

平成11年度厚生科学特別研究事業

クローン技術を利用した動物性食品の安全性について

中間報告書

主任研究者

熊谷 進

## 目 次

家畜繁殖技術の歴史的展開 - 人工授精から体細胞クローンに至るまで - 居在家義昭 (農林水産省畜産試験場)	1
核の初期化と発生異常 角田幸雄 (近畿大学農学部)	23
クローンウシの生理学的正常性の検査項目 入谷 明 (近畿大学生物理工学部)	25
クローン動物の整理・機能 入谷 明 (近畿大学生物理工学部)	27
ミトコンドリアが置換されているクローン牛の食品としての安全性 今井 裕 (京都大学農学部) 山内一也 ( (財) 日本生物化学研究所)	29
まとめ 熊谷 進 (東京大学大学院生命科学研究科)	38

# 家畜繁殖技術研究の歴史的展開 人工授精から体細胞クローンに至るまで

## 緒 論

1997年2月27日付のNature誌に、体細胞の核移植によって子羊が得られたことがWilm utら (Wilm ut et al.,1997) によって報告されて以来、クローン研究が多くのマスメディアによって報道され、多大な関心を集めている。この成果は、発生分化や発生生化学などの純粋基礎学問的領域からではなく、応用学的分野に属する繁殖生理や発生工学的方法の開発を主目的とする家畜繁殖分野からのものであることは特筆に値するものである。

人類は長い時間をかけて野生動物を家畜として馴化させてきた。その多くは餌付けから始まり、徐々に人為的な制御によって、人類の生存性に貢献する生産物を効率的に得るという方向に展開してきた(野澤、1975)。

家畜としての動物、それは人類が生存する上で利用されるべきものであり、愛玩動物とは根本的に異なるものである。しかし、家畜であっても、家畜の研究においては、生命の根元を取り扱うという敬虔な研究姿勢が求められることは自明であり、そのために、多くの研究機関では実験動物指針、動物福祉の遵守、実験計画や結果についてのヒアリングなどの規定を設けており、動物に不必要な苦痛を与えることや、根拠のない不必要な実験などを禁じている。また、学会誌などでも、当該機関の実験動物指針の認可を受けていない論文は受け付けられない状況にある。

これまでの畜産の研究は、その折々に報道されることはあっても、極めて単発的であり、研究の進歩と畜産(家畜飼養)現場の歩みを的確にとらえているようなものではなかった。さらに、国土の都市化が進むにつれて、いわゆる畜産公害などにより、畜産の現場は都市部から撤退を余儀なくされている状況にある。そのため、都市住民の大部分は畜産の現場を目にすることも皆無に近くなり、食材としてしか家畜生産物を理解できなくなってきた。すなわち情報のかい離現象により、食材としての乳肉生産物に多大な注目はしても、その生産物を生み出す家畜やその周辺技術そのものに注意を払うことはほとんどと言って良いほど気にかけることもなく、畜産の基礎となる試験研究にしても重要な関心事項となるものでもなかった。一方、試験研究機関においても積極的に情報を開示して、一般的な世に問うこともなかったと言える反省点はある。

大学や国公立の試験研究機関さらには民間研究機関で展開している家畜繁殖技術研究の最大の目標は、優良な遺伝形質を有する個体あるいは系統を効率的に増殖させる技術を開発し、食糧供給の安定化を果たすことにある。わが国における科学的な家畜繁殖の研究は、1950年に施行された家畜改良増殖法をきっかけとして、凍結精液による人工授精、胚移植、体外受精等を経て受精卵クローンや体細胞クローンへと進展してきた。

本稿では、牛を中心とする代表的な家畜繁殖技術研究の歴史的な展開と技術手法を解説することにより、体細胞クローン家畜の安全性に関して指標となることを主眼とするものである。

### 凍結精液による人工授精の歴史的展開

わが国において牛の人工授精は昭和初期に畜産試験場で結核予防の目的で試みられたのは始まりである。その後、授精用精液は次第に液状精液(射出精液を溶液で数倍に希釈したもの)から凍結精液に変わり、今日に至っている。

家畜の精液の体外保存技術は、20世紀のはじめにソ連のイワノフ(1907)によって、人工授精の理論を家畜の改良増殖の手段として用いることが可能であることが、実験的基礎の上に立って提唱された時代までさかのぼることができる。当時の精液採取の方法は交配時に雌畜の膈内に海綿を入れて、その海綿から精液を絞り出すという原始的な方法で、希釈液も生理的食塩水といった単純な液で精液を薄めるだけであった。そのため、保存しても数時間から10数時間までであった。

1940年にPhillips & Lardyによって、精液の保存に鶏卵の卵黄が有効であることが発見され、卵黄リン酸緩衝液が作出された。このことによって牛精子の体外での受精能保持時間は10数時間から、3～4日に延長された。また、卵黄は精子を低温感作から保護する作用があるので、4～5 まで冷却して精子の運動性を抑制することにより、その保持日数は7～10日間まで延長した。Salisbury(1941)はリン酸緩衝液の代わりにクエン酸ナトリウムを用いた卵黄クエン酸ソーダ液、いわゆる卵ク液を開発した。

この卵ク液はリン酸緩衝液よりも精子の生存性が優れていたため、以来、卵ク液が広く使われるようになった。

精液の保存技術における第二の革命は、イギリスにおけグリセリンの凍害防止効果の発見であり、Polge & Rowson (1952) が凍結精液の授精により牛で受胎例を得たことである。彼らは38頭の雌牛に授精して79%の受胎例を得た。ドライアイスアルコール(-79 )による凍結方法は、その後液体窒素による急速凍結及び-196 保存法の確立によって牛精子の保存は半永久的と考えられるようになった。

#### 1. 牛精液の凍結保存法

牛の精液を凍結保存するには、牛精液凍結保存用第1次希釈液(ブドウ糖、乳糖、リン酸1カリウム、リン酸2ナトリウム、酒石酸カリナトリウム、クエン酸ナトリウム、卵黄)とその希釈液にグリセリンを加えた第2次希釈液を用いる。人工膈内に射精された牛精液を回収し、第1次希釈液で希望精子数の2倍に希釈する、その後第2次希釈液で等量に希釈し、0.5mlのプラスチックストローに希釈した精液を分注する。その後、液体窒素ガスで急速凍結、液体窒素中で保存する。雌牛に授精する際は、プラスチックストロー内に充填されている精液を微温湯で急速融解し、直ちに人工授精用の専用器具に装填して、雌畜の頸管深部に注入する。牛の1回射精あたりの精液量は平均6mlであり、精液1ml 中の

精子数は平均8億となっている。受精するに必要な精子数は約2千万であることから、1回射精あたりの平均として、 $6\text{ml} \times 8\text{億} \div 2\text{千万} = 240$ 、すなわち240頭の牛に授精できることとなる。通常の射精間隔は1週間間隔となっている。わが国の1回あたり授精の受胎率は約50～60%前後であり、飼養されているほぼ100%が凍結精液を用いた人工授精によって産子を得ている状況にある。

しかし、射精直後の牛の精子生存率は通常90～95%であるが、凍結することによって、その精子の生存率は10～15%低下する。

## 2. 人工授精の意義と得失

### (1) 雄牛の利用拡大と育種改良の促進

一般的に自然交配では1回の射精で1頭の雌を受胎させるにすぎない。しかし、人工授精では1回の射出精液を分配して数十頭あるいは数百頭の雌に授精することができる。したがって、人工授精では優良な種畜を極めて多数の雌に、しかも広範囲に交配することが可能となる。自然交配では1頭の雄に対する1か年の交配頭数は約50～100頭程度に過ぎない。しかし、人工授精では数千頭あるいは数万頭に増大できる。

この結果として、少数の雄牛を飼うことによって十分な繁殖の目的を達し得ることとなり、生産性の良くない雄は淘汰されて、優秀な種畜だけを繁殖に用いるために家畜の改良は著しく促進される。わが国では約260万頭いる繁殖牛に対して、雄牛は約2千頭程度になっている。乳量の増加や産肉性の向上は、人工授精の普及なくしては成立しえないものである。

### (2) 遺伝能力の早期判定

人工授精では雄の精液を短期間に多数の雌の交配できるので、雄の遺伝能力を自然交配に比べてかなり早くに判定することが可能である。そのため、優秀な能力を持つ雄牛の精液だけを繁殖に供用することができるので、家畜の改良を促進させることができる。また、凍結された精液は半永久的に保存することができるので、優秀な雄の精液を長期間にわたって用いることも可能となる。

### (3) 伝染性生殖器病の防止

伝染性の生殖器病としては流産細菌、トリコモナス、ビブリオ、ブルセラなどがあげられる。これらの伝染性疾患は自然交配によって伝搬し、不妊または流産のような繁殖障害の原因となる。このためにこうむる経済的損失は莫大なものとなっており、その治療や予防のための経費も無視できない。現在わが国では、これらの伝染性疾患の発生は極めて少なくなっているが、人工授精が普及していない国々では、大きな問題となっている。

### (4) 雄牛を取り扱う危険の低減

種雄牛の体重は1トン近い体重があり、その気質も激しいことから、飼養管理上の危険は大きい。現在でも、その取り扱いで怪我をすることも皆無ではない。また、交配においても、過去には雌牛を雄牛が飼養されているところまで引き連れて行っていた。この時間的な経費は無視できるものではない。

## (5) 凍結精液による損失

種雄牛によっては、精子の耐凍性が低く、液体窒素で凍結保存すると、授精に必要な生存精子が極めて少なくなる個体もある。このような個体は、その能力が以下に優れたものであっても、種雄牛として用いることが不可能となる問題点がある。

### 胚移植技術

#### 1. 胚移植の歴史的展開

人工授精の発達にともなって、優秀な遺伝形質を持つ雄畜の生産した精子を広範囲に配布して、多数の雌畜に授精できるようになり、雄の優れた遺伝形質を受け継いだ多数の子孫を生産することが可能となっている。一方、雌牛は本来単胎動物であり、また、平均280日の妊娠期間を有するために、優秀な形質を持つ雌牛であっても生涯に多くて8～10産しかできない。そのため、雌畜からの遺伝育種改良速度は雄畜と比較にならないほど遅いので、雌畜からの改良を目指して開発されたのが、受精卵(胚)移植技術である。受精卵移植とは雌畜(ドナー)に人為的な処置をして多数の受精卵を生産させ、その生殖器から着床前の受精卵を取り出し、他の雌畜(レシピエント)の生殖器に移して着床・妊娠・分娩させる技術である。胚移植は精液の凍結に比べて、高度な技術体系を要し、それは、ドナー牛の性腺刺激ホルモンによる過剰排卵処置、発情誘起、人工授精、胚回収と検査、レシピエント牛の発情同期化、胚移植などからなる。

哺乳動物で受精卵移植に成功したのはかなり古く、1890年に英国のHeapeがウサギを用いた初期胚の移植で4匹の産子を得たことに始まる。ウシでは、1951年に米国・コーレル大学のWillett(1951)が成功したのが最初であり、これを契機として各国で研究が行われた。しかし成功率は低く、1960年頃までは世界で数頭しか成功しなかった。この時期には開腹手術による採卵・移植が行われていた。しかし、1965年に農林水産省畜産試験場の杉江博士が世界で初めて非手術的方法による受精卵移植に成功し、応用・実用化に弾みがついた(Sugie, 1965)。

1970年代になると欧米では受精卵移植を業務とするベンチャー企業が多数誕生し、その後の全盛期を迎えるようになった。以下ウシを例にして受精卵移植技術についての述べる。

#### 2. 過剰排卵処置

受精卵移植を効率的に実施するためには、通常発情では1個しか排卵しない雌牛に、ホルモン製剤投与を行う過剰排卵処置によって、多数の正常胚を得ることが必要になる。ウシの発情周期は21日ごとに繰り返されるが、過剰排卵処置は通常、発情9～14日目の黄体最盛期に卵胞刺激ホルモン(FSH)を1日2回、3～4日間、漸減投与するのが通常である。投与量は品種によって若干異なり、黒毛和種では18～28AU(アーマー単位)、ホルスタイン種では30～50AU程度である。卵胞が発育してこない場合や片側の卵巣に20個以上の卵胞が発育する場合は、その投与量を増減させる必要がある。

FSH投与後3または4日目にプロスタグランジンF<sub>2</sub> を1日1～2回に分けて投与すると、黄体が急激に退行して、発情が認められるので、発情時に人工授精を行う。

受精卵は受精後4日間は卵管内に、6日目には子宮角先端部に存在する。受精卵の回収は通常、人工授精後7日目に行い、その時期の受精卵は胚盤胞期胚といわれる時期になっている。過剰排卵処置による1頭1処置あたりの平均採卵数は8個、平均正常卵数は5個となっている。正常胚以外としては、未受精卵子、胚の発育が停止しているもの、胚の割球細胞の大部分が変性しているものなどがあげられる。通常これらを一括して変性卵と呼び、移植しても産子を得ることはできない。

過剰排卵処置技術の問題は、1)過剰排卵処置に対する個体間差が非常に大きいこと、2)ホルモン剤による過剰排卵の反復処置によって卵巢の反応が低下し、過剰排卵処置は年に3～4回が限度であること、3)個体ごとの卵巢反応が予測不意可能であることなどが挙げられる。これらの問題解決に向けて多くのアプローチがなされているが、いまだに満足すべき結果は得られていない。しかし近年、膈内に挿入できる黄体ホルモン製剤が使用できるようになり、過剰排卵処置法にも応用されてきている。これまで、過剰排卵処置は発情周期中の黄体最盛期に開始し、プロスタグランジンF<sub>2</sub> で発情を誘起させて授精させる必要性があったことから、ドナー牛の性周期の把握、とくに発情日の特定に多くの労力が必要とされた。しかし、黄体ホルモン製剤法は発情周期に関係なく、12～15日間黄体ホルモン製剤1.9gを含む膈内挿入薬を挿入しておく、卵胞の発育・成熟が抑制される。製剤を除去すると卵胞発育抑制が解除されるため、2～4日以内に約85%のウシに発情が出現する。そのため、これまでの方法に比べて、過剰排卵処置を一定期間内に計画的に反復することが可能となってきた。

