

# トランスジェニックブタの作出

日清製粉(株) 那須研究所  
山川 宏人

遺伝子導入動物の生産は将来、世界の食糧生産、医学研究および医療に多大な影響を与えるであろうことが予測される。すでに欧米および豪州では、家畜の遺伝子導入の研究が活発で、肉や羊毛の生産性の向上を目的とした畜産分野での応用や、遺伝子導入ウシおよびヒツジの乳汁中に医薬原料となるような物質を生産させることのほか、ヒト臓器移植における異種移植ドナーとしてトランスジェニック(Tg)ブタの作出が試みられ、それらの一部は産業化の段階にある。一方、わが国では遺伝子導入家畜の作出の研究は、未だ諸外国に比して遅れており、その原因として、ブタやウシのような大型家畜を多数飼育して研究に供するのが困難な、わが国の研究環境の制限とともに、Tgブタの作出に関わる基盤技術が未確立であることが挙げられる。これらの現状をふまえ、われわれはまず、遺伝子導入ブタの作出に汎用され得る基盤技術の開発を目的として、DNA導入細胞となる受精卵の効率的な採取、培養、体外受精系等に関して検討を行った。本講ではそれらTgブタ作出に関わる技術を紹介し、またそこで得られた知見をもとに、実際に行ったTgブタ作出例にも触れる。

## －トランスジェニックブタ作出のための基盤技術－

### (1) 1細胞期胚(前核期胚)の採取

ブタの排卵はLHサージあるいはhCGの投与後約41時間に起こると言われている<sup>(1,2)</sup>。精子が卵子内に侵入するのが排卵後2時間以内、その後5-6時間で核膜形成および染色体のdecondensationを終了し、同時に前核が最大の大きさになる<sup>(3)</sup>、とするとDNA導入の宿主細胞として用いられる前核期胚の採取は、hCG投与後約48-49時間に実施するのが適切と言える。われわれが行った採卵時期の検討(表1)でも、hCG後49時間の採卵で最も高率に1細胞期胚が採取され

(374/466, 80.3%) また2細胞期胚の出現頻度も低かった(7/466, 1.5%)。しかしながら、別の機会の実験では、hCG後45時間を過ぎると、2細胞期胚が多く回収されるようになり、43~45時間で最も効率よく1細胞期胚が採取されるという、異なる結果が得られた。これらのことから、効率よく1細胞期胚を採取するためには、使用するホルモン製剤のロット差、実験実施の季節、ドナーの系統、その他の要因の影響を、実験毎にある程度考慮する必要があると考えられる。

過排卵処置を施された雌の発情発現時期には個体差があり、このことはDNA注入に適当な発達ステージの胚を効率よく採取するための障害となる。われわれ

は主に、過排卵処理後、雄を許容しない程度の弱い発情しか示さない雌に、hCG後28~30時間に人工授精を施したが、その後の採卵では、自然交配した雌を用いた場合と比べ遜色ない成績で前核期胚が得られた(表2)。このように人工授精の利用は、胚の採取のために多数の種雄ブタを飼育することの、経済的、労力的負担を軽減させるばかりでなく、ステージの揃った前核期胚の採取にも有効であることが示された。

ブタの排卵数は通常10~15個程度であるが、交雑種(ランドレース×オクシヤー)未経産雌ブタ(5~6ヶ月齢、体重60~80kg)を用いて行ったわれわれの実験では、PMSG 1500単位の投与によって、1頭当たり約20個の受精卵を採取することができた

(表3)。ただし、過排卵処置に対するブタの反応性には、個体差、系統差が見られ、ミニブタ(ゲッチンゲン種)からの採卵成績は、過排卵処置した場合1頭当たり10~15個、無処置の場合は数個であった<sup>(4)</sup>。

### (2) 1細胞期胚の培養

より効率的なDNA導入方法の開発を目的として、DNA注入等の操作の胚への影響を調べる際、良好な胚の培養方法が必須である。ブタ1細胞期胚を培養すると4細胞期で発生が停止する、いわゆる発生ブロックが起こるとされてきた。しかし、近年、培養液への高濃度のBSAの添加<sup>(5)</sup>によって4細胞期以後への発達を誘起し得ることが報告され、またブタだけでなく他の動物種でも顆粒膜細胞あるいは卵管上皮細胞との共培養が発生ブロックの解消に有効であることが明らかにされている<sup>(6,7)</sup>。演者らが4種類の培養系を比較した結果では(表4)、共培養系だけでなく、15mg/mlの濃度にBSAを含むWhitten液<sup>(8)</sup>によってブタ1細胞期胚を胚盤胞へ発達させ得ることができた。これによって、今後DNAの導入操作、その他の処置の胚への影響を調べる際には、培養による胚の生存性、発達能の検証という方法が取り得ることが示された。

