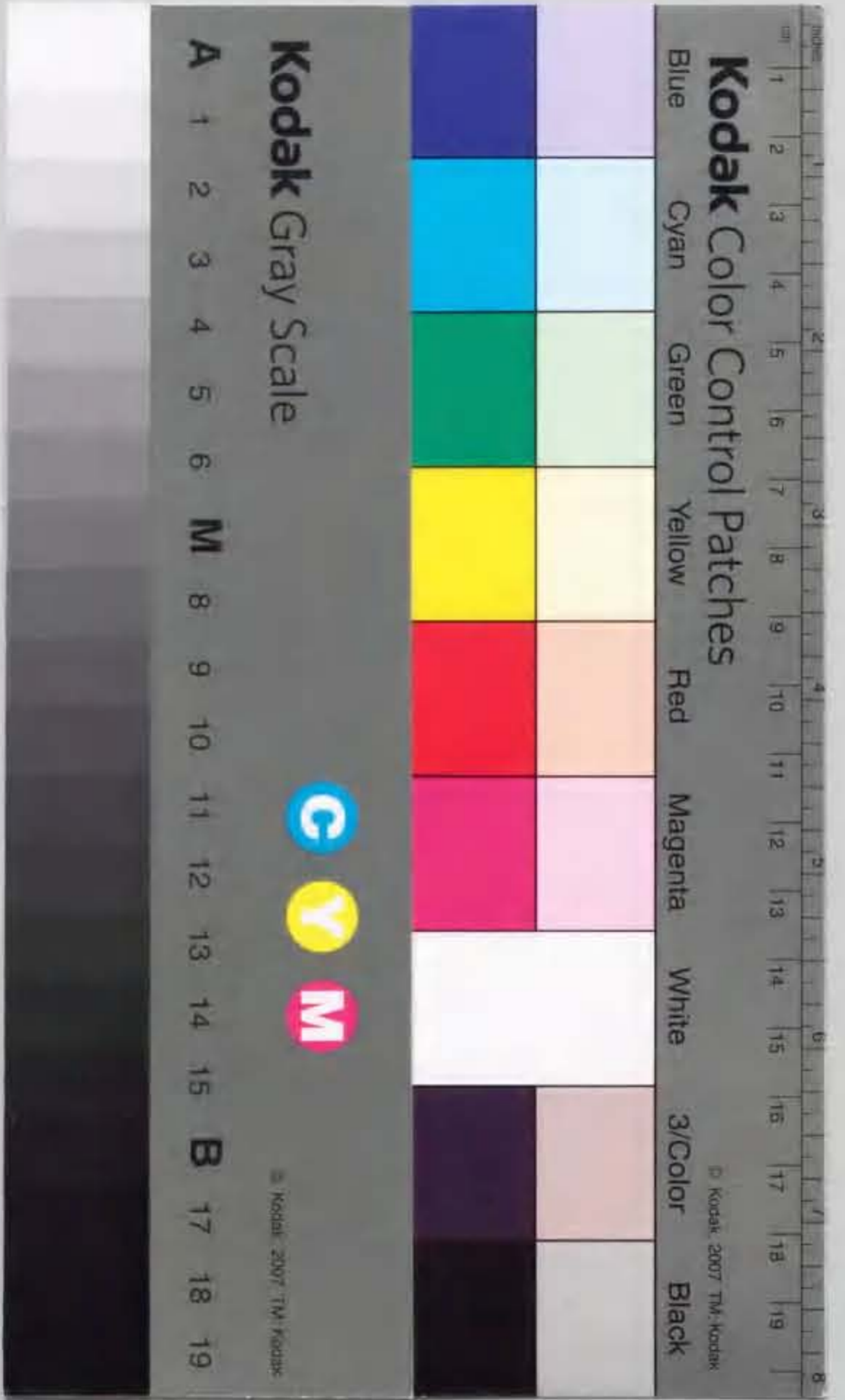


マウス胚操作技術の遺伝育種学  
ならびに発生学研究への応用

吉木 淳



報告番号 甲第 2794 号

①

マウス胚操作技術の遺伝育種学ならびに発生学研究への応用

吉 木 淳

# マウス胚操作技術の遺伝育種学ならびに発生学研究への応用

## 目次

第 I 章 序論 .....	1
1. マウス胚操作技術の歴史 .....	2
2. 胚凍結保存とキメラマウス .....	5
3. 本研究の目的と論文構成 .....	7
第 II 章 凍結マウス初期胚による系統及び突然変異遺伝子保存 .....	8
1. 緒論 .....	9
2. 材料と方法 .....	11
3. 結果 .....	16
( I ) 簡便凍結法による近交系および突然変異遺伝子保存の 可能性の検討 .....	16
1) 簡便凍結法の検討 .....	16
2) 性周期に同調したホルモン処理による胚採取成績 .....	16
3) 凍結融解後の胚の生存性の検討 .....	16
4) 凍結保存胚からの仔マウスの作成 .....	17
( II ) プログラムフリーザーを用いた凍結法による各種系統 および突然変異遺伝子の保存 .....	17
1) 各種系統および系統間交配における胚採取成績 .....	17
2) 各種系統および系統間交配における凍結融解後の 胚の生存性の比較 .....	17

3) 各種系統および系統間交配における凍結融解胚の 仮親へ移植後の生存性の比較 .....	18
4. 考察 .....	19
5. 要約 .....	21
付表 .....	23
第III章 キメラマウスの免疫組織学的解析法の検討 .....	29
1. 緒論 .....	30
2. 材料と方法 .....	32
3. 結果 .....	36
1) マイクロウェーブを用いた組織固定法の検討 .....	36
2) 胎仔組織のマイクロウェーブ照射固定 .....	36
3) 胎生期キメラマウスのキメリズム解析 .....	37
4. 考察 .....	38
5. 要約 .....	41
付表 .....	42
付図 .....	45
第IV章 キメラマウスを用いた小眼症遺伝子 (Elo) の 発生遺伝学的解析 .....	48
1. 緒論 .....	49
2. 材料と方法 .....	51
3. 結果 .....	53
1) 正常およびEloマウスの水晶体発生の経時的観察 .....	53
2) 正常およびEloマウスの水晶体発生における細胞増殖 .....	54

3) <u>Elo</u> 遺伝子の細胞増殖への影響の検討 .....	5 4
4) 正常および <u>Elo</u> とのキメラマウスにおける水晶体の観察 .....	5 5
5) 胎生期キメラ水晶体におけるキメリズムの解析 .....	5 5
4. 考察 .....	5 7
5. 要約 .....	6 1
付表 .....	6 2
付図 .....	6 6

#### 第V章 キメラマウスを用いた、ラボラトリーマウス系統と

野生マウス系統間交配における雄性不妊要因の解析 .....	7 2
1. 緒論 .....	7 3
2. 材料と方法 .....	7 5
3. 結果 .....	7 8
1) BNF1雄の交尾行動と精巣組織の観察 .....	7 8
2) BNF1とBALB/cの生殖細胞における増殖と分化の比較 .....	7 8
3) キメラを用いた雄性不妊要因の解析 .....	8 0
4) 各種近交系とNJL系統とのF1雑種雄における精巣組織の比較 ...	8 1
5) 雄性不妊要因とT遺伝子座との連関の可能性 .....	8 2
4. 考察 .....	8 4
5. 要約 .....	8 8
付表 .....	9 0
付図 .....	9 2

#### 第VI章 総合論議 .....

1. 凍結保存胚とキメラマウス実験系の普及 .....	9 9
-----------------------------	-----

2. キメラ研究の意義 .....	101
3. 集合キメラマウスを用いた応用的研究 .....	102
4. 外来遺伝子導入による細胞標識の試み .....	104
5. キメラマウスを用いた研究の今後の課題 .....	106
第VII章 総合要約 .....	108
謝辞 .....	114
引用文献 .....	115

## 第 I 章 序論



## 1. マウス胚操作技術の歴史

哺乳類の発生を研究する上で最初に直面する問題は受精、卵割から器官形成といった最も変化に富む過程が胎内で進行し、容易に観察できないことである。従って、これらの現象を体外で再現し、観察する必要性が強く認識された。まず、試みられたのは着床前の卵割期にある初期胚の体外培養であった。哺乳類胚で最初に体外培養に成功したのはウサギ胚で、Pincus (1936) により報告された。マウス胚の体外培養についてはJohn Hammond 2世 (1949) が最初に報告した。彼は8細胞期胚を胚盤胞にまで培養することに成功したが、2細胞期にとりだした胚は培養後直ちに死亡した。この問題を解決したのはWhitten (1956) で、彼はウシ血清アルブミンとKrebs-Ringer重炭酸ソーダ溶液を用いた培養液を開発し、1細胞期のマウス胚を胚盤胞期まで発生させることに成功した。

McLarenとMichie (1956) はマウス初期胚を卵管および子宮に移植する最適条件の検討を行い、体外培養した初期胚から仔マウスを作成することを可能にした。こうして、胚に加えた実験的操作がその個体の発生に及ぼす影響を調べるといふ、古典的な実験発生学の手法がマウスにも応用可能になった。そこで、Tarkowski (1961) は異なる2系統の胚を接着させることにより集合キメラマウスを作る事に成功した。さらに、Mintz (1964) により透明帯がプロナーゼにより消化される事が示され、比較的簡単な集合キメラマウスの作成法が確立された。こうした方法の確立と並び、多数にのぼるマウス近交系の存在、突然変異遺伝子を持つミュータント系統が豊富であることにより、キメラマウスを用いて実験的に、哺乳類の性の決定機構、生殖細胞の分化、免疫学、腫瘍のクローン性、突然変異遺伝子の作用点、細胞間相互作用、細胞系譜等、多様な問題に取り組むことが可能となった (McLaren 1976)。まもなくして、Gardnerは分離した胚細胞を宿主の胚盤胞へ注入してキメラマウスを作成する方法を報告し、着床期胚の細胞系譜の解析を試みた (Gardner, 1968)。

マウスの体外受精については、Whittingham (1968) の報告以来、詳細な条件の検討が行われ、比較的簡単な組成の培養液中で精巣上体精子を加える方法が確立された (Hoppe and Pitts, 1973)。これにより、発生時期のそろった受精卵を一度に多数作成したり、繁殖障害を伴うようなミュータントから仔を得る道が開かれた。さらに、Whittinghamら (1972) はマウス初期胚の凍結保存に成功した。一般に、単離・分散した細胞の凍結保存は可能であるが動物個体を凍結保存することは極めて困難である。そこで彼らは個体発生の開始間もない着床前胚に注目し、細胞数の少ないこの段階の胚であれば超低温で長期凍結保存が可能であることを示した。この方法は、マウス系統の保存法としてばかりでなく、一度に多数の胚を用いた実験を可能にする画期的方法としても期待された。

1975年にはテラトカルシノーマ (teratocarcinoma) を胚盤胞に注入することによりキメラマウスが作成された (Mintz and Imlensee, 1975)。さらに、全能性をもつ胚盤胞由来の正常2倍体細胞株 (ES細胞株、embryonic stem cell line) の確立が報告され (Martin, 1981; Evans and Kaufman, 1981)、胚盤胞に注入することによりこれら培養細胞をキメラマウス個体の生殖系列に効率良く組込むことが可能となった。そこで、ES細胞株は、培養細胞における遺伝子導入の手法を応用して、新たなトランスジェニックマウス作出の経路として利用され始めた。

1980年代にはいと、組替えDNA技術が広まり、特定の遺伝子を直接培養細胞に注入して発現させ、その遺伝子の機能を解析する試みが始められた (Capecchi, 1980; Anderson et al. 1980)。この成果を受けてGordonら (1980) はクローン化した遺伝子をマウス受精卵の前核に注入し、その遺伝子が発生した仔マウスのゲノムに組み込まれることを示した。さらに、Wagnerら (1981) はウサギの $\beta$ -globin遺伝子を、Brinsterら (1982) はHerpes simplex virusのチミジンキナーゼ遺伝子をそれぞれマウス受精卵前核に注入し、発生したマウス個体内

でそれら導入遺伝子が発現し、さらに蛋白合成が行われることを示した。

現在では、受精卵前核への遺伝子注入およびES細胞株への遺伝子導入によりトランスジェニックマウスが作成され、生体における遺伝子の発現調節機構や機能の解析に用いられている (Hogan et al. 1986; Rossant, 1991)。特にES細胞では、培養細胞であることの利点を生かして、特定の遺伝子に相同組換えによる突然変異を効率よく導入することが可能で、遺伝子導入をしたES細胞を用いてキメラマウスやトランスジェニックマウスを作成することにより、その遺伝子の機能を解析する試みがなされている (Rossant, 1991; Lee et al. 1992; Li et al. 1992; Moens et al. 1992)。また最近、始原生殖細胞からの多分化能細胞株の樹立とキメラマウス作成が報告されて (Matsui et al. 1992)、新たな遺伝子導入・動物個体作成の経路が示され、今後の研究が注目されている。

## 2. 胚凍結保存とキメラマウス

医学・生物学の分野でマウスを用いた研究が大きな成果をおさめてきたのは、多数の近交系とミュータント系統の育成と維持があったからだと言える。これらの系統は、それぞれの研究目的にかなった実験動物として育成されてきたものや、将来的に有用になることが予想されて育成されてきたものばかりで、いずれも個体として保存されている貴重な遺伝子資源である。さらに、最近では、次々に作り出されるトランスジェニックマウスを新たな系統として保存する必要も生じてきた。初期胚の凍結保存技術は、増え続ける系統の維持のために生ずる経済的問題や飼育スペースといった物理的な問題を解決すると同時に、一連の胚操作技術を用いた実験系をより効率良く進める上で極めて利用価値が高いと思われる。安定した胚凍結保存技術ならびに凍結保存胚の利用性を検討することは今後の遺伝育種学、発生学を基礎とした応用的研究の進展に大きく寄与すると考えられる。

また、ここ10年近くで遺伝子操作技術の著しい進歩がみられ、ヒトやマウスの数多くの遺伝子が単離されつつある。今後の大きな研究課題として、これらの遺伝子の生体における発現調節機構や遺伝子の機能の解析が求められている。先に述べたように最近ではES細胞に目的とする遺伝子を導入し、遺伝子導入されたES細胞を用いてキメラ個体を作成することができる。こうしたキメラ個体の組織では正常胚由来の細胞と遺伝子操作を加えられたES細胞に由来する細胞とが共存しており、組織を構成するそれぞれの細胞の由来が同定されれば、導入した遺伝子の機能や細胞間相互作用の解析のための格好の材料となる。しかしながら、今日まで、細胞の系統由来を同定する優れた標識方法がなかったためにキメラマウスを用いた応用的研究は極めて限られた臓器でしか行うことができなかった。近年、Kusakabeら(1988)によってC3H系統特異的抗体が作成されキメリズムの組織学的解析が可能である事が示された。この方法は既存の代表的近交系に内在する物質を標識とする点、および、利用可能な組織がはば広いことを特徴とし、組織

・細胞レベルでのキメリズム解析法として幅広い応用の可能性を持つと思われる。

以上の様に、分子生物学の発展にともない生体における遺伝子機能の解析が必要となった現在、胚操作技術のなかでもとりわけ胚凍結保存技術の確立とキメラマウスの作成法および解析法の重要性があらためて認識されはじめた。

### 3. 本研究の目的と論文構成

本研究の目的は、マウス胚操作技術の遺伝育種学ならびに発生学研究への応用を目指して、応用範囲の広い胚凍結保存とキメラマウスをとりあげ、凍結胚による系統および突然変異遺伝子保存の可能性を検討し、C3H系統特異的抗体を用いて、マウス発生の初期から生後にいたる様々な組織に応用可能な免疫組織学的キメラ解析法を確立すると共に、その方法の発生遺伝学的研究への応用を検討し、キメラマウスを用いた応用的研究の今後の方向を議論する事である。

そして、本論文の構成は次のようである。第II章では、凍結マウス初期胚による系統および突然変異遺伝子保存の可能性を検討した。第III章では、C3H系統特異的抗体を用いたキメラマウスの免疫組織学的解析法の検討を行った。第IV章及び第V章では、同方法を用いたキメラマウス解析の例として、小眼症マウス (Elo) の解析と系統間交配F1雑種にみられる雄性不妊要因の解析をとりあげて、それぞれ、マウスの水晶体および性腺の発生過程における細胞の増殖・分化・細胞間相互作用と遺伝子発現に関する研究について記述した。第VI章では、胚凍結保存とキメラマウスを用いた研究の今後の課題について総合的な議論を行い、以下の5点について考察した。1. 凍結保存胚とキメラマウス実験系の普及、2. キメラ研究の意義、3. 集合キメラを用いた応用的研究の可能性、4. 外来遺伝子導入実験における細胞標識法の現状と問題点、5. キメラマウスを用いた研究の今後の課題。

## 第II章 凍結マウス初期胚による系統および突然変異遺伝子保存

## 1. 結 論

哺乳類の凍結胚より産仔を得た最初の例は、1972年にマウスを用いた Whittingham らの報告である。その後、ラット (Whittingham, 1975)、ウサギ (Whittingham and Adams, 1976)、ヒツジ (Willadsen et al, 1976)、ウシ (Wilmut and Rowson, 1973) 等でも凍結胚から正常仔を得ることに成功している。安定したマウス胚の凍結保存技術が確立され、多数にのぼる系統に応用可能となれば、各種細胞株で行われている細胞銀行 (Cell Bank) と同様に、胚銀行 (Embryo Bank) を確立することも可能である (Festing, 1981)。凍結胚の利点として、以下の事項があげられる。

- (1) さしあたり必要でない系統や突然変異遺伝子を経済的に保存できること。
- (2) 病気・事故・繁殖力低下などによる系統の絶滅を防ぐこと。
- (3) 一度に多数の胚をもちいる研究を可能にすること。
- (4) 動物輸送の簡易化。
- (5) 継代維持過程でおこる突然変異や人為的ミスによる遺伝的コンタミネーションを防ぐこと。

胚の凍結保存とその利用は次の4段階よりなる。

- (1) 胚の採取。
- (2) 胚凍結と液体窒素中での保存。
- (3) 融解と培養。
- (4) 仮親への移植による仔マウスの作成。

胚採取の際に、一度に多数の胚を得るために、PMSGとhCGを投与して過排卵を誘起する方法が用いられているが、系統によりホルモン感受性が著しく異なり (Hogan et al, 1986)、系統によっては必ずしも多数の正常胚が得られない場合も予想される。また、凍結・融解といった急速な温度変化、浸透圧変化に対する各系統の胚の反応性については殆ど調べられていない。さらに、仮親への移植後の



胚の生存性については、胎仔と母体との相互作用など、未知の要素が多く含まれている。従って、凍結保存胚から系統を再確立したり、実験材料として有効に利用するためには各種系統から得た胚のそれぞれの段階における生存性を十分に検討する必要がある。

胚凍結に用いる装置については、比較的安価な器具を組合わせてマニュアル操作で冷却速度を制御する方法が考案されている (Leibo and Mazur, 1978)。一方では、一連の冷却過程をコンピューターにより制御できるプログラムフリーザーが開発・供給されており、胚凍結の目的や規模に応じて、それぞれの冷却装置の利点を生かした利用法を確立する必要がある。

そこで、本研究では、(I) マニュアル操作による簡便凍結法の検討を行い、7系統および1系統間交配における胚の採取成績と凍結融解後の胚の生存性を調べ、凍結胚によるマウス系統ならびに突然変異遺伝子保存の可能性を検討し、さらに、(II) プログラムフリーザーを用いた凍結方法により、各種系統より採取した胚の凍結融解後の生存性を比較検討した。

## 2. 材料と方法

### (I) マニュアル操作簡便凍結法による胚凍結保存

#### 1) マウス系統

用いたマウス系統は名古屋大学農学部家畜育種学教室にて維持されていたDNI, DDN, BS, C57BL/6, DBA/2, CRN, PAN, C57BL/6-A<sup>y</sup>/+であった。DNIおよびDDN系統はドイツより輸入されたddマウスを起源とする近交系で、それぞれ、兄妹交配20代、28代で実験に用いた。BS系統はIXBL系統から分かれた亜系統で兄妹交配77代で用いた。IXBL、C57BL/6およびDBA/2の特徴については、Staats (1976) により記述されている。CRN系統は尾曲がり系統で、Kasukabe groupに属するマウスで見いだされた尾曲がり形質の個体より選抜・育成され、兄妹交配58代で使用した。PAN系統はC57BL/6とファンシーマウスとの交雑群より育成された pink-eyed dilution (p) 遺伝子を持つ近交系で兄妹交配40代で実験に用いた。C57BL/6Nga-A<sup>y</sup>/+はA<sup>y</sup>遺伝子をC57BL/6系統に戻し交配によって導入したコンジュニック系統で戻し交配50代で使用した。

マウスは17×24×12 cmの木製ケージにて飼育し、雄は単飼、雌は4~6匹で群飼した。餌は市販のニワトリ用試料(日本農産株式会社)とマウス用標準試料(オリエンタル酵母株式会社)を与え、水は自由摂取させた。室温と照明のコントロールは特に行わなかったが、冬季は室温が10℃以下にならぬように暖房をいれた。

#### 2) 初期胚の採取

各系統とも60-150日齢の雌にホルモンを投与して胚の採取に用いた。ホルモン投与のタイミングは雌の性周期に同調する様に行った。すなわち、雌の性周期を膣垢により調べ、白血球および角化細胞の両者が見られる発情休止期の始めに5-10IUのpregnant mare's serum gonadotropin (PMSG、ピーメックス; 三共) と、5-10IUのhuman chorionic gonadotropin (hCG、ゴナトロピン; 帝国臓器) を48時

間間隔で腹腔内投与した。hCG注射後ただちに雄と同居させ、翌朝陰栓の有無を確認した。hCG注射後70-74時間後に卵管を磷酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline, PB-1) (Quinn et al. 1982) で灌流して胚を採取し、形態的に正常な8-16細胞期の胚を選び凍結実験に用いた。

### 3) 胚凍結装置

凍結装置はLeiboら (1978) の記述に従って同様のものを組み立てた。

### 4) 凍結融解法

10-30個の胚を0.15mlのPB-1の入ったガラスバイアル (3ml, 15 X 50mm; Pyrex) に移した。数分後、バイアルを氷上に置き、dimethylsulfoxide(DMSO) を3Mの濃度で含むPB-1、0.15mlを徐々に添加し、最終濃度1.5Mで平衡させた。バイアルは15分間0°Cで静置した後、あらかじめ-7°Cにしておいたエタノール槽に移した。3分後、液体窒素中で冷やしたピンセットで、バイアルのPB-1溶液面のやや上部にあたる部分に触れて植氷を行った。

本実験では以下の3種類の簡便凍結法について、凍結融解後の胚の生存性を比較した。まず2-step法 (Wood and Farrant, 1980) では、植氷後バイアルを-20°Cで15分間静置した後、ただちに液体窒素中へ保存した。Modified 2-step法では、植氷後のバイアルを-20°Cのエタノール槽に移し、-20°Cから-35°Cまで毎分0.6°Cの速度で徐々に冷却し、-35°Cから液体窒素中へ移した。Modified slow法 (Whittingham et al. 1977) では、-7°Cから-20°Cまでを毎分0.6°Cの速度で、-20°Cから-35°Cまでを毎分1.0°Cの速度で冷却し、その後液体窒素中で保存した。

サンプルの融解はバイアルを40°Cの温水中に浸漬することにより急速に行った。DMSOの希釈は室温でPB-1を1分間隔で0.5ml、0.5ml、1.0ml添加することにより行った。回収した胚はM2溶液 (Hogan et al. 1986) で洗浄して形態的観察の後、同

培養液をもちいた微小滴培養法にて24時間培養した。

#### 5) 凍結融解胚の仮親への移植による仔マウスの作成

培養により桑実胚・胚盤胞へ発生した胚は、偽妊娠した仮親雌の子宮へ移植して仔マウスへの発生を調べた。仮親への移植はYokoyamaら(1981)の方法に従った。仮親としてはDNI系統を使用した。

### (II) プログラムフリーザーによる胚凍結保存

#### 1) マウス系統

用いたマウス系統はJc1:MCH (MCH), C57BL/6Njcl (C57BL/6N), BALB/cAJcl (BALB/cA), C3H/HeNjcl (C3H/HeN), DBA/2Njcl (DBA/2N), 129/Sv, BALB/cCrSlc (BALB/cCr), CL/Fr, C3Hf/HeNem-Elo/+, C57BL/6Nga-W<sup>v</sup>/+, MOL-Aおよび(C57BL/6N X C3H/HeN)F1 (B6C3F1), (C57BL/6N X DBA/2N)F1 (BDF1), (DBA/2N X PAN)F1 (DPF1)であった。MCH、C57BL/6N、BALB/cA、C3H/HeN、DBA/2Nは日本クレアから購入した。BALB/cCrはエス・エル・シー株式会社より購入した。CL/FrおよびC3Hf/HeNem-Elo/+は名古屋大学環境医学研究所で維持されていたものを用いた。CL/Fr系統は口蓋裂発生系統として、C3Hf/HeNem-Elo/+ (Oda et al. 1980a, b) は小眼症系統としてそれぞれ知られている。129/Sv、C57BL/6-W<sup>v</sup>/+, MOL-Aは名古屋大学農学部家畜育種学教室にて維持されていたものを用いた。MOL-A系統は日本産野生マウス由来の系統で近親交配18代で実験に用いた。また、系統間交配により(C57BL/6N X C3H/HeN)F1 (B6C3F1)、(C57BL/6N X DBA/2N)F1 (BDF1)、(DBA/2N X PAN)F1 (DPF1)を作成して用いた。

これらのマウスは室温24±1℃、平均湿度60%、14L:10Dの照明条件下で飼育した。雌マウスは215 X 320 X 130mmのプラスチックケージ(日本クレア)に5-6匹群飼し、雄は115 X 260 X 145mmのプラスチックケージ(日本チャールズリバー)に単

飼し、固形試料 (CA-1; 日本クレア) と水を自由摂取させた。

## 2) 初期胚の採取

MCH、C57BL/6N、BALB/cA、C3H/HeN、DBA/2N、129/Sv、BALB/cCr、CL/Frでは、6-10週齢の雌を用いて自然交配およびホルモン処理により胚採取を行った。このホルモン処理群では雌の性周期は考慮せず任意の個体を選んで用いた。また、DDN、B6C3F1、BDF1、DPF1では、4-5週齢の幼若雌にホルモンを投与して胚採取に用いた。B6C3F1雌はB6C3F1、C3Hf/HeNem-Elo/+およびC57BL/6Nga-W<sup>+</sup>/+の雄と交配して胚を得た。BDF1雌はBDF1およびMOL-Aの雄と交配した。DPF1雌はDPF1雄と交配した。ホルモン投与の方法はすべて以下のように行った。まず、午後4時に5IUのPMSGを腹腔内投与し、その48時間後に5IUのhCGを投与して、ただちに雄と同居させた。翌朝膣栓の確認をして64-66時間後に胚を卵管より採取した。形態的に正常な4細胞期、8細胞期およびコンパクション (compaction) を起こし始めた胚を凍結に用いた。

## 3) 胚凍結装置

エタノール槽式のプログラムフリーザーBF211 (タバイエスベック) を用いた。植氷はマニュアル操作にて先に述べた方法で行った。

## 4) 凍結融解法

胚採取からDMSOの添加までは (1) 4) で述べた要領で行った。胚を入れたバイアルをあらかじめ-7°Cに冷却しておいたフリーザーのエタノール槽へ移し数分後に植氷を行った。以下の2種類の凍結プログラムをおこなった。第一は、-7°Cから-35°Cまで毎分0.3°Cの速度で冷却し、その後液体窒素中へ移す方法で、第二は、-7°Cから-70°Cまで毎分0.3°Cの速度で冷却し、液体窒素中で保存する方法で

ある。

融解は40℃の温水中で急速に行った。DMSOの希釈はsucroseを0.25Mの濃度で含むPB-1溶液に胚を移して室温で10分間静置して行い、続いてM2に浸漬して復水させ、形態の観察を行ってから、M16培養液 (Hogan et al. 1986) で洗浄し、同培養液中で24時間培養した。

#### 5) 凍結融解胚の仮親への移植による仔マウスの作成

胚移植の方法はHoganら (1986) の方法に従い、MCHを仮親系統として用いた。

#### 6) 統計処理

平均値の差はStudent's t-testにより、頻度の差についてはカイ2乗検定によりそれぞれ調べた。

### 3. 結果

#### (I) 簡便凍結法による近交系および突然変異遺伝子保存の可能性の検討

##### 1) 簡便凍結法の検討

DNI系統の胚を用いてマニュアル操作による3種類の簡便凍結法を比較したところ、表II-1に示すようにModified 2-step法による凍結融解後の胚の生存率が最も高かった。一方、2-step法では、回収直後の正常胚数の割合が最も低く、凍結融解過程で多くの胚が破壊されたことを示している。以下の各種系統胚の簡便凍結法による生存性の検討にはModified 2-step法を用いた。

##### 2) 性周期に同調したホルモン処理による胚採取成績

表II-2に7系統と1系統間交配におけるホルモン処理後の交尾率、採取胚数および正常な8-16細胞期の胚数を示した。交尾率は系統により異なり、DNIで最も高く(94.1%) DDNで最も低かった(50.0%)。採取胚数も系統により異なり、系統間交配(DNI X C57BL/6-A<sup>y</sup>)で最も多く(36.2±5.8)、PAN系統で最も少なかった(20.2±2.7)。正常な8-16細胞期の胚数は、系統間交配(DNI X C57BL/6-A<sup>y</sup>)で最も多く(21.7±2.6)、C57BL/6およびPAN系統で比較的少なかった(12.9±1.6および13.7±1.9)。

##### 3) 凍結融解後の胚の生存性の検討

表II-3にModified 2-step法による近交系および系統間交配における胚の凍結融解後の生存性を示した。胚の回収率は何れも80%以上であった。正常胚の割合はDDNで最も高く(89.1%) PANで最も低かった(37.0%)。胚発生率についても同様の傾向がみられ、DDNで最も高く(71.9%) PANで最も低かった(17.4%)。

#### 4) 凍結保存胚からの仔マウスの作成

凍結融解胚を用いて仔マウスの作成を試みたところ、DNIで雌2匹、雄4匹、DDNで雌2匹、雄2匹、BSで雌2匹、雄2匹の産仔がそれぞれ得られた。この結果より簡便凍結法によるマウスの系統保存の可能性が示された。DBA/2とCRNでは出産にいたる仔マウスが見られたが間もなく食殺された。C57BL/6の凍結融解胚からは産仔は得られなかった。PAN系統の胚は移植に用いなかった。また、DNI X C57BL/6Nga-A<sup>y</sup>/+の凍結融解胚からも仔マウス(雌2匹、雄4匹)が得られ、内5匹は黄色マウスであったことから、簡便凍結法により突然変異遺伝子の保存が可能であることが示された。

