

厚生労働科学研究費補助金(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)
「バイオテクノロジー応用食品の安全性確保及び高機能食品の開発に関する研究」

分担研究報告書

クローン牛の食品としての安全性

分担研究者 熊谷 進 東京大学大学院農学生命科学研究科

研究要旨

国内外でこれまでに得られている知見は、生後1ヶ月以上生存した体細胞クローン牛個体は、一般牛と同程度に正常に生育し、一般牛と差異のない生理機能をもつことを示している。したがって、一般牛に比べ、クローン牛個体が、ヒトを含めほ乳動物に対して生物作用をもつ物質を多量に産生したり、新規な生物活性物質を産生していることは考えがたい。

クローン牛の肉と生乳についての構成成分に関する知見は、それら乳肉の構成成分が一般牛と異なること、ならびに栄養機能の点において一般牛の肉や生乳と類似していることを示している。さらに動物への給餌試験の結果は、ヒトが通常摂取している量に十分匹敵する量のクローン牛の肉または生乳をラットに給餌しても、健康を損なうことがないことを示しており、栄養的にも一般牛の肉や生乳と同等の機能をもつことを示している。

したがって、受精卵クローン牛や体細胞クローン牛については、従来技術により産生された牛にはない特有の要因によって食品としての安全性が損なわれることは考えがたい。ただし、クローン技術は新しい技術であるために、クローン牛由来の食品の安全性については、慎重な配慮が必要である。クローン牛の人獣共通感染症等疾病への罹患、あるいは同牛由来の乳肉における有害化学物質の残留などによって、安全性が損なわれることのないような慎重な対応が必要である。こうした配慮の下に、その安全性を危惧させる要因が新たに検知された場合には、速やかにその要因を排除できる対応が必要である。

協力研究者

入谷 明(近畿大学生物理工学部)、今井 裕(京都大学大学院農学研究科)、小野憲一郎(東京大学大学院農学生命科学研究科)、鎌田博(筑波大学生物科学系)、高橋清也(独立行政法人農業技術研究機構畜産草地研究所)、角田幸雄(近畿大学農学部)、土井邦雄(東京大学大学院農学生命科学研究科)、山内一也((財)日本生物科学研究所)、吉倉 廣(国立感染症研究所)

A. 研究目的

平成11年度中間報告書において以下の結論を得ている。

(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・機能的データおよび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。

この報告書以降現在までに国内外で多数の知見が得られている。本分担研究では、それらのうち特に食品としての安全性に関連する知見に基づいて、クローン牛の食品としての安全性について考えを求めることが本研究の目的である。以下、クローン牛の食品としての安全性、

家畜繁殖技術研究の歴史的展開、クローン牛の食品としての安全性におけるミトコンドリアの問題、核の初期化と発生異常について考察する。

B. 研究方法

都道府県や大学等の試験研究機関において生産された体細胞クローン牛の育成状況や繁殖能力について、既に報告されている文献を収集するとともに、農林水産省の協力の下に情報を収集するとともに、その他国内外の体細胞クローン牛関連の文献も収集し、それらの中から関連する知見を抜き出し整理した。

C. 研究結果及び考察

クローン牛の食品としての安全性について

1. クローン牛の生育に関する知見

農水省は、我が国の試験研究機関によるクローン牛の開発状況をとりまとめている。

体細胞クローン牛は、平成14年8月14日時点で、出生頭数は312頭である (Table 1)。そのうち育成または試験中で生存している牛が140頭 (44.9%)、死産と生後直死の合計が97頭 (31.1%)、病死等が53頭 (17.0%)、事故死が1頭 (0.3%)、試験と殺が21頭 (6.7%) である。

病死等の時期としては、生後まもない時期の死亡が多く、53頭のうち1ヶ月齢以後での病死等は16頭 (30.2%) で、そのうち6ヶ月齢以上の病死は1頭のみである。試験と殺21頭のうち原因が報告されている例数は4頭で、そのうち3頭は4ヶ月齢未満であった。事故死例は5ヶ月齢の牛に認められている。図1の「死亡年齢と頭数」に、病死および試験と殺(以上が報告されている例およびと殺理由が報告されていない例)の年齢と頭数を示した。生存牛の頭数(図2「生存年齢と頭数」)を考え合わせると、1ヶ月齢以降の死亡頻度は極めて少ないといえる。

特定された病死等の原因は、免疫不全、下痢による衰弱死、腸炎、肺炎、敗血症、リンパ系組織の形成不全、起立不能、臍帯周辺部の炎症、消化不良、および肺炎・肺気腫であった。平成14年9月14日時点で生存している140頭のうち、約40頭が3歳以上で、そのうち数頭は4

歳に達している。

受精卵クローン牛の状況については、平成14年8月14日時点で、出生頭数が663頭である。そのうち育成または試験中で生存している牛が126頭(19.0%)、死産と生後直死の合計が100頭(15.1%)、病死等が91頭(13.7%)、事故死が20頭(3.0%)、試験と殺が24頭(3.6%)であった。死産、生後直死および病死の事例の全体に占める割合は、体細胞クローン牛の場合よりも小さかった。

食肉として処理されたことが確認された頭数は202頭(30.4%)であった。

体細胞クローン牛の子牛については、平成14年9月の時点で、52頭の子牛が人工授精によって妊娠した体細胞クローン雌牛から生まれ、これらのうち最高齢の子牛は1歳9ヶ月齢に達している。52頭のうち死産は3例、1ヶ月齢未満での病死が3例で認められた。体細胞クローン雄牛9頭の子牛については、それらの精子により合計49頭の子牛が生まれ、最高齢の子牛は1歳10ヶ月齢に達している。それらのうち、1例で死産が記録されている。

Pace ら (Biol.Reprod., 67, 334-339, 2002) は、胎児または成熟個体由来の細胞をドナーとしたクローン胚2170個のうち、535個が着床し、106頭の子牛が生まれ、82頭が5~29ヶ月齢で健全に生存していること、雌牛は約10~11ヶ月齢で春季発動を示し、人工授精を受けた22頭の全てが妊娠したことを報告している。

Fairburn ら (Current Biol., 12, R68-70, 2002) によれば、着床前のクローン牛の胚が、体外受精胚に比べ異常な DNA メチル化パターンを示すことが見出されており、こうした欠陥が発育異常と低出生率の原因の一部となっているらしいが、DNA メチル化パターンの異常がクローン胚における異常な転写の原因となっていることを

示す直接的な証拠は得られていない。

最近、一部の受精卵クローン牛や体細胞クローン牛において、ドナー細胞のミトコンドリア DNA が検出され、2種類以上のミトコンドリアが混在する状況(ヘテロプラスミーとよぶ)が生まれうることを示唆されている (Biol. Reproduct., 68, 159-166, 2003; Genetics, 162, 823-829, 2002)。しかし、自然界の牛にもヘテロプラスミーが存在していることから、また、マウスにおけるミトコンドリアと核との相互関係に関する報告などから、進化的に極めて近縁の動物種のみならず、由来するクローン牛の場合、核とミトコンドリアの適合性は高いと予想され、表現型への影響も少ないと考えられている(本報告著「ミトコンドリアの関与」参照)。