### (3) 体外受精

前核へのDNA注入によって得られるTgブタの出現頻度は著しく低く、これまでの多くの報告では、使用した胚の数に対して1%前後に過ぎない<sup>(9,10)</sup>。従って、Tgブタの作出には多数の胚が必要であるが、DNAの注入に適した前核期胚の生体からの採取は、マウスの場合と比べてかなり非効率的で、このことは、研究遂行上の制限要因となり得る。この問題の解決のためには、屠場材料(卵巣)を用いての体外受精による、胚の大量生産は非常に重要である。また今後、効率的なDNA導入方法の開発を試みるためにも、多数の研究材料が経済的に供給されなければならない。しかし、われわれの行った検討結果(表5)だけでなく、現在までの他の報告でも、体外受精胚の発生率は体内受精胚に比して低く<sup>(11)</sup>、DNA注入の宿主細胞として体外受精胚が安定的に利用できるとは未だ言い難い。体外受精胚の発生能には多数の要因が関与しているが<sup>(12)</sup>、屠場卵巣由来の未成熟卵を利用する場合、卵の体外成熟系が特に重要である。卵胞卵の体外成熟方法が不完全なことは、体内成熟卵との比較によって明らかであり、今後成熟培養の

条件について一層の検討が必要であろう。

#### (4) マイクロインジェクション法によるブタ胚へのDNA導入

ブタ胚の前核は、細胞中に含まれる多量の脂肪顆粒を、遠心分離(12,000×g, 8分間)によって細胞質の一極に片寄せさせた後、微分干渉顕微鏡下でDNAを注入する。前核に注入されたDNAは、それぞれ半数体ゲノムを有する両前核が後に接合し、2倍体を形成する際に染色体上に組み込まれる。すなわち、1細胞期胚の2倍体ゲノムに外来遺伝子DNAが組み込まれる結果、その遺伝子は後の細胞分裂過程を通じて、胚固有の他の遺伝子と共に複製され、最終的にその胚から発生した個体の全細胞に伝達される。しかし、外来遺伝子の胚ゲノムへの組み込みが、胚の最初の分割後(2細胞期以後)に起こった場合、導入遺伝子を持たない細胞の系列が生じ、得られた個体の体組織が外来遺伝子に関してモザイク状態になることもある。このようなモザイク状態での外来遺伝子の組み込みは、マウスでは約30%の頻度で生じると言われている<sup>(13)</sup>。

### —トランスジェニックブタの作出の実例—

わが国における外来遺伝子導入実験の対象動物は長年、マウス、ラット、ウサギ等の小動物に限られていたが、これまでに得られた知見をもとに、最近われわれが行ったTgブタ作出例を次に示す。

#### (1) 活性化ras 遺伝子導入トランスジェニックブタの作出

ヒト腫瘍研究のモデル動物の開発を目的として、活性化ras 遺伝子(MMTV/v-Ha-ras)が導入されたTgブタの作出を試みた。この遺伝子を用いて作出したTgマウスが出生後、成長/繁殖することができ、かつ導入遺伝子の発現を示すことはあらかじめ確認されている<sup>(14)</sup>。新しくクローン化された遺伝子を用いる際には、予備実験としてマウス胚への注入を行い、発生阻害の有無、組み込み頻度、発現の効率などを確認した上で、ブタの実験への適否を判断することが肝要である。先述したように体外受精系の確立には至らなかったため、Tgブタ作出実験には、過排卵処理された未経産雌ブタから採取した体内受精卵を用いた。導入したDNAはマウス乳癌ウイルスプロモーターと連結した活性化v-Ha-raの4.8Kb断片であり、このDNAを緩衝液にて希釈後、遠心分離処理後のブタ1細胞期胚の前核に注入した。合計8頭のレシピエントにDNA注入胚合計195個を移植(一部のレシピエントには無処置胚を合わせて移植)した結果、7頭が妊娠し(88%)、そのうち5頭(63%)が、それぞれ4~9頭の子ブタを出産した(表6)。合計29頭の子ブタのDNAを分析した結果、1頭の子ブタに導入DNAの組み込みが認められた。現在、子孫への遺伝子伝達を調べるため、繁殖に供している。

