清、尿、肺、肝臓、脾臓、腎臓、直

腸便、大脳を採材した。

60°C 90 秒

72°C 90 秒

×30 サイクル

↓

72°C 10 分

3. 成熟マウスへの LCMV 感染

C3H/He (♀, 6 週齢) 10 匹に LCMV (M1 株) 4.6×10^4 FFU を腹腔接種した。これらは上述の実験群とは別ケージで飼育し、感染 1,2,4,6,8 週目に 2 匹ずつ、血清、尿、肺、肝臓、脾臓、腎臓、直腸便、大脳を採材した。

(5) 電気泳動

PCR産物は、2%アガロースで 1/2×TBE、100 V、30 分間泳動した。

4. ELISA

(1) ELISA 抗原

LCM-NP 発現バキュロウイルス感染 Tn5 昆虫細胞溶解液を陽性抗原として使用し、polyhedrin(-)バキュロウイルス感染 Tn5 昆虫細胞溶解液を陰性抗原として使用した。

(2) ペルオキシダーゼ標識二次抗体

市販のペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体を使用した。また、各 IgG サブクラスの反応性を調べるために抗マウス IgG1、抗マウス IgG2a、抗マウス IgG2b および抗マウス IgG3 を使用した。

4. IgG サブクラスの定量

マウス血清中の IgG サブクラスの定量は市販の定量キットを使用した。

5. RT-PCR

(1) RNA の抽出

マウス各組織、血清、尿、直腸便より市販の 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。

(3) PCR

LCMV の nucleoprotein (NP) 領域を増幅するプライマーセット NP5-001:5'-tccatragwgcacagtgyggggtgat-3'、NP3-001:5'-gcatgggaraayacracaattgayc-3' (r = a または g, w = a または t, y = c または t) を使用した。PCR は市販の PCR キット (QIAGEN Multiplex PCR kit) を用い、下記の条件で行った。

95°C 15 分

↓

94°C 30 秒

C. 研究結果

1. ELISA による LCMV 特異抗体の検出

新生仔期に LCMV を感染させたが、感染 2 週目から特異抗体が認められ、免疫寛容にはならなかった (ウイルスは排泄していた)。新生仔期に LCMV を感染させたマウスの親は、6 週目に ELISA で特異抗体が検出された。新生仔期に LCMV を感染させたマウスと同居した成熟マウスは、特異抗体を産生するものとしなないものが存在した。産生するマウスは 4 週目には ELISA により特異抗体が検出されたが、産生しないマウスでは 8 週目でも特異抗体が検出されなかった。LCMV 感染成熟マウスでは、感染 1 週目から特異抗体が認められ、全期間で高い OD 値を示した。

2. 血清中の各 IgG サブクラス

新生仔期に感染したマウスでは IgG2a が約 70% を占め、IgG1 と IgG2b が 10-20%、IgG3 は 2% 以下であった。親マウスおよび同居マウスでは IgG 総量が、新生仔期に感染したマウスの約 20% と少なく、そのうち IgG2a が 40-50%、他はいずれも 10-20% であった。LCMV 感染成熟マウスでは、IgG 総量が、新生仔期に感染したマウスの約 50% で、そのうち IgG2a が 50%、他はいずれも 10-15% であった。

3. 抗 IgG サブクラス抗体を用いた ELISA

いずれも抗 IgG2a による ELISA で高い OD 値を示したが、新生仔期に感染したマウスおよび LCMV 感染成熟マウスでは抗 IgG1 を用いた場合が最も強い反応を示した。

4. RT-PCR によるウイルス遺伝子の検出

新生仔期に LCMV を感染させたマウスで

は、ウイルス遺伝子は全期間に渡り各臓器および血清に認められ、糞便・尿からの排泄も確認された。親マウスおよび同居マウスでは6週目までウイルス遺伝子を検出できなかったが、8週目で各臓器から検出された。また、血清からは全期間を通して検出できなかった。LCMV感染成熟マウスでは、肝臓、脾臓で比較的検出率が高かったが、他の臓器では4、6週目に全く検出されなかった。しかし、8週目では各臓器でウイルス遺伝子が検出された。