久保は、我が国において産出された体細胞死亡クローン牛について病理学的検索を行った。1ヶ月齢以上の時点で死亡した10例の牛の病理所見として、骨格筋の変性(2例)、免疫系組織形成不全(7例)、気管支肺炎(1例)、貧血(1例)、股関節形成不全(1例)、肺炎(1例)、糸球体腎症(1例)、白筋症(1例)、下垂体性小児症(1例)、コクシジウム感染(1例)などが認められているが、クローン牛に特有な新規の病理所見は認められなかったとしている。この知見は、体細胞クローン牛の病理学的異常を、従来のと畜検査で摘発できることを示唆している。

Heyman ら (Biol.Reprod., 66, 6-13, 2002) は、成熟個体由来体細胞クローン胚、胎児由来体細胞クローン胚および受精卵クローン胚の発育を比較した研究において、雌牛に移植されたそれらの胚が発育して出生に至った割合は、それぞれ6.8%(9/133)、15.0%(6/40)、34.3%(23/67)であり、人工授精胚の49.0%(25/51)より低いことを報告している。成熟個体由来体細胞クローン牛9頭のうち、3頭は1ヶ月齢以

前に死亡したが、6頭は正常に発育したことが認められている。

生育に伴う体重については、8ヶ月齢までの2頭の体細胞クローン牛の体重を追跡した結果、一般牛と差異のない成長が認められている (Sakaguchi et al., J. Reprod. Develop., 46, 265-269, 2000)。4頭の体細胞クローン牛の1歳時の体重を、それぞれのドナー牛および36頭の一般牛の平均体重と比較した報告によれば、4頭のうち3頭においては、一般牛平均体重およびドナー牛体重に比して低値であったが、その差は育成環境や試験時期の相違によると考えられている (鹿児島県肉用牛改良研究所研究報告第6号20～23(2001))。

以上の知見は、(1)とくに体細胞クローン牛において、流死産および生後直死の頻度が高いこと、(2)現時点で、このような発生以上の原因は不明であること、(3)しかし、生後1ヶ月齢までに死亡を免れた個体は、雌雄ともにその後順調に成育し仔を産することができること、(4)そのような個体の死亡例に、クローン牛特有の病理所見は認められないことを示している。

2. クローン牛の生理機能に関する知見

Chavatte-Palmer ら (Biol.Reprod., 66, 1596-1603, 2002) は、体細胞クローン牛の内分泌機能等を、人工授精子牛と体外授精子牛から成るコントロール牛群と比較した。クローン牛においては、臨床症状は認められないけれども、コントロールよりも体温が高かった。しかし、クローン牛の血漿中甲状腺ホルモン(T4)濃度は、15日齢まではコントロールよりも低かった。IGF-I濃度は両群間で差がなく、IGF-II濃度には有意差が認められたが、大きな差ではなく、20日齢以後、有意差は認められていない。IGFBPにも著しい差異は認められていない。レプチン濃度は、1週齢時まではクローン牛の方

が有意に高いが、最も高い時点での平均濃度は約2.5倍にすぎず、15日齢以後は差が認められていない。成長ホルモン濃度およびACTHによるコルチゾール分泌にも差は認められていない。

Enright らは (Biol.Reprod., 66, 291-296, 2002)、4頭の体細胞クローン雌牛と4頭の同年齢同体重コントロール雌牛を用いて繁殖機能を比較している。春季発動はクローン牛の方が有意に遅いが、発情周期の長さや成熟卵胞径には差異がなく、LH、FSH、エストラジオール、プロゲステロンなどのホルモン濃度の変化にも差は認められていない。これらの成績から、クローン牛の下垂体・性腺軸とフィードバック機構は正常に発達していると考えられている。

Lanza らの実験では (Science, 294, 1893-1894, 2001)、生まれた30頭の体細胞クローン牛のうち、生後直死の5頭と149日齢に腸疾患で死亡した1頭を除き、24頭は1～4年間は健康に生存している。体温、呼吸数、心拍数等の一般所見は正常で、春季発動も予測された通り10～12ヶ月齢で体重が318～365kg時に見られた。2頭は人工授精で子牛を出産し、いずれも見かけ上正常に育っている。24頭については、ヘマトクリット、ヘモグロブリン、血球数、白血球分布などの血液学的パラメーターに加え、電解質、尿素、クレアチン、グルコースなどの血液生化学的パラメーターも、グロブリンと総たんぱく濃度が若干低いことを除けば、すべて正常の範囲内の値であった。尿の臨床検査によっても異常は認められていない。IgG、IgA および IgM の比率にも異常は認められず、抹消血リンパ球についても、牛白血球クラスIとII、CD4とCD8、CD45などは通常牛と比べて有意差がないことから、これらのクローン牛の免疫系は正常な機能を有していると考えられている。

2頭の体細胞クローン雄牛の精子による人工受精を、それぞれ12頭の雌牛に対して行った結果、受胎率はそれぞれ67%および50%、分娩し産子が生産されたのは50%および42%と、繁殖性の上で問題が無いことが報告されている(鹿児島県肉用牛改良研究所研究報告第6号42~45(2001))。

(社)畜産技術協会のクローン牛利用緊急調査事業では、一般乳牛と体細胞クローン乳牛の各3頭について、妊娠3,6,9ヶ月目、分娩後3,6週目に、また、受精卵クローン牛3頭については分娩後3,6週目に、それぞれ採血し、血液性状を検査した。また、一般和牛3頭、体細胞クローン牛1頭および受精卵クローン牛1頭についても21~29ヶ月齢の間に採血し、血液性状を検査した。その結果、項目によってはクローン牛の検査値が正常範囲からわずかに逸脱していたが、一般牛との間に大きな差は認められていない。

以上の知見は、生後直死を免れて順調に発育するクローン牛個体については、繁殖機能およびその他生理機能が、一般牛のものと同等であることを示唆している。

3. クローン牛由来の乳肉の成分

(社)畜産技術協会のクローン牛利用緊急調査事業により、生乳および肉の栄養成分の分析、消化試験、アレルギー試験、小核試験およびラットへの14週間給餌試験が行われた。

一般乳牛と体細胞クローン乳牛の各3頭および受精卵クローン牛2頭から、分娩後3,6週の2時点で朝夕に採取した生乳を泌乳量の割合で混合し、分析用試料とした。肉は、一般乳牛2頭および体細胞クローン牛と受精卵クローン牛各1頭からの部分肉を入手し、チルド状態で皮下脂肪および筋間脂肪塊を除去後、9部位について粉碎して均一化したものを分析用試料と