## (2) ヒト補体制御因子遺伝子導入Tgブタの作出

欧米では、脳死臓器移植が末期臓器機能不全に対する治療法として既に定着している。しかし現在深刻な臓器提供者不足から、ヒト以外の動物から臓器の提供を受ける異種移植の研究が、近い将来の臨床応用を目指して精力的に行われている。移植臓器の提供動物としては、移植時の拒絶反応を考えた場合、系統発生学的にヒトに近いチンパンジーやヒヒなどの霊長類が有利ではあるが、これらの動物は繁殖力の低さからくる数の制限や、動物愛護面での問題があるため、国際移植学会の倫理委員会では、自然に生息しているものより人工的に飼育した動物が望ましいと勧告している。このような観点から、臓器が解剖学的にも、また生理学的にもヒトと類似点が多く、かつ繁殖力が旺盛で、食肉家畜としての歴史も長いブタが、異種移植ドナーとして最近注目されるようになった。

ブタからヒトへの移植のような、種の遠い動物からの異種移植での最大の障壁は、移植後数分から数時間以内に移植臓器が拒絶される超急性拒絶反応である。この反応は主にヒトの血中の自然抗体と反応する抗原が異種臓器細胞膜上に存在することが引き金になり、ヒト補体系が活性化することにより、生ずるといわれている<sup>(15)</sup>。これを克服する手段の一つとして、ドナー動物の遺伝子操作による異種免疫反応の抑制が有望視されるようになり、既に諸外国の研究グループでは、ブタへのヒト補体制御タンパクの遺伝子の導入を行っている<sup>(16-19)</sup>。

わが国においては、未だ脳死臓器移植は開始されていないが、将来臓器移植法案が整備され、これが可能になったとしても、欧米の現状から見て早晚臓器提供者数が頭打ちになるであろうと考えられる。そこでわれわれは、異種移植研究に資することを目的として、ヒト補体系の活性化抑制因子の遺伝子を導入したTgブタ作出を試みた。用いたDNAは、ヒト補体制御因子であるDAF, CD59およびMCPの遺伝子で、それらを3種混合してブタ胚の前核に微量注入した。DNAが注入された合計263個の胚を、合計11頭のレシピエントに移植した結果、8頭が妊娠し、そのうちの4頭から計8頭の産子が得られた。これらの個体の尾組織から抽出したDNAをPCR法により解析した結果、2頭に導入したDNAのうちDAF遺伝子のみ、組み込みが認められた(表7)。現在、得られたTgブタにおける導入遺伝子の発現を解析中である。なお本実験は、名古屋大学医学部第2外科学教室、高木弘教授らのグループと共同で実施した。

## —今後の課題—

わが国では、Tg家畜の飼育が未だ閉鎖系に限定されており、その遵守のためにかかる設備経費や糞尿処理等の労力は、研究遂行上の大きな障害となっている。既にアメリカ、オーストラリアでは、Tg家畜の飼育が解放系飼育に移行しており、わが国においても、それら諸外国での議論を参考に現実的なガイドラインの早急な整備が望まれる。

現状の遺伝子導入および発現頻度の低さから、Tgブタの作出を経済的に行うた

めには、屠場で採取した卵巣からの体外受精卵の作出が重要である。しかし、先述したように、ブタ卵の体外成熟／体外受精系では、異常受精の多発と胚発生能の低さが解決しておらず、今後の研究が待たれる。

マウスでは既にES細胞（胚性幹細胞）が樹立され、標的遺伝子導入法によって、特定の遺伝子が破壊あるいは修飾された個体を作ることが可能である<sup>(20-22)</sup>。一方、ブタのES細胞株の作出に関しては、未だ不明な点が多く、今後生殖細胞分化能を維持したES細胞株の樹立が期待される。

最後に、今後より社会に貢献し得る有用なTgブタの生産およびその利用を効率的に行うためためには、分子生物学、生殖生物学、畜産学、医学など多分野を有機的に結び付けた総合的な研究開発体制の整備が望まれる。

