

畜産生産現場における クローン化技術の活用と問題点

奈良県畜産試験場 主任研究員
小財 千明

【はじめに】

1996年イギリスでのクローン羊「ドリー」の誕生は、学術的意義とともに一般社会では特に倫理面で大きな話題となりました。そして1998年7月の近畿大学を中心としたグループによる我が国初の体細胞クローン牛の誕生以降、日本各地で続々と成功例が報告され、「クローン」という言葉が急速に我々の身近なものとなりました。この事は、多くの消費者に「我々が口にしている畜産物はどのような過程で生産されているのか」ということに関して注目してもらう良い契機となりました。また研究者にとっても、これまでごく当然のように進められていた研究が一般消費者の意識とあまりにかい離してしまっていることを認識すべき絶好の機会であると思います。

今回、奈良県を例に取りまして、どのような経緯で体細胞クローン牛の生産に至ったのか、また今後どのようなことが考えられるのか、一つの話提供として報告させていただきます。

【バイオテクノロジーの歩み】

畜産の生産現場に於いてバイオテクノロジーが進んできた方向は、生産効率の悪い牛の繁殖特性に対して、人の手を借りていかにして牛群が持っている有用な遺伝資源を最大限に活用するか、言い換えればどうしたら自分の目的とする牛だけを無駄なくたくさん生産するかという研究の連続であると言えます。

まず雄牛に関しては、凍結精液を使った人工授精技術の開発普及により、地理的あるいは時間的障害を乗り越えて、優れた雄の遺伝形質を受け継いだ子孫を多数生産することが可能になり、牛の育種改良は大いに進みました。

雌牛側からのアプローチは少し遅れて始まりました。雌牛の繁殖特性を考えると、どんなに優秀な雌牛でも一生涯の間にせいぜい10数頭の子牛を残すのが限界です。一方、卵巣の中には数万個の原始卵胞を持っていて、相当数の子牛を生産する潜在能力があります。そして体外からの性腺刺激ホルモンの投与によって、それらのうち少しでも多く利用しようと開発されたのが過排卵処理-受精卵移植技術です。奈良県では多くの場合、黒毛和種について採卵を実施し、取れた受精卵をホルスタイン種に移植するというパターンです。優秀な種雄牛を持たず、繁殖用雌牛も決して多くはないため、和牛の増産のためにはこの技術に頼らざるを得ません。また、これまで廃棄されていた食肉処理場で解体された牛の卵巣も体外受精技術により有効に利用されるようになり威力を発揮しています。当県は都市近郊ですので良質の和牛が集まり、それらを個体別に認識して体外受精を行うことで、品質のより確かなものの生産が可能です。そして、1個の受精卵から複数の同じ牛を生産

するために取り組んだのが受精卵クローン技術です。また、受精卵クローン技術の多くの課題を払拭し、さらに大きな可能性を秘めていると考えられるのが、胎児体細胞クローンであり成体体細胞クローンです。

【受精卵クローン】

奈良県では受精卵クローンに関する研究は平成3年度に開始しました。そして平成5年1月には西日本初の受精卵クローン牛を生産し、その後2代あるいは3代継代したクローン牛の生産にも成功しています。現在までに延べ141頭に対して移植を行い、同一ドナー胚由来のクローン双子3組、1腹2胚移植由来の双子1組を含む計21頭（雄9頭、雌12頭）の受精卵クローン牛を生産しています。尚、移植胚は全て黒毛和種由来で、受胎牛は全てホルスタイン種かホルスタイン種の雌と黒毛和種の雄をかけあわせたF1交雑種を用いました。生産した子牛21頭のうち6頭は死亡しましたが、9頭は正常な発育を確認後、食肉用に出荷しました。そして残り6頭についても通常の飼養管理のもと正常性を確認後食肉用に出荷する予定です。（表1）

分娩20例中8例についてはホルモン剤による分娩誘起等、何らかの人為的介助による娩出であり、その他でも牽引を必要とする例が多くみられました。一般にクローン子牛のお産は分娩兆候が弱く（外陰部の緩み、乳房の張り等）、子牛の生時体重も若干重くなる傾向が見受けられ、分娩管理には細心の注意が必要と思われました。（表2、表3）

