

野生マウス由来線維芽細胞の樹立による遺伝資源保存技術の一例

安齋 政 幸¹⁾、村 井 仁 志²⁾、宮 下 実¹⁾、岸 昌 生^{1,4)}、
中 家 雅 隆³⁾、西 村 愛 美^{3,5)}、杉 本 奈 央⁶⁾、松 崎 ひかる⁶⁾、
東 里 香⁶⁾、三 谷 匡¹⁾、加 藤 博 己¹⁾、細 井 美 彦^{1,3,6)}

要 旨

本実験では、野生種であるアカネズミおよびカヤネズミから少量の組織サンプルを回収し効率よく安定した DNA を回収するために、パロサイクラー (Baro Cycler) を用いて DNA 抽出とその相同性について検索を行なった。さらに、両マウスの尾部から採取した組織より線維芽細胞を樹立し、染色体解析および樹立した細胞の遺伝資源保存を検討した。その結果、尾部組織および樹立線維芽細胞それぞれはシーケンス後の BLAST 検索によってデータベース上にて高い相同性を示した。また、核型解析では、それぞれの核型は高い正常性を示した。さらに、それら体細胞を用いて、電気融合法による異属間体細胞核移植を実施したところ、一部の再構築卵子は 2 細胞期胚へと発生することを認めた。以上の結果から、今回樹立した野生マウス由来線維芽細胞に異常は少なく、それら細胞の遺伝子資源の保存が可能であることが示された。

キーワード：野生マウス、遺伝資源保存、体細胞、体細胞核移植

1. 緒 論

これまでの報告において絶滅の恐れのある動植物種は 2 万種を超え、これらの種を保護していくために保全繁殖技術 (Reproductive Technologies for Species Conservation) の意義が問われている¹⁾。我が国ではこれまでに、野生動物の保護は、第一に生息地の生息数の確保といった域内保全事業 (in-situ conservation) が優先されているが、生息地の回復が困難な場合やそれまでに動物の生息数が激減する可能性がある場合は、動物園や水族館などといった域外保全 (ex-situ conservation) による飼育繁殖や調査研究を展開しなければならない^{2,3)}。しかし実際は、限られた飼育スペースで Breeding Loan により遺伝的多様性を維持しながら繁殖させていくことは極めて難しい^{4,5)}。そのため、動物を生体ではなく、胚および配偶子そして体細胞を回収して保存する活動が行なわれている。これにより飼育スペースやコスト面の問題が解消され、個体再生まで遺伝子を長期間保存できることで遺伝的多様性を保持することを可能とした新たな人工繁殖による試みが展開されている^{2,6,7)}。一方、哺乳類の中で一番多い生物種であるげっ歯類や多数の県で絶滅危惧種に指定されている小型げっ歯類は、種の保存に関する活動として、生息域の環境保全と共にこれらげっ歯類の生理機能や遺伝的多型に関する研究が行なわれている⁸⁻¹⁰⁾。また通常の繁殖活動でその種を保存することができない小集団では、遺伝的多様性の確保と遺伝的均一化の回避方法として、発生工学技術的手法による遺伝資源の保存が期待されている¹¹⁾。近年、展示動物園において飼育下にあるキタシロサイ (*Ceratotherium simum cottoni*) とドリル (*Mandrillus leucophaeus*) の体細胞から、人工

原稿受付日：2014 年 2 月 16 日

1. 近畿大学先端技術総合研究所 〒642-0017 和歌山県海南市南赤坂 14-1
2. 富山市ファミリーパーク 〒930-0151 富山県富山市古沢 254
3. 近畿大学大学院 生物工学専攻 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930
4. 近畿大学 生石農場 〒643-0531 和歌山県有田郡有田川町楠本 1643-21
5. 九動株式会社 〒841-0075 佐賀県鳥栖市立石町惣業 883-13
6. 近畿大学生物理工学部 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

多能性幹細胞 (iPSCs) の樹立が可能であることが示され、絶滅に瀕する動物種の保護に対して有用な手段に繋がると期待されている¹²⁾。また、長期間冷凍保管されたマウス屠体の組織から細胞核を取り出し、体細胞核移植によりクローンマウスが誕生したことが報告されている¹³⁾。しかし、この動物の誕生には体細胞核移植胚由来胚性幹細胞 (ntES 細胞) の樹立を経てのみ個体産出が可能であり、保存組織の核内の遺伝情報が完全であるかどうかは明らかでなく、それらの技術手法を野生動物種へ適用するには、より詳細な検討を行なう必要があると思われる。本実験では、野生動物の遺伝資源の保存を目的として、富山市ファミリーパークより提供して頂いた野生小型げっ歯類を用いて、これらマウスの尾部から体細胞の樹立と保存を行ない、凍結・融解後の細胞の機能性を検討した。

