

ミニチュアブタの実験動物利用技術に関する研究

誌名	鹿児島県畜産試験場研究報告
ISSN	0389357X
著者	丸野, 弘幸 坂本, 薫 小松, 正憲
巻/号	30号
掲載ページ	p. 6-11
発行年月	1997年3月

ミニチュアブタの実験動物利用技術に関する研究

丸野 弘幸, 坂本 薫¹⁾, 小松 正憲²⁾, 中島 一彰³⁾, 佐藤 忠之⁴⁾, 中西 喜彦⁵⁾

1) 国立佐倉病院, 2) 農林水産省 中国農業試験場, 3) 千葉大学 医学部

4) 東海大学 医学部, 5) 鹿児島大学 農学部

要 約

MLC, Southern blotting, RT-PCRを用いることにより, クラスII MHCが固定されたミニブタを作成する方法を確立した。

SLA純系ミニブタとしてさらに価値あるものにするためには, クラスIMHCについても同様に固定を確認する必要がある。

また, 得られた個体の繁殖維持も重要な課題と考えられる。

緒 言

動物実験を必要とする研究分野は, ライフサイエンス等の進展に伴い, 広い範囲にわたり, 益々増大している。ヒトへの外挿にあたっては精度が高く再現性のある動物実験をめざし, 良質な実験動物の開発が行われ, 種々の動物が実験動物として利用されている。中型実験動物として, 従来からイヌ・サル等が重要な実験動物として利用されてきたが, 昨今の動物愛護の風潮の高まりにより, 今後の継続した利用が困難視されている。このような中で, ブタが人間と生理及び解剖学的に近似値が高く, 実験動物として有用な動物であると注目されて久しい。^{1), 2)}

また, ブタは臓器移植免疫学など基礎医学分野でヒトのモデルとなる実験動物としての利用の増大が見込まれており, 品質の優れた実験用ミニブタの安定した供給体制の確立が求められている。

近年, 免疫応答機構や抗病性等の生体防御機構は自己と非自己を識別する基本であるMHC (主要組織適合性遺伝子複合体: major histocompatibility complex) 遺伝子と密接な関係にあることが明らかとなった。MHC遺伝子について純系のミニブタを開発することが緊急の課題となっている。

このため, 本研究ではブタのMHC型を免疫的手法を用いて分類するとともに, MHC遺伝子を分子生物学的に解明し, MHC遺伝子が均一なミニブタを安定的に生産する技術を開発したので報告する。

材料およびその由来

1. NIH ミニブタ

1990年12月に, 米国国立がんセンターより学術用として指定されたNIHミニブタ10頭(♂; 5, ♀; 5)が貸与された。SLAタイプは(ブタ白血球抗原: swine leukocyte antigen) aa, cc, dd, ggの4タイプであり, すべてホモタイプである。ggは, MHC class I と class II 間の自然発生の組み替え種である。作出法³⁾は異なる研究機関より2頭のミニブタを入手し, 交配前に予め2頭間で皮膚移植を行い, 抗血清を作成し, 生まれた子豚のリンパ球をこの抗血清で吸収しタイプングを実施した。

SLAがヘテロタイプ間での子孫(第三世代)が生まれた時点で, SLAをコントロールし繁殖維持を実施するために補体依存性細胞傷害試験: trypan blue cytotoxicity testを実施した。

2. クラウンミニ

鹿児島大学農学部から1990年10月, 4頭(♂; 2, ♀; 2)を導入した。クラウンミニは, 1978年から, 鹿児島大学農学部において繁殖維持されている。オーミニの雌にゲッチング及びLW(ランドレース種×大ヨークシャー種)を交配して作出された。ほとんどの個体が血縁係数で37.5%を越えており, 家畜でいう近交系の段階に達したと考えられる。^{4), 5)}このことは血液型からみた遺伝的変異性の報告⁶⁾においてゲッチング, オーミニ, ピットマ

ンムーアに比べかなり変異性が小さく、遺伝的固定度も高いことから推察できる。また、当ミニブタは、温順で取り扱い易く小型であることから、今後汎用性の高い実験動物として利用されると考えられる。⁷⁾

3. オーミニ

日本家畜研究所から1992年7月、交雑種を10頭(♂; 5, ♀; 5)導入した。旧満州在来の東北民猪の荷包猪に起源をもち、繁殖性及び肉質に優れている。

方 法

1. trypan blue cytotoxicity test

(補体依存性細胞傷害試験)