### 3. 受精卵の凍結保存

ドナー子宮から回収された受精卵は、直ちにレシピエントに移植する場合を除いて、凍結保存される。凍結保存法には、融解後の耐凍剤除去の仕方により、ステップワイズ法、ダイレクト法などがある。耐凍剤としては前者は10%グリセリン、後者は12%プロパンジオールまたは10%エチレングリコールを用いる。受精卵は耐凍剤に平衡させた後、0.25mlのプラスチックストロー内に挿入する。凍結はプログラムフリーザーを用いて行う。ステップワイズ法では室温から-5℃までは-1℃/分で低下させ、-5℃で10分間保持している間に植氷を行う。植氷は液体窒素で冷却したピンセットで、プラスチックストローの一端を挟むと小さな氷塊が形成され、その氷の部分がきわめて緩慢にプラスチックストロー全体に広がっていく事を指す。その後ストローは-0.3℃/分の割合で-30℃まで低下させ、直ちに液体窒素中に投入する。ダイレクト法での凍結は-7℃に直接ストローを投入して植氷を行わせ、その後の操作はステップワイズと同様である。融解は空気中で5秒前後保持後に、30℃の温湯に約1分浸して行う。ステップワイズではシャーレに受精卵を取り出して、徐々にグリセリンを除去するが、ダイレクト法では直ちにレシピエントに移植する。

ステップワイズ法の長所として耐凍剤除去時の浸透圧ショックが少なく、受精卵の破損

が少なく、生存性も高いことが挙げられる。しかし、受精卵を観察するための顕微鏡や無菌室などが必要になってくる。一方、ダイレクト法では耐凍剤除去の操作が不必要で直ちに移植でき、人工授精と同じような利便性から、凍結の主流となりつつある。しかし、融解後の受精卵の状態を観察しないことや移植に時間をとられると受精卵の生存性が急激に低下するなどの問題もある。

#### 4. 受精卵の移植

ドナーの子宮から取り出した受精卵をレシピエントの子宮内に移植することであり、通常は、専用の器具を用いた非手術的な方法により子宮内に移植する技術である。レシピエントに用いるウシは遺伝的能力に優れている必要性はない。しかし、繁殖性に異常が認められず、妊娠を阻害するような疾病を有していないことなどが求められる。受精卵を移植するに際し、ドナーとレシピエントの発情日の同期化が重要である。発情日が前後1日までの範囲なら受胎率に大きな影響はないとされているが、同じ日に発情している場合が最も受胎率も高い。受精卵が凍結されている場合は、発情周期に合わせて適宜移植を行えばよいが、多頭数を同時期に、あるいはドナーから採取した受精卵を直ちに移植する新鮮卵移植では発情周期の同期化が必要になってくる。発情の同期化にはプロスタグランジンF<sub>2</sub> を注射する方法と、黄体ホルモン製剤を膈内に挿入する方法があることは、過剰排卵処置法の項ですでに述べた。

#### 5. 利用の状況

受精卵移植は優秀な雌牛の子孫を短期間に多数生産する技術であり、雌牛からの改良を進め、低コストでの肉用牛・乳用牛の増産を可能にする。世界の主要40カ国をまとめた報告によれば、年間に延べ8.9万頭に過剰排卵処置を行い、47.8万個の受精卵が回収され、約41.3万頭のウシに移植されている。わが国では年間に1.1万頭のウシに過剰排卵処置を行い、4.5万頭に移植されて1.5万頭の産子が生産されている。この産子数は日本における全産子数の1%弱に相当する(Embryo transfer newsletter,1999)。

わが国の受精卵移植頭数はアメリカ、カナダについて世界第3位となっている。受精卵移植の実施機関数は約440カ所、受精卵移植従事者数は3千人を超えるほどになった。受胎率は凍結していない新鮮受精卵で50%、凍結したもので45%前後でここ数年来推移している。わが国の特徴としては諸外国の凍結受精卵の移植の割合が約50%であるのに対して、約80%と高いことである。これには飼養頭数規模が小さくて、発情周期が揃ったレシピエントを常に準備しておくことができないことも原因となっている。また、黒毛和種や乳用種の育種改良のための受精卵移植の割合が約32%であるのに対して、黒毛和種の受精卵を乳用種や交雑種に移植して、肉資源として特定品種を増産する技術としての68%も利用されていることは、世界的な見地からは特異的となっている。

しかし、近年は乳用牛の雌牛の遺伝的能力評価が開始され、ドナーの選定基準が明確になったことから、乳用牛の牛群改良を目的とした移植も増加傾向にある。スーパーカウをドナーとして生産された子牛は、雌ばかりでなく雄についても高価格で取り引きされて



いる。これらの雄子牛の多くは、次世代の候補種雄牛として利用される事が多い。現在、わが国の乳用牛候補種雄牛は約90%が受精卵移植産子で占められている。黒毛和種においても育種価の導入で、優秀な雌畜集団を受精卵移植によって造成する事業が伸展している。

## 6. 技術の将来性

卵子を巡る研究は急速な進展を見せており、卵子の体外成熟、体外受精ならびに体外発生系の確立は、受精卵移植にも新局面を与えた。それは経膈採卵法である。ウシの卵巢には通常、直径3～5mmの小卵胞が多数存在している。その小卵胞を卵巢の超音波画像を見ながら、専用の注射針で吸引採取する方法である。その小卵胞から採取した卵子を体外成熟、体外受精、体外発生させることにより受精卵を得ることができる。この方法で週2回のペースで数ヶ月間採卵できたとの報告や、妊娠していても採卵ができることなどから、従来の過剰排卵処置以上の受精卵が短期間で得られている。さらに、卵巢には多数の原始卵胞が存在しているが、その卵胞を体外で培養して、体外受精により産子を得ることも可能になってきている。本手法は確立されれば、一個の卵巢から数千頭の産子を得ることも可能になるであろう。

また、受精卵の一部の細胞を分離・採取して、PCR法により雌雄の性判別をすることはすでに実用化されているが、本手法は遺伝子診断をも可能とする。家畜においても遺伝病は少なくないことから、分子生物学的学問領域とともに進歩していくものと考えられる。

受精卵移植技術は、過剰排卵処置や受精卵の回収・移植などに難易の差はあるものの、ほとんどの家畜にとどまらずパンダなどの野生動物までおも、その範疇に入れることができるものとなっている。このため、本技術は家畜における育種改良のための手段として、今後とも重要な役割を果たしていくものと思われるが、希少動物種の保存・増殖などにも大いに利用され、その必要性はますます増加するであろう。また、凍結した受精卵は半永久的に保存できることから、遺伝資源としての種の保存のためのジーンバンクにも、必須のものとなる。

### 体外受精

#### 1. はじめに

牛卵子を体外で成熟させ、体外で受精させること(体外成熟・体外受精)によって、子牛を生産することに成功したのが1985年であった。牛の体外受精は卵巢からの未受精卵子の採取、体外成熟、精子の受精能獲得誘起と授精、受精卵(胚)の培養からなる。体外授精にいたって、卵子や胚の培養系が検討され、実用化に近いレベルにまでその技術水準は達してきている。ヒトでもこの体外授精、あるいは卵子の細胞質に直接的に精子を注入する顕微授精は不妊治療との一つとして、日常的に実施されている。しかし、卵子の成熟や胚の発生における培養の長期化に伴い、その問題点も指摘されている(Boerjan et al.,2000)。

## 2. 技術の概要

と体から取り出した卵巣の表面には、小卵胞が多数存在する。未受精卵子を採取するには、その卵巣表面に存在する直径2～5mmの小卵胞から、注射器で吸引採取するのが一般的である。卵胞から取り出した卵子は、卵丘細胞が密に付着して卵子の細胞質が変性していないものを選別して、成熟培養する。成熟用の培養液としてはTCM199培養液に牛胎子(子牛)血清を加えたものが汎用されている。採取直後の卵子の核は卵核胞期にあるが、約20時間前後成熟培養すると、第1減数分裂を経て第2減数分裂中期と言われる、いわゆる排卵直後の卵子の状態と同じ核相になる。通常、約70～80%以上の卵子は体外培養系でも成熟する。

体外受精には成熟した卵子と精子が必要である。射精した精子はそのままの状態では卵子に進入して受精することは不可能であり、いわゆる受精能獲得現象と呼ばれ質的な変化をとげる必要がある。自然交配では子宮内や輸卵管内のある物質の作用を受けて、受精能を獲得するが、体外受精では人為的に受精能を獲得させる必要がある。体外での精子の受精能獲得誘起には、いくつかの薬剤が有効とされているが、現在では血液中に存在するヘパリンを用いるのが、通常の手法となっている。体外受精は成熟卵子と受精能獲得を誘起させた精子を培養液内で数時間(3～10時間前後)行わせる。

体外受精した胚は、発生培地に移し、約7日間培養すると、レシピエントに非外科的に移植できる胚盤胞期胚に発育する。その発育割合は約20～40%程度である。発生用培養液としての代表的なものとしては、CR1aa、SOF などがある。通常これらの培養液には牛血清アルブミンや胎子血清を加えるが、血清をまったく添加しない無血清培養液も市販されている。

## 3. 利用の状況

牛の体外受精はと畜場由来の卵巣ばかりではなく、近年は超音波診断装置を用いた生体からの経膈採卵後の卵子を用いた体外受精も行われている。経膈採卵は週に1～2回程度、反復して採卵が実施されており、過剰排卵誘起による卵巣の反応が低下した個体や老齢牛、あるいは若齢牛などにも応用されている。と畜場由来の卵巣は個体識別が困難である場合が多いので、個体が特定できる経膈採卵の応用場面は増加するものと考えられる。

牛における体外受精胚の移植は世界的に実施されており、新鮮胚で約1.6万頭、凍結胚で約1.5万頭、合計3.1万頭となっている。移植頭数はアジア、ヨーロッパ地区で多い傾向にある。わが国では、年間に約9千頭に移植し、2～1.7千頭の産子が誕生している。受胎率は生体内生産の胚に比べて約10～15%低く、その値は35%前後となっている。このことは、体外受精により生産された胚の品質が生体内生産胚に比べて、劣ることに起因しているものと推察されている。

## 4. 体外受精における問題点

体外受精における一連の手順、すなわち卵子の体外成熟、体外受精、体外発生の培

養期間の長期化に伴い、人工授精や胚移植に比べて多くの問題点が指摘されている。胚の培養条件によっても異なるが、羊膜水腫、四肢の屈曲等の発生例が報告されており、その頻度は全産子の3.7%であり、人工授精産子の0.8%に比べて有意に高い値を示している。同様に、過大子症候群も報告されている。外国種の例では、生時体重は人工授精、胚移植及び体外受精でそれぞれ42.7kg、43.4kg、47.1kgであり、前二者に比べて有意にその生時体重は重かったと報告されている。当然にも分娩事故のリスクも高くなっている。新生子の死亡も、人工授精;5.3%、胚移植;4.6%であったのに対して、体外受精では7.5%になっており、その差は有意であったとされている(Menezo et al.,2000)。

ヒトの生殖医療においても、当初はその安全性そのものを疑問視することもあったが、今日にいたって、体外受精は広く行われている。わが国においては、年間約1万人の体外受精児が誕生しており、全出生数の約1%に達するとされている。また、ヒトでは未受精卵子の卵細胞質内に直接的に精子を注入する顕微授精も不妊治療の一環として行われている。しかしながら、多胎、流産、出生児の奇形率など、解決されていない問題もあることが指摘されている(Bui et al.,1996)。

これらのリスクが何に起因するかは未だに明確ではないが、体外受精そのもの、受精した胚の培養環境が生体内と異なることが影響しているものと推察されている。

## 胚及び体細胞クローン技術

### 1. はじめに

畜産における先端的技術開発には、近年めざましい進展を示している。とくに、成体の細胞からのクローン作出は、多くの発生生物学者の挑戦にもかかわらず実現されることなく、夢の話として、ほ乳類では不可能なものとしてとらえられていた。しかし、1996年、イギリスのロスリン研究所Campbellらのグループは、ヒツジの9日齢胚エンブリオデスク(将来胎子を形成する原始的な部位)由来培養細胞からのクローン作出に成功した(Campbell et al., 1997)。この細胞は分化細胞としての指標となるサイトケラチンとラミンA/Cを発現しており、核移植によって産子を得るための条件として、核を提供する細胞の未分化性は必須でないことが示されていた。次に、同グループは保存してあった成体の乳腺細胞を用いた核移植により、ついに成体からのクローンの作出に成功した。それがクローンヒツジ「ドリー」であった(Wilmot et al.,1997)。

家畜で核移植を実施する目的の一つは、発生の進んだ胚細胞核や完全に分化した体細胞核を初期の状態に戻す初期化によって個体を発生させ、同一の遺伝子を持つ優れた家畜を多数作出することである。その中でも、体細胞からのクローン家畜の作出は、今後の技術開発や応用・普及のみならず、発生生物学の基礎的研究分野にも、その発展性に大きく影響を及ぼすことになると示唆される。本稿では体細胞クローンヒツジの誕生を受け、わが国で取り組んでいるウシ体細胞クローン誕生の技術概要と動向について概説する。

## 2. クローンとは

クローンとは栄養生殖によって生じた個体の集団またはその子孫(H.J.Webber,1903)と定義され、クローン動物とは同一の遺伝形質を有する動物の集団を指す。高等動物の個体は卵子と精子の受精によって新しい個体が生まれるが、このような有性生殖を伴わずに個体を増殖させる技術が「クローン技術(クローニング)」である。

家畜において、自然発生的に生じるクローンには一卵性双子があるが、その生じる割合は極めて低く、牛では1,000回の分娩に対して1例前後とされている。クローン胚を人為的に作出するためには、1)胚盤胞期胚を2つに切断して、それぞれの切断胚から個体を作成する方法、2)初期胚あるいは初期胚由来の培養細胞を核移植して、個体を作成する方法、3)体細胞や体細胞由来の培養細胞を核移植して、個体を作成する方法が上げられる。後2者は、いずれも核移植という方法が個体作出には不可欠となっている。

