

遺伝子改変マウスの作製 及び供給に関する利用案内

熊本大学生命資源研究・支援センター

////////////////////////////////////
熊本大学生命資源研究・支援センター動物資源開発研究施設（CARD）では、研究支援業務として研究者等からの依頼に応じて、遺伝子改変マウス（マイクロインジェクションによる遺伝子導入マウス及びE S細胞を用いたキメラマウス）の作製、供給業務をおこなっています。
////////////////////////////////////

目次

遺伝子改変マウスの作製及び供給について	ページ
1. 遺伝子導入マウス（Tgマウス）	2
2. E S細胞を用いたキメラマウス	5
遺伝子改変マウスの作製及び供給に必要な書類	
別紙様式1 ・ 別記様式2・3	8

2017.04.01
センター長裁定

遺伝子改変マウスの作製及び供給について

1. マイクロインジェクションによる遺伝子導入マウス (Tgマウス)

1 概要

依頼者が作製したDNA溶液(ベクター部分を除く)を、マウス受精卵の前核中に注入し、仮親の卵管内へ移植を行ってマウスを誕生させます。生まれたマウスは離乳(生後約4週齢)までCARDで飼育します。離乳後、すべてのマウスを依頼者に送付します。スクリーニングは、依頼者が行ってください。

2 作製の手順

- (1) 「遺伝子改変マウス作製及び供給申請書(別記様式1)」, および「遺伝子組換え生物等第二種使用等計画書」を送付下さい。
- (2) (1)と同時に、注入用DNA溶液も送付してください。注入用DNA溶液を受け取った時点で、順番待ちリストに記載します。
- (3) 学長又は文部大臣から「遺伝子組換え生物等第二種使用等計画」の承認があった後、本学歳入徴収官から納入告知書が送付されますので、これにより作製料金(熊本大学遺伝子改変マウス作製等受託規則に定める料金)を納入してください。
- (4) 料金の納入を確認後、Tgマウスの作製を開始します。
- (5) 作製を完了したらマウスを専門業者に依頼して発送します(インジェクションを開始してから約2ヶ月後、かつCARDによる検疫終了後)。なお、マウスを発送するための費用(マウスの輸送用箱、輸送運賃等)は、マウス作製料金には含まれていませんので、別途お支払いください。

3 注意事項

- (1) 注入遺伝子の構造
「遺伝子改変マウス作製及び供給申請書」(別記様式1)の「異種のDNA分子、組換えDNA分子又は組換え体」欄に導入遺伝子の簡単なマップとサイズを記入してください。
なお、遺伝子名は記号のみ標記するのではなく、その内容をわかりやすく簡潔に記入してください。
- (2) マウスの系統
C57BL/6マウス(応相談)
- (3) cDNAの導入の場合
cDNAの導入を計画されている方は、Brinster et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:836-840, (1988)を熟読されることをおすすめします。なお、イントロン付きベクターが必要な方は相談下さい。
- (4) 注入用DNA溶液の調整
依頼者において調整のうえ送付してください。
Brinster et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:4438-4442(1985)を熟読されることをおすすめします。
注入するDNA溶液は遺伝子導入効率や遺伝子発現に大きく影響しますので、下記の点に注意して調整してください。
 - a. 線状ゲノムDNAで、できるだけベクターDNA部分を除くこと。
 - b. DNA濃度: 30 μ g/ml
 - c. DNA量: 100 μ l (50 μ l/tubeを2本)
 - d. DNAの精製法: Tgマウス作製に用いられる方法に準じて作製してください。
- (5) DNA溶液の送付
 - a. DNAを入れたチューブには、必ず、氏名、DNA名を記入し、パラフィル

ム等でシールしてください。

b. DNAは4℃で発送してください。

c. 濃度調製後のDNAの泳動写真を必ず同封してください。

(6) マウス受精卵への遺伝子の導入

マウス受精卵に遺伝子の導入を開始してから、約2ヶ月後（受精卵に遺伝子を導入してから約3週間後にマウスが生まれ、それから約4週間後に離乳します。）にマウスを発送します。

