

第4回哺乳動物生殖工学研究会

プログラム・抄録集

会期 : 平成4年12月 5日(土)
午後2時30分～5時30分

会場 : 北里本館2階大会議室
港区白金 5-9-1 TEL 03-3444-6161

開会の辞

会長 横山峯介

シンポジウム『遺伝子導入動物』

座長 横山峯介・岡本正則

- S-1 胚性幹細胞株の樹立
東 貞宏（東京大学医科学研究所）
- S-2 ジェントラップ-ES細胞を用いた未知遺伝子の検索
山崎由紀子（三菱化成生命科学研究所）
- S-3 遺伝子欠損動物の作出
鈴木宏志（中外製薬・前臨床研究所）
- S-4 Y染色体特異的DNAを用いたPCR法による牛胚の性別判別
板垣佳明（伊藤ハム・中央研究所）
- S-5 トランスジェニックマウスを用いた変異原性試験
加藤基恵（食品薬品安全センター）

一般講演

座長 中潟直己

- 1 遺伝性珠脛症ラット（rdw）の下垂体ホルモン並びに
下垂体特異的転写因子Pit-1のmRNAについて
古舘専一（北里大学医学部動物実験施設）
- 2 君は何回動物園に行くか？
二見典克（小田原動物園）
- 3 酪農4年生の牧場紹介
白石 勝

—— 総 会 ——

S - 1 胚性幹細胞株の樹立

東 貞宏（東京大学医科学研究所）

マウス胚性幹細胞（ES細胞）は、初期発生 of 内部細胞塊から原始外胚葉までの細胞の性質を保持したまま特定の条件下で継代維持を *in vitro* でおこなうことができ、また、このES細胞を初期胚に注入することより、胚の正常発生に組みこまれ、さまざまな細胞に分化する能力を有している。このためES細胞と正常な初期胚由来のキメラ個体が得られる。さらに生殖細胞キメラの場合は、ES細胞に由来する個体が得られている。このようなES細胞の性質を利用して遺伝子欠損動物の作製や発生分化の際に働く未知の遺伝子の検索が行われている。

こうしたES細胞を用いた手法はその利用価値から多くの研究室でこの細胞の利用が望まれている。しかし、現在までにES細胞株を樹立することのできる研究室は僅かである。そこで今回我々の研究室で行っているES細胞株の樹立法を詳細に紹介し、さらにES細胞に分化抑制効果を持つ白血病抑制因子（LIF）のcDNAを導入することによって興味深い知見を得たので併せて紹介する。

S-2 ジーントラップ-ES細胞を用いた未知遺伝子の検索
山崎由紀子（三菱化成生命科学研究所）

マウスのミュータントは、現在までに800近い遺伝子が染色体上にマップされている。しかしそのうちで、表現型を規定する遺伝子が同定・単離されているものは、かぞえるばかりである。近年行われてきた挿入変異形成は、DNAマイクロインジェクションやレトロウイルス感染で、外来遺伝子をマウス初期胚の染色体中に挿入し、ミュータントを誘発する方法であるが、実際に遺伝子同定にまで達したものは限られており、挿入変異体の同定を直接胚や個体を対象として行うことは難しい。

1989年にES細胞を用いたジーントラップ法による効率的なミュータントマウス作成法が報告され、注目を集めた。この方法は同時に、未知なる原因遺伝子の発現パターンの観察、その単離・同定を可能にした。ジーントラップ法の基本は、プロモーターを持たないレポーター遺伝子（LacZ）で、ES細胞内に導入すると、この遺伝子がゲノム内の任意の部位に挿入されることが期待できる。このとき、遺伝子内に挿入され（挿入された側をトラップ遺伝子と言う）、上流にあるトラップ遺伝子のプロモーターから翻訳可能な転写が行われた時のみ、レポーター