#### (II) プログラムフリーザーを用いた凍結法による各種系統および突然変異遺伝子の保存

##### 1) 各種系統および系統間交配における胚採取成績

表II-4に各種系統および系統間交配における胚の採取成績を示した。6-10週齢の雌を用いた場合、ホルモン処理の効果は系統により大きく異なった。C3H/HeN、DBA/2Nではホルモン処理により採取正常胚数は著しく増加したが、C57BL/6N、BALB/cAでは逆に減少する傾向が見られた。交尾率についても系統により大きな差があった。4-5週齢の雌にホルモン処理を施したDDNおよび各種F1では、何れも高い交尾率と比較的多くの正常胚が得られた。正常胚のうち、4細胞期、8細胞期およびコンパクションを起こし始めた胚の占める割合は系統により異なっていた(表II-5参照)。

##### 2) 各種系統および系統間交配における凍結融解後の胚の生存性の比較

表II-5に凍結融解胚の生存性を示した。回収率は88%から100%と高く、正常胚の割合も58.3%から87.5%と安定した結果が得られた。24時間培養後の胚発生率に



についても、DBA/2Nで著しく低く(43.0%)、129/Svでやや低い(57.1%)傾向が見られた以外は、いずれも70%以上の高い発生率が得られた。

### 3) 各種系統および系統間交配における凍結融解胚の仮親へ移植後の生存性の比較

表II-6に各種凍結融解胚の仮親へ移植後の仔マウスへの発生率、および得られた仔マウスの離乳後の繁殖性を示した。用いたすべての系統および系統間交配において凍結融解胚から仔マウスが得られ、しかもこれらのマウスは離乳後同腹仔同士の交配により繁殖可能であることが確認された。移植後の発生率はDBA/2NやBALB/cAで低く(15.0%および17.7%)、MCH、B6C3F2、DPF2、B6C3F1 X C57BL/6-W<sup>+</sup>/+、BDF1 X MOL-A等の交雑胚で比較的高かった(51.2%~64.2%)。

以上の結果より、プログラムフリーザーを用いた本凍結法により各種系統および突然変異遺伝子を安定して凍結保存できることが示された。

#### 4. 考 察

簡単な装置による簡便凍結法と市販のプログラムフリーザーを用いた凍結法により各種マウス近交系および突然変異遺伝子保存を試みた。まず、簡便凍結法では、簡単な装置を用いて、約20分の凍結過程で操作を完了できるModified 2-step法を開発した。7近交系と1系統間交配より採取した初期胚をこの方法により凍結保存し、融解後、胚の生存性を調べたところ胚発生率には系統差が見られた。凍結融解後、桑実胚・胚盤胞に発生した胚を仮親へ移植したところDNI、DDN、BS系統の胚より産仔が得られ、またF1胚(DNI X C57BL/6Nga-A<sup>y</sup>/+)より5匹の黄色マウスが得られた。以上の結果、簡便なModified 2-step法により数系統のマウスおよび突然変異遺伝子の凍結胚による保存が可能であることが示された。さらに、プログラムフリーザーを用いた凍結法により、より安定した胚の生存性が得られ、9系統と5組の系統間交配において凍結融解胚より仔マウスを得ることができた。これらマウスの繁殖性も正常であることが確かめられ、凍結胚による系統および遺伝子保存が多くの系統に適応可能であることが示された。

簡便凍結法、プログラムフリーザーを用いた凍結法のいずれでも融解後の胚生存率に系統差が見られ、凍結融解過程における温度変化や浸透圧変化に対する反応性に系統差のあることが示唆された。表II-5で示した様に、系統によって凍結時点における発生ステージが異なっており、この差が凍結融解に対する耐性の差として現れた可能性がある。その他の要因については今後さらに究明する必要がある。

採取胚数を多くするためにホルモン処理を試みたが、その効果は系統、雌の週齢、ホルモン投与のタイミングにより異なっていた。6-10週齢の雌を任意に選びPMSGとhCGを投与した場合、MCH、C3H/HeN、DBA/2Nでは自然交配時よりも採取正常胚数が増したが、C57BL/6NおよびBALB/cAでは逆に減少した(表II-4)。発生遅延胚、形態異常胚を含めた総採取胚数でも同様の傾向が見られたので、これは雌

の外因性ゴナドトロピンに対する反応性の系統差であると考えられた。一方、性周期をあらかじめ調べ、性周期に同調したホルモン処理を施した場合（表Ⅱ-2）、いずれも高い交尾率と正常胚数が得られた。この方法は繁殖力の低い系統や貴重な系統から胚を採取する確実な方法として有効だと思われる。これらの結果から、性周期にかかわらずランダムに雌を選択してホルモン投与した場合、内因性および外因性ゴナドトロピンの両者の作用が同調すれば効果が大きく、同調しなかった場合には逆に正常胚数が減少すると考えられた。未成熟雌にホルモン処理を施した場合は、顕著な内因性ゴナドトロピンの周期的変化がまだないので、投与したホルモンの効果が端的に現れたと思われる（表Ⅱ-4）。しかしながら、過排卵処理は異常な卵子形成や染色体異常を引き起こすことも報告されており（Lockett and Mukherjee, 1986）、今後、自然交配より得た胚とホルモン処理により得た胚の発生能および凍結融解後の胚生存性について比較検討する必要がある。

凍結融解後の胚生存性、特に移植後の胚発生率は交雑胚で高い傾向にあった。このことは、突然変異遺伝子を保存する目的で系統間交配を用いることの利点を示すものと思われる。例えば、個体数が少なく貴重な突然変異遺伝子を有する系統の雄に過排卵誘起の容易な系統の雌を交配することにより、効率よく突然変異遺伝子を凍結胚として保存できる。今回、CL/Pr胚より口蓋裂を示す個体が2匹、DPF1 X DPF1 胚よりpink-eyed dilution ( $p/p$ ) 個体が4匹、B6C3F1 X C3Hf/HeNem-Elo/+ 胚よりElo/+個体が13匹、B6C3F1 X C57BL/6-W<sup>v</sup>/+ 胚よりW<sup>v</sup>/+個体が20匹、それぞれ得られ、系統の特性ならびに突然変異遺伝子の凍結胚による保存が可能である事が示された。さらに、BDF1 X MOL-A胚より産仔が得られたことは、凍結胚による野生マウス由来の遺伝子保存も可能である事を示している。

今後の胚凍結研究の課題として、キメラ作成など一度に多くの胚を必要とする実験に材料を提供する方法の確立を検討することがあげられる。

## 5. 要 約

凍結マウス初期胚による系統あるいは遺伝子保存の可能性について調べることが目的としてマニュアル操作による簡便凍結法とプログラムフリーザーによる各種系統の胚凍結法を検討した。簡便凍結法では、7系統のマウス (DNI, DDN, BS, C57BL/6, DBA/2, CRN, PAN) と1組の系統間交配 (DNI X C57BL/6-A<sup>y</sup>/+) について胚の採取方法および凍結保存後の胚の生存性を調べた。DNI胚を用いて検討したところModified 2-step法が胚の生存率も比較的高く (77.8%) 短時間で行える簡便な方法であることが示され、他系統の胚にもこの方法を応用した。凍結融解後の胚の生存性には系統差が見られ、PANでは最も低く (17.4%)、DDNでは最も高かった (71.9%)。培養後、桑実胚・胚盤胞に発生した凍結融解胚を仮親に移植した結果、DNI、DDN、BS胚より産仔が得られ、またF1胚 (DNI X C57BL/6-A<sup>y</sup>/+) より5匹の黄色マウスが得られた。以上の結果、簡便なModified 2-step法により数系統のマウスの凍結保存および遺伝子保存が可能である事が示された。

プログラムフリーザーを用いた凍結法では植氷後、-35°Cまたは-70°Cまで毎分0.3°Cの速度で冷却する緩慢凍結法を9系統 (MCH, C57BL/6N, BALB/cA, C3H/HeN, DBA/2N, BALB/cCr, 129/Sv, CL/Pr, DDN) と5組の系統間交配 (B6C3F1 X B6C3F1, DPP1 X DPP1, B6C3F1 X C3Hf/HeNem-Elo/+, B6C3F1 X C57BL/6-W<sup>y</sup>/+, BDF1 X MOL-A) より得た胚に応用した。その結果、凍結融解後の胚回収率は88%から100%と高く、正常胚の割合については系統差が見られたが、58.3% (CL/Pr) から87.5% (B6C3F1 X C57BL/6-W<sup>y</sup>/+) と安定した生存率が得られた。培養後の胚発生率についても、DBA/2Nで著しく低く (43.0%)、129/Svでやや低い (57.1%) 傾向が見られた以外は、いずれも70%以上の高い発生率が得られた。さらに、桑実胚・胚盤胞へ発生した胚を仮親へ移植したところ、7系統と5種類の交雑胚において産仔が得られた。これら産仔は離乳後正常な繁殖性を示したことから、プログラムフリーザーを用いた凍結法により系統および突然変異遺伝子の安定した凍結保存が

Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page.

可能である事が示された。

Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page.

表 II-1 DNI系統胚（細胞期）を用いた簡便凍結法の比較

凍結法	凍結胚数	回収胚数 (%)	正常胚数 (%)	桑実胚・胚盤胞への発生胚数 (%)	
2-step	67	59(88.1) <sup>1)</sup>	31(52.5) <sup>2) a</sup>	28(90.3) <sup>3)</sup>	(47.5) <sup>4) a</sup>
Modified slow	44	39(88.6)	32(82.1) <sup>b</sup>	26(81.3)	(66.7) <sup>a b</sup>
Modified 2-step	103	89(86.4)	73(82.0) <sup>b</sup>	63(86.3)	(70.8) <sup>b</sup>

1) 回収胚数/凍結胚数×100。 2) 正常胚数/回収胚数×100。

3) 発生胚数/正常胚数×100。 4) 発生胚数/回収胚数×100。

異なる肩文字の値どうしは統計的に有意差あり (p<0.01)。

表 II-2 性周期に同調したホルモン処理による各種系統および系統間交配における胚採取成績

系統	使用した雌 の数(日齢)	交尾した 雌の数(%)	回収 胚数 <sup>3)</sup>	正常な8-16細胞期 胚の数 <sup>3)</sup> (%)
DNI	17(60-90) <sup>1)</sup>	16(94.1) <sup>2)</sup>	30.8±2.9 <sup>a,b</sup>	18.9±3.2 <sup>a,b</sup> (61.4) <sup>4)</sup>
DDN	10(60-100)	5(50.0)	21.2±4.0 <sup>b,c</sup>	13.0±4.6 <sup>a,b</sup> (61.3)
BS	14(60-100)	9(64.3)	28.3±2.4 <sup>a,b</sup>	20.4±2.7 <sup>a,b</sup> (72.2)
C57BL/6	13(60-150)	9(69.2)	21.2±2.1 <sup>c</sup>	12.9±1.6 <sup>b</sup> (60.7)
DBA/2	16(60-100)	11(68.8)	24.3±3.8 <sup>b,c</sup>	17.5±2.5 <sup>a,b</sup> (71.9)
CRN	16(60-150)	14(87.5)	29.9±2.9 <sup>a,b</sup>	19.8±3.0 <sup>a,b</sup> (66.3)
PAN	14(60-150)	9(64.3)	20.2±2.7 <sup>c</sup>	13.7±1.9 <sup>b</sup> (67.6)
DNI×B6/A <sup>y</sup>	8(60-90)	6(75.0)	36.2±5.8 <sup>a</sup>	21.7±2.6 <sup>a</sup> (59.9)

1) 使用した雌の日齢。

2) 膣栓の確認された雌の数/交配に用いた雌の数×100。

3) 平均値±標準誤差。

4) 正常胚数/回収胚数×100。

異なる肩文字の値どうしは統計的に有意差あり (p<0.05)。

表 II-3 Modified 2-step法による近交系および系統間交配における  
初期胚の凍結融解後の生存性の検討<sup>1)</sup>

系統	凍結 期間(日)	凍結 胚数	回収 胚数(%)	正常 胚数(%)	桑実胚・胚盤胞への 発生率(%)
DNI	(2-37)	204	175(85.8) <sup>a,b2)</sup>	133(76.0) <sup>b3)</sup>	113(85.0) <sup>a4)</sup> (64.6) <sup>a,b5)</sup>
DDN	(1-21)	75	64(85.3) <sup>a,b</sup>	57(89.1) <sup>a</sup>	46(80.7) <sup>a,b</sup> (71.9) <sup>a</sup>
BS	(1-21)	107	97(90.6) <sup>a,b</sup>	73(75.3) <sup>b</sup>	52(71.2) <sup>b,c</sup> (53.6) <sup>b,c</sup>
C57BL/6	(13-32)	100	82(82.0) <sup>b</sup>	54(65.9) <sup>c</sup>	47(87.0) <sup>a</sup> (57.3) <sup>a,b,c</sup>
DBA/2	(3-49)	87	80(92.0) <sup>a</sup>	64(73.6) <sup>b</sup>	52(81.3) <sup>a,b</sup> (65.0) <sup>a,b</sup>
CRN	(1-50)	113	101(89.4) <sup>a,b</sup>	68(67.3) <sup>b,c</sup>	53(77.9) <sup>a,b</sup> (52.5) <sup>b,c</sup>
PAN	(20-26)	53	46(86.8) <sup>a,b</sup>	17(37.0) <sup>d</sup>	8(47.1) <sup>c</sup> (17.4) <sup>d</sup>
DNI × B6/A <sup>y</sup>	(25-40)	102	93(91.2) <sup>a,b</sup>	56(60.2) <sup>c</sup>	41(73.2) <sup>a,b</sup> (44.1) <sup>c</sup>

1) Modified 2-step法により凍結した。2) 回収胚数/凍結胚数×100。

3) 正常胚数/回収胚数×100。 4) 発生胚数/正常胚数×100。

5) 発生胚数/回収胚数×100。異なる肩文字の値どうしは統計的に有意差あり  
( $p < 0.05$ )。



表 II-4. 各種系統および系統間交配における胚の採取成績

系統	胚供使 雌の週齢	採取正常胚数 <sup>1)</sup>		交尾率 (%) <sup>2)</sup>
		自然交配群(N)	ホルモン投与群(N)	
Jc1:MCH	6-10	12.9±0.7 (28)	15.1±2.1 (10)	91
C57BL/6NJc1	8-9	7.0±1.2 (11)	6.2±1.3 (6)	60
BALB/cAJc1	8-10	8.4±1.2 (24)	6.0±1.2 (5)	50
C3H/HeNJc1	7-10	7.0±0.3 (11)	19.8±2.6 (14)	67
DBA/2NJc1	8-10	7.7±1.0 (6)	21.7±2.7 (12)	43
129/Sv	7	N.D.	8.3±2.9 (6)	83
BALB/cCrSlc	5-9	N.D.	6.6±1.0 (18)	95
CL/Fr	9	9.6±0.7 (5)	N.D.	
DDN	5	N.D.	14.6±2.7 (10)	100
B6C3F1 X F1 <sup>3)</sup>	4-5	N.D.	26.9±3.2 (10)	100
BDF1 X MOL-A <sup>4)</sup>	4-5	N.D.	19.1±2.2 (10)	100
DPF1 X F1 <sup>5)</sup>	4	N.D.	15.5±2.5 (8)	100
B6C3F1×E1o <sup>6)</sup>	4-6	N.D.	17.1±2.6 (15)	100
B6C3F1×W <sup>7)</sup>	4	N.D.	15.7 (3)	100

1) 形態的に正常な4細胞期、8細胞期およびコンパクションをおこし始めた胚を正常胚として数えた。値は平均値±標準誤差。Nは調べた雌の個体数。

N.D.=No data. 2) ホルモン処理群における交尾率。

3) B6C3F1 X F1: (C57BL/6N X C3H/HeN)F1 X (C57BL/6N X C3H/HeN)F1

4) BDF1 X MOL-A: (C57BL/6N X DBA/2N)F1 X MOL-A. MOL-Aは日本産野生マウス由来の系統。

5) DPF1 x F1: (DBA/2N×PAN)F1 X (DBA/2N×PAN)F1. PANはpink-eyed dilution (p) 遺伝子保有系統。

6) B6C3F1×E1o: (C57BL/6N×C3H/He)F1×C3Hf/HeNem-E1o/+

7) B6C3F1×W<sup>\*</sup>: (C57BL/6N×C3H/He)F1×C57BL/6-W<sup>\*</sup>/+

表 II-5. 各種系統および系統間交配における凍結融解胚の生存性

系統	胚数	胚の ステージ <sup>1)</sup>	ハイ7W 数	凍結 <sup>2)</sup> 期間	胚回収 率 % <sup>3)</sup>	正常胚 の割合 % <sup>4)</sup>	胚発生 率 % <sup>5)</sup>
Jcl:MCH	193	8-comp.	8	199-249	90.7	84.0	81.1
C57BL/6NJcl	106	4-8	7	187-266	98.1	76.9	80.8
BALB/cAJcl	195	4-comp.	10	149-235	91.8	67.6	71.5
C3H/HeNJcl	245	8-comp.	10	146-240	93.5	69.9	81.7
DBA/2NJcl	288	4-8	10	94-163	91.3	60.8	43.0
BALB/cCrSlc	61	4-8	2	59-103	91.8	85.7	87.5
129/Sv	87	4-8	3	73-96	88.5	76.6	57.1
CL/Fr	48	4-8	3	132	100.0	58.3	77.1
DDN	157	4-8	7	4-22	91.7	79.7	77.5
B6C3F1×F1*	201	8-comp.	10	2-40	91.0	85.8	79.2
BDF1×MOL-A*	35	8	2	72	91.4	81.3	78.1
DPF1×F1*	97	8-comp.	3	93-175	92.8	73.3	88.9
B6C3F1×E1o*	145	8	6	100-191	91.7	83.5	90.2
B6C3F1×W**	110	4-8	3	72-156	94.6	87.5	95.2

1) 形態的に正常な4細胞期、8細胞期およびコンパクションをおこし始めた胚を選んで用いた。2) 液体窒素中での凍結保存期間を日数で示した。保存期間2日から266日の胚を使用した。3) 胚回収率(%) = 融解後の全回収胚数/凍結胚数×100。

4) 正常胚の割合(%) = 形態的に正常な凍結融解胚数/全回収胚数×100。

5) 胚発生率(%) = 桑実胚および胚盤胞に発生した胚数/全回収胚数×100。

\*系統間交配の説明は表 II-4 の脚注参照。得られた胚は-70℃までプログラムフリーザーにて冷却・凍結し、その後ただちに液体窒素中に保存した。ただし、BDF1×MOL-A、DPF1×F1、B6C3F1×E1o、B6C3F1×W\*については-35℃までプログラムフリーザーにて冷却・凍結し、その後ただちに液体窒素中に保存した。凍結プログラムは材料と方法参照。

表 II-6. 各種系統および系統間交配における凍結融解胚の仮親へ移植後の生存性

胚の系統	仮親 <sup>1)</sup>		得られた仔マウス <sup>2)</sup>		
	使用数	妊娠数	仔数 (発生率%)	雄:雌	繁殖性 <sup>3)</sup>
Jc1:MCH	7	5	43 (51.2)	17 : 26	+
C57BL/6NJc1	5	4	18 (25.7)	11 : 7	+
BALB/cAJc1	6	6	17 (17.7)	10 : 7	+
C3H/HeNJc1	6	6	36 (31.9)	18 : 18	+
DBA/2NJc1	4	2	6 (15.0)	2 : 4	+
BALB/cCrSlc	3	3	10 (28.6)	6 : 4	N. D.
129/Sv	3	1	8 (50.0)	5 : 3	N. D.
CL/Fr	2	2	10 (29.4)	6 : 4 (cl;2)*	+
DDN	3	2	12 (33.3)	5 : 7	+
B6C3F1 x F1	3	3	18 (52.9)	10 : 8	+
BDF1 x MOL-A	2	2	15 (60.0)	9 : 6	+
DPF1 x F1	4	3	25 (54.3)	13 : 12 (p/p;4)#	+
B6C3F1 x E1o	6	6	32 (36.8)	17 : 15 (E1o;13)#	+
B6C3F1 x W <sup>y</sup>	3	3	36 (64.2)	19 : 17 (W <sup>y</sup> ;20)#	+

1) 仮親は8~12週齢のJc1:MCH(ICR)を偽妊娠2日目で用いた。2) 偽妊娠19日目の午前に出産を確認し、翌日、仔マウスの数、雌雄の数を調べた。偽妊娠19日目の午後になっても分娩が見られなかった場合は、ただちに帝王切開にて仔マウスを取り出し、乳母につけた。(発生率%) = 出産仔数/移植胚数×100。3) 同腹の雌雄を同居させて妊娠・出産に至った雌個体があった場合を+とした。N. D. = No Data.

\*: 口唇裂 (cleft lip) 個体が2匹得られた。

# ; 突然変異遺伝子保有個体数。

Faint, illegible text on the left page, possibly bleed-through from the reverse side.

### 第三章 キメラマウスの免疫組織学的解析法の検討

Faint, illegible text on the right page, likely bleed-through from the reverse side.

## 1. 結論

キメラマウスは同一個体内に遺伝的に異なる2種類の細胞が共存するので、その細胞の由来を調べることが出来れば、キメラ個体の発生過程で起こった細胞動態を解明する手がかりとなる。すなわち、ある発生時期におけるキメリズムはそれまでの細胞増殖、細胞移動、細胞分化さらに細胞死の結果を反映しているはずであり、各発生時期の組織にどのようなキメリズムが生じているかについて調べれば、細胞系譜を踏まえた組織の構築過程が理解されると思われる。また、ミュータント系を取り入れてキメラマウスを作成すれば、突然変異遺伝子の作用点が異常形質を示す細胞自身にあるのか周辺の細胞環境にあるのかを調べることが可能となる。いずれにせよ、キメラマウスの潜在的価値を十分に引き出すためには、各発生時期の様々な組織において細胞の系統由来を明確に同定する方法を確立することが必要条件である。McLaren (1976) と Oster-Granite と Gearhart (1981) は、理想的な細胞標識の条件として以下の6つの基準を示している。

- (1) 標識物質は、細胞内に局在して外部に分泌されない。
- (2) 細胞自身によって生産される物質であって、他から移入された物ではない。
- (3) 最初に標識された細胞に安定して存在し、かつ細胞分裂後も娘細胞中に安定して存在する。
- (4) すべての組織に存在する。
- (5) 検出が容易で、組織切片上で検出できる。
- (6) 標識細胞の発生・分化が、他の細胞によって抑制を受けたり、発生過程そのものに影響を及ぼさない。

今日までに、 $^3\text{H}$ -thymidine (Spindle, 1982)、Horse radish peroxidase (Cruz and Pedersen, 1985) 等による標識、 $\text{H-2}^b$  および  $\text{H-2}^k$  に特異的なモノクローナル抗体 (Ponder et al. 1983) や Thy-1 の対立遺伝子である Thy-1.1 に特異的なモノクローナル抗体 (John et al. 1972; Morris and Barber, 1983) の利用、

Dolichos biflorus agglutinin (DBA) によって認識される糖の多型 (Ponder et al. 1983)、 $\beta$ -glucuronidaseの高活性と低活性対立遺伝子 (Mullen, 1977)、M. musculusとM. caroliのサテライトDNAの違い (Siracusa et al. 1983; Rossant et al. 1986) 等、様々な方法が試みられてきたが、いずれも上記6つの基準を満たす方法はなかった。

1988年、KusakabeらによりC3H系統特異的抗体(抗CSA抗体)が開発され、C3HとBALB/cとのキメラマウスにおいて免疫組織学的にキメリズムを検出する方法が報告された。この抗体はC3H/HeN系統の細胞質中の可溶性画分に存在する蛋白に対する抗体でBALB/cAとは反応しない。しかも、このC3H系統特異的抗原(CSA; C3H strain-specific antigen)はC3H/HeNの殆ど全ての臓器の細胞に存在し、様々な組織へ応用できる点で優れている。組織学への応用は必ずしも容易ではなく、フォルマリン系固定液の使用により抗原性は著しく低下し、凍結切片でも検出できず、唯一、95%エタノール・1%酢酸による心臓からの灌流固定により抗原性と組織形態が保持された。しかし、この組織固定法は胎生期のキメラマウスには応用困難であり、生化学的解析用の生検体の採取には不向きであること等の難点があった。近年、マイクロウェーブを用いた組織固定法が紹介され、組織形態や抗原性の保存に優れた結果を示すことが報告されている(Boon and Kok, 1988)。そこで、本研究では、発生時期のすべてを通じてあらゆる組織に応用可能な固定法として、マイクロウェーブを用いた固定法を検討し、より応用範囲の広いキメラ解析法を確立することを目的とした。その結果、マイクロウェーブ照射とエタノール・酢酸による後固定、さらにポリエステルワックスに包埋することにより抗原性および組織形態が良好に保持されることが示され、発生初期から成体にいたる任意の時期におけるキメリズムの解析が可能となり、本章ではその方法と応用について述べる。

## 2. 材料と方法

### 1) 動物

C3H/HeN系統とBALB/cA系統をそれぞれ日本チャールズリバーおよび日本クレアより購入して、理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センター・実験動物棟・SPF飼育室にて繁殖・維持した。交配用の雄は単飼ケージにて維持し、雌は離乳後群飼した。4～6週齢の雌より発情前期にあると思われる個体を選別して（Hogan et al. 1986）、雄の飼育ケージに1～2匹の割合で同居させた。交配の翌日、膣栓の有無を確認し、雌雄を分けて飼育した。胚の発生時期および母体の妊娠日数は膣栓の確認日を0日として数えた。マイクロウェーブの条件設定には、胎生6～17日の胚および生後2ヵ月齢のマウスを用いた。キメラマウス作成用の仮親には日本チャールズリバーより購入したCrj:CD-1を用いた。

### 2) キメラマウスの作成

C3H/HeNとBALB/cAの集合キメラを作成した。妊娠2日のC3H/HeNおよびBALB/cAの雌の卵管をM2培養液（M2）（Hogan et al. 1986）で灌流し、それぞれの8細胞期胚を採取した。0.5% pronase（Boehringer Mannheim）を含むM2中で37℃、3分間培養して、透明帯を溶解し、新鮮なM2で数回ピペッティングすることにより胚を完全に裸化した。裸化した両系統の胚各々1つを、phytohemagglutinin-P（Difco）を5μl/mlの濃度で含むM2の微小滴中で接着・集合させた（Mintz et al. 1973）。集合胚はM16培養液（M16）（Hogan et al. 1986）で洗浄した後、同培養液を用いた微小滴培養法にて一昼夜培養した（5% CO<sub>2</sub>, 37℃）。形態的に正常な桑実胚および胚盤胞に発生した集合胚は、偽妊娠2日目のCrj:CD-1の子宮に移植した。以後、集合キメラは記号「↔」を用いてC3H/HeN↔BALB/cAのように表すこととした（Mintz, 1971）。

### 3) 灌流固定法

2ヵ月齢のマウスをエーテルで麻酔し、背位に固定して開腹・開胸した。まず、横隔膜下の下大静脈(thoracic inferior vena cava)を横隔膜近傍で切断し、つづいて、右心房を切開し放血した。氷冷した95%エタノール・1%酢酸を50mlのテルモシリンジに入れてカテーテルにて左心室から全身灌流をおこなった。主要臓器を摘出してカミソリ刃にて細切し、95%エタノール・1%酢酸に浸漬して2時間、後固定を行った。その後、100%エタノールにて脱水し、ポリエステルワックスに包埋、4 $\mu$ mの連続切片を作成した(Kusakabe et al. 1984, 1988)。

### 4) マイクロウェーブ固定法

生後のマウスについては、灌流固定法と同様にエーテル麻酔下で放血屠殺し、必要な組織を氷冷した生理食塩水に摘出して、5mm厚程度に細切した。胎生6~13日の胚は子宮にはいった状態で、14日以降の胚は子宮からとりだして、マイクロウェーブ照射を行った。組織は50mlのガラスビーカーに入れて、燐酸緩衝液(0.1M, pH7.4, 室温)を注ぎ、組織片と燐酸緩衝液の合計重量を50グラムとした。マイクロウェーブプロセッサ(Bio-Rad Microwave tissue processor H2500)の照射条件を、設定温度40 $^{\circ}$ C、出力60%、照射時間20分に設定し、ビーカーをマイクロウェーブプロセッサの中央に置き、温度プローブと攪はん用チューブを燐酸緩衝液中に挿入して、マイクロウェーブ照射を行った。照射後直ちに、組織片を燐酸緩衝液とともに氷上に置いたガラスシャーレにあけ、さらに組織を細切して、氷冷95%エタノール・1%酢酸または4%パラフォルムアルデヒド溶液(0.1M燐酸緩衝液、pH7.4)に浸漬した。95%エタノール・1%酢酸固定は6から12時間、パラフォルム固定は2時間とした。組織はエタノールによる脱水の後、ポリエステルワックスに包埋し、4 $\mu$ mの連続切片を作成した。



#### 5) 免疫組織染色

切片は100%エタノールに3回通して脱ワックスした。内因性のペルオキシダーゼを不活化するため、切片を0.6%  $H_2O_2$ と0.2% sodium azideを含むメタノールに浸漬して室温で1時間静置した。続いて、切片をTBS7.6 (20mM Tris-HCl, pH 7.6, 150mM NaCl) / 0.05% Tween20 (TBS7.6/Tween) で3回洗い、メタノールを除き、Avidin D blocking solution (Vector)を20分間反応させた。次に、氷温のTBS7.6/Tweenで5分間、3回洗浄して、Biotin blocking solution を20分間反応させた。氷温のTBS7.6/Tweenで5分間、3回洗浄して、ビオチン化抗CSA抗体 (C3H系統特異的抗体) を0.5% Fish gelatinを含むTBS7.6で10 $\mu$ g/mlの濃度に希釈して室温で1昼夜反応させた。氷温のTBS7.6/Tweenで10分間、3回洗浄し、さらに、ペルオキシダーゼ標識Avidin (Zymed) を0.5% Fish gelatinを含むTBS8.0 (20mM Tris-HCl, pH 8.0, 300mM NaCl) で100倍に希釈して20分間反応させた。氷温のTBS8.0/Tweenで10分間、3回洗浄した。3,3'-diaminobenzidine · 4-HCl (DAB) 発色液 (40mg DAB, 40 $\mu$ l  $H_2O_2$  / 150 ml Tris-HCl, 50mM, pH 7.6) に1分間浸漬した後、直ちに蒸留水で洗浄した。

#### 6) 銀増感染色

DAB発色、洗浄後の切片を0.1%塩化金酸水溶液に5分間浸漬した後、蒸留水でよく洗った。次に、2.5%硫化ナトリウム水溶液を作り、塩酸でpH 7.4に調整、切片をこの溶液に5分間浸漬した。蒸留水でよく洗い、銀染色液 (炭酸ナトリウム 20.8% w/v、硝酸アンモニウム 0.1% w/v、硝酸銀 0.1% w/v、ドデカタングステン酸 0.5% w/v、35% formaldehyde 溶液 1.8 $\mu$ l/ml) に1分間静置し、銀の沈着反応を行った (Burns et al. 1985)。発色した切片はすばやく1%酢酸水溶液に移して1分間置き、銀染色を停止した。1%チオ硫酸ナトリウム水溶液に3分間浸漬して銀染色の定着を行った。切片を蒸留水でよく洗い、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染



