

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2012-105687

(P2012-105687A)

(43) 公開日 平成24年6月7日(2012.6.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/873 (2010.01)	C 1 2 N 15/00	4 B O 2 4
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027	

審査請求 有 請求項の数 31 O L 外国語出願 (全 33 頁)

(21) 出願番号	特願2012-55055 (P2012-55055)	(71) 出願人	398066918
(22) 出願日	平成24年3月12日 (2012. 3. 12)		ザ ジャクソン ラボラトリー
(62) 分割の表示	特願2006-523923 (P2006-523923) の分割		アメリカ合衆国 メイン州 バー ハーバ ー メイン ストリート 600
原出願日	平成16年8月11日 (2004. 8. 11)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	60/497, 451		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成15年8月22日 (2003. 8. 22)	(74) 代理人	100062409
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		(72) 発明者	マイケル ブイ. ウィルス
			アメリカ合衆国 メイン, サマービル, マウンテン デザート, ビーチ ヒル 9

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 近交系動物の遺伝的安定性を維持するための方法

(57) 【要約】

【課題】非ヒト動物近交系の遺伝的安定性を維持する新規の方法を提供すること。

【解決手段】この方法では、創始コロニーに由来する血統トラックされる低温保存された胚が作られ、そして適切な間隔で創始コロニーを再構築するために使用される。非ヒト動物の近交系の遺伝的安定性を維持する方法であって、この方法は、以下：(a) 該近交系の創始コロニーを維持する工程；(b) 該創始コロニーに由来する低温保存された胚の血統トラックストックを作る工程；(c) 該血統トラックストックの低温保存された胚から、生きた動物を作る工程；(d) 該生きた動物から、新規の創始動物対として使用される兄妹対を選択し、該創始コロニーを再構築する工程；(e) 工程(c)～工程(d)を、適切な間隔で反復し、これにより、該近交系の遺伝的安定性を維持する工程を包含する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

齧歯類動物の近交系の遺伝的安定性を維持する方法であって、該方法は、以下：

(a) 齧歯類動物の近交系の創始コロニーを構築する工程であって、ここで、該創始コロニーは、その後の全ての齧歯類動物系統が由来する、同腹仔のオス - メス対、親 - 子孫対、または、同腹仔のオス - メス対および親 - 子孫対のみを含む、工程；

(b) 低温保存された齧歯類動物の胚の血統トラックストックを維持する工程であって、ここで、該低温保存された齧歯類動物の胚は、工程 (a) において構築された該創始コロニーからの同腹仔のオス - メス対または親 - 子孫対から得られる、工程；

(c) 工程 (b) において得られた該血統トラックストックの低温保存された齧歯類動物の胚から、生きた齧歯類動物を作る工程；

(d) 工程 (c) において得られた該生きた齧歯類動物から、新規の創始動物対として使用される血統の明らかな近交系の交配対を選択して、該創始コロニーを再構築する工程であって、ここで、該近交系の交配対は、その後の全ての系統の齧歯類動物が由来する、同腹仔のオス - メス対または親 - 子孫対である、工程；

(e) 工程 (d) において得られた新規の創始動物対を交配して、子孫を作り、それによって、該創始コロニーを再構築する工程であって、ここで、該創始コロニーは、その後の全ての齧歯類動物系統が由来する、同腹仔のオス - メス対、親 - 子孫対、または、同腹仔のオス - メス対および親 - 子孫対のみを含む、工程；ならびに、

(f) 工程 (c) ~ (e) を、1 世代 ~ 20 世代の間反復することにより、該創始コロニーを再補充し、遺伝型の変化の蓄積を防ぎ、それによって、齧歯類動物の近交系の遺伝的安定性を維持する工程、
を包含する、方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法であって、ここで、前記齧歯類動物が、マウスである、方法。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の方法であって、ここで、創始コロニーに由来する低温保存された齧歯類動物胚の血統トラックストックを維持する工程が、以下：

(a) 該創始コロニーに由来する近交系の交配対から齧歯類動物胚を得る工程；および

(b) 工程 (a) において得られた齧歯類動物の胚を低温保存する工程であって、ここで、該ストック中での各齧歯類動物胚の血統が、低温保存された各齧歯類動物胚が同定可能な血統を有するようにトラックされ、これによって、低温保存された齧歯類動物胚のストックを作る工程
を包含する、方法。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の方法であって、ここで、創始コロニーに由来する低温保存された齧歯類動物胚の血統トラックストックを維持する工程が、以下：

(a) 齧歯類動物系統の創始コロニーから後裔を得る工程であって、ここで、該後裔は、近交系の交配対を含む、工程；

(b) 齧歯類動物胚を近交系の交配対から作る工程；ならびに、

(c) 工程 (b) において作られた齧歯類動物胚を低温保存する工程であって、ここで、該ストックにおける各齧歯類動物胚の血統が、各低温保存された齧歯類動物胚が同定可能な血統を有するようにトラックされ、これにより低温保存された齧歯類動物胚の血統トラックストックを作る工程
を包含する、方法。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の方法であって、ここで、前記近交系の交配対から齧歯類動物胚を作る工程が、以下：

(a) 該血統の明らかな近交系の交配対のメンバーを交配させ、これによって、齧歯類

10

20

30

40

50

動物胚を作る工程；および

(b) 齧歯類動物胚を収集する工程により実行される、方法。

【請求項6】

請求項5に記載の方法であって、ここで、交配が、交尾により実行される、方法。

【請求項7】

請求項5に記載の方法であって、ここで、交配が、人工受精により実行される、方法。

【請求項8】

請求項5に記載の方法であって、ここで、交配が、インピトロの受精により実行され、該インピトロの受精が、以下：

(a) 卵母細胞を前記近交系の交配对のメスから収集する工程；

(b) 精子を前記近交系の交配对のオスから収集する工程；

(c) 工程(a)において収集された卵母細胞を、工程(b)において収集された精子を用いて受精させ、これにより、受精した卵母細胞を作る工程；および

(d) 受精した卵母細胞を、受精した卵母細胞が齧歯類動物胚へと発生するのに適切な条件下で維持する工程、を包含する、方法。

【請求項9】

請求項8に記載の方法であって、前記近交系の交配对のメスから卵母細胞を収集する前に、該近交系の交配对のメスに過排卵させる工程をさらに包含する、方法。

【請求項10】

請求項4に記載の方法であって、ここで、前記低温保存された齧歯類動物胚のストックが、ストロー内に貯蔵された低温保存された齧歯類動物の胚を含み、その結果、各ストローが単一の近交系の交配对を交配することによりもたらされる胚を含み、ここで、該単一の近交系の交配对が、同腹仔のオス-メス対または親-子孫対である、方法。

【請求項11】

請求項8に記載の方法であって、ここで、前記卵母細胞を受精させる工程が、細胞質内精子微量注入により実行される、方法。

【請求項12】

請求項4に記載の方法であって、ここで、齧歯類動物胚を前記近交系の交配对から作る工程が、以下：

(a) 前記近交系の交配对のメスから卵巣を単離する工程；

(b) 該卵巣を、卵母細胞のインピトロ成熟にとって適切な条件下で培養し、これによって、インピトロの成熟した卵母細胞を作る工程；

(c) 前記近交系の交配对のオスから精子を収集する工程；

(d) 工程(b)において作られたインピトロ成熟卵母細胞を、工程(c)において収集された精子で受精させ、これにより、受精した卵母細胞を作る工程；

(e) 受精した卵母細胞を、卵母細胞が齧歯類動物胚へと発生するのに適切な条件下で維持する工程；および

(f) 該齧歯類動物胚を収集する工程を包含する、方法。

【請求項13】

請求項4に記載の方法であって、ここで、前記近交系の交配对から齧歯類動物胚を作る工程が、以下：

(a) 卵巣を該近交系の交配对のメスから収集する工程；

(b) 該卵巣を断片へとさらに分割し、これによって、卵巣断片を作る工程；

(c) 各卵巣断片を、卵巣除去したホストのメス齧歯類動物へと移植し、これによって、受精能のあるホストのメス齧歯類動物を作る工程；

(d) 卵母細胞を該受精能のあるホストのメス齧歯類動物から収集する工程；

(e) 精子を該近交系の交配对のオスから収集する工程；

10

20

30

40

50

(f) 工程 (d) において収集した卵母細胞を、工程 (e) において収集した精子で受精させ、これによって、受精した卵母細胞を作る工程；

(g) 受精した卵母細胞を、卵母細胞が齧歯類動物胚へと発生するのに適切な条件下で維持する工程；および

(h) 該齧歯類動物胚を収集する工程
を包含する、方法。

【請求項 1 4】

齧歯類動物の近交系の遺伝的安定性を維持する方法であって、該方法は、以下：

(a) 齧歯類動物の近交系の創始コロニーを構築する工程であって、ここで、該創始コロニーは、その後の全ての齧歯類動物系統が由来する、同腹仔のオス - メス対、親 - 子孫対、または、同腹仔のオス - メス対および親 - 子孫対のみを含む、工程；

(b) 低温保存された生殖体の血統トラックストックを維持する工程であって、ここで、該低温保存された生殖体は、工程 (a) において構築された該創始コロニーからの同腹仔のオス - メス対または親 - 子孫対から得られる、工程；

(c) 工程 (b) において得られた該血統トラックストックの低温保存された生殖体から、生きた齧歯類動物を作る工程；

(d) 工程 (c) において得られた該生きた齧歯類動物から、新規の創始動物対として使用される血統の明らかな近交系の交配対を選択して、該創始コロニーを再構築する工程であって、ここで、該近交系の交配対は、その後の全ての系統の齧歯類動物が由来する、同腹仔のオス - メス対または親 - 子孫対である、工程；

(e) 工程 (d) において得られた新規の創始動物対を交配して、子孫を作り、それによって、該創始コロニーを再構築する工程であって、ここで、該創始コロニーは、その後の全ての齧歯類動物系統が由来する、同腹仔のオス - メス対、親 - 子孫対、または、同腹仔のオス - メス対および親 - 子孫対のみを含む、工程；ならびに、

(f) 工程 (c) ~ (e) を、1 世代 ~ 2 0 世代の間反復することにより、該創始コロニーを再補充し、遺伝型の変化の蓄積を防ぎ、それによって、齧歯類動物の近交系の遺伝的安定性を維持する工程、
を包含する、方法。

【請求項 1 5】

請求項 1 に記載の方法であって、ここで、前記齧歯類動物が、マウスである、方法。

【請求項 1 6】

齧歯類動物の近交系の遺伝的安定性を維持する方法であって、該方法は、以下：

(a) 齧歯類動物の近交系の創始コロニーを構築する工程であって、ここで、該創始コロニーは、その後の全ての齧歯類動物系統が由来する、同腹仔のオス - メス対、親 - 子孫対、または、同腹仔のオス - メス対および親 - 子孫対のみを含む、工程；

(b) 低温保存された齧歯類動物の生殖体または生殖体前駆体の血統トラックストックを維持する工程であって、ここで、該低温保存された齧歯類動物の生殖体または生殖体前駆体は、工程 (a) において構築された該創始コロニーからの同腹仔のオス - メス対または親 - 子孫対から得られる、工程；

(c) 工程 (b) において得られた低温保存された生殖体前駆体の血統トラックストックを解凍および移植して、血統トラックオス生殖体および / または血統トラックメス生殖体を作る工程；

(d) 工程 (b) および / または工程 (c) で得られた、該血統トラックオス生殖体および該血統トラックメス生殖体を交配して、血統トラック胚を作る工程；

(e) 工程 (d) において得られた血統トラック胚から、生きた齧歯類動物を作る工程
；

(f) 工程 (e) において得られた該生きた齧歯類動物から、新規の創始動物対として使用される血統の明らかな近交系の交配対を選択して、該創始コロニーを再構築する工程であって、ここで、該近交系の交配対は、その後の全ての系統の齧歯類動物が由来する、同腹仔のオス - メス対または親 - 子孫対である、工程；

10

20

30

40

50

(g) 工程 (f) において得られた新規の創始動物対を交配して、子孫を作り、それによって、該創始コロニーを再構築する工程であって、ここで、該創始コロニーは、その後の全ての齧歯類動物系統が由来する、同腹仔のオス - メス対、親 - 子孫対、または、同腹仔のオス - メス対および親 - 子孫対のみを含む、工程；ならびに、

