

NIBS LETTER 2007 NOVEMBER
No. 547

日生研たより

2007年(平成19年)11月号 第53巻第6号(通巻547号)

挨拶・巻頭言

豚繁殖・呼吸障害症候群
(Porcine reproductive and respiratory
syndrome; PRRS) ウイルスの流行は、現
在では潜在化し、養豚産業において大きな問
題となっている
.....石崎良太郎(2)

獣医病理学研修会

第46回 No.926 イヌの胃壁腫瘍
.....北里大学獣医病理学研究室(3)
第46回 No.927 イヌの精巢
.....宮崎大学獣医病理学教室(4)

レビュー

ドリーからスナッピーへ
.....李 柄千(5)
ミニブタ及びビヌにおける生殖工学技術の
開発とモデル動物の作出
.....島津美樹(10)

お知らせ

新人紹介.....(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/>

豚繁殖・呼吸障害症候群 (Porcine reproductive and respiratory syndrome; PRRS) ウイルスの流行は、現在では潜在化し、養豚産業において大きな問題となっている

石崎良太郎

我が国で PRRS が最初に確認されたのは 1993 年であった。世界では、1987 年に米国において成豚での繁殖障害、幼若豚での呼吸器症状を主徴とする疾病として初めて報告された。その後カナダ、ドイツでも発生がみられ、次いで西ヨーロッパに広がり、やがて世界各国の豚の間に大流行し、養豚産業で大きな被害が報告された。

歴史的には、同属のウイルスとして、馬動脈炎ウイルス (Equine arteritis virus; EAV) が 1957 年に報告された。このウイルスは、馬流産起因病原体として馬ヘルペスウイルスについて最初に研究が実施された米国の競走馬生産州であるケンタッキー州の研究所において、馬に流産を惹起する別の新しいウイルスとして報告された。

分類学的には、プラス 1 本鎖 RNA 球形エンベロップを持った脊椎動物に感染するウイルスで、Nido ウイルス目、Arteri ウイルス科、Arteri ウイルス属の中に分類され、先の EAV が代表ウイルスとなっている。

ビリオンは、ほぼ球形で、直径 45 ~ 60nm である。粒子内に直径 25 ~ 35nm の等軸対称のヌクレオカプシドを持ち、エンベロップを有する。粒子表面には、特徴的なスパイク様構造は観察されない。このウイルスのゲノムは 12.7 ~ 15.7kb のプラス 1 本鎖 RNA である。

PRRS ウイルスは、マクロファージを標的細胞とし、細胞への接着・侵入の際、低 pH 依存細胞内侵入経路を利用し、接着に際しては、唾液腺癒着因子がマクロファージへのウイルスレセプターとして作動することが最近明らかにされた。ウイルスの主要糖蛋白質がこのレセプターに結合し、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれると考えられている。

細胞質内に放出されたウイルスゲノム RNA は、mRNA として働き、ここから蛋白質分解酵素や RNA ポリメラーゼが作られ、ゲノムが転写される。各 mRNA は、他の Nido ウイルスと同様、5' 末端に共通のリーダー配列を持ち、3' 側に共通のゲノム配列を持つ。翻訳される蛋白質は、各 mRNA の 5' 側の最初の ORF のみである。ウイルス合成に重要なウイルス非構造蛋白質がコードされ、EAV では 12 個の蛋白質が知られている。ウイルス mRNA は、非常に複雑な一組の入れ子となるセットを形成しているので、目名の Nido とは、nest= 網、巢あるいは入れ子と言う意味だが、この一組のセットの mRNA の構造を nest と解釈し、ウイルス分類における学術名になったと考えられる。

我が国では、1989 年頃から、千葉県下で肥育豚に慢性肺炎が多発した。その症状は、呼吸数の著しい増加と強い腹式呼吸が特徴で、呼吸の度に腹がヘコヘコと波打つことから、ヘコヘコ病と名付けていた。この様な症例は我が国の他の地域でも多数観察されていた。日生研では、1992 年に、呼吸器障害を示した子豚からの新鮮材料から、PRRS ウイルスを分離することができた。このウイルス学的性状はヨーロッパ型 (タイプ 1) とは異なる、北米型 (タイプ 2) である事が確認された。これらのウイルスは、その後、当研究所内でミニチュア豚に実験室内感染・継代され、現在は培養細胞を用いて継代・維持されている。