した。分析項目は、たんぱく質など一般成分7項目、アミノ酸18種類および脂肪酸16種類とした。

生乳の蛋白質と脂質含量は、体細胞クローン牛が他の牛よりも多い傾向が見られたが、その値は「日本食品標準成分表」における一般的な牛乳の値とほぼ同様であった。

肉では、部位による差が認められたほか、「日本食品標準成分表」における一般的な牛肉と比較すると、蛋白質に比べて脂質含量が高く、この傾向は体細胞クローン牛および受精卵クローン牛で明らかであった。これは、肉質に対する格付けが、一般牛については2頭がA-3、1頭はA-2であったのに対して、受精卵クローン牛はA-4、および体細胞クローン牛はB-4と、両クローン牛の肉の品質が一般牛と比べて高かったことによると考えられている。アミノ酸組成と脂肪酸組成は、一般牛3頭の値および「日本食品標準成分表」の値からみて、個体によるバラツキの範囲内にあり、受精卵クローン牛および体細胞クローン牛に特徴的なパターンは認められていない。

黒毛和種一般牛1頭(生後1日)と黒毛和種体細胞クローン牛(生後4日)の肉について、人工胃液および腸液中でのin vitro消化試験が行われた。また、一般乳牛、体細胞クローンおよび受精卵クローン牛由来の生乳および肉の乾燥粉末(飼料中たんぱく質13.09%に配合)について、ラット(雄)を用いるin vivo消化試験も行われた。いずれの試験によっても、受精卵クローン牛および体細胞クローン牛の生乳および肉の蛋白質を指標とした消化率は、一般牛のそれと比べて差が認められていない。

一般牛、体細胞クローン牛および受精卵クローン牛由来の生乳および肉の乾燥粉末のアレルギー性を調べる目的で、マウスを用い、乾燥

粉末上清を腹腔内投与して感作し、2週間後に乾燥粉末上清を腹壁内に投与し、同時に静脈内投与した色素の漏出によってアレルギー性を比較した結果、牛間で差が認められなかった。

一般牛、受精卵クローン牛および体細胞クローン牛の生乳乾燥パウダー(各3頭分)を2.5、5および10%、肉乾燥パウダー(各2頭、1頭、1頭分)を1、2.5および5%濃度で配合した各3種類の試験飼料を作製し、それらを14日間給餌して小核試験を行った。試験飼料群と陰性対照群の間に有意差は認められず、配合濃度に依存した小核の出現頻度の増加も認められなかったことから、受精卵および体細胞クローン牛の生乳および肉は、一般牛のそれらと同様に、染色体異常誘発性は陰性であると判断された。

上記の一般牛、受精卵クローン牛および体細胞クローン牛の生乳乾燥パウダーを2.5、5および10%、また肉乾燥パウダーを1、2.5および5%濃度で配合した各3種類の試験飼料を作製し、5週齢のSD系ラット(1群雌雄各10匹)に、試験飼料(対照群は基礎飼料)を飲料水とともに14週間自由摂取させ給餌試験を行った。

生乳乾燥パウダー給餌試験の結果、体重、体重増加量および各測定時点の飼料摂取量には、基礎飼料群と比べて、一般牛、受精卵クローン牛および体細胞クローン牛の各濃度群に有意な差は認められず、各濃度ごとの比較においても、牛群間に有意な差は認められていない。機能に及ぼす影響についても、試験飼料の給餌に起因する変化は認められなかった。すなわち、感覚反射機能、着地開脚幅、撞力および自発運動量ならびに雌の性周期について、基礎飼料群と比べて、一般牛、受精卵クローン牛および体細胞クローン牛の各濃度群に有意な差は認められなかった。また、各濃度ごとの比較においても、一般牛群と受精卵クローン牛群ある

いは体細胞クローン牛群の間に有意な差は認められなかった。尿所見、血液学所見、血液生化学所見、剖検所見および器官重量についても、試験飼料の給餌に起因する変化は認められていない。一般牛、受精卵クローン牛と体細胞クローン牛の各高濃度群で認められた組織学的所見は、ラットに自然発生的に認められる変化のみで、各牛群に特異的な変化は認められていない。

肉乾燥パウダー摂取試験の結果、体重、体重増加量および各測定時点の飼料摂取量には、基礎飼料群と比べて、一般牛、受精卵クローン牛および体細胞クローン牛の各濃度群に有意な差は認められず、また、各濃度ごとの比較においても、牛群間に有意な差は認められていない。機能に及ぼす影響についても、試験飼料の給餌に起因する変化は認められなかった。すなわち、感覚反射機能、着地開脚幅、撞力および自発運動量ならびに雌の性周期について、基礎飼料群と比べて、一般牛、受精卵クローン牛および体細胞クローン牛の各濃度群に有意な差は認められなかった。また、各濃度群ごとの比較において、一般牛群と受精卵クローン牛群あるいは体細胞クローン牛群の間にも、有意な差は認められなかった。尿所見、血液学所見、血液生化学所見、剖検所見および器官重量についても、試験飼料の給与に起因する変化は認められていない。なお、血液生化学所見の一部の項目については、牛群間に差が見られたが、これらは雌雄に共通した変化ではなく、また、濃度との相関も認められなかったことから、試験飼料の給餌とは無関係な偶発所見と判断されている。一般牛、受精卵クローン牛と体細胞クローン牛の各高濃度群で認められた組織学的所見は、ラットに自然発生的に認められる変化のみで、各牛群に特異的な変化は認められてい

ない。

以上の成績から、ラットの健康状態は、生乳乾燥パウダーまたは肉乾燥パウダーの14週間給餌によって影響されないことが示された。なお、生乳とサーロイン牛肉のたんぱく質含量(それぞれ、2.9%と18.4%)に基づき、この給餌試験で最高用量群のラットが摂取した生乳乾燥パウダーまたは肉乾燥パウダーをそれぞれ一日体重50kg当たりの生乳とサーロイン牛肉摂取量に換算すると、雄では生乳1.8~3.6kg、牛肉270~760g、雌では生乳3.3~4.1kg、牛肉360~760gとなる。

本研究で、体細胞クローン牛6頭と一般牛3頭の各筋肉について、総DDT、アルドリン、ヘプタクロルなどの残留塩素系農薬を分析した結果、それぞれ検出限界未満の0.05, 0.02および0.02ppm未満であり、脂溶性環境汚染物質である残留塩素系農薬の蓄積による危険性は認められなかった。

以上の知見は、肉および生乳の成分について、毒性影響を含め、クローン牛と一般牛との間に著しい差がないことを示している。

4. クローン牛の食品としての安全性について

以上、平成11年度以降現在までに得られた知見から、先の中間報告書において示したクローン牛の食品としての安全性に関する考え方に大きな変更を加える必要はないことがわかった。新たに得られたクローン牛の育成と生理機能ならびにクローン牛の乳肉成分に関する国内外の知見も踏まえ、クローン牛の食品としての安全性に関しては以下のように考えられる。