2. 材料および方法

(1) 供試動物

供試動物として、ドナー細胞として富山市ファミリーパークより供与頂いた成熟カヤネズミ (*Micromys minutus*) およびアカネズミ (*Apodemus speciosus*) の 2 種の野生マウスを用いた。また、細胞の機能性の確認のため、体細胞核移植に供されるマウスは成熟齢に達した B6D2F1 (日本 SLC (株)) を用いた。またこれらのマウスは入荷後、12 時間照明下において、1 週間以上順化した後、実験に供した。飼育環境として、室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 50% の条件下の空調システムにおいて、飼料 (CRF1R: オリエンタル酵母工業 (株)) を不断給餌とし、飲水は自由摂取とした。なお、本実験に関する動物実験の立案および実験動物の飼養と管理については、近畿大学動物実験規定に準じて実施した。

(2) 野生マウス由来線維芽細胞の樹立

今回、供試した組織として、各マウスに麻酔処置を施し尾部端を一部切除した。初代培養に用いる尾部は、PBS (-) 溶液内にて内部尾部組織と尾部表皮へ分離した後、回収したそれぞれの組織片は 35mm 細胞培養ディッシュ (BD Falcon: 353001) 内で、 $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の Fungizone を含む 5% FBS 加 DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium: Life technologies Corp.) をディッシュに添加した¹⁴⁾。調整した各組織は、炭酸ガスインキュベーター内 (37°C 、5% CO_2 in air) で培養し、各組織由来の細胞がコン플レント状態になった後、継代培養にて線維芽細胞の樹立を行なった。次に、十分に増殖し継代培養が可能な各マウス由来線維芽細胞は凍結保存を行なった¹⁵⁾。凍結操作は、培地を除去後 0.05% Trypsin-EDTA (Life technologies Corp.) を加えて 5 分間培養した後、5% FBS 加 DMEM を加えて細胞を回収した。回収した細胞溶液を遠沈処理して得られた細胞塊を $500 \mu\text{L}$ の細胞保存液 (セルバンカー: 日本全薬工業 (株)) に懸濁して -80°C 下で保存した。融解操作は、細胞懸濁液を 37°C のウォーターバスで急速に融解後、5% FBS 加 DMEM を加え保存液を希釈した。その後、遠沈処理にて細胞保存液を除去した後、回収した細胞塊は同培地で懸濁を行ない機能性解析のため継代培養した (図 1, 2)。

(3) 野生マウス由来線維芽細胞を用いた核型解析

細胞の核型解析は既報に準じて行った^{16, 17)}。即ち、対数増殖期である最終継代 48 時間後に、細胞ディッシュへ $0.06 \mu\text{g}/\text{mL}$ コルセミド溶液を加え、 37°C 、5% CO_2 で 3 時間培養した。次に PBS (-) で洗浄後、0.05% Trypsin-EDTA を加えて 5 分間培養後、遠沈処理にて細胞塊を回収し、 0.075M 塩化カリウムを加え低張処理を 30 分間行なった。その後、カルノア固定液を加え、細胞浮遊液を調整した。調整した細胞浮遊液をスライドガラス上へ滴下し、VECTASHIELD with DAPI (Vector Lab. Inc. Burlingame, CA, USA) で染色を行ない蛍光顕微鏡 (LEICA DMI 6000B: AF6000) にて観察した。



図1. カヤネズミ (*Micromys minutus*) 尾部組織由来線維芽細胞
(左: 初代培養時、右: 継代培養時)



図2. アカネズミ (*Apodemus speciosus*) 尾部組織由来線維芽細胞
(左: 初代培養時、右: 継代培養時)

(4) 野生マウス尾部および尾部由来線維芽細胞からの DNA 抽出操作および種の同定

それぞれの野生マウスから回収した一部の尾部および樹立した線維芽細胞からの DNA 抽出操作は、Baro Cyclor ((株) 池田理化) を用いて行なった。即ち、回収した各細胞組織は、高圧力チューブに入れ、超高圧 35kpsi, 20sec、常圧 0kpsi, 20sec で DNA 抽出を行なった。抽出した各サンプルの濃度測定を行ない、常法^{18, 19)}により TE buffer で調整をした後、PCR を行なった (表 1)。また、得られた PCR 産物を常法により再調整した後、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer により塩基配列を同定することによってシーケンス解析を実施した。なお、これらのデータによる相同性の検索には、DNA Data Bank of Japan (以下、DDBJ) を用いて解析した。

