

13 ホルスタイン種搾乳牛における健常乳房の超音波画像について

畜産技術研究所
○大村 学海

要 約

近年、産業動物臨床現場では携帯型超音波検査機器が普及してきており、主に繁殖分野で用いられているが、腹腔内臓器や乳器での超音波画像の報告も増えてきている。しかし、乳房炎発生時の乳房内超音波画像所見の報告は存在するが、健常時の乳房内超音波画像所見の報告は少ない。そこで健常乳房の超音波画像所見をまとめ、乳房間の所見の違いを解析した。

その結果、健常乳房の画像所見として、高輝度の体表部の奥に均一なエコー源性を示す乳房実質と、エコー源性の低い均一な像が見られる乳槽と大乳管が観察された。前乳房間と後乳房間で乳槽断面積、乳槽輝度、乳槽最大幅、乳槽の深さ、乳頭近位幅、乳房実質輝度について比較したところ、それぞれ差は認められなかった。また、前乳房の各泌乳ステージ間、後乳房の各泌乳ステージ間でも同様に比較した結果、差は認められなかった。各泌乳ステージで前後乳房を比較した結果、乳槽断面積、乳槽の深さ、乳房実質輝度において後乳房が上回る傾向が見られた。

はじめに

乳房炎は病原微生物が乳頭より乳房内に侵入することで誘起される炎症であり、搾乳牛の疾病の中で最も大きな損害を与える疾病である。生乳の廃棄、乳牛の治療、淘汰など、その経済損失は酪農経営に直接関わる大きな問題である [7]。

近年、産業動物臨床現場では携帯型超音波検査機器（以下エコー）が普及してきている。主に繁殖分野で用いられているが、腹腔内臓器や乳器でのエコー画像の報告も増えてきている。牛の乳器においては乳頭のエコー検査に関する報告があり、乳頭狭窄などの乳頭疾患の診断に応用されている [6]。また、エコー検査が牛の乳房の状態や予後に関する追加情報をもたらす [5]、乳房炎発生時の乳房内変化の観察にエコーが有用であると報告されている [7]。

しかし、乳房炎発生時の乳房内エコー所見の報告はあるが [5, 6, 7] 比較対象となる健常時の乳房内エコー所見の報告は少ない。そこで、エコー検査における健常乳房の所見を得ることを目的として、健常乳房の撮影を実施して画像所見をまとめるとともに、乳房間の所見の違いを解析した。

材料と方法

1) 供試牛

供試牛は、2018年10月から2019年10月の間に当所で飼養されたホルスタイン牛19頭で現泌乳ステージで乳房炎を発症していない健常乳房のべ222乳房を用いた。撮影は、泌乳初期は分娩後35日、泌乳最盛期は80日、泌乳中期は160日、泌乳後期は260日から5日間まで行った。なお、前泌乳ステージでの乳房炎発症履歴は問わないこととした。健常乳房は家畜診療指針に基づき乳房炎と診断されない乳房とした [4]。

2) 検査方法

撮影は乳房の縦断面を動物用超音波診断装置 HS-101V (HONDA ELECTRONICS) と経直腸用プローブを使用し、周波数 5MHz、深さ 8cm、フォーカス Middle、STC: 3、BRT: 8 に設定して 15:00~16:00 の間に行った (当所では 9:00~10:00 と 17:50~18:50 の 2 回搾乳を行っている)。図 1, 2 のように前乳房は側面から、後乳房は尾側から乳房表面を剃毛せずエコー用ゼリーを用い、プローブを地面と垂直にして撮影を行った。撮影範囲は乳頭基部より乳槽末端までとした。1 乳房の撮影により得られたエコー画像を連結し、評価を行った [1]。

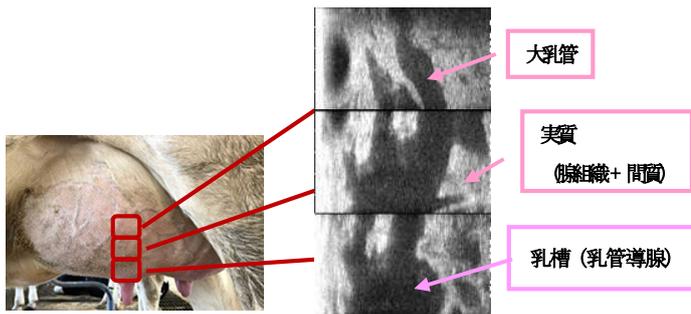


図1 前乳房の撮影部位と乳房エコー画像
画像中央の低輝度領域が乳槽、乳槽周囲のびまん性均一エコー領域が乳房実質

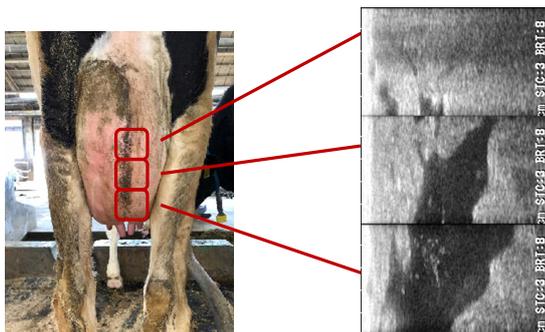


図2 後乳房の撮影部位と乳房エコー画像

3) 評価方法

撮影されたエコー画像を用い、鈴木ら [7] の報告を参考に健常乳房の画像所見を解析した。また、画像処理ソフトウェアである ImageJ を用いて、乳槽断面積、乳槽輝度、乳槽最大幅、乳槽の深さ、乳槽の乳頭近位幅、乳房実質輝度 (図 3) を測定して評価し、右前乳房と左前乳房、右後乳房と左後乳房の比較 (t 検定) を行った。また、各泌乳ステージで前後乳房の比較 (Tukey 検定) を行った。