## 3. 切断2分離胚によるクローン家畜の作出

生物の細胞や組織がその種の全ての器官に分化し、完全な個体を形成できる能力を全能性と言う。受精卵は当然にも、将来1頭の子畜となることから全能性のある細胞であるが、2細胞期胚、4細胞期胚、8細胞期胚と分裂した初期胚の割球(細胞)の核は、それぞれが全能性を有しているかどうかを検討された。その結果、8細胞期胚の初期胚の細胞核の一部の核は全能性を有していることが判明し、16細胞期胚になると、その割球細胞の核は全能性を失い、分化していることが認められた。しかしながら、初期においては、この割球細胞の分離によるクローン動物の作出も試行されたが、効率が悪く、実用化のレベルには達しなかった(Willadsen, 1979)。

その後、マイクロマニピュレーターが普及するようになると、すでに胎子になる部分と胎盤になる部分が明確に区分される胚盤胞期胚になった胚を使い、胎子になる部分を含めて胚を刀で2つに切断する切断2分離胚によるクローン作出が行われるようになった。本技術は今日でも行われており、特に優良な形質を有している乳牛では実施されている例も散見される。しかしながら、最大頭数が2頭までであること、確実に双子になる成功率は低くかつ安定していないことから、より多くの胚を生産できる受精卵核移植へとシフトしていった。

## 4. 初期胚を用いた核移植

### (1) 核移植の歴史

同一の遺伝形質・遺伝子を有する複数個体の作出は、1938年Spemannによる核移植実験の提案にまでさかのぼることができる。1960年代になるとGurdonらのカエルを使った一連の実験が行われ、1981年にはIllmenseeらによるクローンマウス成功の報告がなされた。しかし本手法は再現性に問題があり、多くの論争を引き起こした。1983年にMcGrathとSolter(1983)が前核置換技術を開発し、マウスを誕生させることに成功したことにより、この論争にも終止符が打たれた。前核置換の報告を受け、我が国でも農水省畜試の角田(現;近畿大学)が本技術の有効性に着目し、直ちに実験小動物で核移植技術が開始さ

れた。

家畜では1986年Willadsen(1986)が核移植によってクローンヒツジを生産することに成功し、本手法は牛における核移植の原点ともなっている。彼はマイクロピペットで羊の未受精卵の核を除去し、別の羊から採取した8～16細胞期胚の割球1個を除核した未受精卵の卵胞腔に挿入した。その後電気パルスによって細胞を融合させた。当時は家畜初期胚の体外培養系は確立されていなかったため、作成した胚を寒天の中に封入して、ヒツジの卵管に移植して桑実胚にまで発育させた。移植後5日目に卵管から移植胚を取り出して、正常に発育している胚を再び別のヒツジの子宮に移植して、産子を得ることができた。この成功のポイントは、8～16細胞期に発育している胚の割球細胞を除核した未受精卵に融合させると、核の情報があたかも受精直後の状態に戻ったかのような核の初期化が生じる点にあった。

現在までに、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウサギにおいて核移植産子が得られている。わが国では1989年にウシで核移植産子が初めて誕生した(牛島ら、1991)。家畜、とくにウシにおける核移植技術の進展を可能にしたものとして、体外受精の研究、と場由来卵巣からの未受精卵の体外成熟法や体外培養系の開発にあったことは言うまでもない。

## (2) 初期胚を用いた核移植技術

核移植には1)未受精卵の核(極体を含む)を除く、2)ドナーとなる細胞を除核した卵子に挿入する、3)卵子の胚発生を開始するための刺激を与える操作からなる。核移植の詳細は研究者によって異なるので、一般的な方法を述べる。ドナーとなる胚は通常の過剰排卵処置、人工授精後、5～6日目に子宮を灌流して16～32細胞期となった胚を採取する。このドナー胚はプロテアーゼ処理かピペettingにより単独の割球に分離しておく。体外受精由来の胚も同様に用いることができる。

一方、未受精卵は体外受精に用いる場合と同じように、卵巣から5mm以下の卵胞を注射針で吸引採取し、22～24時間培養する。この卵子の周囲には卵丘細胞が付着しているため、ヒアルロニダーゼで処理して卵丘細胞を除き、裸化卵子とする。その中で、第1極体を放出し、第二減数分裂中期に達し、成熟していると思われる正常な卵子を選別する。真核細胞(卵子を含む)には高度に組織化された内部構造を持ち、細胞内小器官の位置を変えたり、場所を移動できるが、これは細胞質内の蛋白繊維の複雑なネットワークの働きによる。この蛋白繊維は細胞骨格といわれ、主にアクチンフィラメント、マイクロチューブリンなどからなる。未受精卵を除核する際は、この細胞骨格構造を一時的に消失させて操作を容易にするため、サイトカラシンBなどで処理をする。

レシピエントとなる未受精卵の核は、第1極体の近くに存在することが多いので、透明帯を突き刺してカットし、極体とその直下の細胞質を透明帯の穴の部分から押し出すようにして除去する。通常、約30%の細胞質を除去するが、除去割合が多いとその後の発生は低下する傾向にある。除核の確認はヘキスト33342などで染色して、蛍光顕微鏡で観察する。除核した卵子はカルシウムイオノフォアなどにより活性化刺激を与え、シクロヘキ

シミドで活性化を誘起する。活性化は、与えられた刺激に反応して細胞質内の小胞体から一過性にカルシウムイオンが放出されることが引き金となって起こる。

その後、除核卵子へ割球を挿入して、電気刺激による融合を行う。融合の条件は、用いる融合装置などによって異なるため、最適な条件を設定しておく必要がある。この電気刺激は卵子の胚発生を開始させる活性化刺激としての役割も有する。融合の可否は本操作後約1時間目当たりがもっとも観察しやすい。融合した核移植胚は受精直後の受精卵と同じように発生を開始し、7日間体外培養すると、受胎牛の子宮に移植できる胚盤胞期胚に発育する。

核移植では活性化刺激と誘起の役割は大きい。受精の場合、精子が卵子と融合すると、それまで休止状態にあった卵子が刺激を受けて賦活化される。最も容易に認知できる卵子活性化の指標は、表層粒の囲卵腔への開裂と第二減数分裂の再開である。この時、卵子からはカルシウムイオンが大量に放出される。しかし、活性化刺激を兼ねる細胞融合時の電気刺激は、受精の場合とかなり異なり、カルシウムの放出はスパイク状でしかない。自然の状態に類似させることによって、核移植胚の発生能を改善できるのではないかと考えられているが、受精刺激と同じような人為的な活性化誘起法は確立されていない。

### (3) 初期胚を用いた核移植の産子生産

わが国ではこれまでに約520頭 (2000年2月末)の初期胚由来の核移植産子が誕生している。しかし、核移植のメリットが引き出せるとされる1卵性3子以上の生産例は、全体の約1/3弱にしか過ぎない。ドナー胚の細胞数、融合率、移植可能胚発生率や受胎率の現状を当てはめて推察すると、1回のクローン牛の作出効率は1.4～6頭程度であるとされている。そこで、家畜改良に利用するためにはさらなる生産効率の向上が求められている。現在の核移植では、1個のドナー胚から作出できるクローン胚は、ドナー胚の細胞数によって制限されている。そこで、16～32細胞期まで発生が進んだ核移植胚を再びドナー胚として核移植を行う継代核移植によって、移植可能胚の増加をさせることができる。これまでに6世代までの核移植で胚盤胞が得られ、3世代までの核移植胚から産子が得られている。しかし体外培養が長期にわたること、品質の良好な胚がコンスタントに得られないこと、反復核移植によるダメージも考えられることから、長期に渡って反復することは困難と考えざるを得ない。そこで、ドナー細胞を体外培養によって増殖させることによって、大量のクローン家畜を生産することが考えられ、わが国では、1997年に全農グループが胚盤胞由来内部細胞塊の初代培養細胞から複数の産子を得ることに成功している。

## 2. 体細胞核移植による産子の生産

### (1) ドリーの誕生

6歳の雌から採取した乳腺培養細胞を用いた核移植では、体細胞と除核卵子の融合率は64%、桑実胚・胚盤胞期胚への発育率11.7%であり、29個の胚を13頭に移植して、ドリーが1頭誕生した。ドリー誕生の成功の鍵は、ドナー体細胞の細胞周期を血清飢餓培養によって、G0期(休眠状態)に細胞周期を同調させたためだと彼らは強調した(Capbell, 19

97,1999)。しかし、血清飢餓培養による積極的な細胞周期の同調化だけではなく、コンフルエントな状態にすることによってもG0/G1期に同調化させることも可能となっている(Cibelli et al.,1998,Shiga et al.,1999)。

細胞周期とは細胞が分裂・増殖する際にみられる周期性であり、G1期、S期、G2期およびM期に分けられる。活発に増殖が見られる普通の体細胞の細胞周期にけるG1期、S期、G2期、M期はそれぞれ12時間、6時間、6時間、30分であり、一方向性に進行する。また、高感度のフローサイトメーターを使うことによって、細胞のDNA含量を測定することによって、細胞集団の細胞周期のどこに位置するかが明らかすることができる。

一方、卵子の細胞周期は体細胞とは様相を異にしており、卵母細胞が形成された時点でG2期となり、それが数年も続く。卵子が成熟するとM期に入り、精子が進入するなどの活性化が行われるまではそこで停止している。活性化後は、非常に短いG1期の後S期になる。そのため、見かけ上は卵子の細胞周期はM期とS期だけとなる。初期胚の核移植に用いるドナー胚の細胞周期は80%前後がS期にあるとされている。そのため、M期で停止しているレシピエント卵子に人為的に活性化刺激を加えてS期に進行させた後、核移植を行うことが行われてきた。

一方、体細胞核移植においては、血清飢餓培養によってほとんど全ての細胞をG0/G1期に揃えることができ、人為的な活性化刺激を行うと、卵子は速やかにS期に入り、正しい量のDNAが合成されることになる。そのため、細胞周期の同調が精度良く行えた体細胞核移植でドリーが誕生したと考えられている。

## (2) わが国での取り組みに際して

「ドリー」の誕生は、わが国においても広範な論議を巻き起こすこととなった。研究者サイドとしても、何らかの指針が出されるまでは実際に体細胞を使ったクローン研究を開始することは、世界的な状況を考えても不可能であったと言える。科学技術会議では論議を重ねた上、1997年7月28日に下記のような結論を出した。すなわち、科学技術会議の諮問第24号におけるライフサイエンスに関する研究基本計画において、「核移植等の技術を用いて生物個体等を作成する技術、いわゆるクローン技術、については、最近の技術的進展によりヒト個体の作製への適用の可能性も視野に入りつつあり、その使用については種々の観点から議論が起こっている。同技術を用いた畜産動物、医学実験用動物、絶滅直前の希少種動物等の動物のクローン個体の作製や個体を生み出さないヒト培養細胞の培養等については、畜産、科学研究、希少種の保護、医薬品の製造等において大きな意義を有する一方で、人間の倫理の問題等に直接触れるものでないことから適宜推進することとすべきである。ただし、その際でも、ほ乳類のクローン個体の作製については、情報の公開を進めつつ行うことが必要である。」

それを受けて、農林水産省では農林水産省の各機関、および農林水産省の何らかの予算を受けている機関に対して、試験研究開始の実質的なゴーサインを出した。

情報公開についてはインターネットを利用することとした。以下に主な機関のアドレスを

示す。

農林水産省<http://ss.s.affrc.go.jp/docs/sentan/entry.htm>

畜産試験場<http://ss.niai.affrc.go.jp/pub/seiya/html/index-clone.html>

家畜改良センター<http://www.nlbc.go.jp/topics/k1gyoumu/k1110019.html>

近畿大学<http://www.nara.kinchi.ac.jp/nogaku/chikusan/graduate.htm>

### (3) わが国における取り組み

ロスリン研究所での成功例を受け、わが国においては科学技術会議における答申の後、体細胞クローン牛作出に関する研究が開始された。わが国では、ウシの体外受精や初期胚を用いた核移植研究がかなり高いレベルで継続していたことから、まず牛がターゲットになった。実際、豚の卵子や胚は非常にその操作性が困難であり、また、確たる体外成熟培養系、体外受精や体外発生培養系が確立されていないことも起因していた。

用いた細胞として成雌では卵丘細胞、卵管上皮細胞、成雄では皮膚繊維芽細胞、筋肉由来細胞および胎子胚由来繊維芽細胞などである(Gibelli et al.,1998,Kato et al.,1998, Takahashi et al.,1998, Wells et al., 1998,1999, Shiga et al.,1999,Goto et al.,1999, Renard et al.,1999,Kubota et al.,2000)。細胞培養法や核移植の手法は実施した機関によって異なるので、その代表的な方法を紹介する(Takahashi et al.,1998,Akagi et al.,2000)。

ドナー細胞としての体細胞は、トリプシンで細胞を分散後、10%ウシ胎子血清加MEM培養液を用い、炭酸ガス培養器で培養した。細胞が培養皿にほぼ全面的に増殖したら、次の新しい培養皿に細胞数を調整して継代培養した。数代の培養後、血清飢餓培養を行うため、0.5%ウシ胎子血清加MEM(グルタミン欠)で5日間培養したものをドナー細胞とした。フローサイトメーターで計測した細胞周期は、9割以上がG0/G1に同調しているものと思われる。