多くの組織適合性抗原は赤血球には検出されず、主にリンパ球に検出される。そこでリンパ球に対する細胞傷害テストを実施した。標的細胞であるリンパ球を抗原と補体で処理し、インキュベート後、細胞傷害により細胞が破壊されるとtrypan blue色素が取り込まれる。(表1, 2)

まず、米国より譲渡された抗SLAモノクローナル抗体である16.7.E4.2(抗c)と2.12.3a(抗d)を利用して、補体原として用いるウサギ血清のheteroantibodyのチェックとactivityのチェックを実施し、補体の調整を実施した。また、維持colonyのNIHミニブタ4頭を用いて抗SLAモノクローナル抗体の作成を行った。(表3)

表1 リンパ球の分離及び浮遊細胞液の調整

I 採血

充分量のヘパリン(採血量の5%以上)を含むポンプで採血

II 分離

ヘパリン加血を同量のHunksで希釈



lymphoprep 15ml (50mlの遠沈管) 上に希釈ヘパリン加血を重層(写真1)



2,000rpm. 20min (break off)



リンパ球層(写真2)を吸引(on ice)Hunksで2倍に希釈



2,000rpm. 10min (break on)



沈査+ack lysing buffer (2~3ml) 2~3min放置(room temp.)



沈査+ack lysing bufferにM199を10ml加える(on ice)

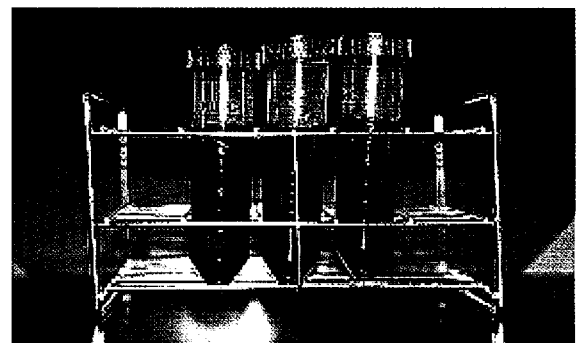
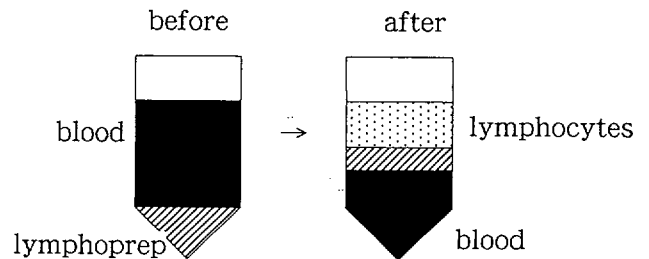


2,000rpm. 10min (break on)

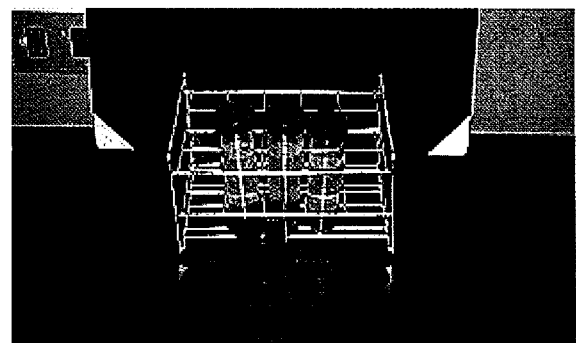


沈査+M199 (gelatin添加) で 5×10^6 に調整

before and after centrifugation



(写真1) before



(写真2) after

表2 plating

96穴マイクロタイタープレート(丸底)に下記の順序でメディウム, 補体, 抗体を加える。

- (1) serum controlを除くすべてのwellに25 μ l M199 (gelatin添加)を加える。
- (2) serum controlに50 μ lの抗血清を加える。
- (3) serum controlから25 μ lとり2倍希釈を繰り返す。最後の列は, mix後25 μ l除く。
- (4) 5×10^6 に調整した細胞浮遊液をすべてのwellに25 μ l加える。
- (5) カバーをかけてplate mixer 10秒。
- (6) incubate 37 $^{\circ}$ C, 15 min。
- (7) すべてのwellに100 μ l M199 (gelatin添加)を加える。
- (8) 1,200 rpm. 5 min。
- (9) flicking。
- (10) M199 (gelatin添加)をmedium controlとserum controlに25 μ l加える。
- (11) compliment controlと*2*4*8のwellに25 μ l rabbit complimentを加える。
- (12) カバーをかけてplate mixer 30秒(強)。
- (13) incubate 37 $^{\circ}$ C 30 min。
- (14) 1,200 rpm. 10 min 4 $^{\circ}$ C。