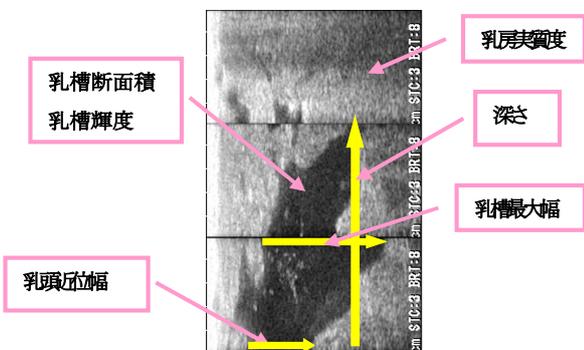


図3 各測定部位

「深さ」は乳頭起始部からエコーで撮影出来た乳槽 (大乳管) の上端部分までとした。

「乳頭近位幅」は乳頭起始部の乳槽の幅とした。

成績

全ての乳房において、高輝度の体表部位の奥に高～中程度の均一なエコー源性を示す乳房実質と、エコー源性の低い均一な像が見られる乳槽と大乳管が観察された。乳房実質と乳槽、大乳管の境界部は明瞭に区別された。遠位の乳槽壁付近の乳房実質は他の乳房実質よりも高輝度となった。体表部の血管は乳槽と同程度の低いエコー源性を示すが、乳房実質との境界部は乳槽よりも不明瞭であることが観察された (図 4)。

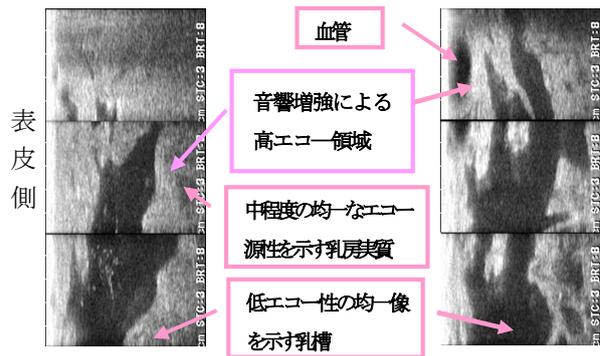


図4 健常乳房エコー画像

右前乳房と左前乳房 (右前 n=47、左前 n=47)、右後乳房と左後乳房 (右後 n=64、左後 n=64) を乳槽断面積、乳槽輝度、乳槽最大幅、乳槽の深さ、乳槽の乳頭近位幅、乳房実質輝度について、泌乳ステージの区別なく比較した結果、すべての項目において有意差は認められなかった (図 5 ~ 10)。

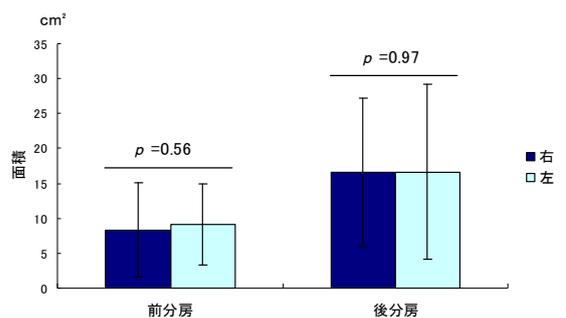


図5 乳槽断面積

前分房間、後分房間で有意差なし

棒グラフは平均値、エラーバーは標準偏差を示す

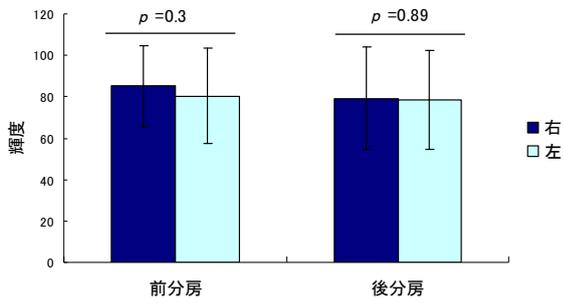


図6 乳槽輝度

前分房間、後分房間で有意差なし

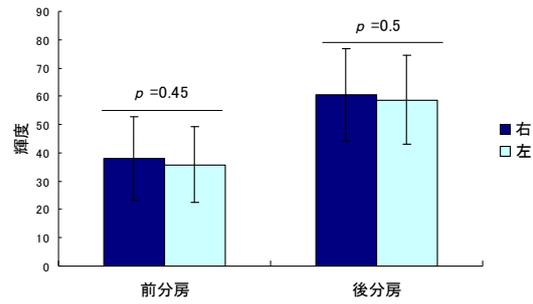


図10 乳房実質輝度

前分房間、後分房間で有意差なし

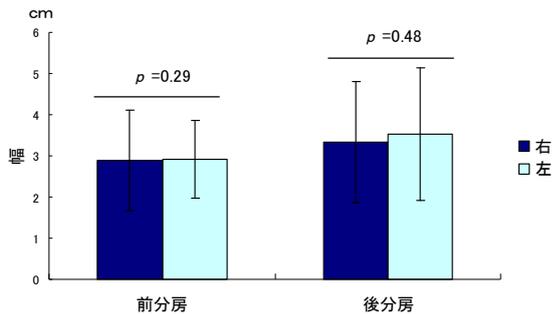


図7 乳槽最大幅

前分房間、後分房間で有意差なし

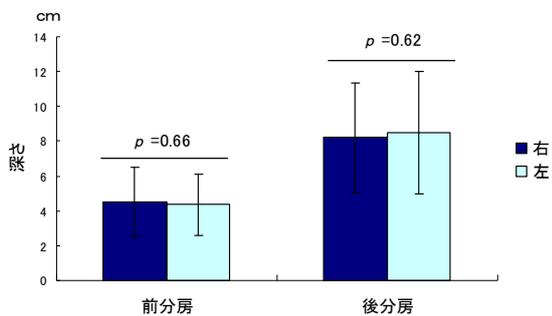


図8 乳槽深さ

前分房間、後分房間で有意差なし

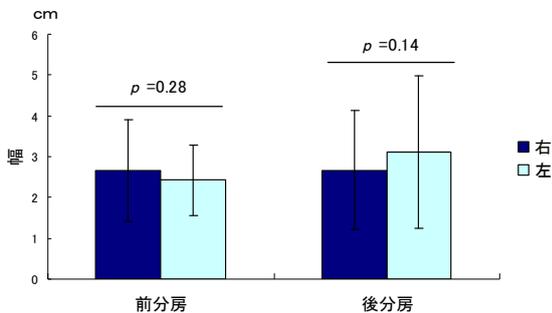


図9 乳頭近位幅

前分房間、後分房間で有意差なし

前乳房の各泌乳ステージ間、後乳房の各泌乳ステージ間で乳槽断面積、乳槽輝度、乳槽最大幅、乳槽の深さ、乳槽の乳頭近位幅、乳房実質輝度について比較した（前乳房：初期 n=6、最盛期 n=64、中期 n=10、後期 n=14。後乳房：初期 n=8、最盛期 n=84、中期 n=16、後期 n=20）。その結果、全ての項目において前乳房間、後乳房間のどちらも有意差が認められなかった。（図11～16）。

