

## 新規霊長類医科学研究用資源の開発・安定供給に関する研究

分担研究者 明里宏文 医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター室長  
協力研究者 木村展之、片貝祐子

### 研究要旨

近年、新世界ザルは脳神経科学研究や新興再興感染症研究におけるモデル動物としての重要性が高まりつつある。新規霊長類医科学研究用資源の開発・安定供給を目標とした本研究では、以下の成果を得た。(1) 新世界ザル SPF 化を念頭に、その第一歩として当センターにて維持している新世界ザルにおける常在寄生虫等のスクリーニングを実施した。その結果、国内繁殖育成施設由来の動物では寄生虫は検出されなかったが、南米より輸入された野生由来の動物では高率に消化管内・住血性寄生虫および病原性ヘルペスウイルスを保有していた。医科学実験に適した SPF 化新世界ザルリソースを確保するには、長期的な自家繁殖育成体制が必要と考えられた。(2) アルツハイマー病を主とする神経変性疾患のモデル動物開発を目的とした基盤的情報収集を行なった。タマリン、マーモセット共にアルツハイマー病関連主要蛋白群の発現および局在がヒトおよびカニクイザルとほぼ一致して確認され、新世界ザルが神経変性疾患のモデル動物として有用であることが示唆された。

### A. 研究目的

近年、脳神経科学や感染症分野を中心とする医科学研究における新世界ザルの需要が急速に増加している。しかしながら、旧世界ザルに比し、いくつかの点で実験用霊長類として整備が進んでいない点が残されている。すなわち、現在用いられている新世界ザルは南米より輸入された野生由来個体が多く用いられていることから、研究精度の向上やバイオセーフティの面からも微生物学的制御、すなわち SPF 化が必要である。また同時に、新世界ザルを用いた医科学研究を発展していくに当たり、新世界ザルに関する基盤的情報が限られていることから、比較霊長類学的情報の集積が不可欠である。

以上のことを鑑み本研究では、(1) 新世界ザル SPF 化を念頭に、その第一歩として当センターにて維持している新世界ザルにおける常在寄生

虫等のスクリーニング、(2) アルツハイマー病を主とする神経変性疾患のモデル動物開発を目的とした基盤的情報収集を行った。

### B. 研究方法

1. 新世界ザル常在寄生虫等のスクリーニング：対象動物はリスザル1ロット 15 頭・アカテタマリン2ロット 36 頭・コモンマーモセット3ロット 29 頭である。リスザルおよびタマリンは南米由来、マーモセットは国内繁殖施設由来であった。施設内への搬入時に落下便・直腸スワブ・咽頭スワブ・末梢血等を採取し、寄生虫学的検査およびウイルス抗体検査（ヘルペスサイミリ・タマリヌス：他種の新世界ザルへの水平感染により重篤な白血病・リンパ腫を惹起する）を行った。
2. アルツハイマー病を主とする神経変性疾患に

ツハイマー病関連主要関連蛋白群の脳内局在を免疫組織科学的に検索した。

免疫染色の検索項目

- 1) アミロイド前駆体蛋白 (APP)
- 2) アミロイドベータ (A $\beta$ ) APP から切断産生され、老人斑と呼ばれる AD 主病変を構成する。
- 3) アポリポ蛋白 E (ApoE) : 脳内で Ab の輸送・凝集に関わると考えられており、ApoE 4 型は AD 発症リスクを高めるとされている。
- 4) Tau : 過剰リン酸化によって凝集し、神経原線維変化とよばれる AD 主病変を構成する。

## C. 研究結果

### 1. 新世界ザル常在寄生虫等のスクリーニング

入荷時検査において、アカテタマリンでは、落下便より糞線虫・結節虫・鉤頭虫・食道虫・鞭虫の虫卵 (陽性率 56%)、血液からトリパノゾーマおよびマイクロフィラリア (同 75%) が検出された。リスザルでは、落下便より腸結節虫・鉤頭虫・糞線虫卵が検出 (同 93%) され、ウイルス検査でヘルペスサイミリ (同 100%) およびタマリヌスが陽性 (同 20%) であった。他方、マーモセットでは、寄生虫ならびにウイルス抗体は検出されなかった。リスザルおよびタマリンについて、イベルメクチンを静脈内投与ならびにプラジカンテル合剤を経口投与し、駆虫を試みた。約 1~2 年後、漸次寄生虫検査を実施したところ、タマリンおよびリスザルのいずれにおいても虫卵は検出されなかった。一方、タマリンでは腹腔内の線虫虫体および末梢血中のマイクロフィラリア、リスザルでは末梢血中のトリパノゾーマが確認された。

### 2. アルツハイマー病を主とする神経変性疾患に関わる新世界ザルの基盤的情報収集

免疫組織学的検索の結果、マーモセットおよびタマリンともに、APP は神経細胞内顆粒染色像として、ApoE はアストログリア主体性に、そして tau は神経細胞突起を中心に陽性像が確認され、その局在性はヒトおよびカニクイザルとほぼ一致していた。今回の検索に用いた新世界ザルはい

ずれも若齢動物であったため、残念ながら老人斑や神経原線維変化等のアルツハイマー病主病変は確認されなかったが、新世界ザルの神経細胞内においても細胞内 A $\beta$  の存在を確認することができた。

## D. 考察

### 1. 新世界ザル常在寄生虫等のスクリーニング

当センターで自家繁殖・育成を行なっているカニクイザルに比し、今回スクリーニングを行なった新世界ザルでは特に南米より輸入した野生由来タマリン及びリスザルにおいて消化管内および住血寄生虫を非常に高率に保有していた。また、ウイルス抗体の保有状況についても同様であった。他方、国内繁殖施設由来のマーモセットではすでに清浄化が進んでいる。タマリン及びリスザルに関しては輸入に依存せざるを得ない現状であることから、入荷時の検疫およびその後の定期的スクリーニング、駆虫が不可欠である。消化管内寄生虫は駆虫によく反応し、数回の駆虫薬投与により虫卵はほぼ検出されなくなった。一方、住血性寄生虫はそのような駆虫にも拘わらず、入荷して 2 年経過した現在でも虫体が散見されている。飼育環境にベクターとなる昆虫は存在しないことから、これらの寄生虫は生体内で長期間生存可能であることが示唆される。こうした結果を踏まえ、今後は研究精度の向上および研究者・技術者等動物取扱者への健康被害リスクを考慮し、自家繁殖による実験用新世界ザルの安定供給および各種病原体の SPF 化を図るべきと考えられる。

### 2. アルツハイマー病を主とする神経変性疾患に関わる新世界ザルの基盤的情報収集

アルツハイマー病関連主要蛋白群の局在がヒトおよびカニクイザルとほぼ一致して確認されたことから、新世界ザルはアルツハイマー病モデル動物候補としての必要最低条件をクリアしたことになる。また、既に市販されている抗体 (ヒトのアルツハイマー病関連蛋白に対して作成されている) が広く使用可能であるということも非