表 1. 各種野生マウス由来組織解析に供した DNA 解析用プライマー配列

Spices	Preimer (<i>Cytochrome b</i>)	Sequence
<i>Apodemus speciosus</i>	Forward	ATTTCTCCACGTAGGACGAG
	Reverse	AAGAAGCGTGTTAGTGTTGC
	Reverse	TGAGAAGCCTCCTCAGATTC
<i>Micromys minutus</i>	Forward	CCTAGGAGTATGCCTTATCGT
	Forward	TCACTCCTAGGAGTATGCCTT
	Reverse	ATGCAGTTGCTATAACTGCG

(5) 体細胞核移植操作法による野生マウス由来線維芽細胞の機能解析

成熟齢に達した B6D2F1 雌マウスに妊馬血清性腺刺激ホルモン（あすか製薬（株））とヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（あすか製薬（株））を 48 時間間隔で 7.5 単位を腹腔内投与して過剰排卵処置を施した。次に、回収した未受精卵を用いて Ogura らの方法を修正して核移植を行なった^{20, 21)}。即ち、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ サイトカラシン B（以下、CB, 和光純薬工業（株））を含む mCZB-HEPES へ約 10 分間静置後、除核操作を行なった。卵子は、mCZB 培地にて洗浄後、ドナー細胞の移植まで 37°Cにて平衡された炭酸ガスインキュベーター内で培養した。続いてドナー細胞の移植は、樹立した各線維芽細胞を 0.25% トリプシン溶液で 5 分間処理した後、細胞を回収し単一細胞に分散させた。ドナー細胞の注入は、インジェクションピペットを用いて除核した卵子透明帯を貫通させて卵卵腔内へ 1 個の体細胞を卵子細胞膜に隣接させた。生存した卵子は、電気融合溶液（0.3M Mannitol, 1.7mM MgCl_2 , 0.1mg/mL Polyvinylpyrrolidone in DW）へ卵子を移し高圧電パルス式細胞融合装置（LF101：ネッパジーン（株））により細胞融合を行なった（融合条件：AC; 10V, 10 μsec 30sec., DC; 90–100V, 10 μsec 2cycle., post fusion AC; 2V, 20–30sec）。融合卵子の活性化処理は、Kishigami らの方法にほぼ準じて行なった²²⁾。融合した卵子は、早期染色体凝集の誘起を確認した後、 Ca^{2+} 不含 mCZB 培地に 10mM 塩化ストロンチウム（和光純薬工業（株））、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CB、5nM Trichostatin A（以下、TSA, Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, USA）を加え 3 時間の卵子活性化処理を行なった。続いて、 Ca^{2+} 不含 mCZB 培地に 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CB を添加、5nM TSA を加えて、3 時間卵子を培養した。最後に KSOM-AA 培地（EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA）に 5nM TSA を加えた培地に卵子を移し 4 時間培養した後、その後の 2 細胞期胚への発生を確認した。

3. 結 果

各野生マウス由来線維芽細胞を用いた核型解析による細胞機能の正常性について、カヤネズミにおいては、今回観察した 317 区画を評価したところ、その正常な核型（ $2n=68$ ）を有したものは 268 区画（84%）であった（図 3）。一方、アカネズミにおいては、100 区画を評価したところ、正常な核型が得られたのは、83 区画 83%（83/100）と（図 4）、樹立した線維芽細胞は凍結・融解後も高い正常性を有していることを確認した。

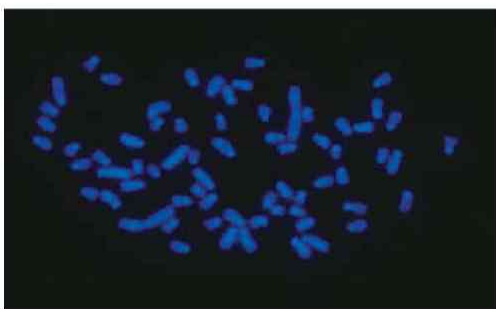


図 3. カヤネズミ染色体検査像（ $2n=68$ ）

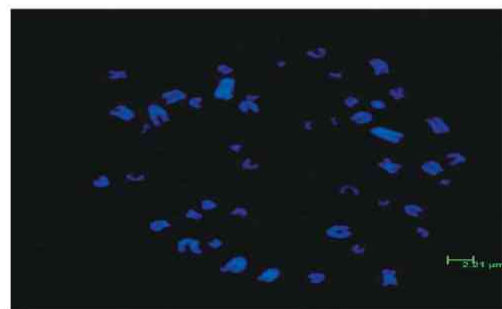


図 4. アカネズミ染色体検査像（ $2n=46$ ）

各野生マウス由来線維芽細胞を用いた相同性解析による細胞機能の正常性について、表 2 には、アカネズミにおけるシーケンス結果の一例を示した。樹立した各線維芽細胞から得られた DNA シーケンス結果をもとに、DDBJ による相同性を検索したところ、カヤネズミ由来細胞は、決定した塩基配列情報を BLAST 解析により 100% の相同性を有した（データ非表示）。一方、アカネズミ由来細胞においても同様に DDBJ による相同性は 100% であった（表 2）。