先の報告書に示したように、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、構成成分自体が毒性や病原性を発現することは知られていないことから、クローン牛が新たにこうした毒性または病原性物質を産生することは考えがたい。

国内外でこれまでに得られている知見は、生後1ヶ月以上生存した体細胞クローン牛個体は、一般牛と同程度に正常に生育し、一般牛と差異のない生理機能をもつことを示している。したがって、一般牛に比べ、こうしたクローン牛個体が、ヒトを含めほ乳動物に対して生物作用をもつ物質を多量に産生したり、新規な生物活性物質を産生していることは考えがたい。

クローン牛の肉と生乳についての構成成分に関する知見は、それら乳肉の構成成分が一般牛と異なること、ならびに栄養機能の点において一般牛の肉や生乳と類似していることを示している。さらに動物への給餌試験の結果は、ヒトが通常摂取している量に十分匹敵する量のクローン牛の肉または生乳をラットに給餌しても、健康を損なうことがないことを示しており、栄養的にも一般牛の肉や生乳と同等の機能をもつことを示している。

以上のように、現在までに得られている知見から、受精卵クローン牛や体細胞クローン牛については、従来技術により産生された牛にはない特有の要因によって食品としての安全性が損なわれることは考えがたい。

ただし、クローン技術は新しい技術であるために、クローン牛由来の食品の安全性については、慎重な配慮が必要である。従来より、食品として利用される牛については健康であることが必要条件であること、その乳肉を利用した食品については安全で健全でなければならないこと

が広く認められてきた^{注1}。この認識は、クローン牛およびそれに由来する食品についても当然当てはまるものと考えられ、したがって、クローン牛の人獣共通感染症等^{注2}への罹患、あるいは同牛由来の乳肉における有害化学物質^{注2}の残留などによって、食品の安全性が損なわれることのないような慎重な対応が必要であると考えられる^{注3}。また、こうした配慮の下に、その安全性を危惧させる要因が新たに検知された場合には、速やかにその要因を排除できる対応が必要であろう。

注1：「Recommended International Code of Practice: General Principles of Food Hygiene.」、
「Recommended International Code of Hygienic Practice for Fresh Meat. Section IV-Animal Production for fresh Meat.」、
「CODEX Standard for Milk Powders and Cream Powder」などCODEXの文書に健康、安全性、健全性についての記載がある。また、食品衛生法第5条により病肉等(臓器や乳も含まれる)の販売の制限について規定されている。

注2：「食品衛生法施行規則第2条」および「乳および乳製品の成分規格に関する省令」に示されている炭疽、結核病およびブルセラ病等の疾病、「食品、添加物等の規格基準」および「乳および乳製品の成分規格に関する省令」に示されている抗生物質、抗菌剤および動物性医薬品などの化学物質、通知により暫定的規制値が示されているPCBや農薬などの有害化学物質などが挙げられる。

注3：BSEに関しても、クローン牛に特有な問題はないものの、他の食用牛同様、全頭検査の対象となっている。

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

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Wilmurら(Wilmur 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。

1. 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。このことにより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るために、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になっており、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、これらの伝生成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。

II. 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、通常の発情では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 F₂ 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上げられる。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 F₂ で発情を誘起させて受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、妊娠を傷害するような疾病を有していないことが求められる。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

凍結してある場合は、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 F2 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前産子数の 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が約 50%であるのに対して、約 80%と高いこと。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。ウシの卵巣には通常、直径3～5mmの小卵胞が多数存在している。その小卵胞を卵巣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、卵巣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、一個の卵巣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。

III. 体外受精

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。牛の体外受精は卵巣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)。

1. 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、質的に変化をとげる必要性があり、いわゆる受精能獲得現象と呼ばれている。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。

2. 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巢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。と畜場由来の卵巢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。

3. 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。

IV. 胚及び体細胞クローン技術

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ことと示唆される。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。

1. 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み出されるが、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。

2. 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保持していないことが認められた。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。

3. 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、核の情報があて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ッテングにより単独の割球にばらしておく。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)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629頭(2002年3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細胞期まで発生の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渡ること、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牛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。

4. 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であると理解された(Campbell,1997,1999)。血清飢餓培養による細胞周期の同調化だけではなく、増殖したドナー細胞の接触阻止によりG0/G1期に同調化したドナー細胞の核移植によってもクローン産子が得られている(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、フローサイトメーターを用いて細胞の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、それが数年間も続く。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、正常に 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。その後、G0/G1 期以外の細胞周期にある体細胞からもクローン産子が誕生することがわかり、ドナー細胞の G0/G1 期への同調は必ずしも必須ではないことがわっている。

(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。わが国の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。また、情報公開については、各研究機関からの報告を求め、農林水産省より一定期間ごとに「家畜クローン研究の現状について」をインターネット上で公表するとともに、毎月の異動状況を公開している。

(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、まず牛が対象になった。一方、豚の卵子や胚は体外での操作性が困難で、体外成熟培養系、体外受精や体外発生培養系が十分に確立されていないことがその背景にある。

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 (Cibelli 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。これらのドナー細胞の細胞周期はフローサイトメトリにより90%以上がG0/G1期に同調されていることが確認された。

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 °C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。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。

ウシ以外の家畜では、牛よりやや遅れて、農林水産省畜産試験場によってヤギ(大越ら2001)とブタ(Ohnishi et al., 2000)の体細胞クローン産子が、近畿大学によってブタ(Yin et al., 2002)の体細胞クローン産子が誕生している。

(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、ニュージーランド、韓国をはじめ多くの国で体細胞クローン牛の誕生が報告されている。また、ウシ以外の動物種では、ヒツジのほかヤギ(Baguise et al., 1999)、ブタ(Polejaeva et al., 2000, Betthausen et al., 2000, Ohnishi et al., 2000)、マウス(Wakayama et al., 1998)、ウサギ(Chesne et al., 2002)、ネコ(Shin et al., 2002)で体細胞クローンによる産子が生産されており、特にヒツジ、ヤギを用いた有用生理活性物質生産のための遺伝

子組換えクローンならびにブタを用いた異種臓器移植のための遺伝子組換えクローン動物に関する研究が活発化している。

米国の Infigen 社では高能力・優良家畜の複製を目的として、1998 年から大規模にクローン牛を生産し、その生産効率や生産性について調査 (Pace et al., 2002) して、コマーシャルでの利用のための基礎を築いてきている。

5. 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、相当な精確度が得られとも言われている。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利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、個体数が減少したこと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、経膈採卵法による採卵、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。

また、南アジア原産の絶滅危惧種である野生牛ガウルの体細胞を家畜牛の卵子に核移植し、体細胞クローン産子を得ることに成功している (Lanza et al., 2000)。このクローンガウルは生後

