

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性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、個体数が減少したも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歳の黒毛和種の卵巢の体細胞を用いて、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らは以下のような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、わずか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 社 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」を誕生させた。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)。

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。

3. 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なる。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死産、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。流死産は実際的に全ての妊娠期間にわたって発生しており、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。

4. 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38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、特に問題点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）、脾臓炎（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さ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。

5. 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用性など、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性がある。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. Detrempes, 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.Wilmot. 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. Scv. J.* 70:243-245.
- Hewitson, L., Dominko, 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 inn first transfer somatc 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 transplantaion 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. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97:990-995.
- Heape, W. 1890. Preliminary note on the transplantaion and grwoth 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 transplantaion 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 uncertanities. *Therriogenology* 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 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.
- 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 tranfected fetal fibroblasts. *Science* 278;2130-2133.
- 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 Janpanese Black Bulls. *Thriogenology*.52:527-535.
- Sugie T.1965. Successful transfer of fertilized bovine egg by non-surgical techniques. *J.Reprod Fertil.* 10:197-201.
- 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).
- 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.
- 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.
- Wakayama T., I. Rodriguez, C.F.Anthony, F.Perry, R.Yamagimachi and P.Mombaerts., 1999. Mice cloned from embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 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.
- Wilmut.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. Wilmut. 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、