D. 考察

論文で報告されていた免疫寛容誘導法に従い新生仔に LCMV を感染させたが、特異抗体が産生され免疫寛容マウスは作製できなかった。そのため、免疫寛容における ELISA への適応について検討できなかった。しかし、新生仔期に LCMV を感染させたマウスでは持続感染を起こし、各臓器でウイルス遺伝子が顕著に検出された。また、糞尿中にウイルスを排泄しており、LCMV 汚染源となったと考えられる。これらのマウスで産生された抗体がウイルス排除能を有しているかを確認する必要があると思われる。今後、免疫寛容マウスの適切な作製条件の検討あるいは垂直感染マウスの作製を行い、抗体検出等を試みたい。

今回の実験で、LCMV に持続感染しているマウスと同居しても特異抗体が8週間検出されない場合があった。この結果から、抗体検出により LCMV 汚染を確認する場合、1匹の囲マウスでは LCMV 汚染を見落とす可能性が示唆された。また、持続感染マウスの親では6週目に抗体が検出されたことから、最低6週間の同居が必要であることが示唆された。一方、RT-PCR では、抗体が検出されなかったマウスでも他の同居マウスと同様に8週目にはウイルス遺伝子が検出されたことから、感染自体は成立し、同居8週目以降であれば RT-PCR により検出可能であることが示唆された。

抗LCMV抗体は、産生されるIgGの量に関わらずLCM-NP抗原に強い反応を示し、IgG2a, IgG1, IgG2bに含まれていた。このことから、

複数のマウスIgGサブクラスに有効な抗体を ELISA の二次抗体として使用することで、抗 LCMV 抗体は十分検出できると考えられる。ただし、親マウスおよび同居マウスでは抗 IgG2a 抗体で著しく高い OD 値を示したことから、自然感染の場合には抗 IgG2a 抗体も有用であるかもしれない。

E. 結論

LCMV 汚染の可能性のあるマウスと同居し、ELISA により LCMV 汚染の有無を調べる場合には、複数のマウスを最低6週間同居させる必要があることが示唆された。また、8週間同居することにより RT-PCR での検出が可能になるので、抗体検査と合わせて実施することにより、より確実な検査が可能になると思われる。

自然感染の場合、LCMV に対する特異抗体は IgG2a に最も多く、ELISA の二次抗体として抗 IgG2a も有用である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

該当なし

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 |
|---|---|-------------------------|--|---------------------|----------|------|---------------------|
| 岡部 勝 | 精子の成熟と受精能獲得 | 森沢 正昭, 星 和彦, 岡部 勝 | 新編 精子学 | 東京大学出版会 | 東京 | 2006 | 153-173 |
| Suzuki Y, Nanba E, Matsuda J, Oshima A | β -Galactosidase Deficiency (β -Galactosidosis): GM1 Gangliosidosis and Morquio B Disease. | Scriver et al | The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease. | LYSOSOMAL DISORDERS | New York | 2006 | Chapter 151 1-32 |