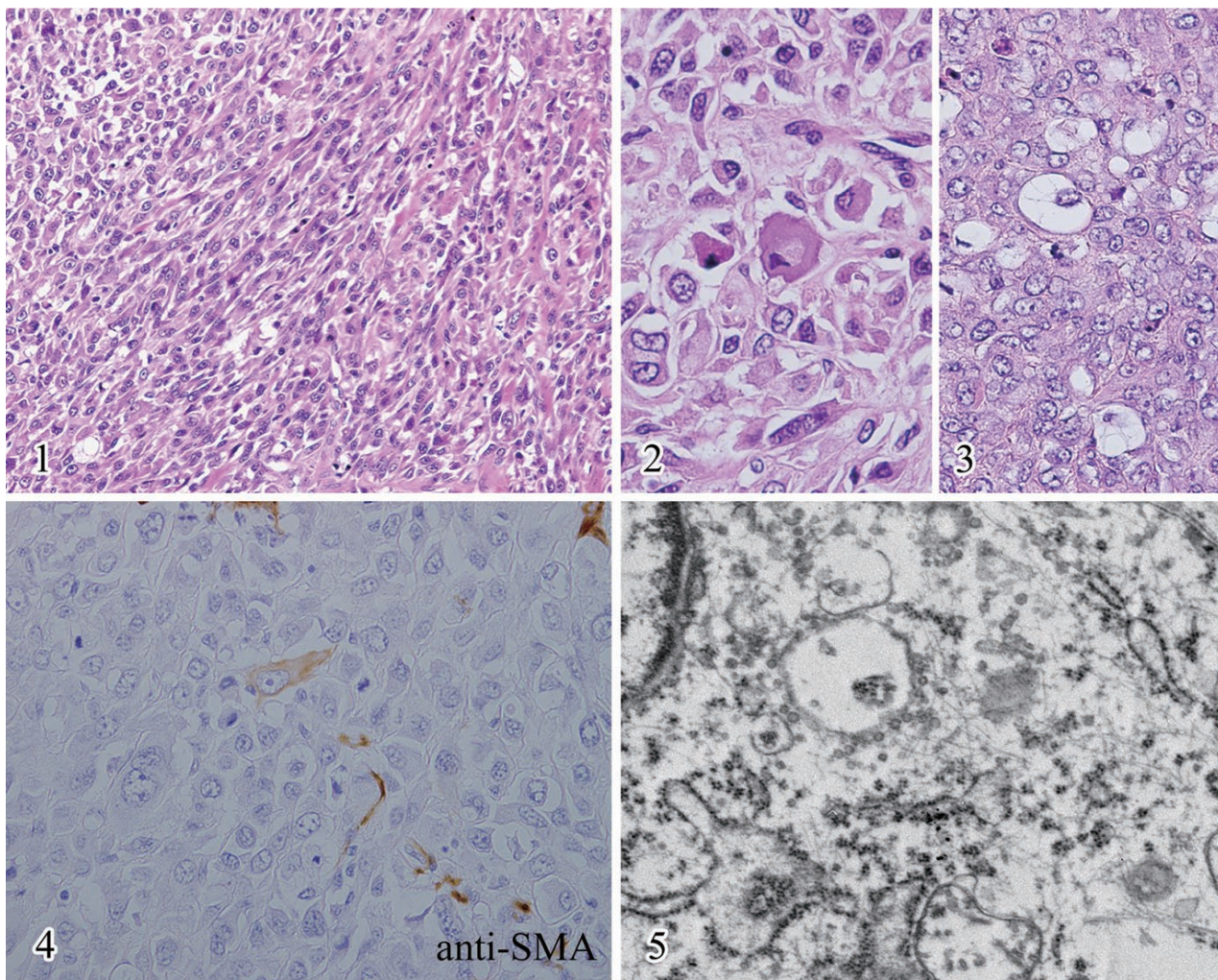
PRRS の流行状況を見ると、繁殖障害は数カ月間流行病的に発生し、その後、不顕性感染が多くなる。そして、その養豚場内にウイルスが常在化し、繁殖障害の発生は散発的となる。育成養豚場においては、離乳豚に呼吸器障害が集中して起こり、慢性に経過した豚には間質性肺炎が認められ、重度の発育不良豚が散見される。

馬の EAV の流行においても、流産よりも呼吸器感染が主体となり、広い地域で流行して問題となったが、EAV と同様、PRRS ウイルス感染症においても、肺炎を起こした感染豚の鼻汁や下痢便中にウイルスが排泄され、その流行が拡大する。症状としては、母豚は食欲不振と発熱を呈した後、流産、妊娠後期の早産、死産などの繁殖障害が起きる。感染母豚が死亡する場合もある。子豚においては、虚弱、開脚姿勢、眼瞼の浮腫、下痢や肺炎など種々な症状を示す。母豚の泌乳停止により子豚の死亡率が高まる。流行ウイルス株によって病原性の強弱がある。現況では、慢性化・潜在化して、汚染養豚場も増えているので、間接蛍光抗体法や ELISA による血清抗体の調査、豚マクロファージ培養細胞その他の適切な培養細胞を用いたウイルス分離、免疫組織化学染色による病理材料における抗原検出、および RT-PCR による血液材料でのウイルス血症の証明などにより、流行状況を早期に把握することが重要である。現在では、ワクチンも利用可能であり、定期的な抗体調査で、母豚、哺乳豚、および育成豚の免疫状態を把握しながら対策を立ててゆくことが望ましい。最近、中国本土で本ウイルスが広く流行し、大問題となっているようで、本病に対する関心は一層高まっているようである。

(主任研究員)

イヌの胃壁腫瘍

北里大学獣医病理学研究室 第46回獣医病理学研修会標本 No. 926



動物：イヌ，シェルティ，雌，7歳5ヶ月齢。

臨床事項：2005年2月7日に嘔吐の主症で某動物病院に来院。その後、粘液状～血液成分を混じる嘔吐を繰り返す。2005年5月6日に本学附属動物病院に来院し、幽門部に形成された腫瘍を切除。術後経過良好であったが、7月21日から再び嘔吐を始めた。8月26日に内視鏡とバリウム検査で再発が確認され、対症療法を施すも好転せず、9月13日未明に死亡した。死亡約12時間後に病理解剖を行った。

剖検所見：腫瘍は幽門部～十二指腸移行部の平滑筋層に形成されていた。境界不規則な類円形腫瘍（6×6×5cm）で肝臓の外側左葉と一部で癒着していた。剖面では、腫瘍中心部に出血壊死が強く、辺縁では乳白色を呈していた。膵臓および腸間膜リンパ節にも転移が認められた。