### 3. 結果

#### 1) マイクロウェーブ照射を用いた組織固定法の検討

まず、マイクロウェーブ照射における組織形態およびCSA抗原の保存性を調べるために、2ヵ月齢のC3H/HeNおよびBALB/cAから採取した肝臓、腎臓、小腸、脳、精巣を対象として、以下の4種類の固定法を比較した。

(1) 従来の95%エタノール・1%酢酸による心臓からの全身灌流による固定。

(2) 組織をリン酸緩衝液中に浸漬してマイクロウェーブ照射する。その後直ちにエタノール系列による脱水過程へ移る。

(3) 組織をリン酸緩衝液中に浸漬してマイクロウェーブ照射する。その後、後固定として95%エタノール・1%酢酸に浸漬する。

(4) 組織をリン酸緩衝液中に浸漬してマイクロウェーブ照射する。その後、後固定として4% paraformaldehyde (PFA)溶液中に浸漬する。

組織形態をHE染色で観察し、CSA抗原の保存性を免疫染色により比較したところ、表III-1の様な結果が得られた。この結果より、マイクロウェーブ照射と95%エタノール・1%酢酸による後固定の組み合わせで、組織形態およびCSA抗原性の両者が良好に保存されることが示された。また、40℃、60%のマイクロウェーブ照射だけでは固定効果は不十分で、固定後、組織切片作成までの過程で細胞質の流失や細胞同士の分離が生じること、組織形態の保存には4%PFAによる後固定との組み合わせで非常に良好な組織像が得られるが、CSAの抗原性は消失することが示された。

#### 2) 胎仔組織のマイクロウェーブ照射固定

次に、上記固定法を胎仔組織に適用することが可能かどうかを検討した。胎生6日～13日の胎仔では緩衝液の攪拌により組織が壊れる場合があったので、子宮ごとマイクロウェーブ照射した。胎生14日目以降は胎仔を子宮から取り出し

て照射した。いずれの発生時期においても、組織形態およびCSA抗原性はよく保たれていた。図Ⅲ-1に胎生9日のC3H/HeNおよびBALB/cAのC3H系統特異的抗体による免疫染色結果を示した。C3H/HeN胚では全ての細胞で細胞質に銀顆粒による黒色の沈着物が見られ(図Ⅲ-1A)、一方、BALB/cA胚ではこうした染色は全く見られなかった(図Ⅲ-1B)。

### 3) 胎生期キメラマウスのキメリズム解析

上記の方法によりキメラマウスの固定および免疫染色を試みた。図Ⅲ-2は胎生7~7.5日のC3H/HeN⇔BALB/cAキメラの免疫染色の結果である。胚体外胚葉(図Ⅲ-2A)、胚体中胚葉(図Ⅲ-2A)、胚外外胚葉、胎盤円錐体(図Ⅲ-2B)、尿膜、羊膜(図Ⅲ-2B)、血島(図Ⅲ-2C)において両系統の細胞がよく混じり合っている状態が観察された。

図Ⅲ-3に、胎生14.5日キメラ胚の中脳、網膜、脊髄、肺、腎臓および肝臓におけるキメリズムを示した。中脳(図Ⅲ-3A)や網膜(図Ⅲ-3B)のキメラパターンは神経上皮細胞の形態と増殖様式を反映した放射状のバッチとして観察された。脊髄の上皮細胞や前角神経細胞、後根神経節の神経細胞の系統由来も明きらかであった(図Ⅲ-3C)。未成熟な胎生期肺の肺胞上皮や間質の細胞においても明瞭なキメリズムが観察された(図Ⅲ-3D)。腎臓では集合管、腎糸球体を構成する細胞が両系統に由来する事が示された(図Ⅲ-3E)。肝臓のキメリズムも明瞭であった(図Ⅲ-3F)。さらに、生後の哺乳仔の組織においても明瞭なキメリズムの染色が可能であった。

#### 4. 考 察

本研究では、胎生期から成体にいたる様々な発達段階のキメラマウスにおけるキメリズムを免疫組織学的に検出する方法を確立した。この方法では、マイクロウェーブ照射による組織の前固定とアルコール・酢酸による後固定を組み合わせ、さらにポリエステルワックスに包埋する事により、系統特異的抗原の抗原性および組織形態を良好に保つ事が可能となった。免疫染色では、マウス・モノクローナルC3H系統特異的抗体（抗CSA抗体）をビオチン化して用い、ペルオキシダーゼ標識アヴィジンを反応させ、DAB発色の後、さらに銀増感を施す事により、より高感度で明瞭な染色結果が得られた。この染色法により、C3H/HeNとBALB/cAの集合キメラマウスにおいて、発生初期から成体まで、あらゆる組織においてキメリズムの検出が可能となった。胎生7-8日のキメラ組織では、胚体外胚葉、胚体中胚葉、胚外外胚葉、胎盤円錐体、尿膜、羊膜、血島において両系統の細胞が混在している様子が示され、さらに、胎生14日の中脳、神経網膜、脊髄、肺、腎臓、肝臓などでも明瞭なキメリズムが観察された。しかし、胎生期には成体組織において見られるような組織特異的なキメリズムは見られず、器官形成過程において著しい細胞増殖、細胞移動や細胞死が起きている事が予想された。

本研究では、系統特異抗原の生化学的性質および生理機能については未だ不明な点が多く、蛋白架橋を行うアルデヒド系の固定液の使用が困難であると言う条件で、しかも、瞬時にして組織全体が均一に固定される方法の開発が求められた。近年、灌流固定に代わる1つの優れた方法としてマイクロウェーブを用いた固定法が報告されている。最も広く行われているのは、アルデヒド系固定液に組織を浸漬してマイクロウェーブ照射をするというもので、マイクロウェーブのエネルギーにより瞬時に組織内へ固定液が浸透する事を利用した方法である（Mizuhira et al. 1990）。また、固定液を使わずに緩衝液中に組織を浸漬し、マイクロウェーブ照射した場合にも固定効果のある事が示された（Boon and Kok. 1988）。こ

の様なマイクロウェーブを用いた固定法により、様々な物質の抗原性および超微形態が従来よりも良好に保存される (Notoya et al. 1990)。そこで、CSAの免疫組織化学にマイクロウェーブの応用を試みたところ、燐酸緩衝液中での組織への照射とエタノール・酢酸による後固定の組み合わせで良好な組織形態とCSAの染色性が得られた。

CSAは細胞質中のミトコンドリアに局在しており、その発現は常染色体上の単一遺伝子により制御されてるいことが示されている。また、この系統特異的抗体は、C3H系統に特異的な抗原 (CSA) を認識する抗体として得られたが、その後、40系統近くの近交系をこの抗体で検索した結果、C3H系統以外の数系統でも陽性反応が示された (表III-2)。したがって、この抗体で組織学的に解析可能なキメラの系統組合せはかなり幅広いものとなった。また、最近になって、CSAをコードする遺伝子が単離され、C3H系統特異的抗体がC3H系統で認識している蛋白に相当するものがBALB/cにもあること、両者の違いがアミノ酸1残基の置換であることが解明された (Kusakabe et al. 1992)。今後、同蛋白の生化学的性質、細胞内での生理的機能が解明されれば、それらにかなったより理想的な固定方法が開発されると思われる。

ある発生時期におけるキメリズムはそれまでにおきた細胞増殖・細胞分化の結果を反映している。従って、組織におけるキメリズム、細胞増殖と細胞分化は互いに切り離すことはできず、これら全ての情報があってはじめて組織構築過程が正確に理解される。試みに、ここに示した方法で作成された組織切片で各種抗体を用いた免疫組織染色を行ったところいずれも良好な染色結果が得られた (表III-3)。さらに、BrdU標識を用いた増殖期細胞の免疫組織学的検出法 (Hanazono et al. 1990) も適応可能なので、ある発生時期における細胞増殖の様子も観察できる。

以上のように、本研究で開発した方法により、細胞増殖・細胞分化、そしてキ

メリズムが同一あるいは隣接の組織切片上で観察可能になり、今後、遺伝子機能や細胞間相互作用といった複雑な問題についてキメラマウスという *in vivo* の場を使用し、細胞レベルで解析することが可能になると思われる。

## 5. 要 約

マウスの初期発生過程における細胞系譜を知るために、胎生期キメラマウスのキメリズムをC3H系統特異的抗体を用いて免疫組織学的に解析する方法を確立した。この方法は、マイクロウェーブ照射による前固定、95%エタノール・1%酢酸による後固定とポリエステルワックス包埋を特徴とする。1次抗体としてビオチン化マウスモノクローナルC3H系統特異的抗体を用いて、続いて、ペルオキシダーゼ標識アヴィジンを反応させ、3,3'-diaminobenzidine 4-HCl(DAB)を用いて発色を行い、さらに銀増感染色を施した。その結果、胎生6-17日のC3H系統ではすべての組織の細胞が銀粒子により標識されたが、BALB/c系統では胚の組織に染色性は認められなかった。この方法は、生後の新生仔および生体の組織においても応用可能であった。

次に、集合キメラC3H/HeN $\leftrightarrow$ BALB/cAを作成し免疫組織染色を行ったところ、キメラマウスの胎生7-8日の初期発生過程においては、胚体外胚葉、胚体中胚葉、胚外外胚葉、胎盤円錐体、尿膜、羊膜、血島において両系統の細胞がよく混じり合っている状態が観察された。さらに、胎生14日の中脳、神経網膜、脊髄、肺、腎臓、肝臓などでも明瞭なキメリズムが観察された。しかし、成体組織において見られるような組織特異的なキメリズムは見られず、器官形成過程において著しい細胞増殖、細胞移動や細胞死が起きている事が予想された。



表Ⅲ-1 灌流固定とマイクロウェーブ固定による組織形態および  
CSA抗原性の保存

固定法	組織形態 (HE)	CSAの染色性
(1) 灌流固定	可 (細胞・組織の収縮 血管拡張有り)	良
(2) MW <sup>*</sup> のみ	不可 (細胞質のエオジン染色性劣、 肝細胞の離散、溶血有り)	有
(3) MW <sup>*</sup> +エタノール・ 酢酸	良 (すべての組織で良好)	優
(4) MW <sup>*</sup> +4%PFA	優 (すべての組織で極めて良い)	消失

<sup>\*</sup>マイクロウェーブ照射 (条件は材料と方法参照)

表 III-2 CSA陽性系統と陰性系統

CSA陽性系統		CSA陰性系統		
DBA/1J	C3HeB/FeJ-nr	A/WySnJ	C57L/J	DBA/2J
SM/J	C3H/HeHa-Pgk	AKR/J	C58/J	DM/Shi
CE/J	C3H. NB/Sn	BALB/cAnN	GR	
PL/J	C3H. SW/SnJ	BALB/cByJ	HRS/J	
SWM/Ms	C3H. OH/N	BALB/cJ	I/LnJ	
RFM/MsNrs	C3H. OL/N	BALB/cUcsd	MA/MyJ	
IQI		CBA/J	NZB/B1NJ	
RIIIS/J		CBA/StMs	P/J	
C3H/HeJ		CBA/CaHN	PT	
C3H/HeN		C57BL/6J	SJL/J	
C3H-Ttf/t <sup>0+</sup>		C57BL/6ByJ	SWR/J	
C3H/HeSn-Ttf/+tf		C57BL/10SnJ	WB/ReJ-W	
C3H-Ttf/t <sup>v18+</sup>		C57BR/cdJ	129/J	

表Ⅲ-3 各種抗体による免疫組織染色の結果

抗体 (認識抗原)	免疫動物種 / 抗体種	入手先
ACK-2 (c-Kit、レセプター型チロシンキナーゼ)	Rt/M	Dr. Nishikawa
BC7 (精巣、zygotene/early pachyteneの膜に存在する糖蛋白)	Rt/M	Dr. Nishimune
TRA369 (精巣、pachytene/round spermatidに存在する93KDaの蛋白)	Rt/M	Dr. Nishimune
Anti-MAP2 (microtubules associated protein 2)	M/M	BioMakor
Anti-tau (tau protein)	Rb/P	BioMakor
Anti-NF160K (neurofilament 160KDa)	M/M	Boehringer Mannheim
Anti-Synaptophysin	M/M	Boehringer Mannheim
Anti-GFAP (glial fibrillary acidic protein)	Rb/P	DAKO
Anti-MBP (human myelin basic protein)	Rb/P	DAKO
Anti-Laminin (mouse laminin)	Rb/P	E-Y Lab.
TN-3 (human tenasin)	Rb/P	Dr. Kusakabe

免疫動物種 : Rt:Rat, M:Mouse, Rb:Rabbit

抗体種 : M:monoclonal, P:polyclonal

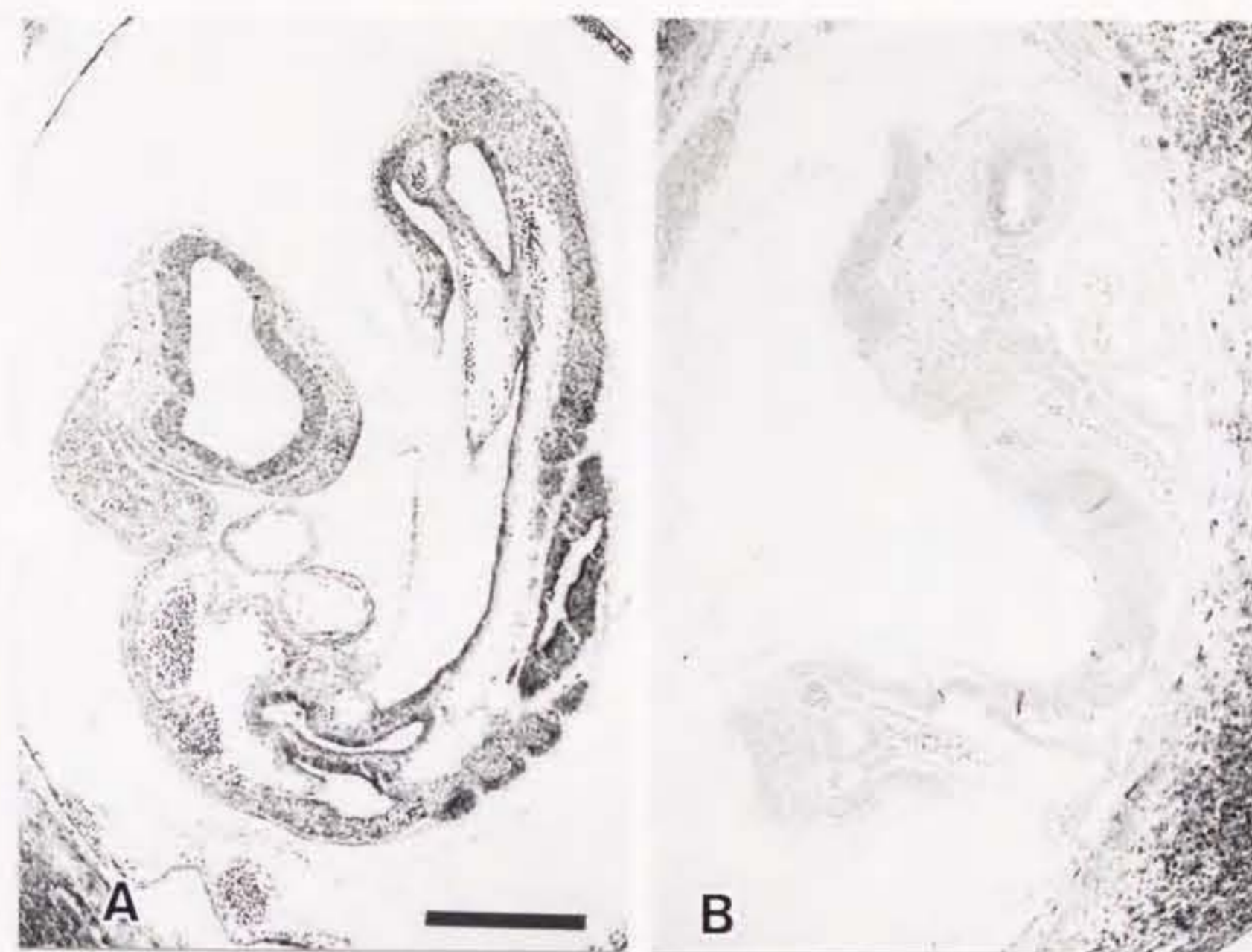


図 III-1. C3HおよびBALB/c胚の抗CSA抗体による免疫組織染色像。  
(A) C3H/HeN胚。(B) BALB/cA胚。縮尺; 500 $\mu$ m。

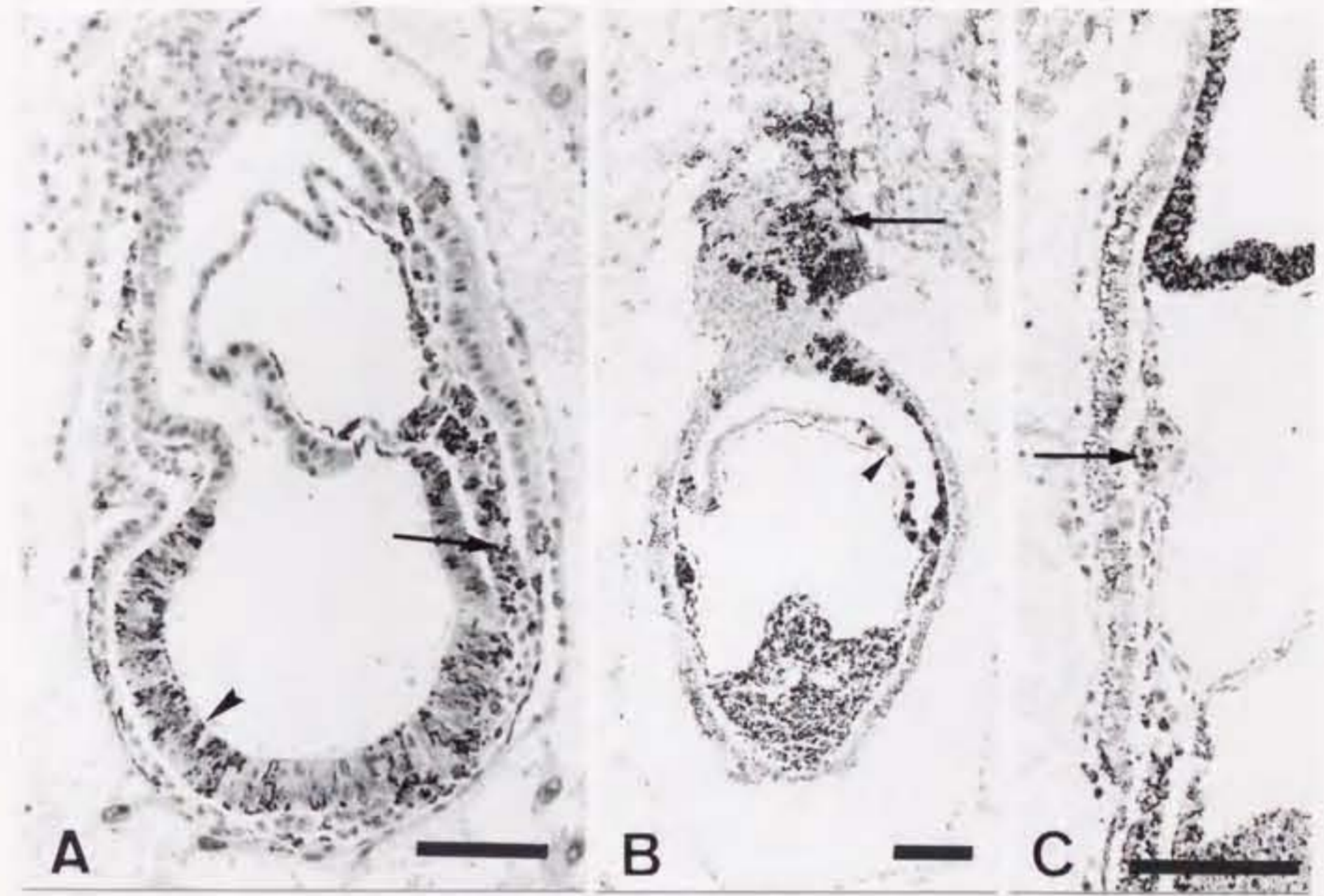
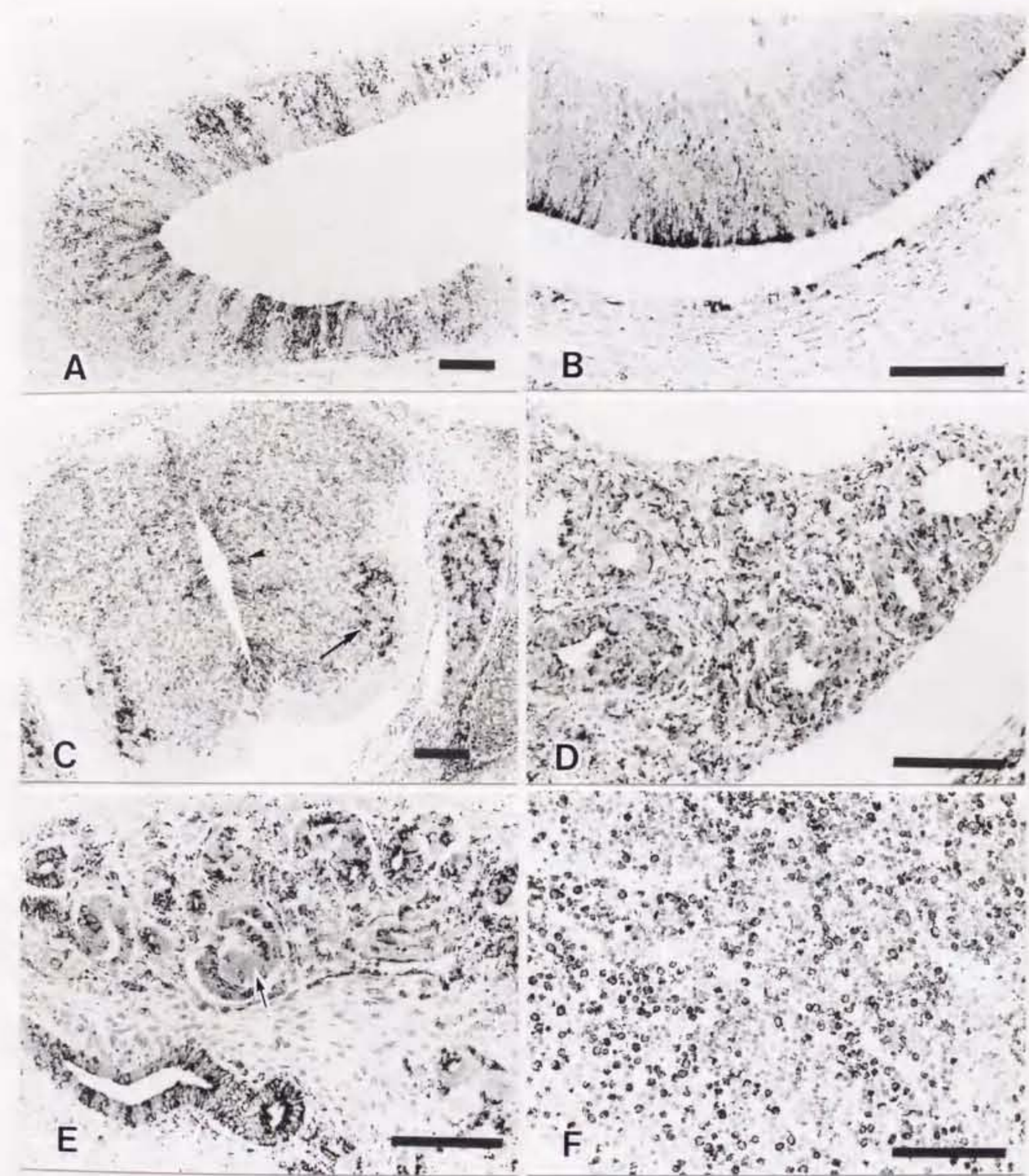


図 III-2. C3H/HeN $\leftrightarrow$ BALB/cAキメラの初期胚におけるキメリズムの免疫組織染色像。(A) 7日胚。矢尻；胚体外胚葉。矢印；中胚葉。(B) 7.5日胚。矢印；胎盤円錐体。矢尻；羊膜。(C) 7.5日胚。矢印；血島。縮尺；100 $\mu$ m。



図三-3. 胎生14.5日のC3H/HeN ↔ BALB/cAキメラの各種組織におけるキメリズムの免疫組織染色。(A) 中脳 (Tectum)。(B) 神経網膜。(C) 脊髄。矢尻；上皮細胞。矢印；前角神経細胞。(D) 肺。(E) 腎臓。矢印；腎糸球体。(F) 肝臓。縮尺；100 μm。

第IV章 キメラマウスを用いた小眼症遺伝子 (Elo) の発生遺伝学的解析

## 1. 緒論

脊椎動物の水晶体は2種類の細胞集団より成る。1つは水晶体線維細胞で水晶体構造のほとんどを占める。もう1つは、水晶体上皮細胞で水晶体の前面を覆う単層上皮である。水晶体の発生は水晶体上皮細胞の増殖とその水晶体線維細胞への分化によって行われる (Hanna and O'Brien, 1961; McAvoy, 1978a)。水晶体発生過程における一連の形態変化に伴い、一定領域での細胞分裂と水晶体特異的蛋白であるクリスタリンの発現が見られる (McAvoy, 1978a, b)。さらに、水晶体は水晶体被膜と呼ばれるコラーゲン、糖蛋白やプロテオグリカンより構成される細胞外基質に包まれている (Kefalids et al. 1979)。この細胞外基質は水晶体構成細胞の増殖や分化誘導に重要な役割を果たしている (Hendrix and Zwaan, 1974; Maggleton-Harris and Higbee, 1987)。また、神経網膜からは水晶体線維細胞の分化を誘導する液性因子が分泌されている事が実験的に示されている (Muthukkaruppan, 1965)。この様に、水晶体の正常な発生過程には、網膜をはじめとする周辺組織や水晶体被膜等の細胞外基質との相互作用、ならびに水晶体細胞同士の密接なつながりが必要であることがわかる。

マウスでは眼の発生に異常を引き起こす *fi*、*or*、*ak*、*Cat<sup>Ff</sup>*等の突然変異遺伝子が知られている (Green, 1989; Konyukhov, 1987)。これらの突然変異遺伝子を持ったマウスでは水晶体上皮細胞や神経網膜の増殖異常、クリスタリンの発現異常等、細胞増殖や分化の異常が報告されている。そして、キメラマウスを用いて、これら突然変異遺伝子の作用機序を解明する試みがなされてきた (Konyukhov, 1987)。近年、優性白内障 *Cat<sup>Ff</sup>*マウスと正常マウスとのキメラにおいて水晶体異常が消失することが報告されて、水晶体発生における細胞間相互作用あるいは細胞環境の重要性が示された (Maggleton-Harris et al. 1987)。しかし、こうしたキメラ解析による研究努力にもかかわらず、これら突然変異遺伝子の作用点や作用機序は十分に解明されていない。その最大の理由は、これらのキメラ解析



において水晶体や神経網膜等の組織におけるキメリズムが組織学的に調べられていなかったからだと言える。

マウスのElo (eye lens obsolescence) 遺伝子は優性で、第一染色体上にあり、水晶体の著しい形成異常を引き起こす (Oda et al. 1981a)。水晶体の異常は、胎生12日頃より水晶体線維細胞の核クロマチンの異常像および水晶体線維細胞の伸長不全として現れる (Oda et al. 1981b)。そこで、本研究はElo遺伝子の水晶体発生における作用を明らかにすることを目的として、(1) C3H/HeN-Elo/+の水晶体発生過程をメタクリル樹脂切片を作成して観察し、(2) BrdU標識をもちいて細胞増殖を調べ、さらに、(3) Eloマウスと正常マウスとのキメラを作製して、C3H系統特異的抗体をもちいた水晶体および神経網膜のキメリズムの解析を行った。

## 2. 材料と方法

### 1) 動物

本研究で用いたマウス系統はC3H/HeN-Elo/+、C3H/HeNおよびBALB/cAである。C3H/HeN-Elo/+は名古屋大学環境医学研究所で維持されていたC3Hf/HeNem-Elo/+を起源として、理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センターの実験動物室にてC3H/HeNに交配して8細胞期胚を採取して、CD-1への胚移植を経てSPF化し、その後7代C3H/HeNに戻し交配を行った後に使用した。+/+とElo/+の水晶体の比較はC3H/HeNの雌にC3H/HeN-Elo/+の雄を交配して得られる同腹仔同士で行った。Eloがヘテロの場合とホモの場合の組織学的な特徴は、水晶体線維細胞の形態異常がホモにおいてヘテロよりも約0.5日早く現れる以外は同様であった。胎仔の日齢は交配後の膈栓の確認日を0日として数えた。水晶体は胎生11日から18日、および生後30日、60日に採取して組織学的標本の作成に用いた。

### 2) BrdU標識と組織標本の作成

妊娠マウスに、1匹当たり0.5mgのbromodeoxyuridine (BrdU, Sigma) を0.5 mlの生理食塩水に溶かして静脈注射した。注射2時間後にマウスを屠殺して組織学的解析に用いた。組織は氷冷した10%緩衝中性フォルマリン(0.1M 磷酸緩衝液、pH 7.4)にて2時間浸漬固定した。組織はその後、エタノールで脱水して、ポリエステルワックス(BDH)またはメタクリル樹脂(Technovit 7100, Kultzer)に包埋した。樹脂包埋した組織は2 $\mu$ mの切片としてHE染色を施した。ワックス包埋した組織は4 $\mu$ mの切片としてBrdUの免疫組織染色を施した(Hanazono, et al. 1990)。

### 3) Elo遺伝子の水晶体上皮へ及ぼす影響の数量的解析

Elo遺伝子の水晶体上皮の発生に及ぼす影響を評価するために、胎生期の正常個体とElo個体の水晶体上皮における細胞数、S期細胞数およびS期細胞の割合を比

較した。比較には、遺伝子型と発生ステージの2要因による分散分析(2-way analysis of variance, 2-way ANOVA)を行った。水晶体は胎生13、14、15、18日の胎仔より採取し、組織標本を作成して、各発生期より任意に選んだ水晶体3つについて以下の要領で計測した。水晶体の中心軸に平行に厚さ4  $\mu$ mの連続切片を作成し、中央付近の切片から4枚おきに合計5枚の切片を選び水晶体上皮の細胞核を数えて細胞数とした。5枚の合計をその水晶体の上皮細胞数とした。隣接切片にはBrdUの免疫組織染色を施して、標識細胞を数え、5枚の合計をS期細胞数とした。S期細胞の割合は、S期細胞数/上皮細胞数により算出し%で表し、角度変換して分散分析に用いた。

#### 4) C3H/HeN-E1o/+ $\leftrightarrow$ BALB/cA集合キメラマウスの作成

C3H/HeN-E1o/+とBALB/cAとの集合キメラマウスを作成した。C3H/HeN-E1o/+胚はC3H/HeNの雌にC3H/HeN-E1o/E1oの雄を交配して得た。集合キメラマウスの作成法は先に第三章の材料と方法で述べた方法に従った。