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 |
|--|---|------------------|--------|-----------|------|
| Ichinomiya S, Watanabe H, Maruyama K, Toda H, Iwasaki H, Kurosawa M, Matsuda J, Suzuki Y | Motor and Reflex Testing in GM1-Gangliosidosis Model Mice. | Brain Dev | 29(4) | 210-216 | 2007 |
| Cho A-R, Uchio-Yamada K, Torigai T, Miyamoto T, Miyoshi I, Matsuda J, Kurosawa T, Kon Y, Asano A, Sasaki N, Aguil T | Deficiency of the tensin2 gene in the ICGN mouse, an animal model for congenital nephrotic syndrome. | Mammalian Genome | 17(5) | 407-416 | 2006 |
| Okada T, Ishii Y, Masujin K, Yasoshima A, Matsuda J, Ogura A, Nakayama H, Kunieda T, Doi K. | The critical roles of serum/glucocorticoid regulated kinase 3 (SGK3) in the hair follicle morphogenesis and homeostasis: the allelic difference provides novel insights into hair follicle biology. | Am J Pathol | 168(4) | 1119-1133 | 2006 |
| Hasegawa H, Sawa H, Lewis M, Orba Y, Sheehy N, Yamamoto Y, Ichinohe T, Tsunetsugu-Yokota Y, Katano H, Takahashi H, Matsuda J, Sata T, Kurata T, Nagashima K, Hall WW | Development of Thymus-Derived T-cell Leukemia/Lymphoma in Mice Transgenic for the Tax gene of Human T-Lymphotropic Virus Type-I (HTLV-I). | Nature Medicine | 12(4) | 466-472 | 2006 |
| 松田潤一郎 | 基盤研実験動物開発研究室の紹介—特に基盤研動物資源バンクについて—. | 関西実験動物研究会会報 | 27 | 69-71 | 2006 |

| | | | | | |
|---|---|---|-------|---------|------|
| 岡田太郎, 舩甚賢太郎, 石井寿幸, 八十島昭, 松田潤一郎, 小倉淳郎, 中山裕之, 国枝哲夫, 土井邦雄 | SGK3 はマウス毛形成および毛周期の重要な制御因子である | 日本疾患モデル学会記録 | 22 | 12-18 | 2006 |
| 鈴木義之, 一ノ宮悟史, 丸山貴美子, 戸田寛子, 渡辺浩史, 岩崎博之, 黒澤美枝子, 小川誠一郎, 飯田真己, 松田潤一郎 | GM1 ガングリオシドーシスモデルマウスを用いた新しい治療法の開発 | 日本疾患モデル学会記録 | 22 | 33-40 | 2006 |
| K. Edashige, M. Tanaka, N. Ichimaru, S. Ota, K. Yazawa, Y. Higashino, M. Sakamoto, Y. Yamaji, T. Kuwano, D.M.Valdez Jr., F.W. Kleinhans, M. Kasai | Channel-dependent permeation of water and glycerol in mouse morulae. | Biology of Reproduction | 74, 4 | 625-632 | 2006 |
| J.F. Guenther, S. Seki, F.W. Kleinhans, K. Edashige, D.M. Roberts, P. Mazur | Extra- and intra-cellular ice formation in stage I and II <i>Xenopus laevis</i> oocytes. | Cryobiology | 52, 3 | 401-416 | 2006 |
| K. Edashige, D.M. Valdez Jr., T. Hara, N. Saida, S. Seki, M. Kasai | Japanese flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>) embryos are difficult to be cryopreserved by vitrification. | Cryobiology | 53, 1 | 96-106 | 2006 |
| D.M. Valdez Jr., T. Hara, A. Miyamoto, S. Seki, M. Kasai, B. Jin, K. Edashige | Expression of aquaporin-3 improves the permeability to water and cryoprotectants of immature oocytes in the medaka (<i>Oryzias latipes</i>). | Cryobiology | 53, 2 | 160-168 | 2006 |
| Y. Yamaji, D.M. Valdez Jr., S. Seki, K. Yazawa, M. Kasai, C. Urakawa, B. Jin, F.W. Kleinhans, K. Edashige | Cryoprotectant permeability of aquaporin-3 expressed in <i>Xenopus</i> oocytes. | Cryobiology | 53, 2 | 258-267 | 2006 |
| Shinsuke Seki, Toshimitsu Kouya, Ryoma Tsuchiya, Delgado M. Valdez Jr., Takao Hara, Bo Jin, Magosaburo Kasai, Keisuke Edashige | The permeability to water and cryoprotectants of immature and mature oocytes in the zebrafish (<i>Danio rerio</i>). | Cryobiology | 54, 1 | 121-124 | 2007 |
| Kaneko T, Yanagi M, Nakashima T, Nakagata N | The improvement in fertilizing ability of cryopreserved mouse spermatozoa using laser-microdissected oocytes. | Reproductive Medicine and Biology | 5 | 249-253 | 2006 |
| Anzai M, Nishiwaki M, Yanagi M, Nakashima T, Kaneko T, Taguchi Y, Tokoro M, Shin SW, Mitani | Application of Laser-assisted Zona Drilling to In Vitro Fertilization of Cryopreserved Mouse Oocytes with Spermatozoa from a Subfertile Transgenic Mouse. | Journal of Reproduction and Development | 52 | 601-606 | 2006 |

