

クローン家畜生産技術利用による優良家畜作出試験

山口大輔・戸塚 豊・渡辺晃行・足立憲隆・赤木悟史¹・

高橋清也¹・久保正法²

Production of Excellent Livestock Animals by Somatic Cell Nuclear Transfer

Daisuke YAMAGUCHI, Yutaka TOZUKA, Akiyuki WATANABE, Noritaka ADACHI, Satoshi AKAGI¹,
Seiya TAKAHASHI¹, Masanori KUBO²

要 約

体細胞クローン技術は、高能力な家畜の複製、育種改良の効率化や遺伝資源の保存に利用できる技術として期待されている。そこで本研究では、体細胞クローン牛および豚について、作出およびその正常性の調査を試みた。

体細胞クローン牛：黒毛和種雌牛の卵丘細胞および耳由来線維芽細胞をドナー細胞として、核移植によりクローン胚を作出した。当センター繋養牛に移植した結果、5頭のクローン牛を得ることに成功した。うち1頭は147日齢で死亡したが、その他の4頭は順調に発育を続けており、発育能力および血液生化学的性状における正常性が示唆された。4頭のうち2頭については、春機発動が認められたのち人工授精を行った結果、2頭とも受胎した。1頭は無事に雌子牛を分娩し、産子は順調に発育しているが、1頭は受胎後252日目に死産した。以上のことから、クローン牛の繁殖能力、乳質およびその後代産子の発育能力および血液生化学的性状における正常性が示唆された。

体細胞クローン豚：茨城県養豚研究所で飼養されているランドレース種の耳由来線維芽細胞をドナー細胞として、核移植によりクローン胚を作出し、受胎豚に外科的に移植した。その結果、クローン雌豚5頭およびクローン雄豚1頭を得ることに成功した。クローン雌豚5頭のうち、生後直死が1頭、胸膜肺炎およびコリネバクテリウムによる全身感染症による死亡が1頭認められたが、それ以外の3頭は順調に発育している。クローン雄豚1頭については、生後直死であった。死亡した3例について病性鑑定を行ったところ、いずれからもクローン特有と思われる所見は認められなかったことから、クローン豚の発育能力における正常性が示唆された。

キーワード：体細胞クローン牛、体細胞クローン豚、核移植

緒 言

体細胞クローン技術（以下、クローン技術）は、同一遺伝形質を持つ動物を生産できる技術として、畜産分野だけでなく、生物学や発生学などの基礎的研究分野でも期待されている。体細胞クローン動物の作出は、1996年に誕生したクローンヒツジ「ドリー」¹⁾を契機に、マウス²⁾、ウシ^{3),4)}、ヤギ⁵⁾、ブタ^{6),7),8)}、ウサギ⁹⁾、ネコ¹⁰⁾、ラバ¹¹⁾、ウマ¹²⁾、ラット¹³⁾およびシカで成功している。日本においては、牛を中心にクローン技術の研究が進められた結果、1998年に世界初の体細胞クローン牛（以下、クローン牛）³⁾が誕生

している。現在までに、国内では約430頭のクローン牛が誕生し、約110頭が育成・試験中である¹⁴⁾。また体細胞クローン豚（以下、クローン豚）については、2000年に国内の研究機関を含む3ヶ所の研究機関がクローン豚の作出に成功している^{5),6),7)}。国内では81頭のクローン豚が誕生し、18頭が育成・試験中である¹⁵⁾。

畜産分野においては、クローン技術を応用することによって、ドナー牛との遺伝的相同性や発現形質におけるクローン牛同士の相似性および斉一性を利用した優良雌牛の増産や種雄牛造成の効率化など、また豚では、遺伝資源としての系統維持や保存が可能となることが期待されている¹⁶⁾。

当センターでは、平成 12 年度から 16 年度まで、体細胞クローン家畜（以下、クローン家畜）、特にクローン牛および豚の生産に係る技術的課題を検討し、その生産および正常性の調査を試みてきた。この試験により一定の成果が得られたので、報告する。

