

**NIBS LETTER** 2007 SEPTEMBER  
No. 546

# 日生研たより

2007年(平成19年)9月号 第53巻第5号(通巻546号)

---

## 挨拶・巻頭言

今、倫理を口にするのは時代遅れか  
……………井土俊郎(2)

## 獣医病理学研修会

第46回 No.921 イヌの肝臓  
……………岩手大学家畜病理学教室(3)

第46回 No.923 ラットの巣径部腫瘍  
……………(財)日本生物科学研究所(4)

## レビュー

幹細胞を用いた新しい鶏卵利用法の開発  
……………鏡味 裕(5)

アルゼンチン共和国・ウルグアイ東方共和国  
出張記……………井土俊郎(8)

## レビュー

体細胞クローンミニブタの作出  
……………石川孝之(10)

## お知らせ

研修者・見学者受け入れ状況……………(12)

---



**NIBS**

財団法人 日本生物科学研究所  
NIPPON INSTITUTE FOR BIOLOGICAL SCIENCE  
<http://nibs.lin.go.jp/>

## 今、倫理を口にするのは時代遅れか

井土俊郎

日生研は本年10月で創立60周年を迎える。戦後の混乱期に船出し、幾多の試練を乗り越えて今あるのも、皆様の支援・激励を受けながら共に歩んできたからに他ならない。「共生」は東洋的思想であり、社会を形成する最も基本的な倫理観を表現する言葉の一つである。永い時代を越えて蓄積されてきた優れた日本文化も、国民に共通する価値観・倫理観を背景に築かれた「共生」の思想に裏打ちされたものである。

最近、犯罪を起こして容疑者として逮捕された者は、ニュースで見ると、先ず第一声としてほとんどの者が「自分は無関係です」あるいは「私はやっておりません」という。贈収賄事件、政治資金規制法違反事件、公安調査庁詐欺事件、食肉偽装事件などで逮捕された被疑者などがそうであり、例を挙げれば切りがない。「政治資金規制法」に関しては今まで何回修正してきたか覚えはないが、立法する度に膨大な時間と経費をかけて出来た法律が最初から抜け穴だらけというのも情けない。国民の論理と議員の論理が乖離しているのだろうが、税金を使いながら何とか誤魔化そうとする態度は国民を欺く行為で倫理観に乏しく、議員の品格も疑われる。酷い例では、事件直後は素直に認めていた事実を何年も経ってから否定する者も多い。彼らは法律の専門家と相談して法律の抜け道を研究し、処罰回避のための言い訳を考えて主張しているとしか考えられない。弁護側の論理は事件の真相を究明するとか、罪のない善良な市民の権利も守ると言うものとは思えない。単に弁護士のために犯人を庇う論理の構築に終始し、罪もないのに前途を奪われた被害者、遺族に対する思いやりは全く感じられないことが多い。社会の健全な発展を導くための法律の番人である弁護士の倫理観はどうなっているのであろうか。大多数の弁護士は健全な倫理観を持って事件・紛争の弁護を行っていると思うが、あまりにも倫理観の欠如した弁護士を見ると事件の寄生虫のように見えてくる。現在、日本の弁護士の数は人口約5,000人当たり1人で、米国の約250人当たり1人に比べて1/20である。先般、米国でクリーニングで紛失したスーツの感謝料として約40億円の支払いを求めた訴訟があったが、それに類する事件は恐らく膨大な数に上るであろう。紛争解決が全て弁護士に委ねられ、その多くが金銭で解決されるという時代は決して一般市民に幸福をもたらさない。「自由」とは言うものの、膨大な法規によって行動が規制されている社会の中で、法規の理念を忘れ、曲解に曲解を重ねればいずれ身動きが取れなくなる。

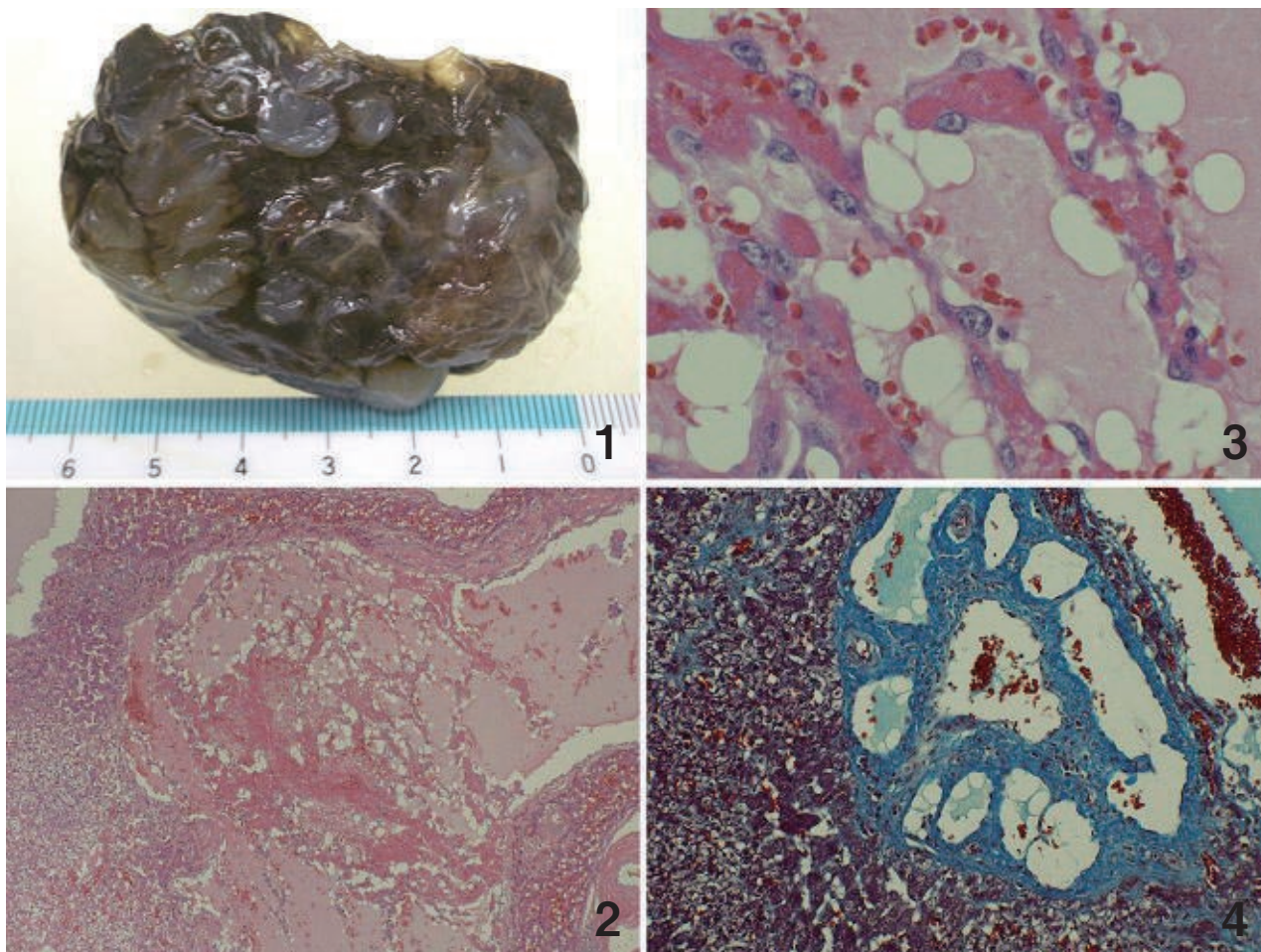
現在のように複雑化した社会では、考え方の違いから来る種々な軋轢、論理と論理の衝突に端を発する紛争が多発する。それを調停するための基準として次から次へと規則を制定し、それを運用すればそれに係わる社会的経費は際限なく拡大する。その膨大な経費とエネルギーは、ほとんど浪費となる。法律が出来ればその解釈がいかようにも出来るものでは困るが、一方で社会が激しく変動する現在、完全無欠な物も難しいと言われる。今、何を基準に行動の規範を考えたら良いのか。全ての人々が優れた倫理観をもち、紛争を全て双方の話し合いで、何のわだかまりもなく解決できれば、恐らく、個々の規則を制定する必要はない。近年、「倫理学」なるものの存在感が薄くなっている感があるが、いま我々に求められているのはこの「倫理観」の復活であろう。先般、NHKで、企業の寿命に関する番組を放送していた。世界的にみて日本の企業の寿命は桁違いに長寿という。それは商売・企業は社会に対する義務・責任を持って経営され、社会がそれを認知しており、互恵の精神がその基礎にあるためであろう。自由を標榜し、社会的責任は無いが如く「利己」の追求のみを経営指針とするような企業では恐らく長寿は望めないであろう。資源、環境および人口問題が重くのし掛かる中、今こそ、全ての人に「共生」を目指した「倫理観」が求められている。

