

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 5/06

C12Q 1/02



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01814239.7

[43] 公开日 2003 年 10 月 8 日

[11] 公开号 CN 1447854A

[22] 申请日 2001.6.15 [21] 申请号 01814239.7

[30] 优先权

[32] 2000. 6. 15 [33] JP [31] 180376/2000

[32] 2000. 9. 13 [33] JP [31] 278057/2000

[86] 国际申请 PCT/JP01/05154 2001.6.15

[87] 国际公布 WO01/96533 日 2001.12.20

[85] 进入国家阶段日期 2003.2.17

[71] 申请人 田边制药株式会社

地址 日本大阪府大阪市

[72] 发明人 中辻宪夫 多田高 鸟居隆三

细井美彦 入谷明 芥照夫

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 曹雯 孟凡宏

权利要求书 2 页 说明书 26 页 附图 3 页

[54] 发明名称 来自猿猴的胚胎干细胞

[57] 摘要

使用猿猴的卵子和精子，利用体外受精法或显微授精法进行受精，得到受精卵，使用该受精卵通过体外培养法使发育成囊胚泡期胚胎，利用该囊胚泡期胚胎建立 ES 细胞的，猿猴 ES 细胞的生产方法；以及利用该方法得到的猿猴 ES 细胞、使用该 ES 细胞对组织或细胞特异分化用试剂的筛选方法；由该 ES 分化的分化细胞或分化组织。本发明有望用于灵长类胚胎学的研究、疾病研究、以及应用于临床和实验模型等。

ISSN 1008-4274

1. 可以通过包括以下工序的方法获得的来自猿猴的胚胎干细胞，
 - (a) 使用猿猴的卵子和精子，利用体外受精法或显微授精法进行受精，得到受精卵的工序，
 - 5 (b) 使用工序(a)得到的受精卵通过体外培养法使发育成囊胚泡期胚胎的工序，以及
 - (c) 通过利用工序(b)得到的囊胚泡期胚胎建立胚胎干细胞工序。
2. 权利要求1记载的胚胎干细胞，其中猿猴是日本猴或食蟹猴。
- 10 3. 权利要求1记载的胚胎干细胞，其中猿猴是食蟹猴。
4. 权利要求1~3任一项记载的胚胎干细胞，其中在工序(a)中使用从TALP液、TALP-HEPES液和BWW液中选择出的培养液。
5. 权利要求1~4任一项记载的胚胎干细胞，其中工序(b)中的体外培养法是微小悬滴培养法。
- 15 6. 权利要求1~5任一项记载的胚胎干细胞，其中在工序(b)中使用CMRL-1066实施体外培养法。
7. 权利要求1~6任一项记载的胚胎干细胞，其中在工序(b)中培养温度是38℃。
8. 权利要求1~7任一项记载的胚胎干细胞，其中在工序(b)中
- 20 培养条件是5%CO₂、5%O₂、90%N₂条件。
9. 来自猿猴胚胎干细胞的生产方法，其包括以下工序：
 - (a) 使用猿猴的卵子和精子，利用体外受精法或显微授精法进行受精，得到受精卵的工序，
 - (b) 使用工序(a)得到的受精卵通过体外培养法使发育成囊胚
 - 25 泡期胚胎的工序，以及
 - (c) 通过利用工序(b)得到的囊胚泡期胚胎建立胚胎干细胞工序。
10. 权利要求9记载的方法，其中猴是日本猴或食蟹猴。
11. 权利要求9记载的方法，其中猴是食蟹猴。
- 30 12. 权利要求9~11任一项记载的方法，其中在工序(a)中使用从TALP液、TALP-HEPES液和BWW液中选择出的培养液。
13. 权利要求9~12任一项记载的方法，其中工序(b)中的体外

培养法是微小悬滴培养法。

14. 权利要求 9~13 任一项记载的方法，其中在工序 (b) 中培养温度是 38℃。

15 15. 权利要求 9~14 任一项记载的方法，其中在工序 (b) 中培养条件是 5% CO₂、5% O₂、90% N₂ 条件。

16. 权利要求 9~15 任一项记载的方法，其中在工序 (b) 中使用 CMRL-1066 实施体外培养法。

17. 建立的来自食蟹猴的细胞，其具有下述特性：

- 10 (i) 可维持未分化状态进行增殖继代、
(ii) 具有与起源的食蟹猴个体相同的染色体数、
(iii) 通过移植到 8~12 周龄的 SCID 小鼠或裸鼠的皮下、肾筋膜下或睾丸，可以确认多分化能力、
(iv) 对 SSEA-1 呈阴性，而对 SSEA-3、SSEA-4 呈阳性、以及
(v) 检测出碱性磷酸酶活性。

15 18. 权利要求 17 记载的建立的来自食蟹猴的细胞，其中当移植到 8~12 周龄的 SCID 小鼠或裸鼠的皮下、肾筋膜下或睾丸时，至少表现出向选自外胚层、中胚层和内胚层中的至少一种的分化能力。

20 19. 权利要求 17 或 18 记载的建立的来自食蟹猴的细胞，其中当移植到 8~12 周龄的 SCID 小鼠或裸鼠的皮下、肾筋膜下或睾丸时，表现出向选自神经元、神经胶质、肌肉、软骨、骨、纤毛上皮、肠道上皮中至少一种分化能力。

25 20. 为进行组织或细胞的特异分化的试剂的筛选方法，其特征是，在被检测物质存在下，维持从权利要求 1~8 任一项记载的来自猴猴的胚胎干细胞以及权利要求 17~19 任一项记载的来自食蟹猴的细胞选择出的细胞。

21. 从权利要求 1~8 任一项记载的胚胎干细胞以及权利要求 17~19 任一项记载的来自食蟹猴的细胞中选择出的细胞分化形成的分化细胞或分化组织。

来自猿猴的胚胎干细胞

技术领域

5 本发明涉及到在灵长类、特别是人、猿猴的发育学研究、疾病研究、临床应用、实验模型等方面有用的来自猿猴的胚胎干细胞；可高收率获得来自猿猴的胚胎干细胞的生产方法；为了获得所期望的分化细胞或分化组织有用的、为进行组织或细胞特异分化的试剂的筛选方法；以及分化细胞或分化组织。

10

背景技术

胚胎干细胞（以下也称之为 ES 细胞）是具有多分化能力和自我复制能力的未分化细胞。而上述 ES 细胞表现出具有损伤后的组织修复能力。因此这样的 ES 细胞在各种疾病的治疗用物质的筛选、再生医疗领域等是有用的，所以成了研究的热点。

15

现在来自小鼠的 ES 细胞广泛地用于通过基因导向法使特定基因改变的小鼠的制作等。然而，在将来自小鼠的 ES 细胞应用于人的疾病模型时，由于 a) 在小鼠和人胚胎中存在着表达时期不同的基因，b) 胎盘等胚胎外组织的构造和功能不同以及 c) 着床初期胚胎的胚胎组织的构造不同等，所以有时未必能获得所期望的效果。

20

而与来自鼠的 ES 细胞相比，来自猿猴的 ES 细胞与人的亲缘关系更近，所以更适合应用于人的疾病。

到目前为止已知世界上有大约 200 种猿猴，但现状是可用于日常实验的种类有限。高等灵长类大致可分为以下 2 类：

25 (1) 新世界灵长类 (New World Primates)

绢毛猴 (*Callithrix jacchus*) 广为人知，是实验用灵长类之一。新世界灵长类的发育虽胚胎和胎盘的构造与旧世界灵长类的不同，但基本类似。

(2) 旧世界灵长类 (Old World Primates)

30 旧世界灵长类是与人亲缘关系非常密切的灵长类。已知有猕猴 (*Macaca mulatta*) 和食蟹猴 (*Macaca fascicularis*)。日本猴 (*Macaca fuscata*) 与食蟹猴同属 (猕猴属)。旧世界灵长类的发育与人的发育

酷似。

现在作为来自猿猴的 ES 细胞已经建立了绢毛猴 ES 细胞 [Thomson, J. A. 等人, Biol.Reprod. 55, 254-259, (1996)] 以及猕猴 ES 细胞 [Thomson, J. A. 等人, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 92, 7844-7848, (1995)]。然而就像上述那样, 绢毛猴是属于与人的系统离得远的新世界灵长类的动物, 胚胎和胎盘的构造也不同。另外绢毛猴由于个头小, 现状是各种实验操作不容易, 而且背景资料也少。而上述猕猴作为实验动物在日本和欧洲使用非常少, 另外繁殖有季节性, 一年也不一定看到排卵。而且在绢毛猴 ES 和猕猴 ES 细胞的制作中也存在着卵子的回收需要时间, 回收效率低的缺点。

虽然也开发了人的 ES 细胞, 但从伦理学观点看, 使用中存在着限制。

发明概述

本发明是借鉴上述以往技术形成的, 目的在于提供在灵长类、特别是人、猿猴的胚胎学研究、疾病研究、临床应用、实验模型等方面有用的来自猿猴的胚胎干细胞; 可高收率获得来自猿猴的胚胎干细胞的生产方法; 用于获得所期望的分化细胞或分化组织有用的、进行组织或细胞特异分化的试剂的筛选方法; 以及分化细胞或分化组织。

本发明的要点涉及到:

- [1] 包含 (a) 使用猿猴的卵子和精子, 利用体外受精法或显微授精法进行受精, 得到受精卵的工序,
(b) 使用工序 (a) 得到的受精卵通过体外培养法使发育成囊胚泡期胚胎的工序, 以及
(c) 通过利用工序 (b) 得到的囊胚泡期胚胎建立胚胎干细胞工序在内的工序获得来自猿猴的胚胎干细胞;
- [2] 包含 (a) 使用猿猴的卵子和精子, 利用体外受精法或显微授精法进行受精, 得到受精卵的工序,
(b) 使用工序 (a) 得到的受精卵通过体外培养法使发育成囊胚泡期胚胎的工序, 以及
(c) 利用工序 (b) 得到的囊胚泡期胚胎建立胚胎干细胞工序在内的来自猿猴胚胎干细胞的生产方法;