組織所見：胃粘膜から筋層、漿膜にかけて紡錘形細胞が束状配列で錯綜し、一部では上皮細胞様類円形細胞も混在性に増殖していた（図1）。核分裂像はhigh power field (HPF, ×40) 50視野中102個、平均1視野中2.02個であった。神経節細胞様細胞（図2）や大小の空胞を有する細胞（図3）および偽管様構造への分化も散見された。ワンギーソン染色では、個々の腫瘍細胞を取り包むように膠原線維の増生が観察された。免疫染色では、極一部の腫瘍細胞が抗SMA抗体に陽性（図4）を

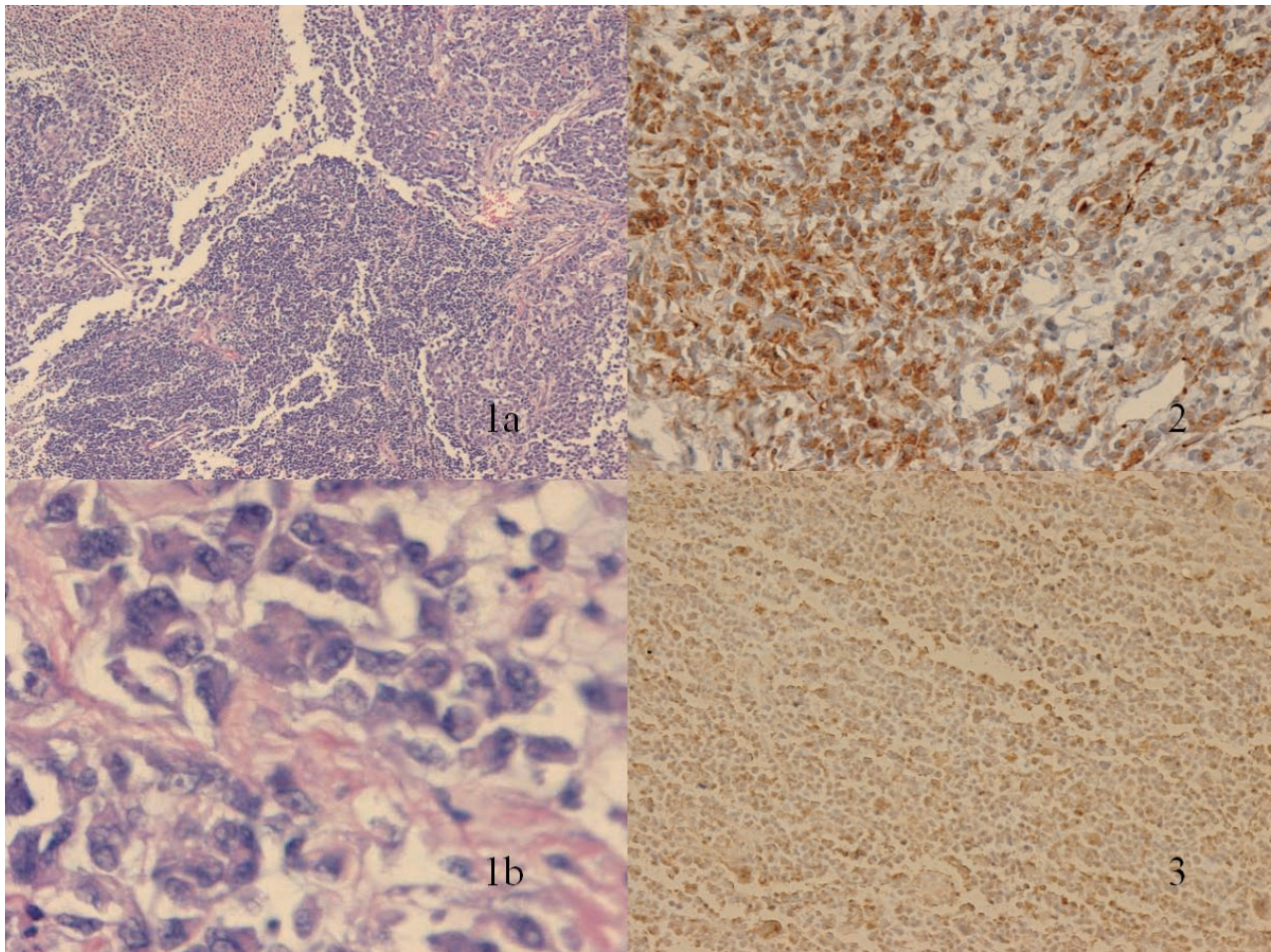
示した。抗c-kit抗体は陰性であった。電顕では、核の両端を中心に細胞小器官が比較的豊富に分布し、大型の粗面小胞体が多数観察された。稀ながらmyofilament（図5）とpinocytotic vesicleが観察された。Dense bodyや時折GISTにみられるシナプス様分泌顆粒は確認されなかった。