約200個のマウス受精卵に遺伝子を注入し（受精卵への遺伝子の導入は約1～2週間を要します。）、それを仮親マウスの卵管内に移植して出産させます。通常、卵管移植（約160個）した受精卵の約15%（24匹）が生まれ、そのうちの約10%（3匹）がTgマウスと考えられます。

(7) Tgマウスの解析

得られたマウスはすべて依頼者に送りますので、DNAの解析等は各自で行ってください。なお、Foマウス（発送するマウス）のDNA解析は、一度はサザン法で確認することをおすすめします。

(8) Tgマウスが得られなかった場合の対処について

通常のインジェクションでTgマウスが得られなかった場合、これまでの膨大な経験から、それは導入技術の不備によるものではなく遺伝子産物自体に何らかの毒性があり、発育途中で死に至ると考えられます。したがって、同じ遺伝子でもう一度行うことは勧められませんし、異なった構造の遺伝子で行うときは、新たな依頼として費用を請求します。

(9) 事前相談

事前に導入遺伝子のコンストラクト等の研究内容に関する相談があった場合、共同開発として特許権を主張することがあります。

4. 参考書

Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. 2nd Edition

B. Hogan, R. Beddington, F. Costantini, E. Lacy

Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994

5. 申込みおよび問い合わせ先

〒860-0811 熊本市本荘2-2-1

熊本大学 生命資源研究・支援センター 疾患モデル分野

竹田 直樹

TEL/FAX : 096-373-6559

E-mail : ntakeda@gpo.kumamoto-u.ac.jp

6. 供給マウスの微生物学的品質

当センターから供給されるマウスは、以下の微生物学的品質検査をおこなっておりますので、御熟読・御理解の上、手続きをおこなって下さい。なお、マウスの微生物学的品質については、貴機関のマウス受け入れ担当者と事前に協議をおこなって下さい。

(1) 改変マウス作製あるいは、マウス胚バンクからのマウスの供給にはすべてSPFマウス（仮親マウスを含む）を使用します。仮親に胚を移植した後は、産仔の出荷までビニールアイソレーターで隔離飼育をおこないます。

(2) マウスの微生物学的品質検査は、仮親を用いて行います。胚の移植・出産・哺育後、仔マウスの離乳時に仮親マウスを検査して、SPFと確認された場合にマウスを発送します（搬出マウスの微生物学的検査参照）。なお、検査結果は発送前に御連絡いたします。

(3) 仮親の微生物学的品質検査は、当センター病態遺伝分野にておこないます。

(4) 微生物学的品質検査の検査項目は、ICLASモニタリングセンターおよび国立大学動物実験施設協議会で策定した微生物検査メニューを参考に決定してあります。

(5) 当センターで実施している検査項目以外の項目の一部の検査については、当センター

が別途行なっております微生物品質検査をご利用いただくことができます。詳細についてはお問い合わせ下さい。しかし、万が一当センターで実施している検査項目以外の病原微生物が検出された場合でも、微生物学的品質保証の対象とはなりませんのでご了承下さい。

- (6) 供給マウスの微生物学的品質に関する連絡先
 熊本大学生命資源研究・支援センター 病態遺伝分野
 責任者：鳥越大輔
 E-mail:dori@kumamoto-u.ac.jp

(7) 搬出マウスの微生物学的検査項目

—対象微生物・寄生虫と検査方法— (2017年4月1日現在)

