

# 免疫不全マウス移植モデル作製試験結果

多発性骨髄種細胞株 (J2N-3)

ならびに

急性骨髄性白血病細胞株 (HL-60, SKM-1, KG-1a)

日本チャールス・リバー株式会社

2015年1月

本資料は、お客様のご厚意によりご提供いただきました

## 1. 目的

- 免疫不全マウス複数系統を使用し、免疫不全マウスの系統、がん細胞株および移植部位による生着率の差を検討した。

## 2. 結果(概要)

- 移植方法、実験結果等詳細は、次ページ以降をご参照くださいますようお願い申し上げます。

移植細胞株	JJN-3		HL-60		SKM-1		KG-1a	
	皮下	骨髄内	静脈内	骨髄内	静脈内	骨髄内	静脈内	
BALB/c-nu	×	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
SHO	×	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
scid-bg	△	△	○	○	○	○	○	
NOD-scid	○	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
NSG	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	○	○	○	

○: 良好な移植結果

△: 移植可能

×: 殆ど移植できず

N.D.: Not Done, 実施せず

## 3. 各移植モデル掲載ページ

皮下移植モデル(JJN-3): 2 ページ

骨髄内移植モデル(HL-60, SKM-1, KG-1a): 5 ページ

静脈内移植モデル(HL-60, SKM-1, KG-1a): 7 ページ

## 4. がん細胞株の免疫不全マウスへの移植試験について

- 免疫不全マウス系統別、がん細胞株別移植データを幅広く収集しています。
- お客様のご施設で、背景データ作成のための移植実験等ご検討の際は、一度ご相談賜りますようお願い申し上げます。
- データ提供等のご協力をいただける機関には、動物を無償サンプル提供させていただいておりますので(注 1)、弊社営業担当またはマーケティング部(045-474-9336) ([Web\\_order@crl.com](mailto:Web_order@crl.com))までご連絡いただけますようお願い申し上げます。

- ◆ 注 1: 匹数の上限、ご提供させていただく期間等に制限がございますのでご了承くださいませようお願い申し上げます。

## 試験報告書(JJN-3)

試験名 : 多発性骨髄種細胞株(JJN-3)を用いた皮下移植モデルマウスの作製検討

試験目的 : 多発性骨髄種細胞株 JJN-3 を免疫不全マウス(BALB/c-nu, SHO, scid-bg および NOD-scid) の皮下に移植し、生着効率を検討する。

試験日程:

動物入荷日 : 2014 年 9 月 16 日および 9 月 30 日  
 検疫・馴化期間 : 2014 年 9 月 16 日～9 月 24 日、9 月 30 日～ 10 月 3 日  
 細胞移植日 : 2014 年 10 月 7 日 (Day 0)  
 観察期間 : 2014 年 10 月 7 日 ~ 12 月 4 日 (Day 58)

使用動物:

日本チャールス・リバーから提供された以下のマウスを使用した。

2014 年 9 月 30 日入荷分(入荷時週齢 5W)

CAnN.Cg-Foxn1<sup>nu</sup>/CrlCrlj (BALB/c-nu)、雄、雌それぞれ 16 匹

Crlj:SHO-Prkdc<sup>scid</sup> Hr<sup>hr</sup> (SHO)、雄、雌それぞれ 16 匹

NOD.CB17-Prkdc<sup>scid</sup>/J (NOD-scid)、雄、雌それぞれ 16 匹

CB17.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Lyst<sup>bg-J</sup>/CrlCrlj (scid-bg)、雄、雌それぞれ 16 匹

2014 年 9 月 16 日入荷分(入荷時週齢 9W)

CB17.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Lyst<sup>bg-J</sup>/CrlCrlj (scid-bg)、雌 16 匹

一連の動物実験は動物の愛護及び管理に関する法律(昭和 48 年 10 月 1 日法律第 105 号、平成 18 年 6 月 1 日最終改正)に従い実施した。

試験方法:

### 1. 細胞移植

40% DMEM + 40% IMDM + 20% FBS 培地で培養した JJN-3 細胞(DSMZ)を遠心回収し、無血清培地を用いて  $2.0 \times 10^7$  cells/mL および  $1.0 \times 10^8$  cells/mL の細胞懸濁液を調製した。細胞懸濁液 0.05 mL ( $1 \times 10^6$  cells または  $5 \times 10^6$  cells) を 27G の注射針およびシリンジを用いてマウスの右腋窩皮下に移植した。

