

附属発生工学実験施設

Laboratory of Embryonic and Genetic Engineering

本実験施設は、1992年4月10日に開設された。初年度は施設の改装を行い、ES細胞培養室、遺伝子操作実験室、胚操作室等の研究室の充実に努力した結果、順調に施設が整備された。

スタッフには、権藤洋一が講師として、東海大学医学部から着任し、中村健司が助手として、1993年4月1日から、また、中尾和貴が技官として1993年3月1日に着任した。それぞれES細胞培養室、胚操作室、マウスルームの開設に努力した。笹岡俊邦助手は、米国に留学中。

マウス個体の遺伝子操作と操作して得られたマウス個体を飼育し、遺伝子の働きを観察するために、感染の防御に充分配慮されたマウスルームが部屋の改装によって出来上がった。研究のために使いやすいマウスルームは、所謂コンベンショナルが望ましいが、ウイルスや細菌、さらに外部寄生虫等が感染する危険性がある。そこで、この新装マウスルームを維持するために、洗浄室が新たに開設され、マウスルームに持ち込まれるすべての器具や装置が滅菌されることになった。

中村、中尾、勝木は、他の施設での経験ではあるが、約10年にわたり無事故の記録を誇っており、その経験がものをいうことになった。

以前から使用されていたマウスルームはきわめて劣悪なもので、悪臭とほこりとごみにまみれていた。しかし、それらをきれいにして微生物学的に清浄なレベルにする必要がある。そのため、研究を中断することなく、マウスのクリーニングを行うという難題が課された。マウスルームを改装し、消毒しながら、マウスの体外受精、マウス受精卵の凍結保存などの先端技術を十分に活かして、この作業を終了することができた。この作業の成功は、きわめて充実した技術によってのみ可能であることを立証できたことを誇りに思う。

A. ジーンターゲット法確立および指導と協力（中村健司、中尾和貴、勝木元也）

ES細胞培養室を2部屋整備した。スペースが少ないためコンパクトな設計に苦勞した。また感染防御の点で白衣等の必須洋品の滅菌に配慮し、利用者の協力を得ることができた。

ターゲットした遺伝子には、細胞学部門と共同で、P53, c-Ha-ras, セロトニン受容体などがある。また京都大学との共同研究でグルタミン酸受容体5種をノックアウトした。その他生化学部門の2つの遺伝子について指導と協力を行った。

B. 発生工学技術を利用したマウスおよびマウスルームのクリーニング（中尾和貴，勝木元也）

微生物学的統御に配慮がなされていなかった従来のマウスルームを，研究を中断することなく，クリーニングするには，計画的かつ熟達した発生工学の技術が必要である．その上，今までの研究を中断することなく，以前から飼育していたマウスの微生物学的クリーニングを行うには，マウスすべてを処分して新しく実験を始めるという従来の方法がとれない．しかし，清浄領域に汚染マウスを入れることができないため，発生工学技術である体外受精法等を用いて胚を凍結し，一旦清浄になったことを確認したのち，汚染マウスを全部処分する必要がある．これらの胚は，凍結までの間にクリーンにし，卵管移植法により，クリーンな領域で生産する．この技術によって，マウスのクリーニングに成功した．ところが，この方法には別の良い点もあった．すなわち，マウスの生産を計画的に行い，従来の交配による生産よりも，同一年齢で，数の揃ったマウスを得ることができ，実験の速度を速めることにも貢献することができた．

このようにしてクリーニングされたマウスは，新設のマウスルームで飼育し，最後に従来のマウスルームを改装し消毒して，この作業を終了した．

a. マウス胚の凍結保存（中尾和貴，外丸裕介，石崎宏好，勝木元也）

実験のために作成された貴重ではあるが，汚染の可能性があるマウス（ノックアウトマウス，トランスジェニックマウス）の雄を使用して，体外受精を行い，得られた受精卵の一部をクリーンな偽妊娠マウスに移植しクリーンなマウスルームで飼育した．このマウスから生まれたものは，クリーンな新装マウスルームで飼育できる実験用マウスである．残りの胚は凍結保存胚として液体チソタンク内に保管した

