

NIBS LETTER 2007 MARCH
No. 543

日生研たより

2007年(平成19年)3月号 第53巻第2号(通巻543号)

挨拶・巻頭言

決意を新たに……………布谷 鉄夫 (2)

獣医病理学研修会

第46回 No. 916 イヌの肺
……………山口大学家畜病理学研究室出題 (3)

第46回 No. 925 イヌの頸部腫瘍
……………日本大学獣医病理学研究室出題 (4)

総説

人獣共通感染症をどのように克服するか
—インフルエンザをモデルとして—
……………喜田 宏 (5)

レビュー

体細胞クローン技術を用いた遺伝子導入動物
作出方法と課題……………勝 俣 淳 (8)



NIBS

財団法人 日本生物科学研究所

NIPPON INSTITUTE FOR BIOLOGICAL SCIENCE

<http://nibs.lin.go.jp/>

決意を新たに

布谷鉄夫

今冬は全国的に記録的な暖冬が続き、タンポポも平年より大幅に早く開花するなど春の前倒しが起きております。ここ青梅でも桜花がほころび始めたこの頃ですが、皆様におかれましてはいよいよ清適の御事とお慶び申し上げます。

年改まり早々から高病原性鳥インフルエンザが再発し、蔓延防止に昼夜奮闘された関係者の方々にはご苦勞の多い日々であったかと拝察いたします。3年前の初発以来、警戒が続く最中での発生で、多大な被害にあわれた生産者の方々には大変お気の毒であります。先回の経験を踏まえた関係者の迅速な防疫対応により、封じ込めが功を奏したようであります。感染経路については今回も渡り鳥説が有力視されていますが、仮に季節風により運ばれた塵埃などの可能性もあるとしたり、隣国で多発している現状を鑑み、今後相応の予防対策が必要になるかもしれません。

さて、本誌1月号で上田進理事長から紹介されておりますが、今年、弊所はその前身である社団法人日本生物科学研究所の設立から数えて60年目を迎えております。その設立理念については同号や過去の本誌等に詳しく紹介されておりますが、設立者の一人であった中村稔治元所長を中核とした先達方が歩んだ苦難の道と偉業、その後の諸先輩の献身的な努力によって築かれた幾多の輝かしい業績を改めて認識するとともに、創設理念を今後とも絶やすことなく継承していかねばならない責任の重さを痛感しています。

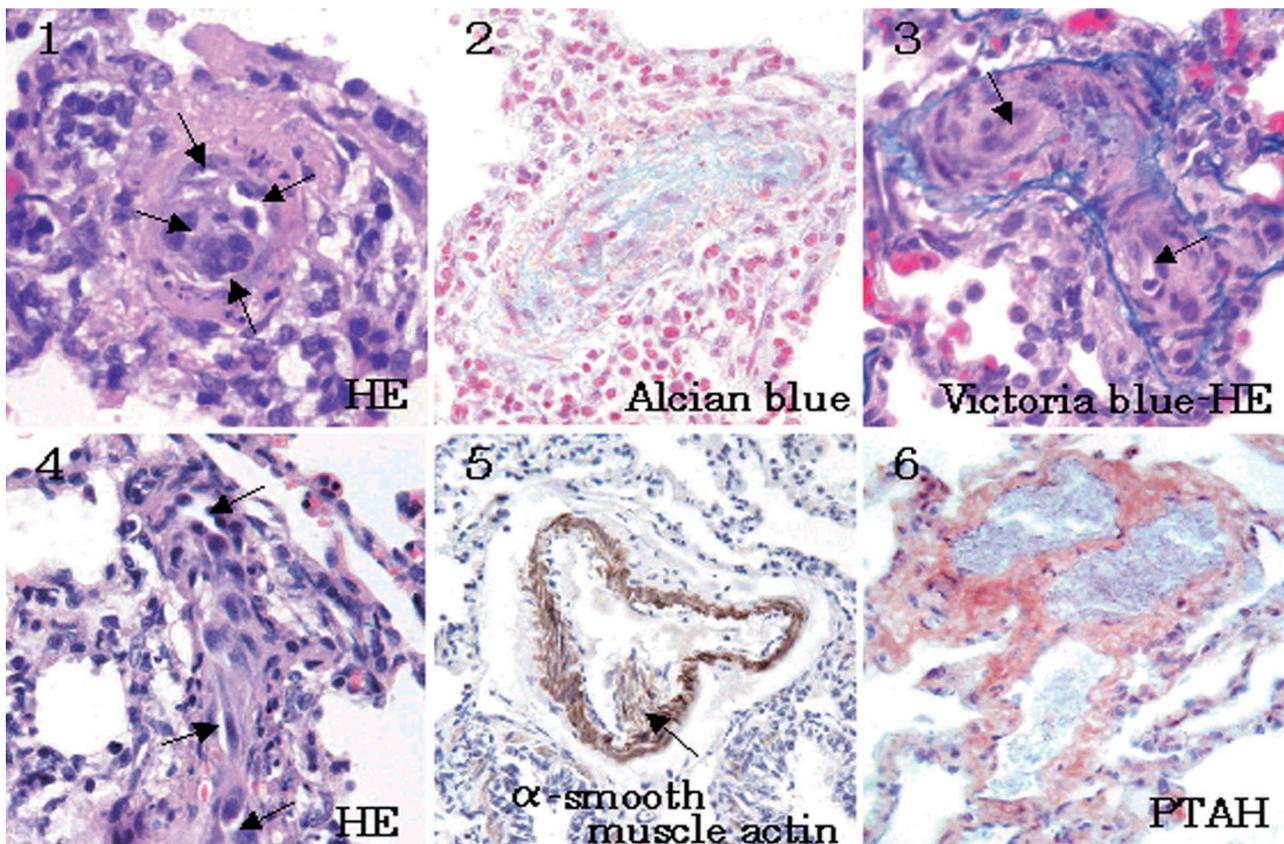
社団法人日本生物科学研究所が設立認可・発足した昭和22年当時は、戦後の混乱状態で多発した狂犬病や日本脳炎などの人獣共通伝染病が広く流行し、悲惨な社会状況であったようです。研究所に生物科学という広義の言葉が選ばれた趣旨については、生物科学の包括的な研究を対象とし将来の拡充発展の希望がこめられたためとされておりますが、当時家畜防疫が重要かつ緊急な問題であったことも反映し、当初の定款には「人類の福祉を増進することを使命として家畜衛生に関する研究を行い、畜産の健全な発達と公衆衛生の向上に貢献する」がうたわれたと記録誌に荒井 研元理事長が記載されています。また設立趣旨の背景には、敗戦による学術研究の衰退を打破し、研究の寡占状態による独善を排し、自由の気に満ちた世界に誇るに足りる民間研究所を作り、真実の追究と実社会に役立つ成果を創り出すという中村稔治元所長の不拔の信念があったということ折に触れ聴かされ、われわれ職員の心の支えとなって来ています。研究所は昭和34年社団法人から財団法人に移行し、それまで組織運営のため実施していた動生剤の製造、販売の収益事業を別に設立した日生研株式会社に移譲し、文部・農林両省（現文部科学省、農林水産省）共管の純学術研究機関になり現在に至っております。その間、主に家畜感染症に関する調査、研究ならびにそれらの成果として多くの画期的なワクチン開発が進められ、野外の伝染病撲滅に至大な寄与となったことが記録に残されています。