常に大きな利点であると考えられる。さらに、細胞内 A $\beta$  の存在が確認されたことは非常に大きな意味を持つと考えられる。これまで、Tg マウスを除く若齢動物では細胞内に A $\beta$  は存在しないと考えられてきた。過去の検索において我々は、世界で始めて若齢カニクイザルの神経細胞に細胞内 A $\beta$  の存在を認めたが、本研究成果によって新世界ザルもまた、若齢動物にもかかわらず細胞内 A $\beta$  が存在するということが明らかになった。このことから、新世界ザルのアルツハイマー病モデル動物候補としてのポテンシャルは非常に大きいものであると考えられる。新世界ザルは、既に老齢モデル霊長類として一般的に用いられているカニクイザルやアカゲザルなどの旧世界ザルに比べて小型であるため、広大な飼育スペースを必要としないという大きな利点を持っている。事実、ヨーロッパを中心としてハイイロコビトキツネザル（残念ながら我が国には輸入不可能）等の新世界ザルを用いた AD 研究が過去 2 年間で飛躍的に増加しており、神経変性疾患モデル候補としての新世界ザルの需要・期待は日に日に増加している。さらに、実験動物を用いた神経変性疾患研究には欠かせないツールである、認知機能の行動学的解析を行う上で必要不可欠な自発運動量の測定も、十分な三次元的広がりを持ったケージにて飼育可能な新世界ザルの方が、より正確に測定できるという利点をもっている。これらの点からも、新世界ザルが持つ神経変性疾患のモデル動物としての可能性・現実性は非常に大きいと考えられる。

## E. 結論

新世界ザル SPF 化を念頭に、その第一歩として当センターにて維持している新世界ザルにおける常在寄生虫等のスクリーニングを実施した。その結果、国内繁殖育成施設由来の動物では寄生虫は検出されなかったが、南米より輸入された野生由来の動物では高率に消化管内・住血性寄生虫および病原性ヘルペスウイルスを保有していた。医学実験に適した SPF 化新世界ザルリソースを確

保するには、長期的な自家繁殖育成体制が必要と考えられた。

アルツハイマー病を主とする神経変性疾患のモデル動物開発を目的とした基盤的情報収集を行なった。タマリン、マーモセット共にアルツハイマー病関連主要蛋白群の発現および局在がヒトおよびカニクイザルとほぼ一致して確認され、新世界ザルが神経変性疾患のモデル動物として有用であることが示唆された。

## G. 研究発表

### 1. 学会発表

- 1) 明里宏文：サルを用いた病原体感染実験実施におけるコンプライアンスとバイオセーフティ. 第 143 回日本獣医学会学術集会シンポジウム、平成 19 年 4 月
- 2) 岩崎優紀、明里宏文：C 型肝炎霊長類サロゲートモデルの開発. 日本レトロウイルス研究会学術集会、平成 19 年 7 月
- 3) 川合覚、斉藤直之、片貝祐子、小野文子、中村紳一郎、揚山直英、明里宏文、寺尾恵治：磁気共鳴画像 (MRI) 検査による実験的脳マラリアの病態解析. 第 143 回日本獣医学会学術集会、平成 19 年 9 月
- 4) 岩崎優紀、飯島沙幸、木村展之、片貝祐子、揚山直英、明里宏文：霊長類サロゲート C 型肝炎モデル：マーモセットにおけるくすぶり型慢性 GBV-B 感染. 第 143 回日本獣医学会学術集会、平成 19 年 9 月
- 5) Akari H, Ishii K, Iwasaki Y, Iijima S, Maki N, Mori K-i, Katakai Y, Kimura N, Yoshizaki S, Ageyama N, Yokota T, Suzuki T, Miyamura T: Development of chronic GBV-B infection in marmosets with smoldering plasma viremia. 14<sup>th</sup> International Symposium on Hepatitis C virus and related viruses. September, 2007.
- 6) 岩崎優紀、石井孝司、飯島沙幸、楨昇、森健一、吉崎佐矢香、木村展之、片貝祐子、揚山直英、鈴木哲朗、神奈木真理、宮村達男、明里宏文：C

型肝炎サロゲート霊長類モデル:GBV-B は新世界ザルに潜伏感染する. 第55回日本ウイルス学会学術集会、平成19年11月

7) 冷岡昭雄、大山篤、手塚行雄、片貝祐子、小野文子、揚山直英、明里宏文: ABSL3 施設でのサル類飼育管理. 第7回日本バイオセーフティ学会学術集会、平成19年11月

## 2. 論文発表

1) Ishii K, Iijima S, Kimura N, Lee Y-J, Ageyama N, Yagi S, Yamaguchi K, Maki N, Yoshizaki S, Machida S, Suzuki T, Iwata N, Sata T, Terao K, Miyamura T, Akari H: GBV-B as a pleiotropic virus: Distribution of GBV-B in extrahepatic tissues *in vivo*. *Microbes and Infection* 9, 515-521, 2007.

2) Hara M, Kikuchi T, Sata T, Nakajima N, Ami Y, Sato Y, Tanaka K, Narita T, Ono F, Akari H, Terao K, Mukai R. Detection of SRV/D shedding in body fluids of cynomolgus macaques and comparison of partial gp70 sequences in SRV/D-T isolates. *Virus Genes* 35, 281-288, 2007.

3) Yokota T, Iijima S, Kubodera T, Ishii K, Katakai Y, Ageyama N, Chen Y, Lee Y-J, Unno N, Nishina K,

Iwasaki Y, Maki N, Mizusawa H, Akari H: Efficient regulation of viral replication by systemically administered siRNA with cationic liposome in a non-human primate surrogate model for hepatitis C. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 361, 294-300, 2007.

4) 明里宏文: 医学実験用霊長類を用いた病原体感染実験施設の管理運営におけるコンプライアンスとバイオセーフティ. *JVM (獣医畜産新報)* 60, 641-645, 2007

5) Sato H, Leo N, Katakai Y, Takano J, Akari H, Nakamura S, Une Y: Prevalence and molecular phylogenetic characterization of *Trypanosoma* (*Megatrypanum*) *minasense* in the peripheral blood of amsll neotropical primates (*Saimiri sciureus* and *Saguinus midas*) after a quarantine period. *Journal of Parasitology*, in press.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

明里宏文、高崎智彦、倉根一朗: デングウイルス検査方法及びモデル動物 (2008年、特許出願中)

## 動物資源の安定供給に向けた繁殖および 品質管理技術の高度化に関する研究

分担研究者 山海 直 独立行政法人医薬基盤研究所

霊長類医科学研究センター 主任研究員

### 研究要旨

カニクイザル5頭を用いて卵巣の凍結保存および移植実験を行った。凍結は卵巣まるごとを磁場環境で実施するという新規なものであった。移植した結果、5頭中4頭で月経周期の回復を認めた。しかし、この4頭が月経周期を回復するまでの過程は個体ごとに異なっており、安定した技術とはいえない。本研究により、卵巣まるごと凍結保存が可能であることをはじめて示し、この方法は広く応用できる可能性を有していると考えられた。サル類の医科学研究への応用範囲を広げるとともに疾患モデルサル等の新規な保存技術にもなり得るものである。

### A. 研究目的

医科学研究に資するサル類を開発することは本研究の目的の一つである。移植分野において、卵巣の凍結保存が注目されており、近年、凍結保存された卵巣を体内に移植し、妊娠・分娩にまで至ったという臨床報告がなされている。この卵巣移植が一般臨床として広く応用できるようになればガン患者の抗がん剤投与や放射線療法の前に卵巣を摘出・凍結し、完治したのちその卵巣を移植することで妊娠が可能になる。子供をもつことを望む女性にとって、その精神的苦痛をいっきに軽減できるものである。また、凍結融解した卵巣の移植が可能になれば、当然、他の臓器移植への応用も期待される。臓器移植時のレシピエントの選抜を時間制限なく行うことが可能になる。また、これまで運搬距離に限界があったがそ