↓

flicking

on iceでtrypan blueを10 μ l添加後, 3分以内に・死細胞率を観察する。(写真3)

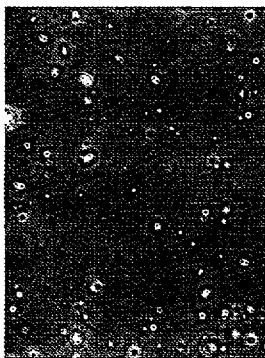


写真3

2. mixed lymphocyte culture : MLC

(リンパ球混合培養)

組織適合性の異なるリンパ球を混合して培養すると, それらのリンパ球は互いに刺激されて増殖を始

める。組織適合性が同一であるとその様な現象はみられない。したがって, 混合リンパ球反応は生体内における同種移植免疫応答を表現しているものと考えられる。

MLCはブタ胎児血清の存在下で5日間培養し³⁾ H - Thymidineの取り込みを比較した stimulation indexにより判定した。

表3

Donor	Recipient
M3 (cd)	M 5 4 (cc)
	M 5 8 (cc)
	6 4 5 7 (dd)

() : SLA type

1×10^6 のリンパ球を7日間隔で3回筋注, 3回目の筋注後, 7日目にRecipientの採血を実施し血清を-80 $^{\circ}$ Cで保存した。

3. 遺伝子解析

(1) Southern blotting

SLA - DR⁹⁾をプローブとしたサザン法で行った。

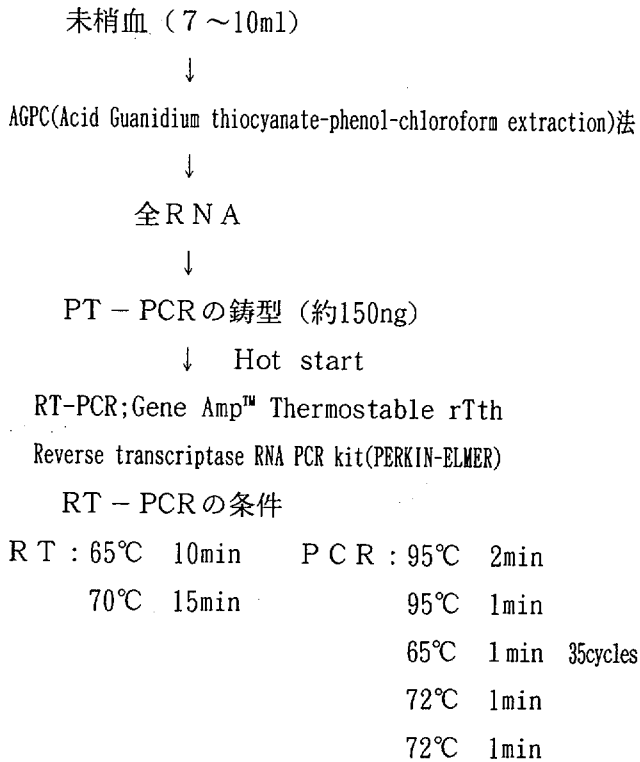
(2) RT - PCR⁹⁾

頸静脈からEDTA添加試験管で全血液を採取後, Rolfらの方法に準じてAGPC法で白血球からのtotal RNAの抽出を図った。RT - PCRは, 抽出したtotal RNAの約150ngをRNA templateとしてPERKIN - ELMERのGeneAmpTM ThermoStabler Tth Reverse transcriptase RNA PCR kitを使用し, Hot startで行った。温度条件・サイクル数は, DQA, DQB, DRA, DRB共に同一条件で実施した。

プライマーは, 現在まで報告されているcDNAの塩基配列^{10), 11), 12), 13)}をもとにAntigenrecognition siteを含む第一ドメイン(エクソン2)の全体を含むようにForward primerをエクソン1にReverse primerをエクソン3部分に設計した。

(表4)

表4 RT-PCR フローチャート



4. 交配

あらかじめMLCで高い反応性を示すことを確認したクラウンミニの雌とオーミニF1の雄を交配し、得られた子孫をMLCおよび遺伝子解析によってSLAのタイプを判定した。