まもなく感染症により死亡したが、近縁種間の核移植によって希少種や絶滅危惧種の保存が可能であることを示す例となっている。この実験を行った米国 ACT 社は、スペイン政府とともにピレネー山脈に生息し、絶滅した野生ヒツジ・ブガードのクローンを作成する試みも発表している。

(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、1) 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、2) 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、1) の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成するのに、米国農商務省によると数千万円程度の費用を要すると試算されている。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、ブタ、マウス、ウサギ、ネコ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、(1) 細胞への遺伝子導入と遺伝子が導入された細胞の選択、(2) 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、最近では遺伝子の相同組換え技術を応用した遺伝子ノックアウトクローン動物がヒツジ (McCreath et al., 2000, Denning et al., 2001)、ブタ (Lai et al., 2002, Dai et al., 2002) で作出されている。

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、一般的に細胞分裂回数が有限であるため、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、体細胞に対しては胚性幹細胞のように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などの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。従来の人工授精や胚移植では、きよ

うだい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。わが国ではこのような試みは現実化されていないが、米国の Infigen 社では高能力・優良家畜の複製を目的として、1998 年から大規模にクローン牛を生産し、その生産効率や生産性について調査(Pace et al., 2002)している。

6. 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、体細胞クローンに密接に関係すると思われる問題が改めてクローズアップされている。体細胞クローンでは全ての妊娠期間において高い頻度で流死産が発生しており、人工授精や通常の胚移植に比べて、その割合は高い。妊娠期間を満了したもので、出生した子牛が虚弱であったり、生後まもなく死亡する例も少なくない。また、出生時の子牛の体重が通常よりも大きく、平均体重の2倍以上に達する例も散見され、これら過大子では分娩時に難産や帝王切開を伴ったり、出生後虚弱であるケースが多い。これらの問題に対して、農林水産省はプロジェクト研究により分子生物学的、病理学的検査体制を構築し、研究を進めることとしている。

7. 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、1998 年7月に近畿大学

が石川県の協力を得て最初の体細胞クローンウシを誕生させた。その後、農林水産省畜産試験場と鹿児島県の研究グループ、大分県などが相次いで体細胞クローンウシの生産に成功した。2002 年3月末までに全国で 39 の研究機関において 293 頭の体細胞クローンウシが誕生している。これらの 48%は現在育成中であるが、死産が 16%、生後直死が 15%、病死が 14%、試験と殺が 7%となっている。

育成過程での子牛の発育・体重推移は、それぞれの品種の平均値と同程度であるとする報告があり、特に問題は見あたらないとされている。また、クローン雌牛の多くは人工授精または胚移植によって受胎が確認され、雄牛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確認されている個体もある。これらクローン牛の繁殖によって生産された子牛では、死産や過大子の発生は問題となっていない。このことから、育成期以降の子牛の発育性やその受胎性ならびに遺伝的能力に、体細胞由来であるが故の特殊性は見いだされていない。今後ともこれらクローン牛生産の動向、特に出生状況や発育状況については、全国で出生したクローン牛についてのデータを集積し、詳しく検討する必要がある。

(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

動物衛生研究所は 2001 年 10 月に開催されたつくば国際ワークショップ “Current Status and Perspectives in Cloning and Related Studies”において、クローン牛の流死産胎子および生後直死産子について、以下の通り発表した(Kubo 2001)。1999 年 4 月より、101 のウシからの検体を組織病理学的に検査した。そのうち 22 頭は計画的に試験淘汰され、42 頭は流産または死産、9 頭は出産直後に死亡、5 頭は出産

後5日以内に死亡、10頭は6日以上生存したウシであった。主な病変として、甲状腺コロイドの欠如あるいは減少(17例)、体重50kg以上の大きな胎子(12例)、胎盤に大型病変(11例)、免疫不全とリンパ組織の形成不全(11例)、筋肉の異常(6例)、臍帯の異常(5例)、股関節の異常(3例)、肺胞蛋白症(2例)が見られた。出産直後に死亡した9頭の子ウシのうち、5頭は体重が50kg以上あり、1頭は40-50kg、もう1頭は30-40kgであり、残り2頭については不明であった。体重が50kg以上の12頭の子ウシのうち、3例は流産または死産であった。5頭は上述のように出産直後に死亡し、2頭は1日以内に、1頭は3日目に、もう1頭は22日目に死亡した。これらの子ウシにみられた主な病変としては、9例で肝臓の結合組織の過形成が観察されている。甲状腺コロイド欠如が2例に、大きさが不規則な甲状腺濾胞が2例に見られた。2例で免疫不全が見られた。甲状腺異常が認められた16頭のうち、12例で甲状腺コロイドの欠如が、4例で甲状腺濾胞の大きさの不規則性が、1例で甲状腺腫が見られた。12頭が流産または死産となったが、胎児の日齢は146日から256日であった。体重50kg以上の3頭が出産直後に死亡し、もう1頭は0日目に死亡し、羊水の吸入および筋肉の異常が認められた。免疫不全のあった11頭のうち、1頭は流産し、6頭は10日以内に死亡し、2頭は10から30日の間に死亡し、2頭は1か月以上生存した。6例は線維芽細胞の核を移植したものであった。胎盤異常がみられた11例には、4組(8頭)の双子が含まれていた。7頭は卵丘細胞の核を移植したものであり、他の4頭の核は線維芽細胞の核であった。5例でカルシウム沈着が、1例で線維形成が見られた。

これら病理学的所見からは、体細胞クローンと関連して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。

過大子については、過大子の発生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との関連が指摘されている。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機会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, Kruij & 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。インプリンティ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原因の同定とその分子メカニズムの解明が求められる。

8. 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、5年間で300頭近い体細胞クローン子牛が誕生し、およそ40の研究機関がいずれも技術的にも安定した水準で研究を実施してきた。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、定着できるのを見極める必要がある。人類の夢が現実となった今、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

- 1) 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. *Thriogenology*. 53:208(Abst).
- 2) 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.
- 3) 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. *Thriogenology*, 53: 537-547.
- 4) Bui T.H. and H.Wramsby, 1996, Micromanipulative assisted fertilization-still clinical research. *Hum.Reprod.*,11:925-926.
- 5) Campbell, K.H.S., J.Mcwhir, W.A.Ritchie and I.Wilmot. 1997. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line.*Nature* 380:64-66.
- 6) Campbell, K.H.S.1999. Nuclear equivalence, nuclear transfer, and the cell cycle. *Cloning*. 1:3-62.
- 7) 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.
- 8) Chesne, P., Adenot, P. G., Viglietta, C., Baratte, M., Boulanger, L, Renard, J. P. 2002 Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells *Nat Biotechnol*. 20: 366-369.
- 9) Dai, Y, .Vaught, T. D., Boone, J., Chen, S. H., Phelps, C. J., Ball, S., Monahan, J. A., Jobst, P. M., McCreath, K. J., Lamborn, A. E., Cowell-Lucero, J. L., Wells, K. D., Colman, A., Polejaeva, I. A., Ayares, D. L. 2002 Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs *Nat Biotechnol* 20:251-255
- 10) Embryo transfer newsletter . 1999. The 1998 statistical figures for the worldwide embryo transfer industry: A data retrieval committee report. 17: 25-31.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.Scvi.J*.70:243-245.
- 14) Heape, W. 1890. Preliminary note ion the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster mother. *Proc. R. Soc.Lond.*,48:457-458.