| | | | | | |
|--|---|-------------------------|---------|-----------|------|
| T, Kato H, Matsumoto K, Nakagata N, Iritani A | | | | | |
| Kaneko T, Nakagata N | Improvement in the long-term stability of freeze-dried mouse spermatozoa by adding of a chelating agent. | Cryobiology | 53 | 279-282 | 2006 |
| Kaenko T, Yamamura A, Ide Y, Ogi M, Yanagita T, Nakagata N | Long-term cryopreservation of mouse sperm. | Theriogenology | 66 | 1098-1101 | 2006 |
| Hoshii T, Takeo T, Nakagata N, Takeya M, Araki K, Yamamura K | LGR4 Regulates the Postnatal Development and Integrity of Male Reproductive Tracts in Mice. | Biology of Reproduction | 76 | 303-313 | 2007 |
| Ono, R., Nakamura, K., Inoue, K., Naruse, M., Usami, T., Wakisaka-Saito, N., Hino, T., Suzuki-Migishima, R., Ogonuki, N., Miki, H., Ogura, A., Yokoyama, M., Kaneko-Ishino, T. and Ishino, F | Deletion of Peg10, an imprinted gene acquired from a retrotransposon, causes early embryonic lethality. | Nat Genet | 38 | 101-106 | 2006 |
| Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N | Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. | Nature | 441 | 885-889 | 2006 |
| Migishima F, Suzuki-Migishima R, Quintero RB, Yokoyama M, Behr BR | Successful pregnancies after transplantation of frozen-thawed mouse ovaries into chimeric mice that received lethal-dose radiation. | Fertility and Sterility | 86 | 1080-1087 | 2006 |
| Narai, S., Kodama, Y., Maeda, Y., Yokoyama, M., Takagi, R. and Kominami, R | Trp53 affects the developmental anomaly of clefts of the palate in irradiated mouse embryos but not clefts of the lip with or without the palate. | Radiat.Res | 166 | 877-882 | 2006 |
| Suzuki O, Koura M, Noguchi Y, Takano K, Uchio-Yamada K, Matsuda J | Analyses of the cDNA and genomic DNA sequences encoding the luteinizing hormone β -subunit precursor protein in the rabbit. | Gen Comp Endocrinol | 150 (3) | 514-519 | 2007 |
| Kawai Y, Hata T, Suzuki O, Matsuda J | The relationship between sperm morphology and in vitro fertilization ability in mice. | J Reprod Dev | 52(4) | 561-568 | 2006 |
| Noguchi Y, Takano K, Koura M, Uchio-Yamada K, Matsuda J, Suzuki O | Sequence analysis of cDNA encoding rabbit follicle-stimulating hormone β -subunit precursor protein. | Gen Comp Endocrinol. | 147 (2) | 231-235 | 2006 |