32年前、田島正典元研究所長の指導を請うて筆者が弊所に入所した当時、本所は立川に所在し、旧陸軍獣医資材本廠の一部を利用した木造立ての如何にも古いが故に愛着を覚えた施設でありました。その後青梅支所への統合を経て、組織の拡大とともに研究環境は大きく変わり、人、施設はもちろん、時間においても個人の工夫次第では大変恵まれた状況になっております。しかし、外に目を向ければあらゆる場面で厳しい競争が展開され、幾多の乗り越えなければならない課題があります。創立60周年を機に、研究所設立の理念を改めて認識するとともに、諸先輩がさまざまな困難を乗り越えながら築き上げてきた有形・無形の貴重な財産を維持しながら、新たな目標に向けて組織の使命と役割を明確に行動に移していく必要があると思います。今後とも皆様の変わらぬ、ご支援・ご協力をお願い申し上げます。

(常務理事・所長)

イヌの肺

山口大学家畜病理学研究室出題 第46回獣医病理学研修会標本 No. 916



動物：イヌ，ミニチュア・ダックスフンド，雄，2ヶ月，体重 1.7 kg。

臨床事項：本症例は，平成 14 年 8 月 30 日に心雑音を主訴に山口大学家畜病院に来院，エコー，レントゲン検査により心奇形，肺水腫，腹水貯留を認めた。9 月 8 日に容態が悪化し，10 日より同家畜病院にて利尿剤による治療を行った。9 月 11 日，造影レントゲン検査により動脈管の開存を確認したが，検査後まもなく徐脈になり，9 月 12 日 0 時に死亡，同日 17 時に剖検を行った。

肉眼所見：肺は表面・断面ともに，左前葉前部の辺縁部，右前葉の辺縁部，左後葉が白桃色で，その他の部位は暗赤色であった。橙赤色不透明漿液状胸水を約 3 mL，橙赤色不透明漿液状腹水を約 30 mL 入れていた。右心房は中等度～重度に膨隆，右心壁は中等度に肥厚，左心房内腔は軽度に拡張しており，約 3 mL の赤色透明漿液状心嚢水の貯留を認めた。肺動脈～大動脈弓間に直径 0.5 cm 程，長さ 1.5 cm 程の動脈管の開存を認め，肺動脈基部は重度に拡張していた。その他全身臓器のうっ血が見られた。

組織所見：肺では，中・小の肺動脈の内皮細胞の肥大，増生，変性および剥離，中膜の肥厚，変性，内皮下および外膜の浮腫を認めた。特に小動脈では，内膜の線維性肥厚や，中膜における fibrinoid necrosis や少数の好中球の浸潤と核破碎を伴う壊死性血管炎 (図 1) が見られ

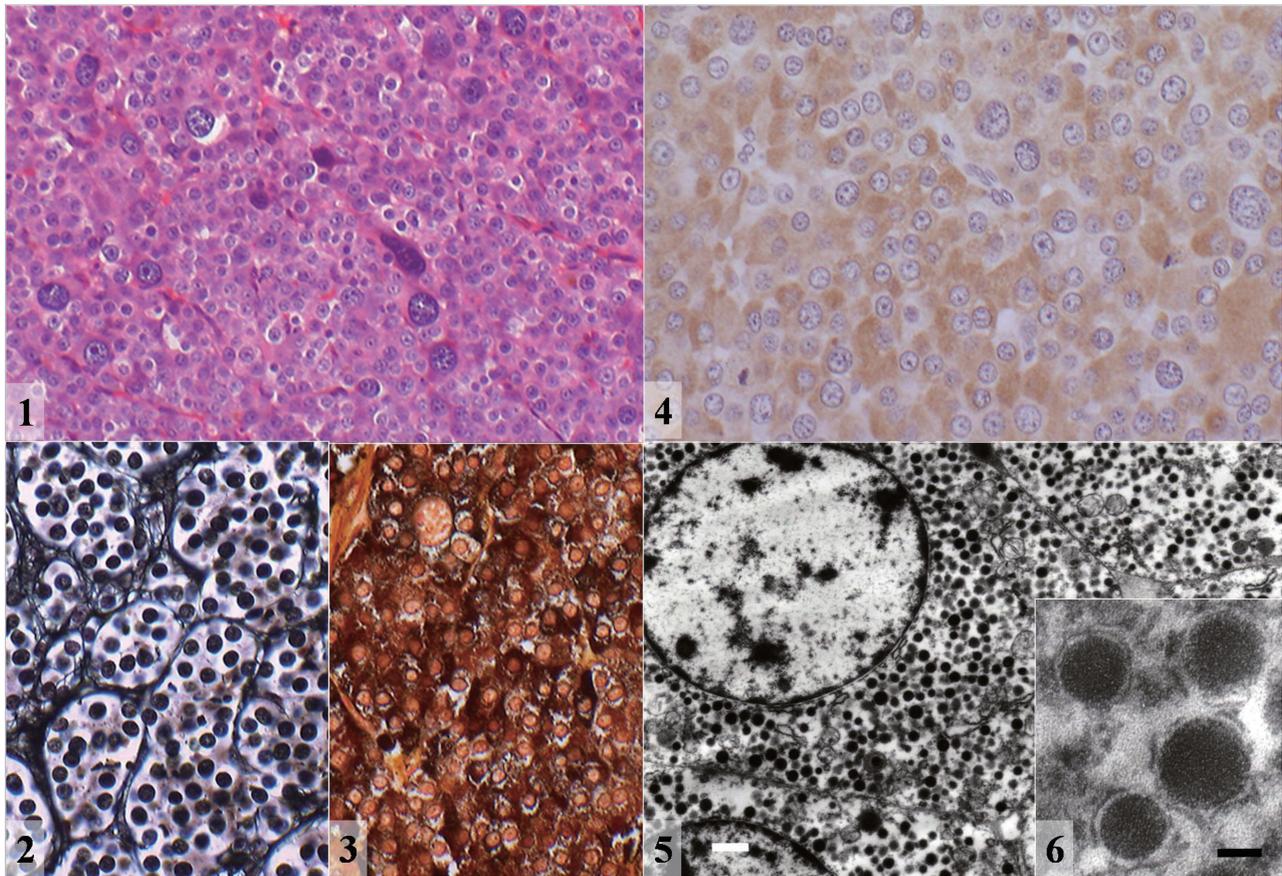
一部に線維素血栓の形成も認められた。その他中膜平滑筋の粘液変性 (図 2) や，一部の小動脈では，拡張した血管腔に内皮細胞や平滑筋細胞が増殖して網目様構造をなす，いわゆる plexiform lesion (PL) (図 3；矢印は血管腔) および glomeruloid lesion (図 1；矢印は血管腔) を認めた。PL には，血栓の再疎通を示唆する像の他に，一般に未熟な内皮細胞と平滑筋が増殖しスリット状の血管腔を形成している像 (図 4；矢印は血管腔)， α -smooth muscle actin で淡染する，内皮細胞で内張りされた平滑筋細胞が，血管内腔や外膜側に向かって増殖している像 (図 5) を認めた。また，血管壁が重度に拡張・菲薄化し，静脈様になった血管が，いくつも集合して見られるいわゆる dilatation lesion (図 6) を認めた。診断：動脈管開存症の幼若犬の肺にみられた Plexogenic pulmonary arteriopathy