- 15) 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 inn first transfer somatic cell cloned fetuses. *Thriogenology*. 53:218 (Abst).
- 16) Hirooka H. 2000. Evaluation of testing schemes with clones for carcass traits in beef cattle. *Anim.Sci.J*.71:J19-J25.
- 17) Illmense K. & P.C. Hoppe, 1981. Nuclear transplantation in *Mus musculus*: developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. *Cell*, 23:9-18.
- 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.
- 19) Kruij, 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.
- 20) 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. *ProNAS* 97:990-995.
- 21) Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, Samuel M, Bonk A, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Hawley RJ, Prather RS. 2002 Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 295: 1089-92
- 22) Lanza R.P., J.B. Cibelli, F. Diaz, C.T. Moraes, P.W. Farin, C.E. Farin, C.J. Hammer, M.D. West, and P. Damiani 2000 Cloning of an Endangered Species (*Bos gaurus*) Using Interspecies Nuclear Transfer. *Cloning* 2:79
- 23) 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.
- 24) McGrath J.& D.Solter, 1983. Nuclear transplantation in the mouse, embryo microsurgery and cell fusion. *Science*, 220:1300-1302.
- 25) Menezo, Y.J.R., A.Veiga and J.L.Pouly.,2000, Assisted reproduction technology(ART) in humans: Factors and uncertainties. *Thriogenology* 53:599-610.
- 26) 野澤 謙 1975, 家畜化と集団遺伝学, 日本畜産学会報.,46:549-557.
- 27) 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).
- 28) Pace, M. M., Augenstein, M. L., Betthausen, J. M., Childs, L. A., Eilertsen, K. J., Enos, J. M., Forsberg, E. J., Golueke, P. J., Graber, D. F., Kemper, J. C., Koppang, R. W., Lange, G., Lesmeister, T. L., Mallon, K. S., Mell, G. D., Misica, P. M., Pfister-Genskow, M., Strelchenko, N. S., Voelker, G. R., Watt, S. R., Bishop, M. D. 2002 Ontogeny of cloned cattle to lactation. *Biol Reprod*. 67:334-339
- 29) Phillips, P.H. & H.A.Lardy ,1940, A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull sperm. *Dairy Sci*.23:399-404.
- 30) Polejaeva, LI.A. and K.H.S. Campbell. 2000.

- New advances in somatic cell nuclear transfer application in transgenesis. *Thriogenology* 53:117-126.
- 31) Polge, C. & L.E.A.Rowson, 1952. Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at 79 . *Nature* 169:626-627.
- 32) Renard ,JP., 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.
- 33) 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.
- 34) 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.
- 35) Schneike K.D., A.J.Kind, W.A. Ritchie, K.Mycock, A.R.Scott, M.Ritchie, I.Wilmur, A.Colman and K.H.S.Campbell. 1977. Factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from tranfected fetal fibroblasts. *Science* 278;2130-2133.
- 36) Shiga,K. T.Fujita, K.Hirose, Y.Ysue and T.Nagai. 1999. Production of calves by transfer of nucle from cultured somatic cells obtained from Japanese Black Bulls. *Thriogenology.* 52:527-535.
- 37) Shin, T., Kraemer, D., Pryor, J., Liu, L., Rugila, J., Howe, L., Buck, S., Murphy, K., Lyons, L., Westhusin, M.2002 A cat cloned by nuclear transplantation *Nature* 415:859
- 38) Suigie T.1965. Successful transfer of fertilized bovine egg by non-surgical techniques. *J.Reprod Fertil.* 10:197-201.
- 39) Takahshi,S. C.Kubota, H.Nakahara, M.Shimizu, T.Tokunaga and H.Imai. 1998. Importance cytopasmic factor after oocyte activation on development of somatic cell nuclear transferred bovine embryos. In; Lauria A, Gandolfi F eds. *Gamates. Development andfunction. Sero syposia*, 607(Abst).
- 40) Takano H., C.Kozai, S.Shimazu, Y.Kato and Y.Tsunoda. 1996. Cloning by multiple transfer. *Thriogenology.* 47:1365-1373.
- 41) 牛島 仁, 角田幸夫,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.
- 42) Wakayama T., A.C.F.Perry, M.Zuccottj, K.R.Johnson and R.Yamagimachi. 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394:370 -374.
- 43) 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.
- 44) 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
- 45) 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.
- 46) Wilmur.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.

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

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

49) 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。

クローン牛の食品としての安全性におけるミトコンドリアの問題

核移植によるクローン牛の生産には、生きた細胞(ドナー)を未受精卵子(レシピエント)内に導入するため、核とともに細胞質に含まれている細胞小器官も導入され、二種類の細胞小器官がレシピエント卵子内で混在することになる。細胞小器官の中で、ミトコンドリアは細胞のエネルギー源を供給する器官として重要である。また、その機能の発揮するためには、核からの遺伝子発現が不可欠であり、核とミトコンドリアとの協調関係が重要と考えられている。また、ミトコンドリアはエネルギー生産のための遺伝子情報を有しており、そのための遺伝子をコードするミトコンドリア DNA を含有している。ミトコンドリア DNA は核内 DNA とは異なり核内タンパク質によって保護されていないために、遺伝的変異を起こしやすい。

核移植によってレシピエント卵子内に導入されたドナー細胞のミトコンドリアおよびミトコンドリア DNA は、その大部分が核移植直後からレシ

ピエント細胞質から消失してゆく。この現象は、自然界における受精の過程で精子のミトコンドリアが卵子内で分解される現象に類似し、ミトコンドリアの子孫への伝達は卵子由来のミトコンドリアが関与する母系遺伝であるという通説を裏付けている。しかし、最近になって、一部の受精卵クローン牛や体細胞クローン牛において、ドナー細胞のミトコンドリア DNA が検出されている。出現率としては低いもののドナー由来のミトコンドリアがクローン動物に混入する可能性があることが示唆するものである。つまり、クローン牛では、2種類以上のミトコンドリアが混在する状況(ヘテロプラスミーとよぶ)が生まれうる。従って、クローン牛に起こるドナー細胞由来のミトコンドリアの残存は、通常の受精による伝達様式とは異なっていることから、ドナー細胞のミトコンドリアがクローン牛に由来する生産物の安全性に悪影響を及ぼす可能性について、ここで言及しておく必要がある。

