

## 動物分野におけるバイオテクノロジー研究開発の方向

京都大学農学部教授 入谷 明

バイオテクノロジーを広義に解釈すれば、新技術を使った効率的な動物生産ということになり、数十年も前からスタートしているといえる。狭い意味では、今後に期待される多数のクローン動物や有用な形質転換動物の生産などがあげられる。

本稿では下記の項目に見られるような広い意味での改良・増殖の分野での新技術について解説する。

- |                   |                    |
|-------------------|--------------------|
| 1. 家畜の人工授精        | 2. 胚移植とその技術の改良について |
| 3. 未受精卵及び胚の凍結保存   | 4. 産子の性制御          |
| 5. 遺伝的同型子の生産      | 6. 家畜の体外受精         |
| 7. 卵細胞の完全成熟培養系の確立 | 8. 形質転換動物の生産       |

### 1. 家畜の人工授精

人工授精は新しい技術とはいえないが、特にウシでは1952年の凍結保存技術の開発と共に広く世界各国で普及している。全世界で年間1億5千万頭のウシが人工授精されており、その90%が凍結精液によるものである。ブタやヒツジでは精液の凍結保存技術は十分に確立されていないが、ヨーロッパではブタの人工授精、ソ連、中国やオセアニアでのヤギ、北欧での毛皮獣の人工授精など活発に行われている。いずれの場合にも少数精鋭の雄畜の効率利用という点で顕著な改良効果を挙げている。

### 2. 胚移植 (ET)

胚の移植技術は、人工授精に見られるような雄畜の優良遺伝形質のみならず、優良雌動物の効率利用も期待できる。殊にウシのような単胎家畜では、生涯に10頭前後の子孫を残しうにすぎないが、過排卵処理によって供胚牛から年間20頭程度の移植可能胚を得ることができる。(5個×3月間隔で4回過排卵)。したがって生涯に100頭程度の子孫を残すことが出来る。(20個の胚×8年×60%妊娠率)

わが国のETの応用意義として次のような項目が挙げられよう。

- (1) 乳牛を借り腹にして2卵移植による肉牛の増数。
- (2) 乳牛飼養農家での高能力牛を供胚牛として平均能力の向上。
- (3) 従来、生体で輸入されてきた北米産乳牛の種雄・雌牛を凍結胚(とくに性鑑別胚)で輸入し得る。

外国の例では、特定の品種の急激な増数、例えば耐暑性の強いウシを中・南米、東南アジアなどで現地のウシの腹を借りて増数する計画、あるいはニュージーランドなどでカシミヤヤギとアンゴラヤギの交配によって作られたカシュゴラをヤギに移植して急速な増数をする計画、中国では黄牛を借腹にして乳牛を増産するなど、他の家畜種でも応用例が増えてくるものと考えられる。(表1,2)

表-1 ウシにおけるETの効果

1回の過排卵・授精 .....	10個
回収 .....	7個
移植可能胚 .....	5個
年間4回処置 .....	20個
20個×60%妊娠率×8歳まで	
<u>100頭</u>	

畜産におけるバイオテクノロジー（入谷）

表-2 ウシにおける胚移植の概況

(万頭)\*

	年 間		過去5年間	
	新鮮胚	凍結胚	新鮮胚	凍結胚
北 米	15	3	57	8
中南米	3	1	6	2
ヨーロッパ	9	2	30	5
アジア・オセアニア	6	2	11	5
計	33	8	104	20

\*入谷の推計値、とくに東ヨーロッパ諸国のものは私信による。

### 3. 未成熟卵や胚の凍結保存

背景と現状：1972年Whittingham及びWilmutによって初めてマウス胚凍結の成功例が報告された。1～1.5MのDMSOを耐凍剤として-60℃まで0.3～1.0℃/minときわめてゆっくりと冷却するものであって、胚の凍結そのものは画期的であったが、非常に手間のかかる技術であった。1973年にはウシ胚の凍結保存が報告された（WilmutとRowson）。ウシでは、脱水を十分にするためにマウスよりも更に冷却速度を遅くする必要があった。