考察：本症例の肺に見られた一連の血管の変化は，ヒトの Heath-Edwards の分類 (1958 年) による primary pulmonary hypertension で見られる肺血管の組織学的変化，すなわち plexogenic pulmonary arteriopathy に非常に類似していた。特徴的な変化である plexiform lesion の形成は，① 線維素血栓の再疎通，あるいはより積極的な ② 血管内皮細胞と平滑筋細胞の増殖による可能性があることが示唆された。

(佐川由佳・林 俊春)

イヌの頸部腫瘍

日本大学獣医病理学研究室出題 第46回獣医病理学研修会標本 No. 925



動物：イヌ，チワワ，避妊雌，11歳。

臨床事項：膀胱腫瘍を主訴に来院。8ヶ月前より左側頸部腫瘍の存在を認めていたが、急速な増大や自壊の傾向がなく、臨床症状も認められなかったために放置され、膀胱全摘手術と同時に左側頸部腫瘍も摘出された。甲状腺腫瘍を疑い FT4, c-TSH, T4 の内分泌検査を実施したが、異常は認められなかった。

剖検所見：腫瘍の大きさは $40 \times 31 \times 26$ mm, 被膜を有し柔軟。辺縁不整な卵形で、表面に結節状隆起が認められた。表面の血管分布が著しく、赤色斑が散在。剖面は灰白色充実性。総頸動脈や迷走交感神経幹を巻き込み周囲組織に固着していた。

組織所見：厚い結合組織で被包された腫瘍中に、淡明・円形の腫瘍細胞が充実性に増殖（図1）、またシート状また重層化した索状構造を形成。出血、ヘモジデリン沈着が散在。腫瘍の細胞境界は不明瞭、細胞質は豊富で淡明なものと同塩基性のものが混在。核は円形、大小不同、異型巨大核が散在。分裂像は2個/HPF。渡辺鍍銀法により細網線維が腫瘍塊を胞巣状に取り囲む Zellballen 様構造が示された（図2）。細胞質内顆粒はグリメリウス法による好銀染色で強陽性（図3）。免疫組織化学的検索では Cytokeratin 8/18, Vimentin, Thyroglobulin,

Calcitonin, Neurofilament に陰性。Chromogranin A（図4）、NSE, Synaptophysin で陽性。S-100 では支持細胞のみ陽性。電子顕微鏡学的検索では細胞質内に多数の高電子密度の分泌顆粒が認められ（図5, Bar = $1 \mu\text{m}$ ）、これらは限界膜を有する $150\text{-}200$ nm の Core より成り、限界膜と Core の間に狭い Halo を形成していた（図6, Bar = 125 nm）。細胞間に時折、デスモソーム結合が存在。

診断：傍神経節腫（Paraganglioma）

考察：副腎以外の傍神経節由来の腫瘍をパラガングリオーマと総称する。動物ではその発生部位により頸動脈小体腫瘍や大動脈体腫瘍が知られており、大部分の細胞は非クロム親和性と考えられている。今回の症例は、位置的に頸動脈小体腫瘍と考えられたが、迷走神経遠位神経節由来もありえるため、上記の診断とした。Cytokeratin 8/18 広域性の CK, Thyroglobulin や Calcitonin が陰性であったことより甲状腺腫瘍を否定した。また電子顕微鏡学的検索により示された限界膜を有する $150\text{-}200$ nm の Core はエピネフリン顆粒と考えられたが、その機能活性と臨床所見との関連性は確認できなかった。

（渋谷 久）

総説

人獣共通感染症をどのように克服するか —インフルエンザをモデルとして—

喜田 宏 (北海道大学大学院獣医学研究科・教授, 人獣共通感染症リサーチセンター・センター長)

主旨

いわゆる新興感染症の多くは人獣共通感染症である。その病因は野生動物と共生関係を確立して自然界に存続してきた微生物であり、宿主域を越えて、家禽や家畜に伝播して、時に重篤な感染症を引き起こす。したがって、自然界における野生生物と微生物のエコロジーを究明し、伝播経路を明らかにしてはじめて、人獣共通感染症対策が可能となる。インフルエンザ、SARS、エボラ・マールブルグ出血熱、レプトスピラ病や、未知の感染症を克服するには、個人、自治体、国そして国際社会がどのように取り組むべきかを共に考え、探りたい。