結果及び考察

trypan blue cytotoxicity testを用いて、NIHミニブタの繁殖維持の際に、SLAclass Iのタイピングを実施した。作成した抗c及び抗d血清はtrypan blue cytotoxicity testの結果より、(表5)タイピングに利用可能と推察された。

当初、同種抗血清を利用したDavid Sachsらの方法³⁾による選抜育種を実施したが、十分な抗体価を持つ抗血清が得られなかったので成功しなかった。両系統の作出過程でのお互いの血縁関与が、主たる原因だと推察された。

Table 5 Trypan blue cytotoxicity test

sera	×1	×2	×4	×8	×16	×32	×64	×128	×256
M54	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M58	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6457	+	+	+	+	+	+	+	60%	50%

DD target

sera	×1	×2	×4	×8	×16	×32	×64	×128	×256
M54	+	+	+	+	+	+	+	60%	30~40%
M58	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6457	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ついで、あらかじめMLCで高い反応性を示すことを確認したクラウンミニの雌とオーミニ×バークシャー種交雑種の雄を交配し、第2世代6頭が得られた。(写真4)次に第1世代と第2世代の個体間でMLCを実施して、heterozygoteでかつ同タイプと思われた雌雄を確認した。この2頭を交配し第3世代8頭が生まれた。この中にhomozygoteの雌雄を確認し、これをさらに交配することにより全てが同タイプである第4世代(写真5)を得ることができた。MLCにより一部判定困難な結果(表6)が生じ、また同種抗血清の利用が不可能と判断したので、遺伝子解析によるSLAタイピングを実施した。

southern blotting結果(写真6)基礎豚は、ホモの個体とホモの個体と片方同じタイプを持つヘテロの組合せであると確認できた。

より簡便に遺伝子解析を実施するために、RT反応でホットスタートを実施し、非特異的バンドが出現しないようにしてRT-PCRでの解析を検討した。RT-PCR反応後、産物を複数の制限酵素で消化後、5%PAGEバンドパターンによりRFLP分析を行った。写真5はSLAクラスII DRB遺伝子座におけるRT-PCR産物のRFLPパターンである。コントロールとしてNIHミニブタを利用してDNAタイピングに有効であるかを確認した。このようにc/dヘテロ型ではc/c型及びd/d型の両者のバンドパターンが認められ、著者らが作出したMHC純系ミニブタは、第4世代でこの様にすべて同じRFLPパターンとなりMHC class IIが固定されたと判定した。

SLA遺伝子解析の結果も一致し、クラスII MHCがhomozygoteでかつ固定されたミニブタを得る方法を確立した。第2世代の2回目の交配により別のSLA遺伝子も認められた。SLA遺伝子解析の精度はRT-PCR法がより優れていた。

SLA純系ミニブタとしてさらに価値あるものにするためには、クラスI MHCについても同様に固定

を確認する必要がある。また、得られた個体の繁殖維持も重要な課題である。

参考文献

- 1) 丸野弘幸：実験動物として有用なミニブタの開発と利用①。FEEDING. 2月号, チクサン出版 東京, 1995.
- 2) Ryozo KAMIMURA, Syusaku SUZUKI, Syusaku NOZAKI, Hiroshi SAKAMOTO, Hiroyuki MARUNO, and Hiroshi KAWAIDA. : Branching Patterns in Coronary Artery and Ischemic Areas Induced by Coronary Arterial Occlusion in the CLAWN Miniature Pig. Exp. Anim. 45 (2), 149-153, 1996.
- 3) Sachs, D.H., Leight, G., Cone, J., Schwarz, S., Stuart, L., Rosenberg, S., : Transplantation in miniature swine. - I. Fixation of the major histocompatibility complex. Transplantation 22 : 559-567, 1976.
- 4) 中西喜彦, 小川清彦, 柳田宏一, 山内忠平: 近交系クラウンミニブタの体尺測定値と特徴について。日豚会誌 第28巻 第3号 1991.
- 5) 内藤元男: 家畜育種学, 62-68, 養賢堂, 東京
- 6) 大石孝雄, 中西喜彦, 田中一栄: 血液型および蛋白質型によるクラウン系ミニブタの遺伝的分析。日豚会誌 第28巻 第2号 1991.
- 7) 坂本薫, 丸野弘幸, 中島一彰, 中西喜彦, 剣持敬, 有田誠司: 臓器移植に適した実験用ミニブタの開発, 今日の移植 Vol.9 No.2, 日本医学出版, 東京, 1996.
- 8) Kenth Gustafsson, Sharon Germana, Francois Hirsch, Karen Pratt, Christian LeGuern, and David H. Sachs. : Structure of miniature swine class II DRB genes., Conservation of hypervariable amino