また、以下のようにしてレシピエント卵子を準備した。と畜場から採取した卵巣の卵巣表面にある小卵胞から卵子を採取した。卵丘細胞が密に付着し、卵細胞質が均一にある卵子は、10%ウシ胎子血清加TCM199培養液を用い、38.5℃の条件下で炭酸ガス培養器を用いて、20時間前後成熟培養させた。その後、ヒアルロニダーゼで処理をして卵子を裸化した後、第1極体が放出されている卵子の除核を行った。除核した卵子の表面にドナー細胞を挿入後、電気パルス(25V / 150 μm, 10 μ秒で供核細胞を融合させた。電気パルスの条件は用いる機種によって異なるので、事前に最適条件を設定しておく必要がある。融合を確認後、サイトカラシンD(2.5 μg / ml)とシクロヘキシミド(10 μg / ml)で1時間、さらにシクロヘキシミドで4時間処理を行った。作出した核移植胚は7日間発生培養した。発育した桑実胚および胚盤胞期胚を受胎牛に移植した結果、胎子および成雄牛細胞由来の産子が誕生した。

### (4) クローン個体としての同定

体細胞核移植によって誕生した子牛が、確かに体細胞由来の産子であることを客観的



に証明する必要がある。そのため、マイクロサテライトをマーカーとしたDNA解析を行った。例えば染色体の中にはシトシン(C)とアデニン(A)の2塩基が繰り返す配列が多数(数万カ所)存在する。マイクロサテライトの反復配列の単位は10~50塩基程度であり、このマイクロサテライトの特徴は超可変性(多型)を示し、遺伝学的解析の良いマーカーとなる。また、その検出も、PCRで増幅後、ゲル電気泳動で分離するだけで、比較的容易に検出することが可能となっている。そのため、それぞれの染色体上の位置が判明している23種類のマイクロサテライトマーカーを用いた。理論的にはこの23種類のマイクロサテライトマーカーを用いることによって、31兆頭の個体、3,700万頭の父牛の個体識別が可能であるとされている。そこで、供核細胞となった個体の細胞、培養した細胞、産子の細胞および受胎牛の細胞を用いて解析を行った。その結果、前3者は完全に一致し、受胎牛とは異なっていたことから、この産子は体細胞クローンと判定されるに至った。

#### (5) 海外の動向

海外では、体細胞クローンの作出について、情勢分析が迅速に行われたことから、わが国に比べて半年余り早く、体細胞クローン子ウシが誕生した。これまでに米国、フランスなどで成功しているが、多くは胎子細胞由来のものであった。成体由来としてニュージーランドがあげられる。各国とも複数の独立した機関が成功しているわけではないので、わが国での突出した数にも近い体細胞クローン子牛の誕生は特筆に値するものであろう。また、複数の機関が豚やウサギをターゲットにして、研究を開始してきており、今後の進展動向が注目される。

### 3. 体細胞クローン技術の展開方向

体細胞クローン技術の展開方向としては、育種改良・増殖、希少種の遺伝資源の保存、遺伝子組換え家畜生産、優良形質を有するコマーシャル群の作成が考えられる。

#### (1) 育種改良・増殖

初期胚由来のクローン家畜の作出は、改良・増殖に果たす役割が大きいと期待されている(Ruane.,1997, Hirooka,2000)。一卵性の3つ子が確実に作出できれば、改良効果の正確な把握が可能とも言われている。生体細胞由来の体細胞クローンにおいても、いくつかのクローン検定モデルが提案されており(古川、1999)、胎子細胞の一部や出生直後の子牛からの体細胞クローンは、初期胚由来のクローン家畜と同程度に育種学的には有用性があることが指摘されている。人工授精や胚移植による産子と体細胞クローン技術を組み合わせることにより、検定精度の向上や期間の短縮が図られるものと考えられる。しかし、体細胞クローン産子の発育性、繁殖性、生理特性などを注意深く観察しながら、その有用性について最終的な結論を得る必要があることは明白である。

#### (2) 遺伝資源の保存としての利用

希少種あるいは在来種の遺伝資源資源としての保全は、世界的な流れであり、わが国においても、農水省農業生物資源研究所をセンターバンクとする動物遺伝資源事業研究が取り組まれている。保存法には個体・集団として保全する方法と、精子や胚を凍結保

存する方法がある。しかし、個体数が減少したのから多くの精子や胚を採取することには、少なからざる問題を抱えている。とくに、胚の保存には多大な努力にも関わらず、決して楽観できる状況にはない。一方、体細胞を用いた希少動物の遺伝資源の保存例として、わが国では繁殖能力をなくした20歳の黒毛和種の卵巣の体細胞を用いて、産子の作出に成功している(Oikawa et al.,2000)。また、ニュージーランドのWellsらは興味深い報告をしている(Wells et al.,1998,1999)。ニュージーランドの孤島、エンデビー島に生存しているエンデビー種牛は、9頭の雄の精液が保存されているものの、推定13歳の雌が1頭生存しているだけである。過去6年間に渡り、経膣採卵法による採卵、体外受精を繰り返したが、卵子の品質がきわめて悪く、たった1頭の雄子牛を得たに過ぎなかった。そこで、採取した卵子からの卵丘細胞を用いて、体細胞核移植を行った結果、6頭の産子を得たと報告している。移植頭数を増加させれば、産子の生産は原則的には無限となる。今後は、現存する凍結精液を用いた計画交配により、本種の復元を目指しているとも述べている。遺伝的多様性は動物遺伝資源の保存の上からは重要であるが、この例は遺伝的多様性を作りだしていく意味も有している。このことから動物遺伝資源の保存にも、体細胞核移植技術が必須のものとなり得ることを明確に示している。性、年齢を問わず多数の個体から体細胞コレクションが、今後の遺伝資源の保存法の一つとなることは明らかである。

### (3) 遺伝子組換え家畜の生産

医薬品などの有用物質の生産、疾患モデル動物や高付加価値による生産性向上などを目指して、遺伝子組換え家畜の生産が試みられている。遺伝子組換え家畜を生産するためには、前核期にある受精卵を用い、前核に遺伝子を導入する方法、マウスなどで樹立されている胚性幹細胞などを用いて、胚性幹細胞に遺伝子の相同組換えを行って、キメラマウスを経由する動物を生産する方法が知られている。ウシでは効率的に遺伝子組換えができる胚性幹細胞などが樹立されていないために、前核注入法が用いられている。しかしその効率は決して高いものではなく、莫大な労力と費用がかかっている。そのため、1頭の遺伝子組換えウシを作出するのに、レシピエントとなるウシが安価であると言われる米国においてさえ、数千万円もかかる計算となる。そのため、現状ではよほどの高付加価値の物質生産を行わせるものでなくては、その意義は少ない。また、遺伝子組換え家畜ができたとしても、交配を重ねるうちにその遺伝子の機能が喪失することがあることはよく知られている。

そこで、体細胞クローン技術の有利性が改めて認識されつつある。これまで、ヒツジ、ウシ、ヤギ(Baguisi et al.,1999)、ブタ(PPL,2000)、マウス(Wakayama et al.,1998)で体細胞クローン動物が作出されているが、クローン動物の作出に用いられた細胞は、胎子繊維芽細胞、乳腺上皮細胞、卵管上皮細胞などの種々の初代培養細胞が用いられている。胚性幹細胞や生殖幹細胞が樹立されていない動物種では、これらの初代培養細胞を用いることによって、細胞への遺伝子導入、遺伝子が導入された細胞の選択、選択された

細胞を用いた体細胞核移植による遺伝子組換え家畜の生産が可能となると期待されている。これまでに、イギリスのロスリン研究所では、ヒツジ胎子繊維芽細胞にヒト血液凝固第9因子遺伝子と薬剤選択マーカー遺伝子を導入し、遺伝子組換えヒツジ「ポリー」を誕生させ、米国のマサチューセッツ大学では、ウシ胎子繊維芽細胞に大腸菌のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子と薬剤選択マーカー遺伝子を導入し、遺伝子組換えウシの作出に成功している。また、最近では遺伝子組み換え体細胞ブタの作出に成功したとの報告例もある(Polejaeva & Campbell,2000,PPL,2000)。

しかし、遺伝子組換え体細胞クローンにも問題が残されている。遺伝子導入に用いる初代培養体細胞は、一般的には最大限50回程度しか分裂することができず、遺伝子導入や選択のための培養の期間が限定されること、体細胞に胚性幹細胞と同じく相同組換えが効率よくできないこと、培養が長期間に渡ると染色体異常が多くなることなどである。無限増殖能を有する樹立された細胞株を用いることによって、いくつかの問題は解決できるものと推察されるが、細胞株から体細胞クローンの作出はマウス(Wakayama et al.,1999)の他に例を見ていない。

#### (4) コマーシャル群の作出

スーパーカウと言われる極めて高い必乳能力を持った雌の乳牛や高品質の牛肉を生産する個体を、体細胞核移植によって作出し、生産性の向上と飼養管理の斉一化を図ることも計画されている。従来的人工授精や胚移植では、兄弟間の遺伝的形質にばらつきが生じることから、高能力牛だけにそろえることは困難である。体細胞核移植によれば、容易にこの種の問題を解決できるのではないかと考えられている。

#### 4. わが国における体細胞クローン産子の誕生の動向と体細胞クローンを巡る問題点

体細胞クローン動物の誕生は、分化した成体体細胞の核が、未受精卵子と融合することにより、全能性を獲得する事を実証したことにある。分化した成体細胞の遺伝発現のパターンは、見かけ上、受精卵の状態にリセットされ、再度、発生分化に必要な遺伝子発現を行いながら、発育の正常パターンを開始できることを明確に示した。一方で、体細胞クローンに関しては流産、分娩直後死、過大子の問題が改めてクローズアップされている。流産は実際的に全ての妊娠期間に渡って発生しており、人工授精や通常の胚移植に比べて、その割合が高いことも事実である。しかし、全国の体細胞クローン子牛の動向に関しては、分子生物学的、病理学的検査体制が構築されている。

#### 5. わが国における体細胞クローン子牛誕生の動向

##### (1) 子牛生産の動向

わが国においては1999年12月23日までに、111頭が出生し、育成・試験中60頭(54.1%)、死産19頭(17.1%)、生後直死・試験と殺等32頭(28.8%)となっている。生後直死・試験と殺の中には、胎子の奇形や流産を引き起こすアカバネ病と診断された子牛が4頭、レシピエント牛が死亡したためのものが1頭含まれている。研究実施機関は41カ所、体細胞クローン牛が出生した機関は20カ所になっている。体細胞クローン子牛の雌雄は、雄3

8頭、雌73頭となっている。品種別では黒毛和種の雄34頭(生時体重40.0kg)、雌14頭(生時体重42.0kg)、ホルスタイン種の雌31頭(生時体重45.9kg)、ジャージー種の雌6頭(生時体重32.3kg)となっており、その他は品種が特定されていない。分娩した母牛に対しては自然分娩が33頭(29.7%)、帝王切開35頭(31.5%)、分娩誘起処置34頭(30.6%)、不明9頭(8.1%)となっている。生時体重はそれぞれの品種の平均値と比較して、約10kg程度重くなっている。

これまでに出生した子牛の発育・体重推移は、それぞれの品種の平均値と同程度であり、特に問題性は見あたらないとされている。また、1998年に誕生した雌の2頭は人工授精によって受胎が確認され、雄についても精液性状やその受胎能力は正常範囲であることが報道されている。このことから、少なくとも生存して生まれた子牛の発育性やその受胎性に、体細胞由来であるが故の特殊性は見いだすことはできない。

## (2) 流死産胎子および生後直死の病理学的所見及び過大子について

流死産胎子および生後直死産子について、1999年10月27日までの27例について病理学的検索を行った。その結果、病理学的には過大子における繊維芽細胞の増生(4例)、骨格筋の変性ないし異常(3例)、骨髄の異常(2例)、免疫不全(2例)、甲状腺コロイドの低形成(2例)、肺胞蛋白症(1例)、膵臓炎(1例)、腸の形成異常(1例)、臍動脈切断(2例)、母牛の病気(2例)、ミイラ胎子(4例)、不明(2例)、母牛がと畜場へ搬入(1例)となっている(未発表資料)。この病理学的所見からは、体細胞由来であるが故に全く新規な病理学的所見として示唆される典型的なものは見いだされていない。すなわち、すべての病理所見は、従来から確立されている病理学的診断の範囲を超えるものではないことが、明確である。

過大子の発生の問題は、苦慮しているところであるが、過大子は体細胞核移植に限ったことではなく、体外で脱出胚盤胞になる前に、体外受精と体外発生培養、あるいは様々な胚操作をした場合に過大子が生まれる。そのことが、難産や産子の呼吸機能障害、呼吸困難、生後直死などを併発するケースが多いことが報告されている。世界の体外受精および初期胚由来クローン胚移植をとりまとめた成績によれば、生時体重が60kgを越えるものは人工授精では1%であったのに対して、体外受精胚では14%、初期胚クローンでは5%存在したとしている(Garry et al.,1996, Kruip & Dass,1997, Leeuw et al.,2000)。しかし、この過大子をもたらす要因については依然として解析が進んでいない。インプリンテング遺伝子との関連から過大子の発生をとらえることも行われているが(Young et al.,1998,2000)、全容を解明するまでには至っていない。今後は、過剰な発育を引き起こす初期胚の変化の同定とその分子メカニズムの解析が求められる。さらに、分娩状況にしても、分娩誘起による計画分娩や時機を逸しない帝王切開なども必要になってくるであろう。また、虚弱子の介護法の確立など、体細胞クローンは周辺の臨床繁殖技術研究と抱き合わせで進める必要性が極めて高い。

## 6. 今後の展望

1998年7月5日、近畿大学の角田教授研究グループが、世界で初の成体由来の体細胞クローン子牛を誕生させて以来、わずか半年余りの内に20数頭の体細胞クローン子牛が誕生した。これは世界的に見ても例にない事実であり、わが国の繁殖研究レベルの高さを証明したとも言える。

家畜の体細胞クローン技術研究は、畜産業の発展に寄与することを第一義として、国民への良質な畜産物の安定的供給を図るための、明確な目的意識を持って着実な歩みが必要とされる。産肉性や乳量などにおける体細胞クローン子牛の有利性など、本技術研究が真に畜産繁殖技術として意義を有し、定着できるのかを見極める必要がある。人類の夢が現実となった今、私達はこの技術が意味のあるものとして、着実に進展していくことを願うものである。