遺伝子の発現が認められる。実際の方法は、(1) レポーター遺伝子を発現しているES細胞を選別し、(2) このES細胞をマウス胚盤胞に注入後、仮親に移植してキメラマウスを作成、(3) 胎児の段階でレポーター遺伝子の発現パターンを調べる。一方(4) 生殖系列にレポーター遺伝子が入った成熟キメラマウスから、最終的にレポーター遺伝子をホモに持つマウスを得る(挿入先のトラップ遺伝子はレポーター遺伝子によって破壊されて本来の機能を失っている可能性があるので、ホモマウスではミュタントが期待できる)。(5) 遺伝子レベルでは、レポーター遺伝子を指標として、隣接領域の未知のトラップ遺伝子の単離・解析を行う。

今回は、私たちの得たトラップ遺伝子の発現パターンを中心に紹介したい。

S - 3 遺伝子欠損動物の作出

鈴木宏志（中外製薬・前臨床研究所）

発生工学および生殖工学の進歩により、クローニングされたDNAの個体レベルでの発現機構あるいは生体内における遺伝子産物の挙動を解析するために、トランスジェニックマウスの作出は、不可欠な研究手段となってきた。いわゆるマイクロインジェクション法によって作出されたトランスジェニックマウスは、遺伝子発現の組織、時期特異性や遺伝子の発現産物の細胞内あるいは個体内での生理機能の解析を可能とした。しかしながら、ある遺伝子の生体内での本来の役割を解析するためには、遺伝子の過剰発現系のみでは限界があり、内在性の遺伝子を欠損あるいは改変させる技術の開発も望まれ、現在では、第2世代のトランスジェニックマウスともいえるマウス胚性幹細胞（ES細胞）を用いての相同組換えを利用したジーンターゲット法が開発され、種々の遺伝子についての遺伝子欠損マウスの作出が試みられている。

演者らは、心血管内皮細胞から単離、精製された21個のアミノ酸からなる血管収縮ペプチドであるエンドセリン-1（ET-1）の生理的意義を解明するために、ET-1遺伝子欠損マウスの作出を試みた。

ET-1遺伝子の第2エクソンから第5エクソンを含む、約7kbのジェノミックDNAフラグメントの第2エクソンにネオマイシン耐性遺伝子を挿入することによって中断し、さらにもうひとつの選択マーカーとして、チミジンキナーゼ遺伝子を用いて、ターゲットングコンストラクトを作製した。これをES細胞A3-1株に導入後、G418およびガンシクロビルを添加して選択培養を行ない、さらにPCRおよびサザンブロットで解析した結果、35個の相同組換え体を得た。これらの相同組換え体をC57BL/6J系マウスの胚盤胞に注入して得られた10例のキメラマウスのうち、2例に生殖系列への伝達(germline transmission)を確認した。現在、ET-1遺伝子を欠損したヘテロ個体同士の交配を行っている。

S-4 Y染色体特異的DNAを用いたPCR法による牛胚の性判別 板垣佳明（伊藤ハム・中央研究所）

家畜の性を人為的に支配することによってもたらされる家畜生産性の向上は計り知れないものがあり、古くから数多くの研究がなされてきた。これらの研究は、1)X-, Y-精子の分離、2)胚を傷つけないで(non-invasive)調べる方法、3)胚の一部を採取して(invasive)調べる方法に大別されるが、いずれも判定率、受胎率、労力、経費などすべての点で満足のいく方法は未だ確立されていない。近年、PCR法を用いて牛胚の少数の細胞からY染色体特異的DNA配列を検出する方法が開発され、従来の染色体検査などと比べてその判定率の高さや簡便さから、国外では一部企業ベースで行われるようになった。我々は1991年より牛胚の性判別を行うべく、独自に牛Y染色体特異的DNA断片の単離を試み、それらの塩基配列を決定した。ここでは、これらの塩基配列をもとに作製したプライマーを用いたPCR法、牛胚の体外作出、胚のバイオプシー操作および性判別胚移植後の出産例などを中心に紹介する。