受精卵クローン子牛を得るためには、まずドナー胚（受精後5～6日目）の採取が必要です。そのためには供卵牛を選定し、数日間に渡る過剰排卵処理と人工授精の後、胚の回収をしなければなりません。次にレシピエント卵細胞質の準備です。ドナー胚の採取日に合わせて屠場から卵巣を持ち帰り、採取した卵母細胞を約22時間の成熟培養後、適切な除核操作と活性化処理を施します。そして、ドナー胚から取り出したドナー細胞とレシピエント卵細胞質を融合させ、約1週間培養を行います。一方、クローン胚の培養と同調して受胎牛の発情誘起処理と選抜も必要となってきます。このように受精卵クローン牛の生産の為には数々の条件を同時にそろえる必要があります。これら時間的制約を緩和するために、いくつかの実験を行いました。

まず、ドナー胚（受精後5日目胚）の耐凍性について調べました。新鮮ドナー胚を使うと1胚当たり平均4個のクローン胚を得られますが、凍結融解したドナー胚の場合では0.9個しか得られませんでした。

次に、クローン胚の耐凍性について調べました。新鮮クローン胚の移植での受胎率は38.2%であるのに対し、凍結クローン胚の場合は13.0%しか受胎しませんでした。

このようにドナー胚、そして発生したクローン胚の凍結保存は非常に困難です。また卵母細胞の凍結保存も効率が悪いため、現段階では各種の条件を全て新鮮な状態で準備する必要があり、恒常的な仕事としては非常に無理が伴います。また奈良県では、状態の良い受胎牛を一度に多頭数確保するのが難しく、受精卵クローン技術によるクローン牛群生産を一層困難なものとしています。

現在、クローン胚に付加価値を付ける目的で、本方法とPCR法とを組み合わせた雌雄産み分け技術に取り組んでいます。これは、同一の受精卵から発生したクローン胚のうち高ランク胚は受胎牛への移植に、低ランク胚はPCRの材料とすることにより性別子牛

生産の効率化を図るもので、従来のバイオプシー法による雌雄判別法と比較して時間的制約が少なく、無傷な胚を複数個移植できるという利点があり、すでに数頭の実績をあげています。