(評議員)



## イヌの肝臓

岩手大学家畜病理学教室 第46回獣医病理学研修会標本 No.921



動物：イヌ，シーザー，雄，15歳齢。

臨床事項：腹部膨満とのことで，某動物病院に来院。超音波検査にて肝臓腫瘍が疑われ，飼い主の希望により試験的開腹術を実施。肝臓全体が嚢胞状になっており，部分摘出術を実施し閉腹した。術後，数日で死亡したが，剖検は行われなかった。ホルマリン固定生検材料のみの送付を受けたが，固定後の所見としては，径1cmにいたる多数の嚢胞が肝臓被膜面に密発していた（図1）。

組織所見：大小様々な大きさの嚢胞状構造部の内腔には，血液あるいは漿液が充満していた（図2：HE染色）。肝細胞索が残存する領域では，腫大した洞内皮細胞が内張しており，肝細胞は顆粒状となり凝固壊死に向かっていった（図3：HE染色）。部位によっては類洞が拡張し，富脈斑様に拡張していた。嚢胞は一層の内皮細胞で内張されており，肝細胞索に接しており，間質の結合組織はほとんど認められなかった。小葉間結合組織のリンパ管および血管は高度に拡張し，結合組織は増生していた（図

4：マッソントリクローム染色）。また，血管内皮細胞やリンパ管内皮細胞，嚢胞壁の一部の内張る細胞は，第Ⅷ因子関連抗原に対し陽性であった。

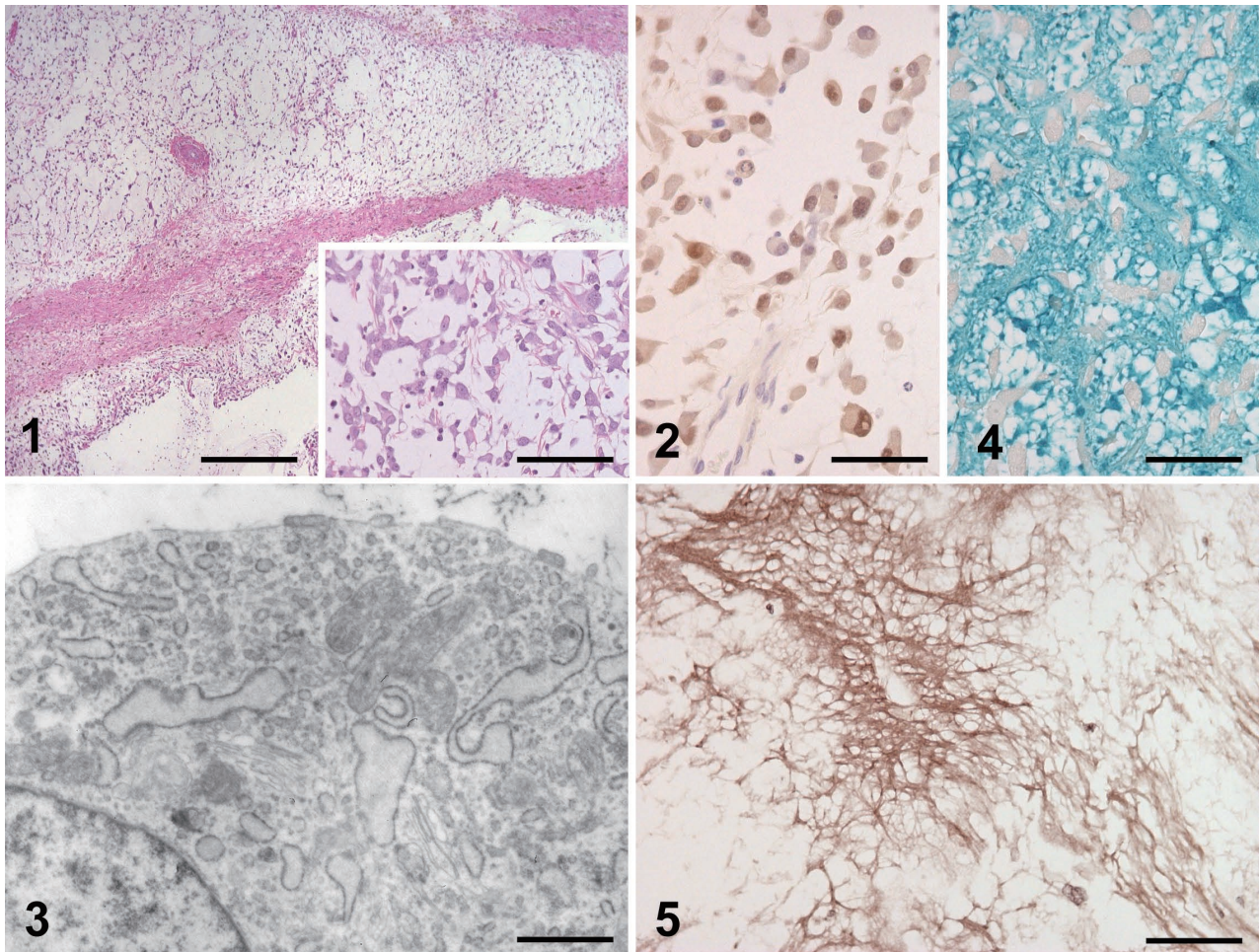
診断：血管肉腫 hemangiosarcoma

考察：肉眼所見および増殖性の変化が乏しいことから「犬肝臓における多発性嚢胞性結節（紫斑病様）」を提唱したが，腫瘍性の病変として捉えるべきであり，「血管肉腫」という診断になった。肝細胞索が残存し壊死に向かっていく領域の腫大した内皮細胞は第Ⅷ因子関連抗原に対し陰性であり，腫瘍細胞というよりも洞内皮細胞ではないかと思われた。しかし，完全に嚢胞化した内張る内皮細胞は，第Ⅷ因子関連抗原に対し陽性を示すことから血管系の腫瘍として捉えても良いのではないかと考えられた。血液およびリンパ液の流れを考慮すると，正常構築を保ちながら徐々に嚢胞状組織が形成されていたのではないかと推察された。（細野志野・御領政信）



## ラットの単径部腫瘤

(財)日本生物科学研究所 第46回獣医病理学研修会標本 No.923



動物：ラット，F344/DuCrj，雄，109週齢。

臨床事項：本症例は104週齢のがん原性試験の背景資料作成のための飼育試験として用いた動物である。4週齢時に入荷し，109週齢まで当所のバリアーシステム下で飼育された。105週齢時より右単径部皮下に腫瘤が触知され，症例は109週齢時に計画殺された。

剖検所見：剖検時，皮下腫瘤は境界明瞭で55×45×30mm大に達し，硬度軟で赤褐色を呈していた。他臓器に本腫瘤と関連性のある異常所見はなかった。

