

## キメラ動物の作出に関する研究の現状と展望

誌名	農林水産技術研究ジャーナル
ISSN	03879240
著者	大西, 彰
巻/号	14巻10号
掲載ページ	p. 13-18
発行年月	1991年10月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## キメラ動物の作出に関する研究の現状と展望

大西 彰

キメラ動物はマウスを中心に発生学の分野でこれまで主に用いられてきた。最近、新しい形質転換動物を作出する手段として、ES細胞 (Embryonic Stem Cell) を用いたキメラが注目されている。ES細胞は多分化能を持つ細胞で、キメラにした場合に精子や卵子に分化することができる。そのため、外来遺伝子を導入して事前にスクリーニングしたES細胞をキメラにした場合、望むべき遺伝形質を持つ産子が得られる可能性が高まる。この技術は、胚の供給に制限がある家畜では特に有用になると思われる。しかし、家畜におけるキメラの作出例はまだ少なく、さらに研究を進める必要がある。

## 1. はじめに

—キメラとは—

キメラ (chimera または chimaera) の語源は、ギリシャ神話に登場するライオンの頭、雌羊の胴それに蛇の尾を持つ想像上の怪獣からきている。今日“キメラ”の定義は、2個以上の受精卵の結合により遺伝的に異なる細胞集団から体が構成された複合個体を示すのに用いられている。キメラとよく混同される言葉にモザイクがあるが、モザイクは1個の受精卵に体細胞突然変異などが生じて2種類以上の遺伝的に異なる細胞集団が誘導された場合の個体を示し、キメラとは根本的に異なる。しかし自然発生の場合においては、キメラとモザイクを区別することは困難である。

これまで人工的には、ヒドラからショウジョ

ウバエ、鳥類そして哺乳類に至るまで様々な動物でキメラが作出されてきた。ここでは哺乳類である家畜を中心にキメラ作出の現状を紹介し、家禽についても簡単に触れることにする。

## 2. キメラ動物の作出方法

キメラの作出方法は大きく凝集法と注入法に分けることができる。

凝集法は、Tarkowski と Mintz がほぼ同時期にマウスを用いて報告したのが始まりである。Tarkowski は、ピペットにより物理的に8細胞期胚の透明帯を破壊し、裸となった2個の胚を接触させて凝集を行いキメラマウスの作出に成功した。その後、Mintz はタンパク質分解酵素であるプロナーゼを用いて透明帯が容易に除去できることを見いだした。さらに彼女は、2個の胚を接触させる際に植物凝集素であるフイトヘマグルチニンを培養液中に加えることにより、室温でも容易に胚の接着および凝集が行えることを報告した。現在、凝集キメラの作出

に最も広く用いられているのはこれら Mintz の方法である。

この方法は確かにマウスにおいては大変に有効でなんら問題はないのであるが、他の動物種では透明帯の除去がその後の胚の発育に悪影響を与えてしまうことがあり、そのまま応用できないことがある。この問題を解決するために、透明帯を除いた胚を再度、透明帯内に戻す方法が行われている。

例えば、Fehillyらは空の透明帯内でヒツジ胚の凝集を行い、凝集した胚を寒天に包埋してウサギの卵管内で胚盤胞期まで発育させ、それらを仮親に移植してキメラヒツジを作出している。彼らは101個の操作胚から36頭ものキメラ個体を得ている。また、Picardらは分割したウシの桑実胚と内部細胞塊を凝集させる際に、空の透明帯を用いてキメラウシを得ている。

注入法は、Gardnerによりやはりマウスを用いて初めて報告された。彼はバラバラに解離した胚細胞を細めのガラスピペットに吸い込み、胚盤胞期胚の胚盤腔内に注入してキメラマウスの作出に成功した。この方法は、3本のガラス針を用いて胚盤胞の栄養芽細胞層に穴を開けて広げてからピペットを挿入して細胞を注入するため、操作が大変に複雑で非常に困難な技術であった。実際この方法は、Gardner およびその門下生の一部で用いられているに過ぎない。

その後、注入法は様々な改良や工夫が行われ、現在では先端を研いで尖らした1本のピペットで注入操作を行うのが一般的になっている。注入法の最大の利点は、透明帯を取り除く必要がないことと、胚盤胞の外側に位置する栄養芽細胞層はすでに胚盤になることが決定しているため、異種の細胞を胚盤腔内に注入しても着床が妨げられないことにある。そのため、ウサギのように透明帯が胚の発育に不可欠な動物や、属間キメラや種間キメラの作出に注入法は威力を発揮する。