診断：犬の胃壁に形成された多形型平滑筋肉腫

考察：本症例の組織学的特徴は、紡錘形細胞の錯綜配列、神経節細胞様細胞や上皮細胞様円形細胞の混在性増殖であった。免疫染色では、抗SMA抗体が一部陽性であり、抗c-kit抗体は陰性を示した。このことから本腫瘍の起源が筋原性である可能性が示唆されたが、GISTおよび悪性神経鞘腫の場合でも筋原性マーカーに陽性を示すことがあり、確定診断には至らなかった。電顕では、核の両端を中心に発達した細胞小器官、myofilamentおよびpinocytotic vesicleが散見され、平滑筋細胞としての構造を保持していた。神経節様細胞や粘液産生細胞では、腫大したミトコンドリアと分泌液を貯留する大型粗面小胞体が観察されたが、神経系細胞への分化を示す所見は観察されず、これらの細胞形態は腫瘍細胞の壊死像に相当するものと推測された。以上のHE、免疫染色、電子顕微鏡学的所見に基づいて、本腫瘍を多形型平滑筋肉腫と最終診断した。（朴 天鎬）

イヌの精巢

宮崎大学獣医病理学教室 第46回獣医病理学研修会標本 No. 927



動物：イヌ，ゴールドンリトリバー，雄，1996年4月1日生（9歳9ヶ月）。

臨床事項：2005年7月17日に飼い主が左下顎腫瘤（2×3cm）を，さらに7日後某動物病院にて診察時に著明に腫大した精巣（10×10cm）を発見。下顎腫瘤の穿刺細胞診では円形細胞が主としてみられたため他の検査機関で炎症が疑われた。血液検査に著変なし。翌日，左下顎腫瘤摘出及び精巣全切除後当教室に検査依頼。13日後に再診。前日より食欲低下。さらに下顎術部腫脹。右目が違和感あり。やや眼圧上昇，瞳孔軽度散大，対光反射，痛みなし。眼下に膿瘍または腫瘤（不明確）あるいは緑内障合併と診断。18日後食欲不振，起立不能のため排尿なし。翌日身体を触れると痛みあり。8月7日痛みが続き呼吸不全により死亡。剖検はされなかった。

組織所見：精巣腫瘤はクロマチンに富む類円形核とごくわずかな細胞質を有する小円形から類円形細胞で，これらの細胞群（小型の横紋筋芽腫瘍細胞塊）と好酸性細胞質を有する大型の腫瘍細胞塊からなり分隔する線維性結合織がみられた（図1aとb，HE×40と×400）。結合織に近い細胞群は吊し柿状配列を呈する。他の部位で

両細胞が衝突するように混在しているが，分隔する線維性結合織がない増殖部位では細胞接着が弱いのが明瞭である。線維性結合織が富む部位に異型を示す巨細胞が観察される。小葉毎に壊死部がみられ，白血球の浸潤が若干みられた。また，下顎の組織（頸部）では細胞質の乏しい小型の細胞が多く，分隔する線維性結合織が頻繁にみられた。部位によっては精巣と同様，異型巨細胞がみられた。大型の細胞はほとんど見られなかった。腫瘍細胞はビメンチン，HHF35（Actin）（図2），ミオグロビン（図3）には陽性を示し，デスミン，CD3，サイトケラチン，HLA-DR，Lysozyme，BLA α -1-anti-trypsinには陰性を示した。

診断：横紋筋肉腫

考察：精巣原発で，下顎部腫瘤に転移したものと考えられるが，剖検されなかったので詳細は不明である。精巣に横紋筋肉腫が見られることは少なく，原発もわずかで特に動物での報告はない。（山口良二）

参考文献：

1. Kumar, P.V. *et al.*, *Br. J. Urol.* **59**:282 (1987).

ドリーからスナッピーへ

李 柄 千 (ソウル国立大学獣医学部教授)

1. 体細胞クローン動物の作出

受精, 胚発生及び胚移植は, その個体の次世代を得るために欠くことができないプロセスである。体細胞を用いた核移植 (Somatic Cell Nuclear Transfer; SCNT) 技術は, 「受精」とは異なり, 体細胞を由来とする分化全能性を有した胚を構築する。すなわち, 除核卵子にその卵子とは異なる遺伝子を起源とする細胞をインジェクションすることで全く異質の細胞, 組織及び次世代を作出するものである。さらに, SCNT 技術は, 近年, 家畜動物の遺伝的・定量的改善, 絶滅危惧種の救済及び遺伝的に同一な動物の生産に利用可能である。

クローニング技術には2種類あり, 1つは受精卵の割球を除核卵子にインジェクションする手法で, もう一つが SCNT となる。しかし, 受精卵クローニング技術は, 「受精」のプロセスを経ているため, 母方と父方の両方の遺伝背景を受け継ぐ。しかも, その極めて低い作出効率と1つの個体(受精卵)からわずか8-16個の細胞(割球)しか利用できないことから適当な技術とは言い難い。

一方, SCNT では, ドナー細胞として卵子及び精子といった生殖細胞ではなく体細胞を利用する。それは, 遺伝的に同一な個体の無制限の複製が理論上可能となる。血清飢餓処理と細胞処理により, 培養体細胞の周期を G0 または G1 期に制御する。

体細胞へのゲノムのインジェクションにより再構築された卵子を制御する研究は盛んに行われているが, 実用段階には至っていない。従って, 卵子を卵巣から直接回収し, 成熟培養を行う必要がある。ドナー個体から体細胞を得, 除核したレシピエント卵

子にインジェクションしなければならない。さらに, 電気刺激により細胞を融合させた後発生を促し, 胚移植, 着床及び胎子の発育後クローンとなる次世代が誕生する。SCNT は, 100% 複製となる個体の作出が可能で, クローニング技術は基礎研究分野ではもちろん, 生物医学研究分野においても利用されている。