〈 受精卵クローン牛生産までの流れ 〉

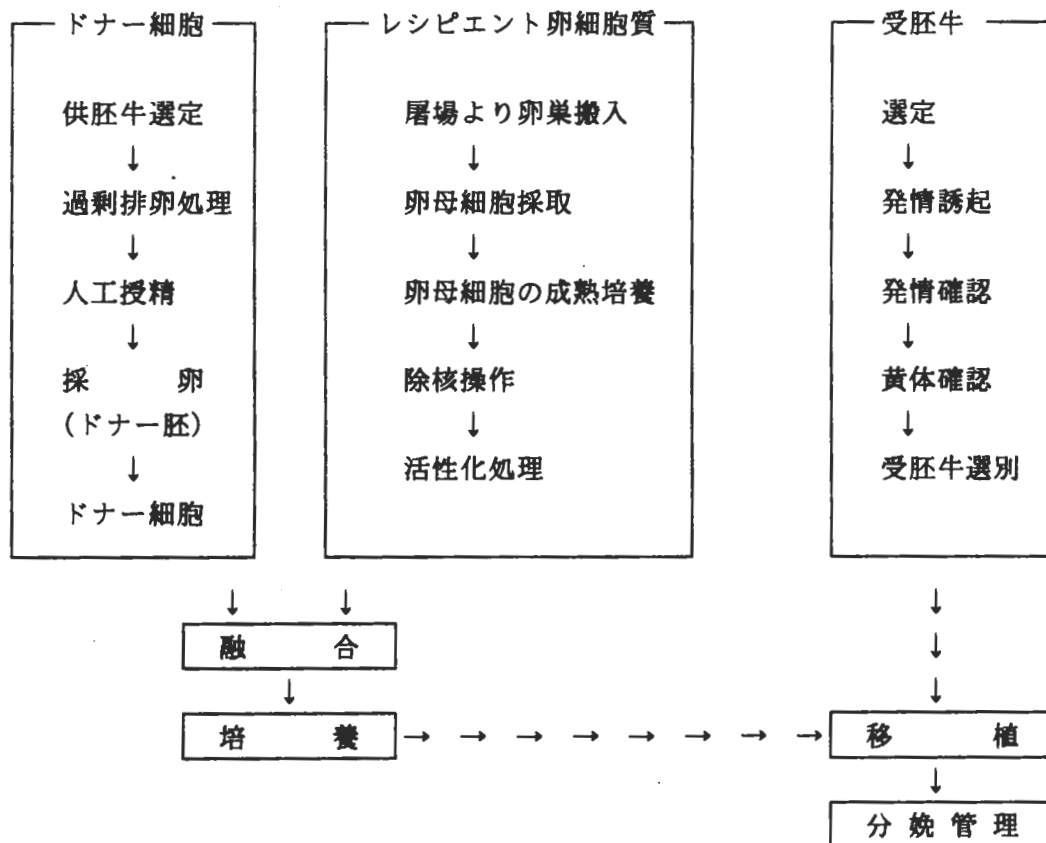


表1. 奈良県の受精卵クローン牛生産概要 (平成12年2月現在)

研究開始年度	平成3年度	
移植頭数 (～平成10年度)	141頭	
受胎頭数 (受胎率%)	41頭	(29.1%)
流産頭数 (流産率%)	21頭	(51.2%)
分娩頭数	20頭	
生産頭数	21頭	(双子1組)
クローン双子組数	3組	
生後直死頭数	4頭	
事故死頭数	2頭	
食肉用出荷頭数	9頭	
現在生存頭数	6頭	(食肉出荷予定)

表2. 奈良県で生産した受精卵クローン牛の概要

NO	分娩状況					クローン牛の 最終処理
	年月日	性別	在胎日数	生時体重	分娩形態	
1	H05.01.18	♂	281	23	自然分娩	食肉出荷
2	H05.06.26	♂	283	38	自然分娩	食肉出荷
3	H06.03.25	♀	287	41	自然分娩	食肉出荷
4	H06.04.13	♀	280	27	自然分娩	食肉出荷
5 ^A	H06.07.19	♀	280	28	自然分娩	食肉出荷
6 ^A	H06.07.19	♀	280	23	自然分娩	食肉出荷
7	H06.07.27	♀	281	41.5	自然分娩	食肉出荷
8	H06.07.31	♂	284	44	自然分娩	生後直死
9	H06.09.07	♂	286	50.5	自然分娩	食肉出荷
10	H06.09.12	♂	291	50	自然分娩	生後直死
11	H07.04.04	♂	290	31	誘起分娩	食肉出荷
12	H09.09.22	♀	286	31	誘起分娩	食肉予定
13	H09.11.08	♂	287	45	誘起分娩	事故死
14	H09.12.09	♀	288	41	誘起分娩	生後直死
15	H10.03.17	♂	287	35	誘起分娩	食肉予定
16 ^B	H10.11.13	♀	274	24.5	誘起分娩	食肉予定
17	H10.11.16	♀	283	18.5	自然分娩	生後直死
18 ^B	H10.12.01	♀	292	50	自然分娩	食肉予定
19 ^C	H11.03.25	♀	284	26	誘起分娩	食肉予定
20 ^C	H11.07.01	♀	274	35.5	帝王切開	事故死
21	H11.07.07	♂	293	40	自然分娩	食肉予定

NO5 と NO6 は同腹双子、A.B.C はクローン双子

表3. 受精卵移植産子の体重比較 (Kg)

性	体内受精由来産子	体外受精由来産子	受精卵クローン産子
雄	29.4 ± 4.7	31.3 ± 8.4	39.6 ± 9.0
雌	25.0 ± 4.4	30.7 ± 3.6	32.3 ± 9.5