1974年にはUtsumiらが氷晶形成危険温度域を急速凍結することによって、ラット胚の凍結保存に成功している。1970年代後半になると、ウサギ、ヒツジ、ヤギ胚でも凍結保存に成功した。Biltonら（1976）がヤギ胚を凍結した方式が現在も広く家畜胚の凍結の基本となっている。

1980年になると、ウシのETに凍結胚がつかわれ、また実験動物ではgeneバンクとして広く応用されるようになった。

また、倫理的問題が解決されればヒトのIVF-ETプログラムで凍結未受精卵ないしは胚の応用が期待される。最近RallとFahy（1985）は、マウス胚を室温下、高張液で脱水し超急速凍結するいわゆる“vitrification”によって8細胞胚を凍結し、80%の生存率を得ている。現在のところマウス胚に限られた成功例である。

#### 4. 一卵性多数子の生産

一卵性2~8つ子の生産は、(a) その遺伝的斉一性によって実験動物としての価値高く、(b) 遺伝形質の優れた胚であれば割球の分離や胚の分断によって優良個体を急速に増数する手段として有用、(c) 8~16細胞胚や胚盤胞の内細胞塊からの一割球の個体発生能を検討するなど生理学的にも有意義である。

##### ①胚盤胞期胚の分断による双子生産：

この方法では、上述のように寒天包埋や仮親卵管での予備培養などの手間がかからず、また移植後の個体発生率も高い。ただし、一卵性双子生産に限られる。

すでにこの技術はウシのETに関連させて広く双子生産に応用されている。

ヤギ、ブタ、ヒツジ等でも同様な方法で比較的容易に双子が生産される。

図1は金鼠刃によって分断されたヤギ胚であり、図2は同様の方法で分断された肉牛の胚を乳牛に移植して生産された一卵性双子である。

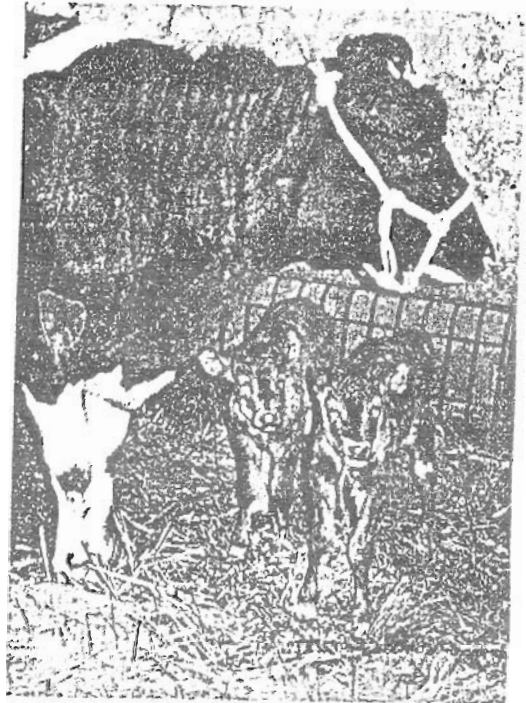
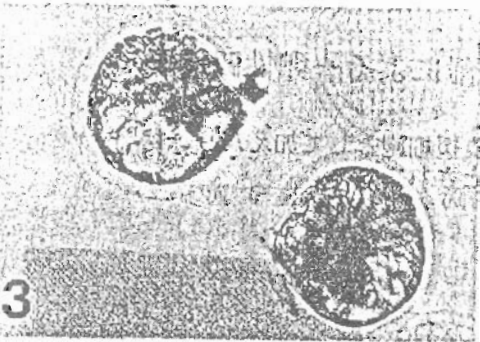
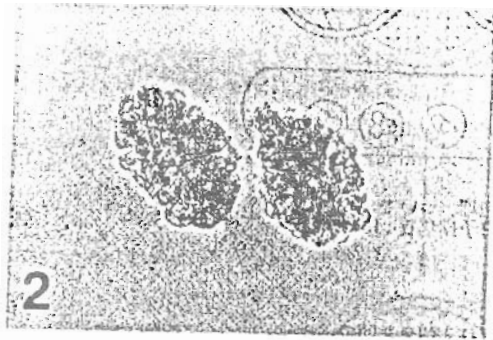
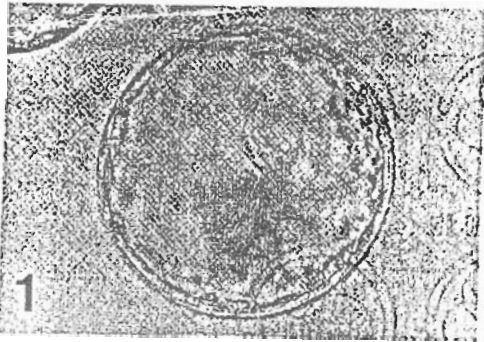