人獣共通感染症とは

近年、ニパウイルス、ハンタウイルス、SARS コロナウイルスや新型インフルエンザウイルス感染症、ウエストナイル熱、ラッサ熱、エボラ・マールブルグ出血熱、出血性大腸菌症、肺ペスト、レプトスピラ病などのいわゆる新興・再興感染症が世界各地で発生し、社会を脅かしている。実は、これらはすべて人獣共通感染症であり、その病原体は、地球上の限られたスポットで野生動物を自然宿主として寄生・存続してきた微生物である。

近年における地球人口の爆発的増加と経済活動の進展・拡大は、森林の伐採と農地化や砂漠化、大気汚染と地球の温暖化を招いた。このような地球環境の急激な変化は、動植物生態系の破綻を招き、野生動物と人間社会の境界消失をもたらした。その結果、これまで自然宿主に何ら危害を及ぼすことなく、存続してきた微生物が家畜、家禽とヒトに伝播し、新たな人獣共通感染症の発生を引き起こしている。黄熱やマラリア等、熱帯地域に限られていた節足動物媒介感染症の発生と流行は、今や亜熱帯および温帯

にまで広がっている。地球の温暖化とダム建設や灌漑工事の結果、ウイルスや原虫の感染を媒介する蚊の生息域が拡大したためである。したがって、新たな人獣共通感染症が出現する頻度は、年々高くなっている。このようにして人間社会に出現する、新たな人獣共通感染症は、現時点では、その発生を予測することはできない。

痘瘡はヒトからヒトにしか伝播しない感染症であって、優れたワクチンが利用できたので、根絶された。ところが、人獣共通感染症は、その病原微生物が自然界から供給されるので、これを根絶することは、当面、不可能であることをまず認めなければならない。その上で、「人獣共通感染症を如何に克服するか」が今、喫緊の国家・国際課題となっている。

人獣共通感染症をどのようにして克服するか

人獣共通感染症を克服するためには、原因微生物の起源と自然界における存続のメカニズム、侵入経路ならびに感染、発症と流行に関する諸要因を明らかにして、発生予測と流行防止の戦略をたてる必要がある。その戦略基盤は、緊密な国際連携の下、地球規模で綿密かつ有機的な疫学調査研究を展開して、自然界における病原微生物の生態を解明するプロジェクトである。

今、私たちが人獣共通感染症を克服するために取り組んでいる、先回り戦略は、これまでインフルエンザを克服するために進めてきた、インフルエンザウイルスの生態と進化ならびに宿主域と病原性の分子基盤を解明することを目標とする研究プログラムをモデルとして策定されたものである。したがって、まず、高病原性鳥インフルエンザとヒトの新型インフルエンザウイルス出現に備えた取り組みを紹介する。

インフルエンザウイルスの生態と進化 ならびに宿主域と病原性

インフルエンザ A ウイルスはヒトを含む哺乳動物と鳥類に広く分布する。なかでも、水禽からはすべてのヘマグルチニン (HA) とノイラミニダーゼ (NA) 亜型 (それぞれ H1 ~ H16 と N1 ~ N9) のウイルスが分離される。すなわち、水禽、特にカモがインフルエンザ A ウイルスの自然宿主である。カモは夏にシベリア、カナダやアラスカの北極圏に近い営巣湖沼でインフルエンザウイルスに水系経口感染し、その結腸陰窩の上皮細胞で増殖したウイルスを糞便と共に排泄する。8 月中旬からカモは南方に渡り始める。カモが渡りに飛び立った後、湖沼水中のウイルスは半年以上凍結保存される。自然界でカモに害を及ぼすことなく受け継がれているウイルスの抗原性と遺伝子は安定である。

カモが渡りの飛翔路に沿って、あるいは越冬地で排泄する非病原性ウイルスは、ニワトリに直接感染することはないが、ウズラ、シチメンチョウやガチョウなどには感染する。これらの家禽を経て、ニワトリに感染する低病原性ウイルスが生ずる。ニワトリに感染したウイルスがニワトリ集団の中で感染を繰り返すと、ニワトリに対する病原性を獲得することがある。これが高病原性鳥インフルエンザウイルス (HPAIV) である。鳥インフルエンザウイルスの病原性は、ニワトリの静脈内に接種した後の致死率によって測られる。したがって高病原性とは、ニワトリに対する毒力が強いことを意味するものであって、他種の鳥や、ましてヒトや哺乳動物に対するものではない。HPAIV の HA 亜型は H5 または H7 に限られる。

高病原性鳥インフルエンザ

2003 年以來アジアに流行している HPAI の原因 H5N1 ウイルスが昨年 4 ~ 7 月に中国北部、モンゴル等で野生水禽から分離され、8 月には、ロシアやカザフスタン、その後トルコ、イラク、エジプト、デンマーク、フランス、イギリスやナイジェリアなどの家禽に HPAI 被害が拡大している。モンゴル、クロアチアおよびナイジェリアで野生水禽から分離されたウイルスは中国の青海湖で水禽から分離され

たウイルスと同じ株と言えるほど近縁で、タイやベトナムで流行しているウイルス株とは異なることが判った。

さらに、2004 年からこれまで、タイ、ベトナム、カンボジア、インドネシア、中国、トルコ、アゼルバイジャン、エジプトなど 10 カ国で、H5N1 ウイルスのヒトへの感染例 260 余名、うち半数以上の死亡が確認されている。これらのほとんど全例が、家禽のウイルスに直接感染したものである。少数の家族内感染を疑う例が報告されているが、夫婦間の伝播は認められていない。さらに、感染したヒトから分離されたウイルスはすべてニワトリから分離されたウイルスと同じレセプター特異性 (SA α 2, 3Gal) を保持していた。以上の事実から、これまでの罹患者は通常のヒトと比べ、H5N1 HPAIV の感染に極めて高い感受性を有する個体であることが解る。

この HPAIV がヒトからヒトに伝播する能力を獲得すれば、新型インフルエンザウイルスとして流行を起し、人類社会に与える被害は計り知れないとして、世界各国と WHO 等の国際機関は H5N1 ウイルス対策を推進している。その可能性を否定するものではないが、H5N1 亜型のみが新型ウイルスとして出現するものと信じられていることに、危険を覚える。H5 以外のヘマグルチニン (HA) をもつウイルスについても、警戒を怠ってはならない。