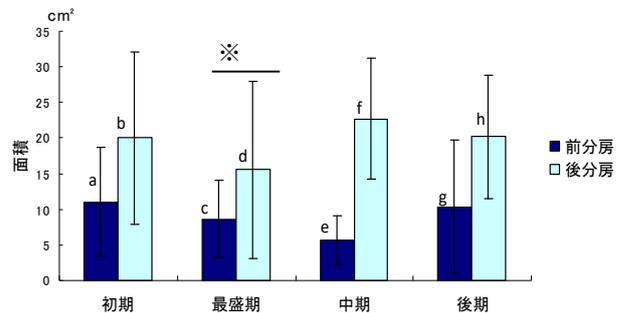


図11 乳槽断面積

a, c, e, g 間、b, d, f, h 間に有意差なし

**p < 0.05

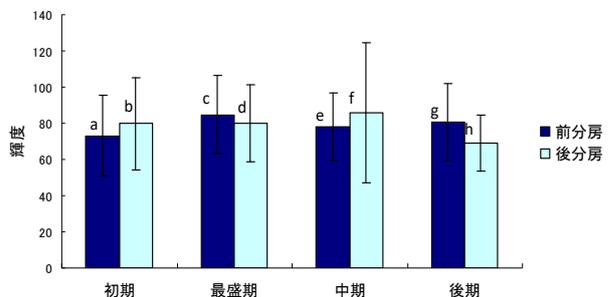


図12 乳槽輝度

a, c, e, g 間、b, d, f, h 間に有意差なし

ab 間、cd 間、ef 間、gh 間に有意差なし

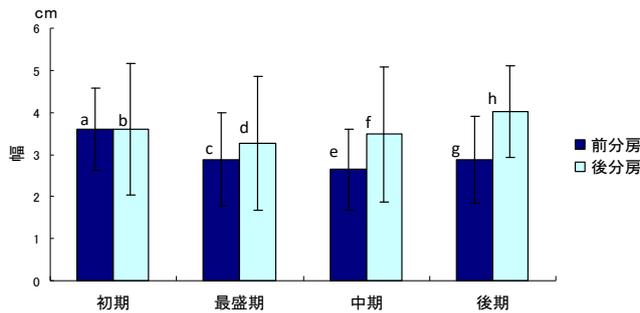


図 1 3 乳槽最大幅
a, c, e, g 間、b, d, f, h 間に有意差なし
ab 間、cd 間、ef 間、gh 間に有意差なし

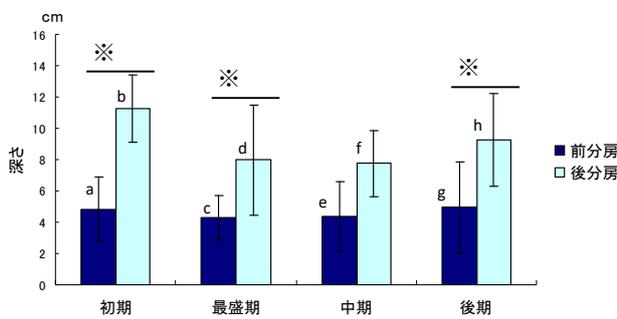


図 1 4 乳槽深さ
a, c, e, g 間、b, d, f, h 間に有意差なし
※ $p < 0.05$

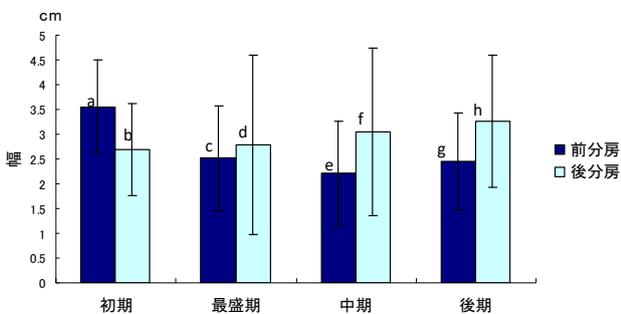


図 1 5 乳頭近位幅
a, c, e, g 間、b, d, f, h 間に有意差なし
ab 間、cd 間、ef 間、gh 間に有意差なし

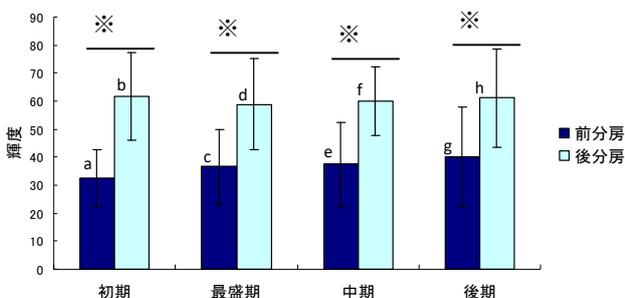


図 1 6 乳房実質輝度
a, c, e, g 間、b, d, f, h 間に有意差なし
※ $p < 0.05$

各泌乳ステージでの前乳房と後乳房の比較において、乳槽断面積では初期・中期・後期で有意差は認められず、最盛期で有意差 ($p < 0.05$) が認められた (図 1 1)。乳槽輝度と乳槽最大幅で有意差は認められなかった (図 1 2、1 3)。乳槽の深さでは中期で有意差は認められなかったが、初期・最盛期・後期で有意差 ($p < 0.05$) が認められた (図 1 4)。乳槽の乳頭近位幅では有意差は認められなかった (図 1 5)。乳房実質輝度は全ての泌乳ステージにおいて有意差 ($p < 0.05$) が認められた (図 1 6)。

考 察

今回、健常乳房エコー画像の撮影を行ったが、健常像でも乳槽や血管など液体が貯留している構造物の遠位の乳房実質は高輝度となった。これはエコーから発生する超音波の減衰が実質臓器よりも少ないために発生する音響増強 (エコーのアーチファクト) によるものと考えられる (図 4)。