[3] 建立的呈现出下述特性的来自食蟹猴的细胞:

- (i) 维持未分化状态可增殖继代,
- (ii) 具有与起源的食蟹猴个体相同染色体数,
- (iii) 通过移植到 8~12 周龄 SCID 小鼠或裸小鼠的皮下、肾筋膜下
5 或睾丸确认多分化功能,
- (iv) 对 SSEA-1 呈阴性、而对 SSEA-3 和 SSEA-4 呈阳性, 以及
- (v) 检测出碱性磷酸酶活性。

[4] 用于进行组织或细胞的特异分化的试剂的筛选方法, 其特征是: 在
10 被检测物质存在下, 维持从上述 [1] 记载的来自猿猴胚胎干细胞和来自
上述 [3] 记载的食蟹猴细胞选择出的细胞, 以及

[5] 从上述 [1] 记载的胚胎干细胞和来自上述 [3] 记载的食蟹猴的细胞
选择出的胚胎干细胞分化出来的分化细胞或分化组织。

附图的简单说明

15 图 1 是表示对本发明的来自食蟹猴的胚胎干细胞进行显微镜观察
的结果的照片。上部画面表示低倍数 (100 倍) 下的观察结果, 下部画
面表示高倍数 (200 倍) 下的观察结果。

图 2 是表示通过各种手法对本发明的来自食蟹猴胚胎干细胞进行
观察的结果的照片。画面 A 和画面 B 分别表示对本发明的来自食蟹猴
20 胚胎干细胞进行显微镜观察的结果 [画面 A: 低倍数 (标尺 (Bar); 100
 μm), 画面 B: 高倍数 (标尺; 50 μm)]。画面 C 表示对本发明的来
自食蟹猴胚胎干细胞实施碱性磷酸酶染色后显微镜观察的结果 (标
尺; 100 μm)。画面 D 表示对来自本发明的食蟹猴胚胎干细胞实施
SSEA-4 免疫染色后显微镜观察的结果 (标尺; 100 μm)。

25 图 3 是表示将本发明的来自食蟹猴胚胎干细胞对小鼠进行皮下注
射后, 对形成的肿瘤进行各种染色后显微镜观察的结果的照片。画面
A~H 表示将本发明的来自食蟹猴胚胎干细胞对小鼠进行皮下注射后,
对形成的肿瘤进行 HE 染色后显微镜观察的结果。画面 A: 整个肿瘤 (标
尺; 300 μm), 画面 B: 神经上皮 (标尺; 200 μm), 画面 C: 神经胶质
30 (标尺; 200 μm), 画面 D: 腺 (标尺; 200 μm), 画面 E: 肌肉 (标尺; 200
 μm), 画面 F: 软骨 (标尺; 400 μm), 画面 G: 骨 (标尺; 200 μm),
画面 H: 绒毛上皮 (标尺; 150 μm)。画面 I~M 表示对上述肿瘤免疫

染色后进行显微镜观察的结果。画面 I: 是对神经元和神经胶质的 NSE 进行的免疫染色 (标尺; 200 μm), 画面 J: 是对神经胶质的 GFAP 进行的免疫染色 (标尺; 200 μm), 画面 K: 是对末梢神经的 NSE 进行的免疫染色 (标尺; 200 μm), 画面 L: 是对肌肉的肌纤维蛋白进行的免疫染色 (标尺; 200 μm), 画面 M: 是对软骨的 S-100 蛋白进行的免疫染色 (标尺; 400 μm)。

实施发明的最好模式

本发明使用的猿猴是指灵长类、具体是指新世界灵长类和旧世界灵长类。其中, 旧灵长类是与人亲缘关系非常密切的灵长类, 而且由于其发育类似于人的发生, 所以有望用作与人接近的疾病模型动物和种种疾病治疗剂的筛选系统。因此在本发明中, 理想的是旧世界灵长类, 如日本猴、食蟹猴等, 食蟹猴最理想。

上述日本猴、食蟹猴是与人亲缘最近的系统, 日本猴, 由于体型中等 (体重: 5~15 公斤), 容易进行外科手术, 在体力充沛这点上也有优势。另外, 由于日本猴性格温顺, 训练效果也大, 所以有在无麻醉下可进行各种实验的优点。而食蟹猴由于体型小 (体重: 3~6 公斤), 在进行各种动物实验时容易操作, 在日本和欧洲作为实验动物使用例子很多, 具有可以获得很多背景资料的优点。而食蟹猴与经过一年才能看到排卵, 即排卵有季节性的猕猴相比具有在生殖生理实验中更有用的优点。

本发明的来自猿猴胚胎干细胞可以通过包括以下工序在内的方法获得 (以下称做来自猿猴的胚胎干细胞的生产方法):

(a) 使用猿猴的卵子和精子, 利用体外受精法或显微授精法进行受精, 得到受精卵的工序,

(b) 使用工序 (a) 得到的受精卵通过体外培养法使发育成囊胚期胚胎的工序, 以及

(c) 通过利用工序 (b) 得到的囊胚期胚胎建立胚胎干细胞工序。

这样的来自猿猴的胚胎干细胞的生产方法也包括在本发明的范围内。

本发明来自猿猴胚胎干细胞的生产方法, 通过上述 (a)~(c) 工序, 本发明人发现可以以大约 40~46% 令人吃惊的高准确率从受精卵获得

囊胚泡期胚胎。另外，按照这样的见解利用本发明的生产方法可以发挥高效率发育成囊胚泡期胚胎的优越效果。因此即便与以往的方法（例如，国际公开第 96/22362 号小册子）相比也能发挥可以以极高收率地获得来自猿猴胚胎干细胞这一优越效果。

5 在工序（a）中，猿猴的卵子可以象以往那样通过开腹，看到卵巢后进行卵巢穿刺的方法，将排卵卵子从卵管摘出后，洗净，回收的方法等获得，从减少对个体的负担、缩短或消除手术后创伤治愈所需要的时间，减少个体感染的危险性的观点出发，希望通过在腹腔镜观察下对猿猴进行采卵获得。在腹腔镜观察下采卵如可以只是在腹壁上切
10 开约 1cm 的口子，将腹腔镜插入腹内，通过腹壁进行卵巢穿刺。这样一来由于容易获得局部放大图象，所以与直视下进行卵巢穿刺情况相比具有可以更正确地捕捉到穿刺部位后进行采卵的优点。另外通过这样的腹腔镜观察下采卵，采卵后对腹壁只需 1 针缝合，由于在短时间进行手术，所以从动物福祉的观点出发也是所希望的。

15 采卵用的雌性猿猴年龄往往因猿猴的种类不同也不同，但从确认定期的月经周期的观点出发，3.5 岁以上，最好是在 4 岁以上，从月经周期终止前观点出发希望在 20 岁以下，最好是在 15 岁以下。具体来说，使用日本猴时希望在 5~15 岁，而食蟹猴在 4~15 岁。

采卵时也可以使用排卵诱发剂。作为上述的排卵诱发剂如促卵泡
20 激素（FSH）、黄体形成激素（LH）、促性腺激素释放激素（GnRH）等，具体来说，如促性腺激素释放激素（GnRH）、妊娠马血清促性腺激素（PMSG）、人绝经期尿促性腺激素（hMG）、人绒毛膜促性腺激素（hCG）、黄体形成激素释放激素（LHRH）、促卵泡激素（FSH）等。这些排卵诱发剂的投药量以及投药期间根据个体的体重、使用的排卵
25 诱发剂的种类可以在发挥排卵诱发效果范围内进行适当选择。

上述工序（a）中使用的猿猴的卵子优选成熟的，达到 MII 期，细胞质均质，有弹性的。这些特性可以通过观察显微授精或体外受精过程进行评价。

30 腹腔镜观察下采卵具体来说可以象下面那样进行：向 5~15 岁雌性日本猴或 4~15 岁雌性食蟹猴皮下注射促性腺激素释放激素（GnRH）1.8~3.65mg。从注射 GnRH 2 周后开始，一天一次连续 9 天定时肌肉注射妊娠马血清促性腺激素（PMSG）（25IU/kg）、或人绝经

期尿促性腺激素 (hMG) (10IU/kg)、或促卵泡激素 (FSH) (3IU/kg)。注射 4~5 日后,用腹腔镜 (外径 3mm) 观察卵巢,确认卵泡有无发育。卵泡有无发育以能看到卵巢上出现许多薄薄白膜那样的形状,卵巢本身变大,进而子宫红色也变深作为指标进行评价。最终,注射 9 天 PMSG、hMG 或 FSH,确认卵泡发育充分后,进行一次肌肉注射人绒毛膜促性腺激素 (hCG) (400IU/kg)。注射 hCG 38~42 小时后,进行采卵。采卵可以通过对卵巢进行腹腔镜 (外径 10mm) 观察下,使用装有含有约 0.5ml 的 10% SSS (血清替代辅助液 (Serum Substitute Supplement)) 的 α -MEM 溶液的 60mm 的带有 19G 或 20G 卡特兰针的 2.5ml 注射器,对卵泡进行穿刺,吸引,与卵泡液一起回收卵子。回收后立即在实体显微镜下分离包含在卵丘细胞中的成熟卵子,移到含有 BSA 的 TALP 中。于 5% CO₂、5% O₂、90% N₂、37℃ 的条件下进行 3~4 小时的前培养,可以得到受精用的卵子。

而猿猴的精子可以从附睾采集,也可以通过电刺激法采集。上述电刺激法如下面实施例记载的直肠法、阴茎法等。具体来说如下:

直肠法

使用盐酸氯胺酮、盐酸甲苯噻嗪等代表性的麻醉剂,对雄性猿猴进行麻醉,呈仰卧位。将凝胶乳膏涂到装在电刺激器上的棒状直肠电极,将该电极轻轻插入到该猿猴的直肠。将电刺激器设定在交流电压、5~20V。断断续续地通电,从阴茎头部采集精液。

阴茎法

在无麻醉下,将雄性猿猴的四肢固定在笼子前面,将阴茎置于容易固定的位置。将电刺激器的电极置于在阴茎上,用夹子连接。断断续续通电,从阴茎头部采集精液。

上述工序 (a) 用的猿猴的精子从要获得高受精能力的观点出发,希望对精子进行活化。精子的活化可以通过咖啡因、dbc-AMP、佛司可林 (forskolin)、己酮可可碱等药物对精子进行处理来实施。在上述药物中,从具有前进性的活泼的运动性和生存率的观点出发,最好是咖啡因和 dbc-AMP 组合使用。而经上述药物对精子进行处理后,通过游泳法 (Swim up) 可以获得受精能力更高的精子。通过对上述精子进行活化,可以得到高的受精率,而即使使用未处理的缺乏运动性的精子时通过显微授精也可以发挥受精效率高的优越效果。

咖啡因和 dbC-AMP 的使用量从使运动性活化观点看对 1×10^7 个精子希望用 $10 \mu\text{M} \sim 1\text{mM}$ 。

上述所谓游泳法指的是通过离心分离将精子收集在圆底试管中后，添加含有咖啡因和 dbC-AMP 的培养基（约 0.5ml），通过置于 5 % CO_2 、 37°C 条件下的温育箱内，经过约 30 ~ 60 分钟后，收集向上泳动的精子的方法。

精子的活性可以以具有前进性的活泼的运动性现象作为指标进行评价。

猿猴精子的活化可以按照如下那样操作进行：

10 从保存有从附睾采集或通过电刺激法采集的精子的麦杆将精子与冷冻保存剂一起移到试管中后，加入含有 1mM 咖啡因和 1mM dbC-AMP 的 BSA/BWW (Biggers, Whitten and Wittinghams) 液 10ml，于 5 % CO_2 、 37°C 条件下的二氧化碳培养箱温育 30 分钟，使精子获得受精能力。然后于 1,000rpm ($200 \times g$) 离心分离 2 分钟，弃掉上清。向留下的精子中重新加入含有 1mM 咖啡因和 1mM dbC-AMP 的 BSA/BWW 约 0.5 ~ 15 10ml。将得到的精子溶液于 37°C 二氧化碳培养箱中静置 60 分钟，收集向上泳动的精子，确认精子的运动性和精子数。而精子的运动性以精子的前进性和活泼性作为指标。通过这种方式就可以对精子进行活化。

20 在工序 (a) 中，受精通过体外受精法或显微授精法进行。体外受精法按照 Torii, R. 等人 [Primates, 41, 39-47 (2000)] 记载的方法进行，而显微授精法按照 Hewitson, L. [Human Reproduction, 13, 3449-3455 (1998)] 记载的方法进行。

25 在本发明的猿猴胚胎干细胞的生产方法中从减少对卵子的影响观点出发，在实施上述体外受精法或显微授精法时，最好是使用由 TALP (蒂罗德-白蛋白-乳酸酯-丙酮酸酯 (Tyrode-Albumin-Lactate - Pyruvate)) 液、TALP-HEPES 液和 BWW 液中选择培养液。TALP 和 TALP-HEPES 液制备如下：

表 1

试剂	贮存溶液		最终溶液 (mM)	贮存液 (ml)	
	(mM)	(g/100mol)		TALP	TALP- HEPES
HEPES	—		10.0	—	240mg
NaCl	157.0	0.92	114.0	至 100ml	至 100ml
KCl	166.0	1.24	3.16	1.9	1.9
CaCl ₂	120.0	1.76	2.0	1.7	1.7
MgCl ₂ · 6H ₂ O	120.0	2.44	0.5	0.41	0.41
乳酸钠	150.0	—	10.0	6.7	6.7
水	—		—	—	7.1
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	20.5	—	0.35	1.7	1.7
葡萄糖	295.0	5.31	5.0		
NaHCO ₃	167.0	1.40	25.0(TALP)	15.0	1.2
			2.0 (TALP-HEPES)		
青霉素 G (10, 000 单位/100ml) 和酚红 (1mg/100ml)					

贮存液经高压蒸气灭菌保存。

5

在要配制 TALP 溶液前制备下述试剂:

丙酮酸钠	0.5mM	0.0055g (相对于 100ml)
庆大霉素硫酸盐 (10mg/ml)	50 μg/ml	50 μl
BSA	3 mg/ml	0.3g

10

得到的试剂经膜过滤灭菌。

另外要配制 TALP - HEPES 溶液前制备下述试剂:

丙酮酸钠	0.1mM	0.0011g (相对于 100ml)
BSA	3mg/ml	0.3g

得到的试剂经膜过滤灭菌。

在配制 TALP - HEPES 溶液时, 首先使 50ml NaCl 和 Na - HEPES (N - 2 - 羟乙基哌嗪 - N' - 2 - 乙磺酸)、酚红、青霉素 G 溶解。向得到的溶液中按规定量分别加入贮存液, 最后用 NaCl 贮存液调到 100ml。

- 5 然后用 1M NaOH 将 pH 得到的溶液调到 7.4。乳酸钠贮存液是将原液(60% 糖浆) 和水按 1 : 35 进行混合。向得到的混合液中加入 1 mg/ml 的酚红, 然后用 1M NaOH 将 pH 得到的溶液调到 7.6, 过滤灭菌。得到的试剂于 4℃ 下可保存 1 周。将 $\text{NaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 28mg 溶解于 10ml 的葡萄糖溶液中, 过滤灭菌。得到的试剂于 4℃ 下可保存 1 周。

- 10 下面表 2 给出了 BWB (Biggers, Whitten and Wittinghams) 溶液的组成。

表 2

试剂	量* (mg)
氯化钠	2,770
氯化钾	178
KH_2PO_4	81
硫酸镁	147
NaHCO_3	1,053
丙酮酸钠盐	14
D (+) - 葡萄糖 (无水)	500
青霉素 G	31
链霉素	25
DL - 乳酸钠	1,037
乳酸钙	263
酚红 1mgMerK	1

*: /500ml

15

在进行体外受精或显微授精时使用的溶液用矿物油覆盖表面, 可以起到防止卵子的溶液或精子溶液干燥, 以及温度、pH、 CO_2 、 O_2 浓度的变动的效果。

另外在工序 (a) 中, 受精时从减少对卵子的影响观点出发, 最好

是使用从 TALP 液、TALP - HEPES 液和 BWV 液中选择培养液。

有无受精以雌雄前核的存在作为指标，可以在相差倒置显微镜下通过目视进行评价。

以下给出了一例本发明中进行的体外受精法或显微授精法：

5 体外受精法

在塑料培养皿内用矿物油包被的 50 μ l 的 BSA/BWV 的培养液小滴中，含有被卵丘细胞包覆的卵子 1~5 个。然后将精子悬浮液移到培养液小滴中使精子数得到 $5.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$ 个（精子）/ml。培养液小滴用矿物油包被，然后进行受精。

10 显微授精法

(i) 卵子的制备

将回收的卵母细胞集中在含有用矿物油（Sigma Chem. co.）包被的 50 μ l 的含有 0.3%BSA 的 TALP（BSA/TALP）溶液小滴中后，于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、5%O₂、90%N₂ 的条件下进行前培养。卵子成熟的状态可以用 0.1%的透明质酸酶进行处理卵母细胞培养物，除去卵丘细胞，对回收的卵子于倒置显微镜下分为以下级数-1~4 4 类，进行评价。

级数-1：具有极体（PB）的成熟卵子、

级数-2：没有观察到 PB 和卵核泡（GV）的成熟过程中的卵子、

级数-3：观察到 GV 的未成熟卵子、

20 级数-4：形状变形显著，或细胞质表现出变性、退化性变化的卵子。

级数-1 卵子经确认后应立即供显微授精。对于级数-2 和级数-3 的卵子再集中在用矿物油包被的 50 μ l 的 BSA/TALP 的培养液小滴中后，于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、5%O₂、90%N₂ 的条件下继续培养。此时，与上述一样对卵子的成熟状态进行确认。对于未成熟卵子和级数-4 卵子希望不要用于受精。

(ii) 精子的制备

按照体外受精的方法进行。

30 (iii) 显微授精法

显微授精在装备了显微操作器的倒置显微镜下进行。

在 150mm 培养皿中依次放置培养液小滴 1: 15 μ l 稀释精子，培养

液小滴 2: 10% 聚乙烯吡咯烷酮 PBS 培养液 [PVP: 平均分子量约 360, 000] $5\ \mu\text{l} \times 3$ 个和培养液小滴 3: 卵子操纵作用的 TALP - HEPES (最终浓度 3mg/ml BSA) 溶液 $5\ \mu\text{l} \times 3$ 个, 表面用矿物油覆盖, 防止干燥, 作为显微授精的操作区。另外为了使操作温度一定, 根据需要可以使用加温步骤。

将注入用的针头装到操作精度高的 ALCAHEL 注射器上。作为注入用的针头例如人显微授精用的倾斜角度为 30 度的针头等。

作为保持卵子的针头, 如上述人显微授精用的倾斜角度为 30 度的针头、用磁性·plur (PN-30、ナリシグ公司生产) 制作的外径约为 $100\ \mu\text{m}$ 、针尖的内径约为 $15\ \mu\text{m}$ 的针头。保持上述卵子用的针头装到带有 $2000\ \mu\text{l}$ 的空气型注射器的注射器后使用。