McGrath, J. と Solter, D. が超微細手術と細胞融合技術によりマウスにおける核移植実験に成功して以降, 核移植技術による個体作出がいくつかの動物種において報告されるようになった。1997年2月の体細胞クローンヒツジ「ドリー」に関する Wilmut, I. らの報告は世界的なニュースとなり, 大論争を巻き起こした。中国, フランス, イタリア, イギリス, アメリカ, 日本及び韓国等の国々で様々な動物種における SCNT 研究がなされている。その結果, ネコ(アメリカ), ウサギ(フランス), ウマ(イタリア), シカ(アメリカ)及びフェレット(中国)等のクローン動物が誕生した。2003年6月の異種臓器移植を目的とした遺伝子組換えブタ作出の成功は世界中を驚かせたが, 実際の臨床応用までには問題が山積している。このような SCNT 技術はまだ未解明な部分が多いが, 生物医学分野及び産業分野の研究において潜在的な可能性を秘めている。一方, ヒトを除く霊長類では, 胚性幹細胞は樹立されているが体細胞クローン個体の作出には至っていない。

2. 体細胞を用いた核移植の手法

図1に体細胞を用いた核移植の手法を示す。具体的には, レシピエント卵子, ドナー細胞, 細胞のインジェクション, 卵子活性化処理, リモデリング,



図1 体細胞を用いた核移植の手法

リプログラミング、体外培養及び移植の各プロセスがある。

2.1. イヌ

2.1.1. 体細胞を用いた核移植のためのドナー細胞の準備

1頭（雄）のアフガンファンド種よりバイオプシーによってサンプリングした耳真皮から、線維芽細胞を単離した。具体的には、耳組織断片の薄片をダルベッコリン酸バッファー（DPBS）内で3回洗浄した後、手術用メスで細切した。その後、37℃に加温された0.25%トリプシン及び1 mM EDTAで補足されたダルベッコ修正イーグル培地（DMEM）内で1時間培養した。トリプシン処理した組織は、300 g、2分間の遠心処理によりDPBSでさらに1回洗浄し、直径100 mmのカルチャーディッシュ内で培養した。培養条件は、39℃、5% CO₂及び95% Airであり、8-10日間培養を継続した。培地は、1 mM グルタミン、25 mM 炭酸水素ナトリウム、1% Minimal essential medium 及び1% Non-essential

amino acid solution を補足したDMEM+10% ウシ胎子血清（FBS）を用いた。浮遊した細胞もしくは組織片の凝集を除去した後、接着した細胞のみをさらに培養した。細胞の継代培養は3-5日間隔で行った。1分間のトリプシン（0.1%トリプシン及び1 mM EDTA）処理により解離した細胞は、さらなる継代培養もしくは凍結保存を行った。凍結細胞は、80% DMEM、10% DMSO 及び10% FBSを含む培地内に保存された。融解後の細胞は、カルチャーディッシュ内いっばいの増殖が認められるまで3-4日間の培養を行い、1分間のトリプシン処理により単層から解離させた。SCNTには2-8継代培養した細胞を用いた。

2.1.2. 排卵卵子の回収

卵子は、開腹手術を施した麻酔下の個体から回収した。卵管の膨大部またはより上方部に反転フランジバルブ針を挿入した。フランジバルブ針は3 cmのプラスチックチューブと止血鉗子を結わえ付けた縫合糸で保定した。子宮卵管接合部に当たる卵管峡

部を指で露出させて 24 G の注射針を挿入し、シリンジに充填した培地を注入した後に、排卵卵子を培地と共にプラスチックチューブへ回収した。培地は 2 mM 炭酸水素ナトリウム及び 5 mg/ml ウシ血清アルブミン (BSA) を補足した Medium 199 HEPES+10% FBS を 8 ml 用いた。

2.1.3. 除核, マイクロインジェクション, 融合, 活性化及び胚培養

第 II 成熟分裂中期に当たる回収卵子の卵丘細胞は、ヒアルロニダーゼを 0.1% 含む CR2 HEPES バッファー (1% Non-essential amino acids 補足) 内でピペッティング処理を施すことにより除去した。その後、5 μ g/ml bis Benzimide H 33342 で 5 分間染色を行い、落射蛍光顕微鏡を用いて 200 倍の倍率で観察を行った。マイクロマニピュレーターを用いて卵子の除核を行った。培地は、1% Non-essential amino acids 補足した CR2 HEPES バッファー +10% FBS に 5 μ g/ml cytochalasin B を添加したものを用了。bis Benzimide H 33342 で染色した第 I 極体とその近くにある染色体をアスピレーションピペットにより取り除いた。除核卵子は Medium 199 HEPES+10% FBS 内で保持した。核移植は、1% Non-essential amino acids 及び 100 μ g/ml phytohemagglutinin を補足した CR2 HEPES バッファー中に移動させた除核卵子のアスピレーションピペット挿入部位に、既述のアフガンランド種由来耳真皮から単離した線維芽細胞 1 個をインジェクションすることで行った。なお、phytohemagglutinin はドナー細胞とレシピエント側の細胞質の融合を促すために用いられた。その後、260 mM mannitol, 0.1 mM 硫酸マグネシウム, 0.5 mM HEPES 及び 0.05% BSA を含む培地に卵子を移し、Cell fusion chamber 上で活性化処理を施した。1 時間後に、実体顕微鏡下でドナー細胞とレシピエント側の細胞質の融合の状態を観察した。移植を行うまでの間、卵子は 25 μ l mSOF 培地当たり 5-6 個の割合となるよう分割し、39°C, 5% O₂, 5% CO₂ 及び 90% N₂ の気相下で保持した。