の問題も解消される。臓器の凍結バンクという構想も実現できることになり、臓器の凍結保存技術は広範な分野で応用が可能となる。

これまでに主としてマウスを用いた卵巣凍結実験の成果が報告されているが、いずれの方法も卵巣をできるだけ細かく切り刻むというところがポイントになっている。すなわち、耐凍剤が組織の内部にまで入り込まなければ凍結融解に耐えられないのが現状である。卵巣も含めてほとんどの臓器は、その一部が生存していれば復活が期待できるが、私が知るかぎりこれまでに臓器まるごとを用いて凍結保存した報告はない。

本研究では新規な方法で卵巣のまるごと凍結を試み、その卵巣を個体にもどすことで回復するか否かについて内分泌学的に検索した。

## B. 研究方法

実験には月経周期を認めるカニクイザル5頭を用いた。月経時に全身麻酔下で開腹手術を施し、左右両側の卵巣を摘出した。卵巣の血液、水分をできるだけ除去し、ビニール袋に入れてシールした。その状態で磁場が暴露できるプログラムフリーザに設置して凍結を開始した。最終的には液体窒素内で保存した。融解は37℃のお湯に浸漬して行った。融解した卵巣を摘出した個体の筋肉内あるいは腎被膜下に移植し（自己への移植）、その個体の月経周期の回復について検索した。なお、実験期間を通して供試個体から経時的に末梢血を採取し、主要性ホルモンであるLH、FSH、E2およびプロジェステロンの濃度を測定した。

（倫理面への配慮）

カニクイザルを使用するにあたり独立行政法人医薬基盤研究所の動物実験委員会の審査を受けている。実験実施時の動物への苦痛の軽減を原則とし飼育環境の整備にも十分に配慮した。

## C. 研究結果

使用した5頭のカニクイザルはE2およびプロジェステロン濃度の動態から卵巣摘出前に正常な月経周期を示していたことが確認された。いずれの個体も卵巣摘出後この二つのホルモン濃度は低値を示し、FSHおよびLHが高濃度となった。これらのホルモン動態は卵巣が完全に摘出されたことを示している。

摘出された卵巣は凍結された状態で1か月保存したが、その後融解したときにはしっかりとした形状を保っていた。この卵巣をもとの5頭に移植した結果、1頭で月経周期の回復を認めた。しかし、この個体の月経周期は2回認めたあとE2およびプロジェステロンは上昇しなくなった。他の4頭に対してFSH製剤を投与したところ、2

頭で月経周期の回復を認めた。この結果は、凍結融解後も卵巣の中の顆粒膜細胞は機能していたことを示している。この2頭のうち1頭は不規則な周期であったが、他の1頭は通常見られる月経周期を示した。5頭のうち2頭は月経周期の回復を認めていなかったが、移植から3か月後、1頭で月経周期が回復した。このように凍結融解した卵巣移植により5頭中4頭で少なくとも1回の月経周期を回復することが内分泌学的に確認された。

## D. 考察

今回用いた磁場環境下での凍結法は、食品業界で注目を集めているものである。食品業界ではいかに味を維持したまま凍結するかということが課題になっている。本法で凍結した食品素材は細胞の形体を維持していることが確認されており、味も新鮮なものほとんど変わらない方法とされている。

この方法を医療分野に応用できる可能性があると着眼し、今回臓器の保存を試みた。磁場環境で凍結するとなぜ、細胞が破壊されないのかは、明確に証明されていない。しかし、対象臓器に磁場をかけることで臓器内の水分子が振動すると考えられている。その状態で温度を下げていくことで過冷却状態となり氷になったときの結晶はかなり小さいと考えられる。氷の結晶が小さいため細胞へのダメージも少なくなっているという仮説がたてられる。

今回、卵巣を用いて凍結保存を実施したが、卵巣を用いた理由は二つある。その臨床応用が現実のものとして求められていること、また、生殖細胞であるため末梢性の性ホルモン濃度を測定することで機能が推測できるためである。とくに臨床応用を想定しているため、サル類で実施した意義は大きい。

本研究では5頭のカニクイザルを用い、最終的には4頭で凍結融解した卵巣を移植

することで性ホルモンの濃度が変化すること、すなわち卵巣が機能したことを確認した。この4頭の機能回復の状態は個体ごとに異なっていたが、まるごとの臓器を凍結し、移植したのち機能の回復を確認したはじめての例である。しかも、この凍結保存法は磁場という環境を利用したため臓器の表面も内部も同じ環境にあったものと考えられ、耐凍剤を用いないという新規な方法であった。これは細胞凍結という分野に大きな影響を与える可能性がある。

残った課題は、供試した個体の中に機能回復を認めなかった個体が存在したこと、機能回復を認めたものの個体ごとに状況が異なっていたことがあげられる。この個体ごとの状況から、移植した卵巣が定着するまでに時間を要する可能性があること、凍結融解により生存細胞の数が少なく月経周期を回帰するだけの機能を果たせなかった可能性もある。今後、より詳細な条件検討を行うことで十分に本法は実用化できる可能性を有している。なお、本研究成果により、サル類の医科学研究への応用範囲が拡大されることは言うまでもなく、さらに疾患モデル等の新しい保存技術にもなり得ると考える。

## E. 結論

カニクイザルの卵巣を磁場環境下でまるごと保存した。融解した卵巣を個体にもどすことで5頭中4頭で卵巣機能が回復したことを示唆するデータを得た。本法は臓器のまるごと保存を可能にする新規な方法となり得る可能性を有していることが示された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Shinichi Hayasaka, Yukihiro Terada, Kichiya Suzuki, Haruo Murakawa, Ikuo Tachibana, Tadashi Sankai, Takashi Murakami, Nobuo Yaegashi, Kunihiro Okamura

Intramanchette transport during primate spermiogenesis: expression of dynein, myosin Va, MyRIP, and Rab27b in the manchette during human and monkey spermiogenesis

Asian Journal of Andrology (in press)

Shinichiro Nakamura, Sachi Okabayashi, Naohide Ageyama, Hiroshi Koie, Tadashi Sankai, Fumiko Ono, Koji Fujimoto, Keiji Terao

Transthyretin amyloidosis and two other aging-related amyloidoses in an aged vervet monkey

Veterinary Pathology, 45: 67-72, 2008

Hironori Okada, Masanori Hatori, Nobuhiro Shimosawa, Hideaki Tsuchiya, Takashi Kuwana, Tadashi Sankai  
Collection and culture of primordial germ cells from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*)

Reproductive Medicine and Biology, 6, 203-210, 2007

Nobuhiro Shimosawa, Hironori Okada, Masanori Hatori, Takashi Yoshida, Tadashi Sankai

Comparison of follicular growth stimulation methods for collecting mature oocytes from cynomolgus and African green monkeys

Theriogenology, 67, 1143-1149, 2007

## 2. 学会発表

Masanori Hatori, Hironori Okada, Nobuhiro Shimozawa, Fowzia Sultana, Ken-ichi Yagami, Tadashi Sankai

Comparison of the proliferation of embryonic stem (ES) cells, embryonic fibroblast of cynomolgus monkeys and the ES cells of mouse

16<sup>th</sup> International Workshop of Primate Diseases (Tsukuba, Japan) December, 2007

Nobuhiro Shimozawa, Masanori Hatori, Tadashi Sankai

Characterization and in vitro differentiation ability of an embryonic stem like cell line in the African green monkey (*Cercopithecus aethiops*)