### 主な参考文献

- Akagi.S., S.Takahashi, T.Noguchi, K.Hasegawa, M.Shimizu, M.Hosoe and Y.Izaike. 2000. Development of embryos using bovine cumulus cells for nuclear transfer. *Theriogenology*.53:208(Abst).
- Baguisi, A.,E.Behboodi, D.Melican, J.S.Pollock, M.M.Detrempe, C.Cammuso, J.L.Williams, S.D.Nims, C.A.Porter, p.Midura, M.J.Palacios, S.L.Ayres, R.S.Denniston, M.L.Hayes, C.A.Ziomek, H.M.Meade, R.A. Godke, W.G.Gavin, E.W.Ovrstrom and Y.Echelard.1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nature Biotechnology*.17:456-461.
- Boerjan M.L., Dass J.H.G. and S.J.Dieleman. 2000. Embryonic origins of health: Long term effects of IVF in human and livestock. *Theriogenology*, 53: 537-547.
- Bui T.H. and H.Wramsby, 1996, Micromanipulative assisted fertilization-still clinical research. *Hum.Reprod.*,11:925-926.
- Campbell, K.H.S., J.Mcwhir, W.A.Ritchie and I.Wilmut. 1997. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line.*Nature* 380:64-66.
- Campbell, K.H.S.1999. Nuclear equivalence, nuclear transfer, and the cell cycle. *Cloning*. 1:3-62.
- Cibelli, J.B., L.S. Stices, P.J.Golueke, J.J.Kane, J.Jerry, C.Blacwell, F.A.O.Leon and J.M.Robl. 1998.Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*. 280: 1256- 1258.
- Embryo transfer newsletter . 1999. The 1998 statistical figures for the worldwide embryo transfer industry: A data retrieval committee report. 17: 25-31.
- 古川 力、1999. クローン技術の育種効率に及ぼすインパクト. 15:19-26.
- Garry,F.B., R.Adams, J.P.McCann and K.G.Odde. 1996. Postnatal characteristics of calves

- produced by nuclear transfer. *Thriogenology*. 45:141-152.
- Goto, Y., K. Kaneyama, S. Kobayashi, K. Imai, M. Shin-noh, T. Tsujino, T. Nakano, S. Matuda, S. Nakane and T. Kojima. 1999. Birth of cloned calves derived from cultured oviductal epithelial cells of a dairy cow. *Anim. Sci. J.* 70:243-245.
- Hewitson, L., Diminko, T., Takahashi, D., Martinovich, C., Ramalho-Santos, J., Sutovsky, P., Fanton, J., Jacob, D., Moneith, D., Neuringer, M., Battaglia, D., Smerly, C., and Schatten, G. 1999. Unique checkpoints during the first cell cycle of fertilization after intracytoplasmic sperm injection in rhesus monkeys. *Neture Medicine*, 5, 431-433.
- Hill, J.R., C.R. Long, C.R. Looney, Q.A. Winger, T.E. Spencer, F.W. Bazer, R.C. Burghardt and M.E. Westhusin. 2000. Placental abnormalities in first transfer somatic cell cloned fetuses. *Thriogenology*. 53:218(Abst).
- Hirooka H. 2000. Evaluation of testing schemes with clones for carcass traits in beef cattle. *Anim. Sci. J.* 71:J19-J25.
- Illmense K. & P.C. Hoppe, 1981. Nuclear transplantation in *Mus musculus*: developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. *Cell*, 23:9-18.
- Kato K, T. Tani, Y. Sotomaru, K. Kurokawa, J. Kato, H. Doguchi, H. Yasue and Y. Tsunoda 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 282:2095-2098.
- Kruip, T.A.M. and J.H.G. Daas. 1997. In vitro produced and cloned embryos: effects on pregnancy, parturition and offspring. *Thriogenology*. 47:43-52.
- Kubota, C., Yamaguchi, H., J. Todoroki, K. Mizoshita, N. Tabara, M. Barber and X. Yang. 2000. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long term culture. *PNAS* 97:990-995.
- Heape, W. 1890. Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster mother. *Proc. R. Soc. Lond.*, 48:457-458.
- Leeuw, A.M.W., E. Mullaart, A.P.W. de Roos, J.S. Merton, J.H.G. den Daas, B. Kemp and L. de Ruigh 2000. Effect of different reproduction techniques; AI, MOET or IVP, on health and welfare bovine offspring. *Thriogenology*. 53: 575-597.
- McGrath J. & D. Solter, 1983. Nuclear transplantation in the mouse, embryo microsurgery and cell fusion. *Science*, 220:1300-1302.
- Menezo, Y.J.R., A. Veiga and J.L. Pouly., 2000, Assisted reproduction technology (ART) in humans: Factors and uncertainties. *Thriogenology* 53:599-610.
- 野澤 謙 1975, 家畜化と集団遺伝学, 日本畜産学会報., 46:549-557.
- Oikawa, T., T. Numabe, T. Kikuchi, T. Takada and Y. Izaike. 2000. Production of somatic cell clone calves from cumulus cells of a 20 year old Japanese Black cow. *Thriogenology*. 53:236(Abst).
- Phillips, P.H. & H.A. Lardy, 1940, A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull

- sperm. Dairy Sci.,23:399-404.
- Polejaeva, L.I.A. and K.H.S. Campbell. 2000. New advances in somatic cell nuclear transfer application in transgenesis. *Thriogenology*. 53:117-126.
- Polge, C. & L.E.A. Rowson, 1952. Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at 79 °C. *Nature*. 169:626-627.
- Renard, J.P., S. Chastant, P. Chesne, C. Richard, J. Marchal, N. Cordonnier, P. Chavate and X. Vignon. 1999. Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. *The Lancet* 353:1489-1491.
- Ruane, J., G. Klemetsdal and E. Sehested. 1997. Views on the potential impact of cloning on animal breeding and production. *Acta Agris. Scand., Sect. A. Animal Sci.* 47:209-212.
- Sakaguchi, M., K. Yotsushima, T. Kakei, H. Nakahara, S. Takahashi, H. Imai and Y. Izaike. Cloned calves by transfer of reconstituted bovine embryos derived from fetal fibroblast cells. *J. Reprod. Dev.* submitted.
- Schneike K.D., A.J. Kind, W.A. Ritchie, K. Mycock, A.R. Scott, M. Ritchie, I. Wilmut, A. Colman and K.H.S. Campbell. 1977. Factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 278:2130-2133.
- Shiga, K., T. Fujita, K. Hirose, Y. Ysue and T. Nagai. 1999. Production of calves by transfer of nuclei from cultured somatic cells obtained from Japanese Black Bulls. *Thriogenology*. 52:527-535.
- Suigie T. 1965. Successful transfer of fertilized bovine egg by non-surgical techniques. *J. Reprod Fertil.* 10:197-201.
- Takahashi, S., C. Kubota, H. Nakahara, M. Shimizu, T. Tokunaga and H. Imai. 1998. Importance of cytoplasmic factor after oocyte activation on development of somatic cell nuclear transferred bovine embryos. In; Lauria A, Gandolfi F eds. *Gametes. Development and function. Sero symposia*, 607(Abst).
- Takano H., C. Kozai, S. Shimazu, Y. Kato and Y. Tsunoda. 1996. Cloning by multiple transfer. *Thriogenology*. 47:1365-1373.
- 牛島 仁, 角田幸雄, 江藤哲雄, 今井 裕 1991。牛 8 ~ 64 細胞期胚割球ならびに胚盤胞内細胞塊細胞核移植由来再構築胚の体外発生能。家畜繁殖誌、37:15-19.
- Wakayama T., A.C.F. Perry, M. Zuccotti, K.R. Johnson and R. Yamagimachi. 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394:370-374.
- Wakayama T., I. Rodriguez, C.F. Anthony, F. Perry, R. Yamagimachi and P. Mombaerts., 1999. Mice cloned from embryonic stem cells. *PNAS*. 96:14984-14989.
- Wells D.N., P.M. Misica, H.R. Tervit and W.H. Vivanco. 1998. Adult somatic cell nuclear

transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed.  
Reprod.Fertil.Dev. 10:369-378

Wells D.N., P.M.Misica and H.R.Tervit. 1999. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. Biol.Reprod. 60:996-1005.

Wilmot,I., A.E.Schnieke, J.Mcwhir., A.J.Kind and K.H.S.Campbell. 1997.Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature.385:810-813.

Willet,F.1951,Successful transplantation of fertilized bovine ovum. Science.113:247.

Young, L. E.Y., D. S. Kevin, and I. Wilmot. 1998. Large offspring in cattle and sheep. Reviews of Reprod. 3:155-163.

Young, L. E. and H.R. Fairburn 2000. Improving the safety of embryo technologies: possible role of genomic imprinting. Thriogenology.53: 627-648.

その他、論文の総説として、

角田幸雄 ウシ胚の核移植.日本畜産学会報、63巻、192-200、

角田幸雄・加藤容子 クローン家畜作出の研究動向、日本畜産学会報、68巻、596-602を参照されたい。



## 核の初期化と発生異常

牛における体細胞クローンの作出は、図に示す方法によって実施されている。すなわち、雌雄の胎子、子牛あるいは成牛の種々の組織から採取した体細胞あるいは胎子の生殖隆起から採取した生殖細胞を体外で継代培養し、核の細胞周期をG0/1期などに同調させた後ドナー細胞として用いる。ついで、卵成熟促進因子(maturation promoting factor, MPF) 活性の高い未受精卵の囲卵腔に培養細胞を注入し、ごく短時間の直流電流を通電して、ドナー細胞を未受精卵に融合する。なお、未受精卵は、あらかじめ機械的に第2減数分裂中期の染色体を除去しておく(レシピエント卵細胞質とよばれる)。融合後、発生を促進するため、さらに数回電気刺激を与えるとともに、新たな蛋白合成を阻害するためシクロヘキシミド添加培地で短時間培養する。レシピエント卵細胞質にとりこまれたドナー細胞の核は、MPFの働きによって核膜が崩壊し、染色体は凝集して卵細胞質にさらされる。与えられた発生刺激に反応してMPF活性が低下することに伴って、染色体は脱凝集して核膜が形成され、DNAの複製がはじまって分割する。ついで、通常の受精卵と同様の発育過程で胚盤胞期へ発生する。ドナー細胞の核が未受精卵の卵細胞質にさらされて、核膜が形成され、DNAの複製が生じる間に「核の初期化」が生じるとされている。

胚盤胞に発育した胚の形態は通常の受精卵由来の胚と区別することはできず、また染色体構成も正常2倍体である。胚盤胞への発生率は、用いた細胞の採取組織によって大差はなく、融合した卵子の20～50%が胚盤胞へ発育する。これらの胚盤胞を排卵時期の同調している受胎牛へ移植すると30～50%が受胎するが、妊娠中後期に流産する例が多く、分娩に至る受胎牛は5～20%である。表に成体体細胞を核移植した場合の体外における発生率、受胎牛へ移植後の妊娠率と産子生産率を示した。筆者ら(Kato et al., 1998) の報告以外は、妊娠率ならびに産子生産率は通常の受精卵移植の成績と比べて低い。また、筆者ら(Kato, Tani and Tsunoda, accepted) が、その後7県の畜産試験場に依頼して大規模に実施した移植試験でも、受胎率は37%、分娩率は17%であった。

分娩に至った場合でも、分娩時あるいは帝王切開時に胎子が死亡していたり、生存して生まれても数時間以内あるいは数日以内に死亡したり、分娩後数ヶ月経過後死亡したりといった場合がみられる。奇型等のため、やむを得ず殺処分する例もみられる。このような産子の異常等の出現割合は、通常の受精卵移植(体外受精を含む)に比べてきわめて高く、約半数を占めることが明らかにされている(Kato, Tani and Tsunoda, accepted)。程度の差はあるが、受精卵の核を核移植することによって得られる受精卵クローンの場合にもみられている。

核移植技術を用いて得られる子牛に異常等がみられる原因については、今のところ明らかになっていないが、2つの理由が考えられる。初期胚割球の核(一般に受精卵クロー

ンとよばれる)、胚盤胞内細胞塊を培養して得られる細胞の核(ES様細胞であるが、得られる個体に対する名称はない)、胎子の生殖細胞を培養して得られる細胞(EG様細胞であるが、得られる個体に対する名称はない)、胎子あるいは子牛や成体の体細胞の核(一般に体細胞クローンとよばれる)など核移植に用いる細胞の違いによって若干の相違はあるが、ドナー細胞核は発現可能な遺伝子の種類が受精卵の状態へ変化することが必要であり、これが核の初期化と考えられる。核の初期化は、未受精卵細胞質中で生じるが、核の初期化が不完全であったり、不適切であったりすることが体細胞由来の胚盤胞を受胎牛へ移植した場合に、流産、死産や奇型などが生じる原因の1つと考えられる。

用いるドナー細胞核の遺伝子の一部に、非可逆的な変化が生じていることが第2の原因と考えられる。1962年にアフリカツメガエルのオタマジャクシの小腸上皮細胞の移植によって、オタマジャクシの体細胞から多数のカエルが得られているにもかかわらず、成体のカエルの体細胞を核移植するとオタマジャクシへ発生した後すべてが死亡しているのも核に非可逆的な変化が生じていることによる可能性がある。マウスの妊娠中期の胎子から採取した生殖細胞を核移植に用いた場合、この細胞では次の世代の生殖細胞を作るための変化がいくつかのインプリンティング遺伝子で生じているために胎子期ですべて死滅し、産子としては生まれぬ。牛体細胞クローン作出に関する研究から、核移植に用いる細胞の由来や細胞株によって、流死産等の状況が異なることから、細胞によっては特定の遺伝子で非可逆的な変化が生じている可能性が大きい。

以上のように、分化した細胞核を染色体を除去した未受精卵へ融合すると個体へ発生することは確実であるが、なぜ核が初期化されて分化全能性を獲得するようになるのか、その機構は明らかではない。また、産子に異常等がみられるのは、核移植技術自体に問題があって核の初期化過程あるいはその後のDNA複製過程で異常が生じるためなのか、それとも用いたドナー核自体に分化に伴うあるいは外的環境によるDNAの変化があるために生じるのかは明らかではない。