(h) 工程 (c) ~ (g) を、1 世代 ~ 20 世代の間反復することにより、該創始コロニーを再補充し、遺伝型の変化の蓄積を防ぎ、それによって、齧歯類動物の近交系の遺伝的安定性を維持する工程、
を包含する、方法。

【請求項 17】

請求項 16 に記載の方法であって、ここで、生きた動物が、単一の同腹仔のオス - メス対から得られた生殖体または生殖体前駆体から作られる、方法。

10

【請求項 18】

請求項 16 に記載の方法であって、ここで、前記齧歯類動物が、マウスである、方法。

【請求項 19】

請求項 16 に記載の方法であって、ここで、創始コロニーに由来する低温保存された齧歯類動物の生殖体または生殖体前駆体の血統トラックストックを維持する工程が、以下：

(a) 齧歯類動物系統の創始ストックから後裔を得る工程であって、ここで、該後裔は、適切な数の同腹仔のオス - メス対を含む、工程；

(b) 生殖体または生殖体前駆体を同腹仔のオス - メス対から作る工程；ならびに、

(c) (b) において作られた生殖体または生殖体前駆体を低温保存する工程であって、これにより低温保存された生殖体または生殖体前駆体のストックを作る工程
を包含し、

20

ここで、該ストック中の各生殖体または生殖体前駆体の血統は、トラックされ、その結果、各低温保存された生殖体または生殖体前駆体は、同定可能な血統を有し、これによって、低温保存された齧歯類動物の生殖体または生殖体前駆体のストックを作る、方法。

【請求項 20】

請求項 19 に記載の方法であって、ここで、前記齧歯類動物が、マウスである、方法。

【請求項 21】

近交系マウスの遺伝的安定性を維持する方法であって、該方法は、以下：

(a) 近交系マウスの創始コロニーを構築する工程であって、ここで、該創始コロニーは、その後の全てのマウス系統が由来する、同腹仔のオス - メス対、親 - 子孫対、または、同腹仔のオス - メス対および親 - 子孫対のみを含む、工程；

30

(b) 低温保存されたマウス胚性幹細胞の血統トラックストックを維持する工程であって、ここで、該低温保存されたマウス胚性幹細胞は、工程 (a) において構築された該創始コロニーからの同腹仔のオス - メス対または親 - 子孫対から得られる、工程；

(c) 工程 (b) において得られた、血統トラックされた低温保存されたマウス胚性幹細胞を解凍して、該マウス胚性幹細胞をホストの胚に導入して、血統トラックオス生殖体および血統トラックメス生殖体を作る工程；

(d) 工程 (c) で得られた、該血統トラックオス生殖体および該血統トラックメス生殖体を交配して、血統トラック胚を作る工程；

40

(e) 工程 (d) において得られた血統トラック胚から、生きたマウスを作る工程；

(f) 該生きたマウスをスクリーニングして、胚性幹細胞に完全に由来するマウスを同定する工程；

(g) 工程 (f) において同定された該生きたマウスから、新規の創始動物対として使用される血統の明らかな近交系の交配対を選択して、該創始コロニーを再構築する工程であって、ここで、該近交系の交配対は、その後の全ての系統のマウスが由来する、同腹仔のオス - メス対または親 - 子孫対である、工程；

(h) 工程 (g) において得られた新規の創始動物対を交配して、子孫を作り、それによって、該創始コロニーを再構築する工程であって、ここで、該創始コロニーは、その後の全ての系統のマウスが由来する、同腹仔のオス - メス対、親 - 子孫対、または、同腹仔

50

のオス - メス対および親 - 子孫対のみを含む、工程；ならびに、

(i) 工程 (c) ~ (h) を、1 世代 ~ 2 0 世代の間反復することにより、該創始コロニーを再補充し、遺伝型の変化の蓄積を防ぎ、それによって、近交系の遺伝的安定性を維持する工程、

を包含する、方法。

【請求項 2 2】

請求項 2 1 に記載の方法であって、ここで、生きた動物が、単一の同腹仔のオス - メス対から得られた胚性幹細胞から作られる、方法。

【請求項 2 3】

請求項 2 1 に記載の方法であって、ここで、創始コロニーに由来する低温保存されたマウス胚性幹細胞の血統トラックストックを維持する工程が、以下：

(a) マウス系統の創始ストックから後裔を得る工程であって、ここで、該後裔は、適切な数の同腹仔のオス - メス対を含む、工程；

(b) 胚性幹細胞を近交系の交配对から作る工程；ならびに、

(c) (b) において作られた胚性幹細胞を低温保存する工程であって、これにより低温保存された胚性幹細胞ストックを作る工程

を包含し、

ここで、該ストック中の各胚性幹細胞の血統は、トラックされ、その結果、各胚性幹細胞は、同定可能な血統を有し、これによって、低温保存されたマウス胚性幹細胞のストックを作る、方法。

【請求項 2 4】

請求項 1 6 に記載の方法であって、ここで、前記低温保存された齧歯類動物の生殖体が 1 つ以上のオス齧歯類動物から得られ、そして、低温保存された齧歯類動物の生殖体前駆体が、1 つ以上の同腹仔のオス - メス対または親 - 子孫対の 1 つ以上のメス齧歯類動物から得られる、方法。

【請求項 2 5】

請求項 1 6 に記載の方法であって、ここで、前記低温保存された齧歯類動物の生殖体前駆体が 1 つ以上のオス齧歯類動物から得られ、そして、低温保存された齧歯類動物の生殖体が、1 つ以上の同腹仔のオス - メス対または親 - 子孫対の 1 つ以上のメス齧歯類動物から得られる、方法。

【請求項 2 6】

請求項 2 4 に記載の方法であって、ここで、前記得られた低温保存された生殖体が精子であり、前記得られた低温保存された生殖体前駆体が卵巣である、方法。

【請求項 2 7】

請求項 2 4 に記載の方法であって、ここで、前記得られた低温保存された生殖体が精子であり、前記得られた低温保存された生殖体前駆体が、一次卵母細胞、二次卵母細胞、または、メス始原生殖細胞である、方法。

【請求項 2 8】

請求項 1 6 に記載の方法であって、ここで、前記低温保存された齧歯類動物の生殖体前駆体が、1 つ以上の同腹仔のオス - メス対または親 - 子孫対から得られる、方法。

【請求項 2 9】

請求項 1 6 に記載の方法であって、ここで、前記得られた低温保存された生殖体前駆体が、精原幹細胞および卵巣である、方法。

【請求項 3 0】

請求項 2 9 に記載の方法であって、ここで、オスの生きたマウスおよびメスの生きたマウスが、工程 (b) において得られた血統トラックストックの単一のオスの低温保存された胚性幹細胞株から作られる、方法。

【請求項 3 1】

請求項 3 0 に記載の方法であって、ここで、メスの生きたマウスが、単一のオスの血統トラックストックされた胚性幹細胞株において同定された X O 細胞から作られる、方法。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願に対する相互参照)

本願は、2003年8月22日に出願された米国仮出願番号60/497,451の利益を主張する；本願の明細書は、米国仮出願番号60/497,451の全体が参考として本明細書に援用される。

【0002】

(政府基金)

本明細書中に記載された仕事は、全体的または部分的に、国立癌研究所、NIHからの助成金番号R01-GM020919により資金提供を受けている。米国政府は、本発明に特定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

(発明の背景)

実験動物は、ヒトの疾患を研究するための有用なモデルとして役立つ。トランスジェニック変異技術および標的化変異技術の進歩のおかげで、マウスが、ヒトゲノム分析のための代理の器官として成功しただけではなく、ヒトの疾患の遺伝学および病原を調査するためのモデル系として最も価値のあるモデル系となった。マウスの研究から得られた実験結果の有効な解釈は、使用されたマウスモデルが遺伝的に純粋であり、十分に明確にされているという保証に依存する。この理由で、研究者は、伝統的に実験に近交系を使用してきた。なぜなら、これらのマウスは、非近交系マウスストックとは対照的に、遺伝子型の均一性および不変性を提供するからである。近交系のマウスは、表現型が予測可能でかつ対立遺伝子組成が定義されている均質の実験個体として反復して利用され得る。

【0004】

しかし、近交系マウスの遺伝子型の不変性は、完全に理解されることは決してない。その理由は、新規の変異が生じること、および新規の変異が残留ヘテロ接合の連続的な対立遺伝子固定とともに徐々に蓄積することの両方である。近交系マウス内の遺伝子型のこれらの変化は、遺伝的浮動として公知である。各世代において、新規の偶発性突然変異が生じる可能性がある。これらの変異は、まず、ヘテロ接合の変異として生じる。一つの近交系の両方の創始動物(founder)が、偶然、偶発突然変異に関してホモ接合性になる場合、この変異は、近交系に固定され、この近交系マウス系統の後の世代は全てこの変異を保持する。

【0005】

偶発突然変異が生じた結果としての遺伝的浮動は、近交系に由来する動物に対して行われる遺伝的解析に影響を与える。近交系動物を用いて作られた実験データの有効な解釈は、遺伝的浮動により損なわれる。最近の刊行物は、この点を例証している。2001年には、SpechtおよびSchoepferは、C57BL/6JOLAHSdマウスにおける染色体の欠失を発見した(非特許文献1を参照のこと)。この変異は、-シヌクレイン(synuclein)遺伝子座の79kbより多くの除去であった。この遺伝子は、パーキンソン病およびアルツハイマー病の病因に關与するシナプス前終脳タンパク質をコードする。多くの研究者が、実験のためまたは他の変異で戻し交配するために、この問題に気付かずにC57BL/6JOLAHSdマウスを野生型コントロールとして使用している。現在、これらの実験結果は、上記系統に存在する-シヌクレイン欠失に鑑み、再評価する必要がある。非特許文献2を参照のこと。

さらに、研究者は、近交系動物から得られたデータを、長期間ずっと、頻繁に比較する必要がある。遺伝的浮動の効果のために、時間と共に、近交系マウスは、初期時点の、「同一の」近交系マウスとは遺伝的に別個の物になる。時間の期間が長いほど、遺伝的差異が蓄積して固定される可能性が高くなる。従って、遺伝的浮動の存在は、長期間の、有効な比較を実行する能力を損なう。

10

20

30

40

50

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】SpechtおよびSchöpfer, Deletion of the alpha-synuclein locus in a subpopulation of C57BL/6J inbred mice, BMC Neurosci. 2, 11 (2001)

【非特許文献2】Wotjak, C57Black/Box? The importance of exact mouse strain nomenclature, Trends in Genetics 19:183~184 (2003)

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

これらの理由で、近交系動物における遺伝的浮動を減少させ、そしてその遺伝的安定性を、長期間ずっと維持することが望ましい。近交系動物の遺伝的安定性を維持する方法について、技術的に差し迫った必要性がある。このような方法が、本明細書中に提供される。

【課題を解決するための手段】

【0008】

(発明の要旨)

20

本発明は、非ヒト動物の近交系マウスストックの遺伝的安定性を維持する新規の方法を提供する。現在、血統創始コロニーが、近交系マウス系統について維持されている。近交系マウスストックの創始コロニーは、単一の同腹仔のオス-メス交配に由来する。1年に2回~4回、新規の創始動物対として新規の同腹仔のオス-メス対が、創始コロニーから選択され、コロニーを再度回復する。このアプローチを用いれば、今日の創始コロニーは、今から何年間も創始コロニーとは遺伝的に異なる。なぜなら、時とともに、偶発突然変異が蓄積し、そして対立遺伝子が固定されるからである。

【0009】

本出願人は、創始コロニーに由来する低温保存された胚の血統トラックストック (pedigree-tracked stock) を作り、そしてこのストックを用いて適切な間隔で創始コロニーを再構築することにより、遺伝的浮動を制限し、近交系マウスの遺伝的安定性を維持する新規の方法を考案した。低温保存したストックを上記創始コロニーのための貯蔵所として所持し、そして定期的に、この低温保存されたストックを用いてこの創始コロニーを再構築することで、一定の期間に継代する世代数が減少し、従って、遺伝的浮動の有効速度が有効に減少する。このストックの各胚の血統が公知であるので、同腹仔のオス-メス対である胚だけを選択的に回復し得る。結果として、この近交系マウス系統は、連続した同腹仔のオス-メス交配を通して増殖し、このマウス系統の近交系ステータスを無傷に保つ。このプロセスは、適切な間隔で反復され得、従って、この系統の近交系ステータスに影響を与えずに、制限された遺伝的浮動を有する近交系マウス系統を維持し得る。