【体細胞クローン】

牛の体細胞クローンに関する研究は、奈良県では平成9年度に着手しました。体細胞クローン牛生産に適した細胞の検索を目的に実験を開始し、種々の細胞由来の胚を平成10年3～4月にかけて合計13頭の受胎牛に移植したところ、胎児皮膚組織、成牛耳の皮膚組織、成牛筋肉組織、卵丘細胞、これら4種類の細胞をドナーとした胚の移植に於いて、計7頭の受胎に成功しました。その後、52日齢、82日齢、89日齢で計3頭が流産し、結局4頭の体細胞クローン牛が誕生しました。(表4)

また前記4種類の細胞の他に生体をあまり傷つけないで採取した材料として、子宮灌流液中の脱落した上皮細胞、超音波ガイドで卵巣から吸引採取した卵胞内の細胞の2種類をドナー細胞とした場合にも胚の発生がみられました。(表5) これらのことから、胚の発生あるいは受胎に至るまでのドナー細胞の選択肢はかなり広いものと考えます。

次に、ドナー細胞の血清飢餓培養の必要性について検討してみたところ、胚盤胞の発生率、胚盤胞の細胞数についてはほとんど差がでませんでした。(表6) また、受胎牛7頭中6頭の移植に関しては血清飢餓培養を行っていない細胞由来のもので、少なくともそれが受胎獲得までの必須条件ではないと考えます。

体細胞は数代の継代が可能であり、また凍結融解にも十分に耐える性質を持っています。従って、これまでの受精卵クローンで障害となっていたドナー細胞の数的制限が取り払われ、ドナー胚の採取スケジュールに追われることなくクローン胚の生産に取り組めるものと思われま。

これまでに奈良県において生産した体細胞クローン牛4頭の概要について表7に示します。平均在胎日数は282.3日、平均生時体重は35.5Kgでした。4頭中3頭については残念ながら生後12時間以内に死亡しました。そしてそれらは病性鑑定の結果アカバネ病と診断されました。個々の例の詳細については下記参照……………

NO1：ホルスタイン種雌胎児皮膚細胞(2代継代、血清添加培養)由来胚をF1交雑種未経産牛に移植し、260日齢で母牛腹部の著しい膨満と胎児の活力低下の為帝王切開を実施した。生時体重24Kg、自力哺乳可能であったが、約12時間後死亡した。病性鑑定の結果アカバネ病と診断。

NO2：NO1と同一ロットの細胞(9代継代、6日間の血清飢餓培養)由来胚をF1交雑種未経産牛に移植し、287日齢でホルモン剤投与による分娩誘起の後、尾位上胎向で難産の末、41Kgで娩出したが約1時間後死亡した。病性鑑定の結果アカバネ病と診断。斑紋は、NO1と若干は異なるがほぼ一致していた。

NO3：繁殖用黒毛和種の臀部筋肉組織の細胞(3代継代、血清添加培養)由来胚をF1交雑種未経産牛に移植し、288日齢でホルモン剤投与による分娩誘起の後、37Kgで娩出したが約30分後死亡した。病性鑑定の結果アカバネ病と診断。

NO4：肥育出荷した黒毛和種雄の耳の皮膚細胞(2代継代、血清添加培養)由来胚をホルスタイン種経産牛に移植し、294日齢でホルモン剤投与による分娩誘起の後、40Kgで娩出した(平成10年12月29日)。

現在、県内で唯一生存している1頭(NO4)については、発育検査とともに定期的に採血を行い、生化学性状、免疫応答、各種ホルモン分泌等についてデータを収集中です。

表4. 体細胞クローン胚の移植成績

由来細胞	移植頭数	受胎頭数	流産頭数	生産頭数
胎児皮膚	4	3	1	2
成牛耳	5	1	0	1
成牛筋肉	3	2	1	1
卵丘細胞	1	1	1	0
合計	13	7 (54%)	3 (43%)	4