検査項目	検査方法
Mouse hepatitis virus	ELISA・IFA
Sendai virus	ELISA・IFA
Citrobacter rodentium	培養；DHL寒天培地（盲腸内容）
Clostridium piliforme	ELISA・IFA
Corynebacterium kutscheri	培養；FNC培地（気管・咽喉頭、盲腸内容）
Helicobacter hepaticus	PCR（盲腸内容）
Mycoplasma spp.	ELISA・IFA・培養；PPL0 broth（気管・咽喉頭）
Salmonella spp.	培養；DHL寒天培地（盲腸内容）
Aspiculuris tetraptera	肉眼による成虫観察（結腸起始部内容）
Syphacia spp.	鏡検；セロハンテープ法による虫卵観察（肛門周囲）
Giardia muris	鏡検；直接塗抹標本（十二指腸内容）
Spironucleus muris	鏡検；直接塗抹標本（十二指腸内容）
Ectoparasite	鏡検；セロハンテープ法による成虫、虫卵の観察（被毛）

ELISA：enzyme-linked immunosorbent assay、IFA：Indirect fluorescent antibody method、
 RT-PCR：Reverse transcriptase polymerase chain reaction

2. ES細胞を用いたキメラマウス

1 概要

依頼者が作製した変異導入ES細胞を、8細胞期胚または胚盤胞内に注入します。ES細胞を注入したマウス胚を仮親マウスの子宮内へ移植してキメラマウスを誕生させます。生まれたマウスは離乳（生後約4週齢）までCARDで飼育します。離乳後、すべてのマウスを依頼者に送付します。スクリーニングは、依頼者が行ってください。

2 作製の手順

- (1) 「遺伝子改変マウス作製及び供給申請書（別記様式1）」、および「遺伝子組換え生物等第二種使用等計画書」を送付下さい。
- (2) (1)と同時に、変異導入ES細胞も送付してください。変異導入ES細胞を受け取った時点で、順番待ちリストに記載します。
- (3) 学長又は文部大臣から「遺伝子組換え生物等第二種使用等計画」等の承認があった後、本学歳入徴収官から納入告知書が送付されますので、これにより作製料金（熊本大学遺伝子改変マウス作製等受託規則に定める料金）を納入してください。
- (4) 料金の納入を確認後、キメラマウスの作製を開始します。
- (5) 作製を完了したらマウスを専門業者に依頼して発送します（インジェクションを開始してから約2ヶ月後、かつCARDによる検疫終了後）。
なお、マウスを発送するための費用（マウスの輸送用箱、輸送運賃等）は、マウス作製料金には含まれていませんので、別途お支払いください。

3 注意事項

- (1) 導入ベクターの構造
「遺伝子改変マウス作製及び供給申請書」（別記様式1）には、簡単なマップとサイズを記入してください。また、遺伝子名は記号のみ標記するのではなく、その内容を分かり易く簡潔に記入してください。
- (2) ES細胞の準備
用いる胚数は約100個ですので、その範囲内で、複数のクローンを用いることが可能です。核型の判定等はこちらで行いませんので、依頼者が行って下さい。
また送付するES細胞は各クローンごとに検疫用検体（培養上清と細胞ペレット：調製法は別途お尋ねください）もご準備ください。
培養に特殊な培地を用いる場合には、培地もお送りして頂くことがあります。事前に培養条件等詳しい情報をお送りください。
- (3) ES細胞の送付
ES細胞を輸送するための輸送用容器（液体窒素を使用）が必要な場合にはご相談ください。なお、輸送用容器は宅配便で送付できます。
- (4) ES細胞のインジェクション
通常、ES細胞を約100個の8細胞期胚または胚盤胞内に注入し、そのマウス胚を仮親マウスの子宮内に移植してキメラマウスを出産させます。
- (5) キメラマウス（またはgermline chimaera）が得られない場合の対処について
ES細胞を用いたキメラマウスの作製は、ES細胞の善し悪し（培養状態等）によりキメラマウス（またはgermline chimaera）がまったく得られないケースがあります。これまでの経験より、それはキメラマウス作製技術の不備によるものではなくES細胞自体に問題があり、キメラマウスが得られないものと考えられます。したがって、ES細胞自体に問題がある場合は、責任を負いかねますのでご了承をお願いいたします。なお、同じES細胞でもう一度行うことは勧められませんし、新たなES細胞で行うときには、新たな依頼として費用を請求いたします。
- (6) 事前相談
事前にターゲティングベクターの構造等の研究内容に関する相談があった場合、