図2 胚の分断移植による  
双子生産（京大・滋賀県）

図1 微小金鼠刃によるヤギ  
胚盤胞期胚（1）の分断  
（2）と透明帯への封入（3）

②割球分離による方法：

分離割球を空の透明帯に封入し、これをさらに寒天包埋して仮親の卵管内で数日間発育させたのち本移植するという方法である。これによって、1/2~1/4割球から効率よく産子の生産が出来るようになった。しかし、8~16細胞期胚の1割球から個体発生させるのはきわめて難しい。これは分割が進むにつれて割球が小さくなり、1個体に発生するための細胞質材料が不足すること一因と考えられる。これを補うために支援細胞(rescue cell)を加えたり(図3)、未受精成熟卵の卵細胞質を1/8~1/16割球と融合させて(Willadsen, 1986)個体への発生率を高める方法がよいとされている。(図3, 4)


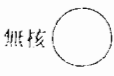





	未受精卵	無核		有核	
		1/8	1/16	1/8	
融合に使った割球					
培養卵の数	76	29	35	19	
100細胞以上への 发育卵数(%)	32 (42)	14 (48)	4 (11)	1 (5)	

図-3 未受精卵細胞質と1/8または1/16割球との融合による1割球からの発生能力(Willadsen, 1986; 入谷作図)

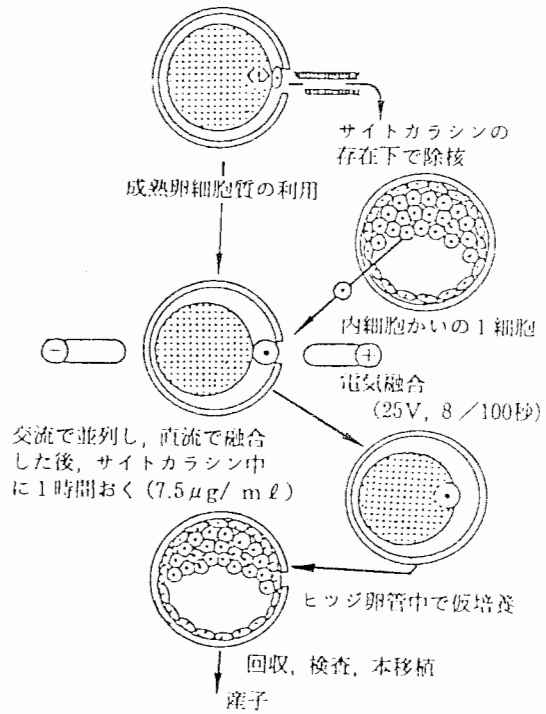


図-4 ヒツジ・ウシでのクローニング

1988年 7月にエジンバラ大学でイギリス家畜繁殖学会が開催されたが、注目すべき発表の一つとしてSmith&Wilmutによるヒツジにおけるクローニングがあげられる。1/16細胞はもとより、内細胞塊の1細胞を未受精核めき細胞質と電気融合させる方法で、すでに妊娠していることが発表された。図4に示すように電気融合のあと7.5<sup>μ</sup>g/mlのサイトカラシン中に1時間おくことが重要とされている。表3に示すように融合率も非常に高く、1/16細胞で90%、内細胞塊で81%であった。その後桑実胚～胚盤胞への発育率も非常に高く、それぞれ35%と56%であった。これらの胚を移植してヒツジで妊娠しており、中・大動物で一卵性20～30子の生産も期待できるようになった。