- 1 (独) 農業・生物系特定産業技術研究機構 畜産草地研究所
2 (独) 農業・生物系特定産業技術研究機構 動物衛生研究所

材料および方法

1 クローン牛の作出

(1) 成熟培養

食肉処理場由来牛卵巣の直径 5mm 以下の小卵胞から、18G 注射針をつけたシリンジで卵丘細胞 - 卵子複合体を吸引した。卵子の周囲に卵丘細胞が密に付着した A ランク卵子のみを選別し、成熟培養を行った。成熟培養は、10%ウシ胎児血清(以下、FCS)+TCM199 で 38.5°C、5% CO₂、20 時間行った。

(2) 卵子裸化および除核

成熟培養した卵丘細胞 - 卵子複合体の卵丘細胞を、0.1%ヒアルロニダーゼ液中でピペッティング操作により除去し、卵子を裸化した。これらの裸化卵子のうち、第一極体を放出し、細胞質の均一なもののみを除核した。除核は、20%FCS+TCM199 を操作培地とし、透明帯切開後、極体とその周辺の細胞を押し出す方法で行った。押し出した部分をヘキスト液 (10 μg/ml Hoechst33342, 10% ethanol 99.5% in PBS) で染色し、紫外線励起下で極体および核が発光しているものを除核されたと判定し、レシピエント卵子として用いた。

(3) ドナー細胞の準備

卵丘細胞については独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構畜産草地研究所繁養の黒毛和種雌牛の卵丘細胞を、耳由来線維芽細胞については当センター繁養の黒毛和種雌牛から採取し、ドナー細胞として用いた。

(4) 細胞融合

レシピエント卵子の成熟培養開始から 24 時間後を目安に、融合用 2 本の電極でレシピエント卵子とドナー細胞を軽く挟み、電気的融合を行った。融合液は Zimmerman Mammalian Cell Fusion Medium¹⁹⁾ を用いた。融合条件は直流パルスで 25V/150 μm · 10 μsec × 1 回とした。

(5) 活性化処理および発生培養

融合処理後、融合した卵子をシクロヘキシミド (以下、CH) およびサイトカラシン D を加えた IVD101 に 1 時間、その後 CH を加えた IVD101 で 4 時間活性化処理を行った。その後 IVD101 において気相条件 5%CO₂、5%O₂、90%N₂ で 7~8 日間培養した。

(6) 凍結保存

発生培養を 7~8 日間行い、形態的に正常と判定されたクローン胚について、10%エチレングリコールを含む 20%FCS+D-PBS に 0.1M trehalose を添加した凍結保存液に入れ、ストローに吸引してゼロステップ法にて凍結を行った。移植する際には、ストローを空气中で 10 秒間保持し、35~37°C の温湯で融解したのち、移植した。

(7) ガラス化保存

発生培養を 7~8 日間行い、形態的に正常と判定されたクローン胚について、ガラス化保存を行った。ガラス化は、2000 年に Dinnyes ら¹⁸⁾ が報告した solid surface vitrification 法に準じて行った。すなわち、ガラス化する胚を平衡液 (4% Ethylene Glycol in 20% FCS +TCM199) で 3 分間、ガラス化液 (35% Ethylene Glycol, 5% polyvinyl pyrrolidone, 0.4M trehalose in 20% FCS+TCM199) で 20 秒間平衡した。平衡した後、胚を含んだガラス化液をガラスピペットで吸引し、1~2 μl になるようにピペット先端に出し、事前にアルコールでアルミプレートの表面を消毒したのち液体窒素で冷却したアルミプレートの表面に落とした。ガラス化したドロップは 0.5ml クライオチューブに入れ、液体窒素中に使用するまで保存した。移植する際には、融解液 (0.4M trehalose in 20% FCS +TCM199) を 2 倍段階希釈し、1 分間ずつ平衡させ、生存を確認するため、IVD101 で 6~18 時間培養した。培養後、形態的に正常と判定された胚を移植した。