2.1.4. 移植

再構築胚は、排卵後 2-4 日目のレシピエント個体の子宮角に移植した。具体的には、レシピエントに塩酸ケタミンとキシラジンを静脈内投与することで前麻酔処理を施した後、2% イソフルランで麻酔を維持した。開腹手術下で子宮を手繰り寄せ、3.5 Fr の Tom cat catheter を用いて片側の子宮角に胚を移植した。移植後 23 日目には、超音波画像診断装置により妊娠診断を行った。

2.2. ウシとブタ

2.2.1. レシピエント卵子

ウシ及びブタの卵巣は、屠殺場でサンプリングし、30-35°C の生理食塩水に浸した状態で加温しながら実験室に運搬した。卵巣の直径 2-8 (ウシ) 及び 3-6 (ブタ) mm の卵胞から、18 G の針を装着した 10 ml のシリンジを用いて卵子を含む卵胞液を吸引回収した。顆粒膜細胞あるいは 3 層以上の卵丘細胞が付着した卵子を選抜し、数種の因子を補足した修正 199 medium を用いて 500 μ l 当たり 30-40 (ウシ) 及び 50 (ブタ) 個の割合となるよう分割し、39°C, 5% CO₂ 及び 95% Air の条件下で成熟培養を開始した。

数層の卵丘細胞が付着した良質な卵子を選抜することが重要であり、卵子の成熟割合を左右する。クローン研究における大半の問題点はレシピエント卵子の数に制約があることである。卵子の体外成熟培養には、より *vivo* に近い環境を再現することが重要である。

2.2.2. ドナー細胞と核移植

ドナー細胞は、妊娠 40 日齢の胎子から線維芽細胞を単離し用了。胎子の頭部をハサミを用いて切除し、肝臓、腸管等の比較的柔らかな組織は鉗子で掻き出した。残りの組織を細切し、0.1% トリプシン及び 1 mM EDTA を含むハンクスメディアウム内で 1-2 時間培養し細胞を解離させた。トリプシン処理終了後、300 \times g, 10 分間の遠心処理により DPBS で 1 回洗浄し、直径 100 mm のカルチャーディッシュ

ュ内で培養した。培養条件は、37–39°C、5% CO₂ 及び 95% Air であり、6–8 日間培養を継続した。培地は、数種の因子を補足した DMEM+10% FBS を用いた。

浮遊した細胞もしくは組織片の凝集を除去した後、接着した細胞のみをさらに培養した。細胞の継代培養は5–7 日間隔で行った。5 分間のトリプシン (0.1% トリプシン及び 1 mM EDTA) 処理により解離した細胞は、2 回の継代培養後に凍結保存を行った。凍結保存用培地は、イヌの場合と同様な組成のものを用いた。融解後の細胞は、カルチャーディッシュ内のおよそ 80% の増殖が認められるまで 3–4 日間の培養を行い、FBS を 0.5% にまで減少させた DMEM 内で 3 日間培養を継続させた。その後、30 秒間のトリプシン処理により単層から解離させ、SCNT に用いた。

SCNT では、成熟培養後の卵子はピペッティングにより裸化処理を施し、マイクロマニピュレーターを用いて除核を行った。ウシ卵子では cytochalasin B を添加した CR2 Hepes バッファーを、ブタ卵子では cytochalasin B を添加した NCSU–23 Hepes をそれぞれ基礎培地として用いた。

除核操作後、卵子は 5 µg/ml bis Benzimide H 33342 で 5 分間染色を行い、落射蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。除核が完全ではない卵子は SCNT から除外した。既述の線維芽細胞の中から表面が滑らかなもの 1 個をインジェクションした。

その後、260 mM mannitol, 0.1 mM 塩化マグネシウム, 0.1 mM 塩化カルシウム及び 0.5 mM Hepes を含む培地に卵子を移し 4 分間平衡させた後、Cell fusion chamber 上で活性化処理を施した。

融合の方法は、化学刺激、不活化ウイルスの刺激及び電気刺激によるものがあるが、電気刺激による手法が一般的である。

移植を行うまでの間、ウシ卵子は 25 µl mSOF 培地当たり 5–6 個、ブタ卵子は 25 µl NCSU–23 当たり 5–7 個の割合となるよう分割し、それぞれ 39°C、

5%O₂、5% CO₂ 及び 90% N₂ の気相下で保持した。

2.2.3. リプログラミング

体細胞の核は、未受精卵に移植されると遺伝子発現プロファイルが復帰させられ、全能性を獲得する。このプロセスが「リプログラミング」であり、除核卵子に移植された核はリプログラミングが起こることが証明されている。結果として、再構築直後の胚が生物学的な時間をリセットする。

2.2.4. 再構築胚の発生培養と移植

再構築胚の培養は発生に悪影響を及ぼす。しばしば、Cell block を被る。当初、このような理由から発生の初期段階のみの同種または異種となる動物の子宮への移植が試みられたが、近年、種々の優れた培地が開発された。しかし、胚の発生培養技術は完全とは言い難く、例えば、妊娠率が低いこと、流産子となる割合が高いこと及び産子が過大子症候群である割合が高いことなどが知られている。また、SCNT 技術では、レシピエント卵子の細胞質ミトコンドリア DNA の胚への影響を除外することはできないため、本当に体細胞クローン動物といえるか否かという疑問が常について回る。多くの科学者は、ヒト X 染色体連鎖性遺伝病及び絶滅した動・植物に影響を与えないためのミトコンドリア DNA 除外のための手法発見に努力している。核移植に用いる組換え体によりミトコンドリア DNA の影響を消失することが期待される。胚はある発生ステージでレシピエントの子宮に移植される。