表-3 ヒツジ・ウシにおけるクローニング

(Smith & Wilmut, 1988)

融合に使われた細胞	融合率 (%)	Morula-Blastocyst への発育率 (%)
1/16 cell	90	35
1/ICM	81	56

#### 5. 中・大家畜における体外受精 (IVF)

哺乳動物の体外受精はほとんどすべての種で確立されており、またハムスターなどを除き、いずれの種でもIVF卵の移植によって産子が生産されている。

体外受精に成功することによって次のような利点が挙げられる。

- (1)受精の初期過程が明らかにされる。
- (2)とくにヒトにおける不妊症の治療
- (3)受精に影響を及ぼす諸要因を直接検定できる。
- (4)ウシやブタのような中・大家畜で、前核への遺伝子注入による形質転換動物の生産に際し、多数の前核期卵を供給し得る。

上記(4)項にみられるようにウシの体外受精は、今後遺伝子組換えの研究に応用されると考えられる。

ウシでは卵巣採取の卵胞卵と射出精子を使った図5に示されるようなIVF方式が広く普及し、卵胞卵の形態的な成熟率、受精率も高いが、つぎのような問題点もみられる。

- (1)雄ウシ個体によって受精率が大きく変動する。
- (2)IVF卵のウシ子宮への移植前に一旦ウサギの卵管などで胚盤胞まで発育させるための予備培養を行う必要があること。
- (3)生体内成熟卵を使わない限り、IVF後の発生率がかなり低い。

一般に卵巣から未成熟卵胞卵を採集して体外で成熟させた卵を使った場合、最終的に移植可能な胚の得られる割合は10～15%と低い。(表4)従って、卵巣内卵胞卵を使って完全成熟させるためのすぐれた体外培養系の確立も今後の重要な課題である。