S-5 トランスジェニックマウスを用いた変異原性試験

加藤基恵（食品薬品安全センター-秦野研究所）

環境中における未知の化学物質などの安全性を評価するにあたり、遺伝子突然変異と染色体異常を調べる必要がある。しかし、これまでin vivoの哺乳動物を用いた遺伝子突然変異を検出する良い試験系がなかった。Gossenら(1989)およびStevenら(1991)は大腸菌の遺伝子を導入したトランスジェニックマウス(Muta™ Mouse, Big Blue™ Mouse)を用い、哺乳動物の体細胞のみならず、生殖細胞におきた遺伝子突然変異を同一の個体から同時に検出できる新しい in vivoの試験系を開発した。

本研究会においては、トランスジェニックマウスの変異原性試験への応用、また、実際に演者が行なったMuta™ Mouseの雄性生殖細胞における突然変異の誘発について紹介する。

1 遺伝性侏儒症ラット (r d w) の下垂体ホルモン並びに
下垂体特異的転写因子 Pit-1 の m R N A について

古館 専一¹、 柴山 啓子²、 大山 宜秀²、 小野 雅夫³

(北里大学・医・¹実験動物、²小児科、³分子生物)

体の異常に小さい疾患である侏儒症のモデル動物に関しては、マウスでは Snell, Ames, Pigmy, Little 等が、ラットでは、突然変異としての GH 単独欠損侏儒症 (dw), the Dwarf rat (Dw) の報告があるに過ぎない。

r d w は 1988 年に報告され、その基礎的検討から、従来のモデル動物とは異なるタイプの新しい遺伝性侏儒症ラットであると推察される。我々は、r d w の疾患モデル動物としての有用性、特性・特徴、更に、その病因因子を明らかにするための検討を進めてる。

今回は、r d w ラットの異常メカニズムを分子レベルで明らかにする第一歩として下垂体における下垂体ホルモン m R N A の含量ならびに下垂体特異的転写因子 Pit-1 遺伝子の発現を Northern hybridization を用い検討した成績について報告する。

r d w ラット下垂体に発現している G H 及び P R L m R N A の大きさは、正常ラットとほぼ同じ 1.0 kb であったが、発現量は正常ラットに比較して 1/30 ~ 1/100 と極めて低下していた。一方、P O M C、 α -subunit の m R N A は r d w が正常ラットに比べてやや多くなっていた。L H β m R N A は r d w と正常ラットでほぼ同じであったが、F S H β m R N A 発現量は r d w で約 1/2 ~ 1/3 に低下していた。なお、今回の Northern hybridization の条件下では、r d w 及び正常ラットの下垂体 R N A に T S H β のプローブとハイブリダイズする sequence を検出できなかった。Pit-1 m R N A に関しては、r d w において、主要な 2.5 kb に加え、1.3、4.5 kb の三種類のバンドが発現しており、その大きさ並びに発現量は正常ラットとほぼ同じであった。

以上の事から、r d w の病因となる遺伝子の産物は Pit-1 蛋白と同一ではないが Pit-1 蛋白と同様に、somatotrophs、lactotrophs、thyrotrophs の前駆細胞内に存在する因子か、或いは外部（視床下部）で産生される因子で、これらの細胞の増殖・分化に重要な役割を果たす蛋白と考えられる。

2 君は何回動物園に行くか？

二見典克（小田原動物園）

1. 小田原動物園の概要

昭和25年に、市制10周年記念の行事として「子供博覧会」が行なわれ期間限定の形で動物園が開催され、その際に展示の目玉としてアジアゾウの雌（愛称ウメコ）が導入されたことが、きっかけとなり常設の動物園となった。当時のゾウ人気は現在のパンダやコアラを凌ぐ程だったらしい。

平成4年10月14日現在、鳥類40種210点、哺乳類22種124点の動物を6人の職員で管理しています。

2. 動物園の機能

(a)教育の場：種目ラベル、ガイドブック、案内板などによる正確な情報の提供、また「ふれあいコーナー」などの設置により動物の体温、臭い、採食行動などが体験として学習することができる。