ヒトの新型インフルエンザウイルス出現機構

1968 年に出現したヒトの新型ウイルス A/Hong Kong/68 (H3N2) 株は、カモがシベリアの営巣湖沼から家禽に持ち込んだ H3 ウイルスと、ヒトに流行していた H2N2 ウイルスが豚に共感染して生じた遺伝子再集合体である。1957 年の H2N2 新型ウイルスも同様の経路で出現したものと推定される。1918 年の H1N1 新型ウイルスは、北米系統の鳥インフルエンザウイルスを起源とする。その伝播経路も、カモ→家禽→ブタ→ヒトであろう。

家禽のインフルエンザの早期摘発、淘汰によって、被害を最小限に食い止め、ヒトの健康と食の安全を守る。鳥インフルエンザを鳥だけに止める。これが鳥インフルエンザ対策の基本である。インフルエンザ A ウイルスの起源と自然界における存続機構ならびに新型インフルエンザウイルスと HPAIV の出

現機構を踏まえて、それぞれの克服戦略を立てねばならない。

以上に述べたように、家禽、家畜、野生鳥獣およびヒトのインフルエンザウイルス遺伝子はその全てが野生水禽、特にカモのウイルスに起源がある。したがって、自然界の水禽、家禽とブタ、そしてヒトのインフルエンザの疫学調査を地球規模で不断に実施することによって、家禽、家畜およびヒトの新型ウイルスの典型を予測すると共に、調査で分離されるウイルスの中からワクチン候補株と診断抗原を選出し、保存・供給するプロジェクトを推進している。

北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター

地球環境はますます悪化し、人獣共通感染症の発生機会と流行地は拡大している。貿易のグローバル化とボーダーレスの国際交流が進み、食肉、飼料、野生動物やペットの輸入と旅行者の増加に伴って人獣共通感染症が我が国に侵入する危険性が增大している。最近、諸外国で発生と流行が見られ、日本に侵入する可能性が高い人獣共通感染症として、狂犬病、ニパ脳炎、ウェストナイル熱、リフトバレー熱、SARS、HPAIなどがあげられる。少なくともこれら感染症の予防対策と危機管理体制を直ちに確立しておかねばならない。

世界には未だ人獣共通感染症の病因微生物の生態、病原性、検出技術および制圧方法を総括的に研究開発する組織がなく、また、人獣共通感染症の予防と制圧に向けた研究と対策を推進する人材が極めて少ない。人獣共通感染症の克服に向けた研究・開発、予防・診断・治療法の開発と実用化、情報と技術の社会普及、人獣共通感染症対策専門家の養成並びに予防対策行政に対する指導、助言に責任を持ってあたる組織を創設し、人材を養成することが緊急の国家・国際課題となっている。

このような背景の下で、かねてより提案してきた、「人獣共通感染症リサーチセンター」の設置が文部科学省に認められ、平成17年4月に北海道大学に新設された。「人獣共通感染症リサーチセンター」は、人獣共通感染症に特化した研究・開発と人材養成を推進、実施すると共に、世界のフィールドから診断・研究材料を受け付けてこれらに対応する研究教育中核拠点である。すなわち、研究面では、人獣共通感染症病原体の自然界における存続メカニズムを解明すると共に、その出現予測、予防と制圧を目指し、全地球規模の疫学調査を展開する。疫学調査で分離される病原体の病原性、宿主域と遺伝子を解析して、データベース化すると共に、人類共有の生物資源として系統保存し、的確な診断抗原とワクチン株を供給する国際バイオリソース拠点でもある。世界の人獣共通感染症の疫学情報と病原体の遺伝子情報の利用と供給を図り、それぞれの病原体について先端研究を展開すると共に、人獣共通感染症の診断、治療および予防対策を立案・実施する。一方、教育面では、国内外の研究者、大学院学生と専門技術者に対して人獣共通感染症の克服に向けた教育・研修コースを提供し、人獣共通感染症対策の専門家“Zoonosis Control Doctor”を養成して世界に送り出すことを目的としている。

謹告

本稿は、昨年8月に開催の「第3回日本獣医内科学アカデミー学術大会」に際し行われました、「動物ワクチン研究会」設立総会での喜田先生による特別講演「インフルエンザの克服戦略」と題するご講演の抄録です。日本中央競馬会の補助事業である「平成18年度畜産振興事業に関する調査研究発表会」で行われた喜田先生の同様な特別講演の抄録から、先生及び主催者のご厚意により転載させて頂きました。

喜田 宏 (きだ ひろし) 北海道大学教授 (大学院獣医学研究科)

昭和42年北海道大学獣医学部卒業、44年同大学大学院修士課程修了。武田薬品工業株式会社技術研究職、北海道大学獣医学部講師、助教授、教授、WHOインフルエンザウイルス共同研究センター客員教授などを経て、平成6年より現職。平成17年より新設の北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター長を兼務。インフルエンザウイルスの生態に関する研究などに対し、日本学士院賞ほか受賞。編著書は、「人獣共通感染症」(2004、医薬ジャーナル社)ほか多数。獣医学博士。

体細胞クローン技術を用いた 遺伝子導入動物作出方法と課題

勝俣 淳 (研究員)

1. はじめに

哺乳動物初の体細胞クローン動物ドリーの誕生は、哺乳動物の体細胞の核に遺伝情報の全てが保存されていることを示し大きな話題を呼んだ。他方、ドリー誕生の翌年、ヒト血液凝固第Ⅸ因子の遺伝子を組み込んだポリーの誕生によって家畜の動物工場としての利用、品種改良といった産業へのクローン技術利用の道が開かれた。

以降、この技術を用いた遺伝子導入動物の作出に関する研究が盛んに行われるようになった。我々の研究所でも数年前にミニブタを用いた遺伝子導入動物の作出プロジェクトがスタートし、著者もそのプロジェクトに加わっている。ここでは体細胞クローン技術を用いた遺伝子導入動物作出方法と課題について整理してみた。

2. クローン動物作出法

クローン動物の作出の方法は大きく分けて3つの方法が開発されてきた。

2-1. 発生の進んだ受精卵を分割する方法

これは、卵割している胚を人工的に分割させて個体を得る方法(図1)で、ヒトで2細胞期に何らかの力によって割球が二つに別れて一卵性双生児ができるのと原理的には同じである。この方法では全く遺伝情報の同じ個体を得ることができるが、一度に多数の個体を生産することはできない。