30

40

【0010】

低温保存された胚の血統トラックストックが、創始コロニーに由来する同腹仔のオス-メス対からの胚を取得し、そして低温保存することにより作られる。胚は、同腹仔のオス-メス対の交配により取得され得る。胚の産生は、交尾(交配)によるもの、またはインピトコの人工的な方法もしくはインピボの人工的な方法によるものであり得る。人工的な方法としては、人工受精、インピトコでの成熟した卵母細胞もしくはインピボでの成熟した卵母細胞のインピトコでの受精、胎芽移植、細胞質内精子注入、クローニング、受精した卵母細胞のインピトコ培養、および胚の分割 (embryo splitting) 等が挙げられる。

【0011】

50

低温保存した血統トラックストックはまた、胚幹細胞のストック、生殖体のストック、または生殖体前駆体のストックであり得る。生殖体、生殖体前駆体、または胚幹細胞は、近交系マウス系統の創始コロニーに由来し得る。このような低温保存されたストックは、創始コロニーのための凍結容器として使用され、近交系の遺伝的安定性を維持し得る。本発明は、低温保存された血統トラックストックを作る方法、およびこのストックを用いて、近交系の遺伝的安定性を維持する方法を提供する。

【0012】

本発明はまた、非ヒト動物の低温保存された胚、生殖体、生殖体前駆体、または胚幹細胞の血統トラックストックを提供する。これらのストックの各々は、近交系の創始コロニーに由来する。各系統についてのそれぞれの胚、生殖体、生殖体前駆体、または胚幹細胞の血統が、将来の時点で選択的な回復を許容するためにトラックされ、そして記録される。

10

【0013】

出願人は、本明細書中に記載された方法により作製された、遺伝的に安定化した非ヒト動物近交系マウス系統をさらに提供する。非ヒト動物は、齧歯類動物（例えば、ラットまたはマウス）であり得る。

【0014】

出願人は、遺伝的に安定化した非ヒト動物近交系を供給するビジネスを行うための方法をさらに提供する。本発明に従って、創始コロニーが近交系について維持され、そして上記創始コロニーに由来する胚の低温保存された血統トラックストックが作られる。適切な間隔にて、単一の同腹仔のオス - メス対に由来する同腹仔のオス - メス胚の対が選択され、そして生きた動物がこの同胞胚から作られる。同腹仔のオス - メス対は、作られた動物から選択され、そして新規の創始動物対として使用され、この創始ストックを再構築する。顧客の要求に応じて、遺伝的に安定化した近交系マウス系統の一つまたは複数の動物が、顧客に供給される。

20

これらの方法の実行により、近交系の近交系ステータスに影響することなく、遺伝的浮動が制限された近交系を維持することを可能になる。結果として、長期間ずっと、遺伝子型が十分に規定された、遺伝的に本当に均一の近交系動物が、有効なデータの解釈および有意義なデータの比較を大幅に補助し、動物研究者に利用可能である。

例えば、本発明は以下の項目を提供する。

30

(項目1)

非ヒト動物の近交系の遺伝的安定性を維持する方法であって、該方法は、以下：

(a) 該近交系の創始コロニーを維持する工程；

(b) 該創始コロニーに由来する低温保存された胚の血統トラックストックを作る工程；

(c) 該血統トラックストックの低温保存された胚から、生きた動物を作る工程；

(d) 該生きた動物から、新規の創始動物対として使用される同腹仔のオス - メス対を選択し、該創始コロニーを再構築する工程；

(e) 工程(c) ~ 工程(d)を、適切な間隔で反復し、これにより、該近交系の遺伝的安定性を維持する工程を包含する、方法。

40

(項目2)

項目1の方法であって、ここで、生きた動物が、前記血統トラックストックの同胞胚から作られる、方法。

(項目3)

項目2に記載の方法であって、ここで、前記非ヒト動物が、齧歯類動物である、方法。

(項目4)

項目3に記載の方法であって、ここで、前記齧歯類動物が、マウスである、方法。

(項目5)

50

項目 4 に記載の方法であって、ここで、創始コロニーに由来する低温保存された非ヒト動物胚の血統トラックストックを作る工程が、以下：

(a) 該創始コロニーの同腹仔のオス - メス対から胚を作る工程；および

(b) (a) において作られた胚を低温保存する工程であって、ここで、該ストックにおける各胚の血統が、低温保存された各胚が同定可能な血統を有するようにトラックされ、これによって、低温保存された胚のストックを作る工程を包含する、方法。

(項目 6)

項目 4 に記載の方法であって、ここで、前記創始コロニーに由来する低温保存された非ヒト動物胚の血統トラックストックを作る工程が、以下：

(a) 非ヒト動物系統の創始コロニーから後裔を得る工程であって、ここで、該後裔は、適切な数の同腹仔のオス - メス対を含む、工程；

(b) 胚を同腹仔のオス - メス対から作る工程；

(c) (b) において作られた胚を低温保存する工程であって、ここで、該ストックにおける各胚の血統が、各低温保存された胚が同定可能な血統を有するようにトラックされ、これにより低温保存された胚のストックを作る工程を包含する、方法。

(項目 7)

項目 6 に記載の方法であって、ここで、前記同腹仔のオス - メス対から胚を作る工程が、以下：

(a) 該同腹仔のメスと該同腹仔のオスとを交配させ、これによって、胚を作る工程；および

(b) 胚を収集する工程により実行される、方法。

(項目 8)

項目 7 に記載の方法であって、ここで、交配が、交尾により実行される、方法。

(項目 9)

項目 7 に記載の方法であって、ここで、交配が、人工受精により実行される、方法。

(項目 10)

項目 7 に記載の方法であって、ここで、交配が、インピトロの受精により実行され、該インピトロの受精が、以下：

(a) 卵母細胞を前記同腹仔のメスから収集する工程；

(b) 精子を前記同腹仔のオスから収集する工程；

(c) (a) において収集された卵母細胞を、(b) において収集された精子を用いて受精させ、これにより、受精した卵母細胞を作る工程；および

(d) 受精した卵母細胞を、受精した卵母細胞が胚へと発生するのに適切な条件下で維持する工程、を包含する、方法。

(項目 11)

項目 10 に記載の方法であって、前記同腹仔のメスから卵母細胞を収集する前に、該同腹仔のメスに過排卵させる工程をさらに包含する、方法。

(項目 12)

項目 7 に記載の方法であって、ここで、前記低温保存された胚が、各ストローが単一の同腹仔のオス - メス対を交配することによりもたらされる胚を含むように、ストロー中に貯蔵される、方法。

(項目 13)

項目 10 に記載の方法であって、ここで、前記卵母細胞を受精させる工程が、細胞質内精子微量注入により実行される、方法。

(項目 14)

項目 6 に記載の方法であって、ここで、胚を前記同腹仔のオス - メス対から作る工程

10

20

30

40

50

が、以下：

- (a) 前記同腹仔のメスから卵巣を単離する工程；
- (b) 該卵巣を、卵母細胞のインビトロ成熟にとって適切な条件下で培養し、これによって、インビトロの成熟した卵母細胞を作る工程；
- (c) 前記同腹仔のオスから精子を収集する工程；
- (d) (b) において作られたインビトロ成熟卵母細胞を、(c) において収集された精子で受精させ、これにより、受精した卵母細胞を作る工程；
- (e) 受精した卵母細胞を、卵母細胞が胚へと発生するのに適切な条件下で維持する工程；および
- (f) 該胚を収集する工程

を包含する、方法。

(項目 1 5)

項目 6 に記載の方法であって、ここで、前記同腹仔のオス - メス対から胚を作る工程が、以下：

- (a) 卵巣を該同腹仔のメスから収集する工程；
- (b) 該卵巣を断片へとさらに分割し、これによって、卵巣断片を作る工程；
- (c) 各卵巣断片を、卵巣除去したホストのメスへと移植し、これによって、受精能のあるホストのメスを作る工程；
- (d) 卵母細胞を該受精能のあるホストのメスから収集する工程；
- (e) 精子を該オスから収集する工程；
- (f) (d) において収集した卵母細胞を、(e) において収集した精子で受精させ、これによって、受精した卵母細胞を作る工程；
- (g) 卵母細胞を、卵母細胞が胚へと発生するのに適切な条件下で維持する工程；および

(h) 該胚を収集する工程

を包含する、方法。

(項目 1 6)

創始コロニーに由来する、非ヒト動物の低温保存された胚の血統トラックストックを作る方法であって、以下：

- (a) 該創始コロニーの同腹仔のオス - メス対から胚を作る工程；および
 - (b) (a) において作られた胚を低温保存する工程であって、ここで、該ストックにおける各胚の該血統が、低温保存された各胚が同定可能な血統を有するようにトラックされ、これによって低温保存された胚のストックを作る工程；
- を包含する、方法。

(項目 1 7)

創始コロニーに由来する、非ヒト動物の低温保存された胚の血統トラックストックを作る方法であって、該方法は、以下：

- (a) 非ヒト動物系統の創始コロニーから後裔を獲得する工程であって、ここで、該後裔は、適切な数の同腹仔のオス - メス対を含む、工程；
- (b) 胚を同腹仔のオス - メス対から作る工程；
- (c) (b) において作られた胚を低温保存する工程であって、ここで、該ストックの各胚の血統が、低温保存された各胚が同定可能な血統を有するようにトラックされ、これにより、低温保存された胚のストックを作る工程

を包含する、方法。

(項目 1 8)

非ヒト動物近交系の遺伝的安定性を維持する方法であって、該方法は、以下：

- (a) 生きた動物を、創始コロニーに由来する血統トラックストックの低温保存された胚から作る工程；
- (b) 新規の創始動物対として使用される同腹仔のオス - メス対を、(a) で作られた、該生きた動物から選択し、該創始コロニーを再構築する工程；

10

20

30

40

50

(c) 工程 (a) ~ 工程 (b) を適切な間隔で反復し、これによって、該近交系の遺伝的安定性を維持する工程、
を包含する、方法。

(項目 19)

項目 18 に記載の方法であって、ここで、生きた動物が、前記血統トラックストックの同胞胚から作られる、方法。

(項目 20)

項目 19 に記載の方法であって、ここで、前記非ヒト動物が、齧歯類動物である、方法。

(項目 21)

項目 20 に記載の方法であって、ここで、前記齧歯類動物が、マウスである、方法。

(項目 22)

非ヒト動物の低温保存された胚の血統トラックストック。

(項目 23)

項目 22 に記載のストックであって、ここで、前記非ヒト動物が、齧歯類動物である、ストック。

(項目 24)

項目 23 に記載のストックであって、ここで、前記齧歯類動物が、マウスである、ストック。

(項目 25)

遺伝的浮動が制限された非ヒト動物近交系を供給するための方法であって、ここで、該方法は、以下；

(a) 該近交系に関する創始コロニーを維持する工程；

(b) 該創始コロニーに由来する低温保存された胚の血統トラックストックを作る工程

；

(c) 生きた動物を、該血統トラックストックの低温保存された胚より作る工程；

(d) 新規の創始動物対として使用される同腹仔のオス - メス対を、(c) で作られた該生きた動物から選択し、該創始コロニーを再構築する工程；

(e) 工程 (c) ~ 工程 (d) を適切な間隔で反復し、これによって、遺伝的浮動が制限された非ヒト動物近交系マウス系統を維持する工程；

(f) 非ヒト動物を、顧客の注文に回答して顧客に提供する工程
を包含する、方法。

(項目 26)

項目 25 に記載の方法であって、ここで、生きた動物が、前記血統トラックストックの同胞胚から作られる、方法。

(項目 27)

項目 26 に記載の方法であって、ここで、前記非ヒト動物が、齧歯類動物である、方法。

(項目 28)

項目 27 に記載の方法であって、ここで、前記齧歯類動物が、マウスである、方法。

(項目 29)

非ヒト動物近交系の遺伝的安定性を維持する方法であって、該方法は、以下；

(a) 該近交系の創始コロニーを維持する工程；

(b) 該創始コロニーに由来する低温保存された生殖体または生殖体前駆体の血統トラックストックを作る工程；

(c) 生きた動物を、該血統トラックストックの低温保存された生殖体または生殖体前駆体から作る工程；

(d) 新規の創始動物対として使用される同腹仔のオス - メス対を、該生きた動物から選択し、該創始動物コロニーを再構築する工程；

(e) 工程 (c) ~ 工程 (d) を、適切な間隔で反復し、これにより、該近交系の遺伝

10

20

30

40

50

的安定性を維持する工程
を包含する、方法。

(項目30)

