

199906048A

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—人工受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)……………	29
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)……………	35
クローン動物の生理・機能 入谷 明 (近畿大学生物理工学部)……………	37
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)日本生物科学研究所)……………	39
まとめ 熊谷 進 (東京大学大学院生命科学研究科)……………	51

## 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－

#### I 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Wilmutら(Wilmut 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。

## Ⅱ 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が始まりである。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膣内に海綿を入れて、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、イギリスにおける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。人工膺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に使用できるので、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、その能力がいか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。

### Ⅲ 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F<sub>2</sub>α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巣の反応が低下し、過剰排卵処置は年に3～4回が限度であること、3) 個体ごとの卵巣反応が予測不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、膣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>α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を含む膣内挿入薬を挿入しておくことで、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ている。

### 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 $-5^{\circ}\text{C}$ までは $-1^{\circ}\text{C}$  /分で低下させ、 $-5^{\circ}\text{C}$ 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 $-0.3^{\circ}\text{C}$  /分の割合で $-30^{\circ}\text{C}$ 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 $-7^{\circ}\text{C}$ 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。融解は空气中で5秒前後保持後に、 $30^{\circ}\text{C}$ 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  $\text{F2 } \alpha$  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による移植の割合が約 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 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をも、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。

## IV 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。体外受精にいたって、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。ヒトでもこの体外受精、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性がある。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性がある。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、分娩事故のリスクも高くなっている。新生子の死亡も、人工授精で 5.3%、胚移植で 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; Hewitson et al., 1999)。

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。

## V 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 (Wilmut 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 (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。

### 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、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囲卵腔に挿入した。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ッテング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ので、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子の核は、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、長期にわた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,1997,1999)。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おける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を明らかにすることができる。

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ると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>

### (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 (Takahasi 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。細胞が培養皿のほぼ全面に増殖した後、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 $\mu$ m、10 $\mu$  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 $\mu$ g / ml) とシクロヘキシミド (10 $\mu$ g / 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