精子在培养液小滴 1 按照显微授精的标准选择具有运动性的精子吸入之后, 将得到的精子移到培养液小滴 2, 排出。培养液小滴 2 中由于 PVP 的粘性, 精子的运动性降低。用注射器针头擦该精子的尾部, 破坏部分膜, 使精子的运动停止。将该精子与粘性高的溶液一起吸入, 移到培养液小滴 3。

将成熟的卵子加入到培养液小滴 3, 使用保持用针头, 为了不用注入用针头破坏处于极体的下部的染色体, 于该位置固定 6 或 12 小时。然后将精子置于注入用针头的针尖处, 刺入卵子。确认针头通过透明带后, 吸引卵细胞膜。确认膜发生破裂后, 将注入用针头内的内含物 (精子和卵子的细胞质) 注入。反复进行有关精子和卵子的细胞质的注入的一系列操作。一次操作对 2~3 个卵子进行显微授精。当精子和卵细胞质污染了针尖内侧时, 用培养液小滴 2 洗净。

在上述工序 (a) 后, (b) 工序使用 (a) 工序得到受精卵通过体外培养法进行使发育成囊胚期胚胎的工序。

作为体外培养法如微小悬滴培养法, 其特征是从为避免温度和二氧化碳浓度急剧变化的观点出发, 用矿物油覆盖培养液。而这样的微小悬滴培养法是在人中不能进行, 而在小鼠和兔子等实验动物中广泛采用的手法, 通过这样的培养法由于适用发育成来自猿猴的囊胚泡期胚胎, 可以发挥出能够得到预料不到的高发育率的非常好的效果。

在受精卵的培养中, 从避免由于观察培养过程可能引起的温度或 pH 变化等不必要的事件发生的观点出发, 希望在体外受精时, 在培养

开始后7~10天、优选在第8天显微受精时，培养开始7-10天，优选在第9天预料囊胚泡期胚胎出现之前停止开闭培养器门，要密闭。

囊胚泡期胚胎的出现具有与初期分裂速度成比例的倾向。

而在工序(b)的体外培养法中，在使用的培养液、培养温度、培养气相中也有一大特征。

在工序(b)中，希望使用CMRL-1066、TCM-199、DMEM、 α -MEM等，实施体外培养法。特别是使用CMRL-1066的体外培养法更好。而CMRL-1066溶液制备如下：

将L-谷氨酰胺0.014615g(1mM)溶解于10ml的A液[青霉素G(1000单位)]、庆大霉素硫酸盐(10mg/ml)0.5ml、CMRL-1066(10 \times) (无NaHCO₃和L-谷氨酰胺)10ml、NaHCO₃0.218g、乳酸钠(290mOsmol's stock)6.7ml、用水调到100ml(用量筒)。然后对得到的溶液过滤灭菌。向1ml灭菌后的溶液加入A液9ml，得到总量为10ml的B液。将丙酮酸钠0.0055g(终浓度5mM)加到B液中溶解，得到C液。将C液8ml和BCS(胎牛血清)2ml混合。对得到的混合物过滤灭菌，得到CMRL-1066液。

而作为培养液，从降低对卵子的影响的观点出发，希望使用从TALP液、TALP-HEPES液和BWW液中选择出的培养液。作为上述培养液具体来说如TALP和CMRL-1066组合的培养液。如果利用这样的TALP和CMRL-1066组合的培养液，经确认受精后通过使用该培养液，在看到从桑椹胚向囊胚泡期胚胎的发育，而且可以得到受精胚胎的40~46%的非常高的发育率方面是有利的。

培养温度从缩短发育所需要的时间的观点以及使桑椹胚向囊胚泡期胚胎发育的观点出发，37℃以上为好，最好是在37.5℃以上、38.5℃以下，最好是在38.2℃以下。具体来说，通过在38℃进行培养，通过体外受精7天后，显微授精第8天后，可以高效地获得囊胚泡期胚胎。

培养气相从使桑椹胚向囊胚泡期胚发育或提高发育的观点出发，低氧气相为好，具体来说，与通常制作ES细胞时所用的培养气相相比，通过O₂浓度低、即5%CO₂、5%O₂、90%N₂的气相可以发挥能够获得令人吃惊的高效率的囊胚泡期胚的极好效果。

而(c)是使用工序(b)得到的囊胚泡期胚胎建立胚胎干细胞的

工序。在工序(c)中,通过将(b)得到的囊胚泡期胚胎得到的内部细胞块在滋养细胞上或白血球增殖抑制因子[也可以表示为LIF、分化抑制因子(DIF)]培养,可以建立胚胎干细胞。

在从囊胚泡期胚取得内部细胞块时,最好使用除去透明带的囊胚泡期胚。上述透明带也可以通过使用透明质酸酶、链霉蛋白酶、酸性蒂罗德溶液等进行处理除去。在用透明质酸酶、链霉蛋白酶、酸性蒂罗德溶液等除去透明带时,例如可以将囊胚泡期胚在含有适当浓度的透明质酸酶、链霉蛋白酶、酸性蒂罗德溶液等M2培养液[例如,参照D.M.Glover等人编写,DNA Cloning 4 Mammalian Systems A Practical Approach第2版(1995)等文献]中进行温育。透明带除去后,对得到的囊胚泡期胚适当地用磷酸缓冲生理盐水洗净。

为了从没有透明带的囊胚泡期胚对内部细胞块进行分离,例如可以对该囊胚泡期胚实施免疫手术。然后用移液管将内胚层系的细胞剥离,得到的内部细胞块在滋养细胞上培养1周,增殖的内部细胞块用胰蛋白酶处理(例如,用0.25重量%胰蛋白酶+0.5mMEDTA等处理),作成由3~4个细胞构成的块,再将这些细胞于滋养细胞上培养。

作为免疫手术用的抗血清如兔抗猴血清,具体来说,如兔抗日本猴血清、兔抗食蟹猴血清等。将囊胚泡期胚胎移至上述抗血清用M16培养液[参照上述DNA Cloning 4 Mammalian Systems A Practical Approach等]稀释20倍的溶液中,通过于37℃下温育30分钟,可以对内部细胞块进行分离。根据需要,使用玻璃针在显微镜下通过物理方法也可以将营养外胚层除去。

作为滋养细胞如通过对妊娠12~16日的小鼠胎儿成纤维细胞株的初代培养细胞、作为小鼠胎儿成纤维细胞株的STO等进行丝裂霉素C或X射线处理之后得到的细胞等。这种来自小鼠的滋养细胞在能够大量制备这一点上对实验等是有利的。

上述滋养细胞的制作例如可以通过下述实施例记载的方法等进行。

滋养细胞例如可以使用MEM培养基(Minimum Essential Medium Eagle)播种到明胶包被的培养容器中。可以将滋养细胞播种到没有间隙那样覆盖整个培养容器的程度。

上述内部细胞块播种到将已播种上述滋养细胞的培养容器中MEM

培养基换成 ES 细胞培养用培养基 [ES 细胞培养基、表 3] 的滋养细胞上。

表 3

ES 细胞培养基的组成

产品名	添加量
DMEM/F12 (Sigma 公司生产)	500ml
FBS (JRH BIOSCIENCES)	75ml
谷氨酰胺 (Sigma 公司生产; 200mM)	5ml
青霉素 (Sigma 公司生产; 10,000IU/ml)	5ml
链霉素 (Sigma 公司生产; 10mg/ml) 混合物	5ml
丙酮酸钠 (Sigma 公司生产; 100mM)	5ml
碳酸氢钠 (Sigma 公司生产; 7.5%)	8ml
2-巯基乙醇 (Sigma 公司生产; 终浓度 10^{-4} M)	4 μ l
LIF (ESGRO 公司生产; 终浓度 1000U/ml)	0.5ml 含有 10^6 U/ml

5

细胞的培养条件可以是通常的小鼠 ES 细胞的培养条件。例如在 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 条件下培养 7 天。而从不妨碍内部细胞块的着床的观点出发，希望从培养开始后 3 天内不换培养液，每日在显微镜下观察着床状况。而根据细胞增殖依次在大尺寸的培养皿中进行继代培养。

10

以下进行胚胎干细胞的鉴定和评价。而评价的标准例子如下所示。

评价标准的例子

核型 (karyotype)

15 染色体数没有异常。通常要研究与作为起源的猿猴染色体数 ($2n = 42$) 是否具有同样的数目。

多分化能力:

20 例如，将认为是胚胎干细胞的细胞 ($1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个) 注射到 8 ~ 12 周龄的 SCID 小鼠或裸鼠的皮下、肾筋膜下或睾丸，研究 5 ~ 16 周后有无肿瘤形成，有肿瘤形成时，通过对该肿瘤进行组织学检查，研究分化能力。而通过除去滋养细胞，或通过添加视黄酸等分化诱导剂可以研究各种分化能力，可以对多分化能力进行评价。

形态学特征:

1. 表现出高的核/细胞质比、显著的核仁、集落形成。
2. 与小鼠 ES 细胞相比, 集落形态为扁平。

图 1 和图 2 的画面 A 和画面 B 给出了上述形态学特征。

5

细胞表面标记的出现:

阴性对照: SSEA - 1

阳性对照: SSEA - 3、SSEA - 4

- 上述细胞表面标记分别是作为阶段特异的胚胎抗原的糖脂细胞表面标记。通过用这样的标记作为抗原, 制备各个抗体, 通过常用的免疫染色等可以检测。

碱性磷酸酶活性:

可以通过常用的碱性磷酸酶染色检测。

- 15 作为本发明的来自猿猴的胚胎干细胞, 具体表现出下述特性的建立的来自食蟹猴的细胞, 具体如胚胎干细胞;