16<sup>th</sup> International Workshop of Primate Diseases (Tsukuba, Japan) December, 2007

Shinichiro Nakamura, Sachi Okabayashi, Naohide Ageyama, Hiroshi Koie, Tadashi Sankai, Fumiko Ono, Koji Fujimoto, Keiji Terao

Transthyretin amyloidosis and two other aging-related amyloidoses in an aged vervet monkey

16<sup>th</sup> International Workshop of Primate Diseases (Tsukuba, Japan) December, 2007

Yoshitaka Ikeda, Hiroshi Koie, Kiichi Kanayama, Takeo Sakai, Mikiko Kobayashi, Miyako Kato, Keiji Terao, Tadashi Sankai, Naohide Ageyama

Establishment of echocardiographic reference values and effect of age on heart in cynomolgus monkey

16<sup>th</sup> International Workshop of Primate Diseases (Tsukuba, Japan) December, 2007

Koichi Kyono, Norio Owada, Tadashi Sankai

Cryopreservation of the entire ovary of cynomolgus monkey in a magnetic field environment

第 34 回日本低温医学会シンポジウム (札幌) 2007 年 11 月

Hiroshi Koie, Naohide Ageyama, Shinichiro Nakamura, Kiichi Kanayama, Takeo Sakai, Keiji Terao, Tadashi Sankai

Antemortem echocardiographic diagnosis of double chambered right ventricle (DCRV) in two cynomolgus monkeys

58<sup>th</sup> AALAS national meeting (Charlotte, NC, USA) October, 2007

(AALAS: American Association for Laboratory Animal Science)

Naohide Ageyama, Hiroshi Koie, Shinichiro Nakamura, Kiichi Kanayama, Takeo Sakai, Keiji Terao, Tadashi Sankai

Nonhuman primate model of severe heart failure associated with dilated cardiomyopathy

58<sup>th</sup> AALAS national meeting (Charlotte, NC, USA) October, 2007

(AALAS: American Association for Laboratory Animal Science)

石山昭彦、原田香奈子、三輪光春、福与恒雄、山下紘正、中山智里、宮本義孝、千葉敏雄、草野満夫、絵野沢伸、渡辺慎介、前田英樹、鹿山貴弘、山海直

TTTS 治療における胎盤血管観察のための蛍光内視鏡

第 5 回日本胎児治療学会 (大阪) 2007 年 10 月



本多 新、廣瀬美智子、井上貴美子、越後貫成美、三木洋美、脇阪紀子、下澤律浩、羽鳥真功、山海 直、小倉淳郎  
ウサギ ES 様細胞の樹立・培養の効率化と解析  
第 100 回日本繁殖生物学会（東京）2007 年 10 月

谷口遼馬、本橋秀之、山海 直、佐藤嘉兵、加田日出美  
成長途上卵母細胞の体外培養における組織の形態変化と成熟能について  
第 52 回日本生殖医学会（秋田）2007 年 10 月

廣瀬美智子、本多 新、井上貴美子、越後貫成美、三木洋美、脇阪紀子、下澤律浩、羽鳥真功、山海 直、小倉淳郎  
ウサギ ES 様細胞の樹立と解析  
第 24 回日本疾患モデル学会（つくば）2007 年 8 月

Tadashi Sankai  
A novel method for cryopreservation of ovarian tissue in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*)  
Organon sponsored special symposium, The 25<sup>th</sup> annual meeting of Japan society of fertilization and implantation (Sendai, Japan) August, 2007

Hideyuki H. Motohashi, Tadashi Sankai, Kahei Sato, Hidemi Kada  
Development of Mouse Fetal Germ Cells in vitro and in vivo: Organ Culture of Female Genital Ridges, Graft under the Kidney Capsule of SCID Mouse and Maturation in vitro of the Grown Oocytes  
25th Annual Meeting of Japan Hum Cell Society (Tokyo) August 2007.

Hideyuki H. Motohashi, Tadashi Sankai, Kahei Sato, Hidemi Kada  
Factors Affecting Morphological Changes and Oocyte Maturation in Preantral Follicles and Oocyte-Granulosa Cell Complexes during Culture in vitro  
25th Annual Meeting of Japan Hum Cell Society (Tokyo), August 2007.

遠藤圭介、持田慶司、大川美佳、三木洋美、羽鳥真功、山海 直、柏崎直巳、小倉淳郎  
マウスおよびウサギ未受精卵のガラス化保存法の検討  
第 54 回日本実験動物学会（東京）2007 年 5 月

下澤律浩、岡田浩典、羽鳥真功、山海 直  
カニクイザルにおける簡略化した卵胞発育誘起法の検討  
第 54 回日本実験動物学会（東京）2007 年 5 月

羽鳥真功、岡田浩典、下澤律浩、八神健一、山海 直  
カニクイザルおよびマウス胚性幹細胞の増殖様式の比較  
第 54 回日本実験動物学会（東京）2007 年 5 月

岡田浩典、下澤律浩、羽鳥真功、山海 直  
二種類のカニクイザル ES 細胞株へのリポフェクションによる遺伝子導入条件の検討  
第 54 回日本実験動物学会（東京）2007 年 5 月

揚山直英、鯉江 洋、中村紳一朗、金山喜一、酒井健夫、小野文子、寺尾恵治、山海 直  
霊長類拡張型心筋症モデルにおける基礎および臨床学的解析  
第 143 回日本獣医学会（つくば）2007 年 4 月

Kanako Harada, Mitsuharu Miwa, Tsuneo  
Fukuyo, Toshiro Chiba, Mitsuo Kusano,  
Shin Enosawa, Shinsuke Watanabe, Hideki  
Maeda, Takahiro Shikuyama, Tadashi  
Sankai

ICG fluoroscopy for the visualization of  
the placental vascular network  
feasibility study

26th Annual IFMSS conference (IFMSS:  
International Fetal Medicine and Surgery  
Society) (Dutch Aruba) April, 2007,

**H. 知的財産権の出願・登録状況**

なし

## 疾患モデルマウスの環境要因と 繁殖学的パラメーターに関する研究

分担研究者 松田潤一郎 独立行政法人医薬基盤研究所

生物資源研究部 研究リーダー

### 研究要旨

実験動物研究資源バンクにおける疾患モデルマウスの安定的な供給体制を整備するため、疾患モデルマウスの病態に応じた繁殖法の改良を目指し、環境要因が疾患発症と繁殖機能に及ぼす影響について検討を開始した。本年度は、低繁殖性を示す EL てんかんマウスについて、環境要因としての食餌が繁殖能力に及ぼす影響について検討したところ、高蛋白飼料より低蛋白飼料を与えた方が、個体当たりの出産回数、合計産仔数が増え繁殖効率が向上することが判明した。

### A. 研究目的

医薬基盤研究所実験動物開発研究室では、創薬・疾患研究への支援を目的に、実験動物研究資源バンクを設立し、疾患モデルマウスを中心に資源の収集・保存・提供・情報発信などを行っている。これらの疾患モデルマウスの中には繁殖が困難なマウスも多く、貴重な研究資源を安定的に供給する体制を整備するためには、病態や繁殖特性に応じた繁殖法の改良が必要である。そこで、本研究では、低繁殖性を示す疾患モデルマウスにおいて、環境要因が疾患発症と繁殖機能に及ぼす影響についてのデータを集積し、疾患モデルマウスの効率的な生産、維持指標を提供することを目指す。本研究によって、実験動物研究資源バンクから各種疾患モデル動物が安定的に供給されることで、創薬研究や治療法開発が推進され、ひいては国民の健康に貢献することが期待される。