群構成

群番号	マウス系統	性別	移植時週齢	移植細胞数	匹数
1	BALB/c-nu	雌	6W	$1 \times 10^6$	8
2	BALB/c-nu	雌	6W	$5 \times 10^6$	8

3	BALB/c-nu	雄	6W	1×10 <sup>6</sup>	8
4	BALB/c-nu	雄	6W	5×10 <sup>6</sup>	8
5	SHO	雌	6W	1×10 <sup>6</sup>	8
6	SHO	雌	6W	5×10 <sup>6</sup>	8
7	SHO	雄	6W	1×10 <sup>6</sup>	8
8	SHO	雄	6W	5×10 <sup>6</sup>	8
9	NOD-scid	雌	6W	1×10 <sup>6</sup>	8
10	NOD-scid	雌	6W	5×10 <sup>6</sup>	8
11	NOD-scid	雄	6W	1×10 <sup>6</sup>	8
12	NOD-scid	雄	6W	5×10 <sup>6</sup>	8
13	scid-bg	雌	6W	1×10 <sup>6</sup>	8
14	scid-bg	雌	6W	5×10 <sup>6</sup>	8
15	scid-bg	雄	6W	1×10 <sup>6</sup>	8
16	scid-bg	雄	6W	5×10 <sup>6</sup>	8
17	scid-bg	雌	12W	1×10 <sup>6</sup>	8
18	scid-bg	雌	12W	5×10 <sup>6</sup>	8

### 3. 評価

経時的に腫瘍径を測定して腫瘍体積を算出した。腫瘍の体積は次の近似式を用いて算出した ( $V = (W^2 \times L) / 2$  ( $V$ :体積  $W$ :短径  $L$ :長径))。腫瘍体積が 2000 mm<sup>3</sup> を超えたマウスは人道的エンドポイントを適用して測定を終了し、頸椎脱臼により安楽殺した。また、活動性低下かつ低体温が見られた個体は瀕死と判断して頸椎脱臼により安楽殺した。

#### 結果・考察:

##### 1. 腫瘍の生着率

各測定日での各群における皮下腫瘍生着匹数を表 1 に示した。BALB/c-nu および SHO マウスでは生着匹数が少なかった。比較的良好な生着を示した NOD-scid (9,10,11 および 12 群) および scid-bg マウス (14 および 16 群) における平均腫瘍体積を図 1 に示した。NOD-scid マウスに安定して腫瘍の生着が確認され、腫瘍の生着率は NOD-scid > scid-bg > BALB/c-nu > SHO の順によかった。また、BALB/c-nu, NOD-scid および scid-bg マウスでは雄のマウスの方が腫瘍の生着率が良好であった。さらに scid-bg マウスでは移植時 6 週齢のマウスよりも移植時 12 週齢のマウスの方が腫瘍の生着率が良好であったが、12 週齢のマウスでは腫瘍からの出血がしばしば見られた。以上より JJN-3 細胞の皮下移植モデルにおいては NOD-scid マウスが最も適していると考えられた。

表 1 各群マウスの皮下腫瘍生着匹数

群番号	Day 0	Day1 0	Day1 3	Day1 7	Day2 1	Day2 4	Day2 8	Day3 1	Day3 7	Day4 4	Day5 1	Day5 8
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	4	4	4	4	5	5	6	6	6
10	0	7	7	7	7	7	7	8	8	8	8	8
11	0	3	4	6	8	8	8	8	8	8	8	8
12	0	5	6	6	7	8	8	8	8	8	8	8
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	1	3	3	3	3	4	4	4	4
15	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
16	0	2	3	5	5	5	5	5	5	5	5	5
17	0	0	0	0	2	2	2	4	6	6	6	6
18	0	2	3	6	8	8	8	8	8	8	8	8