(8) 移植

受胎牛は、当センターに繁養しているホルスタイン種、黒毛和種および交雑種の経産牛を用いた。発情終了後 7~8 日目に、形態的に正常と判定したクローン胚を新鮮胚、凍結胚あるいはガラス化胚で 1 頭につき 1 胚移植した。妊娠診断は移植後 30 日目と 60 日目に超音波診断装置で行い、妊娠鑑定後分娩までの状況を観察した。

(9) 分娩

クローン牛の分娩は、分娩時の事故を防ぐため分娩予定日翌日もしくは 2 日前に金山ら¹⁹⁾ の方

法で受胎牛に分娩誘起を行い、帝王切開で分娩させた。

(10) 発育および繁殖能力調査

発育能力については、体重および体高の計測を1ヶ月に1度実施した。繁殖能力については、発情行動や人工授精などを実施することによる受胎状況および分娩や哺育状況などを観察することによって調査した。

(11) 血液生化学的性状に関する調査

分娩直後、1日後、2日後、7日後、2週間後、4週間後、2ヶ月後に血液を採取した。また対照牛については、通常の黒毛和種雌子牛から血液を採取し、同様のタイムスケジュールおよび項目で血液生化学的性状の検査を行った。分析項目はNa, K, Cl, Mg, Ca, IP, GOT, GPT, GGT, CPK, ALP, LDH, Amy, BUN, UA, T-Pro, Alb, Cre, Glu, T-Bil, T-Cho, TG, HDL-c, および FRA とした。分析には自動血液分析器（ドライケム アークレイ社）を用いた。

(12) 乳質検査

乳をサンプルとして採取し、社団法人茨城県畜産協会に乳質検査を依頼した。検査項目は、脂肪率、無脂固形分率、蛋白質率、体細胞数、乳糖率、全固形分率、および尿素とした。

2 クローン豚の作出

プライムテック株式会社（以下、プライムテック）および茨城県養豚研究所（以下、養豚研）との共同研究により試験を実施した。クローン胚作出をプライムテックが、受胎豚および作出されたクローン豚の飼養管理を養豚研が、移植手術を担当した。

3 病性鑑定

死亡した場合の病性鑑定については、独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構動物衛生研究所へ持ち込み、病性鑑定を実施した。

結果および考察

1 クローン牛の作出および正常性の調査

(1) 作出状況

クローン胚の移植と分娩の結果を表1に示した。作出された卵丘細胞由来クローン胚を新鮮胚の状態に移植した結果、3頭が受胎し、3頭とも分娩した（以下、C1, C2 および C3）²⁴⁾。また、耳線維芽細胞由来クローン胚を新鮮胚、凍結胚あるい

はガラス化胚の状態に移植した結果、ガラス化胚において4頭が受胎し、うち2頭が分娩した（以下、C4 および C5）。

これまでの報告ではクローン牛の場合、過大子が多い傾向があることが報告されており^{20), 21), 22), 23), 24)}、また分娩時の事故による死産、生後直死の例も多く報告²⁵⁾されている。今回得られたクローン牛5頭については、このような傾向は認められなかった。

(2) 発育能力および血液生化学的性状に関する調査

卵丘細胞由来クローン牛3頭の発育曲線を、標準的な黒毛和種雌牛²⁶⁾およびドナー牛のものと比較した（図1）。ただしC3については、147日齢で死亡したため、それまでの調査成績を示した。その結果、クローン牛の体重の推移については標準以下ではあるが、ドナー牛と比較した場合、同様に推移しており、クローン牛の間でも大きな差は認められなかった。また体高についても、クローン牛の間で差は認められなかった。耳線維芽細胞由来クローン牛については、標準的な黒毛和種雌牛⁶⁾と比較した結果、クローン牛の体重および体高は標準以下ではあったが同様に推移した（図2）。また、血液生化学的性状に関する調査を行った結果、正常の範囲内であり、対照牛と比較しても大きな差は認められなかった。