| | | | | | |
|---|--|-------------------------------|------------------|----------------------------------|------|
| 鈴木治 | 卵子発育 | 日本臨牀 | 64 Suppl 4 | 174-178 | 2006 |
| 鈴木治 | 各種実験動物の性腺刺激ホルモン配列比較と過排卵技術の改良 | 関西実験動物研究会会報 | 27 | 72-75 | 2006 |
| Inoue K., Noda S., Ogonuki N., Miki H., Inoue S., Katayama K., Mekada K., Miyoshi H., Ogura A | Differential developmental ability of embryos cloned from tissue-specific stem cells. | Stem Cells | | 印刷中 | 2007 |
| Shinmen A., Honda A., Ohkawa M., Hirose M., Ogonuki N., Yuzuriha M., Miki H., Mochida K., Inoue K., Abe K., Ito M., Ogura A | Efficient production of intersubspecific hybrid mice and embryonic stem cells by intracytoplasmic sperm injection. | Mol. Reprod. Dev. | | Published online on Feb. 8, 2007 | 2007 |
| Takehashi M., Kanatsu-Shinohara M., Inoue K., Ogonuki N., Miki H., Toyokuni S., Ogura A., Shinohara T | Adenovirus-mediated gene delivery into mouse spermatogonial stem cells. | Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. | 104 | 2596-2601 | 2007 |
| Kanatsu-Shinohara M., Inoue K., Ogonuki N., Miki H., Yoshida S., Toyokuni S., Lee J., Ogura A., Shinohara T | Leukemia inhibitory factor enhances formation of germ cell colonies in neonatal mouse testis culture. | Biol. Reprod. | 76 | 55-62 | 2007 |
| Ogonuki N., Mochida K., Miki H., Inoue K., Fray M., Iwaki T., Moriwaki K., Obata Y., Morozumi K., Yanagimachi R., Ogura A | Spermatozoa and spermatids retrieved from frozen reproductive organs or frozen whole bodies of male mice can produce normal offspring. | Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. | 103 | 13098-13103 | 2006 |
| Kanatsu-Shinohara M., Ikawa M., Takehashi M., Ogonuki N., Miki H., Inoue K., Kazuki Y., Lee J., Toyokuni S., Oshimura M., Ogura A., Shinohara T | Production of knockout mice by random or targeted mutagenesis in spermatogonial stem cells. | Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. | 103 | 8018-8023 | 2006 |
| Kanatsu-Shinohara M., Inoue K., Miki H., Ogonuki N., Takehashi M., Morimoto T., Ogura A., Shinohara T | Clonal Origin of Germ Cell Colonies after Spermatogonial Transplantation in Mice. | Biol. Reprod. | 75 | 68-74 | 2006 |
| Y. Okada, Y. Ueshin, A. Isotani, T. Saito-Fujita, H. Nakashima, K. Kimura, A. | Complementation of placental defects and embryonic lethality by trophoblast-specific lentiviral gene transfer. | Nat Biotechnol | 25(2) | 233-237 | 2007 |

| | | | | | |
|---|--|------------------------|--------|-----------|------|
| Mizoguchi, M. Oh-Hora, Y. Mori, M. Ogata, R. G. Oshima, M. Okabe and M. Ikawa | | | | | |
| R. Yamaguchi, K. Yamagata, M. Ikawa, S. B. Moss and M. Okabe | Aberrant Distribution of ADAM3 in Sperm from Both Angiotensin-Converting Enzyme (Ace)- and Calmegin (Clgn)-Deficient Mice. | Biol Reprod | 75(5) | 760-766 | 2006 |
| 井上 直和, 伊川 正人, 岡部 勝 | 受精のメカニズム -イズモを中心に卵子と精子の結合に必要な因子とその異常に関連した受精異常について- | 産科と婦人科 | 73(6) | 735-744 | 2006 |
| 井上 直和, 岡部 勝 | 受精の膜融合における必須分子 Izumo の同定 | Medical Science Digest | 32(10) | 416-417 | 2006 |
| 岡部 勝 | 遺伝子操作マウスを用いて見る卵子と精子の相互作用 | 生化学 | 78(11) | 1062-1072 | 2006 |
| Takabayashi S, Umeki K, Yamamoto E, Suzuki T, Okayama A, Katoh H | A novel hypothyroid dwarfism due to the missense mutation Arg479Cys of the thyroid peroxidase gene in the mouse. | Mol Endocrinol | 20 | 2584-2590 | 2006 |