2-2. 割球から核を採取し、卵へ移植する方法

図2に示すように、発生の進んだ(16~32細胞期)受精卵から割球またはもう少し発生の進んだ胚から

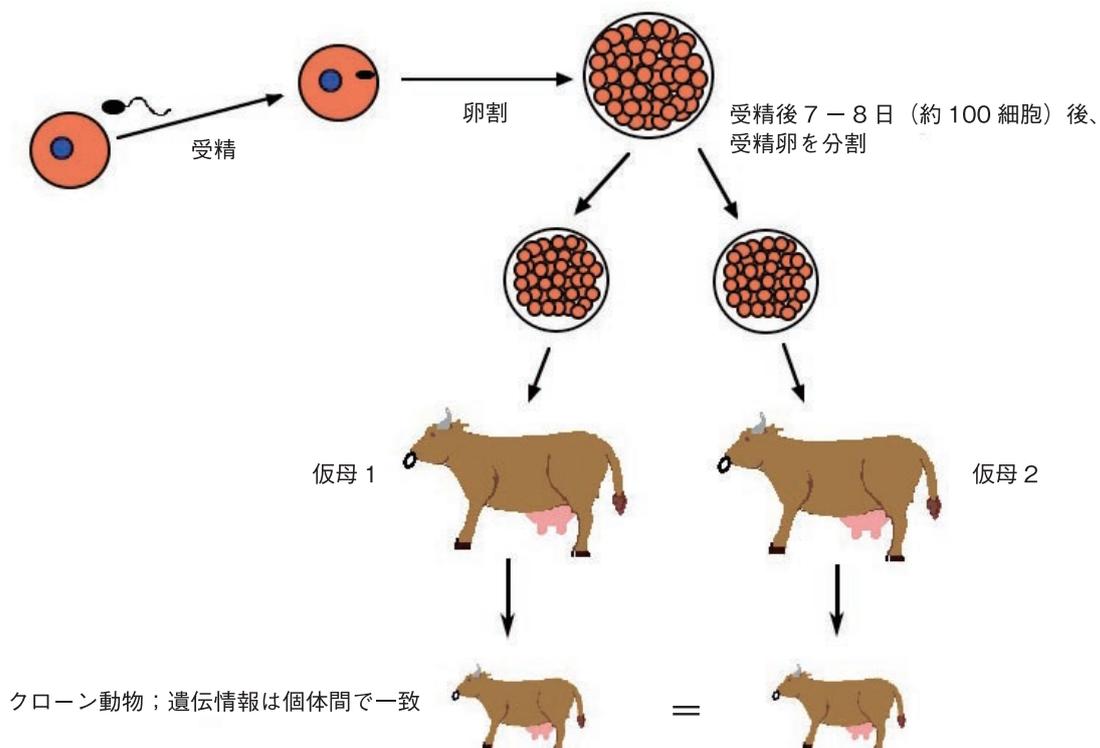


図1：受精卵クローンの作製法

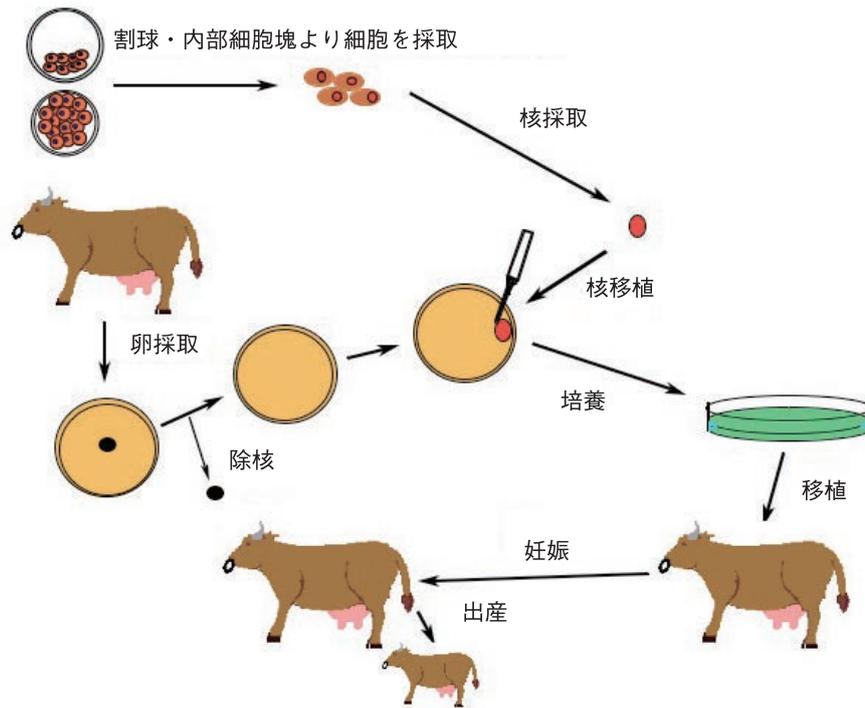


図2：割球を用いたクローン作製法

内部細胞塊を取り出し、そこから得られる核をレシピエントとなる受精卵へ移植する方法である。この方法ではレシピエントとなる卵を複数の個体から得ることができるのでたくさんの個体を生産することが可能である。

2-3. 成体の体細胞を核のドナーとし、得られた核を卵へ移植する方法

成体の適当な組織から細胞を採取・培養し、そこから得られた核を卵へ移植する方法である（図3）。この方法は2-2と基本的に同じであるが、細胞への遺伝子導入、細胞の選択を核移植前に行えるため、