(i) 可维持未分化状态进行增殖继代、

(ii) 具有与起源的食蟹猴个体相同的染色体数、

- 20 (iii) 通过移植到 8~12 周龄的 SCID 小鼠或裸鼠的皮下、肾筋膜下或睾丸, 可以确认多分化能力、

(iv) 对 SSEA - 1 呈阴性, 而对 SSEA - 3、SSEA - 4 呈阳性、以及

(v) 检测出碱性磷酸酶活性

- 25 这样的来自食蟹猴的胚胎干细胞具有 (vi) 表现出高的核/细胞质比、显著的核小体、集落形成, 而且与小鼠 ES 细胞相比, 集落形态为扁平的形态学特征[例如, 参照图 1 和图 2 的画面 A 和画面 B]。

- 30 本发明建立的来自食蟹猴的胚胎干细胞移植到 8~12 周龄的 SCID 小鼠或裸鼠的皮下、肾筋膜下或睾丸时, 表现出向来自外胚层的细胞、来自中胚层细胞、来自内胚层细胞等的分化能力, 更具体来说, 例如表现出向神经元、神经胶质、肌肉、软骨、骨、纤毛上皮、肠道上皮等的分化能力。

本发明建立的来自食蟹猴的胚胎干细胞有望用于疾病模型动物的制作、移植用组织的制作。

本发明的来自食蟹猴的胚胎干细胞可以用于对进行组织或细胞、最好是来自灵长类的组织或细胞的特异分化的试剂进行筛选。本发明中也包括用于进行组织或细胞的特异分化的试剂的筛选的方法。

5 本发明的用于进行组织或细胞的特异分化的试剂的筛选方法的一个特征是在被检测物质存在下，维持本发明的胚胎干细胞。

在本发明的筛选法中，由于使用本发明的胚胎干细胞，不仅在灵长类、特别是在人、猿猴的胚胎学的研究、疾病研究、临床应用、实验模型等是有用的，而且发挥出对要获得所期望的分化细胞或分化组织使用的有用的试剂进行筛选的非常好的效果。

10 在本发明的筛选法中由胚胎干细胞向所期望的组织或细胞特异分化，例如可以在所期望的组织或细胞中出现的标记作为指标进行评价。作为上述所期望的组织或细胞的标记如组织或细胞特异抗原。作为上述所期望的组织或细胞的标记如作为神经系统细胞的标记如神经元特异的烯醇化酶、神经胶质纤维性酸性蛋白质、巢蛋白（ネスチン）
15 等，作为软骨的标记如 S-100 蛋白质、酒石酸抗性酸磷酸酶等，作为肌肉的标记如肌纤维蛋白、肌肉特异的肌动蛋白等。这样特异的标记使用针对该标记的抗体通过常用的 ELISA、免疫染色等也可以检测，也可以使用编码该标记的核酸，通过常用的 RT-PCR、DNA 分析杂化等检测。而所谓核酸是指基因组 DNA、RNA、mRNA 或 cDNA。

20 通过上述筛选方法得到的试剂也包括在本发明的范围。这些试剂有望应用于再生医学领域。

而由本发明的胚胎干细胞分化的细胞或组织也包括在本发明的范围内。

25 前述分化细胞和分化组织，通过上述组织或细胞特异标记的表达，观察其形态学特征可检测出。

上述分化细胞和分化组织由于是与人类亲缘近的猿猴细胞和组织，适合用于针对各种药剂的各种实验的被检测体，组织或细胞的移植模型等。

30 以下通过实施例等进一步详细地对本发明进行说明，但本发明并不受这些实施例的任何限定。而在以下的实施例等中，「%」在没有特别说明时表示重量%。而在 CO₂、O₂ 和 N₂ 中「%」表示体积%。

实施例1 食蟹猴的囊胚泡期胚胎的制作方法

5 猿猴类与小鼠、大鼠或兔等实验动物不同，目前利用卵管或子宫环流的受精卵回收法还没有确立。而且已经知道从子宫内回收排卵周期的体内受精卵的方法效率极低。

本发明为了获得适合于建立胚胎干细胞的囊胚泡期胚胎，对通过体外授精法和显微授精法进行受精，然后对通过体外培养法使发育成囊胚泡期胚胎的方法进行了研究。

10

(1) 卵巢刺激法

将促性腺激素释放激素 (GnRH) [商品名: Leuplin、武田药品工业 (株) 公司生产; 或商品名: Sprecur, Hoechst Marion Roussel 公司生产] 1.8mg 注入雌性食蟹猴 (4~15 龄) 皮下。从注入 GnRH 2 15 周后开始一天一次连续 9 天, 在每天的一定时刻 (在本实施例中是傍晚时刻) 肌肉注射妊娠马血清促性腺激素 (PMSG) [商品名: Serotropin、帝国脏器制药 (株) 公司生产] (25IU/kg)、或人绝经期尿促性腺激素 (hMG) [Pergonal, 帝国脏器制药 (株) 公司生产] (10IU/kg)、或促卵泡激素 (FSH) [Fertinorm, Serono Laboratories 20 公司生产] (3IU/kg)。注入 5 日后, 用腹腔镜 (外径 3mm) 观察卵巢, 确认卵泡有无发育。

然后, 注入 PMSG、hMG 或 FSH, 确认卵泡发育充分后, 进行一次肌肉注射人绒毛膜促性腺激素 (hCG) [商品名: Puberogen、三共 (株) 公司生产] (400IU/kg)。注射 hCG 40 小时后, 进行采卵。

25 采卵可以通过对卵巢进行腹腔镜 (外径 10mm) 观察下, 使用装有含有约 0.5ml 的 10% SSS (Irvine Scientific Sales Inc. 公司生产) 的 α -MEM (α -调节的 Eagles 培养基, ICD Biomedical Inc. 生产) 溶液的 60mm 的带有 19G 或 20G 卡特兰针的 2.5ml 注射器, 对卵泡穿刺, 吸引, 与卵泡液一起回收卵子。

30 回收后立即在实体显微镜下分离包含在卵丘细胞中的成熟卵子, 移到含有 0.3% BSA 的 TALP (以下表示为 BSA/TALP) 中。于 5% CO₂、5% O₂、90% N₂、37℃ 的条件下进行 3~4 小时的前培养。

象以上那样，在腹腔镜观察下采卵只是在腹壁上切开约 1cm 的口，从切口处插入腹腔镜，通过腹壁实施卵巢穿刺进行采卵。

另外作为采卵方法，通常如果采卵对象是小鼠，是采用摘出子宫后，进行卵管灌流的卵巢摘出法，而如果是人是通过使用超声波装置的卵巢穿刺法进行的。然而猿猴类由于个体数有限，所以有时不能使用卵巢摘出法。而由于体躯比人小，使用超声波诊断装置的方法非常困难。因此作为在国内外用于猴类的体外受精的未受精卵的回收方法通常都是通过开腹，在直视卵巢下的卵巢穿刺法。然而该方法存在着①使个体负担大、②手术后的创伤治愈需要时间、③感染的危险性大等缺点。

与上述方法相比，本实施例中的方法不用说可以得到比直视下更扩大的图象。因此可以正确地捕捉到穿刺部位进行采卵。而在采卵后由于只是对腹壁进行 1 针缝合，时间非常短就可以结束了，所以从爱护动物的观点出发是个非常有用的方法。

15

(2) 精子的采集

(i) 从附睾的采集法

在采集雄性食蟹猴（10~15 龄）的附睾后，立即将装有 23G 针头的 1ml 注射器插入精管，慢慢地注入含有 0.3% BSA 的 BWB（以下表示为 BSA/BWB），切断附睾尾部，采集流出的精液。

20

(ii) 利用电刺激法的采集法

i) 直肠法

使用盐酸氯胺酮、盐酸甲苯噻嗪（分别为 5mg/kg 和 1mg/kg）对雄性食蟹猴（10~15 龄）进行麻醉，呈仰卧位。将凝胶乳膏涂到装在电刺激器上的棒状直肠电极，将该电极轻轻插入到上述猿猴的直肠。用灭菌的生理盐水洗净阴茎，用纸巾擦干，将阴茎的前端放入试管（50ml）中。然后将电刺激器设定在交流电压、5V 之后通电。通电 3~5 秒后，停 5 秒。反复操作最多进行 3 次。看到射精时结束。没有看到射精时，将电压设定为 10V 进行同样的操作。还没有看到射精时就将电压设定为 15V、20V 进行同样的操作。

30

ii) 阴茎法

在无麻醉下，将雄性食蟹猴（10~15龄）的四肢固定在笼子前面，将阴茎置于容易固定的位置。带着手术用橡胶手套，用无菌生理盐水洗净阴茎，用纸巾擦干。准备电刺激器，将电极装到阴茎上，用夹子夹在一起。通电，首先在直流电压 5V 下每隔 1 秒反复进行开-关，同时渐渐地缩短间隔操作。没有看到射精时，在 10V、15V、20V 下进行同样操作。还没有看到射精时用交流反复进行同样操作。

(3) 精液采集后的处理和冷冻保存法 (Torii et al.1998)

将利用直肠法或阴茎法采集的精液于 37℃ 的二氧化碳培养箱内静置约 30 分钟。只采集液体成分，加入含有 0.3% BSA 的 BWB (Biggers, Whitten and Wittinghams) (BSA/BWB) 培养液约 1~2ml 调制精子溶液后，静静地铺在 80% 珀可 (percoll) (American Permacia Biotech Inc. 生产) 2.5ml 和 60% 珀可 2.5ml 液体上。将得到的混合物于 1400rpm、室温下离心分离 20 分钟后，试管内底部约残留 0.5ml，吸引除去上层。再添加约 10ml BSA/BWB，轻轻混合。得到的混合物于 1400rpm、室温下离心分离 3 分钟后，试管内底部约残留 0.5ml，吸引除去上层。