#### [参考文献]

- (1) Hunter RHF; J Reprod Fert 15, 199-208, 1968
- (2) Hunter RHF; J Reprod Fert 29, 395-406, 1972
- (3) Prochazka R, Kanka J, Sutovsky P et al; J Reprod Fert, 96, 725-734, 1992
- (4) Yamakawa H, Nagashima H, Katoh Y et al; Exp Anim 39, 413-415, 1990
- (5) Menino AR and Wright RW; J Anim Sci 54, 583-587, 1982
- (6) Ellington JE et al; J Reprod Fert 89, 293-299, 1990
- (7) Saitoh S, Yamakawa H, Nagashima H; Assist Reprod Tech/Androl 259, 257-266, 1992
- (8) Whitten WK; Adv Biosci 6, 129-141, 1971
- (9) Hammer RE et al; Nature 315, 680-683, 1985
- (10) Pursel VG et al; J Reprod Fert Suppl 40, 235-245, 1990
- (11) Yoshida M, Ishizaki Y, Kawagishi H; J Reprod Fert 88, 1-8, 1990
- (12) Hunter RHF; J Reprod Fert Suppl 40, 211-226, 1990
- (13) Palmiter RD and Brinster RL; Ann Rev Genet 20, 465-499, 1986
- (14) Nagashima H, Yamakawa H, Nomura N et al; J Reprod Dev 39, 259-268, 1993
- (15) 高木 弘、林 衆治、小池千裕他; 今日の移植 7, 193-198, 1994
- (16) Cozzi E, Langford G, Tucker A et al, 15th World Congr Transplant Soc, 167, 1994
- (17) Carrington CA, Richards AC, Cozzi E et al; 15th World Congr Transplant Soc, 167, 1994
- (18) Yannoutsos N, Langford G, Cozzi E et al; 15th World Congr Transplant Soc, 168, 1994
- (19) Concar D; New Scientist, 24-29, 1994
- (20) Capecchi MR; Science 244, 1288-1292, 1989
- (21) Kuehn MR, Bradrey A, Robertson EJ et al; Nature 326, 295-298, 1987
- (22) Thompson S, Clarke AR, Pow AM et al; Cell 56, 313-321, 1989

表1、過排卵誘起（PMSG1000IU/hCG750IU）された未経産雌ブタにおける、採卵時間毎の採卵成績

採卵時間*	供試頭数	回収卵数 (%)			平均 受精卵数
		未受精	1細胞期	2細胞期	
45**	17	170 (85.0)	22 (11.0)	8 (4.0)	1.8
48**	7	24 (34.3)	46 (65.7)	0 (0)	6.6
49**	3	14 (38.9)	22 (61.6)	0 (0)	7.3
49***	23	71 (16.5)	352 (81.9)	7 (1.6)	15.6

\* hCG 投与後の時間

系統A\*\*とB\*\*\*のブタを供試

表2、過排卵誘起された未経産雌ブタにおける自然交配および人工授精後の採卵成績

	供試頭数	回収卵数			平均 受精卵数
		未受精	1細胞期	2細胞期	
人工授精	16	70	230	6	14.8 <sup>a</sup>
自然交配	9	13	144	1	16.1 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>有意差なし

表3、未経産雌ブタ(5~6ヶ月齢)へのPMSG1000単位および1500単位投与による過排卵誘起成績

ドナー 系統*	PMSG 単位数	供試 頭数	平均 排卵数	回収卵数			平均 受精卵数	
				未受精	1-cell	2-cell		
A	1500	11	35.7 <sup>a</sup>	27	255	7	26.3 <sup>a</sup>	23.8 <sup>a</sup>
	1000	4	10.8 <sup>a</sup>	7	20	0	6.8 <sup>a</sup>	5.0 <sup>a</sup>
B	1500	12	24.3	109	46	0	12.9	—
	1000	11	—	85	22	8	10.5	—

\* hCG 投与後49時間 (A) および45-48 時間 (B) で採卵

<sup>a</sup> 有意差あり (p<0.01)

表4、4種の培養系におけるブタ1細胞期胚の発達成績

実験区	気相	供試 胚数	各ステージへの発達				
			≥2cell	≥4cell	≥8cell	≥Morula	≥Blast.
#1. mBMOC-3 +顆粒膜細胞層		50	46 (92.0)	44 (88.0)	40 (80.0)	40 (80.0)	33 (66.0)
#2. mKRB +卵管上皮細胞膜集塊	5%CO <sub>2</sub>	53	52 (98.1)	49 (92.5)	48 (90.6)	48 (90.6)	39 (73.6)
#3. mWhitten		35	35 (100)	34 (97.1)	29 (82.9)	29 (82.9)	18 (51.4)
#4. mWhitten	5%CO <sub>2</sub> 5% O <sub>2</sub> 95%N <sub>2</sub>	66	65 (98.5)	63 (95.5)	54 (81.8)	54 (81.8)	33 (50.0)