項目29に記載の方法であって、ここで、生殖体または生殖体前駆体から作られた生きた動物が、単一の同腹仔のオス-メス対から得られる、方法。

(項目31)

項目30に記載の方法であって、ここで、前記非ヒト動物が、齧歯類動物である、方法。

(項目32)

項目31に記載の方法であって、ここで、前記齧歯類動物が、マウスである、方法。

(項目33)

創始コロニーに由来する非ヒト動物の生殖体または生殖体前駆体の血統トラックストックを作る方法であって、該方法は、以下：

(a) 非ヒト動物系統の創始ストックから後裔を取得する工程であって、ここで、該後裔は、適切な数の同腹仔のオス-メス対を含む、工程；

(b) 生殖体または生殖体前駆体を、同腹仔のオス-メス対から作る工程；

(c) (b)において作られた生殖体または生殖体前駆体を、低温保存し、これによって、低温保存された生殖体または生殖体前駆体のストックを作る工程；

を包含し、ここで、該ストックの各生殖体または生殖体前駆体の該血統が、低温保存された生殖体または生殖体前駆体の各々が同定可能な血統を有するようにトラックされる、方法。

(項目34)

項目33に記載の方法であって、ここで、前記非ヒト動物が、齧歯類動物である、方法。

(項目35)

項目34に記載の方法であって、ここで、前記齧歯類動物が、マウスである、方法。

(項目36)

非ヒト動物近交系の遺伝的安定性を維持するための方法であって、該方法は、以下：

(a) 生きた動物を、前記血統トラックストックの低温保存された生殖体または生殖体前駆体から作る工程；

(b) 新規の創始動物として使用される同腹仔のオス-メス対を、(a)において作られた該生きた動物から選択し、創始動物コロニーを再構築する工程；

(c) 工程(a)~工程(b)を適切な間隔で反復し、これによって該近交系の遺伝的安定性を維持する工程、

を包含する、方法。

(項目37)

項目36に記載の方法であって、ここで、生きた動物が、単一の同腹仔のオス-メス対から得られた生殖体または生殖体前駆体から作られる、方法。

(項目38)

項目37に記載の方法であって、ここで、前記非ヒト動物が、齧歯類動物である、方法。

(項目39)

項目38に記載の方法であって、ここで、前記齧歯類動物が、マウスである、方法。

(項目40)

低温保存された非ヒト動物生殖体または生殖体前駆体の血統トラックストック。

(項目41)

項目40に記載のストックであって、ここで、前記非ヒト動物が、齧歯類動物である、ストック。

(項目42)

項目41に記載のストックであって、ここで、前記齧歯類動物が、マウスである、ス

10

20

30

40

50

トック。

(項目43)

非ヒト動物近交系の遺伝的安定性を維持する方法であって、該方法は、以下：

(a) 該近交系の創始コロニーを維持する工程；

(b) 該創始コロニーに由来する低温保存された胚幹細胞の血統トラックストックを作る工程；

(c) 該血統トラックストックに由来する低温保存された胚幹細胞から生きた動物を作る工程；

(d) 該生きた動物から、新規の創始動物対として使用される同腹仔のオス - メス対を選択する工程；

(e) 工程(c) ~ 工程(d)を、適切な間隔で反復し、これにより、該近交系の遺伝的安定性を維持する工程

を包含する、方法。

(項目44)

項目43に記載の方法であって、ここで、生きた動物が、単一の同腹仔のオス - メス対から得られる胚幹細胞より作られる、方法。

(項目45)

項目44に記載の方法であって、ここで、前記非ヒト動物が、齧歯類動物である、方法。

(項目46)

項目45に記載の方法であって、ここで、前記齧歯類動物が、マウスである、方法。

(項目47)

創始コロニーに由来する非ヒト動物の胚幹細胞の血統トラックストックを作る方法であって、該方法は、以下：

(a) 非ヒト動物系統の創始ストックから後裔を取得する工程であって、ここで、該後裔は、適切な数の同腹仔のオス - メス対を含む、工程；

(b) 胚幹細胞を、同腹仔のオス - メス対から作る工程；

(c) (b)において作られた胚幹細胞を、低温保存し、これによって、低温保存された胚幹細胞のストックを作る工程；

を包含し、ここで、該ストックの各胚幹細胞の該血統が、低温保存された各胚幹細胞が同定可能な血統を有するようにトラックされる、方法。

(項目48)

項目47に記載の方法であって、ここで、前記非ヒト動物が、齧歯類動物である、方法。

(項目49)

項目48に記載の方法であって、ここで、前記齧歯類動物が、マウスである、方法。

(項目50)

非ヒト動物近交系の遺伝的安定性を維持する方法であって、ここで、該方法は、以下：

(a) 生きた動物を、前記血統トラックストックの低温保存された胚幹細胞から作る工程

(b) 新規の創始動物対として使用される同腹仔のオス - メス対を、(a)において作られた該生きた動物から選択する工程；

(c) 工程(a) ~ 工程(b)を、適切な間隔で反復し、これにより、該近交系の遺伝的安定性を維持する工程、

を包含する、方法。

(項目51)

項目50に記載の方法であって、ここで、生きた動物は、単一の同腹仔のオス - メス対から得られる胚幹細胞から作られる、方法。

(項目52)

項目51に記載の方法であって、ここで、前記非ヒト動物が、齧歯類動物である、方

10

20

30

40

50

法。

(項目 5 3)

項目 5 2 に記載の方法であって、ここで、前記齧歯類動物が、マウスである、方法。

【 図面の簡単な説明】

【 0 0 1 5】

【 図 1】 図 1 は、創始コロニーに由来する十分な数の血統トラックされる胚を作り、近交系の遺伝的安定性を維持するための低温保存される血統トラックされる胚を作るためのスキームを示す。

【 発明を実施するための形態】

【 0 0 1 6】

(発明の詳細な説明)

本発明は、非ヒト動物近交系の遺伝的安定性を維持する新規の方法を提供する。本明細書中で用いられる場合、近交系動物の遺伝的安定性は、創始コロニーに由来する低温保存された血統トラックされる胚を作ること、およびこれらを用いて適切な間隔で創始コロニーを再構築することにより維持される。この方法の実行により、一定の期間に継代した (p a s s) 世代数が減少し、その結果、遺伝的浮動のリスクが減少する。低温保存された各胚の血統が公知であるので、同胞 (すなわち、同一の親由来) である胚のみを選択的に回復し得る。結果として、近交系マウス系統は、このマウス系統の近交系ステータスをインタクトに保ちながら、連続性同腹仔のオス - メス交配を通して増殖する。

【 0 0 1 7】

(I . 低温保存された胚を用いた遺伝的安定性の維持)

本発明は、非ヒト動物の近交系の遺伝的安定性を維持する方法を提供する。一つの実施形態では、この方法は、以下： (1) 近交系の創始コロニーを維持する工程； (2) この創始コロニーに由来する低温保存された胚の血統トラックストックを作る工程； (3) 適切な間隔で、近交系交配対である低温保存された胚を選択し、そしてこの胚から生きた動物を作る工程； (4) この系統の動物を作るために、作られたこの動物から、近交系交配対を選択し、そしてこの対を新規の創始対として使用する工程；および (5) 工程 (3) ~ 工程 (4) を適切な間隔で反復する工程、を包含する。この様式では、この近交系マウス系統の遺伝的浮動が最小にされ、そしてこの系統の遺伝的安定性が効果的に維持される。

【 0 0 1 8】

本発明で使用される場合、用語「遺伝的安定性」とは、現在利用可能な方法を用いて上記近交系が維持された場合に生じたであろう遺伝的浮動と比較して、近交系の遺伝的浮動が有効に減少することをいう。遺伝的浮動の有効な減少は、近交系の遺伝子型の変化が減少することを意味する。この変化がゲノム中で生じる場所に依存して、遺伝子型の変化が表現型の変化をもたらす可能性もあるし、もたらさない可能性もある。例えば、ゲノムの非コード化領域における変異は、動物の表現型に変化をもたらさない。重要なことに、遺伝的安定性プログラムのもとで維持された系統の創始ストックにおいて生じる変異は、その系統に残存しない。なぜなら、この変異は、低温保存された胚を解凍し、そしてこれを新規の創始ストックとして使用する際に、動物のコロニー全体から浄化 (p u r g e) されるからである。遺伝的浮動は、種々の指標 (例えば、被覆の色、生物化学マーカーアイソエンザイムおよび免疫学的マーカーアイソエンザイム、主要組織適合遺伝子複合体 (M H C)、赤血球抗原、溶血性補体 (H c - 形式的には C 5)、尾皮膚移植、および挙動の変化が挙げられる) を試験することにより評価され得る。遺伝的浮動はまた、当該分野において利用可能な任意の技術 (例えば、二次元タンパク質ゲル、 P C R、 S N P、遺伝子発現プロファイリング、および配列決定) を用いて、種々の分子マーカーを試験することにより評価され得る。

【 0 0 1 9】

近交系は、管理された交配計画により作られ、ヘテロ接合の減少につながる。受容可能な交配計画としては、以下：親 - 子孫交配および同腹仔のオス - メス交配が挙げられる。

近交系は、代表的には、10以上の連続した世代についての同腹仔のオス - メスを交配することにより作られる。近交系の第10番目の世代またはその後の世代が、単一の祖先交配対へとトラックされ得る。好ましい実施形態では、近交系は、オスを20以上の連続した世代のメスと交配することにより、作られ、そして第20番目以降の世代の動物は、単一の祖先交配対へとトラックされ得る。

【0020】

本明細書中で用いられる場合、用語「近交交配対」とは、交配がヘテロ接合の減少につながる任意の交配対をいう。近交系交配対は、親 - 子孫対または同腹仔のオス - メス対であり得る。好ましい実施形態では、この近交系交配対は、同腹仔のオス - メス対であり得る。記載の簡便のため、同腹仔のオス - メス対は、本願の間を通して、例示のために使用され、本発明を記載する。しかし、当業者は、親子孫対は、本発明において同腹仔のオス - メス対に代替し得ることを認識する。

10

【0021】

(a. 近交系の創始コロニーを維持する工程)

近交系マウス系統の創始コロニーは、当業者に公知の技術を用いて維持される。本明細書中で用いられる場合、用語「創始コロニー」とは、上記系近交系後の全ての動物が由来するコロニーをいう。創始動物対は、近交系交配対であり、この純粋交配ストックは、特定の系統のために次の全ての動物を生じさせる。創始動物は、創始コロニーより選択される。

20

【0022】

非ヒト動物は、好ましくは、齧歯類動物（例えば、ラットまたはマウス）である。非ヒト動物はまた、ハムスター、モルモット、ウマ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ニワトリ、七面鳥、霊長類またはその他の任意の非ヒト動物であり得、これらに関して、近交系マウス系統が維持される。

【0023】

近交系マウス系統としては、129S1、129T2、129X1、129P3、129P1、A、AKR、BALB/c、C3H、C57BL/10、C57BL/6、C57BLKS、C57BR/cd、C57L、CBA、DBA/1、DBA/2、FVB、MRL、NOD、SJL、SWR、NOR、NZB、NZW、RBF、BUB、I、LP、NON、P、PL、RIIS、SM、C58、ALR、ALS、BPH、BPL、BPN、DDY、EL、KK、LG、MA、NH、NZM2410、NZO、RF、SB、SEA、SI、SOD1、YBR、およびこれらのマウス系統の各々の全ての近交系亜系 (substrain) が挙げられるが、これらに限定されない。受容されたマウス系統の命名法の使用は、Lab Codeの付加により、この系統コードの末端にて、各系統がさらに同定されることが必要とされ、そしてLab Codeの現在の一覧表は、International Laboratory Code Registryを維持し、<http://dels.nas.edu/ilar/codes.asp>にてアクセスされ得るInstitute for Laboratory Animal Researchにより維持されている。