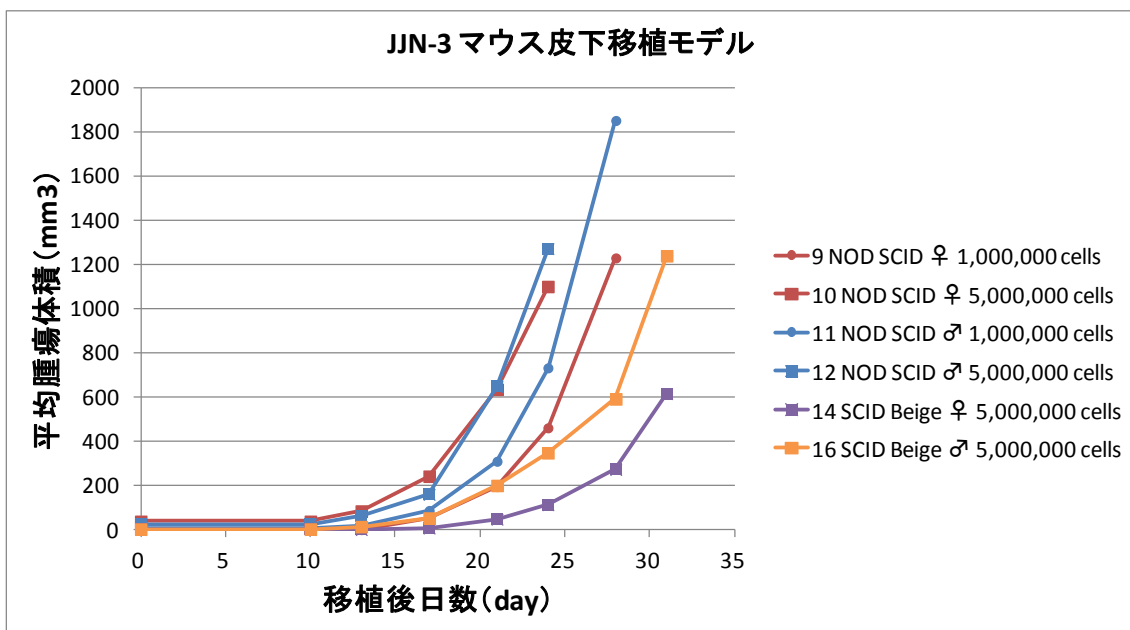


図 1 NOD-scid および scid-bg マウスにおける平均腫瘍体積の比較

## 試験報告書 (HL-60, SKM-1, KG-1a 骨髄移植モデル)

試験名 : 急性骨髄性白血病細胞株を用いた骨髄内移植モデルマウスの作製検討

試験目的 : 急性骨髄性白血病細胞株 HL-60、SKM-1、KG-1a を免疫不全マウス (scid-bg および NSG) の脛骨内に移植し、生着効率を検討する。

### 試験日程:

動物入荷日 : 2014 年 8 月 5 日  
 検疫・馴化期間 : 2014 年 8 月 6 日～ 8 月 11 日  
 細胞移植日 : 2014 年 8 月 12 日 (Day 0)  
 解剖日 : 2014 年 8 月 26 日 (Day 15)、9 月 10 日 (Day 30)  
 解析日 : 2014 年 9 月 14 日

### 使用動物:

CB17.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Lyst<sup>bg-J</sup>/CrlCrlj (scid-bg)、日本チャールス・リバー、雄、15 匹

NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ (NSG)、日本チャールス・リバー、雄、3 匹

入荷時週齢: 5 週齢

一連の動物実験は動物の愛護及び管理に関する法律(昭和 48 年 10 月 1 日法律第 105 号、平成 18 年 6 月 1 日最終改正)に従い実施した。

### 試験方法:

#### 1. 細胞移植

10% FBS を含む RPMI-1640 培地で培養した HL-60、SKM-1、KG-1a 細胞を遠心回収し、PBS を用いて  $1 \times 10^8$  cells/mL の細胞懸濁液を調製した。細胞懸濁液 0.01 mL ( $1 \times 10^6$  cells) をマイJECTA-29G (テルモ、SS-05M2913) を用いて、ペントバルビタール麻酔下のマウスの右足の脛骨内に注入した。

なお、群 1 のマウス 1 匹は麻酔過剰により死亡した。群 3 のマウス 2 匹は移植に失敗したため、除外した。

### 群構成

群番号	マウス系統	移植細胞株	細胞数	匹数
1	scid-bg	HL-60	$1 \times 10^6$	5 → 4
2	scid-bg	SKM-1	$1 \times 10^6$	5
3	scid-bg	KG-1a	$1 \times 10^6$	5 → 3
4	NSG	KG-1a	$1 \times 10^6$	3