今回の調査により、右前と左前乳房、右後と左後乳房では測定した項目 (乳槽断面積、乳槽輝度、乳槽最大幅、乳槽の深さ、乳槽の乳頭近位幅、乳房実質輝度) に有意差は認められなかった。乳房の発生、成長過程では前乳区と後乳区に分けられて発育するため、数値的に計測しても左右で有意差がでなかったと考えられる (図 5 ~ 1 0)。

乳槽輝度は、各泌乳ステージの前乳房と後乳房において有意差は認められなかった (図 1 2)。エコー画像は物質に反射した超音波を利用して結像しており、反射された超音波が多いと輝度が高くなる性質のため、実質臓器のように密度の高いものでは輝度が高く、液体のように密度が薄いものは輝度が低くなることが知られている [1]。健常乳房では各泌乳ステージ間で乳槽内に貯留している生乳成分に大きな違いがないため、前後の乳房で乳槽輝度に差は認められなかったと考えられる。乳槽断面積は最盛期でのみ後乳房が有意に大きいと認められたが (図 1 1)、初期・中期・後期でも同様の傾向が見られた。これらは前乳区よりも後乳区が大きいとの報告と一致する [2]。乳区の大きさに比例して乳槽も大きくなると推察される。また、乳槽最大幅・乳槽の乳頭近位幅は各泌乳ステージの前後乳房

において有意差はなく(図13、15)、乳槽の深さは初期・最盛期・後期で後乳房が有意に深く、中期でも同様の傾向が認められた(図14)。乳槽最大幅・乳槽の乳頭近位幅・乳槽の深さの結果から、乳槽断面積は前乳房に比べて後乳房が大きい傾向にあるが、それは、横幅が大きくなるのではなく、乳槽が深くなって生乳をより多く貯留すると推察される。乳槽断面積・乳槽最大幅・乳槽の乳頭近位幅・乳槽の深さは右前と左前乳房、右後と左後乳房において各泌乳ステージ間で有意差がなかった。このことから、乳槽のサイズはその産次の初期から後期にかけて変わらないと考えられる。乳房実質輝度は各泌乳ステージで後乳房が有意に高かった(図16)。泉は生乳の大部分は乳房実質に溜まると報告しており[3]、また、Flockらは乳汁の充足度によって乳房実質の輝度が決まると報告している[5]。このことから、後乳房実質の輝度が前乳房と比較して高いのは、後乳房の生乳生産が多いためと推察される。

以上より、産業動物臨床現場で用いられる繁殖用エコーを用いて乳房内構造物を確認することができた。今回は乳房炎の比較対象となる健常乳房のエコー画像所見について検討したが、今後はこれを基礎として乳房炎発生時乳房エコー画像の調査を実施していく。

参考文献

- [1] Frances Barr, Lorrie Gaschen: 犬と猫の超音波診断マニュアル, 滝口満喜訳, 2-3, 学窓社, 東京(2013)
- [2] 古村圭子, 柏村文朗, 松井基純, 堂腰顕, 宮竹史仁, 梅津一考, 瀬尾哲也, 木田克弥, 藤澤義美, 増田豊, 乳牛管理の基礎と応用, 柏村文朗, 古村圭子, 増子孝義, 2012改訂版, 91, デーリィ・ジャパン社, 東京(2012)
- [3] 泉賢一, 泌乳と搾乳の生理, 酪農ジャーナル電子版(2018)
- [4] 河合一洋, 岩野英知, 臼井優, 篠塚泰典, 林智人, 樋口豪紀, 牛乳房炎抗菌剤治療ハンドブック, 16-17(2018)
- [5] M. Flöck, P. Winter, Diagnostic ultrasonography in cattle with diseases of the mammary gland, The Veterinary Journal, 171, 314-321 (2006)
- [6] Sebastien Buczinski: 牛疾病の超音波診断ガイドブック, 田口清訳, 124-141, 緑書房, 東京(2015)
- [7] 鈴木直樹, 原口麻子, 黒瀬智泰, 金子宗平, 竹内泰造, 向井裕次郎, 神岡康博, 中谷啓二, 乳牛における臨床型乳房炎と健常乳房炎の超音波画像, 家畜診療, 65, 301-308(2018)

14 中小家畜研究センターで飼養する実験用ミニブタの CSF ワクチン接種と 免疫付与状況について

畜産技術研究所中小家畜研究センター
○塩谷 聡子、大竹 正剛

要 約

2019年11月、中小家畜研究センターでは家畜伝染病予防法第6条に基づき、豚熱の予防的ワクチン接種を実施した。その後の免疫付与状況確認検査において家畜保健衛生所から実験用ミニブタで集団の抗体陽性率が低いことを指摘された。そこで、ワクチンの追加接種を実施し、その後の抗体検査のモニタリングを行った。ワクチン接種は、一斉接種及び追加接種を含めて計3回実施し、接種40～44日後に採取した血液を材料として、豚コレラエライザキットⅡを用いて検査した。1回目ワクチン接種後の抗体検査(n=115)では、陽性37.4%、疑陽性16.5%、陰性46.1%であった。2回目の調査(n=115)では、陽性73.0%、疑陽性5.2%、陰性21.7%であった。3回目の調査(n=17)では、陽性17.6%、疑陽性17.6%、陰性64.7%であった。この結果、3回目の接種により集団の陽性率は86.1%に上昇した。

はじめに

畜産技術研究所中小家畜研究センター（以下、「センター」という）では、開場以来 SPF 環境を30年以上維持しており、2008年から、実験用ミニブタ（以下、「ミニブタ」という）の研究も行っている[6]。当センターのミニブタは、富士マイクラ（株）が生産・販売しているマイクロミニピッグ®（以下、「MMP」という）[4]で、帝王切開、体細胞クローン技術[1]により導入、生産し、実験豚エリア（図1）の2棟の畜舎で飼養管理している。