## クローンウシの生理学的正常性の検査項目

体細胞を核ドナーとして用いたクローニングによって生産された仔ウシでは、肺の機能不全と心筋症(1)、右心室の肥大(1,2,3)、またそのための慢性肺高血圧によると考えられる肝臓の受動性うっ血等の病変(1,2)、漿液血液状の腹水の蓄積(2)、胸腺の萎縮とリンパ球の形成不全が観察され(3,4)、そして胎盤の異常として、臍帯の脈管の拡張、胎盤の浮腫、さらに尿漿膜および羊膜の浮腫が報告されている(1,5)。以上より、以下の項目が、誕生した仔ウシの正常性の検討ないし正常発育したクローン動物の屠体での比較に際して必要と考えられる。

### 1. 誕生前の検査項目

- a. 受胎雌の超音波診断による、尿膜液過多症および羊水過多症のチェック

### 2. 誕生後の検査項目

#### a. 仔ウシの検査項目

- . 体温の測定とモニタリング
- . 動脈血中のO<sub>2</sub>とCO<sub>2</sub>分圧およびpH測定による呼吸困難のモニタリングとアシドーシスのチェック
- . 臍帯の脈管の肥大
- \* . 血中リンパ球数とヘモグロビン濃度の減少の有無
- \* . 胸部レントゲン撮影による肺胞の異常(不十分な拡大)及び肺高血圧症の検出
- \* . 胸部レントゲン撮影による心臓右側の異常(右心室肥大)の検出

#### b. 胎盤の検査項目

- . 尿漿膜、羊膜の浮腫
- . 胎盤の浮腫

\*:健常クローン仔ウシで検査が特に必要

なお、誕生直後からの循環器系の異常に関しては、通常は分娩時に産仔が子宮内環境から体外環境にさらされる際に、肺が膨らむと同時に肺の血流に対する抵抗は急激に低下し、更に空気中の酸素が肺細動脈の拡張効果を示すことによって肺の血流に対する抵抗は更に低下するが、体細胞核移植の結果生まれたクローン仔ウシはこの変化がうまく進行しないために、慢性の肺高血圧症を示すと考えられた。この治療方法は、動脈管(ductus arteriosus)を閉鎖させ、更に肺脈管の低酸素による血管収縮を妨げることであり、そのために誕生直後からの気管への酸素の直接吸入が有効である(1)。

## References

1. Hill, J.R. et al., *Theriogenology*, 51, 1451-1465 (1999)
2. Lewis, I.M. et al., *Theriogenology*, 53, 233 (2000)
3. Renard, J.P. et al., *Lancet*, 353, 1489-1491 (1999)
4. Vignon, X. et al., *C. R. Acad. Sci.*, 321, 735-745 (1998)
5. Wells, D.N. et al., *Biol. Reprod.*, 60, 996-1005 (1999)

## クローン動物の生理・機能

### 1. 子ウシの体温・血液性状及び母ウシ・ヒツジの胎盤の異常

クローンウシは、分娩直後(10分)ではその体温は $39.7 \pm 0.1$  であったが、生後1時間及び8時間ではそれぞれ、 $38.9 \pm 0.2$  及び $38.2 \pm 0.1$  へ低下した(n=10)。血中の $\text{HCO}_3^-$ 濃度は、最初の1時間目はだいたい正常値( $25.7 \pm 0.8$  mM, n=3)であったが、その間に1頭の子ウシは代謝性アシドーシスをおこし、16mMへ低下していた。5頭の子ウシで血中グルコース濃度が調べられ、4頭は正常値( $3.6 \pm 0.5$  mM)であったが、1頭は生後1.5時間で低血糖値を示し、それが正常値に安定するまでには数時間を要した。子ウシは形態的には正常であったが、4頭の受胎雌の胎盤において臍帯血管の拡張、浮腫状の膜、通常よりも多い尿嚢液量といった異常がみられた。しかし、このような胎盤の異常は胚の発達には影響していなかった(1)。クローンウシの誕生後1日目の血中成長ホルモン及びレプチン濃度は対照区の子ウシと同様であった。しかし、IGF-Iの血中濃度はクローンウシにおいて低かった。IGFBP-1及び2の血中濃度はクローンウシにおいて非常に高く、また、IGFBP-3と4に関してはクローンウシにおいて低かった。この血中のIGFBPのパターンは、生後数日たったクローンウシにおいては対照区のウシと差が見られなくなった。これの唯一の例外として、IGFBP-2の血中濃度が継続して高かったクローンウシは、8週目に死亡した(2)。ヒツジのクローン動物において、通常受胎雌羊に、クローン胚を移植し、35日齢で胎児および胎盤を回収したところ、回収された胎児の33%が正常と考えられたが、残りの胎児は発育遅延を起こしており、80%の胎盤で絨毛の形成不全を起こしていた(3)。

1. Wells D.N. et al. Biol. Reprod., 60, 996-1005 (1999)
2. Chavatte-Palmer P. et al., Theriogenology, 53, 213 (2000)
3. De Sousa P.A. et al., Theriogenology, 53, 214 (2000)

### 2. テロメア長

テロメアとは染色体末端に存在するDNAの塩基配列のことで、この部分は染色体が複製される際に少しずつ短くなり、その長さが細胞の分裂回数を数えるカウンターであり、短くなると細胞の自己死につながるものだと考えられている。通常は生殖細胞形成の際、テロメラーゼが働いてこのテロメアの長さを元に戻すが、体細胞クローンニングの結果生まれた動物では、通常生殖細胞形成・受精の経過を経ていないため、このテロメア長が復元されているか否かが興味の対象となっていた。世界で最初の哺乳類の体細胞クローン動物を作出したPPL Therapeuticsでは、体細胞クローンの結果得られた動物を対象として、このテロメア長を検討した。その結果、クローン動物は通常繁殖の結果生まれた同年齢の動物に比べて、テロメア長が有意に短い。クローン動物のテロメアの長さは、その核ドナー細胞を提供した動物の年齢に加えて、核移植の前に細胞を回収後培養した期間を合わせた年齢のテロメア長となっている。以上の結果より、体細胞核移植の結果

作出されるクローン動物ではテロメアの修復が行われなかったことが明らかとなった。体細胞クローン動物では通常の動物に比較して、細胞の自己死の起こる急速なテロメア長に、同年齢の通常繁殖の個体よりも早く達することが考えられるが、同一の動物種の同年齢動物間でもテロメア長の分布は幅広いものであるため、このことががはたして個体そのものの生存時間内に来るかは不明である。

4. Shiels P.G. et al. *Nature*, 399, 316-317 (1999)

### 3. 循環器機能と生殖機能

22頭のクローンウシが生まれ、そのうち5頭が死産だった。死産だった5頭のうち、3頭は難産または子宮のねじれによるものと診断されたが、他の2頭は漿液血液状の腹水が溜まっているのが診断された。その内の1頭をより詳しく剖検したところ、肝臓のうっ血および、心臓右側の肥大と弁の形成不全という異常が発見された。肝臓のうっ血と腹水の蓄積は、この心臓の異常によるリンパと静脈の門脈圧の上昇が引き起こしたものと考えられた。誕生後24時間以内にさらに2頭のクローンウシが同様の異常で死亡した。これに対して、生残した正常なクローンウシのうち、2頭の雄と2頭の雌は春季発動を迎え、交配後正常な繁殖能力を示した。

5. Lewis I.M. et al., *Theirogenology*, 53, 233 (2000)

### 4. 胸腺萎縮とリンパ球形成不全

耳のバイオプシーによって採集された組織から得られた細胞を核ドナーとして作られたクローンウシ(6)において、生後約六週間で血中のリンパ球とヘモグロビンの急激な減少を示した。この結果新生児は生後51日目に死亡した。剖検の結果、胸腺の萎縮とリンパ球の形成不全が観察された。このような現象は他に、胎児の筋肉細胞を核ドナーとして作られたクローンウシ(7)でも観察されている。

6. Renard J.P. et al. *Lancet*, 353, 1489-1491 (1999)

7. Vignon X. et al. *C.R. Acad. Sci.*, 321, 735-745 (1998)

### 5. 染色体数の倍数性

桑実期のウシ胚の細胞を核ドナーとして作られた16個のウシクローン胚盤胞期胚について、一つの胚あたり約54個の核でその染色体の倍数性を調べたところ、16個の胚のうち7個(44%)で倍数性の異常が発見された。それらの胚のうちでも、胚を構成する核の倍数性異常の出現する割合は1.1から66.2%と大きく異なっており、また、3倍体および4倍体の異常が多く見られた。しかし、このような染色体の倍数性異常は体外成熟・受精・培養で得られるウシ胚盤胞期胚の倍数性異常とほぼ同じであり、核移植操作による異常の増加は見られなかった。

8. Booth P.J. et al. *Theirogenology*, 53, 211 (2000)

## ミトコンドリアが置換されているクローン牛の食品としての安全性

### 1. 核移植技術とミトコンドリア

核移植技術は全能性細胞である未受精卵(レシピエント卵子)にドナー細胞(受精卵由来の分裂割球あるいは体細胞)を導入して個体を作成する技術であり、作出されたクローン動物は遺伝的に同一の個体(ジェネティック・コピー)と考えられている<sup>1,2)</sup>。しかし、細胞の遺伝物質は核のみならず細胞質内のミトコンドリアにも存在している。牛も含めた家畜で使われている現在の核移植技術は、未受精卵とドナー細胞との融合によっており、細胞融合直後には2種類のミトコンドリアが混在するが、その後の胚発生の過程において導入した細胞のミトコンドリアは消失し、結果的にクローン家畜は未受精卵のミトコンドリアのタイプを持つことになる<sup>3, 4)</sup>。つまり、クローン家畜の遺伝的な同一性はあくまで核内の遺伝情報についてであり、未受精卵が同一個体に由来するものでない限り、クローン家畜はそれぞれ異なったミトコンドリアを持つことになる。このような現象は自然界では起こりえないことであり、置換されたミトコンドリアがクローン牛肉、クローン牛に由来する牛乳の安全性に与える影響について、現在知られている科学的知見から問題点を整理することが本章の目的である。

### 2. 細胞内でのミトコンドリアの機能

哺乳動物のミトコンドリアは細胞のエネルギー生産に関わる重要な細胞小器官であり、1個のミトコンドリア中には約10コピーのミトコンドリアDNAが存在する。ミトコンドリアDNAは16.5 kbの環状DNA分子であり、DNAの複製に関わるD-ループ領域、エネルギー生産に関与する13種のタンパク質とこれらのタンパク質の翻訳に関与する22種のtRNAと2種類のrRNAの情報を持っている。ミトコンドリアDNAの複製とその遺伝子発現の制御は細胞核の支配下にあり、この意味で核とミトコンドリアは密接に関わっている。

ミトコンドリアの存在部位は細胞質であると同時にそのDNAは核DNAのようにタンパク質によって保護されていないために、外的環境からの塩基変異を受けやすく、ミトコンドリアDNAは核ゲノムに比べて5-10倍の早さで変異が起こるといわれている<sup>5)</sup>。従って、ミトコンドリアDNAは高度に多型を示すと同時に、個体間でも変異がみられ、牛においても各個体のミトコンドリアを識別することが可能である<sup>6)</sup>。

一種類以上のミトコンドリアDNAが細胞内に混在することをヘテロプラスミーと呼ぶ。このような状態はまれであるが、自然界でも起こりうる。ヒトミトコンドリアDNAの変異によって引き起こされるミトコンドリア病ではヘテロプラスミーが認められるし、牛でも2種類のミトコンドリアDNAが同一の個体内で存在している場合がある<sup>7)</sup>。しかし、この場合でも、1~2世代で単一種のミトコンドリアDNAへの均一化が起こる<sup>8)</sup>。これは、卵子形成あるいは初期胚発生の過程で単一のミトコンドリアDNAに均一化される“ボトルネック効果”と呼ばれる仮説によって説明されている<sup>9)</sup>。

### 3. 受精とミトコンドリア

受精にともなって、精子と卵子は融合する。両者の細胞は異なるミトコンドリアを持つため、受精直後には2種類のミトコンドリアが混在するヘテロプラスミーとなる。ここで生じるヘテロプラスミーは核移植時に起こるそれと類似し、受精は自然界で起こる高度に分化した精子細胞による核移植と考えることもできる。しかし核移植と異なる点は、受精後精子のミトコンドリアは卵子細胞質内の蛋白分解酵素(プロテオソームあるいはライソゾーム)によって順次分解され<sup>10)</sup>、卵子に由来するミトコンドリアが残されることである。マウスでは、ミトコンドリアDNAは第一分裂期の前後に分解され<sup>11)</sup>、牛のミトコンドリアDNAの消長は不明であるが、ミトコンドリア自体は第4分裂期の16細胞期にはすでに消失しているといわれている<sup>12)</sup>。いずれにしても、哺乳動物では精子由来のミトコンドリアは胚発生の初期には消失することから、次世代へのミトコンドリアの伝達は卵子に由来する母系遺伝の伝達様式をとっていると考えられている<sup>13)</sup>。

しかし、哺乳動物以外の動物種、例えばミユール貝、カタクチイワシ、ミツバチ、ショウジョウバエでは受精後も精子由来のミトコンドリアが残存しているし<sup>14)</sup>、哺乳動物(マウス)でも異種間の受精の場合には精子のミトコンドリアが残存することが知られている<sup>13)</sup>。最近では、ヒトやチンパンジーのミトコンドリアDNAに起こる変異を統計的に解析すると、これまでの母系遺伝によるミトコンドリアの伝達様式では説明できず、精子由来のミトコンドリアが残存する可能性が指摘されている<sup>15)</sup>。また、ヒト卵細胞質内に精子を注入した実験において、精子由来のミトコンドリアが残存する例も示されている<sup>16)</sup>。卵子内に含まれているミトコンドリアDNA数(20万分子)に比べて、精子のミトコンドリアははるかに少なく(50-75分子)、過去のミトコンドリアDNAの解析では検出できなかった量の精子ミトコンドリアDNAが残存している可能性がある。また、線虫ではミトコンドリアDNA間で組換えが起こることが示唆されており<sup>17)</sup>、卵子と精子のミトコンドリア間で組換えが起こり、このことが個体間でのミトコンドリアの多様性を説明する上で考慮するべき点かもしれない。