#### 5) C3H系統特異的抗体による免疫組織染色

C3H系統特異的抗体による免疫組織染色法は第三章の材料と方法で述べた。

### 3. 結果

#### 1) 正常およびE10の水晶体発生の経時的観察

##### 胎生期

胎生12日までは正常個体とE10個体を組織学的に識別することは困難であった。胎生13日より水晶体線維細胞の伸長不全を示す個体が観察され、伸長不全の線維細胞の核に形態異常が現れた。胎生14日の正常水晶体では、水晶体線維細胞の顕著な伸長が見られ、細胞前極の細胞質には好エオジン染色性顆粒(EG)が観察された。E10では水晶体線維細胞は伸長せず円形細胞となり、水晶体中心部を占めており、EGは見られなかった。胎生15日の正常水晶体では、水晶体線維細胞の核は前極よりに配列していた(図IV-1A)。EGは水晶体の中心付近で線維細胞に沿って無数にみられ、核内にも見られるようになった(図IV-1B)。一方、E10では水晶体皮質付近の細胞伸長は比較的正常であるが皮質深部および水晶体中心部では、細胞伸長不全にともない細胞核は水晶体後極よりに配列しており(図IV-1C)、EGは見られなかった(図IV-1D,E)。胎生18日には、正常水晶体の中心部の核は円形でクロマチンが見られなくなったが、EGは依然細胞質中に認められた(図IV-1F)。E10の水晶体はこの時期までに水晶体後極の被膜が破綻し、円形的水晶体細胞の脱出が見られた(図IV-1G)。水晶体上皮の面積は明らかに正常よりも小さかった。

##### 生後30日

正常水晶体の前面は立方上皮細胞の単層より成る(図IV-2A)。EGは見られなくなり、細胞核も水晶体皮質でのみ見られ、中心部では消失していた。E10では組織形態が著しく崩れ、水晶体前面には不規則な厚みで水晶体被膜が形成され、被膜の後極部は破綻し、円形的水晶体細胞が脱出していた(図IV-2B)。大型の円形細胞は前眼房および後眼房をみたしていた。水晶体上皮細胞の形態は立方

形と言うよりも、偏平な形態を示した。

## 2) 正常およびEloの水晶体発生における細胞増殖

胎生11日では、いずれの個体でも眼胞上皮全域にわたってBrdU標識がみられ領域による細胞増殖の違いはみられなかった(図IV-3A)。胎生12日になると、水晶体後極の上皮細胞の伸長がみられ、この領域での細胞増殖は停止していた(図IV-3B)。これ以降、正常個体では、水晶体における細胞増殖は前面の水晶体上皮でのみ行われ、しかも、水晶体赤道面付近に最も増殖の盛んな領域が見られた(図IV-3C)。生後30および60日では1-2個のBrdU標識細胞が毛様体付近にみられるだけであった(図IV-3D)。Eloでは、形態異常の明らかになる胎生15日でも、水晶体上皮のBrdU標識パターンは正常と同様であった(図IV-3E)。その後、形態が著しく崩れるが、水晶体上皮細胞における標識細胞は常に観察された。生後60日では、水晶体領域の細胞成分はわずかしが残っていなかったが、その中の水晶体上皮細胞にはなお標識されるものがあった(図IV-3F)。

## 3) Elo遺伝子の細胞増殖への影響の検討

まず、水晶体上皮細胞数に及ぼす遺伝子型および発生時期の影響を調べた結果(表IV-1、図IV-4A)、いずれも有意な影響を及ぼしていた。すなわち、胎生14日以降において、正常水晶体では発生の進行に伴って上皮細胞数が増加しつづけるのに対して、Eloではplateauに達する。結果として、Eloの水晶体上皮の面積は比較的小さくなる。つぎに、S期細胞数は(表IV-2、図IV-4B)、発生の進行と共に有意に減少したが、正常とEloとの差は認められなかった。さらに、S期細胞の割合についても(表IV-3、図IV-4C)、有意な減少は見られず、遺伝子型の影響は明きらかではなかった。しかし、発生期と遺伝子型の交互作用

において有意差が見られ、発生時期によっては遺伝子型の影響があることが示された。図で、正常とEloのS期細胞の割合の差は胎生18日で最も大きかった。

以上の結果より、Elo遺伝子の水晶体上皮細胞の増殖に与える影響は、線維細胞の分化異常が現れた後に生じる2次的な現象である可能性が示された。

#### 4) 正常およびEloとのキメラマウスにおける水晶体の観察

Elo遺伝子の作用点、発現機序を調べるためキメラマウスを作成して水晶体における表現型の変化を観察した。まず、生後15および30日齢で25匹の毛色キメラを調べた(表IV-4)。うち7匹は両眼とも小眼症で水晶体後極が破綻し著しい形態異常を示した(図IV-5A)。15匹のキメラでは正常水晶体よりはやや小さいものの被膜の破綻はなく、中心部の白濁した水晶体が観察された(図IV-5B)。また一方に白濁水晶体、他方にElo型水晶体を持つ個体が2匹、一方に白濁水晶体、他方に正常水晶体(図IV-5C)を持つ個体が1匹得られた。両眼とも正常なキメラは得られなかった。

#### 5) 胎生期キメラ水晶体におけるキメリズムの解析

胎生14.5日のキメラ6匹の水晶体細胞の形態異常と系統由来を免疫組織学的に調べた。キメリズムは個体ごとに異なり、水晶体における両系統の細胞の混在割合と神経網膜でのそれとは必ずしも相関するものではなかった。図IV-6に3個体の例を示す。図IV-6A,Bでは水晶体および神経網膜の何れにおいてもCSA陰性細胞が陽性細胞よりも比較的多かった。CSA陽性細胞は水晶体上皮、水晶体皮質部の線維細胞および水晶体中心部の円形細胞に見られた。CSA陽性の円形細胞の核の形態はElo水晶体で見られた様な形態異常を示した。水晶体中心部分においては陰性細胞があるにもかかわらず線維構造が乱れていた。図IV-6C,Dは水晶体のほとんどがCSA陰性細胞により構成され、神経網膜はCSA陽性細胞が優勢と成った例を示

す。わずかながらCSA陽性細胞が水晶体線維部分に認められ、これら線維細胞の核は形態異常を示したが、細胞形態はE10で見られた様に円形ではなかった。さらに、図IV-6Eでは水晶体、神経網膜の両方ともCSA陽性細胞が優勢で、水晶体の組織構造はE10のそれと同様であった。以上の観察結果より、水晶体線維構造の異常の程度はCSA陽性細胞の割合に依存しており、形態異常を示す核を有する細胞はすべてC3H-E10由来であり、BALB/c由来の細胞はなかった。

#### 4. 考 察

本研究はマウスにおける優性の突然変異遺伝子、E1oの水晶体発生に及ぼす影響を細胞分化、細胞増殖および細胞間の相互作用という観点から解析した。細胞分化については、 $2\mu\text{m}$ のメタクリル樹脂切片により組織学的に形態分化を観察し、E1o水晶体における水晶体線維細胞の伸長阻害と核の形態異常、さらに正常水晶体においてみられる好エオジン染色性顆粒の欠如が明かとなった。細胞増殖については、BrdUによるS期細胞の標識と免疫組織学的なBrdU検出法により、増殖中の細胞の分布を調べ、E1o水晶体の初期発生過程では正常水晶体と同様の細胞増殖パターンが観察された。細胞間の相互作用については、C3H-E1oとBALB/cとの間でキメラマウスを作製し、その水晶体におけるE1o由来の細胞の分布をC3H系統特異的抗体を用いて免疫組織学的に解析した。胎生期キメラ水晶体における両系統由来の細胞の分布と、細胞及び細胞核の形態との関係を調べたところ、E1o由来の細胞は水晶体上皮および水晶体線維部分に分布しており、水晶体皮質辺縁部では正常線維細胞と同様に伸長していたが、中心領域では核および細胞形態に異常が認められた(図IV-6 A、B)。一方、水晶体線維部の+由来の細胞は、E1o由来の細胞が少ない場合には正常な形態を示し(図IV-6 C、D)、E1o由来の細胞集団が近隣にある場合には正常な線維構造を示さなかった(図IV-6 E)。全体としてキメラの水晶体の組織構築に見られる異常はE1o由来の細胞の占める割合により影響されるようであった。すなわち、水晶体線維細胞の伸長および形態維持には、水晶体線維細胞の相互作用や周辺の細胞環境が非常に重要であることが示唆された。しかし、いずれの場合も完全に正常化されることはなく、特に、核の形態異常はE1o由来の線維細胞に常に観察されたので、E1o遺伝子の発現はcell autonomousであると考えられる。

水晶体発生の経時的観察結果からはE1o遺伝子が水晶体線維細胞の分化に影響していると考えられた。水晶体上皮の発生過程を定量的に解析したところ(表IV-



1~3、図IV-4)、Eloの水晶体上皮細胞数は正常に比べて明らかに減少していた。S期細胞の数は成長にともなってEloおよび正常水晶体で同様に減少し、Elo遺伝子の影響は認められなかった。ところが、S期細胞の割合について調べたところ、胎生後期において、Elo遺伝子の影響が認められた。これらの細胞増殖と関連のある異常は、Elo遺伝子の積極的な作用とは考えにくく、むしろ、これより先に現れる水晶体線維細胞の形態異常、水晶体被膜の破綻などによる水晶体構造の破壊に伴って引き起こされる2次的影響だと思われる。従って、Elo遺伝子は水晶体線維細胞の分化に特異的に作用する遺伝子であると考えられた。

次に挙げるような物質が水晶体発生において重要な役割を果たしていると考えられている。すなわち、(1)水晶体特異的蛋白、特に、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ クリスタリン (McAvoy, 1978a)、(2)神経網膜により産生される水晶体上皮細胞の伸長促進因子 (Muthukkaruppan, 1965)、さらに、水晶体被膜 (Hendrix and Zwaan, 1974)。水晶体線維細胞の分化は、 $\gamma$ クリスタリン等の水晶体特異的蛋白の産生により特徴づけられる (Maurer-Orlando et al. 1987)。Elo水晶体を2次元電気泳動により解析すると、 $\gamma$ クリスタリンの1つのサブタイプである $\gamma 2$ クリスタリンが著しく減少していることが分かった (正木、渡辺、私信)。Elo遺伝子は染色体上で $\gamma$ クリスタリンの構造遺伝子の近傍に位置しているが (Skow, 1982)、両者は同一の遺伝子ではないこと、さらに、Eloマウスの水晶体では $\gamma$ クリスタリン遺伝子の転写が抑制されていることが報告されている (Quinlan et al. 1987)。正常水晶体では、胎生14日目から水晶体皮質辺縁部を除く水晶体線維細胞に好エオジン染色性顆粒 (EG) が観察された。一方、Elo個体の水晶体線維細胞ではこのEGは観察されなかった。胎生期のElo水晶体における $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ の各クリスタリンの発現を免疫組織学的に調べたところ、正常水晶体における発現との間に顕著な違いは見られなかった (未発表データ)。しかし、 $\gamma$ クリスタリンの分布とEGの分布とはよく一致しており、EGが $\gamma$ クリスタリンのあるサブクラスを含んでいる

ことが推察されたが、それを示す直接的証拠は得られなかった。さらに、水晶体線維細胞の伸長にはアクチン、チューブリン、ビメンチン等の細胞骨格が重要な働きをしていることが知られている (Sax et al. 1990)。これらの事からElo遺伝子が水晶体線維細胞の分化の過程で $\gamma$ クリスタリンの転写や細胞骨格の構築を抑制するような細胞内因子を産生していることが予想された。

水晶体線維細胞の分化には神経網膜からの因子が重要であることが示されている (Coulombre and Coulombre, 1963)。また、マウス水晶体の培養系を用いて神経網膜から線維細胞の分化を促進する液性因子の存在が証明された (Muthukkaruppan, 1965)。最近、神経網膜から精製された線維芽細胞成長因子 (FGF) が線維細胞の分化誘導に促進的に働くことが示された (McAvoy and Chamberlain, 1989)。Eloの胎生期の眼組織の培養実験では、水晶体の形成異常は眼組織以外の環境と独立に起こることが示されているが (Watanabe et al. 1980)、水晶体と神経網膜との相互作用については明らかではなかった。本実験で得られたキメラのなかには、神経網膜においてElo細胞が優勢で、水晶体において+細胞が優勢の個体が観察された。この個体の水晶体の組織構築は正常に近く、Elo由来の線維細胞だけに異常が見られた。このことから、Eloマウスの神経網膜の因子には異常のないことが推察できる。

Elo水晶体において大型の円形細胞が観察され、水晶体後極では被膜の破綻が認められた。胎生期の水晶体から被膜を取り去ると伸長した水晶体線維細胞は大型の球形細胞となることが観察されている (Muggleton-Harris et al. 1981)。さらに、培養下のマウス水晶体上皮細胞に水晶体被膜断片を作用させると、レンズ様構造を誘導することができる (Muggleton-Harris and Higbee, 1987)。これらのことは、水晶体被膜が水晶体線維細胞の分化に不可欠であることを示している。しかし、Elo遺伝子が水晶体被膜成分の生合成に特異的に関与している可能性は少ないと思われる。それは、キメラマウスの実験において水晶体被膜の破綻が見ら

れない水晶体でも白濁などの異常が認められたからである。したがって、Elo水晶体における水晶体被膜の破綻はElo遺伝子の2次的な影響と考えられる。

以上のように、マウスのElo遺伝子は水晶体線維細胞の分化に影響を及ぼし、細胞伸長不全と核の形態異常を引き起こす。これらに引き続いて起こる水晶体被膜の破綻は2次的な異常と考えられ、キメラにすることにより救済される場合がある。この場合、正常な細胞により産生された水晶体被膜成分により細胞外環境が改善され、比較的正常に近い白濁水晶体が形成されたと考えられる。本研究のキメラ解析結果より、水晶体線維細胞の伸長機構において線維細胞同士の相互作用が重要であることが示唆された。Eloマウスは水晶体線維細胞の分化制御機構を研究するうえで貴重な研究材料だと言える。

## 5. 要 約

本研究では、マウスの eye lens obsolescence (Elo) gene の水晶体発生過程における細胞増殖への影響とキメラマウスにおける遺伝子発現について調べた。まず、Eloマウスの水晶体の形態学的特徴として次の4点があげられた。すなわち、(1) 水晶体線維細胞の伸長不全、(2) 水晶体線維細胞の核の形態異常、(3) 水晶体中心部の線維細胞に見られる好エオジン染色性顆粒の欠如、(4) 水晶体後極における水晶体被膜の破綻である。そこで、bromodeoxyuridineを用いた免疫組織学的方法により水晶体上皮細胞の細胞増殖をElo/+と正常+/+とで比較したところ、胎生11-14日までは両者に差は見られなかった。胎生15日以降では、Eloの水晶体上皮細胞数は正常より明らかに少なかったが、S期細胞の数では両者に差はなかった。

つぎに、Eloの水晶体細胞の形態異常が水晶体線維細胞自身で起こるのか、細胞環境の影響を受けるのかを集合キメラC3H/H-Elo/+ $\leftrightarrow$ BALB/cを作成して確かめた。BALB/c細胞優勢のキメラマウスでは、水晶体皮膜の破綻はほとんど見られず、水晶体中心部の白濁と水晶体サイズの僅かな減少がみられた。C3H-Elo/+細胞優勢のキメラの水晶体は形態的にC3H-Elo/+の水晶体と同様の異常を示した。C3H系統特異的抗体を用いて胎生期キメラマウスの水晶体を免疫組織学的に解析したところ、異常核を有する水晶体線維細胞はC3H-Elo/+由来の細胞のみでBALB/c由来の細胞はなかった。以上の結果から、Elo遺伝子は水晶体上皮細胞の増殖には直接的に影響をせず、水晶体線維細胞内で細胞分化に特異的に作用して、細胞伸長を抑制していると考えられた。

表IV-1 水晶体上皮の総細胞数における遺伝子型および発生ステージの影響に関する分散分析表

要因	平方和	自由度	平均平方	分散比	有意水準
遺伝子型	148837.5	1	148837.5	639.4	Sig.p<0.001
発生ステージ	433841.8	3	144613.9	621.2	Sig.p<0.001
交互作用	211328.5	3	70442.8	302.6	Sig.p<0.001
残差	3724.7	16	232.8		
合計	797732.5	23			

Sig; 統計的に有意差あり。

表IV-2 水晶体上皮の総S期細胞数における遺伝子型および発生ステージの影響に関する分散分析表

要因	平方和	自由度	平均平方	分散比	有意水準
遺伝子型	322.7	1	322.7	1.99	Not sig.
発生ステージ	18976.8	3	6325.6	38.99	Sig. p<0.001
交互作用	532.3	3	177.4	1.09	Not sig.
残差	2596.0	16	162.3		
合計	22427.8	23			

Not sig.; 統計的有意差なし (p>0.05). Sig; 統計的に有意差あり.

表IV-3 水晶体上皮のS期細胞の割合における遺伝子型および発生ステージの影響に関する分散分析表\*

要因	平方和	自由度	平均平方	分散比	有意水準
遺伝子型	9.55	1	9.55	4.47	Not sig.
発生ステージ	827.6	3	275.9	129.2	Sig.p<0.001
交互作用	38.2	3	12.7	5.96	Sig.p<0.01
残差	34.2	16	2.14		
合計	909.6	23			

\* 割合は%で表した値を角度変換して用いた。Not sig.; 統計的有意差なし(p>0.05), Sig; 統計的に有意差あり。

表IV-4 C3H-Elo/+ とBALB/cのキメラにおける毛色の混合比と眼の特徴

グループ	毛色混合比 (C/C:c/c)	キメラ個体数					合計
		Mic	Mic/Op*	Op	Op/Nor**	Nor	
1	>	2	0	1	0	0	3
2	=	3	2	3	0	0	8
3	<	2	0	11	1	0	14
合計		7	2	15	1	0	25

25匹の明らかな毛色キメラについて肉眼的に3つのグループに分けた。(1) Elo(agouti) 優勢の個体(>), (2) 両系統の割合がほぼ等しい個体(=), (3) 正常 (albino) 優勢の個体(<).

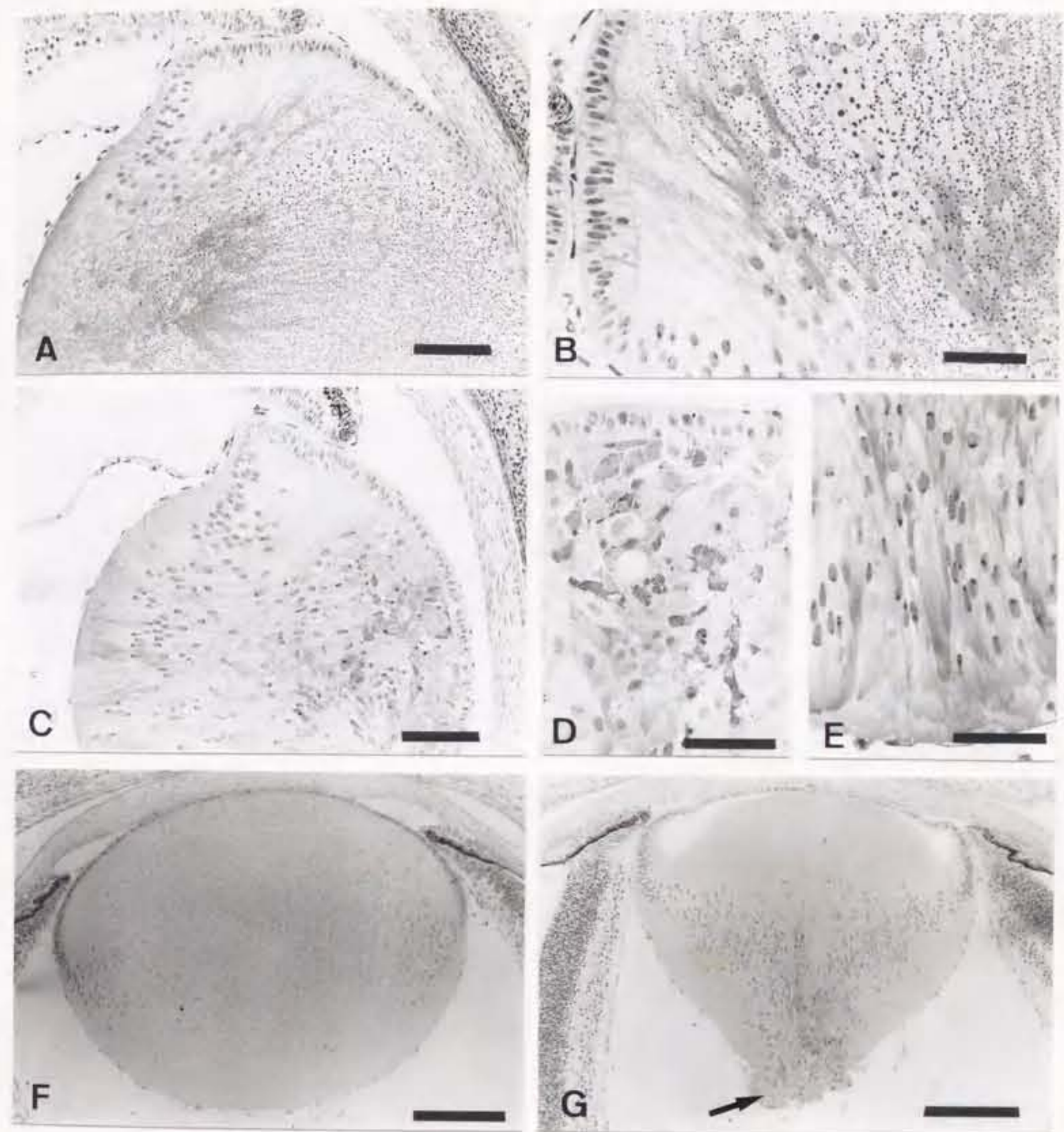
Mic; Eloマウスと同様に水晶体被膜の破綻した水晶体。

Op; 白濁水晶体。Nor; 正常な大きさの透明な水晶体。

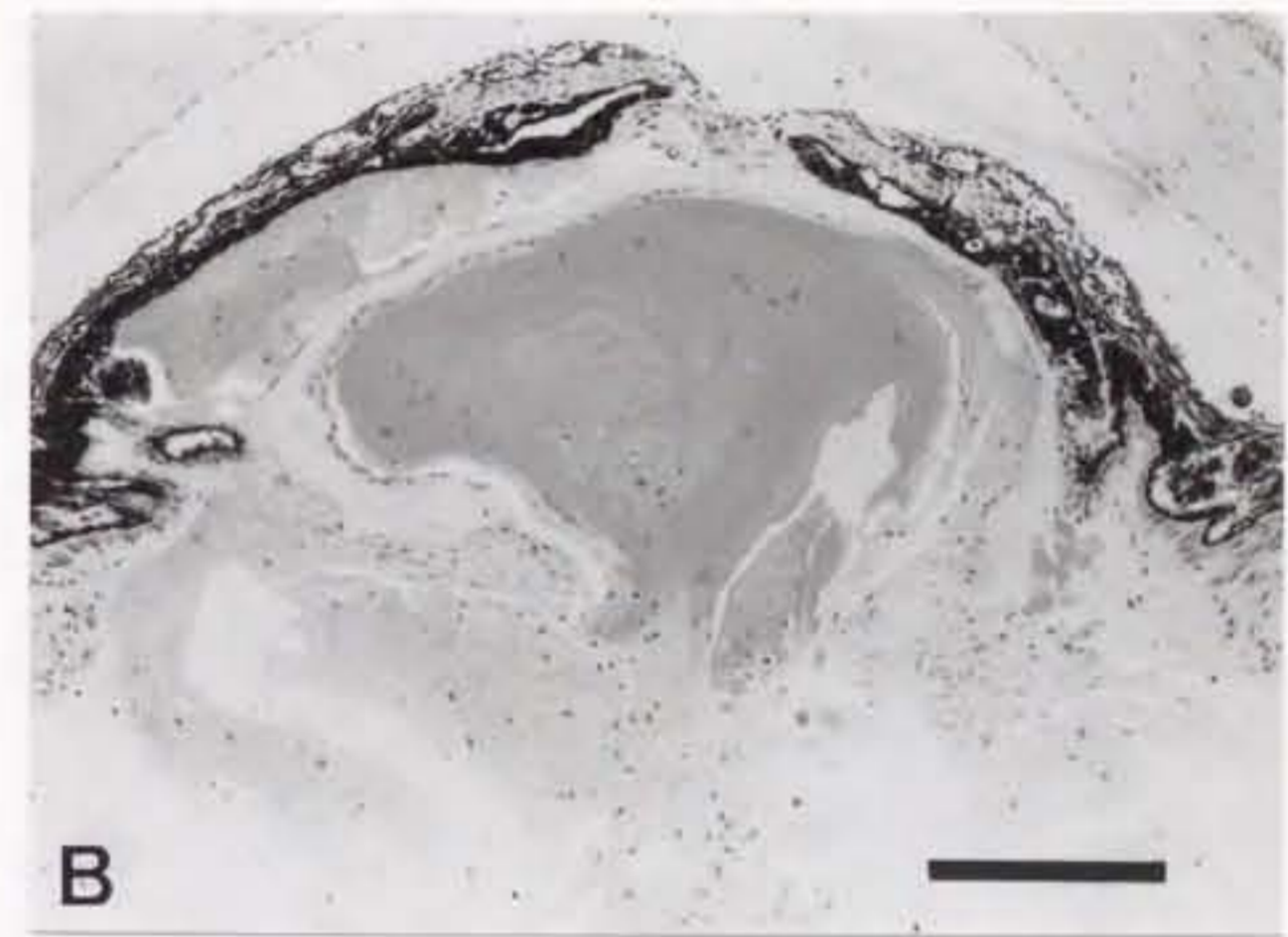
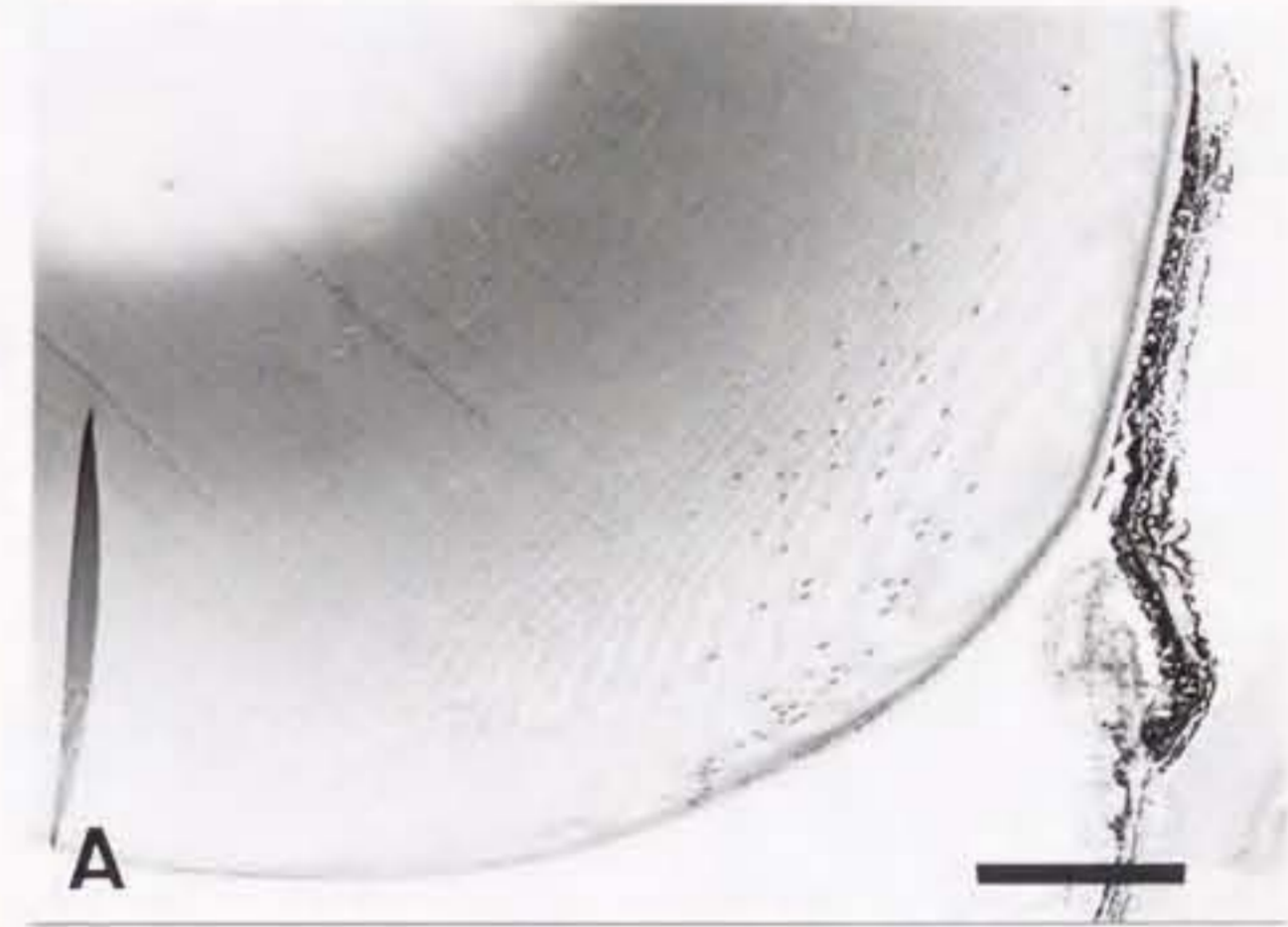
\* 2匹のキメラは片眼がElo型水晶体で片眼が白濁水晶体であった。