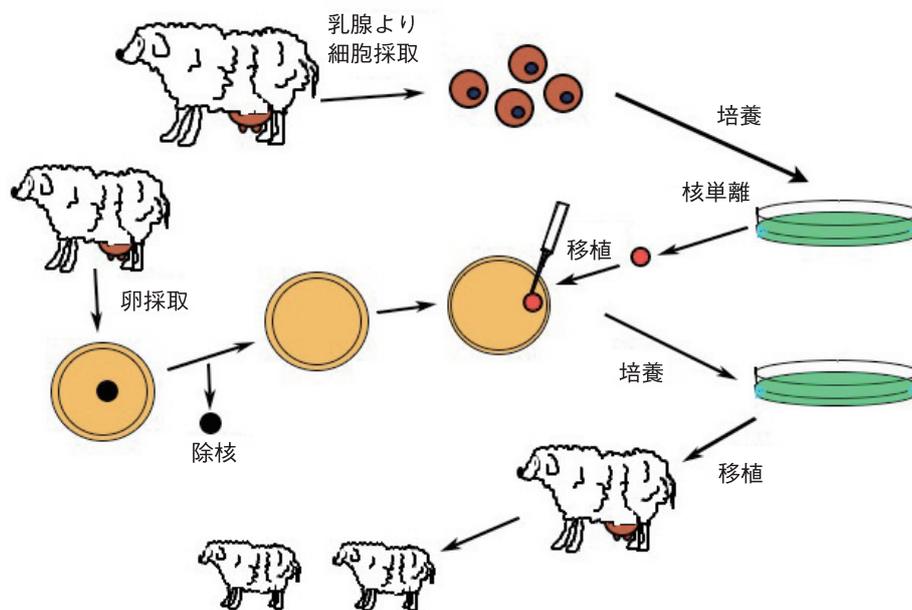


図3：体細胞を用いた遺伝子導入

遺伝子導入動物の作出の道を開いた。参考までに、今までこの方法によって誕生した動物種の例を表1に挙げた。

表1：今までに作られた体細胞クローン動物

動物	年	
ヒツジ	1997	Wilmot, I ら 1)
マウス	1998	Wakayama ら 2)
ウシ	1998	Cibelli ら 3), 他
ヤギ	1999	Baguisi ら 4)
ブタ	2000	Onishi ら 5), 他
ネコ	2002	Shin ら 6)
ウサギ	2002	Chesene ら 7)
ラバ	2003	Woods ら 8)
ウマ	2003	Galli ら 9)
ラット	2003	Zhou ら 10)

余談ではあるが、上記 2-2, 2-3 は卵のドナーが異なっている場合、ミトコンドリア由来の遺伝情報が個体間で異なるため遺伝情報が個体間で全く同じというわけではなく、厳密な意味でクローンではない。しかし、一般にはゲノムに含まれる遺伝情報が同じである個体をクローンとみなしている。

3. 遺伝子導入動物の作出と動物工場としてのクローン技術の応用

上記 2-1, 2-2 で紹介した方法は、「肉質のいい牛と同じ遺伝子を持つ牛を作る」といった品種改良の分野では有効な手段であると考えられ、我が国でも精力的な研究が重ねられており、2004年3月31日現在 687 頭の受精卵クローン牛が生産されている¹¹⁾。一方、動物工場あるいはモデル動物の作出という目的では、1) 遺伝子導入の作業が行えること（上記 2-1, 2-2 では困難）、2) 導入した遺伝子が安定的に保持されること、そして 3) 発現することが必須条件となる。

マウス等で行われてきた受精卵への遺伝子導入による遺伝子導入動物の作製法では、目的とする遺伝子を直接受精卵へ注入し、選択培養することなくそれを仮母へ戻すという方法をとるため、導入した遺伝子が胚の染色体に組み込まれたかどうかは、偶然性に頼るしかない。得られた個体への遺伝子の組み込みは個体が生まれてからでないとわからない。また、多くの場合第一世代はキメラになり、個体を構成する細胞の全てに導入遺伝子が組み込まれているいわゆるトランスジェニック個体を得るためには、さらに交配を必要とするといった問題点がある。これらは妊娠および個体成熟の期間が短く、多産かつ

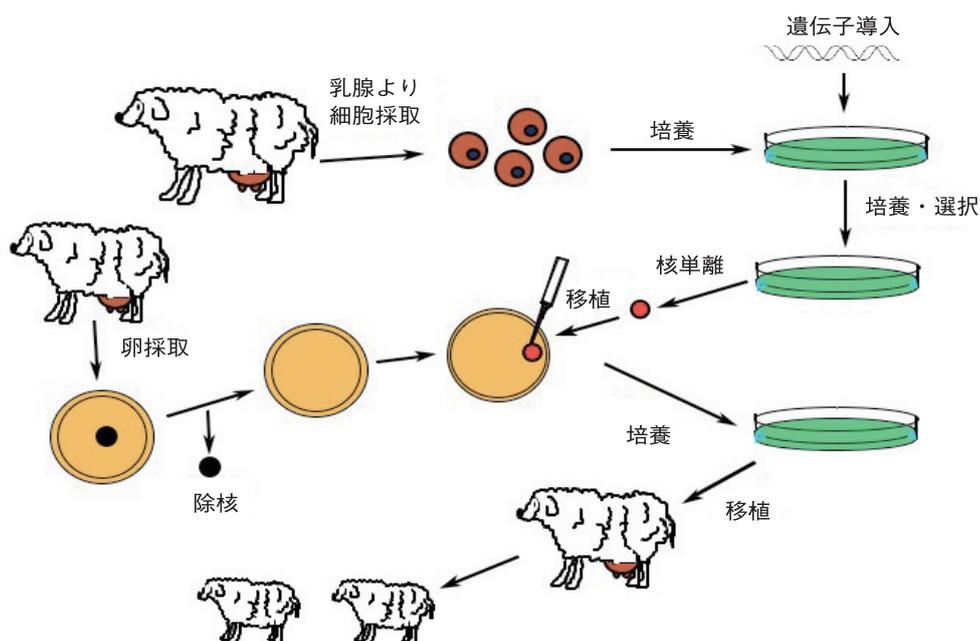


図4：体細胞を用いた遺伝子導入

飼育費用が安いマウス等ではさほど問題ではないが、1回の出産個体数が少なく、成熟までの期間の長い大動物には向かない。ところが、体細胞を用いたクローン動物作出技術が開発されたことで、上記1)から3)の問題を解決できるようになった。

図4に体細胞クローン技術を用いた遺伝子導入動物の作出過程を示した。手順としては以下の通りである。

- ① *in vitro* で培養した細胞に遺伝子を導入し、
- ② ネオマイシン耐性マーカー等で遺伝子が導入された細胞の選択を行い、
- ③ 生き残った細胞から核を抽出し、レシピエントとなる卵に移植する。

この場合、あらかじめ *in vitro* で細胞を選択できるため、生まれてきた個体が導入遺伝子を保持している確率を飛躍的に上げることができ（発生途中で導入遺伝子の欠落が起こらなければ理論上は100%）、遺伝子導入した大動物の作出が現実的なものとなった。表2にこれまでに作出された遺伝子導入動物の例と導入遺伝子産物の発現量を示した。

4. 臓器供与体としての 遺伝子導入動物（ブタ）作出

近年ブタの臓器をヒトへ移植するいわゆる異種移植が話題となった。異種動物から臓器を移植する場合、一番の問題となるのは臓器提供を受ける側の超急性拒絶反応である。この反応は α (1-3) ガラクトース抗原に対する免疫反応で起こることが明らかに