表2. アカネズミ由来線維芽細胞から抽出・増幅したDNA断片を用いたDDBJとの相同性解析の一例

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage
AB164492.1	Apodemus speciosus mitochondrial cytb gene for cytochrome b, partial cds, isolate:HS3002/KT3393	381	381	100%
AB164491.1	Apodemus speciosus mitochondrial cytb gene for cytochrome b, partial cds, isolate:HS3010/KT3401	381	381	100%
AB503240.1	Apodemus speciosus mitochondrial cyt b gene for cytochrome b, partial cds, isolate: ST-23	375	375	100%

表3には、各野生マウス由来線維芽細胞を用いた体細胞核移植操作による細胞機能の正常性を示した。カヤネズミ由来線維芽細胞を用いた電気融合操作では53% (163/308) の卵子が生存し、融合に成功した卵子は77% (126/163) であった。また、融合した卵子を用いて活性化処理を行なった結果、100個 (79%, 100/126) の前核様構造を持つ再構築卵子が得られた。一方、アカネズミでは、電気融合操作により、83% (374/453) の卵子が生存し、40% (148/374) の細胞融合効率であった。また、融合した卵子を用いた活性化処理により、118個 (80%, 118/148) の前核様構造を持つ再構築卵子を作出した。

表3. 各野生マウス由来線維芽細胞を用いた体細胞核移植成績

細胞由来系統	供試卵子数	生存卵子数 (%)	融合卵子数 (%)	再構築卵子数 (%)
カヤネズミ	308	163 (53)	126 (77)	100 (79)
アカネズミ	453	374 (83)	148 (40)	118 (80)

各野生マウス由来線維芽細胞を用いた体細胞核移植操作により作製された、再構築卵子の発生成績を表4に示した。カヤネズミ由来線維芽細胞を用いて作製した再構築卵子をKSOM-AA培地にて培養したところ、70% (70/100) の卵子が2細胞期へと発生した。一方、アカネズミ由来線維芽細胞を用いて作出された再構築卵子の2細胞期への発生成績は64% (75/118) であった。これらの結果から、各野生マウスから樹立された線維芽細胞の機能性は、異属間での体細胞核移植操作において、一部の再構築卵子は2細胞期へと発生することが示された。

表4. 体細胞核移植法により作製した各野生マウス由来再構築卵子の発生成績

細胞由来系統	供試卵子数	2細胞期発生数 (%)
カヤネズミ	100	70 (70)
アカネズミ	118	75 (64)

4. 考 察

元来、カヤネズミ (*Micromys minutus*) は、ネズミ科カヤネズミ属に分類されるネズミであり、日本では宮城県と新潟県を北限とし広く生息している²³⁾。一方、アカネズミ (*Apodemus speciosus*) は、ネズミ科アカネズミ属に分類され、北海道から九州まで広く分布しながら、富山と浜松を結んだ線を境界線として境界線より以西では染色体数が $2n=46$ 、以東では $2n=48$ 、境界線では $2n=47$ と、生息地域によって染色体数の異なることが知られている²⁴⁾。しかし、土地開発や生息域の断片化などによって急速に生息場所が減少し、カヤネズミは、福岡・鹿児島・愛知・長野・群馬県など 18 都道府県以上でレッドデータブックに指定され、アカネズミは、東京都の保護上重要な野生生物種に登録されている。繁殖活動として、地域生活環をもつ野生マウスは、その繁殖性も多岐に渡っていることを示し、その実態を調査して繁殖性を正しくコントロールすることが困難であり^{25, 26)}、地域適応性とその生態の地域への順化が日本固有の野生小型哺乳類の生息環境に大きく左右される²⁷⁾。