図1 中小家畜研究センター

当センターでは、家畜伝染病予防法第6条に基づき、豚熱（以下、「CSF」という）の予防的

ワクチン接種を2019年11月6日に実施した。その後、西部家畜保健衛生所の抗体検査において、ミニブタのみ陽性率が著しく低いことを指摘された。

そこで、当センターのすべてのミニブタを対象に、ワクチンの追加接種を実施するとともに、抗体検査のモニタリングを行ったところ一定の成果が得られたため報告する。

材料と方法

1) 対象動物

対象は、ミニブタ115頭（月齢：1.2～139.5ヶ月齢、性別：雄47頭、雌68頭）とした（図2、3）。



図2 ミニブタ

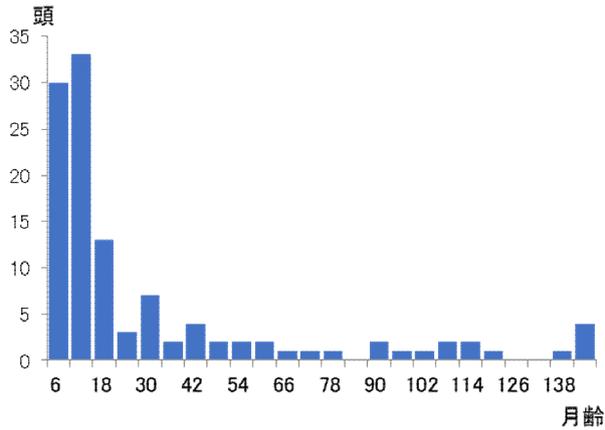


図3 ミニブタの月齢

2) CSF ワクチン接種と抗体検査

ワクチン接種は、計3回実施した。一斉及び2回目は115頭全てに接種した。3回目は2回目接種後の抗体検査において陰性または疑陽性と判定された31頭中、試験終了により鑑定殺した14頭を除く17頭に接種した。ワクチンの接種方法は、定法に基づき実施した。

抗体検査は、それぞれのワクチン接種40~44日後(図4)に、頸静脈もしくは前大静脈洞より採取した血清中の抗ワクチン抗体を豚コレラエライザキットII(JNC(株))を用いて検査し、S/P比が0.10以上を陽性、0.05以上0.10未満を疑陽性、0.05未満を陰性と判定した。

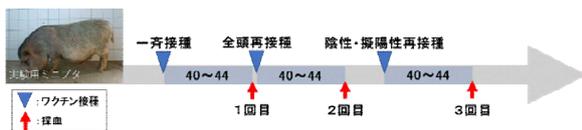


図4 ワクチン接種と採血時期

3) S/P比と形質情報との関係解析

S/P比と形質情報(月齢、性別)の相関関係を解析した。

成績

1回目ワクチン接種後の抗体検査では、陽性37.4%(43/115)、疑陽性16.5%(19/115)、陰性46.1%(53/115)であった。2回目の検査では、陽性73.0%(84/115)、疑陽性5.2%(6/115)、陰性21.7%(25/115)であり、1回目と比較して集団の陽性率が上昇した。3回目の検査では、陽性17.6%(3/17)、疑陽性17.6%(3/17)、陰性64.7%(11/17)となった。この結果、2回目・

3回目陽性個体を併せて集団の陽性率は86.1%(87/101)に上昇した(表1)。

表1 抗体検査の推移

抗体検査	検査頭数	陽性	疑陽性	陰性
1回目	115	43(37.4%)	19(16.5%)	53(46.1%)
2回目	115	84(73.0%)	6(5.2%)	25(21.7%)
3回目	17	3(17.6%)	3(17.6%)	11(64.7%)

1回目の検査で陽性でなかった72頭(疑陽性19頭、陰性53頭)について、2回目の検査では半数以上が陽転した(陽性59.7%(43/72)、疑陽性6.9%(5/72)、陰性33.3%(24/72))。2回目検査で陽性でなかった17頭(2回目で陰転した2頭を含む、疑陽性6頭、陰性25頭から、試験終了により鑑定殺した14頭を除いた疑陽性4頭、陰性13頭)は、3回目の検査では、2回目ワクチン接種ほどの陽転効果は得られなかった(陽性17.6%(3/17)、疑陽性17.6%(3/17)、陰性64.7%(11/17))(表2)。

表2 陽性でなかった個体の抗体検査の推移

抗体検査	検査頭数	陽性	疑陽性	陰性
1回目	72	-	19(26.4%)	53(73.6%)
2回目	72	43(59.7%)	5(6.9%)	24(33.3%)
3回目	17	3(17.6%)	3(17.6%)	11(64.7%)

1回目の検査での結果別に、その後のワクチン接種によるS/P比の変化を見た(図5)。陰性だった53頭のうち24頭が2回目で陽転した。疑陽性だった19頭は2回目で全ての個体が陽転した。陽性だった43頭のうち2回目で2頭が陰転した(疑陽性1頭、陰性1頭)。

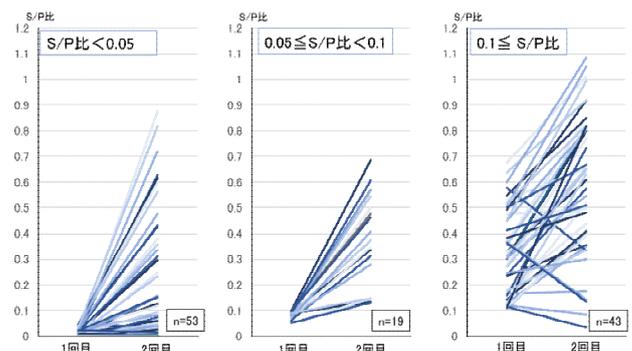


図5 S/P比の推移

S/P 比と形質情報の関係解析を行った結果、月齢との間に負の相関が認められた。性別との間に相関は認められなかった（表 3）。

形質1	形質2	相関係数
1回目S/P比	月齢	-0.31
	性別	0.12
2回目S/P比	月齢	-0.35
	性別	0.20

表 3 S/P 比と形質情報の相関

S/P 比と月齢の散布図から、ミニブタの S/P 比は、月齢が高くなる程上がりにくい傾向が認められた。また 2 回目ワクチン接種後の調査では 1 回目よりも全体の基線が上昇していることが明らかになった（図 6）。