\*\* 1匹のキメラでは片眼が白濁水晶体で片眼が正常水晶体であった。

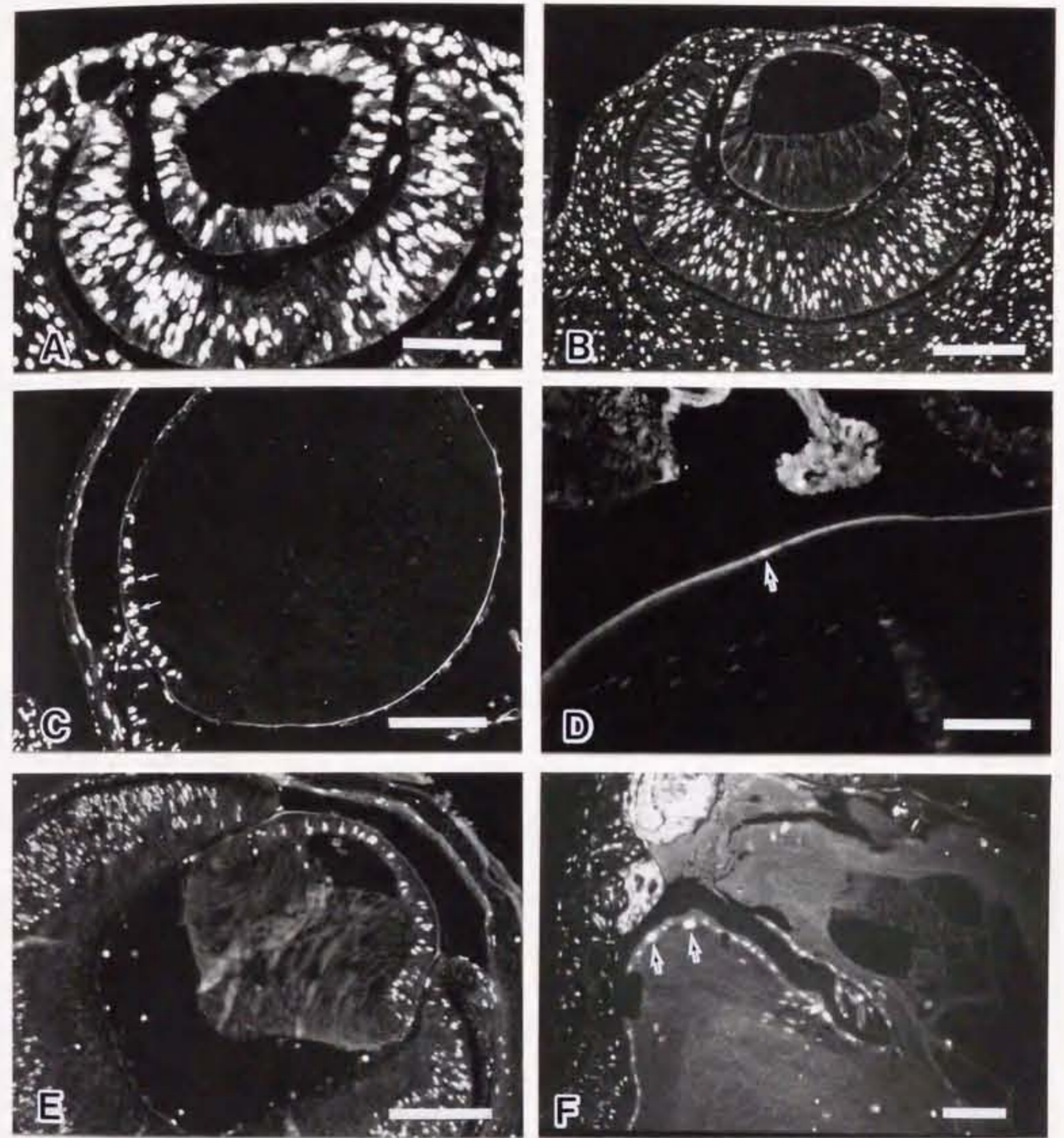




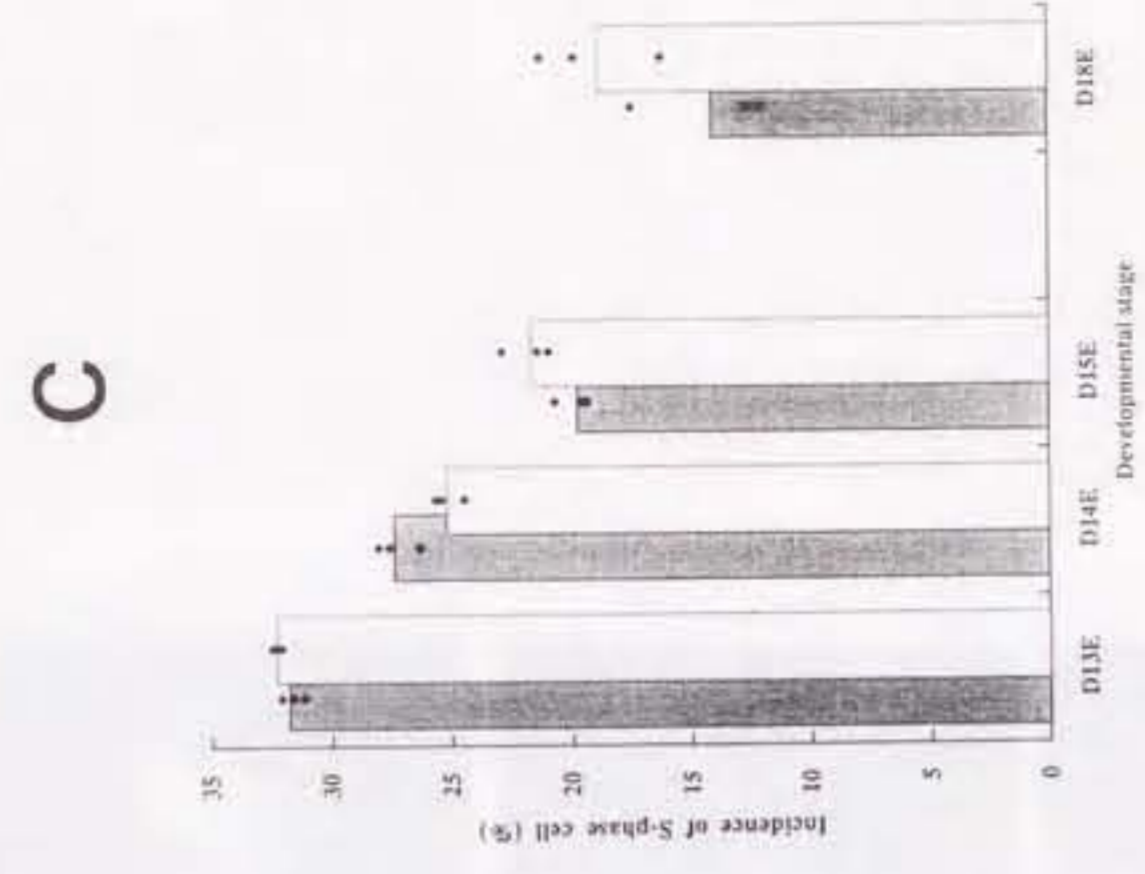
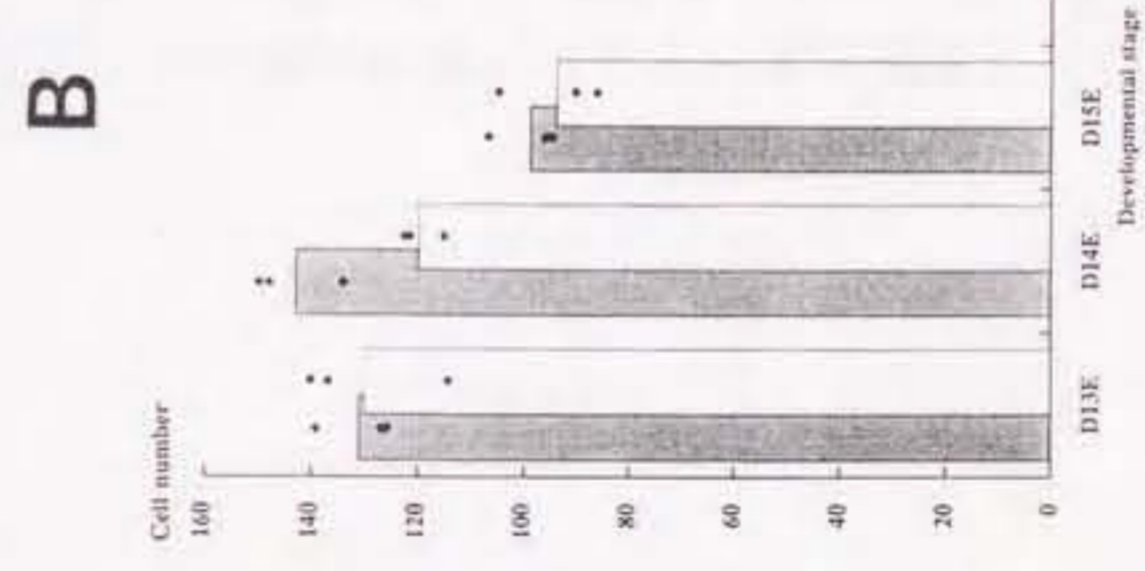
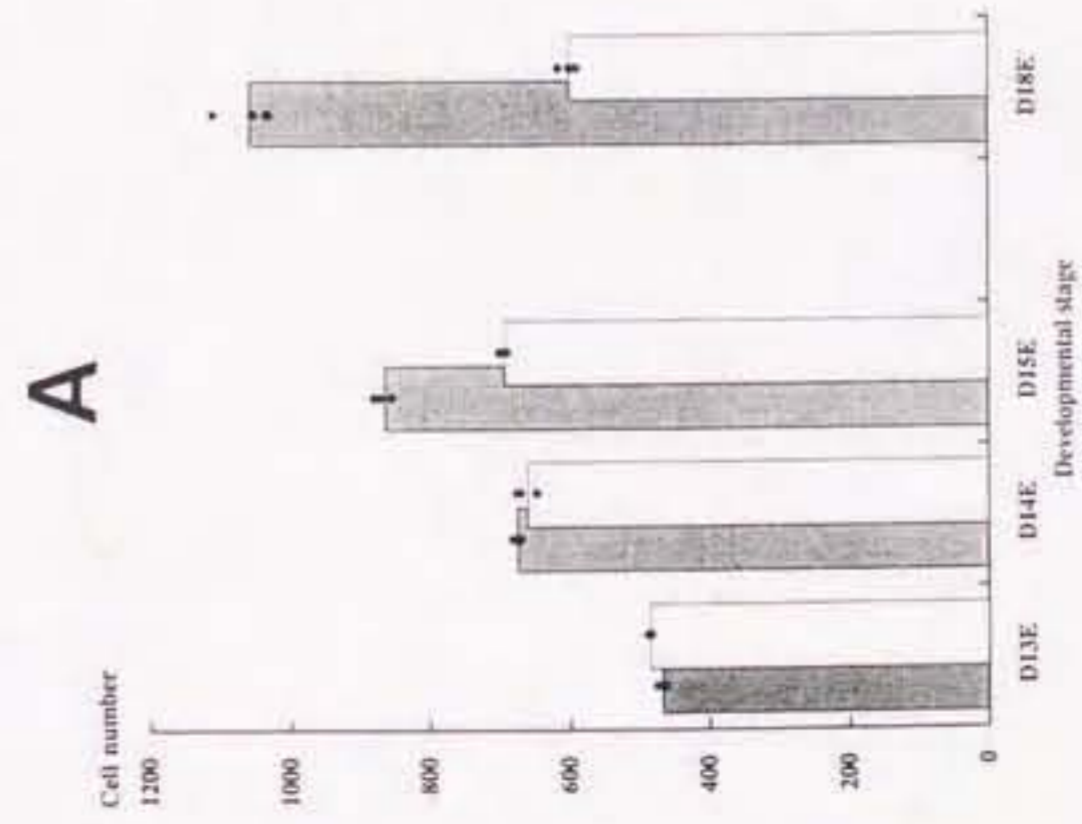
図IV-1. C3H/HeN-+/+およびC3H/HeN-Elo/+の水晶体の組織像。(A) 胎生15日の遺伝子型+/+の水晶体。(B) 胎生15日の+/+の水晶体の強拡大像。好エオジン染色性の顆粒が水晶体線維細胞に沿って無数に認められる。(C) 胎生15日のElo/+の水晶体。伸長しはじめた線維細胞の核は後極付近にとどまっている。(D、E) 胎生15日のElo/+の水晶体の強拡大像。円形の細胞が水晶体中央部前極よりに見られる(D)。後極付近で核の異常がみられる(E)。(F) 胎生18日の+/+の水晶体。(G) 胎生18日のElo/+の水晶体。円形細胞が後極部の被膜破綻部位より脱出している(矢印)。すべて2 $\mu$ mのメタクリル樹脂切片。HE染色。縮尺:(A、C); 100 $\mu$ m、(B、D、E); 50 $\mu$ m、(F、G); 200 $\mu$ m。



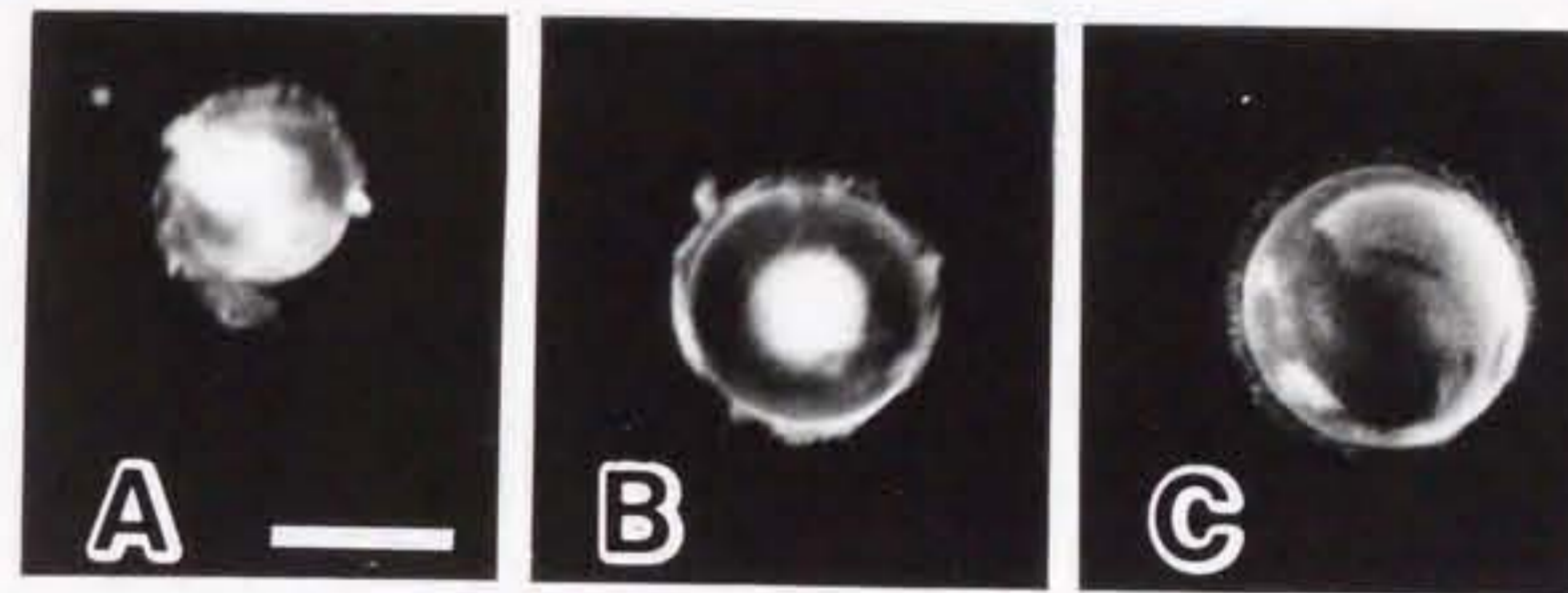
図IV-2. 生後30日の+/+ (A) およびElo/+ (B) の水晶体組織像。  
縮尺; 200  $\mu$ m。



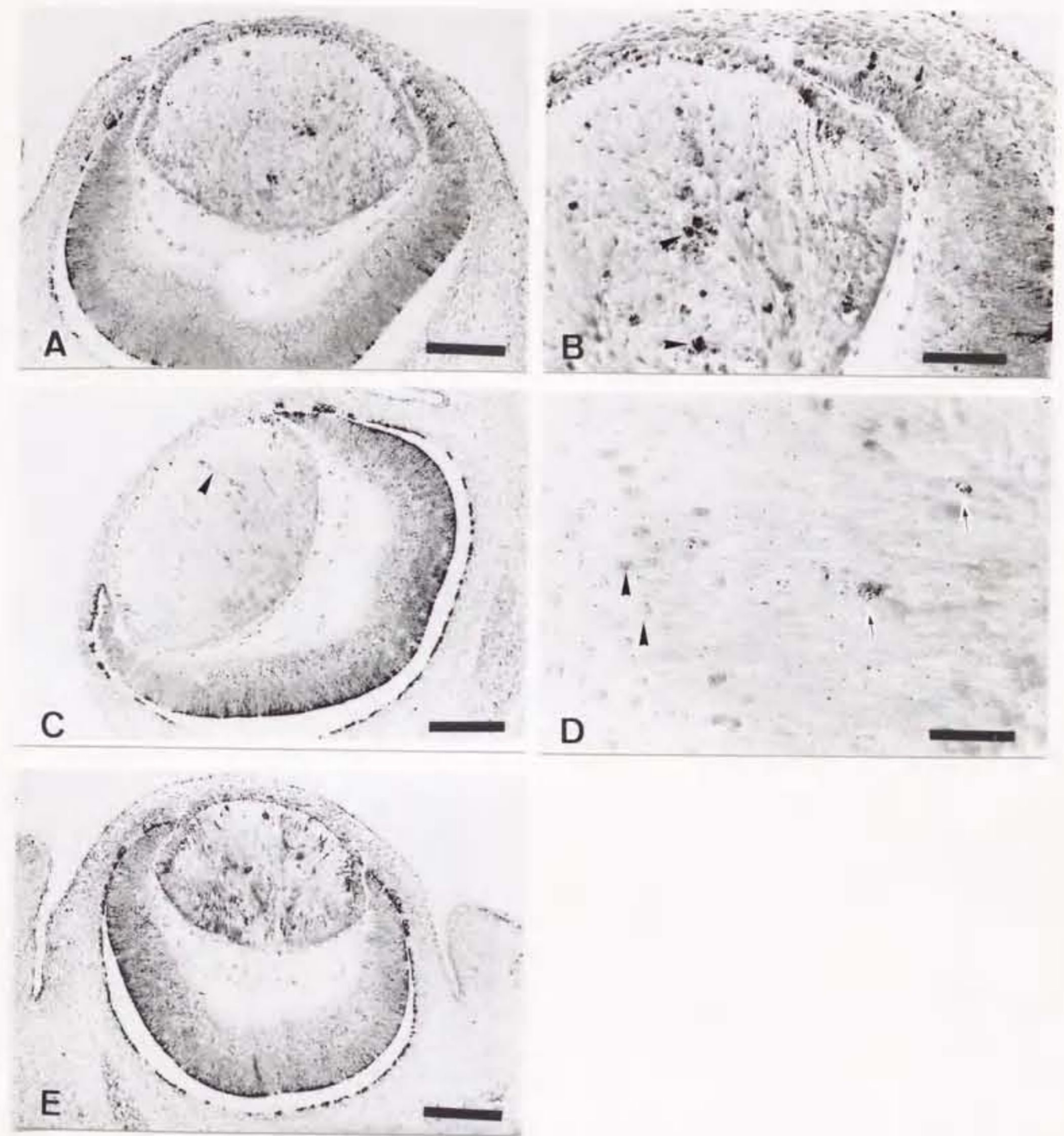
図IV-3. +/+およびElo/+の水晶体発生におけるBrdUの取り込み。(A)胎生11日の水晶体。(B)胎生12日の水晶体。(C)胎生15日の+/+の水晶体。水晶体赤道部より前極よりの領域でBrdUの取り込みが見られる(矢印)。(D)生後30日の+/+の水晶体。毛様体付近の水晶体上皮細胞にBrdUの取り込みが見られる(矢印)。(E)胎生15日のElo/+の水晶体。水晶体構造の崩壊が始まっている。水晶体上皮にはBrdUの取り込み像が認められる。(F)生後30日のElo/+の水晶体。毛様体付近の水晶体上皮細胞にBrdU標識が見られる(矢印)。抗BrdU抗体による免疫組織染色。縮尺:(A、D、F);100 $\mu$ m、(B、C、E);200 $\mu$ m。



図IV-4. 正常およびE10の水晶体上皮における細胞増殖の定量的解析。(A) 胎生13,14,15,18日における水晶体上皮細胞数の推移。(B) 胎生13,14,15,18日におけるS期の水晶体上皮細胞数の推移。(C) 胎生13,14,15,18日の水晶体上皮におけるS期細胞の割合(%)の推移。黒バー; 正常水晶体。白抜きバー; E10水晶体。



図IV-5. Eloと正常マウスとのキメラにおける水晶体の例。(A) Elo型の小眼より取り出した水晶体組織。(B) 白濁水晶体。(C) 透明で正常な水晶体。縮尺; 2mm。



図IV-6. 胎生14.5日のC3H-E10/+ ↔ BALB/c水晶体および神経網膜における抗CSA抗体によるキメリズムの免疫染色像。(A) CSA陽性の水晶体細胞は水晶体上皮および水晶体線維の領域に認められる。(B) Aの強拡大像。水晶体皮質深部の異常核を持つ細胞(矢尻)はCSA陽性である。(C) このキメラ個体では神経網膜はCSA陽性細胞優勢であるが水晶体のCSA陽性細胞(矢尻)はわずかである。水晶体中心部付近では形態異常の核を有するCSA陽性細胞(矢印)と正常な核(矢尻)を有するCSA陰性の水晶体線維細胞の両者が認められる。縮尺:(A, C, E); 200 $\mu$ m。(B, D); 50 $\mu$ m。

第V章 キメラマウスを用いた、ラボラトリーマウス系統と野生マウス  
系統間交配における雄性不妊要因の解析

---

## 1. 諸 論

種間雑種における生殖不能はさまざまな動物および植物で見られる現象で、種と種を隔離する機構のひとつと考えられている (Dobzhansky, 1951)。こうした生殖不能は特に異型配偶子性の性に生じやすいことは Haldan's rule として知られているが (Haldane, 1922)、そのメカニズムについては不明な点が多い。マウスでは F1 雑種の雄性不妊として、核型異常によるもの、T-t 遺伝子複合体の関与によるもの、さらに、Hst-1 をはじめとする hybrid sterility 遺伝子群によるもの等があげられる (Forejt, 1985)。これらの不妊雄では精巣における精子形成に障害を起こしている場合が多数報告されている (Forejt, 1985)。

精巣における生殖細胞の正常な成熟と分化は、精巣を構成している生殖細胞とその支持細胞であるセルトリ細胞、ライデッヒ細胞をはじめとする間質細胞との相互作用により支持されている。さらに、これら性腺の細胞群は視床下部-下垂体-性腺という一連の内分泌系の一部としてホルモンの支配を受けている。F1 雑種における雄性不妊では精子形成に異常があることが報告されているが、どの段階で異常が起きているのか、セルトリ細胞やライデッヒ細胞の関与の有無等、いまだに不明な点が多い。

M. MUS-NJL (NJL) はデンマーク産の野生マウス *M. musculus musculus* を起源として育成された近交系である。この NJL 系統と BALB/c 系統との F1 雑種を作成し、交配実験をしたところ、F1 雌は繁殖可能であったが、F1 雄は不妊であった。しかも、F1 雄の精巣は著しく萎縮したものであることがわかった。そこで本研究では、種間雑種における雄性不妊のモデルとして、NJL と BALB/c との F1 雄でみられた不妊現象をとりあげ、そのメカニズムを解明するために以下の事項について追究した。

- 1) F1 雄の交尾行動と精巣の組織、2) BrdU 標識と生殖細胞の分化段階特異的抗体を用いた生殖細胞の増殖と分化の解析、3) 集合キメラによる不妊要因の解析、4) 各種近交系との交配より得た F1 雄の精巣組織の比較、5) 交配実験による雄



性不妊要因とT-遺伝子座との連関。

## 2. 材料と方法

### 1) 動物

M. MUS-NJL (NJL) はデンマークの northern Jutland で捕獲された野生の *Mus musculus* を起源とする近交系である。1980年にデンマークの P. Hjorth 博士 (Dr. Peter Hjorth, University of Aarhus, DK-8000, Aarhus C, Denmark) より三島の国立遺伝学研究所に送られて以来近親交配 28 世代に達している。

BALB/cCrSlc は日本エス・エル・シー株式会社より、BALB/cAJcl は日本クレアよりそれぞれ購入した。BALB/cAnNCrj、C3H/HeN、AKR/JSea 系統は日本チャールス・リバー株式会社より購入した。その他、129/Sv、CBA/CaHN、C3H/HeSn-Ttf/tf、C3H/HeHa-Pgk は国立遺伝学研究所にて維持されている系統より分与された。A/J および SM/J は浜松医科大学・実験動物施設の西村博士より分与された。GRS/A は 1986 年以来理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センター・実験動物施設 (理研筑波センター) にて維持されていた系統である。

### 2) 交配実験

いずれの系統も理研筑波センターにて 2-3 ペアより交配・繁殖を行い実験用の動物集団を準備した。マウスは SPF 飼育室で維持し、12L:12D の照明条件下で、標準飼料 (CRF-1-R、日本チャールス・リバー株式会社) と水を自由摂取させた。ラボラトリーマウス系統と NJL との F1 雑種は、2-3 匹のラボラトリーマウスの雌を NJL の単飼雄と同居させる事により作成した。同居期間は雌の妊娠が明らかになる 12-17 日とした。妊娠した雌は雄と分離して出産させた。F1 雑種雄は 1.5-2 ヶ月齢で屠殺して組織標本を作成した。

### 3) T 遺伝子座と不妊要因との連関の有無

結果 (表 V-2) に示す通り (BALB/cA X NJL) F1 の雄は著しく萎縮した精巣をも

ち、不妊であるが、(C3H/HeSn-Ttf/+tf X NJL)F1の雄は正常な精巣を持ち、妊性を示した。そこで、BNF1雄の不妊現象にT遺伝子座近傍の遺伝子が関与しているかどうかを調べるために、(BALB/cA X C3H/HeSn-Ttf/+tf)F1-T/+を作成し、このF1雌とNJL雄を交配して、その仔マウスの雄における尾の形質と精巣重量を2ヵ月齢で調べた。BALB/cとNJLのT遺伝子座近傍の遺伝子の相互作用により不妊が生じているとの仮説に立脚した場合、C3H由来の第17番染色体のT近傍領域を持つ短尾個体(遺伝子型:T/+)の精巣重量は比較的大で、BALB/c由来の第17番染色体のT近傍の領域を持つ正常尾個体(+/)の精巣重量は比較的小である事が予想される。

#### 4) (BALB/c X NJL)F1とC3Hとの集合キメラの作製

(BALB/cA X NJL)F1(BNF1)とC3H/HeNの8細胞期胚を用いて集合キメラを作成した。集合キメラ作成方法の詳細は第三章で既に述べた。

BNF1とC3Hの両者とも毛色はアグーチなので、毛色によるキメラ個体の識別は不可能であった。そこで、NJLのglucose phosphate isomeraseの電気泳動的多型を調べたところ、GPI-1Aであった。BALB/cAがGPI-1A、C3H/HeNがGPI-1Bであったので、BNF1(GPI-1A)とC3H/HeN(GPI-1B)の組み合わせより得られた個体がキメラであることの判定はGPIの解析により可能であることがわかった。約1ヵ月齢で少量の血液を採取し、電気泳動用サンプルとして用いた。電気泳動にはセルロースアセテート膜を用いたTitanIII電気泳動システム(Helena Laboratories, Beaumont, Texas)を用い、Muggleton-Harrisら(1987)の条件に従って泳動した。得られたキメラの免疫組織学的解析は1-6ヵ月齢で行った。

本研究では外見的に雄と判定されたキメラマウスを用いたが、それらの中には、XY↔XYキメラだけでなく、XX↔XYキメラが含まれる事が予想された。このようなキメラでは、XXの生殖細胞は生後長くは生存できず、成獣の精巣において脱落すること、さらに、XXのセルトリ細胞は、存在したとしても常に小数にとどまる

ことが示されている（未発表データ； Palmer et al. 1992; Patek, et al. 1992）。従って、本研究では、（a）生殖細胞が両系統より由来する場合、または、（b）両系統由来のセルトリー細胞が同程度混在する場合に限り、これらをXY $\leftrightarrow$ XYキメラであるとみなした。

#### 5) BrdU標識と組織標本の作成

BrdU標識の方法は第Ⅲ章で既に述べた。標識はいずれも1回で、標識後2時間、2、4、6、10、15、20および30日にマウスを屠殺して精巣を採取した。組織の固定法および組織切片作成法は第Ⅲ章で詳しく示した。抗BrdU、BC7、TRA369による免疫染色のみを目的とする組織標本には後固定液として4%paraformaldehyde溶液（0.1M 磷酸緩衝液、pH7.4）を用いた。

#### 6) 免疫組織染色

BrdUの免疫組織染色法については第Ⅲ章ですでに述べた。

精巣の生殖細胞の分化段階を調べるために3種類のラットモノクローナル抗体（ACK-2、BC7、TRA369）を用いた。ACK-2はマウスのW遺伝子座のc-kit proto-oncogeneの遺伝子産物を認識する抗体で（Nishikawa et al. 1991）、精巣では、分化過程にある精祖細胞およびpreleptotene期精母細胞を認識する（Yoshinaga, et al. 1991）。BC7は接合期から初期pachytene期の精母細胞を認識し（Koshimizu et al. 1990, Abstract）、TRA369はpachytene期精母細胞から初期精子細胞までを認識する（Watanabe et al. 1992）。ACK-2は熊本大学医学部の西川伸一博士のご好意により、また、BC7およびTRA369は大阪大学・微生物病研究所の西宗義武博士のご好意により、それぞれ分与された。

精巣におけるキメリズムはC3H系統特異的抗体による免疫組織染色により解析した。染色法の詳細は第Ⅲ章で述べた。

### 3. 結果

#### 1) BNF1雄の交尾行動と精巣組織の観察

まず、BNF1雄の交尾行動が正常かどうかを交配実験により確かめた。BNF1雄と2ヵ月齢のC3H/HeN雌とを連続4日間同居させて、毎朝臆栓の有無を確認した。雌は離乳後群飼していたものから任意に選んだ。図V-1は用いた5匹の雄すべてが、正常に交尾したことを示している。すなわち、交配した20匹の雌のうち18匹(90%)に顕著な臆栓が確認され、しかも、同居3日目に臆栓の確認された個体が最も多かった。この結果により、BNF1雄の交尾行動には異常がなく、しかも、フェロモンも産生されており、雌の性周期を同調させるのに十分であることが示された。次に、雄を解剖してみたところ、著しく萎縮した精巣が観察された。精巣上体、精管および精囊腺には顕著な異常は見られなかった。生後2ヵ月齢でBNF1雄の精巣を組織学的に観察したところ、精祖細胞と初期精母細胞およびセルトリ細胞のみからなる精細管上皮が観察された。一方、同日齢のBALB/cの精巣では、精祖細胞をはじめ各分化段階にある精母細胞、精子細胞と精子が観察された。以上のことから、BNF1雄における繁殖障害は精巣の発育異常、特に生殖細胞の分化過程に異常があるためと考えられた。

#### 2) BNF1とBALB/cの生殖細胞における増殖と分化の比較

BrdU標識:

BALB/cの精巣では、BrdU標識のパターンは、精細管上皮周期に対応して精細管上皮断面ごとに異なっていた。BrdU標識された生殖細胞はS期の精祖細胞と減数分裂の開始段階でDNA合成を行っているpreleptotene期の精母細胞であると考えられた。これら標識細胞は標識2時間ではいずれも精細管の基底層に配列していた(図V-2A)。BNF1の精巣でも、精細管上皮の断面により標識パターンに違いがみられたので、正常同様、周期的な変化を繰り返していることが示唆された。