(b)研究の場：病気やケガの治療や死亡動物の解剖所見などの獣医分野と、一般行動観察、生殖行動観察、繁殖した動物の成長過程の記録、飼料など飼育分野の日常観察そのものが研究となり動物学や医学などの分野に貢献できる。

(c)自然保護：パンダに代表される希少動物の繁殖、園館に持ち込まれる身近な動物の保護や愛鳥週間、動物愛護週間など自然保護活動へのPR。

(d)レクリエーション：いわゆる「憩いの場」としての活用。教育の場としての機能との兼ね合いで、遠足、修学旅行などで活用。近年は動物園全体の集客数が減少傾向にあるが、完全週休二日制の導入などにより増加が期待される。

3. 私の担当動物

(a) アジアゾウ：当園が出来るきっかけとなった動物。昭和25年に推定年齢2才で導入。現在、飼育員が全員で6名だけなので、敷きワラの出し入れ、糞の処理などは全員で行なうようになっている。体重約3ト、性質はおとなしいが、エンジン音に対して極めて強い拒否反応を示す。入職3年目の私はまだ襲われる危険性があるので、ひとりでの放飼場への立ち入りは禁止されている。近年では当園のように直接飼育ではなく事故防止の為間接飼育が主流になりつつある。

(飼料) ジャガイモ約20kg、サツマイモ約30kg（夏期にはカボチャ）
飼料用ワラ約15kg
その他キャベツ、ニンジン、パンなど。

(b) オオヅル：雄29才、昭和38年に当園で繁殖。

雌、推定年齢34才。

全長約150 cmの非常に大型のツル。担当になり約2年半経過。最初の1年は雄の激しい威嚇、攻撃にあって給餌、清掃すら危険だった。

威嚇方法は、頭を胸元まで下げ低いなり声をだし、瞬膜をさかんに上下させる、と同時に両脚を少しバタつかせる様な格好。

繁殖期（春～夏）には2個の卵を産み、営巣、抱卵、育雛をペアで行なう。

過去2年（今年度を含む）は各4個ずつを産卵したがいずれも無精卵であった。

平成2年度には4卵中2卵が孵化し1羽が成鳥となった。

この時期の雄の攻撃は年間を通して最も激しく、バードケージの周りを歩くと、ついてくる程。出入口扉に半透明のビニールタンが設置してあるが、嘴の攻撃により、いくつもの穴が開いている。

最近ようやく私を認めてくれたようで、今年度の繁殖期において私に対する攻撃は著しく緩和された。

(飼料) トウモロコシベースの家禽用飼料、ハト用飼料

フィッシュミール、家畜用炭酸Ca

キャベツ、小松菜、タマネギなどのみじん切り。

夏期にセミ、ミミズ、繁殖時にミルウォーム、ドジョウなどを追加。

(c) クロクマ：別名ツキノワグマ、ニホンクロクマ

愛称、♂カスタード ♀プリン

雄雌とも昭和53年に山形県より推定年齢2才で導入。

担当になり約2年半経過。

雄は私の声やバケツの音に対して、たいへん良く反応するが、雌は反応に乏しい。

5月～6月に交尾期をむかえ翌年の1月～2月に出産する。過去2年間については繁殖ナシ。

野性の個体数が減少している現在、繁殖が期待される日本産食肉目のひとつ。

(飼料) サツマイモ、ジャガイモ、(冬期にはカボチャ) など

4kgにフィッシュミール、食塩を添加したものを煮てそれにオカラ約5kgを混ぜ合わせ2等分したもの。

- (d) マーラ：昭和63年に導入。平成4年11月5日現在で12頭を担当。非常におとなしいが、ほとんど馴れない。最近では秘かなブームとなり飼育予定または開始する園館アリ。体型がウサギ、ワラビー、シカなどの要素を持ち合わせ、初めて見る人にとっては中途半端な感じを与える為に足を止めじっと観察している人が多い。