クローン牛の発育調査に関していくつか報告されている^{27), 28), 29), 30), 31)}。上村らはクローン牛の発育状況を黒毛和種の去勢牛およびドナー牛と比較調査し、その推移が同様であったことから、発育過程において特異な点は見当たらないと報告している³¹⁾。C1, C2 および C3 については、発育は標準より下回って推移しているが、ドナー牛とは近似していた。これはドナー牛の発育が悪く、標準以下で推移していることを反映している。またC4 および C5 については、標準以下ではあるが同様に推移している。これらの報告および結果から、クローン牛の発育に関する正常性が示唆された。またドナー牛とそのクローン牛の間には、発育面で相似性が認められ、クローン牛はドナー牛の発育に関する表現形質を受け継いでいる可能性が示唆された。

(3) 死亡したクローン牛の病性鑑定

C3 については、異常発生前に食欲不振という状態であったが、定期的実施していた血液生化学的検査では正常範囲内であった。しかし、徐々に自力での摂食が困難になるとともに衰弱が激しくなり、147日齢で死亡した。原因究明のために

病性鑑定を実施したところ、下垂体において成長ホルモンを産生する α 細胞が極めて少なかったことから、成長ホルモンの産生が極めて悪かったと推察され、下垂体性小児症と診断された。この影響で成長が阻害されたと思われる。またリンパ球の形成が悪かったことから、免疫不全が疑われた。さらに膵臓の zymogen 顆粒がみられなかったことから、消化酵素の外分泌が不十分であったことが推察された。したがって C3 は、内分泌系の異常による小児症に加え、栄養の消化・吸収が不十分なことによる栄養不足、さらに免疫不全による感染症への抵抗性の低下により死亡したと考えられた。

クローン牛においては、受胎後の早期胚死滅や流産、過大子に伴うと思われる死産や生後直死が多く報告されている^{20), 21), 22), 23), 24)}。また育成段階の牛においても種々の死亡例が報告されているが、その多くは免疫不全や甲状腺の異常であり、C3 のような症例は他に例がない³²⁾。C3 は、クローン胚を作出する過程においてドナー細胞の培養方法や、レシピエント卵子の由来が C1 および C2 と異なっており、それが正常性の差となって現れた一因ではないかと考えられた。

(4) 繁殖能力に関する調査

C4 および C5 は性成熟に達していなかったため、C1 および C2 の繁殖能力について調査した。その結果、19 ヶ月齢時に直腸検査および発情行動の観察などから、春機発動が確認された。また、26 ヶ月齢時にこの 2 頭に人工授精を行った結果、C2 が受胎した³³⁾。C1 は不受胎であったため、後日再度人工授精を行った結果、受胎した³⁴⁾。C2 は受胎後 285 日目に自然分娩により 22.5kg の雌子牛を分娩し、C1 は受胎後 252 日目に死産した。

クローン牛の繁殖能力についてはいくつか報告されており^{35), 36), 37), 38)}、厚生労働省の「クローン技術を利用した動物性食品の安全性について」の最終報告書では、「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」としている³⁹⁾。C2 については、妊娠期間や後代の生時体重を通常の黒毛和種雌牛と比較しても正常範囲内であり、分娩直後から産子に対して哺育行動をとっていた。また、乳質についても正常範囲内であった。産子も順調に発育しており、その血液生化学的性状も正常範囲内であった。今回の結果やこれらの報告から、クローン牛の繁殖能力における正常性が示唆された。

死産した C1 の胎子について病性鑑定を実施したところ、膵臓にリンパ球がほとんどないことや、胸腺において皮質に認められるリンパ球が少ない

ことから免疫不全が、また甲状腺にコロイドが全くないことからホルモン関係の異常が示唆された。しかし、クローン家畜特有と思われる異常は認められなかったことから、通常の黒毛和種雌牛でも起こりうる範囲内の流産であった可能性が高いと考えられた。