向得到的精子中加入适量的 BSA/BWB 使精子数变为约 $5 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^8$ 个，制备精子溶液，于 4℃ 下静置约 60~90 分钟。然后于冰水中慢慢地滴入精子溶液 1/5 量的含有 TTE-G 溶液 [含有终浓度 12% 甘油的 TTE 培养基 (100ml 培养基中的组成: Tes 1.2g、Tris-HCl 0.2g、葡萄糖 2g、乳糖 2g、蜜三糖 0.2g、卵黄 20ml、青霉素 G10,000IU、链霉素硫酸盐 5mg)]，静置 5 分钟。反复进行 5 次上述的 TTE-G 溶液的滴入和静置。

冰水中放置 60~90 分钟后，将得到的精子溶液装入 0.25 或 0.5ml 的麦杆吸管。将麦杆吸管于液氮容器的上部维持约 5 分钟后，再于液氮上面维持 5 分钟。然后将上述麦杆吸管投入到液氮中保存。

(4) 体外受精用精子的制备

从液氮中取出的麦杆吸管一旦于室温下保持 30 秒后，就投入到 37℃ 的温浴中，保持 30 秒钟，使保存精子溶液融解。然后向上述麦杆吸管加入含有 1mM 咖啡因 (Sigma 公司生产) 和 1mM dbc-AMP (Sigma 公

司生产)的BSA/BWW 10ml,于37℃条件下的二氧化碳培养箱温育30分钟,使精子获得受精能力。

然后于1,000rpm(200g)离心分离精子溶液2分钟,弃掉上清。向留下的精子中重新加入含有1mM咖啡因和1mMdbC-AMP的BSA/BWW约0.5~1ml。将得到的精子溶液于37℃二氧化碳培养箱中静置60分钟,收集向上泳动的精子,确认精子的运动性和精子数。这样一来就获得了体外受精用精子。

(5) 受精方法

10 1) 体外受精法

在塑料培养皿内用矿物油包被的50 μ l BSA/BWW的培养液小滴中,加入被卵丘细胞包裹的卵子1~5个。然后将精子悬浮液移到培养液小滴中使精子数达到 $5.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$ 个(精子)/ml。培养液小滴用矿物油包被,然后进行受精。

15 受精后的卵子于37℃、5%CO₂、5%O₂、90%N₂的培养箱中进行培养。受精5小时后,将BWW液换成TALP液,确认是否受精。结果以约45%的高受精率获得受精卵。对于确认受精的卵子培养约20小时之后,移至CMRL-1066液中继续培养。

20 2) 显微授精法

(i) 卵子的制备

将回收的卵母细胞集中在含有用矿物油(Sigma公司生产)包被的50 μ l的含有0.3%BSA的TALP(BSA/TALP)培养液小滴中后,于37℃、5%CO₂、5%O₂、90%N₂的条件下进行2~4小时前培养。

25 为了确认卵子成熟的状态可以用将卵母细胞培养物加到含有0.1%的透明质酸酶(Sigma公司生产)的TALP-HEPES溶液中1分钟,用移液管除去卵丘细胞,回收的卵子用倒置显微镜分为以下级数-1~4类。

- 级数-1: 具有极体(PB)的成熟卵子、
- 30 级数-2: 没有观察到PB和卵核胞(GV)的成熟过程中的卵子、
- 级数-3: 观察到GV的未成熟卵子、
- 级数-4: 形状变形显著,或细胞质表现出变性、退行性变化的卵

子。

级数-1 卵子经确认后立即供显微授精测试。对于级数-2 和级数-3 的卵子再集中在用矿物油包被的 $50\mu\text{l}$ 的 BSA/TALP 的培养液小滴中后，于 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 、 $5\%\text{O}_2$ 、 $90\%\text{N}_2$ 的条件下继续培养。培养 24 小时后，对卵子的成熟状态进行确认。此时成熟的卵子供受精实验用。对于其余未成熟卵子和级数-4 卵子不能用于受精实验。

(ii) 精子的制备

按照体外受精的方法进行。

(iii) 显微授精法

在装备了 Narishige 公司生产的显微操作器的倒置显微镜下 IX70 进行显微授精。

在 150mm 培养皿中依次放置培养液小滴 1: $15\mu\text{l}$ 稀释精子，培养液小滴 2: 10% 聚乙烯吡咯烷酮 PBS 培养液 [PVP: 平均分子量约 360,000, Nacalaitesque 公司] $5\mu\text{l} \times 3$ 个和培养液小滴 3: 卵子操作用的 TALP - HEPES (最终浓度 $3\text{mg}/\text{ml}$ BSA) 溶液 $5\mu\text{l} \times 3$ 个，表面用矿物油覆盖，防止干燥，作为显微授精的操作区。另外本实施例中，为了使操作温度一定，根据需要可以使用加温步骤。

作为注入用的针头使用人显微授精用的倾斜角度为 30° 的针头 (外径约 $7\sim 8\mu\text{m}$ 、内径 $5\sim 7\mu\text{m}$ ，メデイー・コンインタ-ナショナル公司生产)。将上述针头装到动作精度高的 ALCATEL 注射器上。

作为保持卵子的针头，使用上述同样的人显微授精用的倾斜角度为 30° 的针头、或用磁性・plur (PN-30、Narishige 公司生产) 制作的外径约为 $100\mu\text{m}$ 、针尖的内径约为 $15\mu\text{m}$ 的针头。上述针头装到带有 $2000\mu\text{l}$ 的空气型注射器的 Narishige 注射器上。

在培养液小滴 1 按照人显微授精的标准选择具有运动性的精子吸入之后，将得到的精子移到培养液小滴 2，排出。在培养液小滴 2 中由于 PVP 的粘性，精子的运动性降低。用注射器针头擦该精子的尾部，破坏部分膜，使精子的运动停止。将该精子与粘性高的溶液一起吸入，移到培养液小滴 3。

将成熟的卵子加入到培养液小滴 3，使用保持用针头，为了不用注入用针头破坏处于极体的下部的染色体，于该位置固定 6 或 12 小时。然后将精子置于注入用针头的前端，将该精子刺入卵子。确认针头通过透明带后，吸引卵细胞膜。确认膜发生破裂后，将注入用针头内的内含物（精子和卵子的细胞质）注入。反复进行有关精子和卵子的细胞质的注入的一系列操作。一次操作对 2~3 个卵子进行显微授精。当精子和卵细胞质污染了针尖内侧时，用培养液小滴 2 洗净。

将显微授精的卵子立即放回到培养箱中，于 37℃、5% CO₂、5% O₂、90% N₂ 的条件下开始培养。显微授精后立即在 60mm 未覆盖的培养皿中制作 50 μl 的 CMRL-1066 溶液的培养液小滴，然后用液体石蜡包被。而培养液小滴与气相的平衡原则上进行 3 小时以上。在显微授精后 24 小时，由 TALP 溶液移至上述 CMRL-1066 溶液的培养液小滴，在二氧化碳培养箱中于 37℃、5% CO₂、5% O₂、90% N₂ 的条件下一直密封培养 8 天。结果以约 75~85% 的高受精率获得受精卵。

象上述那样当进行猿猴类的体外受精、显微授精时，进行了精子的活化。对于小鼠和人，在进行通常的体外受精、显微授精时可以直接使用精子，但在本实施例中为了获得更高的受精率，通过咖啡因和 dbc-AMP 进行了活化，通过游泳法获得受精能力更高的精子。通过加入该操作，表明在体外受精中可以得到高的受精率。而对于缺乏运动性不适合体外受精的精子也可通过同样的处理通过显微授精获得高效率受精。该方法表明在供给受精率不好的精子时是非常有效的。

(6) 培养方法

在体外受精和显微授精中确认受精后，进行培养时为避免温度和二氧化碳浓度急剧变化，在人中不能进行，而在小鼠和兔子等实验动物中广泛采用的用矿物油覆盖培养基的微小悬滴培养法。为避免由于观察培养过程可能引起的温度或 pH 变化等不必要的事件发生，在体外受精培养开始后 7 天、显微授精培养开始后 8 天，在预料囊胚泡期胚出现之前不要开闭培养器门，要密闭进行培养。

这里使用的培养液、培养温度、培养气相如下。

培养液：TALP 和 CMRL-1066

通常对于小鼠使用 BWB 和对于人使用 P1（ナカメデイカル公司生

产)、胚细胞基质(ナカメデイカル公司生产)以及新开发的HFF(人卵泡液(human follicular fluid)、扶桑药品(株)公司生产),结果表明能顺利进行受精和分裂,直至发育成桑椹胚。确认受精后通过使用TALP和CMRL-1066组合的培养液表明能够看到向囊胚泡期胚胎的发育,而且得到受精胚的40~46%的极高的发育率。在培养箱外的操作通过不使用磷酸缓冲液体系的PBS而使用HEPES缓冲液体系的TALP,可以减少对卵子的坏影响。

培养温度: 38℃

对于小鼠和人通常培养温度为37℃,在这个温度下发育缓慢,而且完全不会向桑椹胚以后发育。因此与在38.5℃进行胚胎培养的牛等同样,通过在38℃和稍高的温度进行培养,体外受精7天后,显微授精8天后可以得到囊胚泡期胚胎。

培养气相: 5% CO₂、5% O₂、90% N₂

在通常利用的5% CO₂、95%空气的条件下,发育停止在桑椹胚,但通过在5% CO₂、5% O₂、90% N₂下进行培养,能够看到向囊胚泡期胚胎发育的高发育率。

实施例2 猿猴ES细胞建立法

(1) 滋养细胞的制作

将从12.5日龄的小鼠胚胎得到的初代胚成纤维细胞(以下也称为PEFs)于含有10%胎牛血清(FBS)的MEM培养基中经初代~3代培养至铺满为止。然后于含有终浓度10μg/ml丝裂霉素C(MMC)的MEM培养基中对PEFs培养2~3小时,对细胞分裂进行钝化。然后除去含有MMC的培养基,将细胞用PBS洗3次。通过胰蛋白酶处理(0.05%胰蛋白酶、1mM EDTA),将洗净后的细胞从培养皿剥离下来,对细胞进行计数。