ミトコンドリアの伝達が母系遺伝によって厳密に制御されているといわれているにもかかわらず、自然界の牛にもヘテロプラスミーが存在している。これまでの研究報告から、この現象に対していくつかの説明が可能と思われる。1) 精子のミトコンドリアは実際には伝達されることがあり、技術的に検出することが困難なため一見母性遺伝のように見える、2) 精子と卵子ミトコンドリアの間で一部の配列が遺伝子組換えを起こし、組換え体ミトコンドリアが複製して増えている、3) 個体が成長してゆく過程で一部のミトコンドリア DNA に変異が起こり、それが複製して増えている、などである。前述したように、ミトコンドリア DNA は変異が起こりやすく、個々の牛をミトコンドリア DNA によって個体識別できることから、一種類のミトコンドリア DNA が安定して伝達されてゆくことは極めてまれであり、常に動的に変化し

ていると考えるべきであろう。自然界に見られる牛のヘテロプラスミーは、ミトコンドリア DNA 変異の過程を一時的に捕えたものと考えられる。

上述したように、自然条件下でもミトコンドリアのヘテロプラスミーは起こりうるが、核移植のように人為的な処理によって生じたヘテロプラスミーについては、新たに生じる細胞核とミトコンドリアの相性(適合性)を問題とする必要がある。一般的に、二種類の動物において、進化的な距離が離れているほど、核の遺伝子ばかりでなくミトコンドリア DNA の遺伝情報は質的な差がある。進化的に距離がある異種の関係にあるマウスにおいて、ミトコンドリアと核との相互関係を調べた報告がある。異種のミトコンドリアを導入した胚では、胚発生が阻害されると同時に、個体の表現型にも影響が出てくることが知られている。進化的距離が異種ほど離れていないが、同種よりは距離のある亜種に相当するマウス間では、胚発生はほとんど影響を受けず、表現型のさもそれほど顕著な差は生じない。クローン牛のように、同種間で起こるヘテロプラスミーが胚発生や表現型にどのように影響を及ぼすのかは不明であるが、進化的にも極めて近縁の動物種であり、核とミトコンドリアの適合性は高いと予想され、表現型への影響も少ないと考えられる。このことは、ドナー細胞を提供した牛とその細胞から生産されたクローン牛、またクローン牛間において、成長、肉質、乳量などを比較したところ、それらが似通っていることから推察できる。クローン牛で死亡するものの中には、細胞核とドナー細胞由来のミトコンドリアの不適合が原因である可能性を排除することはできないが、自然界においてもヘテロプラスミーである牛が存在することを考えると、クローン牛におけるヘテロプラスミーがヒトの生存に悪影響を及ぼすような毒性、病

原性を示す可能性は考えにくい。

核の初期化と発生異常

1. 核が初期化される機構は、受精卵クローンと体細胞クローンで異なる

哺乳動物の核移植は、核(ドナー細胞)を、染色体を除去した未受精卵(レシピエント卵細胞質)へ導入することによって行われている。レシピエント卵細胞質として、卵成熟促進因子(MPF)活性の高いM期の卵細胞質あるいはあらかじめ活性化刺激を与えて MPF 活性を低下させた卵細胞質が用いられている。M期卵細胞質へ核を導入すると、M期以外のドナー核の場合は核膜が崩壊して染色体が凝集する。この状態では発生しないため、活性化刺激を与えて発生を開始させる。それに伴って核膜が再度形成され、核移植前のドナー核の細胞周期にかかわらず DNA が複製される。S期の核の染色体が凝集すると異常になることからドナー細胞としては不適であり、またすでに DNA の複製が終了している G2 期やM期の核を用いた場合は4倍体となることから、核移植後極体が放出されることが必要である。M期の未受精卵をレシピエント卵細胞質として用いる場合は、ドナー核の細胞周期を特定の時期に同調させ、それに応じた核移植を行うことが必要となる。これに対して、活性化刺激を与えた未受精卵をレシピエント卵細胞質として用いると、MPF 活性が低いいためドナー核の核膜は崩壊せず、核移植前の核の細胞周期に従って DNA の複製が進んでいく。このため、核移植前にあらかじめドナー細胞核の細胞周期を特定の時期に合わせる必要はない。なお、M期の場合は再度 DNA が複製されて4倍体胚となるが、M期はきわめて短いため無視できる。

受精卵クローン牛は、主として活性化処置を与えたレシピエント卵細胞質を用いて作出されている。最も広く用いられているのは、過剰排卵

処置牛より採取した桑実胚の割球を1個、あらかじめ染色体を除去し、活性化刺激を与えてから6～9時間目の未受精卵へ融合後7～9日間培養する方法である。融合直後からドナー核の核膜は増大していくが、この間に核が桑実胚であるという記憶を失って初期化されていくと思われる。核移植卵は、受精卵と同様の時間経過で2細胞、4細胞、8細胞、16細胞、桑実胚へと分割し、核移植卵の10～30%が胚盤胞へ発生する。また、これらの胚盤胞を受胎雌へ移植すると、10～30%の胚が子牛へ発生する。得られる子牛に体細胞クローンでみられるような異常もみられるが、その割合は20%未満と低い。

これに対して、体細胞を用いた場合はM期の未受精卵をレシピエント卵細胞質として用いる必要がある。著者らは、細胞周期をG0/G1、S、G2ならびにM期に同調した牛培養卵丘細胞を、M期の未受精卵ならびに活性化刺激を与えてから6時間目の未受精卵へ核移植して胚盤胞への発生率を調べた。その結果、M期の卵細胞質へ核移植するとS期の細胞を用いた場合以外は、いずれの細胞周期の体細胞を用いた場合でも胚盤胞へ発生した。これに対して、活性化卵細胞質を用いると、いずれの細胞周期の核を用いた場合でも8細胞期へは発生するが、桑実胚や胚盤胞へは発生しないことが明らかとなった。牛初期胚では、8細胞期までの卵割は卵細胞質内に貯えられた卵子由来のmRNAの指令によって行われるが、それ以降の分割には胚由来の遺伝子が働くことが必要とされている。このことから、活性化未受精卵に核移植された体細胞核は初期化されず、初期胚の核を用いた場合とは核の初期化機構は異なると考えられる。

2. クローン動物の作出効率は動物種によって異なる

これまで核移植によって産子が得られている動物は、羊、マウス、ラット、牛、山羊、豚、ウサギ、ネコ、アカゲザルであり、このうち、ラットとアカゲザル以外の動物種では体細胞クローンも得られている。個体への発生率は動物種によって異なり、牛では比較的効率よく多数のクローン個体が作出されている。核移植後7～9日間体外で培養すると30～50%が胚盤胞へ発生し、これを受胎雌へ移植することによって10～20%が子牛として分娩されている。この割合は、体外受精卵を用いた場合に比べて若干低い。ドナー細胞として8細胞～32細胞期胚の割球を用いた核移植卵と比べて大差はない。しかしながら、体細胞クローン牛の約半数は何らかの異常を示している。