本年度は、医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクで維持、供給しているモデルマウスのうち、低繁殖性を示す EL マウス（てんかんモデル）について、環境要因としての食餌が繁殖能力に及ぼす影響について検討した。EL マウスは、1954年に国立予防衛生研究所（現国立感染症研究所）にて自然発症脳水腫マウスの研究に見出されたアルビノのマウスである。抛り上げなどの体位変換刺激により容易にてんかん発作が惹起され、脳波などの研究から、ヒトの二次性全般化を伴う複雑部分発作（側頭葉てんかん）のモデルであると考えられている。EL マウスはてんかんの貴重なモデルマウスとして世界的にも有名であり、多数の研究機関で利用されている。しかし、EL マウスは過肥と雄の尿閉が認められ繁殖能力が低い。今回、特殊繁殖用の高蛋白飼料と長期飼育用低蛋白飼料の繁殖成績に対する影響を検討した。

## B. 研究方法

EL マウスの継代維持には、現在、高蛋白飼料（CMF、特殊系繁殖用、オリエンタル酵母工業）を用いており、これを対照群とした。一方、低蛋白飼料（CE-7、長期飼育用、日本クレア）を3世代にわたって投与した3世代目のELマウスを実験群とした。両群について、5週齢ELマウス兄妹を同居させ、15ペアの妊娠マウスを用意した。腹部の膨大によって妊娠を確認した時点で飼育ケージを約30度傾斜し飼育した。分娩を確認したケージには一切触れず、分娩後3～5日を経過した時点で傾斜飼育を解除し通常の飼育に戻した。6か月齢まで同居し、初産から3産目までの繁殖状況、てんかん発症などの観察を行った。

（倫理面への配慮）

動物実験については、動物実験委員会の承認を得、適切な取り扱いを行った。

## C. 研究結果

CMF及びCE-7投与のELマウス両群の繁殖成績を調べたところ、各産次の出産ペア数は15ペア中、CMF群：初産15ペア、2産目6ペア、3産目3ペア（1ペア当たりの出産回数1.6回）；CE-7群：初産15ペア、2産目13ペア、3産目6ペア（1ペア当たりの出産回数2.3回）であった。また、1ペア当たりの交配期間中の合計産仔数は、CMF群が9.8匹、CE-7群が14.2匹であった。以上の結果から、ELマウスにおいて高蛋白飼料より低蛋白飼料を与えた方が、個体当たりの出産回数、合計産仔数が増え繁殖効率が向上した。なお、てんかん発症については飼料による明らかな差は認められなかった。

## D. 考察

疾患研究・創薬研究には、適切な疾患モデル動物の利用が不可欠であるが、繁殖能力が劣るために十分に利用が進まず、研究

の進展を妨げていることがある。本研究では、実験動物研究資源バンクからの疾患モデルマウスの安定供給を目指して、ELてんかんモデルマウスの繁殖成績に及ぼす食餌の影響を検討した。

ELマウスにおいて、低蛋白飼料を与えた方が、高蛋白飼料を与えるよりも繁殖効率が明らかに向上した。ELマウスの雄は尿閉を発症するため、比較的早期に繁殖能力が低下すると考えられている。今回、低蛋白飼料投与によって尿閉発症が遅延、あるいは軽症化した可能性が考えられる。また、ELマウスは比較的肥満傾向を示すことから、低繁殖能が肥満の影響であるとすれば、低蛋白飼料により肥満傾向が改善されたことが、繁殖能力の改善をもたらした可能性もある。現在、尿閉の発症頻度、体重変化、血液生化学的検査値、病理学的変化などと繁殖能力との関連の検討を開始している。なお、てんかんの発症頻度、発症時期などには飼料による差異は認められなかった。従って低蛋白飼料投与は、ELマウスの疾患モデルとしての特性を保持したまま、繁殖能力の改善をもたらすと考えられた。疾患モデル動物は、疾患発症の影響で繁殖能力が低下することが多いが、疾患の発症には出来るだけ影響を与えない方法で繁殖力を高めることが望まれる。ELマウスへの低蛋白飼料投与はこの点でも優れた繁殖向上法と言えよう。

今後、ELマウスのみならず繁殖効率の著しく劣る疾患モデルマウスの病態進行と繁殖学的パラメーターとの関連について基礎データを集積することが必要であろう。また投与飼料の影響などを調べ、系統ごとの効率的繁殖方式を開発するなど、実験動物研究資源バンクからの安定供給体制の整備が望まれる。

## E. 結論

実験動物研究資源バンクにおける疾患モデルマウスの安定的な供給体制を整備するため、疾患モデルマウスの病態に応じた繁殖法の改良を目指し、環境要因が疾患発症と繁殖機能に及ぼす影響について検討を開始した。本年度は、低繁殖性を示す EL てんかんマウスについて、環境要因としての食餌が繁殖能力に及ぼす影響について検討したところ、高蛋白飼料より低蛋白飼料を与えた方が、個体当たりの出産回数、合計産仔数が増え繁殖効率が向上することが判明した。

## F. 健康危険情報

該当無し。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

該当無し

### 2. 学会発表

- 1) 高野薫、小浦美奈子、野口洋子、鈴木治、梶本健吾、松田潤一郎. 低蛋白飼料投与による EL てんかんモデルマウスの繁殖効率の改善。日本実験動物科学技術 2008、仙台（2008 年 5 月予定）

## H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

## 動物資源の安定供給に向けた繁殖および 品質管理技術の高度化に関する研究

分担研究者：鈴木 治（独）医薬基盤研究所生物資源研究部 主任研究員

### 研究要旨

ホルモン投与による誘起排卵で得られる排卵数のマウス系統差は胚の凍結保存や胚操作を実施する上で深刻な問題である。そこで、本研究ではマウス卵巣内卵胞数と性腺刺激ホルモン受容体の系統差を調べることにより効率的な卵胞刺激法を検討する。本年度は特に卵胞刺激ホルモン受容体（FSHR）に注目し、アミノ酸配列やFSHR mRNAの発現量と誘起排卵数との相関を調べたが、明確な相関は見られなかった。よってマウスの誘起排卵数の系統差は卵胞刺激ホルモンの影響よりも、むしろ排卵誘起に関わる黄体化ホルモンの影響が強いことが示唆された。

### A. 研究目的

動物資源の増産・系統保存は配偶子の使用を前提としており、配偶子、特に卵子・胚の安定供給をいかに実現するかが重要である。現在、マウス等の実験動物ではPMSG、hCGという性腺刺激ホルモンの投与により対象動物種の雌で過剰排卵を誘起して卵子・胚を得る方法が一般的であるが、図1に示すように（筆者の過去データの抜粋）、この方法は系統差が非常に大きく、卵子の安定供給という面では非常に問題があり、その解決法の開発が急務である。

卵胞発育およびその後の排卵は、卵胞刺激ホルモン（FSH）と黄体化ホルモン（LH）によって制御されており、排卵誘起ではFSH作用を持つPMSGとLH作用を持つhCGを用いて人為的に卵胞発育・排卵を誘起している。マウ

スにおける誘起排卵卵子数の系統差の原因として、これら2つのホルモンに対する反応性の違い、具体的にはホルモン受容体の系統差が考えられる。特にPMSGは馬由来、hCGは人由来の製剤であり、マウス以外の動物種から得られた性腺刺激ホルモンに対する反応性がマウスの系統によって異なる可能性がある。