角田幸夫 ウシ胚の核移植. 日本畜産学会報、63 巻、192-200,

角田幸夫・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

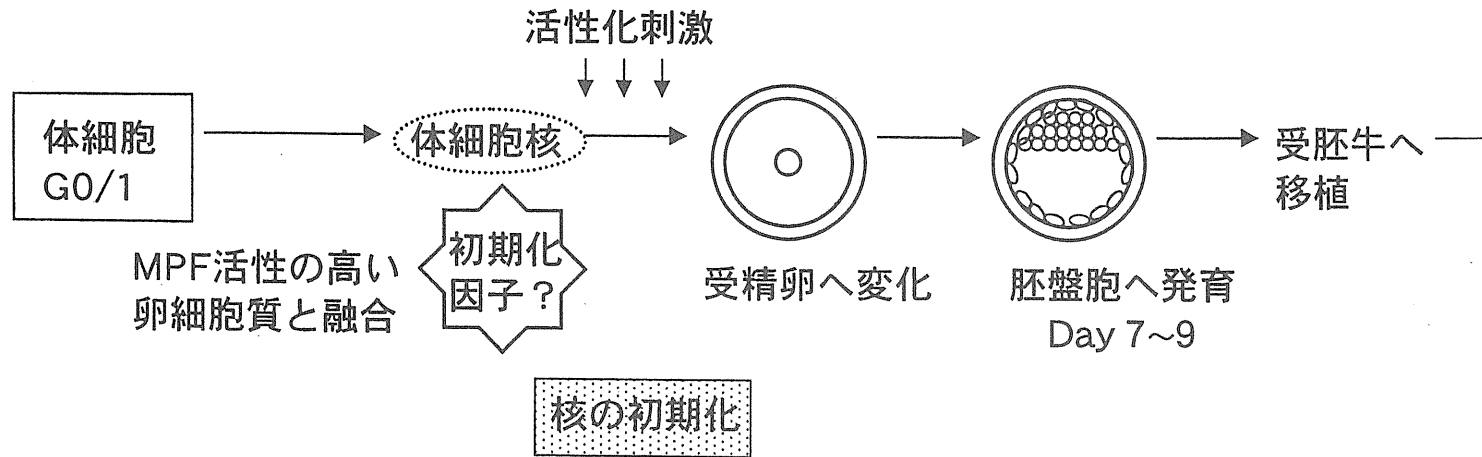
に実施した移植試験でも、受胎率は37%、分娩率は17%であった。

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。

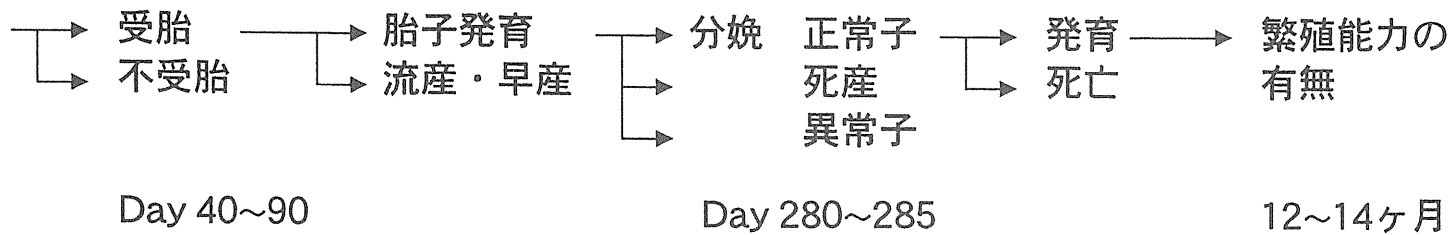
核移植技術を用いて得られる子牛に異常等がみられる原因については、今のところ明らかになっていないが、2つの理由が考えられる。初期胚割球の核（一般に受精卵クローンとよばれる）、胚盤胞内細胞塊を培養して得られる細胞の核（ES様細胞であるが、得られる個体に対する名称はない）、胎子の生殖細胞を培養して得られる細胞（EG様細胞であるが、得られる個体に対する名称はない）、胎子あるいは子牛や成体の体細胞の核（一般に体細胞クローンとよばれる）など核移植に用いる細胞の違いによって若干の相違はあるが、ドナー細胞核は発現可能な遺伝子の種類が受精卵の状態へ変化することが必要であり、これが核の初期化と考えられる。核の初期化は、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ヤクシの小腸上皮細胞の核移植によって、オタマジヤ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ヤ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にくい。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。



核の初期化



牛における核の全能性誘導法

成体体細胞の核移植

| 動物種 | ドナー細胞の由来 | 発生率 | 妊娠率 | 産子数／移植卵数 (%) | 研究者 (年) |
|-----|----------|-------|-----|--------------|-------------------------------|
| 羊 | 乳腺 | 12 | 8 | 1/29 (3) | Wilmot et al.(1997) |
| マウス | 排卵卵丘 | 40~67 | — | 31/1385 (2) | Wakayama et al.(1998) |
| 牛 | 卵丘,卵管 | 23~49 | 100 | 8/10 (80) | Kato et al.(1998) |
| 牛 | 卵丘 | 35~51 | 45 | 10/100 (10) | Wells et al.(1999) |
| マウス | 尾 | 50~58 | — | 3/274 (1) | Wakayama & Yanagimachi (1999) |
| 牛 | 卵管 | 43 | 30 | 2/20 (10) | Goto et al.(1999) |
| 牛 | 子牛耳 | 3 | 20 | 1/6 (7) | Renard et al.(1999) |
| マウス | 卵胞上皮 | 34 | 4 | 1/30 (3) | Kato et al.(1999) |

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

- i. 体温の測定とモニタリング
- ii. 動脈血中の O_2 と CO_2 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
- iii. 臍帯の脈管の肥大
- *iv. 血中リンパ球数とヘモグロビン濃度の減少の有無
- *v. 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
- *vi. 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

- i. 尿漿膜、羊膜の浮腫
- ii. 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 $39.7 \pm 0.1^\circ\text{C}$ であったが、生後1時間及び8時間ではそれぞれ、 $38.9 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 及び $38.2 \pm 0.1^\circ\text{C}$ へ低下した($n=10$)。血中の HCO_3^- 濃度は、最初の1時間目はだいたい正常値($25.7 \pm 0.8 \text{ mM}$, $n=3$)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、 16 mM 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($3.6 \pm 0.5 \text{ mM}$)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、通常よりも多い尿囊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、通常の受胎雌羊に、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、体細胞クローニングの結果生まれた動物では、通常の生殖細胞形成・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、①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。②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い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危急なテロメア長に、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)

5. 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)

6. 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

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、作成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^{1,2)}。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^{3,4)}。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。

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⁵⁾。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⁶⁾。

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⁷⁾。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⁸⁾。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⁹⁾。

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。両者の細胞は異なった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¹⁰⁾、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¹¹⁾、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¹²⁾。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¹³⁾。

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にも精子由来のミトコンドリアが残存しているし¹⁴⁾、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