30

【0024】

本明細書中で用いられる場合、用語「亜系」とは、遺伝的に互いに異なる同一のマウス系統の範囲内のコロニーをいう。亜系は、同一の近交系の2個のコロニーが10世代よりも多くの世代の間隔でられている場合に生じ得るか、または同一の系統の別個のコロニー間の公知の遺伝的差異が存在する場合に生じ得る。別個の亜系間の遺伝的差異はまた、分離の際の祖先の残留ヘテロ接合の名残りの結果でもあり得、このヘテロ接合は、固定され、そして/または後の世代の間の偶発性突然変異の結果（遺伝的浮動）である。亜系の例としては、129S1/SvImJ、129T2/SvEmsJ、129X1/SvJ、129P3/J、A/J、AKR/J、BALB/cByJ、BALB/cJ、C3H/HeJ、C3H/HeOuj、C3HeB/FeJ、C57BL/10J、C57BL/6J、CBA/CaHN-Btkxid/J、CBA/J、DBA/1J、DBA/1L

40

50

a c J、D B A / 2 J、F V B / N J、M R L / M p J、N O D / L t J、S J L / J、S W R / J、N O R / L t J、N Z B / B l N J、N Z W / L a c J、R B F / D n J、1 2 9 S 6 / S v E v T a c、A J T A C、B A L B / c A n N T a c、B A L B / c J B o m T a c、B A L B / c A B o m T a c、C 5 7 B L / 6 N T a c、C 5 7 B L / 6 J B o m T a c、C 5 7 B L / 1 0 S g A i T a c、C 3 H / H e N T a c、C B A / J B o m T a c、D B A / 1 J B o m T a c、D B A / 2 N T a c、D B A / 2 J B o m T a c、F B V / N T a c、N O D / M r k T a c、N Z M / A e g T a c、S J L / J c r N T a c、B A L B / c A n N C r l B R、C 3 H / H e N C r l B R、C 5 7 B L / 6 N C r l B R、D B A / 2 N C r l B R、F V B / N C r l B R、C . B - 1 7 / I c r C r l B R、1 2 9 / S v P a s I c o C r l B R、S J L / J o r l I c o C r l B R、A / J o l a H s d、B A L B / c A n N H s d、C 3 H / H e N H s d、C 5 7 B L / 1 0 S c N H s d、C 5 7 B L / 6 N H s d、C B A / J C r H s d、D B A / 2 N H s d、F V B / N H s d、S A M P 1 / K a H s d、S A M P 6 / T a H s d、S A M P 8 / T a H s d、S A M P 1 0 / T a H s d、S J L / J C r H s d、A K R / O l a H s d、B i o z z i A B H / R i j H s d、C 5 7 B L / 6 J O l a H s d、F V B / N h a n H s d、M R L / M p O l a H s d、N Z B / O l a H s d、N Z W / O l a H s d、S W R / O l a H s d、1 2 9 P 2 / O l a H s d、および 1 2 9 S 2 / S v H s d が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【 0 0 2 5 】

近交系マウスストックはまた、任意のトランスジェニック技術、ノックアウト技術もしくは s i R N A (小さな R N A 干渉) 技術または将来の遺伝子操作技術により作られる、10 以上の世代の間、同腹仔のオス - メスを交配した全てのストックを包含する。

20

【 0 0 2 6 】

(b . 低温保存された胚の血統トラックストックの作製)

本明細書中に記載される場合、本発明の一つの局面は、創始コロニー由来する低温保存された動物胚の血統トラックストックを作る方法に関する。

【 0 0 2 7 】

血統トラックストックは、ストックの各胚の血統が既知であるストックである。この胚の血統は、この胚の系図に従い、そしてこの系図の情報を記録することによりトラックされ得る。例えば、各胚は、血統の情報で別個に標識され得る。あるいは、同胞胚は、物理的に貯蔵され、そして一緒に標識され得る。本明細書中で使用される場合、用語「同胞胚」とは、単一の同腹仔のオス - メス対 (または近交系交配对) に由来する胚をいう。この低温保存した胚は、当業者に公知の方法により貯蔵され得る。一つの実施形態では、低温保存した胚は、滅菌したプラスチック受精ストロー中に貯蔵される。各ストローは、同胞胚のみを含む。ストローは、胚を一つのみを含み得るか、または複数の同胞胚を含み得る。あるいは、低温保存された胚は、他の適切な容器 (例えば、プラスチックのバイアルまたはガラスのアンブル) に貯蔵され得る。

30

【 0 0 2 8 】

本発明の血統トラックストックの胚は、首尾よく低温保存され、そして生きた動物を作るために回復され得る任意の段階の胚であり得る。このような胚としては、全ての段階 (接合子から胚盤胞まで) の移植前の胚が挙げられる。従って、本発明の胚は、例えば、1 細胞胚 (接合子)、2 細胞胚、4 細胞胚、8 細胞胚、桑実胚または胚盤胞であり得る。桑実胚は、1 細胞胚の卵割から生じる細胞の球塊である ; 上記胚盤胞は、上記桑実胚から発生し、そして胞胚腔および細胞の非対照的に置かれた房、内細胞塊を有する。

40

【 0 0 2 9 】

本明細書中で用いる場合、用語「低温保存された」とは、凍結されることをいう。本発明の細胞、胚、生殖体、または生殖体前駆体は、一般的に 0 よりも低い温度にて凍結される。例えば、- 8 0 が、短期の貯蔵に対して使用され得、- 1 9 6 以下の温度が、長期の保存に対して使用され得る。本発明の細胞、胚、生殖体または生殖体前駆体が、無期限に低温保存され得る。低温保存のための方法および道具は、当業者に周知である。例

50

えば、米国特許第5,160,312号、発明の名称「Cryopreservation Process for Direct Transfer of Embryos」、GlenisterおよびHall、「Cryopreservation and rederivation of embryos and gametes」、Mouse Genetics & Transgenics: A Practical Approach、第2版、(I Jackson & C Abbott編) Oxford Univ. Press. Oxford, pp. 27~29を参照のこと。

【0030】

本明細書中で用いられる場合、「創始コロニー由来の胚」は、創始動物対から直接的に得られる胚、およびこの創始動物対の後裔から得られる胚を包含する。

10

【0031】

低温保存されたストックにおいて必要とされた胚の数は、多くの因子(例えば、遺伝的安定性プログラムが維持されるはずの時間の長さ、低温保存されたストックが使用されて創始コロニーを再構築する頻度、生きた動物を低温保存された胚から作る効率)に依存する。これらの因子は、種々の動物種の間で異なり、そして同一の動物種の様々な系統の間で異なる。例えば、異なる近交系からのマウスは、低温保存された胚の回復効率が異なることが公知である。

【0032】

所望の数の胚を作るために必要とされるメスの動物の数もまた様々である。必要とされるメスの数は、各メスから得られ得る卵母細胞の数(受精した卵母細胞の比率および胚移送に続く期間にまで発生する胚の比率)と逆の相関がある。従って、必要とされるメスの数は、各工程の効率の関数である。各工程の効率が高いと、必要とされるメスの総数が減少する。

20

【0033】

一つの実施形態では、低温保存された胚の血統トラックストックが、最初に胚を、創始コロニーの同腹仔のオス-メス対(創始動物対)から得、次いで、この胚を低温保存することにより作られ得る。血統の情報がトラックおよび記録され、その結果、各低温保存された胚が、同定可能な血統を有する。この実施形態では、胚は、創始動物対を交配することにより直接的に作られる。結果として、この血統トラックストックは、同胞胚のみを含む。

30

【0034】

あるいは、この創始コロニーは、最初に広げられ、適切な数の同腹仔のオス-メス対を作る。従って、別の実施形態では、創始コロニーに由来する低温保存された胚の血統トラックされるストックは、以下:(1)後裔が十分な数の同腹仔のオス-メス対を含むように、この後裔を創始コロニーから取得する工程;(2)(1)において取得した後裔の間で胚を同腹仔のオス-メス対からの胚を作る工程;ならびに(3)(2)において作られた胚を低温保存する工程、により作られ得る。血統の情報は、トラックおよび記録され、その結果、低温保存された各胚は、同定可能な血統を有する。この実施形態において作られた血統トラックストックは、一つより多くの同腹仔のオス-メス対に由来する胚を含む。

40

【0035】

一つの間腹仔のオス-メス対は、オスまたはメスのいずれかが2対の間で異なる場合、別の対とは異なる。例えば、オスAおよびメスBは、オスAおよびメスC、ならびにオスDおよびメスBとは異なる。本明細書中で用いられる場合、「後裔」とは、創始動物対に由来する動物の世代(例えば、F1世代、F2世代、F3世代およびF4世代を含む)をいう。「別個の間腹仔のオス-メス対の適切な数」は、低温保存されたストックを作り出し、そして近交系の遺伝的安定性を維持する目的で、十分な数の胚を作る数である。

【0036】

後裔を創始動物ストックから取得する工程は、当業者に公知の交配技術(例えば、自然交配、人工受精およびインピトロでの受精)により達成され得る。

50

【0037】

胚は、同腹仔のオス - メス創始動物対を交配することにより取得され得る。本明細書中で用いる場合、「交配」は、受精が起こるような、オスの生殖体およびメスの生殖体の結合を意味する。このような結合は、交尾 (mating) (交接) により、またはインビトロもしくはインビボの人工的手段により生じ得る。人工的な手段としては、人工受精、インビトロでの受精、胚の移送、細胞質内精子注入、クローニング、受精した卵母細胞のインビトロ培養、および胚の分裂が挙げられるが、これらに限定されない。適切に熟成した胚を作る任意の方法が使用され得る。

【0038】

人工受精は、精子を手動注入または手動適用することにより、メスの動物を受精させるプロセスである。このような手順では、オスの動物は、受精の時に必要とされなくて、精子がこの動物から予め取得された。Wolfe, 1967、ならびに、SatoおよびKumura, 2002を参照のこと。交配が自然交配または人工受精により達成される場合、胚は、交配または人工受精の後、メスの卵管または子宮を洗浄することにより得られる。Hoganら、2003を参照のこと。この胚分裂技術は、当業者に周知である。胚分裂は、例えば、マイクロマニピュレーターを用いて、または類似の手順を用いて、正常な胚を (2細胞から桑実胚まで) 分割することにより、実行され得る。

10

【0039】

インビトロでの受精 (IVF) はまた、当該分野で周知である。例えば、Hoganら、Manipulating the Mouse Embryos, A Laboratory Manual, 第2版、146頁~147頁 (1994) を参照のこと。IVFは、一般的に、卵母細胞および精子をそれぞれメスおよびオスから収集する工程、このメスからの卵母細胞を、オスからの精子で受精させる工程、ならびに、生じた受精した卵母細胞が胚へと発生するのに適切な条件下で、生成した受精卵母細胞を維持する工程を包含する。胚は、種々の段階で収集され得る。上記メスは、過排卵し得、その後、卵母細胞がIVFのために収集される。例えば、Hoganら、2003を参照のこと。本明細書中で用いられる場合、この卵母細胞および精子は、同腹仔のオス - メス対から取得される。IVFは、単一のメスから取得される胚の数を増加するための有用な手段であり得る。

20

【0040】

細胞質内精子注入 (ICSI) は、受精速度を改善するために使用され得る。このICSI手順は、卵母細胞の周囲を囲っている卵丘細胞 (cumulus cell) の除去およびこの精子の卵母細胞への注入 (通常は、ガラスピペットを通しての注入) を伴う。KimuraおよびYanagimachi, 1995を参照のこと。

30

【0041】

成熟した卵母細胞をIVFのためにメスから収集する代替策として、未熟な卵母細胞が取得され、そしてインビトロで成熟可能にし得る (「インビトロ成熟化」として公知)。哺乳動物では、ごく一部の未熟な卵母細胞しか、成熟した卵母細胞へと発生せず、そして残りは、退化し、そして死ぬ。未熟な卵母細胞を動物から単離し、そしてこれら未熟な卵母細胞をインビトロで成熟させることにより、IVFにとって適切な多くのより多くの卵母細胞を所定のメスから取得し得る。哺乳動物の卵母細胞は、インビトロで成熟することが公知である。マウス、ウシおよび他の哺乳動物の場合、インビトロで成熟した卵母細胞は、インビトロで受精し、そして胚が適切な子宮へと移送された場合、正常で健康な子孫を生じる (SchroederおよびEppig 1984 Dev. Biol. 102: 493; Sirardら、1988, Biol. Reprod. 39: 546)。インビトロ成熟技術は、当該分野で周知である。例えば、Chiuら、Effects of Myo-inositol on the in-vitro Maturation and Subsequent Development of Mouse Oocytes, Human Reprod. 18: 408~416 (2003) およびO'Brienら、A Revised Protocol for In Vitro Development of Mouse Oocytes from Primordi