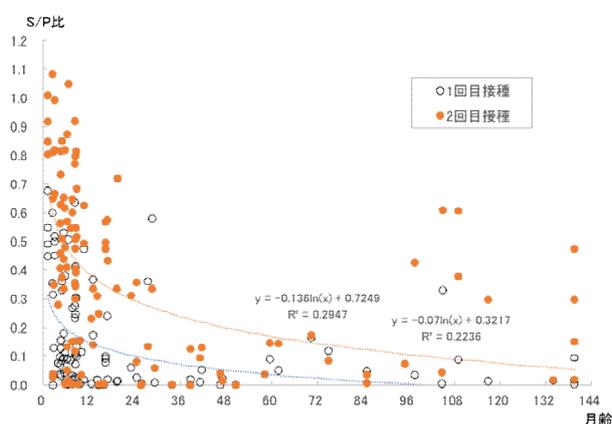


図 6 S/P 比と月齢との関係

考 察

現在使用されている CSF ワクチンは、過去の CSF 撲滅で使用されたワクチンであり [8]、今回の一斉接種後に実施された抗体検査でも、検査した県内のブタの 95% が抗体陽性であった（検査頭数 3059 頭、陽性 2898 頭（95%）、陰性 161 頭（5%）、静岡県 CSF 防疫対策本部第 4 回本部員会議資料より）。一方、同検査における当センターのミニブタは、抗体陽性率が 40% に満たなかった。ワクチン抗体価については、ワクチンの接種方法、飼養環境及び品種等の要因が影響するとの報告がある [2]。今回、接種方法に関しては、添付資料の用法用量に基づいて実施しており、原因としては低いと考えられた。飼養環境に関しては、当センターは SPF 環境であることから飼育ストレスや免疫低下を引き起

こす病原体の罹患はなく、否定できると考えられた。品種に関しては、当センターのミニブタは MMP または MMP と中国豚である金華豚 [5] の交雑種 [7] であり、共にアジア系の豚という特徴がある。現在日本で飼養されている豚の大半が、大ヨークシャー、ランドレース、デュロック等の西洋種やこれらの交雑により生産された交雑種であること [3] から、系統の違いが影響した可能性が考えられた。

当センターのミニブタ集団は、2 回目の接種後に集団陽性率は 70% 以上に到達し、3 回目の接種と淘汰により最終的には 80% 以上の免疫付与を獲得できた。また、ワクチン接種後の S/P 比は、月齢と負の相関があり、月齢が高くなる程上がりにくい傾向にあること、1 回目の接種後に S/P 比の低い個体も 2 回目の接種後に上昇する個体が多いことが明らかになった。2 回目以降検査の陽性個体の増加の原因は、① 2 回目の追加接種により免疫付与が増強された可能性、② ミニブタではワクチン効果の発現が遅く、1 回目のワクチン接種の効果が時間をおいて効果を及ぼした可能性等が考えられたが不明であった。ただし、今回の結果から、家畜防疫上、月齢の高いミニブタは、2 回以上のワクチン接種が必要であると考えられた。

参考文献

- [1] Enya S, Kawarasaki T, Otake M, Kangawa A, Uenishi H, Mikawa S, Nishimura T, Kuwahawa Y, Shibata M: Preservation and Reproduction of Microminipigs by Cloning Technology, In Vivo, 09-10;30(5), 617-22 (2016)
- [2] 本川賢司: Journal of Japanese Society for Clinical Infectious Disease in Farm Animals Vol.4 No.2, 39-47 (2009)
- [3] 一般社団法人日本養豚協会: 2019 年度養豚農業実態調査報告書, 令和 2 年 3 月
- [4] Naoki Kaneko, Katuhiko Itoh, Atsushi Sugiyama, and Yasukatsu Izumi: Microminipig, a Non-rodent Experimental Animal Optimized for Life Science Research, J Pharmacol Sci., 115, 112-114 (2011)
- [5] 丹羽太左衛門: 養豚ハンドブック, 丹羽太左衛門編, 第 1 版, 29-41, (株)養賢堂, 東

京都 (1994)

- [6] 大竹正剛：オベリスク、Vol. 21, 1 January 3-9 (2016)
- [7] 柴田昌利, 塩谷聡子, 大津雪子, 河原崎達雄：戻し交配による GFP ミニブタの開発, 静岡県畜産技術研究所 中小家畜研究センター研究報告 第 6 号, 7-10 (2013)
- [8] 清水悠紀臣：日本における豚コレラの撲滅, 動物衛生研究所研究報告 第 119 号, 1-9 (2013)

15 CRISPR/Cas9 システムによる筋ジストロフィー疾患モデルマイクロミニピッグの作出

畜産技術研究所中小家畜研究センター
○大竹 正剛、塩谷 聡子

要 約

ゲノム編集技術が確立されて以降、遺伝子改変が困難であったブタにおいてもノックアウト動物の作出が報告されてきた。実験用ブタの中でもマイクロミニピッグは、6 カ月齢時の体重が 10kg 程度であり、他のミニブタより小型で取り扱いやすい特徴を持つ。そこでマイクロミニピッグを素材として、CRISPR/Cas9 システムによりジストロフィン遺伝子を欠損させた疾患モデルミニブタの作出を試みた。ジストロフィン遺伝子のエクソン 23 を機能不全にすべく、プラスミド構築し DSB-HDR アッセイの評価にて標的配列を決定した。次にマイクロミニピッグの受精卵を採取し、標的配列を有する sgRNA と Cas9 蛋白をマイクロインジェクション法にて導入後、発情同期化した家畜ブタに移植し産子 (F0) を得た。F0 は 5 頭得られ、うち 4 頭で標的配列に 11 塩基欠損が確認されたが全てモザイクであった。このうち精液中に変異が確認された F0 オスを WT メスに交配して F1 メスを得て、さらに変異を有する F1 メス 5 頭を WT と交配して変異を有した F2 オスを 4 頭得た。得られた F2 オスは、筋ジストロフィーの臨床症状を呈し、骨格筋にも特有の病変を認めた。以上から、CRISPR/Cas9 システムによりジストロフィン遺伝子を欠損させたマイクロミニピッグを得ることができた。また、変異がモザイクであっても有性生殖により疾患モデルを得ることが可能であると考えられた。

はじめに

ブタは解剖学的、生理学的にヒトと類似していることから、医薬品・医療機器評価等の分野で利用されており、今後はイヌやサルの変換としての使用や再生医療の分野での活用が見込まれている。マイクロミニピッグ[®] (以下、「MMP」という) は富士マイクラ (株) が生産販売する実験用ミニブタで、6 カ月齢時の体重が約 10 kg と一般的な実験用ミニブタが同じ月齢で 15~20 kg であるのと比較し、非常に小型であるのが特徴である。小型であることは、取り扱いやすい点で有用であるのに加え、長期に飼育して観察が可能である点で有利である。このため MMP は、医学研究や医薬品評価に関する研究において利用されている [5-7, 14]。