共同開発として特許権を主張することがあります。

4. 参考書

Gene Targeting, A Practical Approach

A. L. Joyner

OXFORD UNIVERSITY PRESS, 1993

Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. 2nd Edition

B. Hogan, R. Beddington, F. Costantini, E. Lacy

Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994

実験医学別冊 バイオマニュアルシリーズ8 ジーンターゲティング

相沢慎一

羊土社, 1995

5. 申込みおよび問い合わせ先

〒860-0811 熊本市本荘2-2-1

熊本大学 生命資源研究・支援センター 疾患モデル分野

竹田 直樹

TEL/FAX : 096-373-6559

E-mail : ntakeda@gpo.kumamoto-u.ac.jp

6. 供給マウスの微生物学的品質

当センターから供給されるマウスは、以下の微生物学的品質検査をおこなっておりますので、御熟読・御理解の上、手続きをおこなって下さい。なお、マウスの微生物学的品質については、貴機関のマウス受け入れ担当者と事前に協議をおこなって下さい。

- (1) 改変マウス作製あるいは、マウス胚バンクからのマウスの供給にはすべてSPFマウス（仮親マウスを含む）を使用します。仮親に胚を移植した後は、産仔の出荷までビニールアイソレーターで隔離飼育をおこないます。
- (2) マウスの微生物学的品質検査は、仮親を用いて行います。胚の移植・出産・哺育後、仔マウスの離乳時に仮親マウスを検査して、SPFと確認された場合にマウスを発送します（搬出マウスの微生物学的検査参照）。なお、検査結果は発送前に御連絡いたします。
- (3) 仮親の微生物学的品質検査は、当センター病態遺伝分野にておこないます。
- (4) 微生物学的品質検査の検査項目は、ICLASモニタリングセンターおよび国立大学動物実験施設協議会で策定した微生物検査メニューを参考に決定してあります。
- (5) 当センターで実施している検査項目以外の項目の一部の検査については、当センターが別途行っております微生物品質検査をご利用いただくことができます。詳細についてはお問い合わせ下さい。しかし、万一当センターで実施している検査項目以外の病原微生物が検出された場合でも、微生物学的品質保証の対象とはなりませんのでご了承下さい。

(6) 供給マウスの微生物学的品質に関する連絡先

熊本大学生命資源研究・支援センター 病態遺伝分野

責任者：鳥越大輔

E-mail: dori@kumamoto-u.ac.jp

(7) 搬出マウスの微生物学的検査項目

—対象微生物・寄生虫と検査方法— (2017年4月1日現在)

検査項目	検査方法
Mouse hepatitis virus	ELISA・IFA
Sendai virus	ELISA・IFA
Citrobacter rodentium	培養；DHL寒天培地（盲腸内容）
Clostridium piliforme	ELISA・IFA

Corynebacterium kutscheri	培養 ; FNC培地 (気管・咽喉頭、盲腸内容)
Helicobacter hepaticus	PCR (盲腸内容)
Mycoplasma spp.	ELISA・IFA・培養 ; PPL0 broth (気管・咽喉頭)
Salmonella spp.	培養 ; DHL寒天培地 (盲腸内容)
Aspicularis tetraptera	肉眼による成虫観察 (結腸起始部内容)
Syphacia spp.	鏡検 ; セロハンテープ法による虫卵観察 (肛門周囲)
Giardia muris	鏡検 ; 直接塗抹標本 (十二指腸内容)
Spironucleus muris	鏡検 ; 直接塗抹標本 (十二指腸内容)
<u>Ectoparasite</u>	<u>鏡検 ; セロハンテープ法による成虫、虫卵の観察 (被毛)</u>

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay、IFA : Indirect fluorescent antibody method、
RT-PCR : Reverse transcriptase polymerase chain reaction