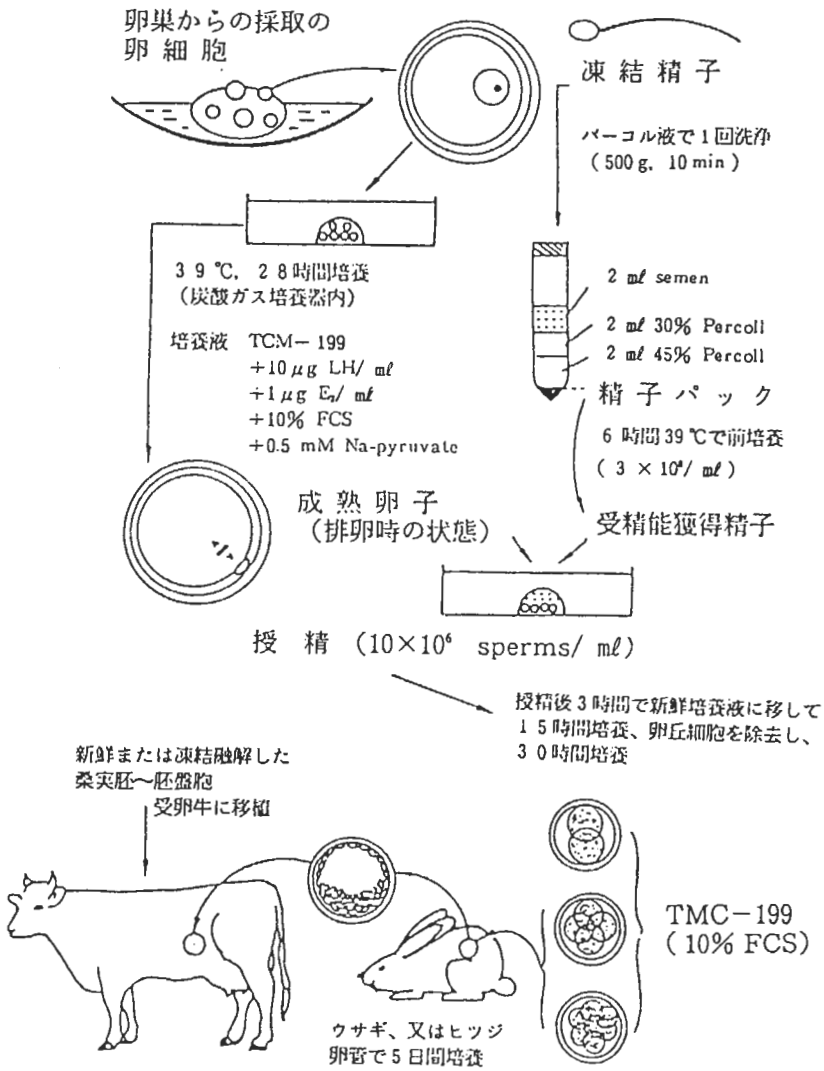


図 5 牛の体外受精・移植 (京大方式)

表-4 ウシの体外受精・移植の効率

卵胞卵の体外成熟	90%
正常受精	80% (72%)
4～8細胞への分割	40% (29%)
32～64細胞への分割発育	30% (9%)
移植後の妊娠率	65% (6%)

100個の卵胞卵から6頭の子牛


6. 卵巣内卵胞卵の体外成熟培養と受精卵の体外培養

現在、ウシの体外受精方式で発生効率の高い胚を生産する上で重要な課題の一つとして、未成熟卵胞卵の体外培養による完全成熟があげられよう。ウィスコンシン大学やダブリン大学での体外培養法（顆粒膜細胞との共培養）は、ほぼ類似のもので表4に示すように成熟卵胞の卵丘近辺の細胞と共培養する方式である。卵丘細胞の黄体化による効果を期待している。結果は40%と高い胚盤胞率をえている。

またウシやヒツジの体外受精卵を子宮内への本移植に先だって、ウサギやヒツジの

卵管に仮移植して、桑実胚や胚盤胞を生産する方式がとられているが、GandolfiとMoorは受精後の胚の体外培養で卵管上皮細胞との共培養で、その後の発生率の高い胚のえられることを報告している。図6に示されるように6日間共培養した胚のうち拡張胚盤胞への発育率は47%、また移植胚の発生率も30%と高かった。

表-5 ウシ卵胞卵の体外成熟培養系\*

培養液中に 10 ~ 15 卵胞卵	
+	$5 \sim 7 \times 10^4 / \text{ml}$ 卵胞細胞 20%発情期ウシ血清 ※ ゴナドトロピン無添加 ※ 振とう培養
	
体外成熟 → 体外受精 → ヒツジ卵管内	
↓ 数日間培養	
桑実胚 ~ 胚盤胞期胚への発生率 = 40%	

\* Leibfried et al.

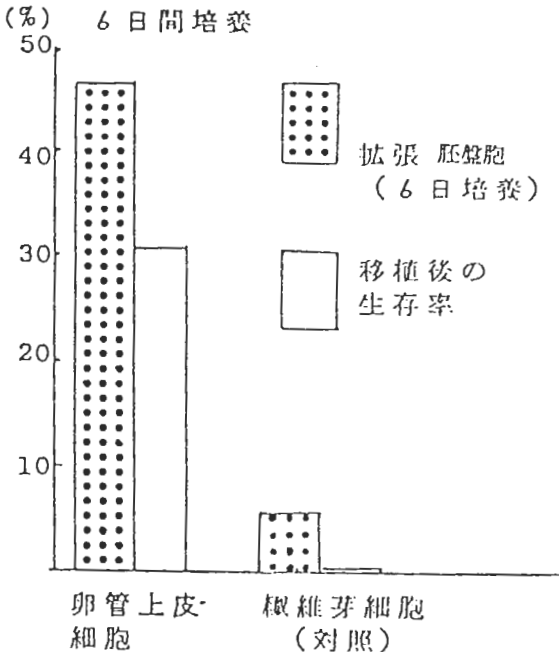


図6 ヒツジ受精卵の体外発育に及ぼす共培養の影響

(Gandolfi & Moor, 1988)