3. クローン技術の展開と可能性

遺伝子組換え動物、特に、ヒトの病気モデルは SCNT 技術により作出可能である。マウス以外の動物に関しては限定的に研究されてきた経緯がある。クローン技術は新しい製剤及び新規化合物探索の研究を加速させ、遺伝子組換え動物を用いた研究は人の生活を向上させ、寿命を伸ばすことに貢献するであろう。

4. 初めて作出に成功したクローン犬「スナッピー」

4.1. 結果

ここに、クローン犬誕生に関して報告する。

世界初のクローン犬の作出は、2005年8月4日にソウル大学が発表した。8月24日にソウル大学獣医病院で530gの世界初のクローン犬「スナッピー」が誕生した。スナッピー (Snuppy) は、ソウル大学 (SNU) と子犬 (puppy) とを合わせて名付けられたもので、3歳齢のアフガンフェンド種「タイ」(雄)のクローンであった。借腹犬は4歳齢の雑種であった。今回の研究成果は、Nature 誌 (436巻, 7051号, 2005年) に掲載されている (写真1)。



写真1 左：体細胞供与犬「タイ」、
右：クローン犬「スナッピー」

4.2. 研究成果の意義

犬に関して、卵子の培養は不明確な部分が多く、SCNT手技は不可能であると考えられていた。また、排卵卵子は未成熟な状態にあること及び発情回帰が年2回しか認められないこと等ユニークな繁殖生理を有することからクローン犬の誕生は難しいと思われた。

我々は、1,095個の胚を123頭の借腹犬に移植し、

3胎子の着床に成功した。スナッピーを除く、1頭は流産子となり、残り1頭は560gで帝王切開により誕生したが3週齢時に誤嚥性肺炎で死亡した。

スナッピーと3週齢時に死亡したクローン犬の2頭とタイのゲノムDNAをマイクロサテライト・アナライシスにより検査したところ、同一であることが認められ、また、血液型も一致した。

これらの研究は、2002年8月より開始したものであった。

4.3. 今後の展開

クローン犬は遺伝病のための新規治療に有用である。また、ヒトの病気モデルとして用いることにより、創薬と細胞治療が可能となるため、クローン動物とこれを用いた細胞療法の確立は究極の目標である。さらに、多くの未知の遺伝病の研究及び治療法の開発のために有用である。さらなるステップとして、韓国灰色オオカミを含む絶滅危惧種のクローンの作出が可能となった。

5. まとめ

我々は、クローン犬以外にイヌレシピエント卵子を用いた2頭のクローン灰色オオカミの作出に成功した (写真2)。これらの研究は、SCNT技術は絶滅危惧に瀕したイヌ科動物の保存のための実用的アプローチであることを意味する。



写真2 クローンオオカミ

ミニブタ及びイヌにおける 生殖工学技術の開発とモデル動物の作出

島津美樹 (研究員)

1. はじめに

私は昨年9月に財団法人日本生物科学研究所に入所し、現在、核移植技術を用いた実験動物の作出に関する研究を主たる課題として掲げ業務を遂行している。本日は、これまでに関わってきた特にミニブタ及びイヌに関する生殖工学技術の開発とモデル動物の作出について紹介する。

2. ゲッチングン系ミニブタを用いた研究

ブタは、解剖学的及び生理学的特性がヒトに類似しており、古くから生物医学的研究に用いられてきた。しかし、体重は6ヶ月齢で90 kg 前後あり、繁殖用個体では300 kg にまで及ぶため、外科的手術の処置等を施すのは容易ではない。これらのことから、より小型なブタ (ミニブタ) の育種改良がなされるようになった¹⁻⁶⁾。我が国においては、1967年に当研究所及び現独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構畜産草地研究所にピットマンムーア系ミニブタ、1975年に財団法人実験動物中央研究所及び現株式会社中外医科学研究所にゲッチングン系ミニブタが導入され、系統維持がなされた⁷⁾。また、オーミニ系ミニブタ、クラウン系ミニブタ等の新規系統の作出も行われた⁷⁾。

近年、欧米ではミニブタの実験動物化の検討が急速に進み、医薬品開発等の評価に関わるガイドラインに使用動物種として加えられた。1998年度の欧州におけるブタの実験使用頭数は14,000余りとなり、そのおよそ3割はミニブタであったことが報告されている。一方、日本国内で実施された動物実験に関するアンケート調査では、2001年度のブタ及びミニブタ使用頭数は3,371に及んでいる。しかし、この数値は任意回答の集計結果であるため、実際の使用頭数はより多いものと考えられる。