組織所見：腫瘤内部および周囲組織に多数の出血巣が認められた。腫瘤は線維性結合織に隔てられた不規則な小葉構造を呈していた(図1, bar=500μm)。小葉内には豊富な粘液性間質に囲まれた腫瘍細胞の索状もしくは鎖状配列が認められた。腫瘍細胞は大小不同で多型性を呈し，円形から卵円形の大型の核と弱好酸性の豊富な細胞質を有し(図1挿入図, bar=100μm)，有糸分裂像が多数認められた。免疫染色において腫瘍細胞はvimentinおよびS100蛋白(図2, bar=50μm)に陽性を示したが，cytokeratin, α-SMA, myoglobin, neurofilament, MBP, GFAP, lysozyme, ED1, von Willebrand factor およびCD34には陰性であった。電顕検索において腫瘍細胞は多数のミトコンドリア，ゴルジ装置および粗面小胞体を有し，細胞表面に微絨毛様細胞突起が認められた(図3, bar=1μm)。粘液性間質はコロイド鉄法(図4, bar=

50μm)など酸性ムコ多糖類の染色に陽性を示し，免疫染色においてcollagen type I, II(図5, bar=50μm), IIIおよびVIに陽性を，type Xに陰性を示した。

診断：ヒト骨外性粘液型軟骨肉腫に類似したラット未分化肉腫

考察：肉眼的に骨および関節との連続性がないこと，組織学的に小葉構造を呈し，腫瘍細胞間に酸性ムコ多糖からなる豊富な粘液性間質が認められたこと，腫瘍細胞はvimentinおよびS100蛋白に陽性を示したがその他のマーカーには陰性であったこと，超微形態学的に未分化な軟骨芽細胞様の形質を有していたことよりヒトの骨外性粘液型軟骨肉腫(EMC)に相当する腫瘍であると考えられた。ヒトのEMCにおいては明らかな軟骨形成を認める症例は稀であること，本症例の粘液性間質がcollagen type IIに陽性で軟骨組織への分化傾向を示したこと，ならびにヒトのEMCと同様にcollagen type I, IIIおよびVIに陽性を示したことなどより本症例はヒトのEMCに相当する腫瘍であることが示唆された。しかしながら獣医領域においてEMCという診断名はまだ一般的でないため，本症例は「ヒトEMCに類似したラット未分化肉腫」とした。(中村圭吾)

参考文献：

1. Nakamura, K. *et al.*, *Toxicol Pathol*, in press (2007).
2. Aigner, T. *et al.*, *Mod Pathol* 17:214-221 (2004).

## 幹細胞を用いた新しい鶏卵利用法の開発

鏡味 裕 (信州大学農学部動物発生遺伝学研究室)

### 序論

鶏卵は理想的な栄養価を持つ食品として世界中で消費されているのみならず、ワクチン生産の場としても極めて有用である。また最近のバイオテクノロジーの進展によって鶏卵内で医薬品を生産する試みや、疾病診断用の抗体を生産する試みが盛んに展開されている。本稿では鶏卵の初期胚中に存在する幹細胞の発生分化を制御し、鶏卵やニワトリの新たな利用法を開拓する試みを紹介する。