2 クローン豚の作出および正常性の調査

養豚研で飼養されているランドレース種の耳由来線維芽細胞をドナー細胞として作出したクローン胚を、受胎豚 18 頭へ外科的に移植した結果、3 頭が受胎した。1 頭は妊娠継続中であるが、2 頭は分娩し、クローン雌豚 5 頭 (以下、P1, P2, P3, P4 および P5) およびクローン雄豚 1 頭 (以下、P6) を作出することに成功した。ただし、P1 は生時体重が 1.41kg と正常であったが、成長するにつれ発育不良を呈し、139 日齢で死亡した。P4 は肢の異常および重度のヘルニアの状態で生まれたのち、数時間後に死亡した。P6 は死亡した状態で発見された。

クローン豚の体重の推移を、養豚研で飼養している標準的なランドレース種の体重の推移と比較した (図 3)。その結果、139 日齢で死亡した P1 以外のクローン豚における体重の推移は、標準と比較して同様であり、クローン豚の間でも大きな差は認められなかった。柴田らは、クローン豚の発育は、概ね対照豚の発育曲線の範囲内であったと報告している^{16), 39)}。今回の結果およびこれらの報告から、クローン豚の発育における正常性が示唆された。

死亡した 3 頭について病性鑑定を実施したところ、P1 については、豚胸膜肺炎ウイルスの感染による胸膜肺炎およびコリネバクテリウムによる全身感染症と診断され、発育不良が感染の原因と考えられた。P4 については、生時体重が 0.61kg と小さく、肢の異常とヘルニア以外に異常は認められなかった。P6 については、腹腔内および脳内に出血が発見されたが臓器に著変はなく、肺に呼吸した形跡があることおよび胃の中に初乳が認められたことから、正常に呼吸および哺乳したが、生時体重 0.88kg と小さく生まれたことによる体力低下のため死亡したと考えられた。また、3 頭ともクローン特有と思われる異常は認められなかった。

農林水省の発表によると、クローン豚の死産および生後直死は 81 頭中 30 頭 (37%)、病死は 81 頭中 8 頭 (9.9%) であった¹⁵⁾。また大西によると、クローン豚の生後死に関しては、クローン豚特有の現象は見られておらず、通常の豚においては、哺乳期間中に 5~25% の子豚が死亡するが、

クローン豚の死亡率もこの範疇になるため、解析が困難な状況にあるとしている⁴¹⁾。今回の結果において、死産および生後直死は6頭中2頭(33.3%)、病死は6頭中1頭(16.7%)であった。また死亡したクローン豚について病性鑑定を実施したところ、クローン特有と思われる異常は認められなかった。従って、今回の死亡例は通常の豚でも起こりうる範囲内であると考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、牛卵巣採材においてご協力いただきました県北食肉衛生検査所および茨城県中央食肉公社、クローン豚作出にご尽力いただきましたプライムテック株式会社および茨城県養豚研究所の皆様に深謝いたします。