一方で、野生マウスの様々な種を研究用として用いる新たな手法が導入され²⁸⁻³⁰⁾、興味深いことに、日本産野生由来マウスと実験動物化されている近交系 C57BL/6 系において遺伝的に類似した領域があることが示され³¹⁾、様々な野生マウスを用いた疾患研究が急速に進むと思われる。今回、供試した 2 種の野生マウス³²⁾ においても、カヤネズミにおいては、体長が小さいマウスであること、球巣を構築しそのなかで営巣と繁殖をもつ特徴を有し³³⁾、アカネズミでは、生息環境域の特性を持つ狭い範囲内での交雑で維持されているため、劣勢な交雑個体で両染色体群が維持され、さらにロバートソニアン異型接合体の減数分裂が交配後の隔離機構を働かせ、結果的に両染色体群の側所的分布の維持がされていると考えられ³⁴⁾、この特異性は、ダウン症の原因となるロバートソニアン転座の解明につながる有用な疾患モデルとなると期待されている³⁵⁾。このように野生マウスを研究資源として用いるには、繁殖効率の向上は当然のことながら飼育繁殖法の確立が急務とされている。宮田らはカヤネズミの営巣と繁殖を展示環境下にて確認し環境への適応する能力が高いと報告した³⁶⁾。また今まで繁殖が困難であったアカネズミ³⁷⁾ においては定量的な繁殖行動を捉えることに成功したのは極めて最近であり³⁸⁾、私たちもカヤネズミの繁殖には成功したもののアカネズミの繁殖は出来なかった (安齋ら、未発表)。さらに、実験動物では困難な生物学的特徴と生物学的進化を有する、固有の野生小型げっ歯類では、飼育繁殖の基礎データの集積は始まったばかりである³⁹⁾。

上述の通り、これからの野生マウスは実験動物化として大きな価値を持ち、生息域の保護・繁殖そして遺伝資源の保存技術を確認していく必要があり、様々な動物種において人工繁殖による生息数の維持がされているものの¹¹⁾、繁殖能が低い場合や個体が既に死滅し、ペアの維持が困難を極める場合などは、遺伝的形質の変化が危惧され、さらに人工繁殖が行なえない場合、より高度な生殖工学的技術と遺伝資源の保存技術の開発が望まれる^{40, 41)}。Hasegawa⁴²⁾ らは、野生マウスから得られる卵子の採取方法の改良に成功し、体外受精と初期胚の保存を様々な野生マウス系統へ応用してバイオリソースとしての役割を進めている。私たちも、飼育下にて繁殖が成立した野生マウスを用いて体外受精を行ないガラス化保存により超低温下 (-196°C) にて保存された初期胚を用いて加温後、生存した胚を移植することにより正常産子を獲得し、さらに微生物学的統御を可能にすることを示した⁴³⁾。また、マウスを処分することなく低侵襲的な処置にて卵巣の一部を摘出し、そこから回収した未成熟卵子を用いた初期胚の作出と産子作出に成功し、今後、希少な野生マウスを処分することが無く個体の生理機能を維持することが可能であると共に、生殖細胞の回収と遺伝資源の保存ならびに個体増殖が期待できることを示唆した⁴⁴⁾。

Wakayama らは、凍結保護剤を用いずに冷凍されたマウスの屠体の組織から細胞核を取り出し、核移植によってクローンマウスが誕生したことを報告しているが、核の正常化は発生させたクローン胚からの

ntES 細胞の樹立に寄与することが必要であった⁴⁵⁾。また、Kato からも、絶滅種である細胞核を用いて体細胞核移植を行なったところ、細胞動態の確認は出来ず細胞核の正常性は認められなかった⁴⁶⁾。今回、私たちが実施した野生マウスからの体細胞樹立およびその細胞機能の特性を検討する上で、体細胞核移植技術を用いたところ、異属間における卵子の処置は可能でありクローン胚の作出にも成功した。さらに単一クローン胚由来 DNA 断片からのシーケンス結果は、DDBJ と高い相同性を保持していることを確認し（安齋ら、未発表）、生細胞レベルでの遺伝資源の保存とその機能性をこれらの技術によって検証することは、極めて有用であると思われる。

現在、多くの機関において動物種の研究資源バンク^{11, 47, 48)} が機能するに至っている。また、マウスでは体細胞から初期化により人工多能性幹細胞 (iPSCs) を樹立し生殖細胞へ分化することが報告された⁴⁹⁻⁵¹⁾。今後、遺伝子資源の保護および疾患モデルとして研究価値の高まる希少な野生小型マウス由来体細胞組織の獲得と研究材料としての資源情報の共有化が進むことが可能となろう。