そこで本研究ではFSH受容体（FSHR）およびLH受容体の系統差を調べることにより誘起排卵のマウス系統間差の解決を目指す。初年度である本年度は卵巣内卵子数の系統差について確認すると共に、FSHRについて、アミノ酸配列、発現量の系統差の有無を調べた。

## B. 研究方法

### 1) マウス

卵巣内体外成熟可能卵子数の調査には4系統の21日齢マウスを、FSHR mRNAの定量RT-PCRおよび卵巣重量の測定には6系統の4週齢雌より得た卵巣を、FSHRのアミノ酸配列の決定には12系統の成熟雄精巣を用いた。

### 2) 卵巣内成熟可能卵子数の調査

ホルモン投与を行っていない21日齢マウスの卵巣内の卵胞より、卵丘細胞に含まれた卵子を採取し、ピルビン酸、抗生物質、ポリビニルピロリドンおよびヒトリコンビナントFSH (Serono社)を添加したWaymouth培地にて17~18時間、37°C、5% CO<sub>2</sub>、5% O<sub>2</sub>、90% N<sub>2</sub>の気相下で培養し、培養後ピペッティングにより卵丘細胞を剥がし、卵核胞が崩壊した卵子数を成熟卵子数として記録した。1回の実験には4匹分の卵巣を用い、各系統につき3~7回の繰り返し実験を行った。

### 3) FSHR mRNAの定量RT-PCR

6系統の4週齢雌マウス、各5匹よりそれぞれ卵巣を回収し(RNeasy Mini Kit; Qiagen)、片側ずつから個体毎にTotal RNAを抽出し、逆転写酵素によりcDNAを合成し(QuantiTect Reverse Transcription キット; Qiagen)、FSHR mRNA用、およびGAPDH用のTaqMan Probe (ABI社)を用いてRealtime-PCR (QuantiFast Probe PCR キット; Qiagen およびABI Prism 7900HT; ABIを使用)により両者の発現量を測定した。

### 4) 卵巣FSHRのWestern Blot解析

3)で採取した卵巣より蛋白質を抽出し(ReadyPrep タンパク質抽出キット、総タンパク質用; Biorad)、4-12%BisTrisゲルとMESバッファ(Invitrogen)によるSDS-PAGEの後、PVDF膜(Pall社)へ転写し、転写総蛋白質の存在をSyproRuby Blot Stain (Invitrogen)による蛍光染色で確認後(FX-proにて撮影、Bio-rad)、一次抗体として抗FSHR抗体(Santa Cruz社SC-7798もしくはSC-13935)を、二次抗体としてPeroxidaseラベル抗ヤギIgG抗体(Jackson ImmunoResearch社)もしくはPeroxidaseラベル抗ウサギIgG抗体(Vector

Laboratories社)を用いて免疫染色を行った。視覚化には化学発光(ECL plus, GE社)を用い、CCDカメラ(LAS3000, FujiFilm)にて発光像を記録した。

### 5) FSHRのアミノ酸配列解析:

12系統の成熟雄マウス精巣からTotal RNAを抽出し(RNeasy Mini Kit)、逆転写酵素によりcDNAを合成し(Superscript III, Invitrogen)、GenBankより得たマウスFSHRの配列情報(Accession #: NM\_013523.2)を基にPrimer 3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi))でコーディング領域全体をカバーするように4区間のPCR用プライマーを設計し、それぞれPCRを行い、産物についてシーケンスし、オーバーラップ部分を基に連結して、コーディング領域全体を求め、アミノ酸配列に翻訳し、GENETYXソフトウェアV8(ゼネティックス社)によりアミノ酸配列を整列・比較した。

### 6) 統計処理

体外成熟卵子数、卵巣重量、およびFSHR mRNA発現量の系統差の有意差検定には分散分析の後、Tukey-Kramer法により各系統間の比較を行った(StatView for Windows Version 5, SAS Institute, Inc.)。棄却率を5%とした。

### (倫理面への配慮)

動物を用いた実験は、(独)医薬基盤研究所の動物実験規定に従って行った。

## C. 研究結果

### 1) 卵巣内成熟可能卵子数の調査

21日齢マウス4系統の卵巣より得られた成熟卵子数(4匹あたり)を図2に示す。系統間で有意差が見られる組み合わせもあるが、誘起排卵数との相関はないようであった。

### 2) 卵巣重量の系統差

図3に6系統分の卵巣重量を示す。卵巣重量は系統差が大きいが、卵巣重量が大きければ排卵数が多いというわけではなかった。

### 3) FSHR mRNA発現量の系統差

図4にFSHR mRNA発現量をC57BL6/Crを1とした相対値で示した。DBA/1とC57BL/6Crとの間にのみ有意差が見られたが、他の系統間には有意差はなく、誘起排卵数の系

統差との相関も低かった。

#### 4) FSHR 蛋白質発現の系統差

2種類の抗 FSHR 抗体を用いた Western Blot により、FSHR 蛋白質量の系統差の検出を試みた。しかし、両抗体とも2ロットずつ試行したが、マウス卵巣では良好な染色像が得られず(図5)、系統間の量的比較はできなかった。

#### 5) FSHR アミノ酸配列の系統差

12系統の FSHR の cDNA 配列を決定し、その配列からアミノ酸配列を求めた。図6にあるように調べた系統間で配列に差はなかった。なお、基準とした NM\_013523.2 由来アミノ酸配列には1アミノ酸の差異があった。

### D. 考察

本研究では、マウスにおける誘起排卵数の系統差が FSHR の量的・質的差異によるものかを検討するため、複数系統の FSHR アミノ酸配列、mRNA 発現量、蛋白質発現量を調べたが、どの点についても明確な系統差は見られなかった。それゆえ、卵胞発育に関与する FSH に対する感受性が誘起排卵時の系統差の原因とは考えにくいと思われる。

筆者の過去のデータ (Suzuki *et al.* *Reprod. Fertil. Dev.* 8:975-980, 1996) で、平均産仔数と誘起排卵数との間には相関がないことを既に報告している。今回、幼若期に生じる一過性の卵胞成熟(いわゆる First Wave)によって発育する卵胞から得られる体外成熟可能な卵子数を求めてみたところ(図2)、やはり誘起排卵数とは相関がなかった。人為的に誘起する卵胞発育・排卵と内因性因子による卵胞発育・排卵は、違うものと考えた方がよいと言える。

本研究では FSHR 蛋白量や受容体としての活性を測れていないので、この点は補強する必要があるだろう。

排卵誘起には FSH 作用を持つ PMSG のあと、LH 作用を持つ hCG を投与するので、この LH 作用に対する反応性に系統差があるのではないかと考えられる。次年度は、LH 受容体の系統差について検討する予定である。

### E. 結論

マウスにおける誘起排卵数の系統差は、FSHR のアミノ酸配列や mRNA 発現量には系統差はないことから、FSH 作用(卵胞発育)よりも、LH 作用(排卵)の系統差を考慮すべきであろう。

### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし。
2. 学会発表
  1. **Suzuki O**, Koura M, Takano K, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Aberrant turnover of collagen type VI in the hearts of transgenic mice harboring Gal $\beta$ 1,3 GalNAc  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase II (ST3GalII) transgenes. *Experimental Biology* 2007, Washington, DC., USA, 2007年4月。
  2. **鈴木治**, 小浦美奈子, 高野薫, 野口洋子, 内尾-山田こずえ, 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6型コラーゲンの減少. 第54回日本実験動物学会総会, 東京, 2007年5月。
  3. **Suzuki O**, Koura M, Takano K, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Sequence Analysis of the FSH Receptor in the Mongolian Gerbil. 89th Annual Meeting of the Endocrine Society, Toronto, ON, Canada. 2007年6月。
  4. **Suzuki O**, Koura M, Takano K, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Protein profiling of mouse oocytes matured in vitro during the first wave of folliculogenesis. 40th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, San Antonio, TX, USA, 2007年7月。
  5. **Suzuki O**, Koura M, Takano K, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Strain difference of 2410146L05Rik, an oocyte/embryo specific gene in mice. 58th National Meeting of the American Association for Laboratory Animal Science, Charlotte, NC, USA, 2007年10月。



6. **Suzuki O.** Sequence comparison of FSH-receptors among 12 mouse strains. 21st International Mammalian Genome Conference, 京都, 2007年10月。
7. **Suzuki O.** Koura M, Takano K, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Microarray Analysis of Gene Expression in Mouse Oocytes Matured in vitro during the First Wave of Folliculogenesis. 47th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, Washington, DC, USA, 2007年12月
8. **Suzuki O.** Koura M, Takano K, Noguchi Y,

- Uchio-Yamada K, Matsuda J. Production of Pups by Ovarian Transfer in the Syrian Hamster. 34th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Denver, CO. USA, 2008年1月。
9. 水町涼治、**鈴木 治**、村田勇二、松本貴博、那須昌弘、直弘、西勝英。4C30 マウスを用いた拡張型心筋症モデルとしての有用性の検討。第81回日本薬理学会年会, 横浜, 2008年3月。

**H. 知的財産権の出願・登録状況**

該当なし

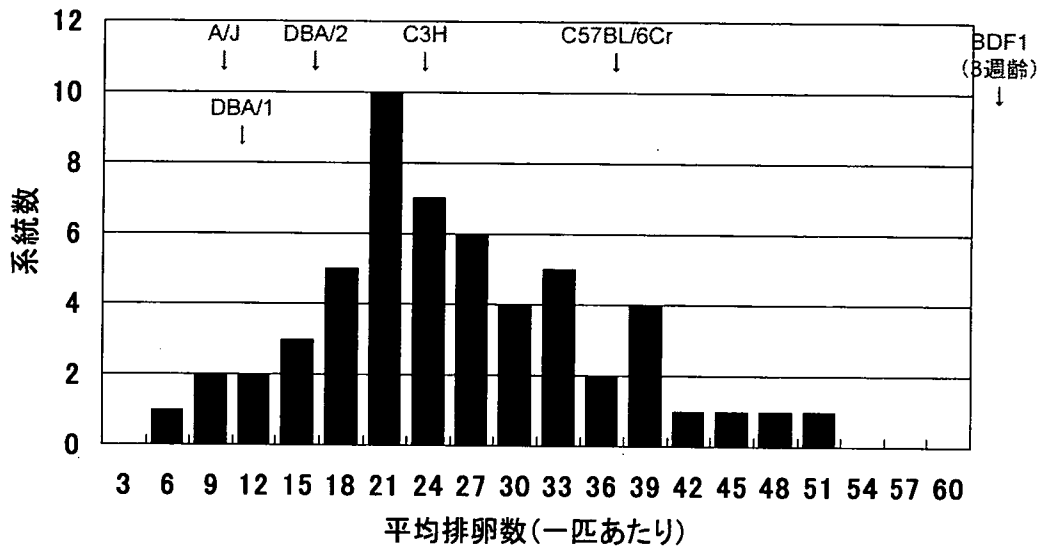


図1 PMSG (5iu) と hCG (5iu) 投与による4週齢マウス55系統の過排卵誘起成績。横軸に平均排卵数、縦軸にはその排卵数を示した系統の数を示している。今回の研究の背景データとして筆者の過去文献 (Suzuki *et al.* Reprod. Fertil. Dev. 8:975-980, 1996) より抜粋した。主な系統については具体的な排卵数を矢印で示した。BDF1系については当該論文中にはないため、3週齢での参考値を付け加えた。

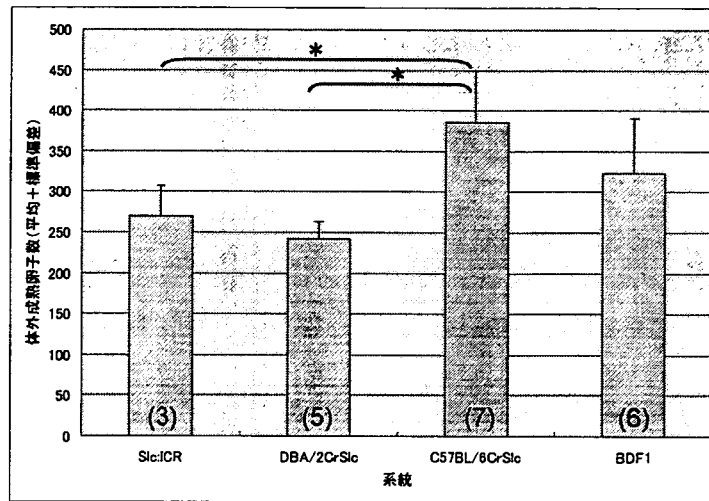


図2 21日齢雌マウス卵巣より得られた体外成熟卵子数。一回に4匹を使用した実験を括弧内の回数行い、グラフには1実験(4匹)あたりの平均値+標準偏差を示した。系統は左から誘起排卵数が少ない順に並べた。なお、一個体あたりに換算すると得られた体外成熟卵子数の平均は、Slc:ICR:67.6個、DBA/2CrSlc:60.5個、C57BL/6CrSlc:96.3個、BDF1:80.8個であった。\*はTukey-Kramer法により有意差があると判定された組み合わせを示す( $p < 0.05$ )。21日齢雌卵巣内の体外成熟可能卵子数と誘起排卵数との間に明確な相関があるとは考えにくいと思われる。

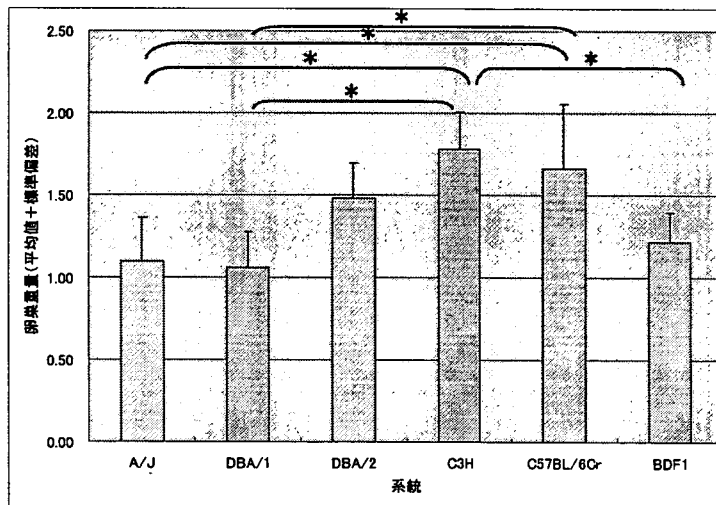


図3 4週齢の1個あたりの卵巣重量。定量RT-PCR用RNA抽出時に各系統でRNA Laterにて保存しておいた卵巣5個の重量を測定した(平均値+標準偏差)。系統は左から誘起排卵数が少ない順に並べた。\*はTukey-Kramer法により有意差があると判定された組み合わせを示す( $p < 0.05$ )。誘起排卵数が多い系統ほど卵巣重量が高いというような相関はないようである。