近年、マウス、ブタ、ウシ、ヒツジ、ヒト、等の哺乳類においては多能性を保持する胚性幹細胞 (ES 細胞) の樹立が試みられている。人の ES 細胞の樹立は再生医療や先端の生殖医療への実現性を示唆した。鳥類幹細胞を培養し ES 細胞が樹立されれば、雌雄産み分け、遺伝子導入家禽の作出、クローンニワトリ作出、などに直結する。しかし現在に至るも家禽 ES 細胞は樹立されていない。このため当該研究は、米国ノースカロライナ州立大学、英国ロスリン研究所、ドイツ連邦政府畜産研究所、韓国ソウル大学、米国 Origen Therapeutics 社、等の研究機関やベンチャー企業において極めて競争的に行われている。

### 鳥類幹細胞の発生

幹細胞や生殖細胞の発生起源の同定が、鳥類において様々な研究手法を用いて試みられてきた。始原生殖細胞 (PGC) は放卵直後の胚盤葉の上層部に同定された。PGC の同定には主に PAS 染色や免疫組織化学染色がおこなわれてきた。しかし、鳥類幹細胞や PGC の発生起源を確定するには至らなかった。そこで、初期胚における幹細胞の発生起源を確定するための研究戦略を構築した。胚盤葉明域中央部、明域周辺部、暗域、から細胞塊を除去した後、操作胚を全胚培養した。明域中央部を除去した胚の平均始原生殖細胞数は他の実験群より有意に減少したことから、鶏における生殖細胞の発生起源は、胚盤葉

明域中央部に存在することが確定した。

### 幹細胞の遺伝的特性

遺伝子解析技術の進展によって、異種生物間の相同遺伝子の同定が容易に行えるようになってきた。マウスの生殖細胞の発生分化を制御する重要な遺伝子の一つに *Vasa* が挙げられる。ニワトリにおいても *Vasa* ホモログが同定されている。このニワトリ *Vasa* 発現解析からも幹細胞が放卵直後の胚盤葉明域中央部に起源を持つことが確かめられた。また、幹細胞や PGC が局在する胚盤葉明域中央部では、*c-kit*, *DAZL*, *Oct* の強い遺伝子発現が確認された。胚発生が進行するにつれ、これらの遺伝子は生殖半月環や生殖腺原器においても強く発現することが確認された。幹細胞や PGC の局在する領域で、*c-kit*, *DAZL*, *Oct* の強い遺伝子発現が確認されたことから、ニワトリ PGC の発生分化においてもマウス等の哺乳類の発生分化を制御する遺伝子と同様な遺伝子制御機構が働くものと思われた。

### 幹細胞の培養

幹細胞を長期間培養できれば ES 細胞の樹立に直結する。基礎培養液に LIF を添加して培養した方が基礎培養液のみで培養するより細胞の培養期間が伸張されたことから、サイトカイン LIF はニワトリの培養細胞に対しても細胞増殖刺激および細胞分化抑制の効果があると考えられた。マウスにおいて、LIF が細胞表面の *gp130* と LIF レセプターからなる二量体サブユニットに結合し、*gp130* から細胞内の JAK-STAT 系へのシグナル伝達が起こる。さらに、*STAT3* が活性化することによって未分化状態が維持される。そして、*STAT3* の活性化が LIF によるマウス ES 細胞の未分化状態維持に必要な十分であることが知られている。培養液にニワトリフィーダー細胞を添加した場合も、基礎培養液のみの場合よりも未分化状態維持期間が延長した。このことか



ら、ニワトリフィーダー細胞は幹細胞の増殖を維持する LIF などのサイトカインを産生している可能性が示唆された。最近ニワトリ LIF が単離され、ニワトリ LIF は STAT3 を活性化するが、マウス LIF では活性化が見られず、むしろ分化に働く MEK/ERK 系が活性化されるという報告もある。しかし、ニワトリ ES 細胞はニワトリ LIF を使用しても未だ樹立されていない。このことからマウスとニワトリで STAT3 の役割が異なると考察された。基礎培養液に LIF と SCF を添加した場合、細胞は細胞の増殖に伴って明瞭なコロニーを多数形成した。また培養継続可能期間も一層伸長した。これらの培養細胞で明確な ALP 陽性細胞が多く観察された。この培養条件においては他のいずれの培養条件よりも培養継続可能期間が延長したのみならず、およそ 3 日に 1 回の割合で継代が必要になるほど細胞増殖性が増加した。これらの培養細胞中で明確な ALP 陽性細胞のコロニーも確認された。以上の結果から、初期胚由来の幹細胞の至適培養条件として LIF と SCF を共に添加した実験群が至適条件であろうと思われる。

#### 幹細胞増殖因子の解析

幹細胞の多能性解析には、増殖因子やサイトカインを支配する遺伝子の同定やその発現制御機構の解析が必須となる。このため、鳥類における細胞増殖因子に関連する cDNAs がニワトリおよびウズラにおいてそれぞれ同定された。これらのアミノ酸配列は両者間で高い相同性 (98%) を示した。またこれらの配列と各種哺乳類との間では比較的低い相同性 (53%前後) が示された。今後は、哺乳類の ES 細胞の培養において多能性の保持と細胞増殖の促進に重要であろうと考えられている各種の増殖因子 (SCF, LIF, bFGF, IL-11, IGF-I) を精選し、これらを添加し最適の培養条件を決定することが鳥類 ES 細胞の獲得に必須であろうと思われる。

#### 生殖細胞キメラ作出

黒色羽装のニワトリ品種 (横斑プリマスロック) の幹細胞をドナーに、白色羽装のニワトリ品種 (白色レグホン) の胚盤葉をレシピエントとしてキメラを作出した。性成熟後のキメラはドナー系の横斑プリマスロックに戻し交配した。この結果、ドナー配偶子由来の黒色雛が効率的に作出されることが確認

された。初期胚の循環血中の PGC をドナーとしても、生殖細胞キメラが作出されている。これまで、生殖細胞キメラの検定は主に羽色を遺伝的マーカーとした後代検定によっておこなわれてきた。しかしこの方法によるキメリズムの検定には性成熟に達するまで長期間を必要とする。また配偶子を形成する以前のキメラ個体や孵化する前の胚での検定が不可能である。このため分子レベルでの生殖細胞キメリズムの検定が必須である。そしてミトコンドリア DNA の一塩基置換を検出する SNP 解析によって各品種を判別し得ることが報告された。