5. 結 論

本実験では、2 種の野生マウスの尾部より採取した組織を用いた遺伝資源保存を検討した。尾部組織および樹立線維芽細胞それぞれをシーケンス後の BLAST 検索により相同性を確認したところ、データベース上に高い相同性を示すことを確認した。さらに、それら体細胞の機能を調べるために、電気融合法による体細胞核移植を試み、一部の再構築卵子は 2 細胞期胚へと発生することを示した。これらのことから、今後、絶滅に瀕する野生動物の遺伝資源の保護技術として胚・配偶子の保存操作に用いられる生殖工学技術のみならず、体細胞機能の特性を活かした核移植操作による保存技術が有用であることが示唆された。

6. 謝 辞

本実験に関して、適切なご助言を賜りました（株）紀和実験動物研究所 中川隆生、東雅志氏、近畿大学生物理工学部 崎田恵、亀井美紅両氏に感謝申し上げます。本研究の一部は、JSPS 科研費 23500506 の助成および近畿大学 21 世紀研究開発奨励研究費「マンモスおよび希少動物の再生に向けて」の支援を受けて行ったものです。

7. 参考文献

1. Conde DA, Flesness N, Colchero F, Jones OR, Scheuerlein A. (2011). Conservation. An emerging role of zoos to conserve biodiversity. *Science*. 331, 1390-1391.
2. 福井大祐. (2005). 生物多様性の保全を目指した野生動物の人工繁殖と細胞保存. *日本野生動物医学学会誌*. 10, 1-12.
3. 佐藤義明、永友雅己. (2010). 世界動物園水族館協会 (WAZA) による「動物園・水族館による動物研究の実施に関する倫理指針」について (翻訳). *動物心理学研究*. 60, 139-146.
4. 楠田哲士、乙津和歌、川上茂久. (2013). ゾウの飼育下繁殖の現状と課題. *獣医畜産新報*. 66, 812-822.
5. 柳川洋二郎. (2014). 野生動物の繁殖制限と避妊法. *獣医畜産新報*. 67, 33-35.
6. 楠比呂志、木下こづえ、佐々木春菜、荒蒔祐輔. (2008). 我が国における動物園・水族館での保全繁殖共同研究. *日本野生動物医学学会誌*. 14, 37-50.

7. 大沼学. (2014). 絶滅危惧種の遺伝資源の保存. 獣医畜産新報. 67, 35-44.
8. 土屋公幸、若菜茂晴、鈴木仁、服部正策、林良博. (1989). トゲネズミの分類学的研究. I. 遺伝的分化. 国立博物館専報. 22, 227-234.
9. 本川雅治、下稲葉さやか、鈴木聡. (2006). 日本産哺乳類の最近の分類体系. 哺乳類科学. 46, 181-191.
10. 森脇和郎. (2010). ゲノムに映したネズミの歴史. - 分子生物学的アプローチによる小型哺乳類の整理地理・遺伝的分化に関する研究 -. 哺乳類科学. 50, 67-80.
11. S.M.H. Andrabi, W.M.C. Maxwell. (2007). A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. Anim Reprod Sci. 99, 223-243.
12. Ben-Nun IF, Montague SC, Houck ML, Tran HT, Garitaonandia I, Leonardo TR, Wang YC, Charter SJ, Laurent LC, Ryder OA, Loring JF. (2011). Induced pluripotent stem cells from highly endangered species. Nat Methods. 8, 829-831.
13. Wakayama S, Ohta H, Hikichi T, Mizutani E, Iwaki T, Kanagawa O, Wakayama T. (2008). Production of healthy cloned mice from bodies frozen at -20 degrees C for 16 years. Proc Natl Acad Sci U S A. 105, 17318-17322.
14. Chandan K. Sen, Lester Packer. (2002). Redox cell biology and genetics. pp125-126. Academic Press.
15. Oishi K, Noguchi H, Yukawa H, Miyazaki T, Kato R, Kitagawa Y, Ueda M, Hayashi S. (2008). Cryopreservation of Mouse Adipose Tissue-Derived Stem/Progenitor Cells. Cell Transplantation. 17, 35-41.
16. Yoshizawa M, Nakamoto S, Fukui E, Muramatsu T, Okamoto A. (1992). Chromosomal analysis of first-cleavage mouse eggs fertilized in caffeine-containing medium. J Reprod Dev. 38, 107-113.
17. Nakamura T, Matsubara K, SP. Yasuda, Tsuchiya K, Matsuda Y. (2007). Chromosome homology between mouse and three Muridae species, *Millardia meltada*, *Acomys dimidiatus* and *Micromys minutus*, and conserved chromosome segments in murid karyotypes, Chrom Res. 15, 1023-1032.
18. Tomozawa M, Suzuki H. (2008). A trend of central versus peripheral structuring in mitochondrial and nuclear gene sequences of the Japanese wood mouse, *Apodemus speciosus*. Zoolog Sci. 25, 273-285.
19. Michaux JR, Chevret P, Filippucci MG, Macholan M. (2002). Phylogeny of the genus *Apodemus* with a special emphasis on the subgenus *Sylvaemus* using the nuclear IRBP gene and two mitochondrial markers: cytochrome b and 12S rRNA. Mol Phylogenet Evol. 23, 123-36.
20. Ogura A, Inoue K, Takano K, Wakayama T, Yanagimachi R. (2000). Birth of mice after nuclear transfer by electrofusion using tail tip cells. Mol Reprod Dev. 57, 55-59.
21. 東貞宏、横山峯介、安齋政幸. 核移植卵の作製方法、該方法により得られる核移植卵、該核移植卵を発生させて得られるクローン個体、及び該クローン個体の作製方法. 公開特許公報. (特開 2002-320428).
22. Kishigami S, Mizutani E, Ohta H, Hikichi T, Thuan NV, Wakayama S, Bui HT, Wakayama T. (2006). Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. Biochem Biophys Res Commun. 340, 183-189.
23. 繁田真由美、黒田貴綱. (2005). 横浜市におけるカヤネズミの生息記録. 神奈川県自然誌資料. 26, 63-65.