(飼料) サツマイモ1.2 kg パン0.4 kg キャベツ1.2 kg
ニンジン0.7 kg 草食動物用ペレット2.0 kg
*入荷飼料により変動する。

4. 主な保護動物：

(鳥類) ツバメ、ハト、ムクドリ、ヒヨドリ、ユリカモメ
コサギ、ササゴイ、トビ、アヒル、マガモ、スズメ
フクロウ、オナガ、カラスなど。

(哺乳類) タヌキ、アナグマ、ハクビシン、ニホンザル
イノシシなど。

(例外) いわゆる夜店で売られている動物であるウサギ、ニワトリ、モルモットなどは收容スペースの関連と口こみで広がる事の心配、飼育し始めたら最後まで面倒を見なければならない事、動物を飼う事の責任の重さ、などを教える意味も含めて、できるだけ收容しないようにしている。ところが出勤するとダンボール詰になったニワトリなどが放置されている事が後を断たない。当園は小田原城跡内に存在するため、外堀に囲まれているが、そのなかには幾匹のミドリガメが生息しているのか定かではない。

5. 終わりに

動物園をとりまく状況は刻々と変化し、近代動物園の発祥と言われているロンドン動物園の閉園に関する問題の報道などは記憶に新しいところである。

動物園を訪れる人々の知識が豊富になり、テレビなどでも素晴らしい番組を放送するようになりました。

しかし現状はお客様と私たちとの間の「動物園」に対する考え方や利用法に少々のギャップがあるように思います。動物に適した生活環境を与え1日でも長生きしてもらい1頭、1羽でも多くの子孫を残してもらいたい事を願ってやみません。

人は一生のうち最低でも4回は動物園に足を運ぶそうですが皆様はいかがでしょうか？

(参考資料)

飼育ハンドブック (社) 日本動物園水族館協会

以上.

小田原動物園

〒250 神奈川県小田原市城内6-1

☎0465 22 3818

※ 年中無休、入園無料

3 酪農4年生の牧場紹介 白石 勝

私の働いている白石牧場は、東京から南へ80キロ、千葉県の中部、東京湾に面した富津市にあります。近くには東京湾に突き出た富津岬、そして、対岸には神奈川県横須賀市が海岸からよく見えます。また市内には、観光牧場で有名な鹿野山マザー牧場があります。地理的に東京に近いので、私の牧場は典型的な近郊酪農を営んでいると思います。