同じ家畜でも、クローン豚の作出は困難とされていた。2000年に3つの研究機関から成功例が報告されて以来、相ついでクローン豚の作出例が報告されているが、いずれの報告でも産子への発生率は1～5%と低い。マウスの場合、牛や豚に比べて染色体の除去は容易ではあるにもかかわらずクローン個体の作出は困難である。ウサギでは、体細胞由来核移植卵は高率に胚盤胞へ発生するが、これまで体細胞クローンウサギは得られなかった。しかしながら最近、核移植卵の発生ステージと受胎雌の排卵時期をずらすことによって成功例が報告された。排卵時期を遅らせた受胎雌へ移植することによって、なぜ個体を得られるのかは明らかになっていない。

3. 異常個体の出現頻度は、細胞の由来や核移植方法によって異なる

さまざまな組織由来の体細胞が核移植のドナー細胞として用いられているが、同じ手法を用いて実施する限り胚盤胞への発生率に大差はみられない。しかしながら、受胎雌へ移植後の

産子への発生率には差がみられる。マウスでは雄胎子期生殖細胞を核移植に用いた場合、胚盤胞へは発生せず次代の生殖細胞を形成するための変化が生じているため、胎子は分娩には至らずすべて妊娠中期で死滅する。また、ES細胞を用いた場合、産子への発生率は体細胞を用いた場合に比べて高いが、多くのクローンマウスが分娩直後に死亡したり胎盤形成に異常がみられる。牛体細胞クローン胚の大規模な移植試験は実施されていないことから明確な結論はだせないが、用いた細胞の由来によって子牛への発生率は異なる。特に、異常個体の出現頻度は、用いた細胞の由来によって異なっている。我々の実験では、成熟雌の卵管あるいは卵丘細胞由来の培養細胞を用いた場合、13頭のクローン牛が得られたが、その内4頭が分娩直後に死亡した。これに対して、成熟雄の皮膚や耳由来の培養細胞を用いて得られた10頭の子牛のうち、8頭が種々の原因によって死亡している。また、同じ組織由来の培養細胞を用いて同じ手法で核移植を行っても、正常な子牛へ発生する頻度の高い細胞、分娩前後に子牛が死亡する確率の高い細胞や妊娠初期で流産する頻度の高い細胞などがみられる。このように、細胞の由来や細胞株の違いによって、流産や異常個体の出現頻度が異なる原因は明らかになっていない。

核移植は、ドナー細胞の培養と準備、前処置、細胞周期の同調、未受精卵の染色体の除去、状態、ドナー細胞のレシピエント卵細胞質への導入、核移植卵への発生刺激の付与、体外培養、移植、妊娠雌の管理、分娩補助、クローン個体の飼育などといった一連の要素技術を含む複雑な技術である。これらの要素技術の違いによって、核移植卵の個体への発生率や得られる個体の正常性が変化することが知られてい

る。

4. 発生異常が生じる原因

なぜ体細胞クローン個体に、種々の異常が頻発するかは明らかにはなっていない。クローン個体や同時に得られた胎盤で発現している遺伝子の状況は、体外受精卵の移植で得られる受胎産物と異なっている場合が多い。このような遺伝子発現の相異の一部は、核移植卵が胚盤胞期に発育した時点ですでに検出されているが、どの遺伝子の発現がどの程度受精卵と異なっていれば流産や発生異常に結びつくのかは明らかになっていない。このような異常がみられる原因として、核移植に用いる前のドナー細胞の核ですでに非可逆的な遺伝子の変化が生じていること、あるいは核移植に伴って生じる核の初期化の不完全さによって生じると推察されている。性成熟期まで生存した体細胞クローンマウスでは、寿命が短かったり、肥満になったりする場所のある事が報告されているが、これまでのところ体細胞クローン牛ではこのような異常は認められていない。なお、体細胞クローン個体を繁殖に用いた場合、次の世代にはクローン個体でみられたような異常はみられていない。

5. 今後の問題点

現在の体細胞クローン作出技術には、技術上の安全性に疑義があることから、現行の不確実な手法を実際の家畜生産の現場で使用するのは問題が残る。今後、受精卵と核移植卵の相異を分子生物学的に解析して明らかにするとともに、受精卵と相同な能力を持つ核移植卵を作出し、あるいは選別する技術の確立が必要である。

D. 研究発表

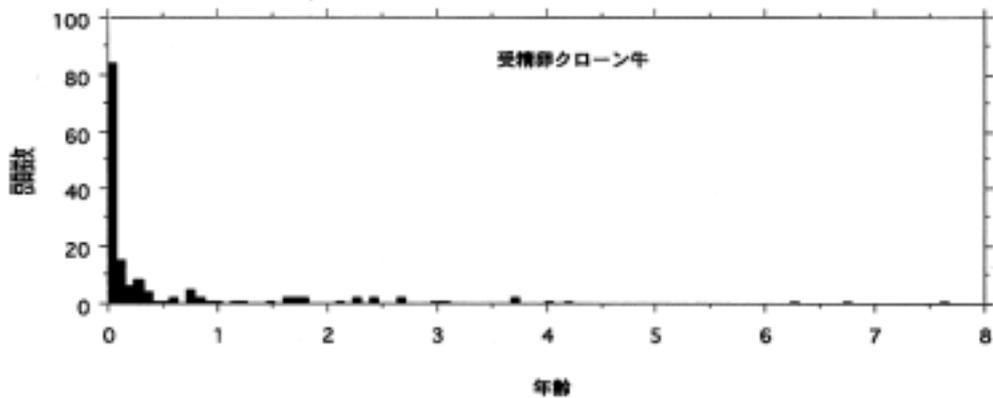
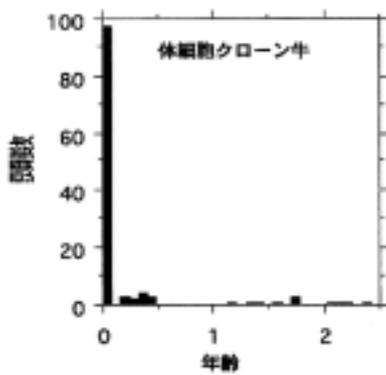
なし

Table 1. 体細胞クローン牛内訳(平成14年8月14日)

出生頭数	312 (頭)
育成試験中	140
死産	54
生後直死	43
病死等	53
うち1ヶ月齢以上で死	16
うち6ヶ月齢以上で死	1
事故死	1
うち1ヶ月齢以上で死	1
試験と殺	21
うち原因があるもの	4

(図1)

死亡年齢と頭数



(図2)

生存年齢と頭数