24. 土屋公幸. (1974). 日本産アカネズミ類の細胞学および生化学的研究. 哺乳動物学雑誌. 6, 67-85.
25. 木村吉幸、菊池壮蔵、岩原幸子. (1998). 福島市においてカヤネズミを捕獲. 哺乳類科学. 38, 181-184.
26. 立石隆. (2007). 尾瀬地域におけるアカネズミの繁殖行動. 哺乳類科学. 47, 215-220.
27. 安部永. (2003). カワネズミの捕獲, 生息環境および活動. 哺乳類科学. 43, 51-65.
28. 松島芳文. (2006). 日本産野生由来マウスに発見した新しい疾患モデル動物. モダンメディア. 52, 43-49.
29. 宮下信泉、久城憲壽、城石俊彦、松島芳文、山口泰典、佐藤淳. (2009). 野生集団より新たに育成されたマウス系統の実験動物としての貢献. 関西実験動物研究会会報. 31, 49-54.
30. Kuramoto T, Nakanishi S, Ochiai M, Nakagama H, Voigt B, Serikawa T. (2012). Origins of albino and hooded rats: implications from molecular genetic analysis across modern laboratory rat strains. PLoS One. 7, 1-7.
31. Frazer KA, Eskin E, Kang HM, Bogue MA, Hinds DA, Beilharz EJ, Gupta RV, Montgomery J, Morensoni MM, Nilsen GB, Pethiyagoda CL, Stuve LL, Johnson FM, Daly MJ, Wade CM, Cox DR. (2007). A sequence-based variation map of 8.27 million SNPs in inbred mouse strains. Nature. 448, 1050-1053.
32. 金子之史、村上興正. (1996). 日本産の齧歯類 (野鼠および家鼠) の分類学史的検討. 哺乳類科学. 36, 109-128.
33. 東寛子、岡田絢子、山中みのり、山中佐紀子、小林一恵、福本薫、桜谷保之. (2010). 近畿大学奈良キャンパスにおける希少種カヤネズミの生態. 近畿大学農学部紀要. 43, 75-80.
34. Saito M and Y Obara. (1988). Meiotic studies of interracial hybrids from the wild population of the large Japanese field mouse, *Apodemus speciosus*. Zool. Sci. 3, 785-792.
35. 山岸学、松原和純、松田洋一、酒泉満. (2011). FISH法を用いたアカネズミ (*Apodemus speciosus*) のロバートソン型転座染色体の同定と構造解析. 日本哺乳類学会大会講演要旨集 pp78.
36. 宮田桂子. (2005). カヤネズミのゆりかご作り - 日本で一番小さなネズミの巣作り行動 -. 哺乳類科学. 45, 51-54.
37. Oh H.S, Mori T. (1998). Growth, development and reproduction in captive of the large Japanese field mouse, *Apodemus speciosus* (Rodentia, Muridae). J Fac Agri, Kyushu Univ. 43, 397-408.
38. 酒井悠輔、坂本信介、加藤悟郎、岩本直治郎、尾崎良介、江藤毅、篠原明男、森田哲夫、越本知大. (2013). アカネズミ (*Apodemus speciosus*) の自然交配による繁殖を誘導できる飼育交配手法. 哺乳類科学. 53, 57-65.
39. 篠原明男、山田文雄、榎村敦、阿部慎太郎、坂本信介、森田哲夫、越本知大. (2013). 絶滅危惧種アマミトゲネズミ *Tokudaia osimensis* の実験室環境における長期飼育. 哺乳類科学. 53, 335-344.
40. 安齋政幸、細井美彦、松本和也、佐伯和弘、入谷明. (2005). マウス胚・配偶子の凍結保存技術. 日本胚移植学雑誌. 27, 123-131.
41. S.P. Leibo, N. Songsasen. (2002). Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. Theriogenology. 57, 303-326.
42. Hasegawa A, Mochida K, Matoba S, Yonezawa K, Ohta A, Watanabe G, Taya K, Ogura A. (2012). Efficient production of offspring from Japanese wild-derived strains of mice (*Mus musculus molossinus*) by improved assisted reproductive technologies. Bio Reprod. 86, 1-7.