## 2. 評価

HL-60 の移植マウスは移植 15 日目に、SKM-1 および KG-1a の移植マウスは 30 日目に安楽殺を行い、脛骨を採取した。脛骨を液体窒素で凍らせた状態で破碎し、Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega, A2361)を用いて DNA を抽出した。DNA 濃度は Qubit 2.0 Fluorometer (Life Technologies) で測定した。ヒト ALU 遺伝子に対する特異的 Taqman プローブ (Life Technologies)を用いて定量的 PCR (Roche, LC480)を行い、ヒト ALU 遺伝子量を測定した。マウス骨髄細胞と培養白血病細胞株から抽出した DNA を用いて作った検量線より、骨髄中に含まれる白血病細胞割合 (%)を算出した。

### 結果・考察:

#### 1. HL-60

HL-60 の移植マウスでは平均 24%の骨髄内白血病細胞量が認められたが、バラツキが比較的大きかった (表 1)。なお、CB17-scid マウスに HL-60 を移植した以前の検討でも平均 30%の白血病細胞量(0~43%の範囲でバラツキ、n=6)が認められている。この細胞株では scid-bg マウスへの変更による改善は少ないと考えられた。

#### 2. SKM-1

SKM-1 の移植マウスでは平均 73%と高い割合で白血病細胞が認められ、バラツキも少なかった(表 1)。他のマウスでの検討は行っていないが、本細胞株では scid-bg マウスの使用は有用であると考えられた。

#### 3. KG-1a

KG-1a では scid-bg、NSG マウスとも高い移植効率が認められた(表 1)。以前の CB17-scid マウスでの検討では、平均 28%の白血病細胞量(0~62%の範囲でバラツキ、n=6)であった。この細胞株では scid-bg または NSG マウスの使用による大幅な改善が見込まれる。

表 1 各移植マウスにおける骨髄中白血病細胞量 (%)

Cell line	HL-60	SKM-1	KG-1a	KG-1a
Mouse	scid-bg	scid-bg	scid-bg	NSG
1	41.5	65.6	64.3	79.1
2	36.9	76.9	63.8	60.0
3	10.9	61.2	62.5	102.9
4	5.8	74.3	-	-
5	-	86.0	-	-
Average	23.8	72.8	63.5	80.7
SE	9.0	4.4	0.9	12.4

## 試験報告書 (HL-60, SKM-1, KG-1a 静脈内移植モデル)

試験名 : 急性骨髄性白血病細胞株を用いた静脈内移植モデルマウスの作製検討

試験目的 : 急性骨髄性白血病細胞株 HL-60、SKM-1、KG-1a を免疫不全マウス (scid-bg および NSG) の静脈内に移植し、生着効率と生存期間を検討する。

試験日程:

動物入荷日 : 2014 年 8 月 5 日  
 検疫・馴化期間 : 2014 年 8 月 6 日 ~ 8 月 11 日  
 細胞移植日 : 2014 年 8 月 12 日 (Day 0)  
 観察期間 : 2014 年 8 月 12 日 ~ 11 月 20 日 (Day 100)

使用動物:

CB17.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Lyst<sup>bg-J</sup>/CrIcr (scid-bg)、日本チャールス・リバー、雄、15 匹

NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ (NSG)、日本チャールス・リバー、雄、6 匹

入荷時週齢: 5 週齢

一連の動物実験は動物の愛護及び管理に関する法律(昭和 48 年 10 月 1 日法律第 105 号、平成 18 年 6 月 1 日最終改正)に従い実施した。

試験方法:

### 1. 細胞移植

10% FBS を含む RPMI-1640 培地で培養した HL-60、SKM-1、KG-1a 細胞を遠心回収し、PBS を用いて  $2.5 \times 10^7$  cells/mL の細胞懸濁液を調製した。細胞懸濁液 0.2 mL ( $5 \times 10^6$  cells) を 26G の注射針およびシリンジを用いてマウスの尾静脈から注入した。

群構成

群番号	マウス系統	移植細胞株	細胞数	匹数
1	scid-bg	HL-60	$5 \times 10^6$	5
2	scid-bg	SKM-1	$5 \times 10^6$	5
3	NSG	SKM-1	$5 \times 10^6$	3
4	scid-bg	KG-1a	$5 \times 10^6$	5
5	NSG	KG-1a	$5 \times 10^6$	3