### 3. 家畜のキメラ

表1に家畜および実験動物のキメラ作出に関する主な文献を示した。マウスについては余りにも報告が多いために古典的なものに限っている。

家畜ではヒツジを用いたキメラが最も多く、凝集法で前述のFehillyらが、注入法でTuckerらとButlerらがそれぞれキメラヒツジを作出している。Tuckerらは92個の注入胚からわずかに3頭のキメラを得ただけであったが、Butlerらは52個の注入胚から16頭のキメラを得ている。また、ヒツジとヤギの属間キメラの成功例がいくつかある。Fehillyらの作出したキメラは、ネイチャー誌の表紙を飾って“ギーブ”として有名になったことは良く知られている。

ウシについては、分割胚を用いて凝集させた方法が多い。BremらおよびPicardらがこの方法によりキメラウシを得ている。また同様な方法で、Williamsらはインド牛であるブラーマン種とヨーロッパ牛であるホルスタイン種またはヘレフォード種とショートホーン種の雑種との間で、種間キメラの作出に成功している。彼らの種間キメラは外見からも明らかにキメラと判定できるほどで、以前に注入法でSummerらが得た種間キメラが血液型で判定できたことよりも優れている。

ブタについては、以前にミズーリ大学での成功例が商業誌に紹介されたが、最近の報告ではキメラ胚の作出に成功したのみで、キメラ個体の作出までには至っていない。国内では、昭和産業株式会社での胚盤胞期胚を用いた注入キメラ個体の成功例が新聞で紹介された。しかし今のところ、学術誌に報告された豚のキメラは見あたらないようである。

実験動物で特に興味深いのはマウスとラットの属間キメラである。この組合せではこれまで凝集法および注入法により様々な検討が行われてきたにもかかわらず、着床後ある程度までの

表1 家畜および実験動物におけるキメラ作出の主な文献

## ヒツジ

- Pighills, E., J. L. Hancock and J. G. Hall. 1968. Attempted induction of chimaerism in sheep. *J. Reprod. Fert.* 17: 543 - 547.
- Fehilly, C. B., S. M. Willadsen and E. M. Tucker. 1984. Experimental chimaerism in sheep. *J. Reprod. Fert.* 70: 347 - 351.
- Tucker, E. M., R. M. Moore and L. E. A. Rowson. 1974. Tetraparental sheep chimaeras induced by blastomere transplantation. Changes in blood type with age. *Immunology* 26: 613 - 621.
- Butler, J. E., G. B. Anderson, R. H. BonDurant, R. L. Pashen and M. C. T. Penedo. 1987. Production of ovine chimeras by inner mass transplantation. *J. Anim. Sci.* 65: 317 - 324.

## ヒツジ-ヤギ

- Fehilly, C. B., S. M. Willadsen and E. M. Tucker. 1984. Interspecific chimaerism between sheep and goat. *Nature* 307: 634 - 636.
- Meinecke-Tillmann, S. and B. Meinecke. 1984. Experimental chimaeras-removal of reproductive barrier between sheep and goat. *Nature* 307: 637 - 638.
- Polzin, V. J., D. L. Anderson, G. B. Anderson, R. H. BonDurant, J. E. Butler, R. L. Pashen, M. C. T. Penedo and J. D. Rowe. 1987. Production of sheepgoat chimeras by inner cell mass transplantation. *J. Anim. Sci.* 65: 325 - 330.
- Roth, T. L., G. B. Anderson, R. H. BonDurant and R. L. Pashen. 1989. Survival of sheep × goat hybrid inner cell masses after injection into ovine embryos. *Biol. Reprod.* 41: 675 - 682.

## ウシ

- Brem, G., H. Tenhumberg and H. Krauß. 1984. Chimerism in cattle through microsurgical aggregation of morulae. *Theriogenology* 22: 609 - 613.
- Picard, L., I. Chartrain, W. A. King and K. J. Betteridge. 1990. Production of chimaeric bovine embryos and calves by aggregation of inner cell masses with morulae. *Mol. Reprod. Dev.* 27: 295 - 304.

## ヨーロッパ牛-インド牛

- Summer, P. M., J. N. Shelton and K. Bell. 1983. Synthesis of primary *Bos taurus*-*Bos indicus* chimaeric calves. *Anim. Reprod. Sci.* 6: 91 - 102.
- Williams, T. J., R. K. Munro and J. N. Shelton. 1990. Production of interspecies chimeric calves by aggregation of *Bos indicus* and *Bos taurus* demi-embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* 2: 385 - 394.

## ブタ

- Martin, M. J., T. C. Cantley, W. L. Flowers and B. N. Day. 1991. Development of porcine embryos following microsurgical blastomere transplantation. *Anim. Reprod. Sci.* 24: 315 - 322.

