

SLA (ブタ MHC) 純系ミニブタの作成

丸野弘幸・福永智明・加治佐修・平山愛和・小村喜久男・犬童政昭 (鹿児島県畜産試験場)

Hiroyuki MARUNO, Tomoaki FUKUNAGA, Osamu KAJISA, Narukazu HIRAYAMA,
Kikuo KOMURA and Masaaki INUDO: Fixation of SLA in miniature Pig.

ブタが人間と生理およ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^{3),5)}。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。

1. 材料およびその由来

(1) NIH ミニブタ⁶⁾: 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。

(2) クラウンミニ⁴⁾: 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。

(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) を導入した。旧満州在来の東北民猪の荷包猪に起源をもち、繁殖性および肉質に優れている。

2. 方法

(1) trypan blue cytotoxicity test

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。

(2) mixed lymphocyte culture: MLC

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、このよう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、³H-T hymidine の取り込みを比較した stimulation index により判定した。

(3) 遺伝子解析

① Southern blotting

SLA-DR¹⁾ をプローブとしたサザン法で行った。

② RT-PCR²⁾

頸静脈から EDTA 添加試験管で全血液を採取後、白血球からの total RNA の抽出を図った。プライマーは、現在まで報告されている cDNA の塩基配列をもとに Antigen recognition 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。

3. 結果

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 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と考えられる。

Table 1 Pig MLC

stimulator responder	K41	OM4-5	CO1	CO4	CO5	CO6
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)
CO1	220±149 (3)	124±33 (2)	74±43 (1)	62±11 (0.8)	75±1 (1)	191±104 (3)
CO4	1442±312 (7)	4731±944 (22)	123±53 (0.6)	215±62 (1)	5453±428 (25)	8012±1087 (37)
CO5	1561±1012 (7)	395±48 (2)	53±20 (0.2)	91±89 (0.4)	224±25 (1)	158±42 (0.7)
CO6	3151±403 (14)	124±72 (0.5)	332±203 (1.5)	640±295 (3)	279±50 (1.2)	226±124 (1)

(): stimulation indices

引用文献

- 1) Kenth Gustafsson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 87. pp. 9798-9802, December 1990.
- 2) Masanori KOMATSU, anim. Sci. Technol. (Jpn.) 67 (2): 211-217.
- 3) 丸野弘幸: FEEDING. 2月号, チクサン出版 東京, 1995.
- 4) 中西喜彦: 日豚会誌 第28巻 第3号 1991.
- 5) Ryozo KAMIMURA, Exp. Anim. 45(2): 149-153, 1996.
- 6) Sachs, D. H., Transplantation. 22: 559-567, 1976.