ところが、精細管基底層に並ぶ標識細胞はわずかで、多くは精細管上皮の内腔側に観察された(図V-2B)。ここで、基底層の標識細胞はS期の精祖細胞、内腔側の標識細胞はpreleptotene期精母細胞であると考えられた。同様にして、BrdU注射後2、4、6、10、15、20、30日にBrdU標識細胞を観察したところ、時間経過に従って標識細胞の精細管基底層から内腔への移行がみられた。2-4日後のBALB/cの精巣では、標識細胞はleptotene-zygotene期にあり、依然として基底層に配列していた。2-4日後のBNF1の精巣では、標識細胞は精細管内腔側に多くみられた。6日目のBALB/cでは初期pachytene期に移行していたのに対して(図V-2C)、BNF1では多くの標識細胞が消失していた(図V-2D)。さらに、BALB/cでは10日目にpachytene期、15日目にround spermatid(図V-2E)、そして20日目にelongated spermatidに至ることが示された。30日目には基底層に蛍光核をもつ精細管がわずかに見られただけなので、多くの標識細胞は20-30日の間に精子まで分化した後、精細管上皮から離脱したと考えられる。10日目以降のBNF1の精巣では、顕著な標識細胞は消失していた(図V-2F)。また、精細管基底層に標識細胞を有する精細管は2日目から30日目にいたるまでBNF1およびBALB/cのどちらにおいても観察されたが、その数は内腔へ移行した蛍光核より少なく蛍光強度も弱かった。精祖細胞の段階でBrdUをとりこみ、分裂により標識が希釈されたと考えられる。

#### ACK-2:

ACK-2はマウスのW遺伝子座にあるc-kitの遺伝子産物を認識する(Nishikawa et al. 1991)。正常精巣では分化過程にある精祖細胞とpreleptotene期精母細胞に強く発現する(Yoshinaga et al. 1991)。BALB/cの精巣ではACK-2陽性細胞はすべて精細管上皮の基底層に配列していた(図V-3A)。一方、BNF1の精巣ではACK-2陽性細胞が精細管基底層にも見られたが、多くは精細管上皮内腔側に位置

していた（図V-3B）。

#### BC7とTRA369:

BALB/cの精巣ではBC7によって、精細管基底層に位置するzygotene期から初期pachytene期の精母細胞が染色された（図V-3C）。また、TRA369によって初期pachytene期精母細胞から成熟中期の精子細胞が染色された（図V-3E）。

BNF1の精巣では、BC7陽性細胞が精細管上皮基底層から離脱して、精細管内腔に多数見られた（図V-3D）。さらに、TRA369陽性の細胞はほとんど観察されなかった（図V-3F）、初期pachytene期精母細胞にまで至る細胞がないと判断された。

以上の観察から、BNF1の精巣では、精祖細胞が存在し周期的な増殖をしているが、preleptotene期精母細胞の段階ですでに基底層から離脱して内腔側に位置しており、zygotene期の段階で順次、精細管上皮から離脱・消失していると思われる。

#### 4) キメラを用いた雄性不妊要因の解析

次に、生殖腺の発育異常に生殖細胞とセルトリー細胞との細胞間相互作用が関係するかどうかについて、BNF1とC3H/HeNとの集合キメラを作成して調べた。GPIの電気泳動パターンによりキメラ個体を識別したところ、表現型雄のキメラが22匹、表現型雌のキメラが9匹得られた。表現型雄のキメラのうち2匹は片側に精巣、片側にovo-testisを持っていたのでXX↔XY型の性キメラと考えられたので、本解析から除外した。

20匹の表現型雄キメラについて、その精巣をC3H系統特異的抗体を用いて解析した結果、生殖細胞およびセルトリー細胞の由来と構成割合により、4群に分けられた（表V-1）。材料と方法で示した基準に従って、III群とIV群のキメラ計

5匹を明らかなXY $\leftrightarrow$ XYキメラであると考え以下の観察に用いた。

まず、III群のキメラでは、生殖細胞、セルトリー細胞、Leydig細胞および体細胞のいずれも両系統に由来する細胞が混在していた。何れの組織においてもBNF1由来のCSA陰性細胞が優勢であった。図V-4A、Bに示すように、ほとんどがBNF1と同様の染色パターンを示す精細管上皮により構成されていたが、一部で精子形成にまで至る精細管上皮が見つかった。C3H系統特異的抗体による免疫染色により、この部分では精細管上皮を構成する生殖細胞は全てC3H/HeN由来であることが示された(図V-4C)。また、CSA陰性のセルトリー細胞が見られたので(図V-4C)、セルトリー細胞はBNF1由来であると考えられた。

IV群のキメラ(図V-4D、E、F)では生殖細胞はすべてBNF1由来であったが、セルトリー細胞は両系統由来の細胞が同程度混在していたので、XY $\leftrightarrow$ XYキメラであると考えられた。これらの精巣では、BC7陰性(図V-4D)、TRA369陽性(図V-4E)のpachytene期精母細胞がしばしば観察された。抗CSA抗体による染色の結果(図V-4F)、これらpachytene期精母細胞の観られた精細管ではC3H/HeN由来のセルトリー細胞が優勢であることが示された。しかし、いずれの場合も、pachytene期精母細胞以降の分化段階にまで至る生殖細胞は観察されなかった。

以上の観察結果により、BNF1のセルトリー細胞はC3H/HeNの生殖細胞の分化を支持することが可能であること、BNF1の生殖細胞はC3H/HeNのセルトリー細胞により支持された場合、pachytene期精母細胞にまで分化段階が改善されるが、それ以降の分化は起こらないことが示された。

#### 5) 各種近交系とNJL系統とのF1雑種雄における精巣組織の比較

BNF1雄でみられた不妊現象の遺伝学的解析の一つとして、各種近交系マウスと交配してF1を作成し、雄の精巣を組織学的に観察した。得られた各種F1の精巣は



生殖細胞の分化程度の違いにより、3群に分けられた(表V-2)。第I群はA/J、BALB/cの3つのサブラインとのF1で、BC7とTRA369による免疫染色では、BC7陽性細胞が精細管内腔側に集積し、TRA369陽性の細胞は殆ど観察されなかった。生殖細胞の分化はzygotene期精母細胞で停止していると考えられた。第II群はC57BL/6N、AKR/JとのF1で、BC7陽性細胞は第I群と同様に内腔側に多数見られたが、TRA369による染色でも陽性細胞が確認された。これらTRA369陽性細胞は、正常な精巣に比べて明かに数が少なく、pachytene期精母細胞および精子細胞であった。第III群は129/Sv, CBA/CaHN, GRS/A, C3H/HeN, C3H/HeSn-Ttf/+tfおよびC3H/HeHa-PgkとのF1で、精細管上皮が良く発達しており多数の精子が観察された。BC7とTRA369による染色パターンは正常精巣のそれと同様であった。第I群、第II群、第III群の代表的な精巣組織を図V-5 A、B、Cにそれぞれ示した。

以上の様に、各種系統とNJL系統との交配より得られた各種のF1雑種雄の精巣では、生殖細胞の分化程度に差のあることが示された。こうした系統分布と、先に示した生殖細胞の分化異常、さらにNJL系統の起源となる野生マウスの捕獲場所を考慮すると、この不妊現象に第17番染色体、T遺伝子座近傍にあるHst-1遺伝子座(Forejt, 1975)の遺伝子が関与していることが考えられた。そこで、次の交配実験によりその可能性を調べた。

#### 6) 雄性不妊要因とT遺伝子座との関連の可能性

NJLとBALB/cとのF1雑種における雄性不妊にT遺伝子座近傍の遺伝子が関与している可能性を調べた。先に、(C3H/HeSn-Ttf/+tf x NJL)F1の雄が妊性を示し、正常な精巣を有していたことから、ForejtらのHst-1、T6解析の例(1975, 1976)にならい、NJL系統雄と(BALB/cA x C3H/HeSn-Ttf/+tf)F1-T/+雌とを交配した。この交配より得られたF1の雄について、片側の精巣重量(mg)と尾の形質(短尾T/+ : 正常尾+/+)を調べたところ図V-6の様な分布が見られた。BALB/c由来の野生型

対立遺伝子 $+$ を持つ正常尾個体は精巣重量の比較的小さな群に、C3H由来の $T$ を持つ短尾個体は精巣重量の比較的大きな群に分離する傾向が見られた。正常尾個体と短尾個体の平均精巣重量はそれぞれ $36.4 \pm 2.4$  ( $n=31$ )および $61.1 \pm 2.3$  ( $n=29$ )で、両者の差は統計的に有意であった (Student's  $t$ -test,  $t_{cal}=7.36$ ,  $p<0.001$ )。

この結果は、NJLとBALB/cとのF1雑種雄における精巣の異常は第17番染色体 $T$ 遺伝子座近傍の遺伝子が関与しており、NJL由来の対立遺伝子とBALB/c由来の対立遺伝子がヘテロの組み合わせになった場合におこるとする仮説に一致した。

#### 4. 考 察

本研究では、BALB/c系統と野生マウス (*Mus musculus*) 由来のNJL系統とのF1雑種 (BNF1) における雄性不妊現象を免疫組織化学とキメラマウスの実験系を用いて細胞レベルで解析を行った。その結果、BNF1の精巣において生殖細胞の分化は減数分裂前期のzygotene期精母細胞の段階で停止していること、BNF1とC3H/HeNとのキメラの精巣において、C3H/HeN由来のセルトリ細胞が優勢の場合、BNF1の生殖細胞の分化段階は精母細胞のpachytene期まで改善されるが、さらに進んだ精子形成段階には至らないことが示された。また、交配実験によりこの不妊現象はBALB/cおよびNJL由来の第17番染色体上のT遺伝子座近傍の遺伝子がヘテロの状態で組合わさる事により引き起こされる可能性が示された。

BrdU標識により不妊のBNF1の精巣における生殖細胞の増殖と分化を調べたところ、BNF1の精巣でも正常精巣と同様に精祖細胞が精細管上皮基底層に存在し周期的な増殖を繰り返している事がわかった (図V-2)。しかし、精祖細胞から精母細胞へ分化する段階で基底層から離れ、pachytene期精母細胞に達する前に消失した (図V-2D)。生殖細胞の異なる分化段階を認識するACK-2、BC7およびTRA369の染色結果もこのことを裏付けるものであった。ACK-2は分化段階にある精祖細胞およびpreleptotene期精母細胞を認識する (Yoshinaga et al. 1991)。BNF1の精巣ではACK-2陽性細胞が精細管基底部および内腔側に観察されたが、正常精巣では精細管基底部のみに観察された (図V-3A、B)。BNF1の精巣で精細管内腔側に見られた生殖細胞は、ヘマトキシリンによる核の染色性より、正常精巣におけるpreleptotene期精母細胞に相当すると思われた。さらに、正常精巣の隣接切片をBC7およびTRA369により染色すると、BC7によりzygotene期から初期pachytene期精母細胞が染色され、TRA369により初期pachytene期精母細胞から初期精子細胞までが認識された。すなわち、初期pachytene期精母細胞はBC7およびTRA369の両抗体と反応した。ところが、BNF1の精巣ではBC7陽性の生殖細胞は多数

見られたが、TRA369陽性の細胞は殆ど見られなかった。したがって、BNF1の精巣では初期pachytene期精母細胞にまで至っている細胞がないことが示された。これらの免疫組織学的検索結果からBNF1における生殖細胞の分化障害は減数分裂前期のzygotene期に起こると結論された。

精巣の発生・発育過程における生殖細胞とセルトリ細胞の相互作用の役割は特に重要である (de Krester, 1990)。本研究ではBNF1とC3H/HeNの組み合わせでキメラマウスを作成して生殖細胞とセルトリ細胞の相互作用を調べた。BNF1の生殖細胞では精母細胞のzygotene期に分化障害が起こり、TRA369陽性細胞が見られなかったが、キメラマウスでは、C3H/HeN由来のセルトリ細胞が優勢の場合にBNF1由来のBC7陰性-TRA369陽性生殖細胞が認められた。これらのTRA369陽性細胞は、核の形態よりpachytene期精母細胞だと思われた。すなわち、キメラにすることにより、BNF1の精巣において見られなかったTRA369により認識される分子の発現が行われ、若干の分化段階の改善が見られた。従って、C3H/HeNのセルトリ細胞の作る環境がBNF1の生殖細胞分化に対して促進的な働きをしている事が示唆された。しかし、キメラの環境においても完全な精子形成に至るBNF1由来の生殖細胞は観察されず、生殖細胞自身に分化障害を起こす要因があることが明らかとなった。一方、BNF1が圧倒的に優勢のキメラ精巣において、精子細胞への分化が観察された (図V-4C)。この部分の生殖細胞はC3H/HeN由来である事、しかもこの部分で抗CSA抗体陰性のセルトリ細胞が観察されたことから、BNF1の精巣環境でも正常なC3H/HeN由来の生殖細胞は発育・分化が可能で、BNF1のセルトリ細胞も正常に機能し得ると考えられた。以上のことから、生殖細胞の分化にはセルトリ細胞との相互作用が非常に重要であること、BNF1の生殖細胞においてはセルトリ細胞との相互作用に関連する因子に異常をきたしていることが予想された。

F1雑種の不妊雄の生殖細胞を対象とした細胞遺伝学的研究から、完全な精子形成過程にはXおよびY染色体の対合が必須であると言われている (Burgoyne et al.

1992)。C57BL/6と *Mus spretus* とのF1雑種雄では、高頻度でおこるX-Yの分離により減数分裂中期(MI期)以降に生殖細胞の分化障害がおこることが報告されている(Matsuda et al. 1991)。*Mus musculus molossinus*と近交系マウスとの交雑では、高頻度のX-Y分離と精巣重量の低下が認められたが、雄の妊性には影響を与えなかった(Imai et al. 1981)。また、BALB/c系統と *Mus spretus* とのF1雑種においては、第9染色体上の *Hst-2* 遺伝子座の関与が示されており(Green, 1989)、この場合も生殖細胞はMI期以降の分化に障害がある。そこで、*Mus spretus*由来の系統PNG2とBALB/cのF1雑種を作成し雄の精巣をBrdU標識、ACK-2、BC7、TRA369で検索したところ、preleptotene期精母細胞は精細管基底層に維持されており、TRA369陽性細胞も多数観察されたが、精子細胞は著しく少なかった(未発表データ)。これらの例では生殖細胞は少なくともMI期まで至っており、しかも、生殖細胞の分化がある段階で完全に停止するものではなかった。対照的に、BNF1では生殖細胞の分化障害がzygotene期という早期におこり、しかも、比較的完全に分化停止がおこるので、BNF1雄における生殖細胞の分化障害はX-Yの分離以外のメカニズムによると思われる。

BNF1において生殖細胞の分化が減数分裂前期でおこること、NJLがデンマーク産野生マウス由来であること、さらに、各種系統との交配により得られるF1雄の妊性について表V-2の様な結果が得られたこと等は、Forejtら(1975)の報告した第17番染色体上の *Hst-1* 遺伝子座による雄性不妊現象に見られた結果と類似していた。そこで、Forejtらの例に習い、NJLと(BALB/cA×C3H/HeSn-*Ttf/+tf*)-*T/+*とを交配して得られるF1雄における精巣重量と尾の形質との相関を調べたところ、BALB/c由来の *T* 遺伝子座近傍を有する正常尾個体の精巣重量は比較的小さく、C3H/HeSn-*T/+*由来の *T* を有する個体の精巣重量は比較的大きかった。従って、BNF1における生殖腺の異常は、主に、BALB/cの第17番染色体、*T* 遺伝子座近くの遺伝子とNJLのそれに対応する遺伝子の組み合わせにより生じると考えられた。

今後、この遺伝子座のより詳細なマッピングにより Hst-1 との相同性を確かめる必要がある。また、予備実験として、(BALB/c X NJL)F1雌をNJLに戻し交配した場合には、精巣の組織学的特徴や精巣重量に明瞭な分離が見られなかった（未発表）ので、他の遺伝的要因の関与の可能性も残された。

今後、生殖細胞の分化障害をもたらしている細胞要因、生殖細胞とセルトリー細胞との相互作用に必要な因子と、Hst-1 の遺伝子およびその他の遺伝的要因との関係をさらに追究する必要がある。

## 5. 要 約

本研究では、BALB/c系統と野生マウス由来のN/JL系統とのF1雑種(BNF1)雄に見られる不妊について、そのメカニズムを細胞生物学的および遺伝学的に調べた。BNF1雄の交尾行動を調べたところ異常はなかったが、その精巣は明らかに正常より小さく萎縮していた。そこで、精巣における細胞増殖と分化をbromodeoxyuridine (BrdU) 標識法及び生殖細胞分化段階特異的抗体ACK-2、BC7、TRA369により免疫組織学的に調べた。まず、BALB/cの精巣では生後30日頃から精子形成が観察され、BrdU静注後2時間で、精細管基底層にならぶS期の精祖細胞およびpreleptotene期精母細胞が標識された。一方、BNF1の精巣では、精細管基底層に標識細胞のみられる精細管はわずかで、多くの場合、精細管内腔側に位置する細胞が標識された。その後、標識細胞を経時的に観察したところ、BALB/cの精巣では2-4日にleptotene-zygotene期、6日に初期pachytene期に至ることが示された。BNF1では4日になると標識細胞の数が減少しはじめ、6日には著しい減少が認められた。従って、BNF1では、精祖細胞が存在し周期的に増殖を繰り返しているが、preleptotene期精母細胞の段階ですでに基底層から離れて内腔側へ移動しており、zygotene期に完全に精細管上皮から離脱消失していると考えられた。ACK-2、BC7、TRA369による免疫組織染色によっても、同様の結果が得られた。

つぎに、生殖細胞とセルトリ細胞との相互作用の影響を見るためにBNF1とC3H/HeNの集合キメラを作成し、その精巣における細胞分化と系統由来を調べた。その結果、BNF1の生殖細胞の分化はC3Hのセルトリ細胞の参加によっても精子形成までには至らないが、pachytene期精母細胞までは改善されることが示された。また、BNF1のセルトリ細胞によりC3Hの生殖細胞は精子にまで分化可能であったので、BNF1のセルトリ細胞は正常に機能し得ると考えられた。これらの結果から、生殖細胞の分化にはセルトリ細胞との相互作用が重要であること、BNF1の生殖細胞の分化異常は生殖細胞自身の要因によりおこることが示された。さらに、

交配実験の結果、T遺伝子座に関連した遺伝的要因がBNF1において精巣重量の減少を引き起こしている可能性が示唆され、Hst-1の関与が考えられた。



表V-1 精巢生殖細胞およびセルトリー細胞の由来系統  
の構成割合によるC3H-BNF1キメラの分類

分類群	個体数	由来系統の構成割合		分類* 基準
		生殖細胞	セルトリー細胞	
I	13	BNF1	BNF1>>C3H	-
II	4	C3H	C3H>>BNF1	-
III	3	BNF1>>C3H	BNF1>>C3H	(a)
IV	2	BNF1	BNF1=C3H	(b)

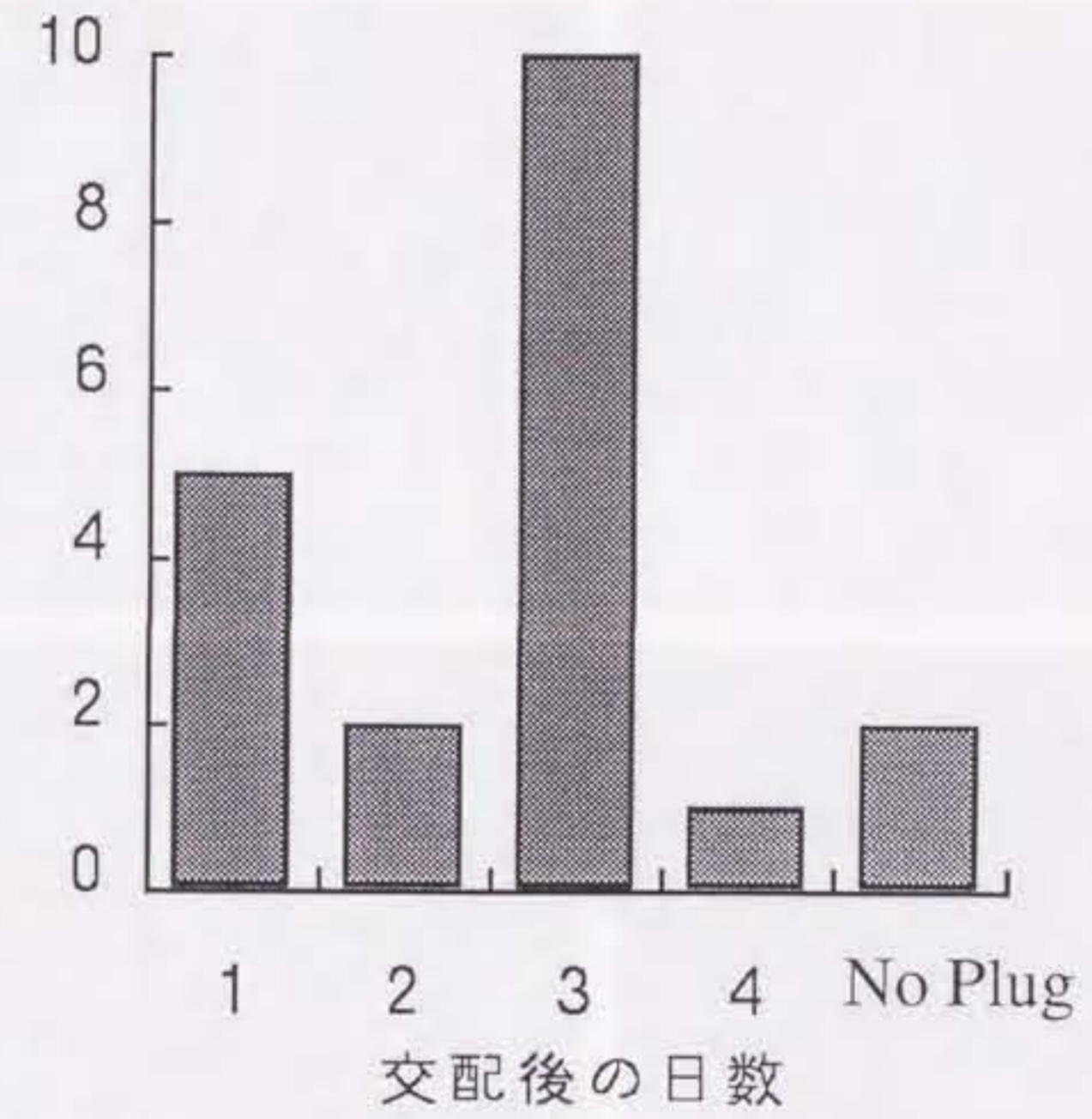
\*分類基準については材料と方法参照。

表V-2 各種F1雑種の精巣における生殖細胞の分化段階による分類

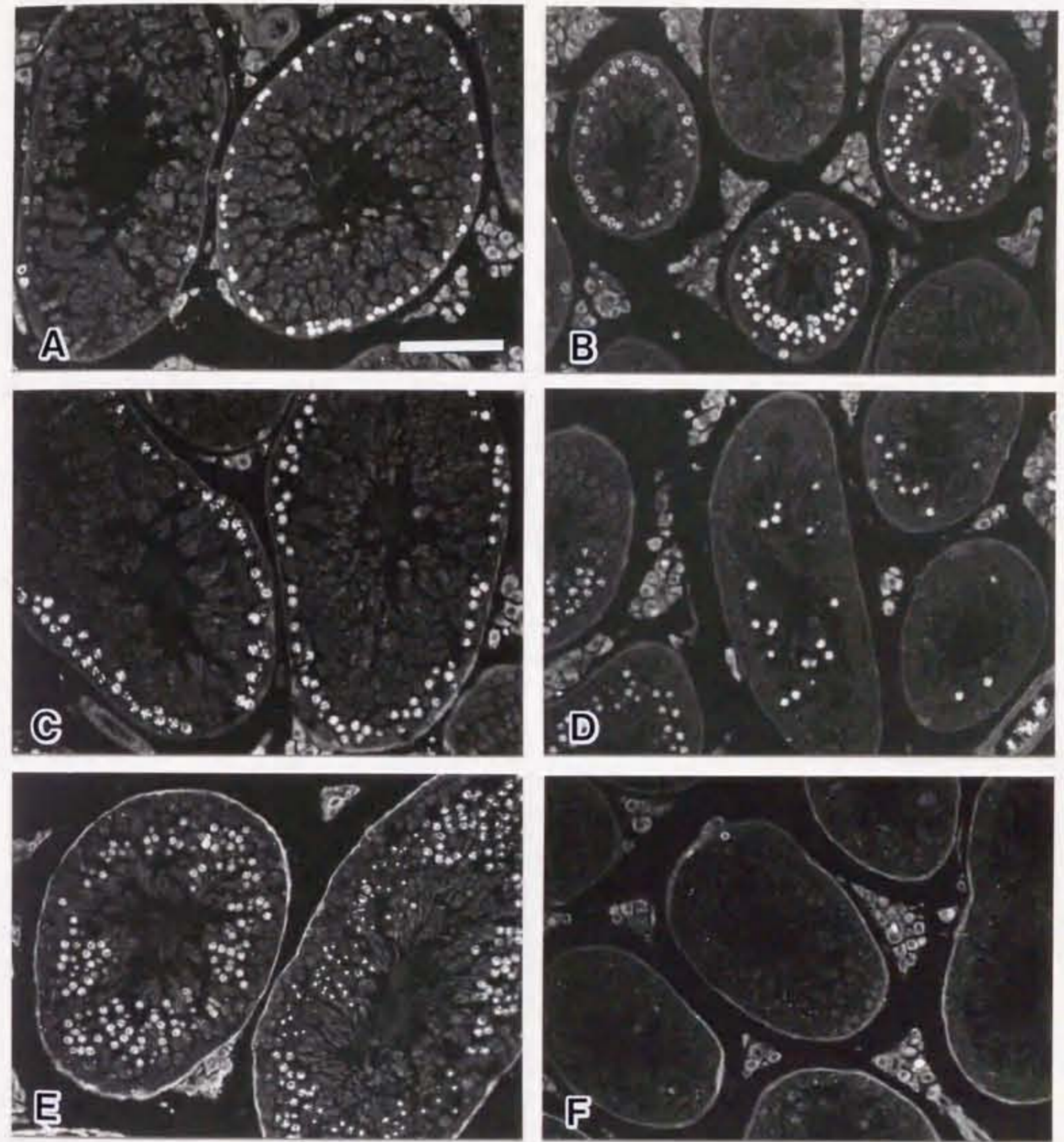
F1雑種	生殖細胞の分化段階*				妊性	分類
	SPG	PSC	SPT	SPM		
A/J X NJL	+	-	-	-	S	I
BALB/cCrSlc X NJL	+	-	-	-	S	I
BALB/cAJcl X NJL	+	-	-	-	S	I
BALB/cAnNCrj X NJL	+	-	-	-	S	I
C57BL/6N X NJL	+	+	+/-	+/-	S	II
AKR/JSea X NJL	+	+	+/-	+/-	N.D.	II
129/sv X NJL	+	+	+	+	N.D.	III
CBA/CaHN X NJL	+	+	+	+	F	III
GRS/A X NJL	+	+	+	+	F	III
SM/J X NJL	+	+	+	+	F	III
C3H/HeN X NJL	+	+	+	+	F	III
C3H/HeSn-T <sub>1</sub> /+ <i>gf</i> X NJL	+	+	+	+	F	III
C3H/HeHa-Pgk X NJL	+	+	+	+	N.D.	III

\* SPG; 精祖細胞, PSC; pachytene期精母細胞, SPT; 精子細胞, SPM; 精子。  
 +; 観察された細胞, -; 観察されなかった細胞, S; 不妊, N.D.; 記録なし, F; 妊性あり。  
 分類については結果参照。