## ニワトリ

- Marzullo, G. 1970. Production of chick chimaeras. *Nature* 225: 72 - 73.
- Petitte, J. N., M. E. Clark., G. Liu., A. M. V. Gibbins and R. J. Etches. 1990. Production of somatic and germline chimeras in the chickens by transfer of early blastodermal cells. *Development* 108: 185 - 189.

ニワトリ-ウズラ

- Naito, M., M. Watanabe., M. Kinutani., K. Nirasawa and T. Oishi. 1991. Production of quail-chick chimaeras by blastoderm cell transfer. *Br. Poult. Sci.* 32 : 79 - 86.

マウス

- Tarkowski, A. K. 1961. Mouse chimaeras developed from fused eggs. *Nature* 190 : 857 - 860.
- Mintz, B. 1962. Formation of genotypically mosaic mouse embryos. *Amer Zool.* 2 : 432 (Abstr. 310).
- Mintz, B., J. D. Gearhart and A. O. Guymont. 1973. Phytohemagglutininmediated blastozona pellucida. *Science* 138 : 594 - 595.
- Gardner, R. L. 1968. Mouse chimaeras obtained by the injection of cells into the blastocyst. *Nature* 220 : 596 - 597.
- Mintz, B., J. D. Gearhart and A. O. Guymont. 1973. phytohemagglutininmediated blastomere aggregation and development of allophenic mice. *Dev. Biol.* 31 : 195 - 199.

家ネズミ-野生ネズミ

- Rossant, J. and W. I. Frels. 1980. Interspecific chimeras in mammals: successful production of live chimeras between *Mus musculus* and *Mus caroli*. *Science* 208 : 419 - 421.

ラット

- Hall, B. V. and J. S. Nicholas. 1942. Experiments on developing rats. *J. Exp Zool.* 90 : 441 - 459.
- Mayer, J. F., Jr. and H. I. Fritz. 1974. The culture of preimplantation rat embryos and the production of allophenic rats. *J. Reprod. Fert.* 39 : 1 - 9.
- Mullen, R. J. and M. M. LaVil. 1976. Inherited retinal dystrophy: primary defect in pigment epithelium determined with experimental rat chimeras. *Science* 192 : 799 - 801.

ラット-マウス

- Kajiwara, Y., M. Inoue, T. Kuwana and T. Fujimoto. 1988. Interspecific melanocyte chimaeras made by introducing rat cells into postimplantation mouse embryos in utero. *Dev. Biol.* 129 : 586 - 589.

ウサギ

- Gardner, R. L. and A. J. Munro. 1974. Successful construction of chimaeric rabbit. *Nature* 250 : 146 - 147.
- Moustafa, L. A. 1974. Chimaeric rabbits from embryonic cell transplantation (38371). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 147 : 485 - 488.
- Yang, X. and R. H. Foote. 1988. Production of chimeric rabbits from morulae by a simple procedure. *Gam. Res.* 21 : 345 - 351.

胚の発育が得られただけで実際に生存するキメラが得られたことはなかった。最近、着床後の胚を一度子宮ごと体外に引き出し、子宮の外から胚内に細胞を注入し、再び体内に戻すことによりキメラを作出する方法が開発された。Kajiwaraらはこの方法により、8.5日齢のマウス胚に10~12日齢のラット胎児の細胞を注入してマウスとラットの属間キメラ個体の作出に成功している。

家禽では、ニワトリとウズラで後期胚の脊索の交換移植によるキメラがこれまで作出されてきた。最近、産卵以前のニワトリ胚を取り出し、体外培養により成体にまで発育させる技術が開発され、初期胚の体外での取扱が可能になった。その結果、解離した胚盤葉の細胞を他の胚盤葉に注入したキメラニワトリの作出が可能となった。さらに同様な方法でウズラの細胞をニワトリ胚盤葉内に注入することにより、ウズラとニワトリの属間キメラも得られている。

#### 4. キメラ動物の利用

##### (1) キメラ性ヘテロシス

キメラは初期胚の発生過程や性分化の機構解明など、おもに発生学の分野で多く利用されてきた。これまで畜産の分野での利用はほとんどなかったが、著者はキメラマウスの繁殖能力や発育能力にヘテロシス（雑種強勢）が発現することを明らかにした。

一般の交配による雑種にヘテロシスが発現することは良く知られているが、この場合の“雑種”とは遺伝子レベルでの雑種を意味する。一方、キメラでは個々の細胞は“純粋”で、組織のレベルで雑種であるといえる。もしもキメラにヘテロシスが発現するならば、これまでの遺伝子間あるいは遺伝子座間の相互作用ばかりではなく、細胞間の相互作用によってもヘテロシスが生じることになる。