もし精子由来のミトコンドリアが残存する可能性がある場合、そのことが個体形成にどのように影響を及ぼすのかについては想像の域をでないが、ミトコンドリアと核との密接な関係を考慮すれば、その関係に不適合が起こった場合には、核遺伝子の発現異常、細胞死(アポトーシス)、染色体異常などが起こりうる。このことが、自然界でも通常認められる流産などの一因となっている可能性を否定できない。

### 4. 核移植とミトコンドリア

核移植技術は手法上の違いから大きく3つに大別される。つまり、1)電気融合法を用いた細胞融合<sup>18)</sup>、2)センダイウイルスの膜融合活性を利用した方法<sup>19)</sup>、3)ガラス針による細胞質内注入による方法<sup>20)</sup>、である。しかし、未受精卵に細胞核を移植するという点で3者は基本的に同じである。牛を含めた家畜類では、ほとんどの場合が1)の手法によって行われている。核移植の結果として、未受精卵に由来する細胞質とドナー細胞由来



の細胞質は一体化することになり、細胞質に含まれる2種類のミトコンドリアが混在する状況が生まれる。すでに記したように、自然界においても受精の過程で一時的に卵子と精子のミトコンドリアが混在するが、精子のミトコンドリアは受精後の早い時期に消失する。核移植後のドナー細胞のミトコンドリアも精子と同様の挙動をとる。つまり、受精卵クローンの場合、ドナー細胞に由来するミトコンドリアは胚盤胞期までには消失し、一部の例外はあるが<sup>21)</sup>、受精卵クローン牛にはドナー細胞由来のミトコンドリアは認められない<sup>3)</sup>。体細胞クローン牛では、現在のところドナー細胞由来のミトコンドリアは確認されていない<sup>22)</sup>。つまり、受精と核移植におけるミトコンドリアの挙動は極めて似通っているが、そこから生じる個体のミトコンドリアの構成が異なっていることになる。受精の場合には卵子由来のミトコンドリアから構成されているのに対し、核移植ではドナー細胞に由来する個体の複製を目的としていながら、核移植後のミトコンドリアの分解という自然のふるいかけられる結果、ミトコンドリアの大部分は未受精卵由来のものとなる。クローン動物において生じる新たなミトコンドリアと核との関係が、クローン動物の生物として健全性、ひいては食品としての安全性が問題となってくるわけである。

マウスでは、受精卵へのカリオプラスト(核を含む細胞質)の融合や細胞質融合、あるいはミトコンドリアそのものの細胞質内注入によって、人工的に異なった個体に由来するミトコンドリアをもつマウスや2種類のミトコンドリアを持つヘテロプラスミックマウスが作出されている。これらのマウスが遺伝的に亜種の関係にある場合、ヘテロプラスミックマウスとして正常に繁殖させることができる<sup>23, 24)</sup>。この場合、導入したミトコンドリアに完全に置換する場合もあれば、逆に受精卵のミトコンドリアが維持される場合もある。このような法則性のないミトコンドリアの伝達様式がなぜ起こるのかについては不明であるが、単に導入するミトコンドリアの量によっている可能性もある<sup>25)</sup>。体細胞クローンと受精卵クローンでは、ドナー細胞の大きさの違いから導入するミトコンドリアは約30倍量異なっており、受精卵クローン牛ではドナー細胞のミトコンドリアが残る場合があることも、それを裏付けているように思われる。

いずれにしても、亜種の関係にあるマウスにおいては、別の個体に由来するミトコンドリアを持っていても、ミトコンドリアがヘテロプラスミーとして混在する場合においても動物の生存にとって重大な影響が及んでいる可能性は低い。一方、あるマウスの受精卵に、このマウスとは異種の関係にあるミトコンドリアを導入した場合にもヘテロプラスミーは起こる。しかし、この場合には先の亜種間のマウスの場合とは異なり、胚発生初期の段階で胚の生存性は著しく低下する<sup>26)</sup>。進化的に離れた動物種のミトコンドリアが導入された場合には、核とミトコンドリアとの共存関係がうまくゆかず、胚発生を低下させると考えられる。

牛を含めた家畜類の核移植の場合、未受精卵とドナー細胞のミトコンドリアは同種の関係にある。例えば、わが国で行われている核移植では、和牛とホルスタイン種間の様々な組み合わせの未受精卵とドナー細胞を使って行われている。これらの品種はいずれも遺伝的には *Bos taurus* に属する近縁種で、異種のミトコンドリアを導入されたマウス胚のよう

な核移植後の胚発生の有意な低下が認められるわけではなく、自然の受精に近い体外受精の発生率と何ら変わるところがない。ミトコンドリアと核は密接な関係を保っており、両者が進化的に離れている場合には相性の問題が出てくる。しかし、現在牛で行われている同種間の核移植で見られる流産、出生直後の死産原因をミトコンドリアと核との不適合に帰する科学的根拠はなく、その原因は不可逆的な細胞分化の過程を経ている細胞を核移植によって脱分化させ、個体形成する過程で起こっている異常ととらえるのが妥当であろう。

## 5. ミトコンドリアDNAの変異とミトコンドリア病

ミトコンドリアは細胞のエネルギー生産に重要な細胞小器官であるので、ミトコンドリアDNAにおこる変異の状況によっては、個体の生存性に影響が及ぶものがある。例えば、ヒトでもミトコンドリアDNA内の突然変異と関連しておこるいくつかの疾患が知られている(27)。レーバー病(遺伝性視神経萎縮症)、ミトコンドリア脳筋症、ピアソン症候群などがこれにあたる。疾病の出現部位は高いエネルギー生産が求められる脳や筋肉に多く、ミトコンドリアDNAの突然変異によってエネルギー代謝に異常が起こり、乳酸アシドーシス(酸性症)やアポトーシスによって疾病が出現すると考えられる。細胞内には変異ミトコンドリアと正常なミトコンドリアが共存しているが、変異型は何らかの理由で正常なものより複製能が高く、時間の経過とともに細胞内に蓄積され、変異ミトコンドリアの量がある閾値を超えると症状が現れると考えられる。しかし、これらの疾患が必ずしも母性遺伝によって子孫に伝達されているわけではない。母性遺伝するためには卵細胞質にミトコンドリア変異が蓄積される必要があり、たとえそのようなことが起こったにしても、胚発生の過程でエネルギー生産に支障があれば胚発生の停止や流産に至る可能性が高い。また、ミトコンドリア病の伝達様式から、これらの病因が単にミトコンドリアにおける突然変異によってのみ説明できるわけではなく、核の遺伝的変異とも関連しているといなければならない。しかし、ミトコンドリアと核は同一の細胞内にあり、細胞レベル、個体レベルでの両者の役割を分けて考えることは難しい。この意味で、まったく異なったミトコンドリアを有する細胞に核を導入できる核移植技術は両者の相互関係を解明する上で有用な実験系を提供しうる。

いずれにしても、細胞内のミトコンドリアDNAは個体発生の過程において、自らの複製と娘細胞への均等分配を忠実に繰り返しているのではなく、DNAを構成している塩基は常にダイナミックに変化していると考えられる。個体に見られるミトコンドリアの多様性を考えれば、むしろ当然のことといえる。ヒトのミトコンドリア病に見られるような表現型への影響は、偶発的に細胞核あるいはミトコンドリアに起こった多くの変異の中で、核とミトコンドリアに生じる不適合の結果であり、家畜においても過去に同様の現象が起こっていても不思議ではない。しかし、これらの変異は年齢とともに蓄積されるのが一般的であり、肉用牛の場合は生後3年以内で、また乳用牛でも7~8年が牛の耐用年数(食品として出荷される期間)であることを考えると、乳・肉生産の過程ではこれらの異常が表面的にでてこない状

況にあるのかもしれない。

## 6. ミトコンドリアの動物個体表現型への影響

ミトコンドリアが家畜の表現型、特に乳・肉生産に及ぼす影響について検討しているいくつかの報告がある。乳牛において、乳生産量の低い家系と高い家系のそれぞれを特徴づけるミトコンドリアの変異を見いだすことはできないが<sup>7)</sup>、乳脂率は変異と関係しているといわれている<sup>28)</sup>。また、肉用牛(和牛)のミトコンドリアDNA変異は肉質と相関するという報告もある<sup>29)</sup>。しかし、核の遺伝情報に大きなバリエーションのある家畜において、乳質や肉質などの経済形質をミトコンドリアだけの影響として論ずることは難しい。

マウスでは、核の遺伝情報が均一化した多くの近交系が樹立されていることから、異なった個体のミトコンドリアを導入することによって表現型に対するミトコンドリアの影響をより正確に予測できる。例えば、ミトコンドリアが母系遺伝することを利用して、2種類の近交系マウス(C57BLの雄と*Mus spretus*雌)を交配すれば、次世代には*Mus spretus*のミトコンドリアを持ちC57BLと*Mus spretus*の核が半分ずつ混在するマウスができる。このマウスにC57BLの雄を20代以上交配し続けると、核の遺伝情報はC57BLでありながら*Mus spretus*のミトコンドリアを持つミトコンドリアコンジェニックマウスを作ることができる。このマウスをそれぞれの近交系マウスとの間で成長、運動性、各種臓器の重量、採食性などの表現型を比較すると、両者で有意な差が生じることが分かっている<sup>30)</sup>。C57BLと*Mus spretus*はミトコンドリアDNAの塩基配列の違いから進化上は異種の関係にある。亜種の関係にあるマウスで同様なことをすると表現型は異種ほどの差を生じないことから、ここで見られた表現型の差は、異種に由来するミトコンドリアあるいはミトコンドリアと核との相互関係によってもたらされたものであると推察できる<sup>30)</sup>。同様のことは胚発生にもいえる。C57BLと*Mus spretus*のミトコンドリアを持つコンジェニックマウスにおいて、それぞれの胚は体外での発生能に差があり、コンジェニックマウスの胚は体外の培養条件に極めて感受性が高く、胚発生率は極端に低下する<sup>31)</sup>。

ミトコンドリアコンジェニックマウス系統の作出には20代以上の交配を必要とするが、核移植では1世代でミトコンドリアコンジェニック動物を作出することができるわけで、個体形質へのミトコンドリアと核の不適合性を考慮する必要がある。繰り返しになるが、わが国における牛の核移植に用いられている未受精卵とドナー細胞の由来は、核もミトコンドリアも進化的には極めて近縁の同族種の関係にある。上記のマウスの例から考えると、クローン牛においてミトコンドリアの置換が起こったとしても、それが表現形質にまで影響を及ぼす可能性は考えにくく、あるとしても個体差と区別できないくらいに低いと考えるのが妥当であろう。実際、これまでに作出されてきた受精卵クローンと体細胞クローンについて、クローン牛間あるいはドナー細胞の由来となった元牛との間で成長、体高等の基本的な表現型を見る限りにおいて大きな差は見いだされていない。

## 7. クローン牛肉、クローン牛由来のミルクの食品としての安全性とミトコンドリアの影響

本章で検討してきた点は、核移植を使ったクローン牛の生産において、生産された牛がドナー細胞のミトコンドリアのタイプではなく、未受精卵のそれに置き換わることが知られており、このことが核移植を行っていない通常の牛と比べた場合に動物の表現型、特に肉質や乳生産にどのような差が生じるのかということにある。哺乳動物のミトコンドリアに関する研究の歴史は60年に満たないものであり、ミトコンドリアそのものの機能、細胞レベルでのミトコンドリアの伝達能、ヒトに見られるミトコンドリア病に関する研究の蓄積はあるものの、ミトコンドリアと核との相互作用や動物個体の表現型へのミトコンドリアの関与については研究が始められたばかりである。

このような状況下で、現在までに得られている科学的データに基づいて、ミトコンドリアが置換されたクローン牛の食品としての安全性について以下のようにまとめることができる。

個体形成の出発点は受精卵であり、核移植の場合には細胞核が未受精卵に移植されたときに胚の発生が始まる。いずれの場合にも発生開始直後には2種類のミトコンドリアが混在するヘテロプラスミーとよばれる状態になる。その後、受精の場合には精子、核移植の場合にはドナー細胞に由来するミトコンドリアは細胞質内で分解され、卵子由来のミトコンドリアとなる。この意味で発生開始時のミトコンドリアの挙動は自然の摂理に従った様式をとるが、核移植の場合問題となるのは、ドナー細胞を提供した牛をクローン技術によって複製しようとしているにもかかわらず、ミトコンドリアは未受精卵のタイプに置き換わることにある。ミトコンドリアDNAの発現は細胞核の支配下にあるために、核移植によって置き換わったミトコンドリアと核との相性の問題が生じる。マウスを用いた実験から、ミトコンドリアと核が異種の関係にある場合には、胚発生は阻害され、子孫を残すための繁殖能も低下する。生まれた子孫はその後正常に生存するが、体成長、運動性、臓器重量などの表現型はオリジナルの近交系マウスと異なっている。従って、進化的に遠縁の関係にある核とミトコンドリア間の不適合性は動物の繁殖能に影響を及ぼす。しかし、亜種あるいは同種のミトコンドリアが存在する場合には、繁殖能の低下も認められないし、受精卵クローンや体細胞クローン胚の発生率はすでに行われている体外受精などの成績と比べて何ら変わることはない。このことは、進化的に近縁の動物種間での核とミトコンドリアの不適合の可能性は低く、クローン牛生産の過程で生じる異常出産は核移植後の核のリプログラミングが正常に起こっていないことが主たる要因であると考えられる。