40

50

al Follicles Dramatically Improves Their Developmental Competence, Biol. Reprod. 68: 1682~1686 (2003)を参照のこと。

【0042】

別の代替策では、卵母細胞は、所望のメスからの卵巣の一部が予め移植された「ホスト」メスから収集され得る。所望のメスが、創始コロニーに由来する同腹仔のオス-メス対の同腹仔のメスである場合、IVFのために、このメスからの卵母細胞が必要とされる。これは、同腹仔のオス-メス対の同腹仔のメスから卵巣を収集すること、この卵巣を断片(section)へとさらに分割すること、手術により卵巣が断片化された(ovarisectomized)ホストのメスまたは化学的にもしくは遺伝的に損なわれたホストのメスへと各断片を移植すること、および卵母細胞をこのホストのメスの各々から収集すること、により達成される。このアプローチにより、所定のメスに関して取得される卵母細胞がより多くなる。

10

【0043】

(c. 低温保存された胚のストックから生きた動物を作ること)

適切な時点で、低温保存された同胞胚が選択され、そして生きた動物がこれらの同胞胚より作られる。一つの実施形態では、生きた動物は、同胞胚の一つのセットから作られる。別の実施形態では、生きた動物は、同胞胚の一つよりも多くのセットより作られる。

【0044】

生きた動物を低温保存された胚から作る工程が、当業者に公知の技術を用いて実行され得る。一つの実施形態では、生きた動物が低温保存された胚より、以下：(1)この低温保存された胚を解凍する工程；(2)この解凍した胚を、少なくとも一つの偽妊娠のメスのレシピエントへと移植する工程；および(3)生きた動物を作るのに適した条件下で擬妊娠のメスのレシピエントを維持する工程、により作られる。結果として、生きた動物が作られる。

20

【0045】

本明細書中で用いられる場合、用語「解凍」とは、低温保存された材料の温度を上昇させるプロセスをいう。低温保存された材料を解凍する方法(その結果、これらの方法により、解糖プロセス後に生きた動物が生じ得る)は、当業者に周知である。

【0046】

本明細書中で胚に関して用いられる場合、用語「移植」とは、本明細書中に記載の胚を有するメスの動物に、一つ以上の胚を移送することをいう。偽妊娠のメスのレシピエントは、たとえ自身が受精していない卵が退化しても、移送された胚に対して、生殖路(reproductive tract)が受容性になるメスの動物である。偽妊娠のメスの動物が、例えば、メスを無菌のオスと交配させることにより作られる。偽妊娠のメスを移植する技術は、当業者に周知である。例えば、Hoganら、Manipulating the Mouse Embryos, A Laboratory Manual、第2版、170頁~181頁におけるRecovery, Culture and Transfer of Embryosを参照のこと。これらの胚は、子宮で発生することが可能であり得るか、または代わりに、この子宮は、分娩前に胎仔環境から除去され得る。

30

40

【0047】

(d. 作られた生きた動物から新規の創始動物対を選択すること)

工程(c)において作られた生きた動物から、新規の創始動物対になる同腹仔のオス-メス対が選択され、創始コロニーを再構築する。このマウス系統の後代の全ての動物は、低温保存されたストックを用いて上記創始コロニーを再構築する工程が、次の節で記載されるように反復されるまで、この新規の創始動物対に由来する。

【0048】

同腹仔のオス-メス対は、創始動物対としてランダムに選択され得る。あるいは、この創始動物対は、表現型スクリーニング、遺伝子型スクリーニング、またはこれら両方の組み合わせにより選択され得る。表現型スクリーニングは、目視検査(例えば、コートカラ

50

ーおよび挙動の変化)により行われ得る。表現型スクリーニングはまた、筋肉の握力強度の定量的な分析により行われ、呼吸速度、一回換気量、および他の呼吸指標(呼吸性チャレンジを伴うものまたは伴わないもの)の無制限の測定、CO₂の生成とO₂の取り込み、食物および水の摂取、運動活性(locomotor activity)および日周期パターンの同時測定、臨床的化学試験および血液化学試験、標本化された組織の発現プロファイリングにより行われる。遺伝子型スクリーニングは、種々の指標(例えば、生物化学的マーカーおよび免疫学的マーカーのアイソエンザイム、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)、赤血球の抗原、溶血性補体(Hc-形式的には、C5)、マイクロサテライトおよび一塩基多型(SNP)が挙げられる)を試験することにより行われ得る。遺伝子型スクリーニングは、当該分野で利用可能な任意の技術(例えば、PCRおよび配列決定が挙げられる)により実行され得る。

【0049】

(e. 工程(c)~工程(d)の反復)

適切な間隔で、生きた動物を血統トラックストックから作り、そして同腹仔のオス-メスを新規の創始動物対として選択するプロセスが反復される。「適切な間隔」は、低温保存されたストックを用いて、創始コロニーを再構築するために使用される間隔であり、この間隔が、近交系の遺伝的安定性の維持をもたらす。この適切な間隔は、系統について経験的に(例えば、このストックの遺伝的浮動の比率を評価することにより)決定され得る。従って、この決定された適切な間隔は、種々の近交系動物種間で、および同一の動物種内の異なる系統の間で、変動し得る。あるいは、適切な間隔は、予め規定された間隔であり得る。適切な間隔は、1世代~40世代までの間の任意の数の世代ごと(例えば、各世代ごと、5世代ごと、10世代ごと、20世代ごと、または40世代ごと)であり得る。

【0050】

本発明の別の局面は、近交系動物の遺伝的安定性を維持する方法に関する。この方法は、生きた動物を、上記近交系の創始コロニーに由来する血統トラックストックの低温保存された胚から作る工程、この生きた動物から新規の創始動物対として選択された同腹仔のオス-メス対を用いる工程、および上記手順を適切な間隔で反復する工程を包含する。

【0051】

本発明のなお別の局面は、創始コロニーに由来する低温保存された胚の血統トラックストックを提供する。この血統ストックは、本明細書中に記載の任意の方法により作られ得るか、またはこれらの方法の任意の改変により作られ得る。このような低温保存された血統トラック胚は、適切な間隔で創始コロニーを再構築するために使用され得る。一つの実施形態では、この低温保存された血統トラックストックは、単一の同腹仔のオス-メス創始動物対の交配により得られた胚のみを含む。別の実施形態では、この低温保存された血統トラック胚は、創始コロニーに由来する一つより多くの同腹仔のオス-メス対の交配により得られる胚を含む。

【0052】

本発明のさらなる局面は、本明細書中に記載された方法により作製された、遺伝的に安定した非ヒト動物近交系に関する。

【0053】

本発明のなおさらなる局面は、遺伝的浮動が制限された非ヒト動物近交系を供給するビジネスの方法を提供する。この方法は、以下:(1)上記近交系の創始コロニーを維持する工程;(2)上記創始コロニーに由来する低温保存された胚の血統トラックストックを作る工程;(3)適切な時点において、同胞である低温保存された胚を選択し、この胚から生きた動物を作る工程;(4)同腹仔のオス-メス対を、上記作られた動物から選択する工程およびこれらを生きた動物対として用いて、この系統の将来の動物を誘導する工程;(5)工程(1)~工程(4)を適切な間隔で反復する工程、ならびに(6)顧客の注文に応じて顧客に動物を提供する工程、を包含する。

【0054】

(II. 低温保存された生殖体または生殖体前駆体のストックを用いて、遺伝的安定性

を維持する工程)

近交系の遺伝的安定性を維持する目的で、血統トラックストックを作り出すために、近交系の創始コロニーに由来する胚、生殖体または生殖体前駆体を使用することの代替策が使用され得る。

【0055】

従って、本発明は、近交系の遺伝的安定性を維持する方法を提供し、この方法は、以下：
(1) 近交系の創始コロニーを維持する工程；
(2) 上記創始コロニーに由来する低温保存された生殖体または生殖体前駆体の血統トラックストックを作る工程およびそれらから生きた動物を作る工程；
(3) 適切な間隔で、単一の同腹仔のオス-メス対から得られた、低温保存された生殖体または生殖体前駆体を選択する工程；
(4) 上記生じた動物から同腹仔のオス-メス対を選択し、そしてこれらを新規の創始動物対として使用し、この系統の将来の動物を作る工程；
ならびに(5) 工程(3)および工程(4)を適切な間隔で反復する工程、を包含する。

10

【0056】

本明細書中で用いられる場合、用語「生殖体」とは、新規の二倍体の個体の形成を開始し得る、任意のオスまたはメスの生殖細胞をいう。生殖体の例は、精子および卵母細胞である。生殖体は、動物から収集される流体、組織、および器官の中に存在し得る(例えば、精子は、精液の中に存在する)。

【0057】

用語「生殖体前駆体」は、生殖体を作り得る任意の前駆体を包含する。このような前駆体は、上記生殖体の前駆体細胞(progenitor cell)であり得る。精子についての前駆体細胞としては、始原生殖細胞、精原細胞(A1型精原細胞、A2型精原細胞、A3型精原細胞およびA4型精原細胞が挙げられる)、精原幹細胞、中間精原細胞、B型精原細胞、一次精母細胞、二次精母細胞、ならびに精子細胞が挙げられるが、これらに限定されない。卵母細胞の前駆体細胞としては、始原生殖細胞、卵原細胞、一次卵母細胞、二次卵母細胞が挙げられるが、これらに限定されない。このような前駆体はまた、胚幹細胞であり得、この胚幹細胞は、生殖体を作り得る。例えば、Hubnerら、Science 300:1251~6(2003)を参照のこと。用語「生殖体前駆体」とはまた、生殖体を作り得る任意の細胞、組織または器官(例えば、卵巣および精巣を包含する)をいう。

20

30

【0058】

始原生殖細胞は、生殖細胞になり得る2倍体の体細胞である。始原生殖細胞は、例えば、生殖隆起(genital ridge)より単離され得る。生殖隆起は、発生する胚の公知の規定の領域であり、そして当業者に周知である。例えば、Strelchenko, 1996, Theriogenology 45:130~141およびLavoir 1994, J. Reprod. Dev. 37:413~424を参照のこと。

【0059】

本発明の一つの局面は、創始コロニーに由来する、低温保存された生殖体または生殖体前駆体の血統トラックストックを作る方法に関する。

【0060】

遺伝的安定性を維持するために、血統トラックストックを作り出すのに必要とされる生殖体または生殖体前駆体の数は、胚のストックを考慮する同一のセットを用いて決定される。同様に、このストックのために十分な数の生殖体または生殖体前駆体を作るのに必要とされる動物の数は、上で考察されるような、胚のストックに照らして同一の考慮(consideration)で決定される。従って、生殖体または生殖体前駆体は、創始動物対から直接的に得られ得る。あるいは、胚のストックに関して、創始コロニーは、最初に広げられ、十分な数の特徴的な同腹仔のオス-メス対を作り、そして生殖体および生殖体前駆体は、次いで、これらの同腹仔のオス-メス対から得られ得る。

40

【0061】

生殖体および生殖体前駆体は、生きた動物または胚のいずれかである同腹仔のオス-メ

50

ス対から得られる。生殖体または生殖体前駆体を得るための技術は、当該分野で公知である。例えば、OguraおよびYanagimachi, 1995、ならびにKubotara、2003を参照のこと。

【0062】

生殖体および生殖体前駆体は、当該分野で公知の方法を用いて低温保存され得る。例えば、米国特許第5,758,763(発明の名称:「Methods for Cryopreservation of Primordial Germ Cells and Germ Cells」)、米国仮出願20020131957(発明の名称「Cryopreservation of Sperm」)、Szteinら、Biol. Reprod. 58:1071~1074(1998)およびCandyら、2000を参照のこと。

10

【0063】

血統トラックされる生殖体または生殖体前駆体のストックは、ストック内の各生殖体または生殖体前駆体の血統が、既知であるストックである。この生殖体または生殖体前駆体の血統は、血統に従い、そして血統の情報を記録することにより、トラックされ得る。例えば、各生殖体または生殖体前駆体は、血統の情報で別個に標識され得る。別の例としては、単一の個体からの生殖体または生殖体前駆体は、同胞群として物理的に貯蔵され、そして標識され得る。この様式で、将来の単一の同腹仔のオス-メス対から得られる生殖体または生殖体前駆体のみを選択し得る。例えば、生殖体は、特定のメスからの唯一の卵およびこのメスの同腹仔のオスからの精子の選択のみを可能にする様式で貯蔵され得る。