表 A. 1. 移植胚と凍結保存胚

	系統	移植胚	産仔数	凍結保存胚
感染防御学部門	13	1,281個	630匹	4,836個
遺伝子学部門	6	801個	359匹	2,113個

b. 雌幼若マウスを利用した体外受精（中尾和貴，外丸裕介，石崎宏好，勝木元也）

雌幼若マウスを利用すると，性成熟年齢を待たず約3～4週令でホルモン処理により一匹あたり40～50個の未受精卵を得ることができ，この未受精卵を使用して体外受精を行うことができる．これによってマウスの生産を約1カ月間短縮することができる．ノックアウトマウスやトランスジェニックマウスのホモ個体を早く作成する必要がある場合には，上記の方法を組み合わせた実験を行った．雌幼若マウスに過排卵を誘起するには，ホルモン処理の時期が系統に

よってきわめて微妙である。そこで3週令のマウスの尾の一部を切断し、DNA解析し、1週間後に結果を出してもらい一方すべての雌幼若マウスにホルモン注射をしておく。DNA解析の結果によってノックアウトマウスやトランスジェニックマウスを選別し、これらのマウスから採卵し体外受精を行い無事実験を終了させることができた。DNAの解析が遅れて、マウスの選別が不可能な場合はホルモン処理したすべての雌幼若マウスを使用した。

以上の経験は、感染防御部門および遺伝学部門の協力なくしてはできなかつた。と同時に、この方法なくしては、両部門のマウスを実験を中断することなくクリーンにすることはできなかつたものと考えられる。

表 A. 2. 成熟マウスと幼若マウスでの排卵数

	系統	成熟マウス			幼若マウス		
		マウス数	系 統	受精卵数	マウス数	系 統	受精卵数
感 染 防 御 部 門	A	19	B6J	234	14	ノックアウトマウス	713
	B	18	B6J	235	19	ノックアウトマウス	594
	C	10	B6J	105	9	ノックアウトマウス	328
	D	12	B6J	154	7	ノックアウトマウス	178
	E	10	B6J	154	7	ノックアウトマウス	301
	F	30	B6J	431	10	ノックアウトxTg	161
	G	30	B6J	479	9	ノックアウトxTg	478
遺 伝 学 部 門	A	10	B6J	125	9	ノックアウトマウス	417
	B	10	Tg マウス	107	21	ノックアウトマウス	676
	C	30	Tg マウス	121	9	ノックアウトマウス	336
	D	10	Tg マウス	227	6	Tg マウス	153
	E	24	Tg マウス	170	5	Tg マウス	252

Tg: トランスジェニックマウス B6J: C57BL/6J

c. マウスルームのクリーニング (中尾和貴, 外丸裕介, 石崎宏好, 勝木元也)

マウスルームのクリーニングは上記の作業結果を確認後、残りのマウスを処分することから始めた。この作業を通じて強く感じたことは、日本の多くの大学に認められることではあるが、マウスルームの水準がきわめて低いことである。そして、その水準を高くすることの必要性である。これは、研究者自らが自覚して、ほんの少し努力すればよいことであり、研究の第一歩ともいえる心がけである。今後は益々全員の協力のもとに落伍者を出さない運営の必要性を自覚させられた。従来のマウス飼育ラックは、あまりの汚さと機械部分の破損等で風量コントロー

ルが出来ないためとから再使用不可能として処分した。また他の研究室への配慮からホルマリン燻蒸は断念したが、過酢酸噴霧、ヨードおよびアルコールによる滅菌等を約2週間かけて行い、消毒後落下菌テストを行った。その結果、きわめて清浄であることが示された。またオトリマウスを4週間飼育し、感染テストをしたところ、すべて陰性であった。

以上のために約200万円を要したがその価値は充分にあったと評価できる。自画自賛であるが、きわめて劣悪なマウスルーム、その環境で汚染されたマウスから、仕事を停滞させることなく、しかも規模を拡大しながら計画的に新しい清浄なマウス飼育に移行できたことは特に記録に留めたい。

d. 実験用マウス胚、その他の供給（中尾和貴、外丸裕介、石崎宏好、勝木元也）

実験用としてマウス胚、移植用レシピエントマウスの供給を行った。

C. 発癌リスク評価系の開発（権藤洋一、塩山善之、中尾和貴、勝木元也）

細胞学部門との共同で、体細胞突然変異をモニターするマウスが確立された。癌は遺伝子の突然変異によって起る細胞の異常増殖である。変異がおこる機構を解明するには、稀にしか起らない突然変異を検出する必要がある。細胞系ですで行われている手法を生物個体に移す試みを行った結果、迅速且つ鋭敏な方法が確立した。（細胞学部門参照）