## 7. 形質転換動物の生産

医学分野で発ガン遺伝子を組みこんで病態モデル動物を生産したり、特定の生理活性物質を本来は生産していない動物の特定の臓器で生産させる試みがなされている。畜産分野でも効率的な乳、肉、毛の生産を期待して、形質転換動物の生産が活発になってきている。最近アメリカのRexroadはヒツジやブタへの遺伝子注入に関する業績を総説している。表5に示すようにヒト、ウシ、ヒツジ、ブタなどの生長ホルモン遺伝子とメタロサイオネイン(MT)遺伝子をつけて注入した場合が非常に多い。最も多く研究されているのはブタで、表-6からみても7,610個の注入胚を移植して618頭が生まれており(8%)、うち48頭(7.8%)に遺伝子が組みこまれ、発現の有無を検定した36頭中21頭(58%)で発現をみている。

表-6 家畜への遺伝子導入 (Rexroad改変, 1988)

複合遺伝子	動物種 (研究者)	移植 遺伝子注入 胚数	産子数 (%)	挿入産子数 (%)	発現産子数 (%)
MThGH	ブタ (Bremら, 1985)	268	15 (5.6)	1 (6.7)	-
	ブタ (Hammerら, 1985)	2,035	192 (9.4)	20 (10.4)	11/18 (61)
	ヒツジ (Hammerら, 1985)	1,032	73 (7.1)	1 (1.4)	-
MTbGH	ブタ (Purselら, 1988)	2,198	149 (6.8)	11 (7.4)	8 (73)
	ヒツジ (Purselら, 1988)	842	47 (5.6)	2 (4.3)	2 (100)
MToGH	ヤギ (Fabricantら, 1987)	153	9 (5.9)	0	-
	ヒツジ (Nancarrowら, 1987)	436	27 (6.2)	1 (3.7)	-
MTpGH	ブタ (Seamark, 1987) (Vize, 1987)	423	13 (3.1)	6 (46.2)	1/6 (17)
MLVrGH	ブタ (Ebertら, 1988)	59	15 (25.4)	1 (6.7)	1/1 (100)
MThGRH	ヒツジ (Pinkertら, 1987)	435	63 (14.5)	9 (14.3)	1/7 (14)
	ブタ (Pinkertら, 1987)	2,627	234 (8.9)	9 (3.8)	-
RSVCAT	ウシ (Bieryら, 1988)	819	79 (9.6)	4 (5.1)	1/1 (100)

\*産子数に対する割合

表-7 TGブタの次世代への外来遺伝子  
Transmission (Pursel et al., 1987)

マウスMT-I-bGH 遺伝子発現検定	注入 血中bGH (RIA)
a. 未経産雌ブタ×AI	(TG発現雄) 3/13は, TG発現
b. 未経産雌ブタ×AI	(TG非発現雄)
No.1	17/52は, TG非発現
No.2	1/33は, TG非発現



PurselによるとMT-bGH発現ブタでは血清中bGHが高い一方でブタ自身のpGH濃度がきわめて低く、対照ブタや非発現ブタにくらべて発育が非常におそいという。また形質転換ブタでは食欲が弱く、生時体重も小さい。したがって対照と同じくらいに発育するのに飼料消費は少なくすむという。

なお、組みこまれた外来遺伝子の次世代へのトランスミッションについても、少数ではあるがPurselらの成績があげられる。

TGでしかも発現オスブタで人工授精されたaグループでは、生まれた13頭中3頭はTGでしかも発現していた。しかし、TGで非発現オスブタで人工授精した場合、No1では5.2頭中1.7頭はTGであったが発現せず、No2では3.3頭中わずかに1頭がTGであったにすぎない。

筆者の知る限り、TG家畜で唯一有用な動物が生産された例としてオハイオ大学のWagnerら(1987)の成果があげられ、ブタでロース芯の大きい皮下脂肪のうすい個体が生産された。(表8) この先数年～数十年前後には、畜産分野でも有用な形質転換動物の作出が期待される。

表-8 MT-bGH融合遺伝子のブタ前核への注入(T.Wagner)

500～200	コピーの fusion genes
1～1.5ml	0.5 μm内径ピペット使用
40	注入卵子/受胎雌ブタ
18	子ブタ/3頭の受胎雌
1/3	挿入ブタ - bGH (肝、腎で発現)
0	ロース芯 (×1.4)
0	皮下脂肪がうすい (1/3)