#### 雌細胞由来の精子作出

現在の家禽生産や育種において最重要課題の一つは雌雄産み分けであろうと思われる。理論的には、雌性細胞から受精能を持つ W 精子を作出できれば家禽の雌雄産み分けへ途を拓くこととなる。そこで我々は雌幹細胞 (ZW) を雄レシピエント (ZZ) に移植し、キメラの精巢中に雌雄の細胞が混在する異性キメラ (ZW/ZZ) を作出した。雌ドナー細胞は雄キメラの精巢中で第一および第二減数分裂を経て W 精子へと発生分化し得ることが初めて確認された。W 精子の作出は、最初は Southern Hybridization によって確認された。その後、鳥類における雌細胞由来の精子の作成の可否が内外の独立した研究機関でも検討された。これらの結果、雌由来の W 精子の作出が PCR, FISH によりそれぞれ確認された。もし受精能を持った W 精子が効率的に生産できれば家禽の雌雄産み分けに途を拓くこととなる。

#### 鶏卵の生物工場としての活用

家禽は哺乳類に比べ性成熟に要する時間が短く、良質なタンパク質を卵黄や卵白として効率的に生産できる。このため鶏卵やニワトリ個体を有用物質生産のバイオリクターと活用できれば家禽を用いた新産業の創出に貢献し得る。残念ながら、今日においても確実に遺伝子導入家禽を作出する方法はほとんど開発されていない。これまで、レトロウイルスベクターを用い遺伝子導入が試みられてきた。しかし、レトロウイルスを扱うには特別な施設と高度な技術が必要とされる。そこで雌雄の前核が融合した直後の接合子に外来遺伝子を顕微注入し遺伝子導入家禽の作出が試みられた。しかし家禽の胚発生は巨

大な卵黄上で進行し接合子の位置を正確に観察できない。始生殖細胞や幹細胞に外来遺伝子を導入後、レシピエント胚に導入し、生殖細胞キメラを介した遺伝子導入家禽の作出が試みられた。この方法によっても外来遺伝子が導入され得ることが確認された。今後、遺伝子導入技術の一層の改善によって非ウイルス系ベクターでも確実に遺伝子導入家禽が生産され、また、卵または個体内に医薬品として使用可能なタンパク質が生産されれば家禽バイオリクターとしての活用が実現するであろうと期待される。

### 幹細胞による再生

ES細胞や体性幹細胞（骨髄細胞等）を分化制御し、臓器、器官、個体の再生を試みる研究が展開されている。再生医療の可能性と相まって、ヒトやマウス等の哺乳類では再生研究が活発に展開されている。再生研究の主な学問的基盤である発生学や遺伝学の研究においてニワトリを始めとした家禽の受精卵や胚は最も重要な研究材料として古くから利用されてきた。ニワトリの全胚培養系の確立によってニワトリ胚の利用性は拡大した。ヒトやマウスの細胞を鶏胚中で培養できれば極めて有用なバイオリクターとなるであろうと期待される。これらのことから、臓器または個体の再生研究モデルとしてニワトリは、今後ますます重要になるものと思われる。これまでに我々は幹細胞を用いて、烏骨鶏の脚を完全に再生することに成功した。現在、初生雛の骨髄細胞を用いて血管内皮等への分化転換能の解析を試みている。今後はニワトリ幹細胞を用いて各種の組織、器官、臓器、また個体を完全に再生することが期待される。これらの実験系は、再生医学においても有用な基礎的知見を提供し得ると思われる。

### 展望

欧米各国の先導的研究機関において、幹細胞の発生分化を制御し再生医療や医薬品生産に活用する研究が極めて競合的に行われている。今後これらの研究の進展によって、遺伝子導入鳥類作出の作出、希少鳥類の再生、クローン個体作出、新規家禽育種戦略の開拓に貢献することが期待されている。またこれらの新知見の集積と新たな技術開発によって、鶏卵の新しい利用法が開発されるものと期待される。



ノースカロライナ州立大学大学院ホスト教官のPetitte教授（写真中央の男性）とその研究室メンバーと共に。Petitte教授は米国における鶏幹細胞の分化制御に関する研究の第一人者である。（右から三人目が著者）

### 参考文献

1. Yamamoto Y., Usui F., Nakamura Y., Ito Y., Tagami T., Nirasawa K., Matsubara Y., Ono T., and Kagami H. A novel method to isolate primordial germ cells and its use for the generation of germline chimeras in chicken. *Biol Reprod.*, 77:115-119 (2007).
2. Lillico SG, Sherman A, McGrew MJ, Robertson CD, Smith J, Haslam C, Barnard P, Radcliffe PA, Mitrophanous KA, Elliot EA, Sang HM. Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 104:1771-1776 (2007).
3. Petite JN, Mozdziak PE. The incredible, edible, and therapeutic egg. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 104:1739-1740 (2007).
4. van de Lavoie MC, Diamond JH, Leighton PA, Mather-Love C, Heyer BS, Bradshaw R, Kerchner A, Hooi LT, Gessaro TM, Swanberg SE, Delany ME, Etches RJ. Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature.*, 441:766-769 (2006).
5. Fujiwara A., Mizutani M., Ono, T. and Kagami, H. Introduction of genes relating to muscular dystrophy into chimeric chickens by embryo engineering. In: *Anim Cell Technol, Basic & Applied Aspects.* (Iijima S. and Nishijima K. eds.), Springer, pp. 127-133 (2006).
6. Stern CD. The chick; a great model system becomes even greater. *Dev Cell.*, 8:9-17 (2005).

## アルゼンチン共和国・ウルグアイ東方共和国出張記

井土俊郎（評議員）

平成19年3月8日から3月20日までの13日間、国際協力機構の「広域協力を通じた南米南部家畜衛生改善のための人材育成プロジェクト」に係わる短期専門家として、アルゼンチン共和国のラプラタ大学（ラプラタ市）およびウルグアイ東方共和国のウルグアイ東方共和国大学（モンテビデオ市）に派遣された。出張目的は「ウルグアイ東方共和国及びアルゼンチン共和国でのセミナーを通じた鳥インフルエンザ等の新興・再興感染症に関する技術指導」ということであったが、今回の出張は突然決定したために、準備期間が3週間不足と日程的には非常に厳しいものであった。

3月8日（木）夕刻、成田を發ち、ニューヨーク、サンパウロを經由して現地時間で3月9日（金）午後2時過ぎにブエノスアイレスへ到着した。プロジェクトの現地スタッフである鈴木邦昭氏の出迎えを受け、JICA事務所で古屋年章事務所に挨拶した後、ラプラタ入りした。2年半前の上出張の際に滞在したラプラタ市内中心部のサンマルコホテルに到着したのは夕刻であった。自宅を出て48時間以上、地球の真反対までの道程はやはり長いと改めて感じた。