43. Suzuki H, Nakagata N, Anzai M, Tsuchiya K, Nakura M, Yamaguchi S, Toyoda Y. (1996). Transport of wild mice genetic material by in vitro fertilization, cryopreservation, and embryo transfer. *Lab Anim Sci.* 46, 687-688.
44. 西村愛美、石東祐太、杉本奈央、中家雅隆、中川隆生、東雅志、村井仁志、宮下実、三谷匡、細井美彦、安齋政幸。(2012)。外科的処置による低侵襲的卵巣回収および得られた未成熟卵子発生能の検討。近畿大学先端技術総合研究所紀要。17, 1-8.
45. 若山照彦。(2009)。クローン技術による冷凍保存した個体再生。日本胚移植学雑誌。31, 95-102.
46. Kato H, Anzai M, Mitani T, Morita M, Nishiyama Y, Nakao A, Kondo K, Lazarev PA, Ohtani T, Shibata Y, Iritani A. (2009). Recovery of cell nuclei from 15,000 years old mammoth tissues and its injection into mouse enucleated matured oocytes. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 85, 240-247.
47. 福岡敏夫。希少動物の配偶子バンク (特集・希少動物の人工繁殖)。(1996)。遺伝。50, 35-39.
48. 横山峯介、安齋政幸。(2001)。遺伝子操作マウスの胚・配偶子バンクの構築と有用性。医学のあゆみ。196, 127-130.
49. Yamanaka S. (2007). Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 7, 39-49.
50. Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, Aramaki S, Saitou M. (2011). Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell.* 146, 519-532.
51. Hayashi K, Ogushi S, Kurimoto K, Shimamoto S, Ohta H, Saitou M. (2012). Offspring from oocytes derived from in vitro primordial germ cell-like cells in mice. *Science.* 338, 971-975.

英文抄録

A genetic resource conservation technology
by establishing cultured fibroblast cells derived from two wild mice

Masayuki Anzai¹⁾, Hitoshi Murai²⁾, Minoru Miyashita¹⁾, Masao Kishi^{1,4)}, Masataka Nakaya³⁾,
Manami Nishimura^{3,5)}, Nao Sugimoto⁶⁾, Hikaru Matsuzaki⁶⁾, Rika Azuma⁶⁾, Tasuku Mitani¹⁾,
Hiromi Kato¹⁾ and Yoshihiko Hosoi^{1,3,6)}

Abstract

In this study, to improve the DNA extraction efficiencies for a small amount of tissue from two wild mice, we have done a search for DNA homology with Baro Cyclor. In addition, fibroblasts were also established from those mice tails. Karyotype analyses were performed on the fibroblasts, and those cells were frozen for the preservation. As a result, the frozen-thawed fibroblast cells have a high number of normal karyotype. Fibroblasts derived from organization and tail confirmed the homology sequence after BLAST search. Furthermore, these somatic cells performed somatic cell nuclear transfer (SCNT) by electrofusion method. These results of reconstructed oocytes several developed to 2-cell stage embryos. In conclusion, abnormalities in this wild mouse derived fibroblast cells were low, and therefore conservation of genetic resources was possible in these somatic cells.

Key word: wild mouse, conservation, genetic resource, somatic cell nuclear transfer

-
1. Institute of Advanced Technology, Kinki University, Kainan, Wakayama, 649-0017, Japan.
 2. Toyama Municipal Family Park Zoo, Toyama, Toyama, 550-0002, Japan
 3. Division of Biological Science, Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University, Kinokawa, Wakayama, 649-6493, Japan.
 4. Experimental Farm, Kinki University, Kusumoto, Aridagawa, 643-0531, Japan.
 5. Kyudo, Co. Ltd., Tosu, Saga, 841-0075, Japan.
 6. Department of Genetic Engineering, Faculty of Biology Oriented Science and Technology, Kinki University, Kinokawa, Wakayama, 649-6493, Japan.