私は、1994年から2000年の間、現独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構の出資事業に参加し、ゲッチングン系ミニブタ (写真1) の実験動物化のための背景データ、飼育・実験手技マニュアル等の整備、さらには遺伝子導入個体作出を最終目的に据えた生殖工学技術確立に関するプロジェクトに従事した。当時、農林水産省は実験動物を第三の家畜と位置付け⁸⁾、研究助成に注力しており、特にミニブタにおいては、イヌ及びサルに代わる中型実験動物としての需要拡大が期待されていた。そのため、実験動物として必須な体系的・普遍的ベースラインデータの充実、飼育管理方法の確立、実験手技の検討等が急務な状況にあった。私が参加したプロジェクトの成果としては、実験マニュアルの作成⁹⁾、精液の液状保存技術¹⁰⁾及び凍結保存技術の確立、過剰排卵誘起技術の確立¹¹⁾、発情同期化技術の確立¹²⁾、受精卵移植技術の確立、マイクロインジェクション法による遺伝子導入個体の作出¹³⁾等がある。



写真1 8ヶ月齢のゲッチングン系ミニブタ (雌)

3. イヌを用いた研究

筋ジストロフィーは、筋線維の変性・壊死を主病変とし、進行性の筋力低下を示す経過をとる遺伝性の疾患である。近年、同病態のモデル動物としてマウス、ハムスター、ネコ、イヌ等で自然発症個体が

見出され、維持・繁殖がなされるようになった。さらに、トランスジェニック、ジーンターゲットング等の手法による数多くのモデルマウスの作出が行われている。これらモデル動物の中で、筋ジストロフィー犬は進行性で重篤な症状を示すことから、モデルとしては最適であり、最も注目されている。

Cooper ら¹⁴⁾ 及び Kornegay ら¹⁵⁾ は、ゴールデンレトリバー種に X 染色体連鎖性劣性遺伝をとり、進行性の筋力低下を示す個体のあることを見出し、筋ジストロフィー犬 (Golden retriever muscular dystrophy; GRMD) のコロニーを確立した。我々は、同コロニーの病態犬の凍結精液を用いることでビーグル種との交雑による新たな病態犬コロニーの立ち上げに成功し、この筋ジストロフィー犬を Canine X-linked muscular dystrophy in Japan; CXMD_J と名付けた¹⁶⁾。CXMD_J (写真 2; 参考文献 17 より引用) の病態^{16), 17)} を Kornegay ら¹⁵⁾ Valentine ら^{18), 19)} の GRMD における病態解析と比較した場合、より軽度であることが推察された。その原因は、ビーグルとの交雑による特異性、体格の小型化に伴う総筋肉量の減少等が考えられた。

また、凍結精液を用いた授精タイミング、精子数及び授精回数の検討^{20), 21)}、授精タイミングと繁殖成績の検討²²⁾、さらにはドパミン作動薬を用いた発情統御の検討等イヌにおける生殖工学技術確立を目指した研究を行った。



写真 2 12 ヶ月齢の CXMD_J (参考文献 17 より引用) 側頭筋の萎縮、関節の拘縮等が認められる

4. おわりに

私は、入所以来、外部機関にて遺伝子改変動物を作出するための核移植技術について研修を受けてき

た。現在、本技術による研究の本格稼働に向け、基礎データを集積しているところである。

参考文献

- 1) Bustad LK, *et al.*: Swine in Biomedical Research, Bustad LK and McClellan RO (eds) (1966) pp. 769–774.
- 2) England DC, *et al.*: Growth (1954) 17:207–214.
- 3) Glodek P: Swine in Biomedical Research, Tumbleson ME (eds) (1986) pp. 23–28.
- 4) Haring F, *et al.*: Swine in Biomedical Research, Bustad LK and McClellan RO (eds) (1966) pp. 789–796.
- 5) Rempel WE and Dettmers AE: Swine in Biomedical Research, Bustad LK and McClellan RO (eds) (1966) pp. 781–787.
- 6) Tumbleson ME, *et al.*: Swine in Biomedical Research, Tumbleson ME (eds) (1986) pp. 597–609.
- 7) 中西喜彦: アニテックス (1999) 11:4–11.
- 8) 農林水産省畜産局家畜生産課: 第三の家畜—実験動物— (1986).
- 9) 谷川学ほか: ミニブタ実験マニュアル (2000).
- 10) Shimatsu Y, *et al.*: Exp Anim (2002) 51:143–147.
- 11) Shimatsu Y, *et al.*: Theriogenology (2000) 53:1013–1022.
- 12) Shimatsu Y, *et al.*: Vet Rec (2004) 155:633–635.
- 13) Uchida M, *et al.*: Transgenic Res (2001) 10:577–582.
- 14) Cooper BJ, *et al.*: Nature (1988) 334:154–156.
- 15) Kornegay JN, *et al.*: Muscle Nerve (1988) 11:1056–1064.
- 16) Shimatsu Y, *et al.*: Exp Anim (2003) 52:93–97.
- 17) Shimatsu Y, *et al.*: Acta Myol (2005) 24:145–154.
- 18) Valentine BA, *et al.*: Acta Neuropathol (Berl) (1986) 71:301–310.
- 19) Valentine BA, *et al.*: J Neurol Sci (1988) 88:69–81.
- 20) Shimatsu Y, *et al.*: J Reprod Dev (2000) 46:315–318.
- 21) Shimatsu Y, *et al.*: Vet Rec (2003) 153:369.
- 22) Shimatsu Y, *et al.*: Reprod Dom Anim in press.

新人紹介

個人情報保護のため、新人紹介欄は削除させていただきました(2010年9月)。



—— 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、研究の永続性を願う気持ちを心よいリズムに整え、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547号) 平成19年10月25日印刷 平成19年11月1日発行(第53巻第6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
TEL: 0428(33)1056(企画学術部) FAX: 0428(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)