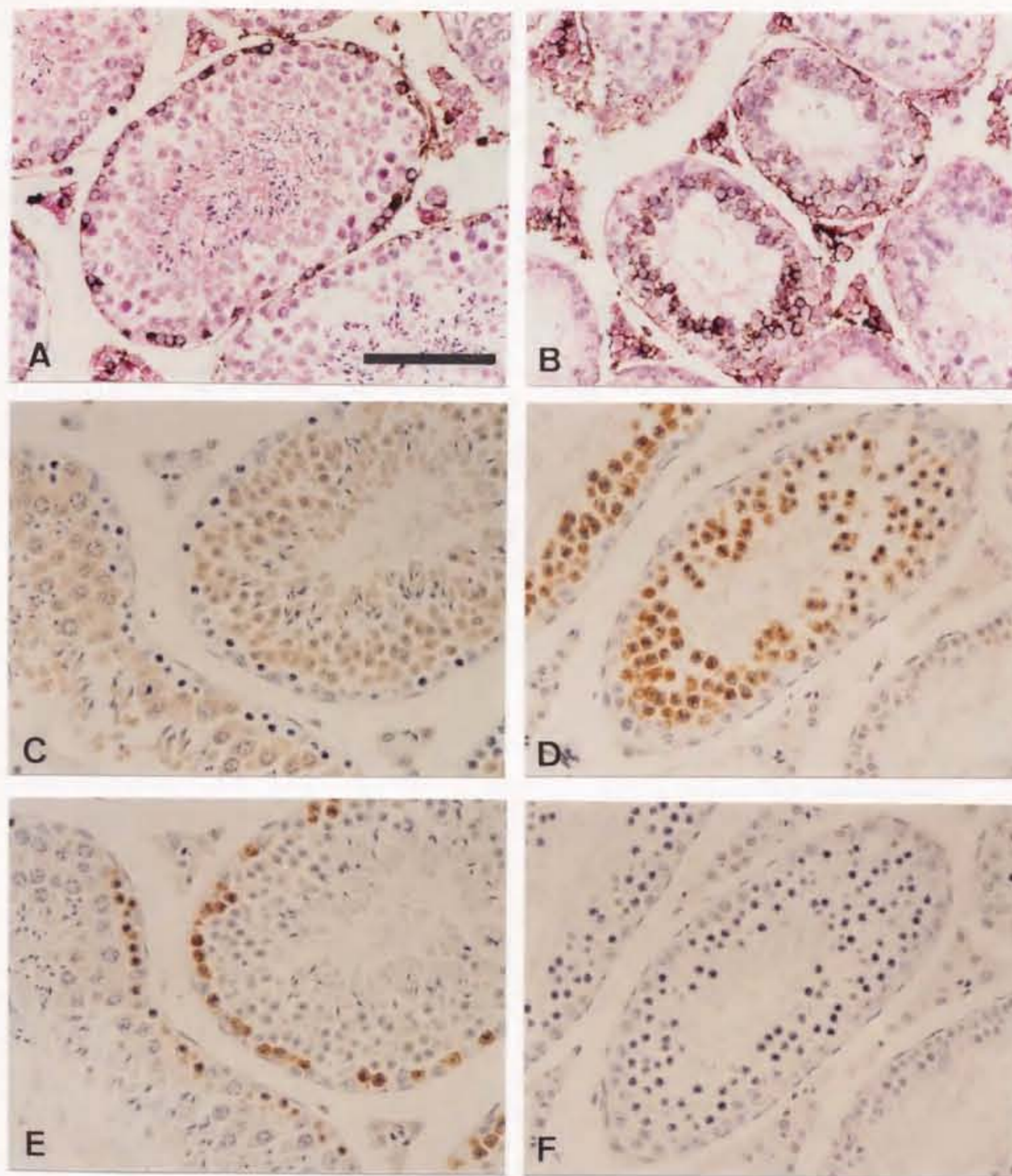
膣栓の確  
認された  
個体数



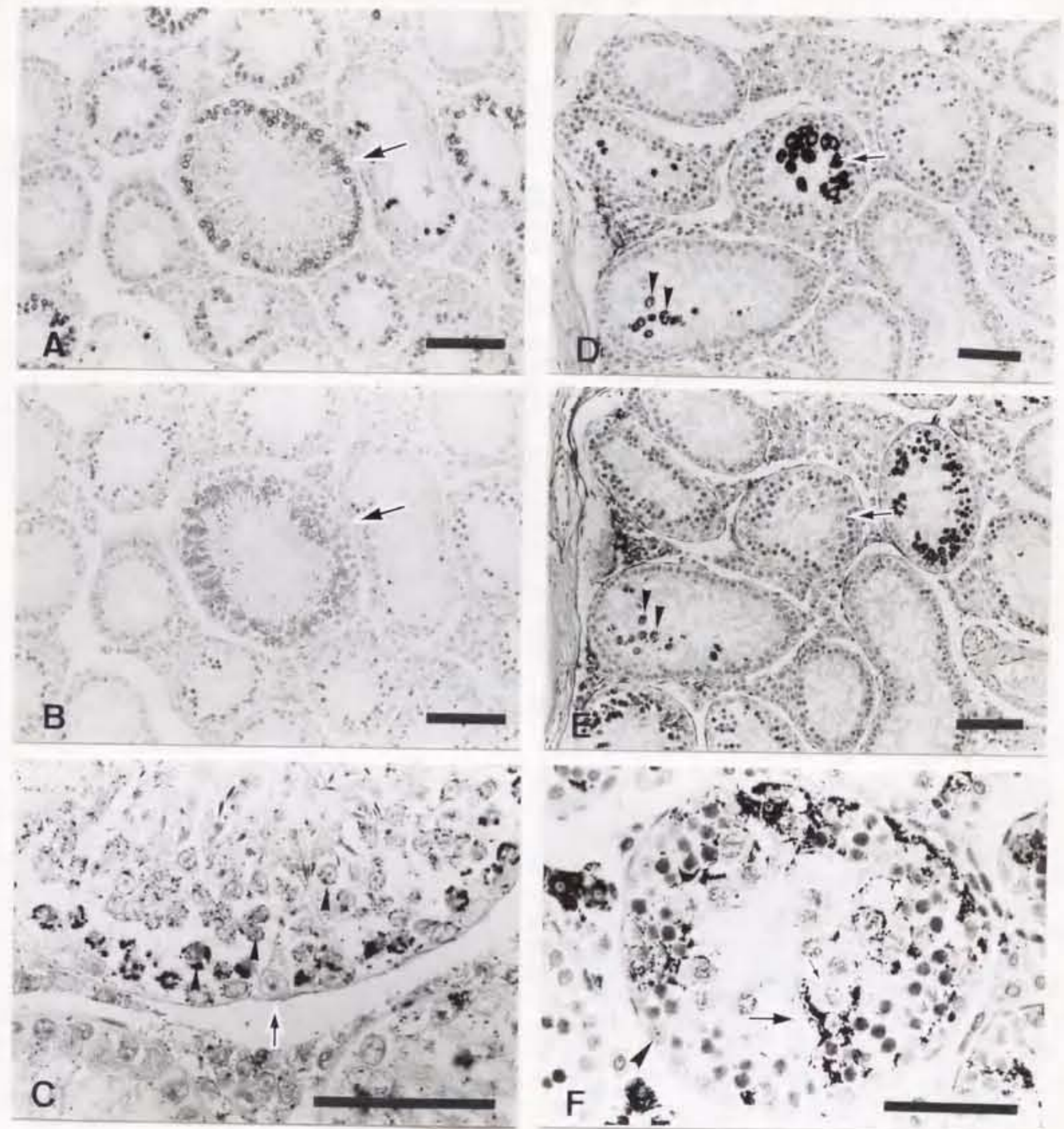
図V-1. (BALB/cA X NJL) F1雄の交尾能力。F1雄とC3H/HeNの雌を1:1で同居させ毎朝膣栓を確認した。ヒストグラムは5組の交配について同居4日間で確認された膣栓を有する雌の数を示す。



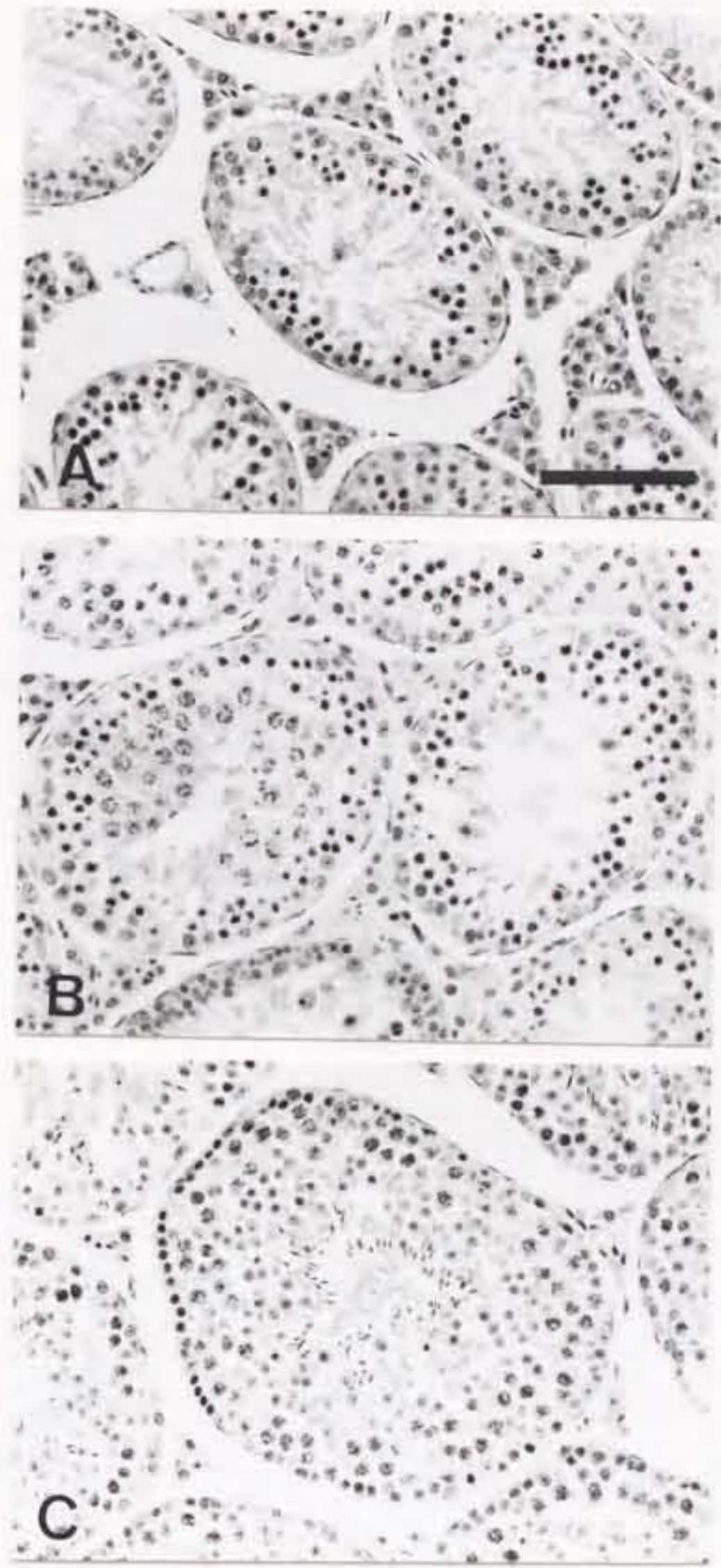
図V-2. BALB/cAとBNF1の精巣におけるBrdUの免疫組織染色。A、BはBrdU投与後2時間のBALB/cAおよびBNF1。C、DはBrdU投与後6日のBALB/cAおよびBNF1。E、FはBrdU投与後15日のBALB/cAおよびBNF1。縮尺：100 $\mu$ m。



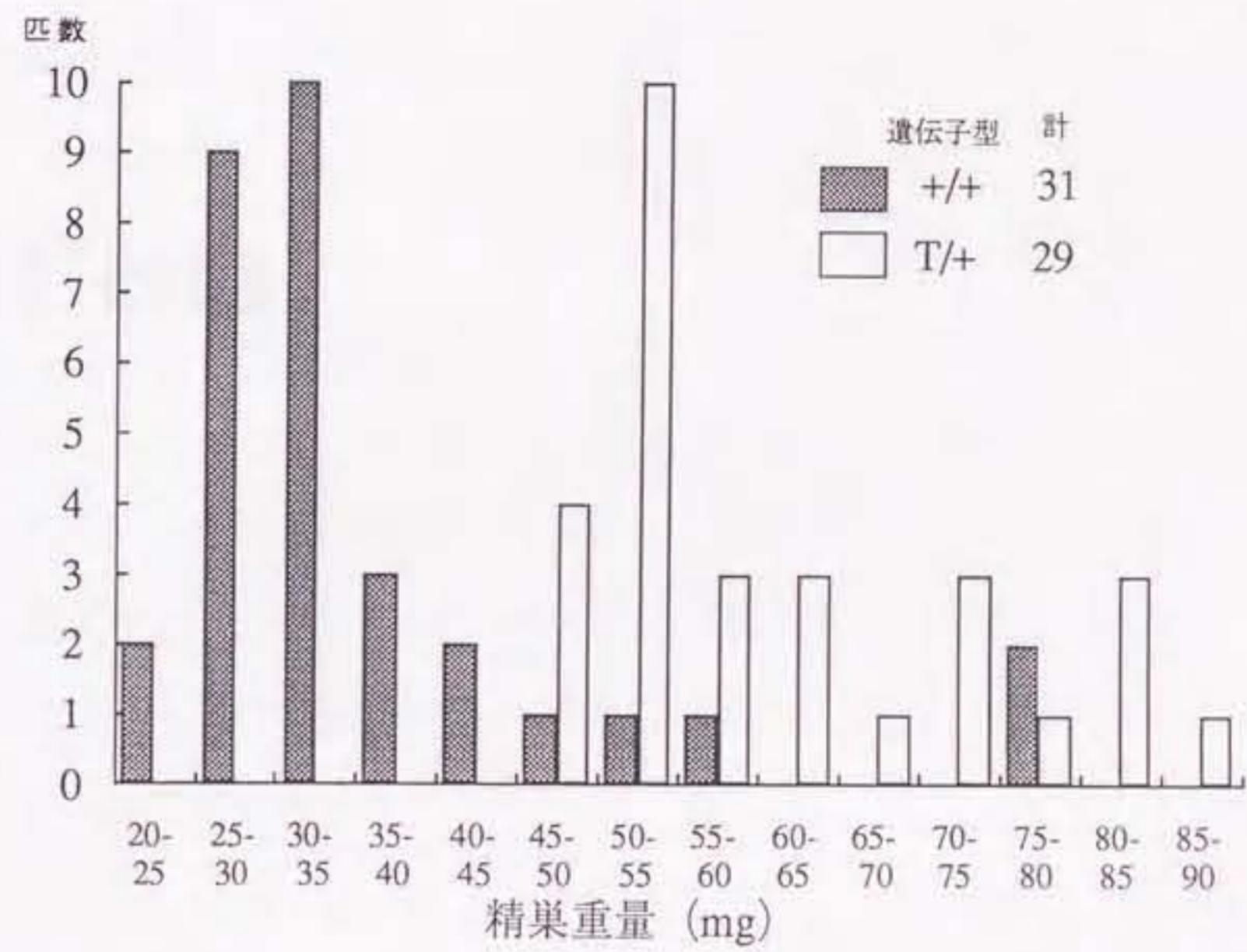
図V-3. BALB/cAとBNF1の精巣における生殖細胞分化特異的抗体 (ACK-2、BC7、TRA369) による免疫組織染色。A、BはBALB/cAおよびBNF1のACK-2による染色像。C、DはBALB/cAおよびBNF1のBC7による染色像。E、FはBALB/cAおよびBNF1のTRA369による染色像。CとE、DとFは、それぞれ隣接切片。縮尺：100 $\mu$ m。



図V-4. C3H/HeNとBNF1とのキメラ精巣におけるBC7、TRA369および抗CSA抗体による免疫組織染色。A、B、Cは第Ⅲ群のキメラ精巣の隣接切片をBC7(A)、TRA369(B)および抗CSA抗体(C)により染色した。A、Bの矢印で示した精細管ではBC7陽性細胞およびTRA369陽性細胞が層状に配列し、さらに精子形成も認められた。この精細管では、生殖細胞はすべてCSA陽性で(C、矢尻)、セルトリ細胞はCSA陰性であった(C、矢印)。D、E、Fは第Ⅳ群のキメラ精巣の隣接切片をBC7(D)、TRA369(E)および抗CSA抗体(F)により染色した。BC7陰性(D、矢印)かつTRA369陽性(E、矢印)のpachytene期精母細胞(F、小矢印)が認められ、それらは、CSA陽性のセルトリ細胞(F、大矢印)に支持されていた。生殖細胞はすべてCSA陰性(F)。BC7陽性(D、矢尻)、TRA369陽性(E、矢尻)の生殖細胞も認められた。CSA陰性のセルトリ細胞も認められる(F、矢尻)。縮尺; 100 $\mu$ m。



図V-5. 各種F1雑種における精巣組織。A ; (BALB/cA X NJL) F1。  
B ; (C57BL/6N X NJL) F1。C ; (C3H/HeN X NJL) F1。HE染色。  
縮尺 ; 100  $\mu$ m。



図V-6. (BALB/cA X C3H/HeSn-Ttf/+tf) F1-T/+雌とNJL雄の交配より得られる雄マウスの精巣重量の分布。尾の表現型(短尾または正常尾)と相関した2相性の分布が見られ、雄性不妊要因とT遺伝子座との連関が示唆された。黒バー；正常尾個体。白抜きバー；短尾個体。





Figure 1: Comparison of experimental results under different conditions. The chart shows that the results are significantly higher for conditions 4, 5, and 6 compared to conditions 1, 2, and 3.

## 第VI章 総合論議

この論文の目的は、... (The purpose of this paper is to...)

まず、... (First, ...)

次に、... (Next, ...)

以上より、... (From the above, ...)

## 1. 凍結保存胚とキメラマウス実験系の普及

キメラマウス作成にあつたては、まず、胚採取のために非常に多くの動物を飼育・維持する必要がある。しかも、集合キメラ作成の場合、胚供給用の2系統と仮親系統の合計3系統を交配させ準備しなければならず、確実に実験を成立させるには飼育マウスの母数を大きくするしかない。こうした実際的な問題が解決されればさらに広く多くの研究者によってマウスキメラの実験系が利用される。その1つの解決方法として、凍結保存胚の利用があげられる。マウス胚の凍結保存は1972年にWhittinghamらによって報告されて以来、多数にのぼる近交系やミュータント系統の保存法として、また、大量の胚を一度に使う発生学的実験の材料供給源として期待されてきた。第II章で示したように、系統により凍結融解操作に対する耐性や仮親へ移植した後の生存率に差があるものの、各系統で凍結保存胚より正常な仔マウスが得られることがわかった。そこで、凍結融解胚を用いてキメラマウス作成の可能性を調べた。Yokoyamaら(1981)の方法により凍結されたC57BL/6N系統の8細胞期胚を用いて、正常なC3H/HeN胚との組合わせでキメラ作成を試みた。その結果、融解後、DMSOを希釈して直ちに胚をプロナーゼ処理すると、透明帯の溶解にともない胚の各割球が解離した。そこで、DMSO希釈後1時間培養したのちにプロナーゼ処理をしたところ、割球の解離は見られず、C3H/HeN胚と集合・接着することができた。凍結融解により一時的に細胞間接着が障害を受け、その後の培養によりその障害が回復したと考えられる。その後24時間の培養でこれら集合胚は胚盤胞に発達した。さらに、仮親へ移植後、凍結融解胚と正常胚とのキメラマウスを得ることができた。この結果は凍結保存胚をもちいたキメラマウス作成の可能性を示しており、今後両系統とも凍結保存胚を使ったキメラ作成も試みていきたい。

一方、ES細胞株では通常の細胞株と同様の凍結保存が行われているので、各種近交系、ミュータント系からES細胞株を確立することにより、それら系統の動物

個体を繁殖・維持することなくキメラ作成が可能である。特に、繁殖障害や致死を引き起こす遺伝子を有する系統については、ひとたび、ES細胞株として確立されればその潜在的利用価値は大きいと思われる。

以上のことから、今後のキメラマウス作成にあたっては、凍結保存胚や凍結保存ES細胞株を有効に活用することにより一度に準備する動物数を大幅に削減できると思われる。アメリカ合衆国ではすでにマウスの凍結保存胚が商業ベースで供給されており、胚細胞注入用の宿主胚として利用されている（G. B. Pierce 私信）。日本国内ではまだ試験段階ではあるが、凍結マウス胚の販売を検討しているところもあり、近い将来、入手可能になると思われる。さらに、この分野の研究を発展させるためには、各種近交系やミュータント系の凍結保存胚とES細胞株の確立をおこなうと共に、より多くの研究者がそれを利用出来るような供給・支援態勢の確立が望まれる。

## 2. キメラ研究の意義

本研究では、第Ⅲ章でC3H系統特異的抗体を用いたキメラマウスの免疫組織学的解析法を検討し、その結果、発生初期から生後に至るまで様々な組織に応用可能な免疫組織学的キメリズム解析法が確立された。続いて、第Ⅳ章では同方法論を用いてマウスの小眼症遺伝子 (Elo) の解析を、第Ⅴ章では系統間交配F1雑種にみられる雄性不妊要因の解析をとりあげて、それぞれ、マウスの水晶体および性腺の発生過程における細胞の増殖・分化・細胞間相互作用と遺伝子発現に関する研究を行った。これらの研究では、単に異常形質を示すマウスと正常系統とのキメラを作成するだけでなく、対象とする組織の正常発生および異常発生過程における細胞増殖や細胞分化を基盤にして追究を行った。これは、ある発生時期のキメリズムが細胞増殖、細胞分化、細胞移動、細胞死といった組織・細胞レベルでそれまでに起こった出来事の結果としてあるので、キメラを構成するそれぞれの細胞の表現型や動態をもとの動物で詳しく調べることにより、キメラにおけるキメリズムと表現型の成立過程についての解釈がはじめて可能になるからである。従来、キメリズムの検出法の代表としてGPIの電気泳動多型を利用する生化学的解析法が用いられてきた。この方法では、サンプルとして用いた組織に両系統の細胞が混在していること、サンプル全体として両者がどのような割合で混在しているかは言えたが、構成するそれぞれの細胞の由来については知る事ができなかった。多くの場合、ランダムに混ざり合う事を前提として実験が行われてきた。ところが、実際のキメラ組織を系統特異的抗体で調べてみると、混ざり方は必ずしもランダムではなく、器官や組織特有のキメラパターンが存在することが示され (Kusakabe et al. 1988)、*in situ*でキメリズムを解析することの重要性が指摘された。従って、本研究で示したように、細胞増殖、細胞分化、そして、キメリズムを*in situ*で総合的に検討して特定の遺伝的形質を細胞生物学的立場から明らかに出来た事は画期的と言える。

### 3. 集合キメラを用いた応用的研究

本研究で確立したキメラマウス解析法により、様々な問題に組織・細胞レベルで取り組むことが可能となった。例えば、小腸における組織構築過程と組織新生機構の解析 (Kusakabe et al. submitted) では、小腸のクリプトおよび絨毛の組織構築過程における細胞増殖とキメリズムのパターンの推移を調べ、さらに、放射線による小腸障害後の組織新生における細胞増殖とキメリズムを調べることで、小腸クリプトにおける幹細胞の存在様式について、新たな仮説を示すことができた。

また、発癌機構の解析の例として、diethylnitrosamine (DEN) 誘発マウス肝癌におけるクローナリティーの解析があげられる (Lee et al. 1991)。C3HとC57BL/6マウスは、自然肝発癌と化学肝発癌の両方において、前者は高感受性で後者は低感受性である。この差を規定する因子が、細胞内に内在するものか、増殖因子等の細胞環境にあるのかを明らかにするために、C3H/HeN $\leftrightarrow$ C57BL/6キメラにおけるDEN誘発肝癌のクローナリティーの解析がおこなわれた。その結果、腫瘍巣はすべてクローナルな増生であること、その数とサイズはC3H/HeN由来のものが大であることが示され、さらに、それぞれの系統の腫瘍に特徴的な細胞形態がキメラでも認められた。この実験結果より、両系統の発癌感受性を規定する因子は、標的細胞自身にあることが明瞭に示された。

次に、生殖腺分化のメカニズムを調べるために、XXおよびXY細胞の分化能の解析が行われた (Kusakabe et al. unpublished)。集合キメラの中には性キメラ (XX $\leftrightarrow$ XY) となる組み合わせが生じ、この場合、多くの個体は雄の表現型を示す。なかには、ovo-testisと精巣、あるいは、ovo-testisと卵巣を持つような中間的表現型を示す個体が観察され、明らかに性キメラであると考えられる。これらの生殖腺のキメリズムを調べた結果、XY細胞は卵管、子宮、膈の上皮細胞、さらに、顆粒層細胞、黄体に分化可能であること、XX細胞はセルトリー細胞、Leydig細胞、

副生殖腺の上皮に分化可能であることが示された。

また、不妊の  $S1/S1^d$  と C3H/HeN とのキメラにおいては、C3H/HeN のセルトリ細胞と  $S1/S1^d$  の生殖細胞の組合わさった領域では精子形成が行われ、C3H/HeN の生殖細胞と  $S1/S1^d$  のセルトリ細胞の組合わさった領域では精子形成が阻害されており、 $S1/S1^d$  の不妊がセルトリ細胞の異常により引き起こされていることが示された (Kasugai et al. unpublished)。

さらに、発生期脳組織構築過程の解析 (Yoshiki et al. 1992) では、マウスの発生期大脳皮質における細胞増殖、細胞分化を調べ、さらに、キメリズムを重ね合わせるにより、神経細胞の移動様式について考察を加えることができた。

以上、集合キメラマウスを用いた応用的研究の可能性を示したが、系統特異的抗体によるキメリズム解析は、注入キメラや細胞・組織の移植によるキメラ、培養系でも利用可能なので、さらに幅広く多くの実験系に取り入れることが可能だと思われる。

#### 4. 外来遺伝子導入による細胞標識の試み

本研究では既存の近交系の持つ内在性物質を免疫組織学的に標識することによりキメリズムを解析する方法を示した。一方、近年著しく発展した遺伝子操作技術とES細胞株を用いて、外来遺伝子導入による細胞標識法が試みられている。

花岡らは、ヒトペプチド鎖伸展因子 (EP1 $\alpha$ ) のプロモーター領域を含む調節領域に大腸菌由来のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子を連結しマウス受精卵に導入した (Hanaoka et al. 1991)。その結果、様々な組織で強いCAT活性を示すトランスジェニックマウスが得られ、今後、キメラマウス解析への応用が期待されている。花岡らはさらに、ES細胞株にEP1 $\alpha$ プロモーターと大腸菌の $\beta$ ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ) との融合遺伝子を導入し、そのES細胞を胚盤胞に注入してキメラ個体を作成、各種組織に分化したES細胞を組織化学的に検出することに成功した。しかし、このキメラ個体より標識ES細胞株由来の子孫が得られず、トランスジェニックマウス作成には至っていない (花岡、私信)。また、角川らも lacZ を導入したES細胞株を確立し、胎生期キメラの細胞系譜解析の可能性を示した (Kadokawa, et al. 1990)。ところが、キメラ個体においてこのES細胞の占める割合が多い場合には胎生後期に発生異常を起こす例があること、また、生体に至った場合でも脳においてES細胞由来のグリア細胞が見られないこと等が明らかになってきた (角川、私信)。これらの結果はES細胞株やそれらに遺伝子を導入した細胞株の多分化能を維持することが極めて困難であることを物語っているのかもしれない。

この様に、多くの場合、標識遺伝子として大腸菌の $\beta$ ガラクトシダーゼをコードする遺伝子 (lacZ) が好んで用いられている。それは、免疫組織学的方法や in situ hybridization に比べて標識細胞の染色法が簡単だからである。しかし、元来哺乳類の細胞にない遺伝子を導入した場合に、その遺伝子産物が宿主細胞にあたえる影響は十分に検討されているとはいえない。例えば、ネオマイシン耐性

遺伝子は遺伝子導入細胞の選択マーカーとして広く用いられているが、最近、このマーカー遺伝子の発現が細胞の代謝に影響を与えることが指摘された (Valera, et al. 1992)。lacZについては宿主細胞の増殖、分化や代謝に影響を与えると言う直接的な証拠はないが、今後、検討されるべき問題だと思われる。

以上のように外来遺伝子導入による細胞標識法にも、ES細胞株の分化能維持の問題、導入遺伝子の発現の安定性とその遺伝子産物の宿主細胞への影響等、解決すべき大きな問題がある。今後、内在性マーカーと遺伝子導入によるマーカーとが補完的に使える様なキメラの組み合わせで、相互の問題点を明らかにし、より信頼性の高いキメラ実験系を確立する必要がある。



## 5. キメラマウスを用いた研究の今後の課題

先に述べたように、ここ数年、受精卵への遺伝子注入によるトランスジェニックマウスの作製や、胚性幹細胞を使って特定の遺伝子を標的とした相同組換えにより、標的遺伝子を破壊したマウスの作製が可能となってきた。そうした中で、従来より突然変異遺伝子の作用点、細胞間相互作用や細胞系譜の解析に有用とされてきたキメラマウスが、これら遺伝子操作を受けたマウスや胚性幹細胞の個体レベルでの解析の場として再び注目される様になった。しかし、キメラマウスがこうした期待に十分に答え得るものかどうかはまだ未知の部分が多い。それは、特定の発生時期に注目する組織でどの様なキメリズムが生じるのか、十分に解明されていないからである。Kusakabeら(1988)は成体のキメラを用いて組織ごとにキメリズムを調べ4つのパターンに分類可能であることを示した。しかし、成体における組織特有のキメリズムが発生の各段階でどの様に形成されるかについては未だ詳細な報告はない。この点については、現在、本研究で確立したキメリズム解析法により研究を継続中である。

また、何種類かのキメラを作成して系統特異的抗体により組織を調べたところ、系統の組み合わせや特定の遺伝子の影響によりキメリズムに差が生じる可能性があると思われた。例えば、本研究第V章のBNF1とC3H/HeNの組み合わせでは、得られたキメラのほとんどはBNF1優勢で、特に精巣でその傾向はより一層強かった。すなわち、C3H/HeN由来の生殖細胞が入った精細管は稀で、入った場合でも、その分布は極めて限られたものにすぎなかった。精巣の生殖細胞は生殖隆起へ移動する過程で急速に増殖するといわれている(Tam and Snow, 1981)。従って、精子への分化能を持たないBNF1雑種の生殖細胞でも、生殖隆起への進入の時点で、あるいは、生殖隆起へ到達するまでの増殖過程ではC3Hに対して圧倒的に優勢となるのかもしれない。BALB/cA-nu/nu $\leftrightarrow$ C3H/HeNキメラの小腸では、小腸腺上皮細胞のほとんどがBALB/cA-nu/nu由来の場合でも筋層や間充組織はC3H/HeNが優勢となる

傾向が見られた (Yoshiki et al. 未発表)。C3H/HeN $\leftrightarrow$ BALB/cAではそうした例が見られなかったので、nu遺伝子が発生の初期において細胞の分化方向や増殖過程に影響を及ぼしていることが予想された。また、GRS/A $\leftrightarrow$ C3H/HeNの組み合わせでは、肝臓のキメリズムにおいて、C3H/HeN由来の細胞がまばらに分散した状態で存在する傾向が見られた (Hiraiwa et al. 未発表)。このようなキメリズムは肝細胞の増殖過程で一方の系統の細胞が選択的に増殖し、他方の増殖が抑制された場合を想定しなければ成り立たない。このような現象が特定の系統の組み合わせで生じるとすれば、キメラマウスを用いた細胞系譜の解析結果は用いる系統により左右される可能性がある。この問題がどの程度重要かは現在育成中であるCSAのコンジェニック系統であるBALB/cA-CSA+系統 (Kusakabe 私信) とBALB/c系統とのキメラにおけるキメリズムを調べることにより近い将来明らかにされると思われる。

以上のように、既存の各種近交系、コンジェニック系統やミュータント系統を駆使して、組み合わせによるキメリズムの違いを比較検討することは、発生過程において形態形成や細胞間相互作用に重要な分子を拾い出す全く新しい実験系となる可能性がある。また、従来より、多くの研究者が気づきながらその分子的あるいは細胞生物学的説明が十分なされなかった、系統の特性、遺伝的背景による遺伝子の表現型の違い、近交退化や雑種強勢と言った現象などに新しい解釈を加える事ができるかもしれない。今後のキメラマウスは、分子生物学の発達を背景に数多く単離されてくる遺伝子の生体における機能を解析する実験系として、また、長年にわたり多くの研究者の地道な努力により開発・育成されてきた数々の近交系および突然変異系統の新たな特性発見の場として活躍が期待される。

Faint, illegible text on the left page, likely bleed-through from the reverse side.

### 第Ⅶ章 総合要約

Faint, illegible text on the right page, likely bleed-through from the reverse side.