翌日、3月10日（土）はラプラタ大学のDr. NOSETTO（獣医学部長）、Dr. PONS（プロジェクト責任者・前学部長）、Dr. PECORARO（プロジェクトの実質的中心人物・ウイルス学講座准教授）および鈴木氏と翌日から始まるウルグアイ東方共和国およびアルゼンチン共和国における、高病原性鳥インフルエンザの診断・予防に関するセミナーの日程について打ち合わせを行った。

3月11日（日）は早朝、一旦ホテルをチェックアウトし、同行するラプラタ大学のDr. PECORARO, Dr. SQUAZZA, Dra. GALOSIの3人と共にブエノスアイレス市内のAero Parque空港からウルグアイ東方共和国へ移動した。モンテビデオ空港へは川幅70kmというラプラタ川を斜めに越えて40分余の飛行であった。この日はたまたま米国のブッシュ大統領がウルグアイ東方共和国を訪問中

で、市内は厳しい警戒態勢が敷かれていた。随行員1,700名中、300名が警察官という物々しい護衛団を引き連れた大統領は、招かれざる客というべきか、市内には「ブッシュ帰れ」と書かれた多くの垂れ幕が見られた。国際社会、とりわけ南米における米国の信用、地位が失墜している中とは言え、「何のために来たのだ」と言う手荒い歓迎には少々驚いた。

3月12日（月）はウルグアイ東方共和国大学側の受け入れ責任者であるDr. GUARINO (Prof. Agregado Area Virologia) とJICAウルグアイ東方共和国出張所の石浜由実子氏との打ち合わせを簡単に済ませ、9時から大学関係者、学生等を前に、30分の休憩時間を挟んで約3時間「高病原性鳥インフルエンザとその診断・予防対策：特に日本における発生例と防疫対策」について講演した。質疑応答では石浜氏にスペイン語通訳をお願いして何とか意見交換ができた。講演終了後、約30分間、報道機関（テレビ、新聞）からのインタビューの時間が設けられており、ここでも石浜氏の通訳に助けられた。ウルグアイ東方共和国ではまだ高病原性鳥インフルエンザの発生はないが、世界的に汚染地が拡大している中、本病が何時侵入するか解らないという状況にあるという強い危機感を防疫関係者が持っていると感じられた。この日の午後からは診断技術研修として、Dr. PECORAROがPCR法に関する原理・基本的操作法に関する講義を行った。

3月13日（火）の午前中はラプラタ大学のスタッフにより、PCR法に関する操作法実習が行われ、これに立ち会った。午後は石浜由実子氏に同行し、在ウルグアイ日本国大使館を表敬訪問し、久山慎一特命全権大使及び一等書記官櫻井健二氏（前農水省消費安全局動物衛生管理課）と面談した。大使とは鳥インフルエンザ、食糧問題など種々な話題について、20分の予定時間を1時間以上超過して面談した。日本とは異なる時間の流れの中に身を置き、改めて日本について考えると、生きる指標の不明確さ、物事を深く考える精神的・時間的余裕の無さなど、日



本人のやや異質な国民性が見えてくるという。普段あまり考える機会のない種々な話題について示唆に富んだお話しを頂いた。

3月14日(水)の午前中、ウルグアイ農務省を表敬訪問した。12日に行われた高病原性鳥インフルエンザの講演会に出席出来なかったということで、石浜由実子氏の通訳で畜産局次長及び衛生担当者5名と2時間半程度、高病原性鳥インフルエンザの診断・予防対策等について話し合った。北半球を中心に急速に汚染地域が拡大していることを考えると、今から具体的な対策を考えておく必要があるということであった。午後はウルグアイ東方共和国大学の学長(Dr. KREMER)及び副学長(Dr. KRAMER)、それにDr. PECORAROの4人で昼食会の後、研修修了証書の授与があり、3日間の研修プログラムを終了した。半数以上が女性であったが、将来、彼女達の何%が家畜の防疫業務に携わるだろうか。

3月15日(木)午前中の便でアルゼンチンに戻り、筆者のみブエノスアイレスのJICA事務所で16日のラプラタで行われる高病原性鳥インフルエンザに関するセミナーの打ち合わせを行った。そこで急遽、講演用の英語スライドをスペイン語版に翻訳して使用することになったため、スライドをコピーし、KUMABE氏に翻訳をお願いし、翌日の10時からの講演に間に合わせた。

3月16日(金)のセミナーのプログラムは右記の通りであった。

今のところ、アルゼンチンでも高病原性鳥インフルエンザの発生はないが、関係者は侵入に対する不安があり、高い関心を持っていた。講演終了後のパーティーでも種々質問を受けた。どうして南米に流行が波及していないか、明確な答えはないようであるが、渡り鳥の経路が関係している可能性が考えられる。ダイナミックに変化する自然を捉えることは容易ではないし、自然界の現象に関して我々が知っていることはまだほんの一部に過ぎないと思われる。今回の高病原性鳥インフルエンザに関するセミナーが盛会裏に終わったことは非常に喜ばしい事であったが、更にこれが両共和国における本症防疫対策を考える上で少しでも役に立つことが出来れば幸いである。

アルゼンチン共和国はラプラタ川流域を中心に数千kmにもおよぶ平坦で肥沃な、日本の耕地面積の50倍以上の広大な耕地面積を持つ恵まれた国であ

る。しかし、耕地の利用度は非常に低いと思われ、これを生産性の高い農地に変換できれば、迫りつつある食糧危機に際しては世界の食料庫になりうる潜在能力を持っている。1万円/1haという地価の放牧地で昼夜放牧されている肉牛の生産費は、我が国における肉牛の生産費と比べてどの位だろうか。見える範囲が全て自分の土地というような広大な土地で牛を飼育しているとそんな勘定高いことなど考える必要がないのかも知れない。北の空を移動する太陽に地球の真裏にいることを実感しながらそんなことを考えていた。

#### SEMINARIO SOBRE INFLUENZA AVIAR

Fecha: 16 de Marzo de 2007

Lugar: Hotel Corregidor, La Plata

Preside: M.V. Eduardo Rafael PONS

9:00 ~

Palabras de bienvenida a cargo del Decano de la FCV-UNLP y Gerente de Proyecto PROVETSUR, Dr. Edgardo NOSETTO. A continuacion, hablaron a los concurrentes representantes de la Agencia de Cooperacion Internacional del Japon (JICA), Embajada del Japon y Cancilleria.