表5. 体細胞クローン胚の培養成績

ドナー細胞	供試胚数	融合数 (率)	胚盤胞数 (率)
胎児皮膚	117	79 (67.5)	22 (27.8)
成牛耳	227	107 (47.1)	22 (20.6)
成牛筋肉	37	13 (35.1)	6 (46.2)
卵丘細胞 (屠体)	23	13 (56.5)	4 (30.8)
卵丘細胞 (生体)	171	93 (54.4)	18 (19.4)
子宮上皮	140	3 (2.1)	1 (33.3)

表6. 血清飢餓培養の有無と培養成績 (ドナー細胞：卵丘細胞)

区分	培養卵数	融合数 (%)	胚盤胞数 (%)	胚盤胞細胞数
飢餓培養	181	55 (30.4)	23 (41.8)	88 ± 23 (53 ~ 124)
血清培養	161	38 (23.6)	15 (39.5)	82 ± 21 (49 ~ 120)

表7. 奈良県で生産した体細胞クローン牛の概要

NO	ドナー細胞		分娩状況				クローン牛の現状	
	品種	由来	性別	在胎日数	体重	分娩形態	生死	詳細
1 ^A	H	胎児	♀	260	24	帝王切開	生直死	7か ^A 病と診断
2 ^A	H	胎児	♀	287	41	誘起分娩	生直死	7か ^A 病と診断
3	J	筋肉	♀	288	37	誘起分娩	生直死	7か ^A 病と診断
4	J	耳	♂	294	40	誘起分娩	生存	H10.12.29 生

A：同一細胞由来クローン牛、

H：ホルスタイン種、J：黒毛和種

【今後の展望】

これまで述べましたように、当初は受精卵クローン技術を用いて、優秀で均一な牛群を形成し、経営の効率化を図ることを目的に研究を進めて参りました。具体的な方法として、まず同一ドナー胚由来のクローン胚をできるだけ多く生産します。その為には培養技術の改善、継代技術の確立（ドナー胚1個の細胞数は約30個）、また継代を繰り返す為にはドナー胚の凍結も必要です。次に多数のクローン胚のうちの1個から産子を得、残りは凍結保存しておきます。そしてその子牛の能力が判明したところで、保存しておいたクローン胚を有効に活用します。しかしその実現のためには前述しましたように、ドナー胚の凍結保存、クローン胚の凍結保存、継代クローン胚の正常性についての検証等数多くの課題が残されています。

次に、胎児体細胞クローン牛の成功により、受精卵クローン技術の大きな課題であったドナー細胞についての数的あるいは時間的制約が解消されます。また必要な時に必要な数だけクローン胚を生産出来ることにより、常に新鮮なクローン胚を用意することが出来、クローン胚の凍結保存の必要性がなくなります。具体的な活用法として、優秀な子牛となるドナー細胞を検索し（やはり受精卵クローンと同様、産子を得てそれについて検討する必要がありますが）、その細胞を継代、増殖、凍結保存しておきます。そして必要に応じてそれらを融解後、核移植操作を行いクローン胚を培養し、クローン子牛を自在に生産することが可能となります。

成体体細胞クローンは、同じ世代のクローンということで前2者とは少し意義が違うと思います。大きな特徴は、生まれてくるクローン子牛の能力がある程度予測できるだろうということです（まだ実証されていませんが）。この技術が確立されれば、農家個々のニーズに合った牛群が短期間に形成でき、経営の安定化、合理化を図れるものと思います。

しかしながら、そのためには解決しなければならない課題が数多く残されています。ミトコンドリアDNAの関与、細胞年齢（テロメア長）、ゲノムインプリンティング機構等々、技術的、学術的な課題はともかく、今一番大きな問題であり、早急に対策を講じる必要があるのは、本技術に対して社会的な承諾を得ることです。直接我々の口に入る畜産物に関する事ですので、消費者の方々の十分な理解なしでは成立しえない技術です。人工授精の開発から成体体細胞クローン牛の誕生まで研究者側の理屈だけで一方的に突き進んできてしまったように思います。今回のクローン技術に対する社会的な批判を真摯に受け止め、これを機会にまず出来るだけ多くの方々に広く理解してもらうことが最重要であると考えます。