本研究では、マウス胚操作技術の遺伝育種学ならびに発生学研究への応用を目指して、応用範囲の広い胚凍結保存とキメラマウスをとりあげ、(1)凍結胚による系統および突然変異遺伝子保存の可能性を検討し、(2)C3H系統特異的抗体を用いて、マウス発生初期から生後にいたる様々な組織に応用可能な免疫組織学的キメラ解析法を確立すると共に、(3)その方法の発生遺伝学的研究への応用を検討し、(4)キメラマウスを用いた応用的研究の今後の方向を議論した。

#### (1) 凍結マウス初期胚による系統および突然変異遺伝子保存

マニュアル操作による簡便凍結法とプログラムフリーザーによる各種系統の胚凍結法を検討した。

簡便凍結法では、7系統のマウス(DN1, DDN, BS, C57BL/6, DBA/2, CRN, PAN)と1組の系統間交配(DN1 X C57BL/6-A<sup>y</sup>/+)について胚の採取方法および凍結保存後の胚の生存性を調べた。DN1胚を用いて検討したところModified 2-step法が胚の生存率も比較的高く(77.8%)短時間で行える簡便な方法であることが示され、他系統の胚にもこの方法を応用した。凍結融解後の胚の生存性には系統差が見られ、PANでは最も低く(17.4%)、DDNでは最も高かった(71.9%)。培養後、桑実胚・胚盤胞に発生した凍結融解胚を仮親に移植した結果、DN1、DDN、BS胚より産仔が得られ、またF1胚(DN1 X C57BL/6-A<sup>y</sup>/+)より5匹の黄色マウスが得られた。以上の結果、簡便なModified 2-step法により数系統のマウスの凍結保存および遺伝子保存が可能である事が示された。

プログラムフリーザーを用いた凍結法では植氷後、-35℃または-70℃まで毎分0.3℃の速度で冷却する緩慢凍結法を9系統(MCH, C57BL/6N, BALB/cA, C3H/HeN, DBA/2N, BALB/cCr, 129/Sv, CL/Fr, DDN)と5組の系統間交配(B6C3F1 X B6C3F1, DPF1 X DPF1, B6C3F1 X C3Hf/HeNem-E1o/+, B6C3F1 X C57BL/6-W<sup>y</sup>/+, BDF1 X MOL-A)より得た胚に応用した。その結果、凍結融解後の胚回収率は88%から100%

と高く、正常胚の割合については系統差が見られたが、58.3% (CL/Fr) から87.5% (B6C3F1 X C57BL/6-W<sup>v</sup>/+) と安定した生存率が得られた。培養後の胚発生率についても、DBA/2Nで著しく低く(43.0%)、129/Svでやや低い(57.1%)傾向が見られた以外は、いずれも70%以上の高い発生率が得られた。さらに、桑実胚・胚盤胞へ発生した胚を仮親へ移植したところ、7系統と5種類の交雑胚において産仔が得られた。これら産仔は離乳後正常な繁殖性を示したことから、プログラムフリーザーを用いた凍結法により系統および突然変異遺伝子の安定した凍結保存が可能である事が示された。

#### (2) キメラマウスの免疫組織学的解析法の検討

C3H系統特異的抗体を用いて、マウス発生の初期から生後にいたる様々な組織に応用可能な免疫組織学的キメラ解析法を検討した。マイクロウェーブ照射による前固定、95%エタノール・1%酢酸による後固定とポリエステルワックス包埋を組み合わせ、ビオチン化マウスモノクローナルC3H系統特異的抗体、ペルオキシダーゼ標識アヴィジンを反応させ、3,3'-diaminobenzidine 4-HCl (DAB)を用いて発色を行い、さらに銀増染色を施すことにより、胎生期および生後の集合キメラC3H/HeN⇔BALB/cAのキメリズムが明瞭に染色された。胎生7-8日の初期発生過程においては、胚体外胚葉、胚体中胚葉、胚外外胚葉、胎盤円錐体、尿膜、羊膜、血島において両系統の細胞がよく混じり合っている状態が観察され、胎生14日の中脳、神経網膜、脊髄、肺、腎臓、肝臓などでも明瞭なキメリズムが観察された。しかし、成体組織において見られるような組織特異的なキメリズムは見られず、器官形成過程において著しい細胞増殖、細胞移動や細胞死が起きている事が予想された。

(3) このキメラ解析法の発生遺伝学的研究への応用として、(3)-1 小眼症

マウス (Elo) の解析と (3) - 2 野生マウス系統との雑種における雄性不妊要因の解析を試みた。

(3) - 1 キメラマウスを用いた小眼症遺伝子 (Elo) の発生遺伝学的解析

Eloマウスの水晶体の形態学的特徴として次の4点があげられた。すなわち、(1) 水晶体線維細胞の伸長不全、(2) 水晶体線維細胞の核の形態異常、(3) 水晶体中心部の線維細胞に見られる好エオジン染色性顆粒の欠如、(4) 水晶体後極における水晶体被膜の破綻である。bromodeoxyuridine (BrdU) を用いた免疫組織学的方法により水晶体上皮細胞の細胞増殖を Elo/+ と正常 +/+ とで比較したところ、胎生 11 - 14 日までは両者に差は見られなかった。胎生 15 日以降では、Elo の水晶体上皮細胞数は正常より明らかに少なかったが、S 期細胞の数では両者に差はなかった。

つぎに、Elo の水晶体細胞の形態異常が水晶体線維細胞自身で起こるのか、細胞環境の影響を受けるのかを集合キメラ C3H-Elo/+ ↔ BALB/c を作成して確かめた。BALB/c 細胞優勢のキメラマウスでは、水晶体皮膜の破綻はほとんど見られず、水晶体中心部の白濁と水晶体サイズの僅かな減少がみられた。C3H-Elo/+ 細胞優勢のキメラの水晶体は形態的に C3H-Elo/+ の水晶体と同様の異常を示した。C3H 系統特異的抗体を用いて胎生期キメラマウスの水晶体を免疫組織学的に解析したところ、異常核を有する水晶体線維細胞は C3H-Elo/+ 由来の細胞のみで BALB/c 由来の細胞はなかった。以上の結果から、Elo 遺伝子は水晶体上皮細胞の増殖には直接的に影響をせず、水晶体線維細胞内で細胞分化に特異的に作用して、細胞伸長を抑制していると考えられた。

(3) - 2 キメラマウスを用いた、ラボラトリーマウス系統と野生マウス系統間交配における雄性不妊要因の解析

BALB/c 系統と野生マウス系統 (NJL) との F1 雑種 (BNF1) 雄にみられる不妊につ

いて解析を行った。精巣生殖細胞の増殖と分化をBrdU標識法及び生殖細胞分化段階特異的抗体ACK-2、BC7、TRA369により免疫組織学的に調べた。まず、BALB/cの精巣では生後30日頃から精子形成が観察され、BrdU静注後2時間で、精細管基底層にならぶS期の精祖細胞およびpreleptotene期精母細胞が標識された。一方、BNF1の精巣では、精細管基底層に標識細胞のみられる精細管はわずかで、多くの場合、精細管内腔側に位置する細胞が標識された。その後、標識細胞を経時的に観察したところ、BALB/cの精巣では6日に初期pachytene期に至るが、BNF1では4日になると標識細胞の数が減少しはじめ、6日には著しい減少が認められた。BNF1では、精祖細胞が存在し周期的に増殖を繰り返しているが、preleptotene期精母細胞の段階ですでに基底層から離れて内腔側へ移動しており、zygotene期に完全に精細管上皮から消失していると考えられた。ACK-2、BC7、TRA369による免疫組織染色によっても、これを支持する所見が得られた。

つぎに、生殖細胞とセルトリー細胞との相互作用の影響を見るためにBNF1とC3H/HeNの集合キメラを作成し、その精巣における細胞分化と系統由来を調べた。その結果、BNF1の生殖細胞の分化はC3Hのセルトリー細胞の参加によっても精子形成までには至らないが、pachytene期精母細胞までは改善されることが示された。また、BNF1のセルトリー細胞によりC3Hの生殖細胞は精子にまで分化可能であったので、BNF1のセルトリー細胞は正常に機能し得ると考えられた。これらの結果から、生殖細胞の分化にはセルトリー細胞との相互作用が重要であること、BNF1の生殖細胞の分化異常は生殖細胞自身の要因によりおこることが示された。さらに、交配実験の結果、I遺伝子座に関連した遺伝的要因がBNF1において精巣重量の減少を引き起こしている可能性が示唆され、*Hst-1*の関与が考えられた。

#### (4) キメラマウスを用いた応用的研究の今後の課題

キメラマウスを用いた応用的研究の今後の課題については以下の点があげられ

る。

1. 凍結保存胚やES細胞株を有効に利用すること。
2. C3H系統特異的抗体を用いたキメラ解析法の異なる組織への応用可能性の検討。
3. C3H系統特異的抗体と遺伝子導入によるマーカーとが補完的に使える様なより信頼性の高いキメラ実験系の確立。
4. 異なる系統の組合わせによるキメラマウスのキメリズムの比較。

今後、これらの点について検討を重ねることにより、既存の各種近交系、コンジュニック系統やミュータント系統を駆使して、発生過程において形態形成や細胞間相互作用に重要な役割を果たす分子を拾い出す全く新しい実験系を組み立てることが可能になるとと思われる。今後のキメラマウスは、分子生物学の発達を背景に数多く単離されてくる遺伝子の生体における機能を解析する実験系として、また、長年にわたり多くの研究者の地道な努力により開発・育成されてきた数々の近交系および突然変異系統の新たな特性発見の場として活躍が期待される。



## 謝 辞

本研究を行うにあたり一貫して指導と激励をくださった名古屋大学農学部、若杉昇教授および富田武教授に深謝します。系統特異的抗体の提供とキメラマウスの実験系に対する考え方の指導をしていただいた理化学研究所真核生物研究室、日下部守昭博士ならびに坂倉照好博士に心より感謝します。卵子凍結保存研究において指導、協力をいただいた八木記念パーク実験動物研究所の大野京子研究員にこころより感謝いたします。小眼症マウスに関する研究において協力いただいた名古屋大学農学部、家畜管理学教室、織田銃一助教授および理化学研究所真核生物研究室、花園誠博士に感謝します。また、信州大学農学部、太田克明教授にはデータ解析における統計処理に関する指導をいただき感謝します。野生マウス系統との雑種における雄性不妊の研究において研究協力および指導をしてくださった国立遺伝学研究所、森脇和郎教授、宮下信泉博士にお礼申し上げます。さらに、有益な助言をいただいた名古屋大学農学部、並河鷹夫助教授、名古屋大学医学部、鬼頭純三助教授、京都大学霊長類研究所、川本芳博士、京都府立医科大学、伏木信次助教授に感謝します。

## 引用文献

- Anderson, W.F., Killos, L., Sanders-Haigh, L., Kretchmer, P.J. and Diakumakos, E.G. (1980) Replication and expression of thymidine kinase and human globin genes microinjected into mouse fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 5399-5403.
- Boon, M.E. and Kok, L.P. (1988) *Microwave cookbook of pathology: The art of microscopic visualization.* Leyden: Coulom Press.
- Brinster, R.L., Chen, H.Y., Warren, R., Sarthy, A. and Palmiter, R.D. (1982) Regulation of metallothionein-thymidine kinase fusion plasmids injected into mouse eggs. *Nature* 296, 39-42.
- Burgoyne, P.S., Mahadevaiah, S.K., Sutcliffe, M.J. and Palmer, S.J. (1992) Fertility in mice requires X-Y pairing and a Y-chromosomal 'Spermatogenesis gene' mapping to the long arm. *Cell* 71, 391-398.
- Burns, J., Chan, V., Jonasson, J.A., Fleming, K.A., Taylor, S. and McGee, J.O'D. (1985) Sensitive system for visualising biotinylated DNA probes hybridised in situ: rapid sex determination of intact cells. *J. Clin. Pathol.* 38, 1085-1092.
- Capecchi, M.R. (1980) High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell* 22, 479-488.
- Coulombre, J. L. and Coulombre, A. J. (1963) Lens development: fiber elongation and lens orientation. *Science, N.Y.* 142, 1489-1499.
- Cruz, Y.P. and Pedersen, R.A. (1985) Cell fate in the polar trophectoderm of mouse blastocysts as studied by microinjection of cell lineage tracers. *Dev. Biol.* 112, 73-83.
- de Kretser, D.M. (1990) Germ cell-Sertoli cell interactions. *Reprod. Fertil. Dev.* 2, 225-235.
- Dobzhansky, T. (1951) *Genetics and the Origin of Species.* (3rd ed.) New York: Columbia University.
- Evans, M.J. and Kaufman, M.H. (1981) Establishment or culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.
- Festing, M.W.F. (1979) *Inbred strains in biomedical research.* London: Macmillan Press.
- Festing, M.F.W. (1981) Embryo banks in the production of genetically defined laboratory animals: A step towards the concept of Type Culture Collections of Defined Laboratory Animals. *In Frozen Storage of Laboratory Animals* (ed. Zeilmarker, G.H.), pp.149-155. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- Forejt, J. and Ivanyi, P. (1975) Genetic studies on male sterility of

- hybrids between laboratory and wild mice (*Mus musculus* L.).  
*Genet. Res. Camb.*, 24, 189-206.
- Forejt, J. (1976) Spermatogenic failure of translocation heterozygotes affected by H-2-linked gene in mouse. *Nature* 260, 143-145.
- Forejt, J. (1985) Chromosomal and genic sterility of hybrid type in mice and men. *Exp. Clin. Immunogenet.* 2, 106-119.
- Gardner, R.L. (1968) Mouse chimeras obtained by the injection of cells into the blastocyst. *Nature* 220, 596-597.
- Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A. and Ruddle, F.H. (1980) Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 7380-7384.
- Green, M.C. (1989) Catalog of mutant genes and polymorphic loci. In *Genetic variants and strains of the Laboratory mouse* (ed. M.F. Lyon and A.G. Searle), pp.12-403.
- Haldane, J.B.S. (1922) Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. *J. Genet.* 12, 101-109.
- Hammond, J. (1949) Recovery and culture of tubal mouse ova. *Nature* 163, 28-29.
- Hanaoka, K., Hayasaka, M., Uetsuki, T., Fujisawa, Sehara, A. and Nabeshima, Y. (1991) A stable cellular marker for the analysis of mouse chimeras: The bacterial chloramphenicol acetyltransferase gene driven by the human elongation factor 1 $\alpha$  promoter. *Differentiation* 48, 183-189.
- Hanazono, M., Yoshiki, A., Ota, K., Kitoh, J. and Kusakabe, M. (1990) Immunohistochemical detection of DNA replication in mouse uterine cells by bromodeoxyuridine labeling of wax- and resin-embedded tissue sections. *Stain Technol.* 65, 139-149.
- Hanna, C. and O'Brien, J. E. (1961) Cell proliferation and migration in the epithelial layer of the lens. *Archs Ophthal.* 66, 103-107.
- Hendrix, R.W. and Zwaan, J. (1974) Changes of the glycoprotein concentration of the extracellular matrix between lens and optic vesicle associated with early lens differentiation. *Differentiation* 2, 357-362.
- Hogan, B., Constantini, F. and Lacy, E. *Manipulating the mouse embryo.* U.S.A.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1986
- Hoppe, P.C. and Pitts, S. (1973) Fertilization in vitro and development of mouse ova. *Biol. Reprod.* 8, 420-426.
- Imai, H.T., Matsuda, Y., Shiroishi, T. and Moriwaki, K. (1981) High frequency of X-Y chromosome dissociation in primary spermatocytes

- of F1 hybrids between Japanese wild mice (*Mus musculus molossinus*) and inbred laboratory mice. *Cytogenet. Cell Genet.* 29, 166-175.
- John, M., Carswell, E., Boyse, E.A. and Alexander, G. (1972) Production of  $\theta$  antibody by mice that fail to reject  $\theta$ -incompatible skin grafts. *Nat. New Biol.* 238, 57-59.
- Kadokawa, Y., Suemori, H. and Nakatsuji, N. (1990) Cell lineage analyses of epithelia and blood vessels in chimeric mouse embryos by use of an embryonic stem cell line expressing the  $\beta$ -galactosidase gene. *Cell Differ. and Develop.* 29, 187-194.
- Kefalids, N. A., Alpher, R. and Clark, C. C. (1979) Biochemistry of basement membranes. *Int. Rev. Cytol.* 61, 167-228.
- Konyukov, B. V. (1987) Gene expression and cell interactions in the mammalian development. *Sov. Sci. Rev. G. Physiol. Gen. Biol.* 1, 561-601.
- Kusakabe, M., Sakakura, T., Nishizuka, Y., Sano, M. and Matsukage, A. (1984) Polyester wax embedding and sectioning technique for immunohistochemistry. *Stain Technol.* 59, 127-132.
- Kusakabe, M., Yokoyama, M., Sakakura, T., Nomura, T., Hosick, H.L. and Nishizuka, Y. (1988) A novel methodology for analysis of cell distribution in chimeric mouse organs using a strain specific antibody. *J. Cell Biol.* 107, 257-265.
- Kusakabe, M., Baba, T., Michikawa, Y., Arai, Y. and Sakakura, T. (1992) A novel 68-KDa protein as a mouse genetic marker. 5th International Congress on Cell Biology, Abstract, p297, 1992.
- Lee, K.-F., Li-E, Huber, L. J., Landis, S. C., Sharpe, A. H., Chao, M. V. and Jaenisch, R. (1992) Targeted mutation of the gene encoding the low affinity RRGF receptor p75 leads to deficits in the peripheral sensory nervous system. *Cell* 69, 737-749.
- Lee, G.-H., Nomura, K., Kanda, H., Kusakabe, M., Yoshiki, A., Sakakura, T. and Kitagawa, T. (1991) Strain specific sensitivity to diethylnitrosamine-induced carcinogenesis is maintained in hepatocytes of C3H/HeN-C57BL/6N chimeric mice. *Cancer Res.* 51, 3257-3260.
- Leibo, S.P. and Mazur, P. (1978) Methods for the preservation of mammalian embryos by freezing. *In* *Methods in Mammalian Reproduction* (ed. Daniel, J.), pp.179-201. New York: Academic Press Inc.
- Li, E., Bestor, T. H. and Jaenisch, R. (1992) Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69, 915-926.

- Luckett, D.C. and Mukherjee, A.B. (1986) Embryonic characteristics in superovulated mouse strains. *J. Hered.* 77, 39-42.
- Martin, G.R. (1981) Isolation of pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 7634-7636.
- Matsuda, Y., T. Hirobe and V. M. Chapman, 1991. Genetic basis of X-Y chromosome dissociation and male sterility in interspecific hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 4850-4854.
- Matsui, Y., Zsebo, K. and Hogan, B.L.M. (1992) Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 70, 841-847.
- Maurer-Orlando, M., Paterson, R.C., Lok, S., Tsui, L.-C. and Breitman, M. L. (1987) Differential regulation of  $\gamma$ -crystallin genes during lens development. *Devel. Biol.* 119, 260-267.
- McAvoy, J.W. (1978a) Cell division, cell elongation and distribution of  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -crystallins in the rat lens. *J. Embryol. exp. Morph.* 44, 149-165.
- McAvoy, J.W. (1978b) Cell division, cell elongation and the coordination of crystallin gene expression during lens morphogenesis in the rat. *J. Embryol. exp. Morph.* 45, 271-281.
- McAvoy, J.W. and Chamberlain, C.G. (1989) Fibroblast growth factor (FGF) induces different responses in lens epithelial cells depending on its concentration. *Development* 107, 221-228.
- McLaren, A. (1976) Mammalian chimaeras. London: Cambridge University Press.
- McLaren, A. and Michie, D. (1956) Studies on the transfer of fertilized mouse eggs to uterine foster-mothers. I. Factors affecting implantation and survival of native and transferred eggs. *J. Exp. Biol.* 33, 394-416.
- Mintz, B. (1964) Formation of genetically mosaic mouse embryos, and early development of lethal ( $t^{12}/t^{12}$ )-normal mosaics. *J. Exp. Zool.* 157, 273-292.
- Mintz, B. (1971) Allophenic mice of multiembryo origin. *In* *Methods in Mammalian embryology* (ed. J. C. Daniel Jr), pp. 184-214. San Francisco: W. H. Freeman.
- Mintz, B., Gearhart, J.D. and Guymont, A.O. (1973) Phytohemagglutinin mediated blastomere aggregation and development of allophenic mice. *Devel. Biol.* 31, 155-199.
- Mintz, B. and Illmensee, K. (1975) Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. 72, 3585-3589.
- Mizuhira, V., Notoya, M., Hasegawa, H. (1990) New tissue fixation method for cytochemistry using microwave irradiation I. General remarks. *Acta Histochem. Cytochem.* 23, 501-523.
- Moens, C.B., Auerbach, A.B., Conlon, R.A., Joyner, A.L. and Rossant, J. (1992) A targeted mutation reveals a role for N-myc in branching morphogenesis in the embryonic mouse lung. *Genes Dev.* 6, 691-704.
- Morris, R.J. and Barber, P.C. (1983) Fixation of Thy-1 in nervous tissue for immunochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 31, 263-274.
- Muggleton-Harris, A.L., Hardy, K. and Higbee, N. (1987) Rescue of developmental lens abnormalities in chimaeras of noncataractous and congenital cataractous mice. *Development* 99, 473-480.
- Muggleton-Harris, A.L. and Higbee, N. (1987) Factors modulating mouse lens epithelial cell morphology with differentiation and development of a lentoid structure in vitro. *Development* 99, 25-32.
- Muggleton-Harris, A.L., Lipman, R.D. and Kearns, N. (1981) In vitro characteristics of normal and cataractous mouse lens epithelial cells. *Expl. Eye Res.* 32, 563-573.
- Mullen, R.J. (1977) Site of Ped gene action and Purkinje cell mosaicism in cerebella of chimeric mice. *Nature* 270, 245-247.
- Muthkarrappan, V. (1965) Inductive tissue interaction in the development of the mouse lens in vitro. *J. exp. Zool.* 159, 269-288.
- Nishikawa, S., Kusakabe, M., Yoshinaga, K., Ogawa, M., Hayashi, S., Kunisada, T., Era, T., Sakakura, T. and Nishikawa, S. (1991) In utero manipulation of coat color formation by monoclonal anti-c-Kit antibody: two distinct waves of c-kit-dependency during melanocyte development. *EMBO J.* 10, 2111-2118.
- Notoya, M., Hasegawa, H. and Mizuhira, V. (1990) New tissue fixation method for cytochemistry using microwave irradiation I. Details. *Acta Histochem. Cytochem.* 23, 525-536.
- Oda, S., Watanabe, T. and Kondo, K. (1980a) A new mutation, eye lens obsolescence, Elo, of the mouse. *Expl. Eye Res.* 31, 673-681.
- Oda, S., Watanabe, K., Fujisawa, H. and Kameyama, Y. (1980b) Impaired development of lens fibers in genetic microphthalmia, eye lens obsolescence, Elo, of the mouse. *Expl. Eye Res.* 31, 673-681.
- Onoda, M., Djakiew, D. and Papadopoulos, V. (1991) Pachytene spermatocytes regulate the secretion of Sertoli cell protein(s) which stimulate Leydig cell steroidogenesis. *Mol. Cell Endocrinol.* 77, 207-216.

- Oster-Granite, M.L. and Gearhart, J. (1981) Cell lineage analysis of cerebellar purkinije cell in mouse chimeras. *Dev. Biol.* 85, 199-208.
- Palmer, S.J. and Burgoyne, P.S. (1991) In situ analysis of fetal, prepuberal and adult XX-XY chimaeric mouse testes: Sertoli cells are predominantly, but not exclusively, XY. *Development* 112, 265-268.
- Patek, C.E., Kerr, J.B., Gosden, R.G., Jones, K.W., Hardy, K., Muggleton-Harris, A.L., Handyside, A.H., Whittingham, D.G. and Hooper, M.L. (1991) Sex chimaerism, fertility and sex determination in the mouse. *Development* 113, 311-325.
- Pincus, G. (1936) *The eggs of mammals.* Macmilan, New York.
- Ponder, B.A.T. and Wilkinson, M.M. (1983) Organ-related differences in binding of Dolichos biflorus agglutinin to vascular endothelium. *Dev. Biol.* 96, 535-541.
- Ponder, B.A.T., Wilkinson, M.M. and Wood, M. (1983) H2 antigens as a marker of cellular genotype in chimeric mice. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 76, 83-93.
- Quinlan, P., Oda, S., Breitman, M.L. and Tsui, L.-C. (1987) The mouse eye lens obsolescence (Elo) mutant: Studies on crystallin gene expression and linkage analysis between the mutant and the  $\gamma$ -crystallin genes. *Genes Devel.* 1, 637-644.
- Quinn, P., Barros, C. and Whittingham, D.G. (1982) Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 66, 161-168.
- Rossant, J. (1991) Gene disruption in mammals. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1, 236-240.
- Rossant, J., Vihh, K.M., Grossi, C.E. and Cooper, M.D. (1986) Clonal origin of hematopoietic colonies in the postnatal mouse liver. *Nature* 319, 507-510.
- Sax, C.M., Farrell, F.X., Zehner, Z.E. and Piatigorsky, J. (1990) Regulation of vimentin gene expression in the ocular lens. *Devel Biol.* 139, 56-64.
- Siracusa, L.D., Chapman, V.M., Bennett, K.L., Hastie, N.D., Pietras, D.F. and Rossant, J. (1983) Use of repetitive DNA sequences to distinguish *Mus musculus* and *Mus caroli* cells by in situ hybridization. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 73, 163-178.
- Skow, L.C. (1982) Location of a gene controlling electrophoretic variation in mouse  $\gamma$ -crystallins. *Expl. Eye Res.* 34, 509-516.
- Spindle, A. (1982) Cell allocation in preimplantation mouse chimeras. *J. Exp. Zool.* 219, 361-367.

- Takahashi, T., Nowakowski, R.S. and Caviness, V.S.JR. (1992) BUdR as an S-phase marker for quantitative studies of cytokinetic behaviour in the murine cerebral ventricular zone. *J. Neurol.* 21, 185-197.
- Takeda, H., Yoshiki, A., Nishikawa, S.-I., Nishikawa, S., Kunisada, T., Sakakura, T., Amanuma, H. and Kusakabe, M. (1992) Expression of c-kit, a proto-oncogene of the murine W locus, in cerebella of normal and neurological mutant mice: Immunohistochemical and in situ hybridization analysis. *Differentiation* 51, 121-127.
- Tarkowski, A.K. (1961) Mouse chimaeras developed from fused eggs. *Nature* 190, 857.
- Valera, A., Perales, J.C., Hatzoglou, M. and Bosch, F. (1992) Neo selectable marker induces metabolic and gene expression changes in cultured cells. 5th International Congress on Cell Biology, Abstract, p430.
- Vergouwen, R.P., Jacobs, S.G., Huiskamp, R., Davids, J.A. and de Rooij, D.G. (1991) Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *J. Reprod. Fertil.* 93, 233-243.
- Wagner, T.E., Hoppe, P.C., Jollick, J.D., Scholl, D.R., Hodinka, R.L. and Gault, J.B. (1981) Microinjection of a rabbit beta-globin gene into zygotes and its subsequent expression in adult mice and their offspring. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 6376-6380.
- Watanabe, D., Sawada, K., Koshimizu, U., Kagawa, T. and Nishimune, Y. (1992) Characterization of male meiotic germ cell-specific antigen (Meg 1) by monoclonal antibody TRA369 in mice. *Mol. Reprod. Dev.* 33, 307-312.
- Watanabe, K., Fujisawa, H., Oda, S. and Kameyama, Y. (1980) Organ culture and immunohistochemistry of the genetically malformed lens, in eye lens obsolescence, Elo, of the mouse. *Expl. Eye Res.* 31, 683-689.
- Whitten, W.K. (1956) Culture of tubal mouse ova. *Nature* 177, 96.
- Whittingham, D.G. (1968) Fertilization of mouse eggs in vitro. *Nature* 220, 592-593.
- Whittingham, D.G. (1975) Survival of rat embryos after freezing and thawing. *J. Reprod. Fertil.* 43, 575-578.
- Whittingham, D.G. and Adams, C.E. (1976) Low temperature preservation of rabbit embryos. *J. Reprod. Fert.* 47, 269-274.
- Whittingham, D.G., Leibo, S.P. and Mazur, P. (1972) Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C. *Science* 178, 411-414.
- Willadsen, S.M., Polge, C., Rowson, L.E.A. and Moor, R.M. (1976) Deep



- freezing sheep embryos. *J. Reprod. Fert.* 46, 151-154.
- Wilmut, I. and Rowson, L.E.A. (1973) Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vet. Rec.* 92, 686-690.
- Wood, M.J. and Farrant, J. (1980) Preservation of mouse embryos by two-step freezing. *Cryobiol.* 17, 178-180.
- Yokoyama, M., Wakasugi, N. and Nomura, T. (1981) An attempt to store inbred mouse strains. *In* *Frozen Storage of Laboratory Animals* (ed. Zeilmaker, G.H.), pp.113-117. Stuttgart, New York: Gustav Fischer Verlag.
- Yoshiki, A., Kusakabe, M. and Fushiki, S. (1992) Mechanisms of histogenesis in the mouse cereberum: Analysis of chimeras with immunohistochemical intrinsic marker system. 5th International Congress on Cell Biology, Abstract, p335.
- Yoshinaga, K., Nishikawa, S., Ogawa, M., Hayashi, S., Kunisada, T., Fujimoto, T. and Nishikawa, S.-I. (1991) Role of c-kit in mouse spermatogenesis: identification of spermatogonia as a specific site of c-kit expression and function. *Development* 113, 689-699.

報文目録

- 1) Yoshiki, A., Ohno, K. and Wakasugi, N. :  
Cryopreservation of strains and mutant genes in mice.  
Experimental Animal, 36, 379-386, 1987.
- 2) Yoshiki, A., Hanazono, M., Oda, S., Wakasugi, N., Sakakura, T. and  
Kusakabe, M. : Developmental analysis of the eye lens obsolescence  
(Elo) gene in the mouse: cell proliferation and Elo gene expression  
in the aggregation chimera.  
Development, 113, 1293-1304, 1991.
- 3) Yoshiki, A., Moriwaki, K., Sakakura, T. and Kusakabe, M. :  
Histological studies on male sterility in hybrids  
between laboratory and wild mouse strains.  
Develop. Growth and Differ., 1993 (in press).
- 4) Yoshiki, A., Sakakura, T. and Kusakabe, M. :  
The mouse chimera during intra-uterine stages: Immunohistological  
analysis by using C3H strain-specific antibody.  
J. Histochem. Cytochem. (submitted).

参考論文目録

- 1) Hanazono, M., Yoshiki, A., Ota, K., Kitoh, J. and Kusakabe, M.  
Immunohistochemical detection of DNA replication in mouse uterine cells by bromodeoxyuridine labeling of wax- and resin-embedded tissue sections.  
Stain Technol. 65, 139-149, 1990.
- 2) Hanazono, M., Yoshiki, A., Ota, K., Kitoh, J. and Kusakabe, M.  
DNA replication in uterine cells of adult and prepubertal mice under normal and hormonally stimulated conditions detected by bromodeoxyuridine labeling method.  
Endocrinol. Japan 37(2), 183-191, 1990.
- 3) Lee G-H, Nomura, K., Kanda, H., Kusakabe, M., Yoshiki, A., Sakakura, T. and Kitagawa, T.  
Strain specific sensitivity to diethylnitrosamine-induced carcinogenesis is maintained in hepatocytes of C3H/HeN-C57BL/6N chimeric mice.  
Cancer Res. 51, 3257-3260, 1991.
- 4) Takeda, H., Yoshiki, A., Nishikawa, S.-I., Nishikawa, S., Kunisada, T., Sakakura, T., Amanuma, H. and Kusakabe, M.  
Expression of c-kit, a proto-oncogene of the murine W locus, in cerebella of normal and neurological mutant mice: Immunohistochemical and in situ hybridization analysis.  
Differentiation 51, 121-127, 1992.