明胶包被的24孔培养皿的各个孔中播种 2×10^4 个经MMC处理的PEFs。

就得到的细胞实际播种到培养皿上,在确认比较合适的细胞数后对鼠ES细胞进行培养,研究其性质。结果表明增殖能力良好,由于维持未分化状态,得到的细胞适合作为滋养细胞。而培养至3代以下(初代~3代)的滋养细胞好用。

(2) 从猴囊胚泡期胚胎分离内部细胞块

将除去透明带的囊胚泡期胚胎移至含有最终浓度为 0.5% 的链霉蛋白酶或蒂罗德 (Tyrode) 溶液的 M2 培养液 [例如, 参照 D.M. Glover 等人编写, DNA Cloning 4 Mammalian Systems A Practical Approach 第 2 版 (1995) 等文献] 中, 37℃ 下进行温育 10 分钟。对于还残留透明带的囊胚泡期胚于 37℃ 下用链霉蛋白酶处理 5 分钟。确认除去透明带后, 得到的囊胚泡期胚胎用 PBS 洗 2 次。

然后将囊胚泡期胚移至用 M16 培养液 [上述 DNA Cloning 4 Mammalian Systems A Practical Approach] 稀释兔抗食蟹猴淋巴球蛋白血清 20 倍的溶液中, 于 37℃ 下温育 30 分钟。然后得到的囊胚泡期胚用 PBS 洗 3 次。将囊胚泡期胚移至用 M16 培养液稀释 50 倍的补体溶液中, 于 37℃ 下温育 30 分钟。得到的囊胚泡期胚用 PBS 洗 3 次。当囊胚泡期胚的营养外胚层没有完全除去时, 使用玻璃针在显微镜下通过物理方法也可以将营养外胚层除去。通过这样方式对内部细胞块 (Inner Cell Mass; ICM) 进行分离

(3) 猴内部细胞块的培养

从播种了 (1) 中得到的滋养细胞的 24 孔培养皿中除去 MEM 培养基, 然后每孔各加入 800 μ l 的 ES 细胞培养基 [表 3]。

接下来用微量移液管将 (2) 中得到的 ICM 移至各个孔中 (每孔一个), 于 37℃、5% CO₂ 条件下培养 7 天。为了不妨碍 ICM 的着床, 从培养开始后 3 天内不换培养液, 每日在显微镜下观察着床状况。

在培养第 7 天进行 ICM 细胞的解离。从孔中除去 ES 细胞培养基, 用 PBS 洗 1 次。向孔中加入 300 μ l 的 0.25% 胰蛋白酶/0.02% EDTA, 然后立即除去。对 24 孔培养皿于 37℃ 下温育 1 分钟。在显微镜下对细胞的解离进行确认后, 向孔中加入 500 μ l 的 ES 细胞培养基, 用移液管充分搅拌。

向预先播种了滋养细胞的 24 孔培养皿的孔中移入上述的全细胞。添加 300 μ l 的 ES 细胞培养基, 加了总计 800 μ l 的 ES 细胞培养基后, 充分混合使其不出现细胞播种的痕迹。每 2 天更换一次 ES 细胞培养基。解离后, 于 7 天内认为是 ES 细胞的细胞团增殖, 以集落出现, 每日进行观察。

如果出现 ES 细胞集落，对 24 孔培养皿上的细胞进行胰蛋白酶处理，反复进行继代培养。其间，每天或每 2 天一次更换 ES 细胞培养基。结果从食蟹猴囊胚泡期胚胎可以得到许多 ES 细胞株。

5 实施例 3 猿猴 ES 细胞的评价

(1) 食蟹猴 ES 细胞

核型 (karyotype)

研究染色体数是否正常 (与作为起源的猴染色体数同样的数: $2n = 42$)。结果表明建立的 ES 细胞株保持正常的核型。

10 多分化能力:

将 1×10^6 个食蟹猴 ES 细胞注射到 8 周龄的 SCID 鼠颈部皮下。在注射 5~12 周后确认有肿瘤形成。将上述肿瘤用布郎 (ブラン) 液固定后，切成薄片，实施苏木精嗜红染色 (HE 染色) 或免疫染色，进行组织学检查。而在免疫染色中，由于能够利用的猴组织特异抗体极少，
15 所以使用针对人神经元特异的烯醇化酶 (NSE) 的抗体、针对神经胶质纤维性酸性蛋白质 (GFAP) 的抗体，针对 S-100 蛋白质的抗体和针对肌纤维蛋白的抗体。

其结果表明形成的肿瘤是由来自外胚层 (神经元、神经胶质)、中胚层 (肌肉、软骨、骨) 和内胚层 (纤毛上皮、肠道上皮) 的细胞群构成的畸胎瘤。而在免疫学检查中神经元可以通过针对 NSE 的抗体、而神经胶质可以通过针对 NSE 的抗体和针对 GFAP 抗体，末梢神经可以通过针对 NSE 的抗体，软骨可以通过针对 S-100 蛋白质的抗体，肌肉可以通过针对肌纤维蛋白的抗体检测。以上结果表明食蟹猴 ES 细胞具有向来自外胚层的细胞、来自中胚层的细胞、来自内胚层的细胞等，
25 更具体来说向神经元、神经胶质、肌肉、软骨、骨、绒毛上皮、肠道上皮等的多分化能力。

图 3 的画面 A~H 给出了上述 HE 染色后显微镜观察的结果，图 3 画面 I~M 分别给出了免疫后的显微镜观察的结果。

形态学特征:

30 图 1 和图 2 的画面 A 和画面 B 给出了下述形态学特征:

1. 表现出高的核/细胞质比、显著的核仁、集落形成。
2. 与鼠 ES 细胞相比，集落形态为扁平。

细胞表面标记的出现:

为了确认有无作为细胞表面标记的阶段特异胚胎抗体 (Stage-specific embryonic antigens) (SSEA), 使用针对 SSEA-1 (阴性对照)、SSEA-3、SSEA-4 的各个细胞表面标记的抗体, 进行免疫染色。这些抗体从 The Developmental Studies Hybridoma Bank of the national Institute of Child Health and Human Development 获得。对于 SSEA 的各个细胞表面标记通过以下操作进行评价: 使 4% 对-甲醛固定的细胞和一次抗体反应。然后使过氧化物酶和二次抗体结合的标记聚合物 (シンプルステイン P0, ニチレイ公司生产) 与氨基酸聚合物反应后, 加入シンプルステイン DAB 溶液 (ニチレイ公司生产) 进行检测。

结果没有检测出 SSEA-1, 而检测出了 SSEA-3 和 SSEA-4。

所述免疫染色的 SSEA-4 的检出结果如图 2 的画面 D 所示。

碱性磷酸酶活性:

以 Fast-Red TR SaH 作为底物, 使用 HNPP (ロッシユ公司生产) 测定碱性磷酸酶活性。结果检测出碱性磷酸酶活性。图 2 中的画面 C 给出了这些检测结果。

产业上利用的可能性

本发明的来自猴胚胎干细胞在灵长类、特别是人、猿猴的胚胎学研究、疾病研究、临床应用、实验模型等方面是有用的; 利用本发明的来自猴干细胞的生产方法, 由于可以高收率获得来自猿猴的干细胞, 有望用于灵长类胚胎学的研究、疾病研究、以及应用于临床和实验模型等。另外根据本发明的用于进行对组织或细胞特异分化用试剂的筛选方法, 可用于为获得所期望的分化细胞或分化组织, 进行组织或细胞特异分化的试剂的筛选。