20

【0064】

適切な間隔にて、単一の同腹仔のオス-メス対から得られる、低温保存された生殖体または生殖体前駆体を選択し、そしてこれらから生きた動物を作り得る。低温保存された生殖体前駆体は、この生殖体前駆体が生殖体(この生殖体は、次いでインビトロの受精を経て、そして生きた動物を作る)を作る条件下で解凍され、培養され得る。

【0065】

一つの実施形態では、卵母細胞は、過排卵されたメスから収集され、そして低温保存される。精子は、各々のオス同胞から収集され、そして低温保存される。適切な間隔で、同胞からの卵母細胞および精子は、解凍され、そしてIVFにより胚を作るために使用される。生じた胚は、子孫を作るために、偽妊娠のレシピエントに移される。

30

【0066】

本発明の別の局面は、近交系動物の遺伝的安定性を維持する方法に関する。この方法は、生きた動物を、この近交系の創始コロニーに由来する血統トラックストックの低温保存された生殖体または生殖体前駆体から作る方法を包含し、この際、上記生きた動物から選択された同腹仔のオス-メス対を新規の創始動物対として用い、この手順を適切な間隔で反復する工程を包含する。

【0067】

本発明のなお別の局面は、創始コロニーに由来する低温保存された生殖体または生殖体前駆体の血統トラックストックを提供する。このような血統トラックストックは、適切な間隔で創始コロニーを再構築するために使用され得る。

40

【0068】

本発明の更なる局面は、本明細書に記載の方法により作製された、遺伝的に安定化した非ヒト動物近交系に関する。

【0069】

本発明のなおさらなる局面は、遺伝的浮動が限定された非ヒト動物近交系を供給するビジネスの方法を提供する。この方法としては、以下:(1)近交系の創始コロニーを維持する工程;(2)この創始コロニーに由来する低温保存された生殖体または生殖体前駆体の血統トラックストックを作る工程;(3)適切な間隔で、単一の同腹仔のオス-メス対から得られた、低温保存された生殖体または生殖体前駆体を選択する工程、およびこれらから生きた動物を作る工程;(4)この生じた動物から同腹仔のオス-メス対を選択し、

50

そしてこれらを新規の創始動物対として使用し、この系統の将来の動物を作る工程；（５）工程（３）および工程（４）を適切な間隔で反復する工程；ならびに顧客の注文に答えてマウスを顧客に提供する工程、を包含する。

（ⅡⅡⅡ．低温保存されたES細胞株を用いた遺伝的安定性の維持）

胚を使用することの代替策として、近交系の創始コロニーに由来する胚幹細胞が、近交系の遺伝的安定性を維持する目的で血統トラックストックを作り出すために、使用される。

【0070】

従って、本発明は、近交系の遺伝的安定性を維持する方法を提供し、この方法は、以下：（１）近交系の創始コロニーを維持する工程；（２）この創始コロニーに由来する低温保存された胚の血統トラックストックを作る工程；（３）適切な間隔で、単一の同腹仔のオス-メス対から得られた、低温保存された胚を選択する工程、およびこれらから生きた動物を作る工程；（４）この生じた動物から同腹仔のオス-メス対を選択し、そしてこれらを新規の創始動物対として使用し、この系統の将来の動物を作る工程；ならびに（５）工程（３）および工程（４）を適切な間隔で反復する工程、を包含する。

10

【0071】

胚幹細胞（ES細胞）は、胚から単離された多能性細胞である。ES細胞は、インビトロで、支持細胞有りまたは無しで、培養され得る。ES細胞は、初期胚（原理上は胚盤胞段階の胚から単離された胚細胞から樹立され得る。ES細胞の樹立および培養の両方のための方法は、当業者に周知である。例えば、WO 97/37009（発明の名称「Cultured Inner Cell Mass Cell-Lines Derived from Ungulate Embryos」SticeおよびGolueke、1997年10月9日刊行、ならびにYangおよびAnderson、1992、Theriogenology 38:315~335を参照のこと。これらの両方は、本明細書中にその全体が参考として援用される。本明細書中で用いられる場合、用語「胚幹細胞」または「ES細胞」は、ES細胞株（cell line）を包含する。

20

【0072】

血統トラックストックのES細胞は、上記創始コロニーの同腹仔のオス-メス対を交配することにより作られる胚から得られ得る。このような技術は、当業者に周知である。次いで、このES細胞は、単一の同腹仔のオス-メス対から得られるES細胞のみを選択することを可能にする様式で、低温保存され、そして貯蔵される。好ましくは、このES細胞は、初期継代（例えば、3継代から20継代内）で低温保存される。

30

【0073】

遺伝的安定性を維持するための血統トラックストックを作り出すのに必要なES細胞の凍結単位数は、多くの因子（例えば、遺伝的安定性が維持されるはずの時間の長さ、この低温保存されたストックが創始コロニーを再構築するために使用される頻度、生きた動物を低温保存されたES細胞から作る効率およびこのES細胞がこのES細胞に完全に由来する生きた動物を作る効率）に依存する。これらの因子は、種々の動物種間で異なるだけでなく、同一の動物種の異なる系統の間で異なり得る。

【0074】

ES細胞は、創始動物対の交配に由来する胚から得られ得る。あるいは、この創始コロニーは、最初に広げられ、そして十分な数の特徴的な同腹仔のオス-メス対を作り、次いで、ES細胞が、これらの同腹仔のオス-メス対の交配から生じる胚から得られ得る。

40

【0075】

ES細胞は、当業者に公知の方法を用いて低温保存される。例えば、Hoganら、2003を参照のこと。

【0076】

上記血統トラックストックの低温保存されたES細胞は、解凍され、そして適切な間隔で創始コロニーを再構築するために使用され得る。一つの実施形態では、オスおよびメス（同腹仔のオス-メス）の胚に由来するES細胞は、別個に桑実胚段階または胚盤胞段階

50

の胚へと導入され、そしてこの動物の発生に關与させる。生じた子孫は、代表的には、キメラであり、このキメラの一部は、ホストの胚または寄与したオスもしくはメスのES細胞のいずれかから発生した。このキメラの生殖細胞系列は、上記ホストおよび寄与したES細胞の両方の誘導体を含み得る。コートカラーおよび/または他の遺伝的マーカーの使用により、使用されたES細胞に完全に由来する子孫を選択し得る。次いで、生じた子孫は、創始コロニーを再構築するために使用され得る。

【0077】

代替の実施形態において、上記血統トラックストックのオスのES細胞およびメスのES細胞は、ホストの4倍体の胚で別個に凝集され(4倍体胚相補性(tetraploid embryo complementation))、この凝集は、例えば、電気的パルスで、この2つの細胞段階の胚の融合により作製され得る。このようなES細胞は、このマウス胚を首尾よく十分にコロニー化し、その一方で、この付加的な胚組織が4倍体のホストにより供給される。これは、4倍体のホスト胚で凝集するために使用されるこのES細胞に依存して、オスES細胞またはメスES細胞のいずれかに完全に由来する子孫を作る。コートカラーおよび/または他の遺伝的マーカーを用いたこのプロセスの十分なモニタリングにより、このES細胞に由来する子孫から、任意の可能なホスト胚由来の子孫を区別し得る。従って、各ES細胞に完全に由来する子孫を選択し得る。次いで、同腹仔のオス-メス対は、オスES細胞(同腹仔のオス)に由来する子孫およびメスES細胞(同腹仔のメス)に由来する子孫から選択され、創始コロニーを再構築し得る。

10

【0078】

このような技術は、当該分野で公知である。例えば、Hoganら、2003. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells, Proc Natl Acad Sci USA. 90, 8424~8428。また、<http://www.mshri.on.ca/nagy/diploid/diploid.htm> および <http://www.mshri.on.ca/nagy/Tetraploid/tetra.htm> もまた参照のこと。

20

【0079】

さらなる実施形態では、オスの子孫およびメスの子孫は、血統トラックストックの単一のオスES細胞株(cell line)から作られ得る。このオスES細胞は、X染色体およびY染色体(XY)を含む。Y染色体が、XY細胞株(cell line)のサブクローンにおいて高頻度で失われることが示され、そしてこのXY ES細胞株のサブクローン中にXO細胞を同定することを慣用的にする。これらのXO ES細胞は、4倍体の胚相補性またはキメラの形成のいずれかを介して出産可能なメスの子孫を作るために使用され得る(Egganら、2002を参照のこと)。メスの子孫の一つは、創始コロニーを再構築するために、オスのES細胞に由来するオスの子孫の一つと交配するために選択され得る。

30

【0080】

ES細胞は、インビトロで生殖細胞を形成し得ることが公知である。Toyooka, Yら、2003を参照のこと。従って、別の実施形態では、血統トラックストックのES細胞は、インビトロで生殖細胞を作るために使用され、次いで、この生殖細胞は、上記ES細胞に由来する子孫を作るために使用される。

40

【0081】

本発明の別の局面は、創始コロニーに由来する低温保存されたES細胞の血統トラックストックを作る方法に関する。

【0082】

本発明のさらなる局面は、近交系マウスの遺伝的安定性を維持する方法に関する。この方法は、5つの工程：(1)上記近交系の創始コロニーに由来する血統トラックされる低温保存されたES細胞株から、単一の同腹仔のオス-メス対から得られる低温保存されたES細胞を選択し、そして生きた動物をこれらのES細胞から作る工程；(2)そのよう

50

にして作られた生きた動物から、同腹仔のオス - メス対を新規の創始動物対として選択する工程；ならびに(3)工程(1) ~ (2)を適切な間隔で反復する工程；を包含する。

【0083】

本発明の別の局面は、創始コロニーに由来する低温保存されたES細胞の血統トラックストックを提供する。このような血統トラックストックは、適切な間隔でこの創始コロニーを再構築するために使用され得る。

【0084】

本発明のさらなる局面は、遺伝的浮動が制限された非ヒト動物近交系を供給するビジネスの方法を提供する。この方法は、以下：(1)上記近交系の創始コロニーを維持する工程；(2)この創始コロニーに由来する低温保存されたES細胞の血統トラックストックを作る工程；(3)適切な間隔で、単一の同腹仔のオス - メス対から得られた低温保存されたES細胞を選択し、そしてこれらから生きた動物を作る工程；(4)作られた生きた動物から、同腹仔のオス - メス対を選択し、そしてこれらを用いて新規の創始動物対として使用し、この近交系の将来の動物を導き出す工程；(5)工程(1) ~ 工程(4)を適切な間隔で反復する工程；ならびに顧客の注文に応じて動物を提供する工程、を包含する。

10

【0085】

本発明の実行は、他に示されなければ、マウスの遺伝学、発生生物学、細胞生物学、細胞培養、分子生物学、トランスジェニック生物学、微生物学、組換えDNA、および免疫学の従来技術（これらは、当業者の範囲内である）を用いる。このような技術は、文献に記載される。例えば、Current Protocols in Cell Biology, Bonifacino, Dasso, Lippincott - Schwartz, Harford, および Yamada 編、John Wiley and Sons, Inc. New York, 1999、Manipulating the Mouse Embryos, A Laboratory Manual, 第3版、Hoganら、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2003、Gene Targeting: A Practical Approach, IRL Press, Oxford University Press, Oxford, 1993、ならびに Gene Targeting Protocols, Human Press, Totowa, New Jersey, 2000を参照のこと。本明細書中に記載の全ての特許、特許出願および参考文献が、参考としてその全体が援用される。

20

30

【実施例】

【0086】

以下に一般的に記載される発明は、以下の実施例を参照することにより、より容易に理解され、この実施例は、本発明の特定の局面および実施形態の例示の目的で包含されるに過ぎず、本発明を限定することを意図するものではない。

【0087】

(実施例1 胚のストックを用いて近交系の遺伝的安定性を維持する工程)