されている。そこで、この反応を抑える方法として、1) ヒトの補体制御蛋白 Decay accelerating factor (DAF, CD59), Membrane cofactor protein (MCP, CD46) などの遺伝子を導入した動物を作製し超急性拒絶反応を抑える、あるいは、2) α (1-3) ガラクトース抗原を合成する酵素 galactosyltransferase 遺伝子をノックアウトした動物を作製するといった試みが遺伝子導入と体細胞クローン技術を用いて行われている。ヒトの DAF 及び N-acetylglucosaminyltransferase III 遺伝子を導入したトランスジェニックブタの皮膚をカニクイザルへ移植した実験では、移植された皮膚が31日間生着していたという報告がある¹²⁾。また、ヒト DAF 遺伝子導入ブタの心臓のヒヒへの移植実験では、平均14.6日の生着結果が得られている¹³⁾。いずれの場合にも、超急性拒絶反応は抑えられており、現在ではこれに続く血管性急性拒絶反応の抑制が課題になっている。

5. 問題点と今後

特に動物工場としての利用を考えた場合、遺伝子導入およびクローン動物作製技術の問題点の一つとして、導入遺伝子の発現量が動物个体によって異なり、経済性に見合うだけの発現をする個体を得ることがたやすくはないことが挙げられる。遺伝子導入動物作出効率が数パーセント台であることからこれは産業化を考えた場合に問題となる。プロモーターおよびエンハンサーの研究から CAG プロモーターといったかなり発現量の高いプロモーター・エンハ

表2：トランスジェニック動物を用いた蛋白質の発見

産物	乳1ℓ当たりの生産量（動物）
α 1-アンチトリプシン	30 g（ウサギ）
組織プラスミノゲンアクチベーター	3 g（ヤギ）
アンチトロピンⅢ	6 g（ヤギ）
血液凝固第Ⅸ因子	25 μ g（ヒツジ）
プロテインC	5 g（ブタ）
インターロイキン2	0.3 mg（ウサギ）

http://wwwsoc.nii.ac.jp/jsvs/05_byouki/prion/pf18.html より

ンサー系も開発されているが、細胞内での遺伝子発現はプロモーターやエンハンサー等による制御の他にエピジェネティックな制御も受けているため、強いプロモーター・エンハンサーを用いても導入遺伝子を目的とする組織で十分に発現しないといった現象が起こる。これを打破するための一つの方法として相同組換えを利用することが考えられる。

例えば、牛の乳汁中に目的とする遺伝子の産物をたくさん発現させたい場合、牛の細胞のカゼイン遺伝子と導入遺伝子の間で相同組換えを起こさせ、乳腺組織で、牛が本来持っているカゼイン遺伝子の発現制御システム下に導入遺伝子を置き、強い発現を得ようというものである。相同組換えの方法はジフテリアトキシン A フラグメント遺伝子や HSV チミジンキナーゼ遺伝子を用いた系が開発されているが、その効率は遺伝子導入に用いた細胞数 $10^6 \sim 10^8$ 当たり数個と、決して高いとは言えない^{14), 15)}。また、不活性な遺伝子座は核内でヘテロクロマチンといわれる凝集した状態をとっており相同組換えの障害となる。したがって相同組換えを効率的に行わせるためには、相同組換えを起こさせるターゲットとなる遺伝子が転写されているかあるいは転写されうる状態の細胞を用いることが望ましい。具体例を挙げると、目的遺伝子を牛のカゼイン遺伝子との間で相同組換えを起こさせたい場合、乳腺細胞を用いればカゼイン遺伝子は元来乳腺で発現しているのでヘテロクロマチン構造を取っておらず導入遺伝子との間での相同組換え体を得ることが期待される。一方、骨髓細胞や腺維芽細胞を用いた場合、カゼイン遺伝子はこれらの細胞では発現していないためヘテロクロマチン構造を取っていることが予想され、相同組換えは期待し難い。

動物を用いた蛋白質の大量発現に限って言えば、冒頭に出てきたポリマーのように相同組換えは利用せず、導入遺伝子の発現を期待する組織由来細胞（ポ

リーの場合は乳腺細胞）を用いて核供与体となる遺伝子導入細胞を作製するというのもこの問題を回避する一つの方法である。しかしながら、臓器移植用あるいは薬剤動態モデル動物作製を含めたより広い範囲での遺伝子導入動物の利用を考えた場合、相同組換えを利用して発現を期待する臓器で導入遺伝子が発現するようにすることが望ましいと考えられる。そのためには、より効率良く組換え体を作製できるように、組換えを起こさせたい遺伝子が発現している細胞を核供与体にできるような細胞培養技術の確立が望まれる。

参考文献

- 1) Wilmut, I *et al.* 1997. *Nature* 385 : 810–813.
- 2) Wakayama *et al.* 1998. *Nature* 394 : 369–374.
- 3) Cibelli *et al.* 1998. *Science* 280 : 1256–1258.
- 4) Baguisi *et al.* 1999. *Nat. Biotechnol.* 17 : 456–461.
- 5) Onishi *et al.* 2000. *Science* 289 : 1188–1190.
- 6) Shin *et al.* 2002. *Nature* 415 : 859.
- 7) Chesene *et al.* 2002. *Nat. Biotechnol.* 20 : 366–369.
- 8) Woods *et al.* 2003. *Science* 301 : 1063.
- 9) Galli *et al.* 2003. *Nature* 424 : 635.
- 10) Zhou *et al.* 2003. *Science* 302 : 1179.
- 11) 畜産の新しい技術 社団法人 畜産技術協会
- 12) Tatsuya Fujita *et al.* 2004. *Transplant Immunology* 13 : 259–264.
- 13) Brenner P *et al.* 2005. *Transplantation Proceedings* 37 : 472–476.
- 14) Ramsoondar JJ, *et al.* 2003. *Biology of Reproduction* 69 : 437–445.
- 15) Takeshi Y, *et al.* 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 9918–9922. Lore consecet, qui tat. Duisi.

日生研たより 昭和 30 年 9 月 1 日創刊(隔月 1 回発行)
 (通巻 543 号) 平成 19 年 2 月 25 日印刷 平成 19 年 3 月 1 日発行(第 53 巻第 2 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 井土俊郎
 編集室 委員/細川朋子(委員長), 小山智洋, 大森崇司
 事務/企画学術部
 印刷所 株式会社 精興社
 (無断転載を禁ず)



—— 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、研究の永續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