9:30 ~

"Influenza Aviar Altamente Patogenica"

A cargo de Dr. Toshiro IZUCHI, Experto de Corto Plazo de JICA,

Instituto Japonese de Ciencias Biologicas, Tokio, JAPON.

11:45 ~

"Acciones de la FAO sobre Influenza Aviar en Sudamerica "

A cargo de Dr. Ernesto SPATH, Coodinador Regional Contra la Influenza Aviar, FAO.

12:15 ~

"Acciones previstas por SENASA ante la presencia de Influenza Aviar a nivel nacional"

A cargo de Dr. Marcelo DE LA SOTA, Director de Luchas Sanitarias, SENASA.

12:45 ~

Comentarios y cierre a cargo del M.V. Eduardo R. PONS, Coordinador General PROVETSUR (Universidad Nacional de La Plata)

## 体細胞クローンミニブタの作出

石川孝之

### はじめに

体細胞クローン羊・ドリーが誕生<sup>1)</sup>して以来、ウシ<sup>2)</sup>、マウス<sup>3)</sup>など様々な動物種において体細胞クローンが作出されている。家畜ブタに関しては、2000年に3つの研究グループがほぼ同時に体細胞クローン作出に成功した<sup>4,6)</sup>。この手法の優位性は、核ドナー細胞が容易に確保できるうえに凍結保存や遺伝子操作を施すことが比較的簡単な点である。そのため畜産領域では、この技術を優良種、希少品種の保存方法として、あるいは遺伝子改変家畜を利用した動物工場を実現する手段として大きな期待を寄せている。一方で医学領域においては、生物学的特性がヒトに類似するブタあるいはミニブタの遺伝子を改変して、異種移植や再生医療へ応用する試みがなされている。実際に超急性拒絶反応の抑制を目的とした $\alpha$  1,3-Galactosyltransferase 遺伝子ノックアウトブタが作出され、注目されている。

近年、動物愛護の観点からイヌ（愛玩動物）やサル（ヒトと同じ霊長類）の実験動物としての使用が厳しく制限され始めている。これに対してブタは、食用として長い歴史を持つために実験動物としても社会的に受け入れられ易い。特にミニブタは、取り扱いが容易で有望な中型実験動物として期待されている。当実験動物研究所においても3系統の小型ブタから独自にNIBS系ミニブタ（以下、NIBS系）を造成し、維持・繁殖している。このNIBS系の付加価値をさらに高め、先端医療など新たな研究分野において有効に利用され得るミニブタを開発するために、2003年度から明治大学農学部生殖工学研究室と共同で体細胞クローンミニブタの作出に取り組んで来た。本稿では、その研究の一部を紹介する。

### 1. NIBS系（ミニブタ）について

NIBS系は、ピットマンムーア系ミニブタ、台湾小耳種およびゲッチングンミニブタの3元交配によって造成された白毛色の小型ブタ（成体重およそ20kg）であり、性質は温順で安定した繁殖成績（表1）を維持している。繁殖コロニーに対しては、年間4回の定期検査で22項目の微生物モニタリングを実施している。

遺伝学的には、主要組織適合性遺伝子 (SLA) クラスII領域のDRB I (D/D), DQA (D/D), DQR (S9あるいはS10/ S10)の各座位がホモに固定しているという特徴がある。詳細な生物学的背景データと微生物モニタリング項目は、既に日生研たより<sup>7)</sup>に紹介しているので参照されたい。

### 2. NIBS系への生殖工学技術の応用

#### 2-1. NIBS系の発情同期化とホルモン投与量の検討

ウマ絨毛性性腺刺激ホルモン (eCG) とヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) を併用した家畜ブタの発情同期化法<sup>8)</sup>を参考にNIBS系における発情同期化条件、個体あたりの排卵数ならびに排卵卵子の発生能を調べた。プロスタグランジン (PGF2 $\alpha$ ) で流産誘起した妊娠25日以上、40日以下の未経産ミニブタについて、性腺刺激ホルモンの投与量が異なる2つのグループ（グループI：PGF2 0.15g + eCG 500 IU およびhCG 150 IU 投与、グループII：PGF2 0.15g + eCG 250 IU およびhCG 120 IU 投与）を設定した。その結果、いずれのグループも全個体の発情が同調し、ホルモン量による成績の差は認められなかった（図1および表2）。



表1 NIBS系の繁殖成績

項目	動物数	
発情周期 (日)	8	20.5 ± 2.3
産子数 (匹)	40	4.4 ± 1.5
離乳個体数 (匹)	40	3.4 ± 1.3
出生時体重 (g)	♂ 32	452.0 ± 95.5
	♀ 32	403.0 ± 75.3

(平均値±標準偏差)

図1 発情同期化のスケジュール

日数	-5	-4	-1	0	1
処置	PGF <sub>2α</sub> の投与 (16:00)	PGF <sub>2α</sub> & eCGの投与 (16:00)	hCGの投与 (10:00 ~ 11:00)	排卵日	採卵 (9:00)

PGF<sub>2α</sub>: プロスタグランジン eCG: ウマ絨毛性性腺刺激ホルモン  
hCG: ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン

表2 NIBS系の排卵成績

	動物数	体重 (Kg)*	排卵数*
グループI	9	30.4 ± 3.0	15.1 ± 5.2
グループII	8	30.9 ± 2.5	9.4 ± 3.0
自然排卵	6	28.7 ± 2.6	7.3 ± 0.5

\*: 平均値±標準偏差

グループI: PGF<sub>2α</sub> 0.3g 投与⇒(24時間)⇒PGF<sub>2α</sub> 0.15g + eCG 500 IU 投与⇒(68時間)⇒hCG 150 IU を投与  
グループII: PGF<sub>2α</sub> 0.3g 投与⇒(24時間)⇒PGF<sub>2α</sub> 0.15g + eCG 250 IU 投与⇒(68時間)⇒hCG 120 IU を投与

一方で1個体あたりの排卵数は、グループIが15.1 ± 5.5個(平均値±標準偏差)であったのに対してグループIIでは、9.4 ± 3.0個だった。排卵数から推察してグループIIの個体の卵巣がより自然排卵に近い状態を呈していると考えられた。