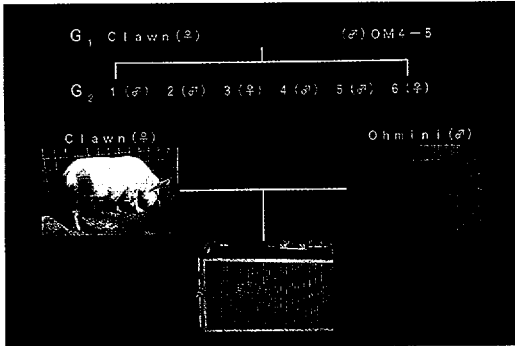


写真4

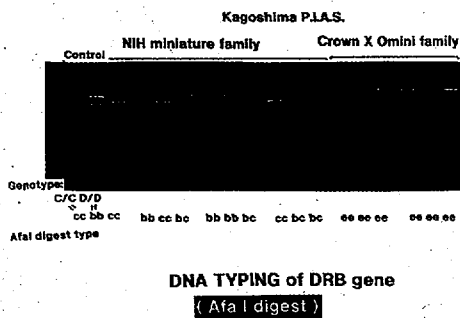


写真5

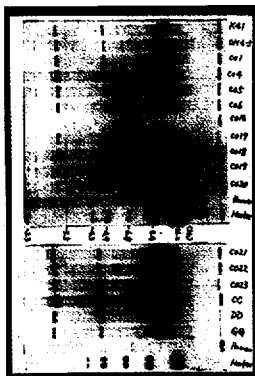


写真6

Table 8 Pig MLC stimulator () : stimulation indices

responder	K41	OM4-5	C01	C04	C05	C06
K41	152±59 (1)	4456±456 (29)	152±87 (1)	2195±597 (14)	5930±1387 (39)	8927±636 (59)
OM4-5	2982±1174 (13)	237±46 (1)	176±39 (0.7)	493±351 (2)	247±118 (1)	252±109 (1)
C01	220±149 (3)	124±33 (2)	74±43 (1)	62±11 (0.8)	75±1 (1)	191±104 (3)
C04	1442±312 (7)	4731±944 (22)	123±53 (0.6)	215±62 (1)	5453±428 (25)	8012±1087 (37)
C05	1561±1012 (7)	395±48 (2)	53±20 (0.2)	91±89 (0.4)	224±25 (1)	158±42 (0.7)
C06	3151±403 (14)	124±72 (0.5)	332±203 (1.5)	640±295 (3)	279±50 (1.2)	226±124 (1)

- acid residues between distantly related mammalian species. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 87. pp. 9798-9802. December 1990.
- 9) Masanori KOMATSU, Kazuo KAWAKAMI, Hiroyuki MARUNO, Akira ONISHI and Kumiko TAKEDA : RT - PCR - based Genotyping for Swine Major Histocompatibility Complex (SLA) Class II Genes. Anim. Sci. Technol. (Jpn.) 67(2) : 211-217.
- 10) Gustafsson K, LeGuern C, Hirsch C, Hirsch F, Germana S, Pratt K, Sachs DH. : Class II genes of miniature swine. IV. Characterization and expression of two allelic class II DQB cDNA clones. J. Immunol, 145 : 1946-1951. 1990.
- 11) Gustafsson K, Germana S, Hirsch F, Pratt K, LeGuern C, Sachs DH. : Structure of miniature swine class II DRB genes, conservation of hypervariable amino acid residues between distantly related mammalian species. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 : 9798-9802. 1990.
- 12) Hirsch F, Sachs DH, Gustafsson K, Pratt K, Germana S, LeGuern C. : Class II genes of miniature swine. III. characterization of an expressed pig class II gene homologous to HLA - DQA. Immunogenetics, 31 : 52-56. 1990.
- 13) Hirsch F, Germana S, Gustafsson K, Pratt K, Sachs DH, LeGuern C. : Structure and expression of Class α genes in miniature swine. J. Immunol. , 149 : 841-846. 1992.