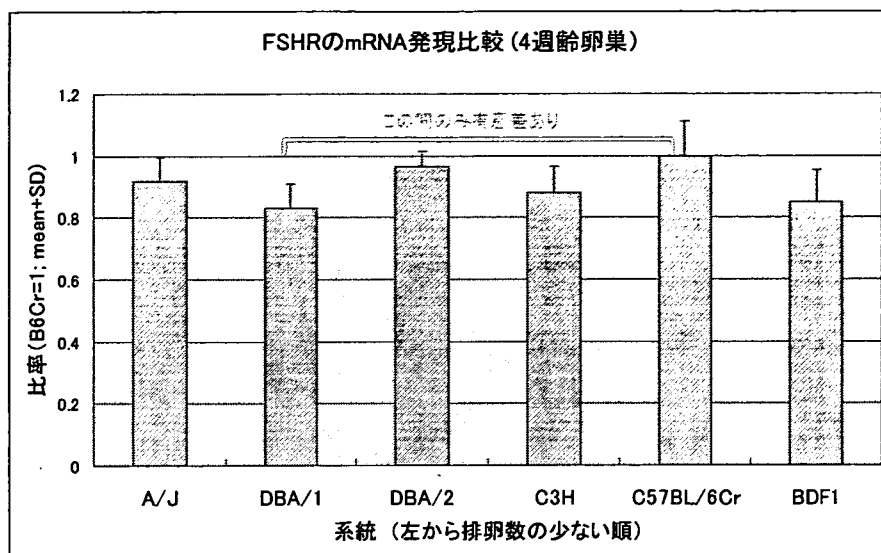


図4 マウス6系統のFSHR mRNAの発現量 (n=5, 平均値+標準偏差)。具体的にはFSHR mRNAの発現量をGAPDHを内部標準としてTaqMan Probeを用いたqRT-PCRにて測定し, C57BL/6CrSlc (B6Cr)の平均値を1として標準化した。系統は左から誘起排卵数が少ない順に並べた。DBA/1とC57BL/6Cr間にのみ有意差があると判定され (Tukey-Kramer法;  $p < 0.05$ ), 他の系統間には有意差がなかったことから, 誘起排卵数とFSHR mRNAの発現量との間に明確な相関があるとは考えにくいと思われる。

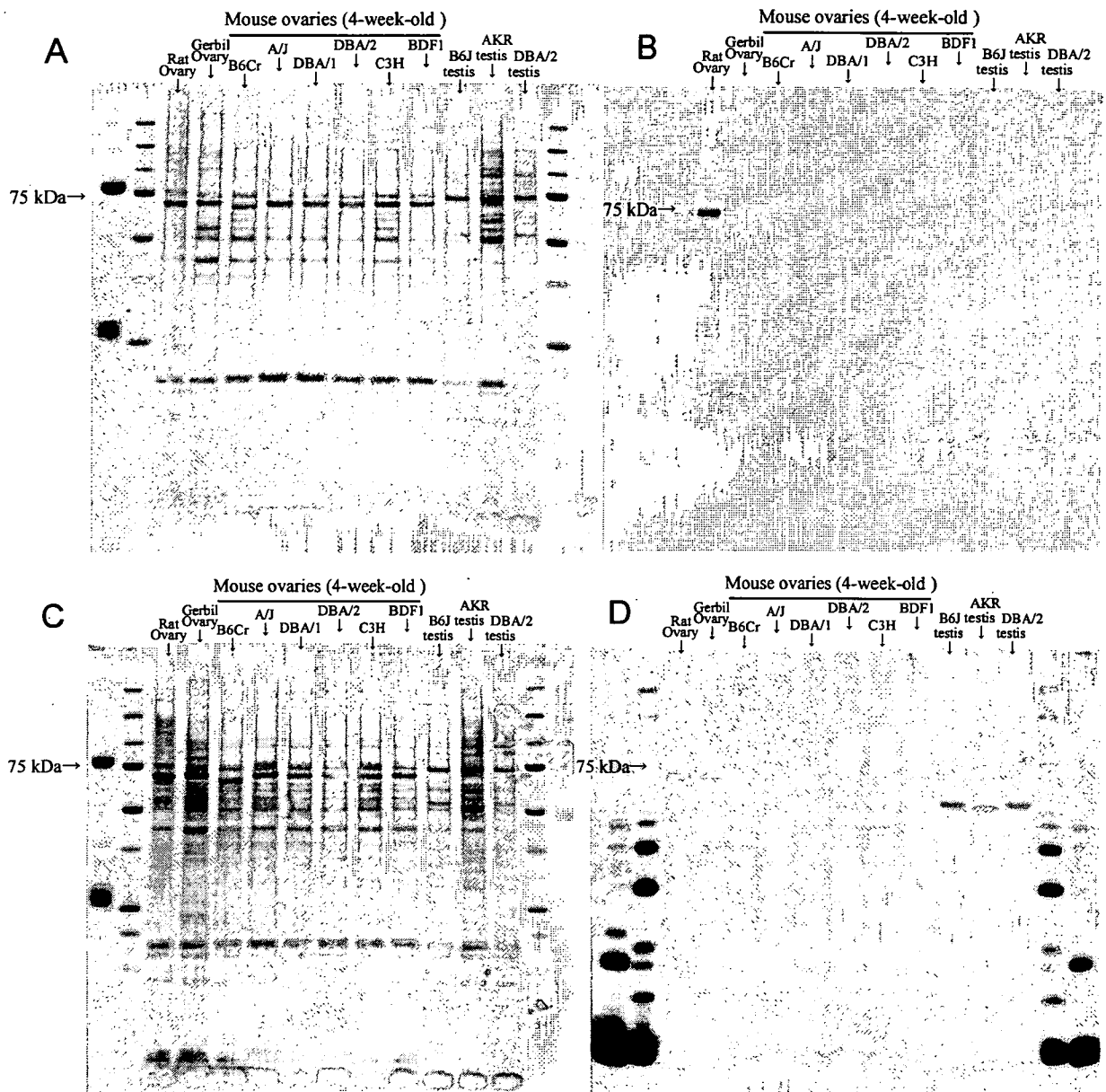


図5 FSHR の Western Blot 解析。A および C は、PVDF 膜に転写した蛋白質全体を染色する SyproRuby Blot Stain の像である。B は抗 FSHR 抗体 SC-7798 にて A で示した膜を、D は抗 FSHR 抗体 SC-13935 にて C で示した膜を免疫染色したものを示す。ラット (Rat) およびスナネズミ (Gerbil) 卵巣蛋白質を陽性対照として用い、さらに参考としてマウス 3 系統の精巣も追加した。しかし、SC-7798 はラットのみ、SC-13935 はラットおよびスナネズミ FSHR を認識するもの (70 KDa 付近)、両者ともカタログではマウス FSHR も認識すると明記されていたにもかかわらず、用いた 6 系統でマウス卵巣および精巣 FSHR を全く認識しなかった。なお、SC-7798 および SC-13935 で、それぞれ 2 つのロットで試したが、同じ傾向であった。泳動蛋白量は 1 レーンあたり約 2.5  $\mu$ g とし、分子量マーカーとして Precision Plus Protein Standard (Bio-Rad) を用いた。B6Cr: C57BL/6Cr, B6J: C57BL/6J。