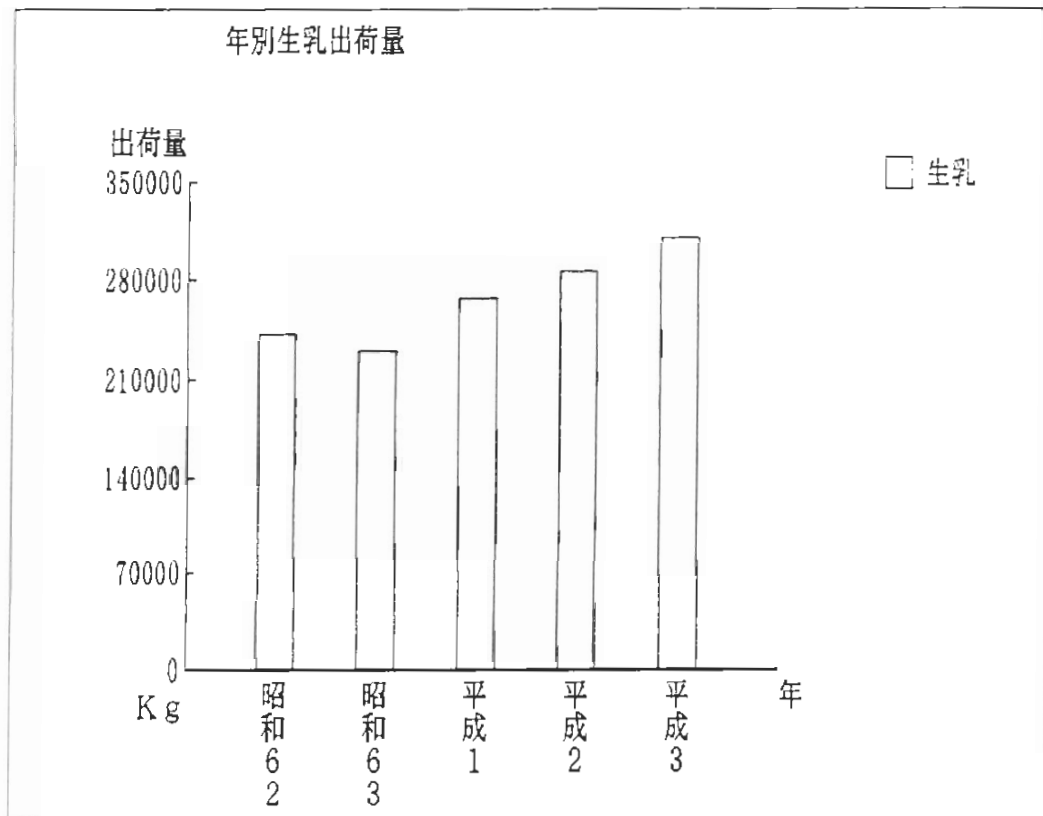
まず、白石牧場の経営規模は、総頭数がホルスタイン種67頭、うち成牛40頭、育成牛27頭と現在なっております。しかし、来年中には75頭前後にまで戻したいと思っています。ちなみに、4年ほど前にはおよそ80頭もの牛がいました。耕作面積は、自作地が2ヘクタール、借地が3ヘクタールあり、飼料作物としてデントコーン、ソルガム、イタリアンライグラスを栽培し、殆どをサイロに詰めて、サイレージとして給与しております。千葉県は温暖な気候で、特に富津市の海岸部では霜の降るのが遅く、雪の心配もないので、飼料作物の3毛作ができます。ですから年間の10アール当たりの収量

も非常に多く、北海道の様に広大な土地も必要がないと言えます。しかし、5ヘクタールでは十分とは言えず、あと3～4ヘクタールは土地を確保したいと思っています。前年度の出荷乳量は31万キロで、平均乳脂肪は3.7%、平均乳蛋白は3.1%でした。牛群の1頭当たりの平均年間乳量は8500kgぐらいです。ここ数年は集荷乳量、乳成分、牛群の能力などは順調に伸びています。

また、最近4年間の問題点や、これからの課題として次のようなことがあげられます。まず父の病気による、搾乳頭数の減少があり、これは配合飼料の改善と個体能力の向上により出荷乳量の減少及び、収入の減少は最小限に留めていますが、経営的には頭打ちで、とにかく合理化を進めはやく以前の頭数まで戻し、より多くの収入と安定した経営をしたいと思います。また安定した経営には良質な粗飼料の確保が重要だと言えます。今現在、飼料畑として5ヘクタールほど耕作していますが、土壌は地力に乏しい砂地です。砂地は肥料持ちが悪く、干害や湿害を受けやすく、その年の天候により飼料作物の収量が大きく左右されます。これには今までよりも多くの

飼料畑を耕作するしか方法がないようです。今、技術的に不安はありませんが、施設の老朽化と乳牛の改良の遅れが少々気になります。

これからの目標としては病気の少ない健康で丈夫な牛作りをしたいと思います。やはり儲かる酪農はこの事が第一だと思っています。



作業機械

種類	規格	備考
トラクター4WD	クボタ55ps クボタ32ps クボタ22ps	共同3/5
自走式ハーベスタ	スター8輪車 カネコ8輪車	中古 共同3/5
ヘイベータ	スター1010	
ヘイレキ	スター1600	
ディスクモア	スター1000	
ロータリーモア	スター0940	
ドライブハロー	スター2400	
ブラウ	タカキタ 16x2	長期借用中
コーンプランター	3条	共同3/5
鎮圧ローラー	2m	
ライムソア	デリカ2m	共同3/5
ダンプトラック	マツダ2t トヨタ2t	堆肥運搬専用
トラック	ニッサン1.5t	
軽トラック	スズキ	中古