引用文献

- 1) Wilmut, I. et al. (1997). Nature, 385:810-813
- 2) Wakayama, T. et al. (1998). Nature, 394:369-374
- 3) Kato, Y. et al. (1998). Science, 282:2095-2098
- 4) Cibelli, J. et al. (1998). Science, 280:1256-1258
- 5) Baguisi, A. et al. (1999). Nature Biotechnology, 17:456 - 461
- 6) Betthausen, J. et al. (2000). Nature Biotechnology, 18:1055-1059
- 7) Onishi, A. et al. (2000). Science, 289:1188-1190
- 8) Polejaeva, I. et al. (2000). Nature, 407:86-90
- 9) Chesné, P. et al. (2002). Nature Biotechnology, 20:366 - 369
- 10) Shin, T. et al. (2002). Nature, 415:859
- 11) Woods, G. et al. (2003). Science, 301:1063
- 12) Galli, C. et al. (2003). Nature, 424:635
- 13) Zhou, Q. et al. (2003). Science, 302:1179
- 14) 農林水産省 (2005). クローン牛の異動報告のとりまとめについて
- 15) 農林水産省 (2004). 家畜クローン研究の現状について
- 16) 柴田ら (2003). 体細胞金華豚の発育と繁殖能力. 静岡中小試研報, 14 : 13-16
- 17) Wolfe, B. A. et al. (1992). Theriogenology, 3 : 5-15
- 18) Dinnyes, A. et al. (2000). Biology of Reproduction, 63:513-518
- 19) 金山ら (2000). 第15回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会講演要旨, 第16号 : 13-15
- 20) Kato, Y. et al. (2000). Journal of Reproduction and Fertility, 120:231-237
- 21) 沼辺孝 (2000) 第15回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会講演要旨, 第16号 : 8-10
- 22) 農林水産省農林水産技術会議 (2002). 家畜クローン研究の現状について
- 23) 加藤ら (2003). 体細胞クローン牛の正常性について (第1報). 岐阜県畜研研報, 3 : 27-36
- 24) 戸塚ら (2002). クローン家畜生産技術利用による優良家畜作出試験 (第2報). 茨城畜セ研報, 35 : 55-60
- 25) 農林水産省農林水産技術会議 (2002). 家畜クローン研究の現状について
- 26) 農林水産省農林水産技術会議事務局 (2000). 日本飼養標準肉用牛 (2000年度版)
- 27) 本多ら (2003). 体細胞クローン牛の遺伝的相同性および発育性について. 福島畜試研報, 10 : 13-16
- 28) 長野ら (2002). 体細胞クローン牛 (ホルスタイン種) の発育性. 鹿児島県畜試研報, 35 : 83-88
- 29) 坂下ら (2002). 体細胞クローン去勢牛の肥育成績. 鹿児島県畜試研報, 35 : 28-36
- 30) 渋谷ら (2000). 体細胞クローン牛の確立に関する研究 (1) 体細胞クローン牛の遺伝的相同性調査. 大分県畜試研報, 29 : 102-107
- 31) 上村ら (2000). 体細胞クローン牛の発育調査. 奈良県畜試研報, 27 : 16-19
- 32) 農林水産省生産局畜産部 (2003). 第7回核移植技術全国検討会議資料
- 33) 山口ら (2003). クローン家畜生産技術利用による優良家畜作出試験 (第3報). 茨城畜セ研報, 35 : 55-60
- 34) 山口ら (2004). クローン家畜生産技術利用による優良家畜作出試験 (第4報). 茨城畜セ研報, 35 : 55-60
- 35) 井上ら (2002). 体細胞クローン牛生産技術の確立に関する研究 (2) 乳用牛における体細胞クローン利用技術の確立. 大分県畜試研報, 31 : 69-71
- 36) 森ら (2002). 体細胞クローン牛の初産分娩時までの繁殖状況. 鹿児島県畜試研報, 36 : 34-40
- 37) 加藤ら (2003). 体細胞クローン牛の正常性について (第1報). 岐阜県畜研研報, 3 : 27-36
- 38) Enright, P. et al. (2002). Biology of Reproduction, 66:291-296
- 39) 熊谷 (2003). クローン技術を利用した動物性食品の安全性について (最終報告書). 厚生労働省

- 40) 柴田ら (2004). 体細胞クローン金華豚産子の産肉性と肉質 I. 静岡県中小試研報, 15 : 35-38
 41) 大西 (2004). トランスジェニック豚および鶏の開発と再生医療への利用. 社団法人農林水産技術情報協会

表 1 : クローン胚の移植成績

ドナー細胞	移植頭数	胚の状態	受胎頭数	分娩頭数	生時体重
卵丘細胞	16	新鮮胚	3	3	C1 : 31.0kg, C2 : 37.5kg, C3 : 31.0kg
	19	新鮮胚	0	0	
耳線維芽細胞	10	凍結胚	0	0	
	13	ガラス化胚	4	2	C4 : 33.0kg, C5 : 14.5kg