総 説

1. 権藤洋一、中尾和貴、高橋美千江、池田由美子、茂手木淑子、竹下綾、勝木元也.1993.
トランスジェニックマウスを用いた変異原の高感度解析法の開発。
環境変異原研究, 15, 39-49.
2. 中村健司、中尾和貴、権藤洋一、勝木元也.1993.
自在な標的遺伝子置換法。
実験医学. 11, 138-141.

学会発表

1. 勝木元也。(1993, 1/22)
特別講演：新しい実験医学—発生工学を用いたモデルの動物の開発。
第19回水晶体研究会, 東京.
2. 勝木元也。(1993, 2/22)
環境変異原物質の検査系としてのトランスジェニックとジーンターゲットティング。
筑波研究支援センター, 筑波.
3. 勝木元也。(1993, 3/27)

- 新しい実験医学のための実験動物。
創薬シンポジウム, 大阪.
4. 勝木元也. (1993, 6/7-8)
Universal gene replacement 法。
がん特別研究シンポジウム「がん研究の進歩'93」, 東京.
 5. 勝木元也. (1993, 7/2)
遺伝子欠失, 置換法とその応用。
第97回日本医学会シンポジウム「遺伝子と医学」, 東京.
 6. 勝木元也. (1993, 7/2)
発がん機構研究に有効なトランスジェニックマウス。
実験動物中央研究所維持会シンポジウム, 東京.
 7. 権藤洋一, 中村健司, 中尾和貴, 勝木元也. (1993, 9/4)
マウス p53遺伝子の標的置換とジーンコンバージョン。
第8回遺伝子組換えとその制御ワークショップ, 函南.
 8. 権藤洋一, 勝木元也. (1993, 9/17)
トランスジェニックマウス (HITEC マウス) を用いた体細胞突然変異の迅速鋭敏な検定法の確立。
第65回日本遺伝学会大会, 三島.
 9. 権藤洋一, 勝木元也. (1993, 10/5-10/7)
In vivo における発がん性検定系の開発 III. HITEC マウスの体細胞に生じる突然変異の解析法の確立。
第52回日本癌学会総会, 仙台.
 10. 中村健司, 権藤洋一, 中尾和貴, 笹岡俊邦, 畠中正美, 木村穰, 勝木元也. (1993, 10/5-10/7)
p53遺伝子欠損マウスに認められる個体発がん。
第52回日本癌学会総会, 仙台.
 11. 権藤洋一, 中村健司, 中尾和貴, 笹岡俊邦, 勝木元也. (1993, 11/7-11)
Universal gene replacement and genome dynamics in mouse embryonic stem cells.
第7回国際マウスゲノムカンファレンス, 浜名湖.
 12. 勝木元也. (1993, 11/18)
トランスジェニックマウス/突然変異検出法。
放射線総合医学研究所シンポジウム, 千葉.
 13. 権藤洋一, 勝木元也. (1993, 11/26)
トランスジェニックマウスを用いた環境変異原の検定系の開発.

- 第22回日本環境変異原学会 (EMS Japan) 大会, 東京.
14. 中村健司, 権藤洋一, 中尾和貴, 笹岡俊邦, 畠中正美, 木村穰, 勝木元也. (1993, 12/16-12/19)
ES細胞を用いた新しい遺伝子置換法の開発 III.
第16回日本分子生物学会年会, 千葉.
15. 権藤洋一, 中村健司, 中尾和貴, 勝木元也. (1993, 12/16-12/19)
ジーンターゲッティングにみられる「半相同組換え体」: 半相同組換え体スクリーニングの留意点.
第16回日本分子生物学会年会, 千葉.
16. 池田由美子, 茂手木淑子, 高橋美千江, 竹下 綾, 中尾和貴, 権藤洋一, 勝木元也. (1993, 12/16-12/19)
HITECマウス: トランスジェニックマウスを用いた体細胞突然変異検定法の確立.
第16回日本分子生物学会年会, 千葉.