また、卵管灌流法で採取した未受精卵の一部に電気刺激による単為発生を誘起して、体外培養を試みたところ、供試卵24個のうち8個(33%)が胚盤胞期胚へと発生した。

2-2. NIBS系未経産ミニブタを用いた胚移植試験

NIBS系のレシーピエント(授卵)雌としての能力を評価するために、グループIIの条件で発情を同期化した3頭の未経産ミニブタに卵管移植法で単為発生卵を移植した。妊娠25日目に開腹して妊娠の有無を調べたところ、全頭が妊娠しており1個体あたりおよそ4頭の着床胎児が確認された(表3)。

表3 NIBS系未経産ミニブタに対する胚移植試験

レシーピエント頭数	移植単為発生胚数 / レシーピエント	妊娠頭数 (妊娠率%)	着床胎児数 (妊娠25日)
3	約100個	3 (100)	4.7 ± 3.1*

\*: 平均値±標準偏差

3. 体細胞クローンミニブタの作出

核ドナー細胞として、妊娠25日齢のNIBS系雌から摘出した雄胎児由来の線維芽細胞を、レシーピエント卵には、屠場由来の家畜ブタ卵巣から体外成熟させた未受精卵を除核して用いた。核ドナー細胞は、血清飢餓培養によって細胞周期をG<sub>0</sub>期に同調した後、電気融合法によって核移植を行なった。クローン胚の再活性化条件は黒目らの方法<sup>9)</sup>を参照した。

体細胞クローンミニブタを作出するために1,121個のクローン胚を12頭のレシーピエント雌の卵管へおよそ100個ずつ移植した。その結果、妊娠した10頭から自然分娩で合計11頭の体細胞クローンミニブタが誕生した(写真1)。体細胞クローンの作出効率はおおよそ1%であった(表4)。産子は全て雄で、出生時体重の平均値(±標準偏差)は370g(±9.7g)であり、NIBS系新生子に比べてやや小さかった。また、核ドナー細胞とのゲノムの同一性を20個のマイクロサテライトマーカーを用いて確認した。



写真1 NIBS系体細胞クローンミニブタ

表4 体細胞クローンミニブタ作出成績

レシーピエント頭数	総移植クローン胚数	妊娠雌数 (妊娠率%)	総産子数 (平均値±標準偏差)	作出効率 (%)
12	1,121	10	11	0.98

核ドナー細胞: NIBS系胎児線維芽細胞  
移植クローン挿越/レシーピエント: 約100個(63~115個)

おわりに

本研究を通じて様々な生殖工学技術を応用し、

NIBS系体細胞クローンミニブタを作出することができた。しかしながらその効率は、およそ1%程度に止まっている。他の研究グループの成績もほぼ同程度であり、体細胞クローンの実用化において、この効率の低さが大きなネックになっている。原因の1つと考えられるドナー核のエピジェネティックな修飾を初期化するために、核ドナー細胞に組織幹細胞を用いたり<sup>10)</sup>、連続核移植によってドナー核の初期化を促す方法が試みられて成果をあげつつある。

こうした新技術の蓄積によって、我々が目標としている遺伝的背景が同一なミニブタの大量生産や遺伝子改変ミニブタの作出が、一層容易になることが期待される。

#### 謝辞

本研究の遂行にあたり多くのご指導、ご助言を賜

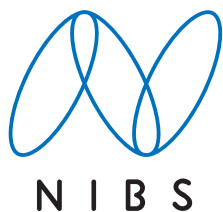
った明治大学農学部 長島比呂志教授に深謝致します。

#### 参考文献

- 1) Wilmut, I. *et al.*, *Nature* **385**:810-813 (1997).
- 2) Kato, Y. *et al.*, *Science* **282**:2095-2098 (1998).
- 3) Wakayama, T. *et al.*, *Nature* **394**:369-374 (1998).
- 4) Betthausen, J. *et al.*, *Nat. Biotechnol* **18**:1055-1059 (2000).
- 5) Onishi, A. *et al.*, *Science* **289**:1188-1190 (2000).
- 6) Polejaeva, I.A. *et al.*, *Nature* **407**:86-90 (2000).
- 7) 斉藤敏樹 日生研たより, 527号 :8-12 (2004).
- 8) ブタの胚移植マニュアル (1996), 農林水産省 家畜改良センター
- 9) Kurome, M. *et al.*, *Cloning Stem Cells* **5** (4): 367-378 (2003).
- 10) Inoue, K. *et al.*, *Stem Cells* **25** (4):157-163 (2007).

### 研修者・見学者受け入れ状況 (平成18年1月～平成18年12月)

来所日・期間	所属機関・人数	研修・見学内容
1月10日	高知県西部家畜保健衛生所 1名	豚慢性疾病対策
4月6日～4月7日	株式会社 ピグレッツ 2名	豚のウイルス感染症に関する遺伝子検査技術
6月1日	株式会社 ピグレッツ 1名	豚のウイルス感染症に関する遺伝子検査技術
7月5日～7月6日	武蔵村山市立第一中学校 1名	職場体験学習
7月31日～8月28日	北里大学獣医畜産学部獣医学科 1名	学外実習
8月9日	埼玉県坂戸保健所管内 飯能・日高狂犬病予防協会 12名	狂犬病予防事業視察研修
10月31日	大阪府立大学大学院 10名	JICA研修
10月11日～10月12日	千葉県中央家畜保健衛生所 1名 千葉県東部家畜保健衛生所 1名 千葉県北部家畜保健衛生所 1名 千葉県南部家畜保健衛生所 1名	豚の細菌感染症に関する抗体検査技術
11月1日～12月28日	東京大学大学院農学生命科学研究科 2名	正常プリオン蛋白の検出技術



—— テーマは「生命の連鎖」——  
生命の「共生・調和」を理念とし、生命体の豊かな明日と、研究の持続性を願う気持ちを心よリズムに整え、視覚化したものです。カラーは生命の源、水を表す「青」としています。

表紙題字は故中村稔治博士の揮毫

日生研たより 昭和30年9月1日創刊(隔月1回発行)  
(通巻546号) 平成19年8月25日印刷 平成19年9月1日発行(第53巻第5号)  
発行所 財団法人 日本生物科学研究所  
〒198-0024 東京都青梅市新町9丁目2221番地の1  
TEL0428(33)1056(企画学術部) FAX0428(31)6166  
発行人 長井伸也  
編集室 委員/小山智洋(委員長), 中村圭吾, 川原史也  
事務/企画学術部  
印刷所 株式会社 精興社  
(無断転載を禁ず)