#1: mBMOC-3 +10%牛胎児血清+4mg/mlBSA, 500μl 小滴  
 #2: mKRB +10%子羊血清+4mg/mlBSA, 50μl 微小滴  
 #3, 4: mWhitten +15mg/mlBSA, 50μl 微小滴  
 全てのステージでグループ間に有意差なし

表5、体内成熟卵および体外成熟卵の体外受精後の発達成績

実験区	実験 回数	供試 胚数	各ステージへの発達 (%)				
			≥2cell	≥4cell	≥8cell	≥Morula	≥Blastocyst
体内受精 <sup>☆</sup> (体内成熟 <sup>*</sup> )	4	50	46 (92.0) <sup>a</sup>	44 (88.0) <sup>a</sup>	40 (80.0) <sup>a</sup>	40 (80.0) <sup>c</sup>	33 (66.0) <sup>c</sup>
体外受精 <sup>***</sup> (体内成熟 <sup>*</sup> )	4	88	74 (84.1) <sup>a</sup>	67 (76.1) <sup>a</sup>	46 (52.3) <sup>a</sup>	35 (39.8) <sup>a</sup>	18 (20.5) <sup>a</sup>
体外受精 <sup>***</sup> (体外成熟 <sup>**</sup> )	8	627	144 (23.0) <sup>b</sup>	122 (19.5) <sup>b</sup>	59 (9.4) <sup>b</sup>	47 (7.5) <sup>b</sup>	9 (1.4) <sup>b</sup>

発生培養: mBMOC-3 + 10%FBS + 4 mg/mlBSA、顆粒膜細胞層と共培養39℃、5%CO<sub>2</sub>

<sup>☆</sup> 表4の実験区#1と同データ

<sup>\*</sup> 体内成熟卵: 過排卵処理を施された雌の卵管から hCG投与後42時間に採取

<sup>\*\*</sup> 成熟培養: 550mg/lグルコース、100mg/lビルビン酸ナトリウム、900mg/ml乳酸ナトリウム、0.01AU/mlFSH、25%ブタ胎血清、10万単位/lペニシリンGカリウム、50mg/l硫酸ストレプトマイシン 加12.5mM HEPES 緩衝TCM-199、約50個卵-卵丘細胞塊/2.5ml、48時間培養

<sup>\*\*\*</sup> 媒精: 2mMカフェイン、5mg/mlBSA加BO液、最終精子濃度 5×10<sup>5</sup> /ml、6時間

<sup>a-c</sup>: 各ステージで異符号間に有意差あり(p<0.05)

表6、活性化 ras(MMTV/v-Ha-ras) 遺伝子導入  
トランスジェニック (Tg) ブタの作出

レピエント 番号	移植胚数			妊娠	産子数 (♂;♀;雑)	Tgブタ
	DNA注入胚	無処置胚	合計			
101	25	5	30	-	0	-
102	12	18	30	+	流産	-
103	31	5	36	+	流産	-
104	29	5	34	+	5(3;2;0)	0
105	32	0	32	+	5(1;3;1)	1(♀)
106	28	0	28	+	9(3;6;0)	0
107	26	0	26	+	6(3;2;1)	0
108	12	12	24	+	4(0;1;3)	0
109	0	20	20	+*	-	-

\* 妊娠40日に剖検した結果、胎児12頭を確認

表7、ヒト補体制御因子遺伝子導入トランスジェニック (Tg) ブタの作出

レピエント 番号	移植胚数			妊娠	産子数 (♂;♀;雑)	Tgブタ
	DNA* 注入胚	無処置胚	合計			
9	14	9	23	+	流産	-
10	29	5	34	-	-	-
11	17	18	35	+	流産	-
12	18	10	28	-	-	-
18	35	0	35	+	2(2;0;0)	1(♀)
24	25	11	36	+	2(0;2;0)	1(♂)
25	25	10	35	+	流産	-
29	18	6	24	+	流産	-
30	18	7	25	-	-	-
36	32	0	32	+	3(1;1;1)	0
37	32	0	32	+	1(1;0;0)	0

\* DAF, CD59およびMCP DNA