現在、牛の生産は肉牛、乳牛に限らずほとんどすべての場合人工授精技術に依存している。過去には、欧米牛と和牛との間で人工授精し、欧米系の乳・肉生産形質を和牛に導入して家畜の改良を図ってきた歴史的経緯があり、また、現在でもホルスタイン種を妊娠させて牛乳を生産させるために、ホルスタインへの和牛精子の人工授精はごく一般的に行われている。この場合、生産された牛の核は雑種となりミトコンドリアはホルスタイン種のものとなる。このように異なった品種間での核とミトコンドリアの関係においても、これ

まで食品の安全性を考慮すべき事態には陥っていない。以上を総合すると、核移植により未受精卵由来のミトコンドリアをもつようになったクローン牛は生物学的にまったく新しい存在ではなく、従来からの牛には存在しない新たな物質を保有することも考えられない。したがって、クローン牛が食品衛生上の問題を提起する科学的根拠は見あたらない。クローン牛の食品としての安全性は、これまで行われているとおり、屠畜場での臨床検査、牛乳においては成分検査によって食品としての的確さを判定する従来どおりの基準によって十分対応可能であると考えられる。

- 1) Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J. and Campbell, K. H.S. (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385, 810- 813.
- 2) Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J., Doguchi, H., Yasue, H. and Tsunoda, Y. (1998) Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, 282, 2095-2098.
- 3) Takeda, K., Takahashi, S., Onishi, A., Goto, Y., Miyazawa, A. and Imai, H. (1999) Dominant distribution of mitochondrial DNA from recipient oocytes in bovine embryos and offspring after nuclear transfer. *J. Reprod. Fertil.*, 116, 253-259.
- 4) Evans, M.J., Gurer, C., Loike, J.D., Wilmut, I., Schnieke, A.E. and Schon, E.A. (1999) Mitochondrial DNA genotypes in nuclear transfer-derived cloned sheep. *Nature Genet.*, 23, 90-93.
- 5) Brown, W. M., George, M. Jr. and Wilson, A. C. (1970) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 1967-1971.
- 6) Takeda, K., Onishi, A., Takahashi, S., Kojima, T. and Hanada, H. (1997) Genetic variations of bovine mitochondrial DNA D-loop region in Japanese Black, Japanese Brown and Horstein breeds. *Anim. Sci. Technol.*, 68, 1161-1165.
- 7) Hauswirth, W. W. and Laipis, P. J. (1982) Mitochondrial DNA polymorphism in a maternal lineage of Holstein cows. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 4686-4690.
- 8) Olivo, P. D., Van de Walle, M. J., Lapis, P. J. and Hauswirth, W. W. (1988) Nucleotide sequence evidence for rapid genomic shifts in the bovine mitochondrial DNA-loop. *Nature*, 306, 400-402.
- 9) Piko, L. and Taylor, K. D. (1987) Amounts of mitochondrial DNA and abundance of some mitochondrial gene transcripts in early embryos. *Dev. Biol.*, 123, 364-374.
- 10) Sutovsky, P., Moreno, R.D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C. and Schatten, G. (1999) Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature*, 402, 371-372.
- 11) Kaneda, H., Hayashi, J., Takahashi, S., Taya, C., Fisher Lindahl, K. and Yonekawa, H. (1995) Elimination of paternal mitochondrial DNA in interspecific crosses during early mouse embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 4542-4546.

- 12) Sutovsky, P., Navara, C. S., and Schatten, G. (1996) Fate of the sperm mitochondria, and the incorporation, conversion, and disassembly of the sperm tail structures during bovine fertilization. *Biol. Reprod.*, 55, 1195-1205.
- 13) Gyllensten, U., Wharton, D., Josefsson, A. and Wilson, A. C. (1991) Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature*, 352, 255-257.
- 14) Zouros, E., Ball, A. O., Saavedra, C. and Freeman, K. (1994) An unusual type of mitochondrial DNA inheritance in the blue mussel *Mytilus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91, 7463-7467.
- 15) Awadalla, P., Eyre-Walker, A. E. and Smith, J. M. (1999) Linkage disequilibrium and recombination in hominid mitochondrial DNA. *Science*, 286, 2524-2525.
- 16) St. John, J., Sakkas, D., Dimitriadi, K., Barnes, A., Maclin, V., Ramey, J., Baratt, C. and De Jonge, C. (2000) Failure of elimination of paternal mitochondrial DNA in abnormal embryos. *Lancet*, 355, 200.
- 17) Lunt, D. H. and Hyman, B. C. (1997) Animal mitochondrial DNA recombination. *Nature*, 387, 247.
- 18) Willardsen, S. M. (1986) Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*, 320, 63-65.
- 19) McGrath, J. and Solter, D. (1984) Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro. *Science*, 226, 1317-1319.
- 20) Wakayama, T., Perry, A. C., Zuccoti, M., Johnson, K. R. and Yanagimachi, R. (1998) Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 394, 369-374.
- 21) Steinborn, R., Zakhartchenko, V., Jelyazkov, J., Klein, D., Wolf, E., Muller, M. and Brem, G. (1998) Composition of parental mitochondrial DNA in cloned bovine embryos. *FEBS Letters*, 426, 352-356.
- 22) Evans, M. J., Gurer, C., Loike, J. D., Wilmut, I., Schnieke, A. E. and Schon, E. A. (1999) Mitochondrial DNA genotypes in nuclear transfer-derived cloned sheep. *Nature Genet.*, 23, 90-93.
- 23) Meirelles, F. V. and Smith, L. C. (1997) Mitochondrial genotype segregation in a mouse heteroplasmic lineage produced by embryonic karyoplast transplantation. *Genetics*, 145, 445-451.
- 24) Takeda, K., Takahashi, S., Onishi, A., Hanada, H. and Imai, H. (2000) Replicative advantage and tissue-specific segregation of RR mitochondrial DNA between C57BL/6 and RR heteroplasmic mice. *Genetics*, in press.
- 25) Muramatsu, H., Nagao, Y., Minami, N., Yamada, M. and Imai, H. (2000) Intra-specific transfer of liver mitochondria and their fate during embryogenesis after microinjection into mouse zygotes. *Theriogenology*, 53, 398.

- 26) Nagao, Y., Totsuka, Y., Atomi, Y., Yonekawa, H. and Imai, H. (1998) Effect of different type of mitochondrial DNA on preimplantation embryonic development in the mouse. *J. Reprod. Dev.*, 44, 129-134.
- 27) Wallace, D. C. (1992) Diseases of the mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Biochem.*, 61, 1175-1212.
- 28) Schutz, M.M., Freeman, A.E., Beitz, D.C. and Mayfield, J.E. (1992) The importance of maternal lineage on milk yield traits of dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 75, 1331-1341.
- 29) Mannen, H., Kojima, T., Oyama, K., Mukai, F., Ishida, T. and Tsujii, S.(1998) Effect of mitochondrial DNA variation on carcasses traits of Japanese Black cattle. *J. Anim. Sci.*, 76, 36-41.
- 30) Nagao, Y., Totsuka, Y., Atomi, Y., Kaneda, H., Fischer Lidahl, K., Imai,H. and Yonekawa, H. (1998) Decreased physical performance of congenic micewith mismatch between the nuclear and the mitochondrial genome. *Genes Genet.Syst.*, 73, 21-27.

## まとめ

人類は、野生の牛から出発し、何世紀もの長い時間をかけて家畜として優れた形質を持つ牛を求め改良を重ねてきた。今世紀には、精液の保存技術の開発に始まり、人工授精や受精卵(胚)移植の技術開発が進められ広く普及されるに至った。これら技術をベースに近年開発されるに至った核移植技術は、優良な雌雄牛の利用拡大、家畜改良の促進、生産効率の促進等を招来し、食料資源としての家畜牛の改良をさらに推進させるものとして期待されている。

人工授精では、凍結保存した精子を用いる。自然交配では、1頭の雄に対する年間交配頭数は50-100頭程度であるのに対し、1頭当たり数千-数万頭に増大できる。この技術の普及により、我が国においては繁殖牛頭数約200万頭に対し、雄牛は約2千頭しかない。

受精卵(胚)移植は、性腺刺激ホルモン投与によって過剰排卵を誘起した雌牛に人工授精を施し、回収した受精卵を別の牛の子宮に移植することによって子牛を生産する技術である。雌牛の場合は1生涯に多くても8-10産しかできないため、雌牛からの遺伝育種改良速度を早めることを目的として開発された技術である。我が国においては年間に1.1万頭の牛に過剰排卵処理を施し、得られた受精卵は4.5万頭に移植され、その結果1.5万頭の産子(全産子数の約1%)が生産されている。乳用牛候補種雄牛は約90%が受精卵移植牛で占められている。

体外受精においては、薬剤により受精能を付与した精子(自然交配においては精子は子宮内や輸卵管内の物質の作用によって受精能を獲得する)と成熟卵子を培養液内で数時間反応させることによって得た受精卵を約7日間体外で培養して胚盤胞期胚に発育させ、雌牛に移植する。我が国においては年間約9千頭に受精卵を移植し、1.7-2千頭の産子が生産されている。受胎率は生体内受精卵と比べ約10-15%低く、35%前後である。人工授精や胚移植と比べいくつかの問題点が指摘されており、羊膜水腫、四肢の屈曲、過大子症候群等の発生が報告されている。

初期胚核移植においては、過剰排卵処理してから人工授精することによって子宮内から得られた初期胚(16-32細胞期)の細胞を、除核した後に活性化した成熟卵子に物理的に挿入してから、電気刺激により両細胞を融合することによって核移植胚が得られる。それを体外培養してから牛の子宮に移植する。我が国においてはすでに約500頭の産子が得られている。



体細胞核移植では、初期胚核移植における初期胚細胞の代わりに、継代培養したのち血清飢餓培養をした体細胞を用いる。我が国においては、1999年末までに111頭が出生し、そのうち19頭が死産であった。流死産胎子と生後直死産子27例の病理所見からは、新規な病理変化は見い出されていない。生時体重はそれぞれの品種の平均値よりも約10kg大であったが、子牛の発育・体重推移に通常繁殖動物との間の相違は認められていない。産子のうち雌牛2頭については人工授精によって受胎が確認されている。雄牛についても精液性状と受胎能力が正常範囲であることが報じられている。

体細胞核移植胚の胚盤胞への発生率は融合した卵子の20-50%、これら胚盤胞を受胎牛に移植した場合の受胎率は30-50%、分娩に至る受胎牛は5-20%であることが認められている。流死産や生後直死、奇型等の産子の異常の出現率は、体外受精卵移植の場合よりも大きい。その理由として、核の初期化が不完全または不適切であることの可能性、ドナー細胞核の遺伝子の一部に不可逆的变化が生じることの可能性が考えられている。

体細胞クローン牛においては、体温、血中炭酸水素イオン濃度、血中グルコース濃度、血中成長ホルモン濃度、血中レプチン濃度、血中IGF-II濃度、血中GFBP-1、-2、-3、-4濃度は、生後直後においては異常値を示す個体があるが、正常に成長する個体においてはやがて正常値に復すことが認められている。同一年令の通常繁殖動物に比してテロメア長が有意に短いことが認められていることから、細胞の自己死の起こるテロメア長に早く達することが考えられるが、同一動物種の同年令動物間でもテロメア長の分布は幅広いため、そのことが個体そのものの生存期間内に起こるかどうかは不明とされている。最近では、老化させたドナー細胞からのクローン牛では、かえってテロメア長が長くなるとの報告もある。初期胚の核移植を施した胚盤胞期胚の染色体の倍数性異常は、体外受精により得られるものとほぼ同じであり、核移植操作による異常の増加が見られないことが報告されている。

核移植の結果、未受精卵由来の細胞質とドナー細胞由来の細胞質が一体化し、2種類のミトコンドリアが混在する状況が生まれるが、体細胞クローン牛においては現在までドナー細胞由来のミトコンドリアは確認されていない。ドナー細胞のミトコンドリア量が、体細胞クローン牛に比して著しく多い受精卵クローン牛においては、ドナー細胞のミトコンドリアが残っている場合が認められている。しかし、マウスにおいて、異種間のミトコンドリアの混在によっては発生初期の胚の生存性が低下するのに対し、亜種間のミトコンドリアの混在の場合にはこのようなことが認められていない。我が国における牛の核移植に用いられる未受精卵とドナー細胞の由来は、核もミトコンドリアも進化的には極めて近い同族種の関係にあることから、核移植牛に見られる流死産と生後直死をミトコンドリアの混在に帰することはできず、また、たとえクローン牛においてミトコンドリアの置換が起こったとしても、表

現型にまで影響をおよぼす可能性は考えがたい。

以上を要約すると、(1)受精卵クローン牛や体細胞クローン牛においては、流死産や生後直死の発生頻度が従来技術によって生産された牛に比して高い傾向が認められているが、順調に生育する牛も多数存在し、それら個体については調べた限りにおいては各種生理機能を含め特段の異常がこれまで認められていない。(2)植物や微生物、は虫類以下の動物の中には、極めて微量または少数でヒトに対して毒性や病原性を発現し、食品として摂取した場合にヒトに危害を招来するものが少なからず存在する。しかし、ほ乳類や鳥類については、その構成成分であるタンパク質が一部のヒトにアレルギーを招来することはあっても、ヒトが食品として食した場合に、構成成分自体がヒトに毒性や病原性を発現することは知られていない。(3)受精卵クローン牛や体細胞クローン牛において、構成成分として新規に毒性物質や病原物質が生産される可能性を示すような科学的知見は得られていない。

したがって、受精卵クローン牛や体細胞クローン牛に特有な、食品としての安全性を懸念する科学的根拠はない。しかし、その時代時代における科学的知見には自ずと限界があり、新しい技術については多面的な角度からのデータの集積によって安全性を確認する努力が払われるべきである。成長した受精卵クローン牛や体細胞クローン牛の両者には本質的な差はなく、現時点で得られている限りの知見からは食品としての安全性を危惧する根拠はないが、より多数のクローン牛について、生理的・機能的データ、乳肉に関するデータをとることによって安全性の裏づけを得ることが望まれる。