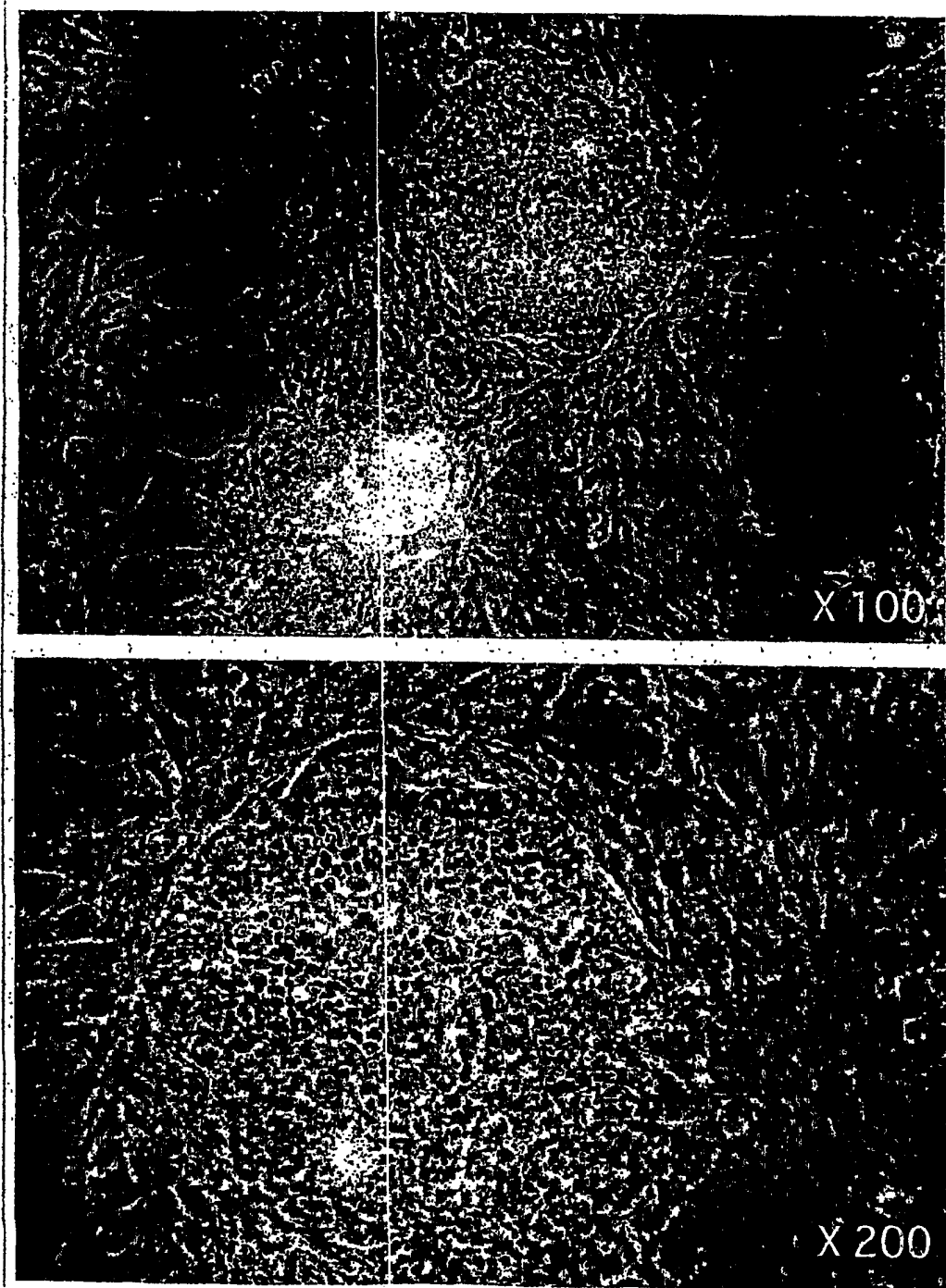


图 1

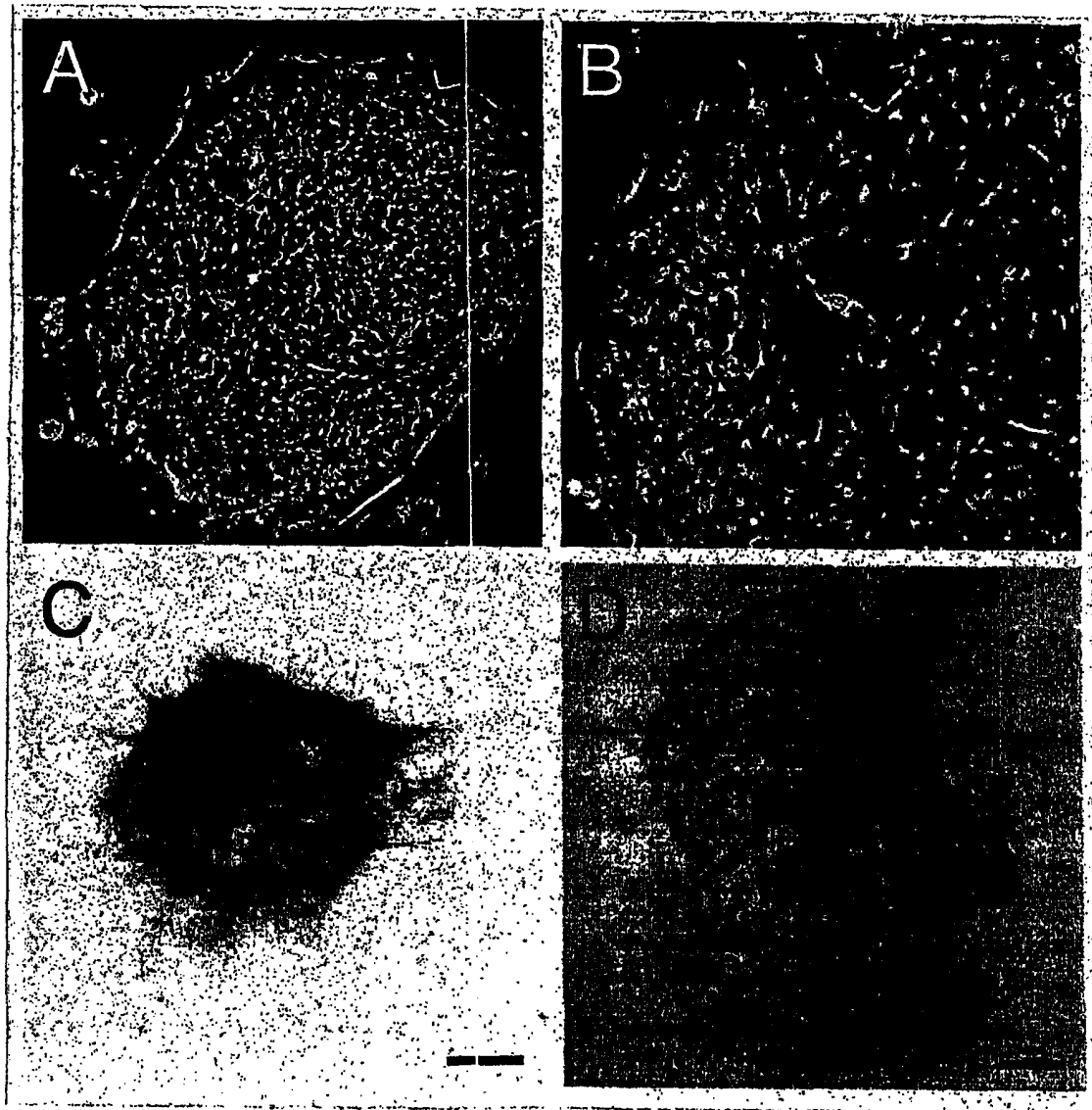


图 2

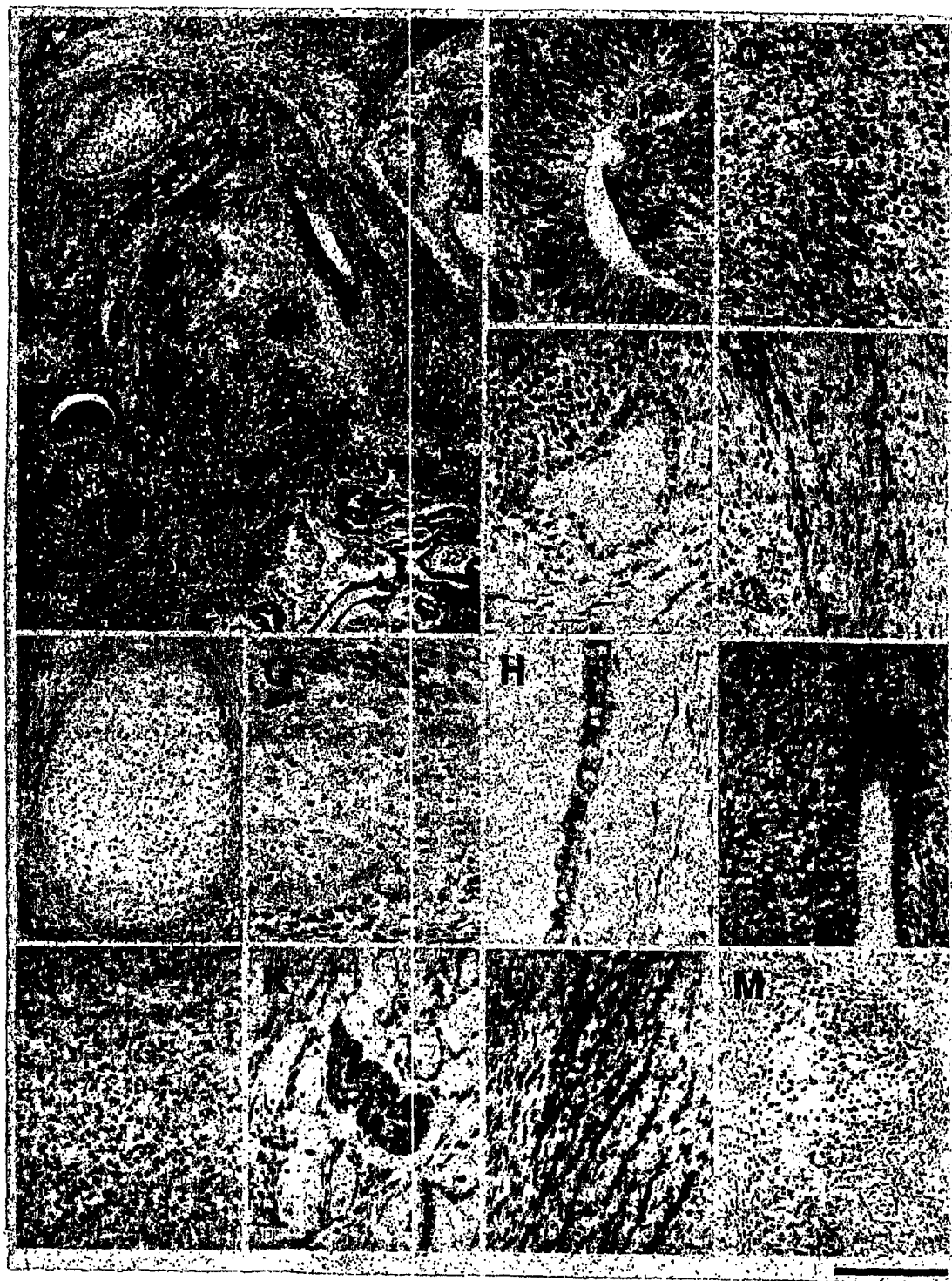


图 3