一方、ヒトの難治性疾患の新しい治療方法の確立には疾患モデル動物が不可欠であり、ブタにおいてもこれまで遺伝子組み換え技術を用いて疾患モデルが作出されている [8] が、ES 細胞が樹立されていないブタでは主に体細胞クローン技術を用いる必要があり、その作出効率は低かった [13]。しかし最近では CRISPR/Cas9 システムをはじめとした遺伝子編集技術が応

用されており、マウスでは遺伝子組み換え動物を作る方法 [10] の主流となりつつある。ブタにおいても遺伝子編集技術の 1 つである ZFN (Zinc Finger Nuclease) や CRISPR/Cas9 システムにより疾患モデルが作出されてきた [15, 16]。しかし、これまでミニブタにより作出されたことはない。

そこで今回、MMP を素材として CRISPR/Cas9 システムを用いてジストロフィン遺伝子を欠損させた筋ジストロフィー疾患モデル動物の作出を試みた。

材料と方法

1) 遺伝子編集の標的配列の設定

ジストロフィン遺伝子 (X 染色体 79 エクソン) をノックアウトすべく、標的配列を探索した。専用探索ソフト CRISPRdirect (<https://crispr.dbcls.jp/>) を用いてエクソン 23 上の PAM 配列 (CGG) から上流約 20mer を選択し、2 種のプラスミド (①標的配列を挿入 CRISPR/Cas9 システム用オールインワンベクター; pX330 及び②エクソン 23 の標的遺伝子周囲を PCR で増幅し MCS (multicloning

site)に挿入したDSB-HDR(double-strand break - Homology-directed repair)アッセイ用レポータープラスミド;pCAG-EGxxFP)を構築した。MMPの体細胞に2つのプラスミドを共移入し、GFP(green fluorescent protein)の発現から標的遺伝子の切断効果を確認し、効果の高い配列を決定した。

2) 遺伝子編集ブタと後代産子の作出

供試動物は、8カ月齢以上で発情周期が明瞭なメスのMMP(3頭)及びデュロック種(3頭)を用いた。発情確認9-12日後にエストラジオール(E2)を筋肉内投与して偽妊娠を誘導し、投与20-35日後にPGF2 α 、PMSG(妊馬血清性性腺刺激ホルモン)及びhCG(ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン)を投与し、発情同期化及び過剰排卵処置を行った。MMPは、hCG投与30時間後に自然交配し、49時間後に安楽殺し卵管から受精卵を回収した。マイクロマニピレーターを用いて、1)で設定した標的配列を有するsgRNA(25ng/ μ L)とCas9蛋白(25ng/ μ L)を回収した受精卵にPXM培地地下で10 μ L共導入した。導入後、発情同期化した家畜豚のうち最も明瞭な発情を呈した1頭に観血法にて胚移植した。

また、得られた産子(F0)のうち変異を有するF0オスを野生型(WT)メスに交配して、後代産子(F1)を得た。さらに変異を有するF1メスをWTオスで交配して、後代産子(F2)を得た。産子(F0、F1、F2)は、標的遺伝子の変異の導入効果を評価した。

3) 標的遺伝子の変異の評価

得られた産子(F0、F1、F2)の各組織からDNAを抽出し、ダイレクトシーケンス法により標的遺伝子の塩基配列を決定した。

遺伝子に変異が認められたF2オス1頭について、採血し血清クレアチニンキナーゼ活性を測定した。また骨格筋について組織標本(ヘマトキシリン・エオシン染色及び抗ジストロフィン抗体を用いた免疫染色)を作製し、病変を評価した。またタンパク質評価として、ウエスタンブロット法にてジストロフィン発現解析を行った。

なお、本研究は静岡県畜産技術研究所中小家畜研究センター動物実験委員会の承認のもと実施した。

成績

1) 遺伝子編集ブタと後代産子の作出

切断効果を確認した結果、図1の配列に決定した。PAM配列と標的配列を含むsgRNAとCas9蛋白を30個のMMPの受精卵に注入したところ、5頭の産子(F0)が得られた。

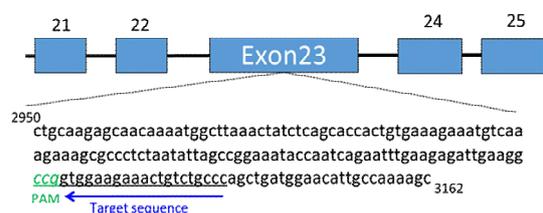


図1 ジストロフィン遺伝子と標的配列

F0の遺伝子解析を行ったところ、うち4頭は標的配列を中心に11塩基の欠損が認められた(表2)が、全ての個体で体内に変異と正常な遺伝子配列がモザイク状に混在していた。このうち1頭(図2;F0-04)で精液中に変異が確認されたことから、WTと交配して後代産子(F1、F2)を作出した(表2)。F1では、メス11頭中10頭で標的配列に変異を認め、F2ではオス7頭中4頭で変異が確認された。

表1 F0で認められた遺伝子変異

INDEL	塩基配列
WT	tttgaagagattgaaggccggtg/gaagaaactgtctgccagctgat
-11	tttgaagagattgaa-----/---gaaactgtctgccagctgat

上段: 野生型(WT)の遺伝子配列

下段: 認められた変異(11塩基欠損)

緑: PAM配列/赤: 切断位置/青: 欠損配列



図2 精液中に変異を認めたF0ブタ(F0-04)

表2 後代産子(F1、F2)ブタの作出成績

作出世代	種オス	種メス	受胎頭数	産子数(%) ^{a)}				変異配列
				オス		メス		
			頭数	うち変異	頭数	うち変異		
F1	1 (F0-4モザイク)	5 (WT)	5	17 6 (0.0)	0 (0.0)	11 10 (90.9)	-11	
F2	1 (WT)	5 (F1キャリア)	5	9 7 (57.1)	4 (57.1)	2 0 (0.0)	-11	

2) 得られた産子(F2)の評価

標的配列に変異が認められた F2(図 3)は、一般行動は鈍重な行動を呈す運動不耐性で、食餌行動は緩慢で嚥下障害による嘔吐を呈した。



図 3 ジストロフィンに変異を有する F2 (筋ジストロフィーブタ)