図は、遺伝的安定性を維持するために使用される、創始コロニーに由来する低温保存された胚の血統トラックストックを作るためのスキームを記述する。これは、本発明の単なる一つの実施形態である。図中の左側のパネルは、第一の工程：創始動物対(P世代)を選択し、そして何回か交配されて複数の同腹仔を作る。示されたスキームにおいて、6匹の同腹仔のメスおよび2匹の同腹仔のオス(F1世代)を、次なる工程のために選択する。図の中段のパネルは、第二の工程を示し、この第二の工程では、同腹仔をトラックするために、F1世代の各同腹仔のメスを別個に籠に入れる。示されたスキームにおいては、同一のオスを、一群の3匹のF1世代の同腹仔のメスと順番に交配する。6匹のF1世代のメスの各々を、各々の同腹仔のオスと複数回交配し、F2世代の複数の同腹仔を作る。図の右側のパネルは、第3の工程を示し、この第3の工程では、9匹のF2世代の同腹仔のメスおよび単一のF1世代の同腹仔のメスに由来する1匹の同腹仔のオスが、IVFで使用され、胚を作る。IVFを、約9匹の同腹仔のメスおよび1匹の同腹仔のオスのセッ

40

50

トの6セット以上の各々に対して実行する。54匹(6×9)のメスの各々からの胚を、個々のストローにおいて低温保存する。これは、25年以上を網羅する、2倍より多くの重複性を与え、そしてコントロールおよび/または予知できない偶発性のための胚を含む。

【0088】

適切な間隔で、低温保存されたストックからの同胞胚を解凍し、そして偽妊娠のメスのレシピエントへと移送し、子孫を発生させる。次いで、同腹仔のオス-メス対を、新規の創始動物対として子孫から選択し、この創始コロニーを再構築する。

【0089】

当業者は、上に記載されたものが、本発明の血統トラックされる低温保存された胚のストックを作るための単に一つの実施形態を表すだけであることを理解する。明らかに、このスキームの詳細の多く(例えば、この胚のストックを作製する前にこの創始コロニーを広げるのに必要とされる世代数、1世代あたりに使用されるメスの数、および使用される近交系交配対の類型)は、変動し得る。例えば、交配対を選択し、そしてF(x+1)子孫(ここで、xは選択の時点での世代数である)を交配対から作り得る。その間、交配対のオスからの精子を取得し、そしてアリコートで低温保存する。メスのF(x+1)子孫を、IVFにより解凍した精子と交配し(親-子孫交配)、低温保存し得るF(x+2)胚を作り、血統トラックストックを作る。

10

【0090】

(実施例2 生殖体ストックを用いた近交系の遺伝的安定性の維持)

20

一つの実施形態では、創始コロニーに由来するメスマウスを、過排卵させ、そして卵母細胞を収集し、そして低温保存する。このメスのオス同胞の各々からの精子もまた、収集して低温保存する。胚をIVFにより作るために、適切な間隔で、同胞からの卵母細胞および精子を解凍し、そして使用する。生じた胚を、偽妊娠のレシピエントに移送し、子孫を作る。次いで、同腹仔のオス-メス対を、新規の創始動物対として子孫から選択し、この創始コロニーを再構築する。

【0091】

(実施例3 生殖体前駆体ストックを用いて、近交系の遺伝的安定性を維持すること)
(低温保存した卵巣および精子)

創始コロニーに由来するメスからの卵巣を低温保存し、同様に各々のオス同胞からの精子を低温保存する。所望の間隔で、この卵巣を解凍し、そして移送する。一度このメスレシピエントの受胎能が示されると、このメスに、過排卵させ、そしてこのメスの同胞に由来する低温保存された精子を用いてこれを人工受精させ、子孫を作る。次いで、同腹仔のオス-メス対を新規の創始動物対として子孫から選択し、創始コロニーを再構築する。

30

【0092】

(低温保存した卵巣および精原幹細胞)

卵巣を、上に記載されたように収集し、そして低温保存する。精原幹細胞を、オス同胞から収集し、そして低温保存する。精原幹細胞を、適切な間隔で解凍し、そして移植し、繁殖性のオスを作る。一度このオスの受胎能が示されると、このオスのメス同胞からの卵巣を解凍し、そして移植する。次いで、この動物を交配し、そして子孫を作る。次いで、同腹仔のオス-メス対を、新規の創始動物対として子孫から選択し、この創始コロニーを再構築する。Candyら、2000、ならびにNaganoおよびBrinster 1998を参照のこと。

40

【0093】

(実施例4 ES細胞株を用いて近交系の遺伝的安定性を維持すること)

オスES細胞およびメスES細胞を、近交系から単離し、血統の明らかな同腹仔のオス-メスを交配し、そして低温保存する。適切な間隔で、同腹仔のオス-メス交配に由来するオスES細胞およびメスES細胞を、貯蔵から回復する。ホストの胚を、遺伝的に異なる近交系(例えば、ES細胞とは異なるコートカラー)から調製し、そして電気パルスを紹介して融合を誘導し、4倍体の胚を作る。この生存胚を、桑実胚の段階で培養する。オス

50

ES細胞の複数の群（1～40個の細胞）を、4倍体のホスト胚の一つの近位部分に置く。同様に、メスES細胞（1個～40個の細胞）の複数の群を、他の4倍体のホスト胚の近位部分に置く。このES細胞および各々の4倍体の胚が単一の胚へと融合し（一晚培養物）、この胚を偽妊娠のメスレシピエントへと導入する。出生後適切なコートカラーおよび/または他の遺伝的マーカーが使用され得、このES細胞に由来する子孫を選択し得る。次いで、同腹仔のオス-メス対を、これらの子孫を用いて作製し、創始コロニーを再構築し得る。

【0094】

本発明は、本発明を行い、そして使用する当業者にとって十分詳細に記載され、そして例証されるが、種々の代替物、改変物、および改良物が本発明の精神および範囲から逸脱することなく明らかであるはずである。

10

【0095】

当業者は、目的を実行し、そして言及される目標および利点ならびにそれらに固有のものを得るために本発明が十分に適合されることを理解する。本方法、胚のストックおよび生殖体のストックは、好ましい実施形態の代表であり、例示的であり、そして本発明の範囲の限定として意図されない。これらの中の改変および他の用途を、当業者は思いつく。これらの改変は、本発明の精神の内部に包含され、そして特許請求の範囲により規定される。

【0096】

種々の置換および改変が、本発明の範囲および精神から逸脱することなく、本明細書中に開示される発明に対してなされ得ることが当業者に容易に明らかとなる。

20

【0097】

本発明は、好ましい実施形態により具体的に開示され、そして本明細書中に開示される概念の選択的な特徴、改変および変更が、当業者により頼られ得ること、ならびにこのような改変および変更が、添付の特許請求の範囲に規定される本発明の範囲内であると考えられることが理解されるはずである。

【0098】

【表 1】

参考文献

- Candy CJ, Wood MJ, Whittingham DG. 2000. Restoration of a normal reproductive lifespan after grafting of cryopreserved mouse ovaries. *Hum Reprod.* Jun;15(6):1300-4.
- Chiu ら、, Effects of Myo-inositol on the in-vitro Maturation and Subsequent Development of Mouse Oocytes, *Human Reprod.* 18: 408-416 (2003) 10
- Eggan, K. ら、 (2002). "Male and female mice derived from the same embryonic stem cell clone by tetraploid embryo complementation." *Nat Biotechnol* 20(5): 455-9.
- Glenister および Hall, "Cryopreservation and rederivation of embryos and gametes" in *Mouse Genetics & Transgenics: A Practical Approach*, 第2版 (I Jackson & C Abbott, 編) Oxford Univ. Press, Oxford, pp. 27-59. 20
- Han MS; Niwa K; Kasai M, Vitrification of rat embryos at various developmental stages. *Theriogenology* 2003 Apr 15;59(8):1851-63
- Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F., Lacy, E. *Manipulating the Mouse Embryos, A Laboratory Manual*, 第3版、 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2003,
- Hubner ら、 Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells, *Science* 300: 1251-6 (2003). 30
- Kimura および Yanagimachi, Intracytoplasmic sperm injection in the mouse, *Biol. Reprod.* 52: 709-20, 1995.
- Kimura および Yanagimachi, Development of normal mice from oocytes injected with secondary spermatocyte nuclei, *Biol. Reprod.* 53: 855-62, 1995
- Kimura および Yanagimachi, Mouse oocytes injected with testicular spermatozoa or round spermatids can develop into normal offspring, *Development* 121: 2397-405, 1995. 40
- Kubota, Avarbock および Brinster, Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cell, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 100: 6487-6492, 2003.

【表 2】

- Lavoieら、 Isolation and identification of germ cells from fetal bovine ovaries. *Molecular Reprod. Dev.* 37: 413-424 (1994).
- Nagano M, Brinster RL. 1998. Spermatogonial transplantation and reconstitution of donor cell spermatogenesis in recipient mice. *APMIS*. Jan;106(1):47-55; discussion 56-7.
- Nagy, A.; Rossant, J.; Nagy, R.; Abramow-Newerly, W.; Roder, J. C. (1993). 10
Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90, 8424-8428.
- O'Brien et al., A Revised Protocol for In Vitro Development of Mouse Oocytes from Primordial Follicles Dramatically Improves Their Developmental Competence, *Biol. Reprod.* 68: 1682-1686 (2003).
- Oguraおよび Yanagimachi, Spermatids as male gametes, *Reprod. Fertil. Dev.* 7: 158-9, 1995 20
- Sato M, Kimura M. 2002. Comparison of intrabursal transfer of spermatozoa, a new method for artificial insemination in mice, with intraoviductal transfer of spermatozoa. *J Assist Reprod Genet.* Nov;19(11):523-30.
- Schroeder and Eppig 1984 *Dev. Biol.* 102:493
- Sirardら、 1988, *Biol.Reprod.* 39:546
- Specht および Schoepfer, Deletion of the alpha-synuclein locus in a subpopulation of C57BL/6J inbred mice, *BMC Neurosci.* 2, 11 (2001). 30
- Strelchenko, Bovine Pluripotent stem cells, *Theriogenology* 45: 130-141(1996)
- Sztejn, JM, Noble K, Farley JS, Mobraaten LE. 2001. Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology* 42 (1):28-39.
- Sztejnら、 *Biol. Reprod.* 58: 1071-1074 (1998)
- Toyooka, Y., N. Tsunekawa, ら、 (2003). Embryonic stem cells can form germ cells in vitro, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(20): 11457-62. 40
- Wolfe HG. 1967. Artificial insemination of the laboratory mouse (*Mus musculus*). *Lab Anim Care.* 1967 Aug;17(4):426-32.
- Wotjak, C57Black/Box? The importance of exact mouse strain nomenclature, *Trends in Genetics* 19: 183-184 (2003).

【表 3】

Yang & Anderson, 1992, Theriogenology 38: 315-335

米国特許第5,758,763号, 発明の名称 "Methods for Cryopreservation of Primordial Germ Cells and Germ Cells"

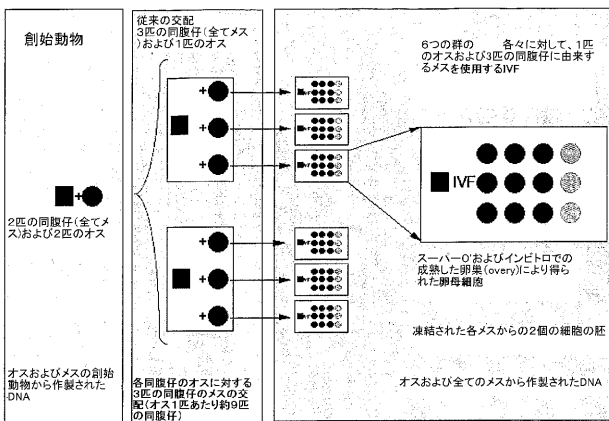
米国仮出願番号 20020131957, 発明の名称 "Cryopreservation of Sperm"

米国特許第5,160,312号, 発明の名称 "Cryopreservation Process for Direct Transfer of Embryos"

WO 97/37009, 発明の名称 "Cultured Inner Cell Mass Cell-Lines Derived from Ungulate Embryos," SticeおよびGolueke, 1997年10月9日公開

【図 1】

Figure 1. 近交系の遺伝的安定性を維持するために使用される創始コロニーに由来する胚を作り出す工程



フロントページの続き

(72)発明者 ロバート タフト

アメリカ合衆国 メイン, 04679, サウス ウェスト ハーバー, バルサム ウェイ
41

(72)発明者 エヴァ エム. アイッカー

アメリカ合衆国 メイン, シール コーブ, ルート 102

Fターム(参考) 4B024 AA10 AA20 GA30 HA20

【外国語明細書】

2012105687000001.pdf