実際、近交系マウスを用いて作出したキメラの繁殖能力や発育能力は、明らかに両近交系を

上回り、ヘテロシスの発現は明らかであった。しかもこの発現は細胞の混じり具合により様相が変化し、2種類の細胞がほぼ同じ割合で混じりあった個体ではF<sub>1</sub>（雑種第一代）と同様な高い能力が得られたが、細胞の混じり具合がどちらか片方に偏るにつれて近交系の能力は低下した。著者らはこのヘテロシスを通常のヘテロシスと区別するため、キメラ性ヘテロシスと呼んでいる。

家畜では3元、4元雑種、戻し交雑などの様々な雑種が利用されているが、いずれの交雑方法でも1つの遺伝子座に位置できる対立遺伝子の数は2つに限定されるため、理論的にはF<sub>1</sub>のヘテロシスを上回ることはない。一方、A系とB系のF<sub>1</sub>胚とC系とD系のF<sub>1</sub>胚でキメラを作出した場合、F<sub>1</sub>のヘテロシスにキメラ性ヘテロシスが加わり、F<sub>1</sub>以上の能力が得られることが考えられる。著者らの行った実験では、これらのF<sub>1</sub>間キメラの発育能力はF<sub>1</sub>をやや上回ることが明らかになった。

##### (2) ES細胞導入キメラ

現在、キメラの利用で最も注目されているのはES細胞（Embryonic Stem Cell）を用いたキメラであろう。ES細胞は多分化能を持つ細胞で、キメラにした場合に精子あるいは卵子に分化するため、次世代にその遺伝形質を伝えることができる。しかも、ES細胞は培養系の細胞で一度に多数の細胞を取り扱うことができるため、遺伝子導入を行った場合のスクリーニングが可能である。特に、最近の培養細胞系への遺伝子導入技術の進歩は著しく、目的とする遺伝子座での遺伝子改編が可能になってきた。このように遺伝子導入を行ったES細胞をキメラにした場合、その遺伝形質が次世代に伝えられて目的とする形質転換動物が得られる。マウスでは実際の成功例がすでにある。

これまで外来遺伝子を個体に導入する手段として最も早く実用段階に達したのは、受精卵の核内に直接に外来遺伝子を導入する方法であったが、この方法では特定の遺伝子座を目標にす

ることができないため、任意の個体が得られる可能性はきわめて低かった。特に家畜の場合には胚の供給がマウスのように簡単ではないため、この方法は問題が多いと思われる。ES細胞ではすでにスクリーニングをした細胞をキメラに用いるため、目的の遺伝子を持つ産子が得られる可能性が高まるわけで、家畜では大変に有用な技術になるであろう。

## 5. おわりに

家畜においては、ES細胞の研究はまだ始まったばかりの段階である。数例のES細胞株樹立の報告があるものの、実際にキメラとして組み込まれた例はない。ES細胞のもつ多分化能、特に生殖細胞への分化能の有無については今のところキメラにして調べるより他に方法がない

のが実状である。

これまでに報告された家畜のキメラの多くは、マーカーの遺伝形質が不明瞭なこともあるが、外観から明らかにキメラと判定できた例は少なく、血液型によって初めてキメラと判定された例が多い。この事は、これらのキメラの多くは細胞の混じり具合がどちらか片方の細胞に偏った、いわゆるキメラの程度の低い個体であることを示している。ES細胞由来の産子を得る一つの条件として、導入したES細胞が高率に個体内に組み込まれる必要がある事からも、家畜においては高率にしかも容易にキメラが作出できるようさらに研究を進める必要がある。そのためには、未だに不完全な家畜胚の体外培養技術などの、地味ではあるが基礎的な研究が大切であると思われる。

(畜産試験場 形質発現研究室)

## 耕耘作業の変遷と技術開発の方向

農林水産省農業研究センター編  
A5判 132頁 定価1,200円 千250円

耕耘作業は近年農業機械化の進展に伴い、もっとも機械化、省力化が進んだ分野です。しかし、最近耕地の浅耕化が問題になるなど、耕耘作業の問題と今後の技術的対応の検討が迫られています。

このような時期に、農業研究センターでは調査研究を行い、その成果を取り纏めました。この成果は広く農業に関心を持たれる方々や、実際に営農にたずさわっている方々にとって極めて有益と思しますので、広く活用されるようお奨めいたします。

[主な内容] 第I編：稲作における耕深変化と技術的問題、第II編：畑作における耕耘作業の多様化と技術的問題、第III編：農耕様式の変貌に対応した技術開発の方向

発行所

社団法人 農林水産技術情報協会

〒103 東京都中央区日本橋兜町15-6 (製粉会館内)  
電話 (03)3667-8931(代) 振替 東京1-71476