血清クレアチニンキナーゼ活性は、WT(1.1U/ml)に比較して著しい高値(160.9U/ml)を示した。3ヵ月齢の F2 ブタのウェスタンブロットおよび免疫染色標本では、骨格筋でジストロフィンの発現は認められなかった(図 4)。同様に病理組織標本では、筋線維の崩壊像(変性、壊死、大小不同)、マクロファージによる変性・壊死筋線維の像、再生筋線維像が認められた(図 5)。ただし心筋では病変は確認されなかった。

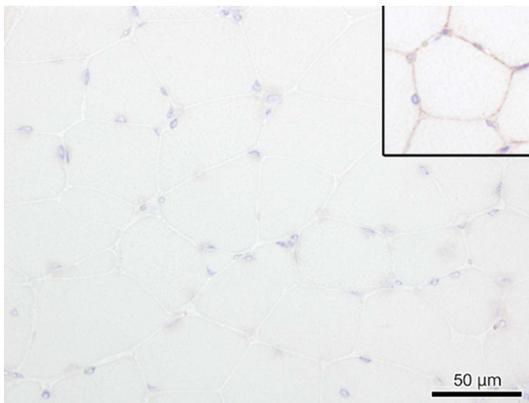


図 4 F2 ブタの抗ジストロフィン免疫染色像 (挿入: WT)

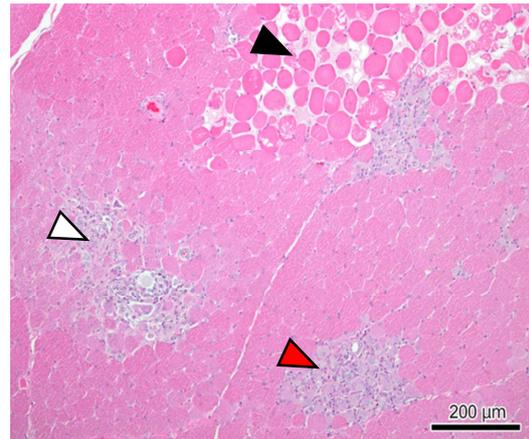


図 5 骨格筋の病変組織像(HE 染色)

(黒矢印: 筋線維の変性、壊死、大小不同/赤矢印: Mφによる変性・壊死筋線維の貪食/白矢印: 再生筋線維)

考察

指定難病である筋ジストロフィーは、骨格筋の壊死・再生を主病変とする遺伝性筋疾患の総称である[3]。様々な病型があるが、代表的なデュシェンヌ型筋ジストロフィー(以下「DMD」という)は、男性の3,500-6,000人に1人に認められる。本病はX染色体に位置するジストロフィン遺伝子の異常により骨格筋が機能不全に陥り、連続的に壊死と再生を繰り返すことで筋萎縮や筋肉が脂肪・線維化し、根治不能な疾患である[11]。DMDの新しい治療研究には疾患モデル動物が不可欠であり、マウスやイヌをはじめとして様々な動物で作出されている。[8, 12]。マウスには、エクソン23の点変異でノックアウトされたmdxマウス、イヌにはイントロン6の影響によるゴールデンレトリバー(CXMD)が挙げられる[2]。しかし、mdxマウスは維持が容易である一方で症状が軽いためヒトの外挿性に乏しく、イヌは症状が個体毎にばらつく課題があげられる[1]。ブタは解剖学・生理学的特徴がヒトに近く、特にMMPは他のミニブタに比べて格段に小さくハンドリングや飼育試験に有効な動物種であることから、今回CRISPR/Cas9システムを用いて筋ジストロフィー疾患モデルの作出を試みた。

作出されたF0ブタは、変異がモザイクのみであったが、精液中に変異が認められたF0をWTに交配することでF1メスを効率的に作出でき、全身に変異を有するF2オスブタを作出することができた。F2ブタは、ヒトの筋ジストロフィーと同様の臨床症状を呈すとともに血清

クレアチニンキナーゼ活性は著しい高値を示した。さらに免疫学的評価によってジストロフィンの欠損が確認され、骨格筋で筋肉の崩壊、マクロファージによる貪食、筋再生像が確認された。これらはDMD特有の症状であり、本動物の疾患モデルとしての有用性が示唆された。ただしヒトの死因の一つである心筋の病変[4]は認められなかったことから、今後前臨床に用いられるべく、さらなる評価が必要と考えられる。また得られたF0ブタがモザイクであっても、配偶子に変異が認められれば有性生殖を介することで疾患モデルを得ることが可能であると考えられた。

以上のことから、CRISPR/Cas9システムによりジストロフィン遺伝子を欠損させたMMPを得ることに成功した。本成果は、九州大学医学研究院小野教授との共同研究において得られた。

参考文献

- [1] Banks GB, Chamberlain, JS: *Curr. Top Dev. Biol.*, 84:431-453(2008)
- [2] Hilton D: *Neurobiol.*, 33:481-482(2007)
- [3] Hoffman EP, Brown RH: *Cell*, 51:919-928(1987)
- [4] Judge DP, Kass D et al: *Am. J. Cardiovasc. Drugs*, 11:287-294(2011)
- [5] Kaneko N, Itoh K et al: *J. Pharmacol. Sci.*, 115:112-114(2011)
- [6] Kawaguchi H, Miyoshi N et al: *J. Pharmacol. Sci.*, 115:115-121(2011)
- [7] Kawaguchi H, Yamada T et al: *J. Atheroscler. Thromb.*, 21:186-203(2014)
- [8] Klymiuk N, Blutke A et al: *Hum. Mol. Genet.*, 22:4368-4382(2013)
- [9] Lim KRQ, Nguyen Q: *Genes(Basel)*, 11(2020)
- [10] Mashiko D, Fujihara Y et al: *Sci. Rep.*, 3:3355(2013)
- [11] Mah JK, Korngut L, et al: *Neuromuscul. Disord.*, 24:482-491(2014)
- [12] Nakamura A, Takeda J: *Biomed. Biotechnol.*, 184393(2011)
- [13] Onishi A: *Cloning Stem Cells.*, 4:253-259(2002)
- [14] Sugiyama A, Nakamura Y et al: *J. Pharmacol. Sci.*, 115:122-126(2011)
- [15] Tanihara F, Takemoto T et al: *Sci Adv.*

2016 Sep; 2(9): e1600803.

- [16] Umeyama K, Watanabe K et al: *Sci Rep.* 6: 24413(2016)