## 2. 評価

毎朝生存匹数を記録した。活動性低下かつ低体温が見られた個体は瀕死と判断して、炭酸ガス吸入により安楽殺した。

### 結果・考察:

#### 1. HL-60

HL-60 を移植した scid-bg マウスでは、移植 30 日頃から衰弱および背部皮下の腫瘍が認められるようになり、平均生存期間は  $35.2 \pm 0.9$  日であった(表 1、図 1)。なお、CB17-scid マウスに HL-60 を移植した以前の検討(抗 asialo GM1 抗体による前処置あり)では、平均生存期間は  $37.6 \pm 1.4$  日であった(n=17)。scid-bg マウスへの変更により、前処置なしでの生着が得られ、若干の病態進行期間の短縮とバラツキの低下も期待できる。

#### 2. SKM-1

SKM-1 を移植した scid-bg マウスでは、移植 28 日頃から衰弱および背部皮下の腫瘍が認められるようになり、平均生存期間は  $34.8 \pm 1.2$  日であった(表 1、図 1)。NSG マウスへの移植では平均生存期間は  $20.0 \pm 0.6$  日であった。本細胞株では CB17-scid マウスでの検討は行っていないが、scid-bg マウスの使用は有用であり、さらに NSG マウスの使用によって大幅な病態進行期間の短縮とバラツキの低下が期待できる。

#### 3. KG-1a

KG-1a を移植した NSG マウスの平均生存期間は  $54.0 \pm 4.6$  日であった(表 1、図 1)。一方、scid-bg マウスへの移植では、5 例中 4 例が移植 100 日目までに死亡したが、1 例は 100 日の時点で病態が認められていない。なお、CB17-Scid マウスに移植した以前の検討(抗 asialo GM1 抗体による前処置あり)では細胞の生着、死亡は認められなかった。本細胞株では scid-bg マウスの使用は有用であり、さらに NSG マウスの使用によって大幅な病態進行期間の短縮が期待できる。

表 1 各移植マウスの生存日数

Cell line	HL-60	SKM-1	SKM-1	KG-1a	KG-1a
Mouse	scid-bg	scid-bg	NSG	scid-bg	NSG
1	32	32	19	67	46
2	35	32	20	74	54
3	36	36	21	74	62
4	36	37	-	95	-
5	37	37	-	>100	-
Average	35.2	34.8	20.0	>82.0	54.0
SE	0.9	1.2	0.6	>6.5	4.6

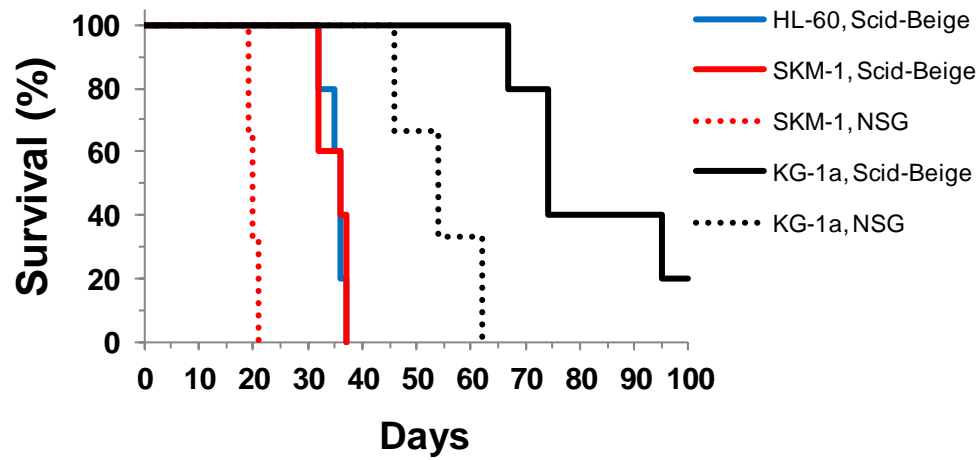


図 1 各移植マウスの生存期間

本冊子に関する問い合わせ、技術的な問い合わせは、下記アドレスよりご連絡いただけますよう、  
 お願い申し上げます。(日本チャールス・リバー(株)マーケティング部)

[web\\_order@crl.com](mailto:web_order@crl.com)