

## ホルスタイン種雌牛由来卵丘細胞から作出したクローン個体と その後代産子に関する生理学および病理組織学的観察

長谷川清寿 佐々木恵美 安部亜津子 村尾克之 高仁敏光

**要約** 核移植技術の実用化に向けた知見の蓄積を目的として、ホルスタイン種雌牛からの体細胞クローン個体およびその後代産子の生産を試みるとともに、それらを対象とした発育、生理機能に関する調査ならびに病理組織学的検査を行った。ホルスタイン種成雌牛 (M) から経腔で採取後に成熟培養処理した卵丘細胞から移植可能な核移植胚が発生し、受胎牛に移植したところ1頭のクローン個体 (CM) が娩出された。CMは6か月齢時から発情徴候が定期的に観察され、人工授精 (AI) で2頭の産子 (PCM-1：雄、PCM-2：雌) を分娩した。生時体重はCMが52.0kg、PCM-1が39.6kg、PCM-2が47.0kgであり、12か月齢までの若齢期では発育の鈍化は認められず、臨床的な問題もなく順調に生育した。一般血液所見を非クローン牛由来のAI産子と比較した結果、CMのWBC、RBC、HGBおよびHCTは、1～2か月齢の測定時ではAI産子の測定値を下回る傾向がみられたが、3か月齢時以後はAI産子と概ね同レベルで推移した。泌乳成績について、CMの2産次の乳量 (305日補正) は10,930kgであり (初産次は9,092kg)、Mの2産次の成績 (11,500kg) とほぼ同等であった。乳成分 (乳脂肪率、乳蛋白質率) についても、CM (4.0%、3.2%) とM (4.1%、3.1%) の成績は同レベルであった。また、CMの初産次および2産次の乳量および乳成分は、非クローン牛由来のAI産子と比べ、著しい相違がみられなかった。全ての調査対象牛は、計画的と殺によって外貌所見、剖検による臓器等の肉眼所見および組織所見を調べたが、特筆すべき異常は認められなかった。以上の成績から、今回の調査の対象としたクローン個体およびその後代産子において明瞭な異常が検出されず、それらは正常性を有していたと判断された。

**キーワード：**牛 ホルスタイン 体細胞クローン 後代産子

牛の体細胞をドナー核とした核移植によってクローン個体を生産する体細胞クローン技術は、近畿大学の研究グループの報告<sup>1)</sup>を皮切りに、国内では主として産業動物への技術応用を目指した研究の対象として数百頭のクローン牛が生産されてきた<sup>2)</sup>。現在、胎内ないしは生後の発育・生理機能、能力の相似性に関する知見が徐々に得られてきているところである<sup>3-8)</sup>。そして、クローン技術が畜産分野のみならず、医療分野などへの発展的応用の可能性も種々論じられている<sup>9,10)</sup>。その一方で、食品としての安全性の観点から、厚生労働省の調査チームによる核移植クローン技術の安全性に関する調査研究<sup>11)</sup>がなされ、クローン個体特有の要因によって由来食品の安全性が損なわれるとは考えがたいと結論づけられた。しかし、この技術の実用化について、科学的評価が可能なレベルの知見が揃っている状況とは言えず、生産および消費段階での社会的受容を得るまでには至っていない。

乳用種由来の体細胞クローン作出技術を生産現場で活用すること、その最も直接的な意義は、極めて高い泌乳能力を持つ雌牛 (スーパーカウ) の複製・

増殖による高能力集団の形成であり、最終的な目標は、その効果として得られる農家経営の安定であろう。Bousquetら<sup>12)</sup>も、乳用牛の繁殖手法の一つとして体細胞クローン技術を導入した場合、商業あるいは選抜育種手法として十分利用できる可能性があることを述べている。このように利用の方向性が種々提案されるなか、海外では2,000個規模のクローン胚の移植および100頭を超える産子調査<sup>13)</sup>も行われている。しかしながら、国内での研究報告例<sup>14-18)</sup>は稀少であり、技術評価の隘路ともなっている。その主な理由として、前述のような社会的背景から乳用雌牛由来の体細胞クローンおよびその後代雌産子から搾乳した生乳の出荷が政府によって自粛されている現状で、試験段階においては分別搾乳と乳廃棄処理の手間やコストが少なからず生じ、個々の研究機関レベルでの試験設計が極めて困難になっていることが挙げられる。

今回我々は、核移植技術の実用化に向けた知見の蓄積を目的として、ホルスタイン種雌牛からの体細胞クローン個体およびその後代産子の生産を試みるとともに、それらを対象とした発育、生理機能に関

する調査ならびに採材組織の検査を行った。

### 材料および方法

#### 体細胞核移植および産子生産

核移植のドナー細胞は、ホルスタイン成雌牛1頭 (M:1990.2.24米国で出生→1993.12スーパー乳用牛として本県に導入→1994.1.12に2産次→) の卵管内、ならびに死亡した状態で娩出された雌子牛1頭 (S:米国からの輸入胚を県内で移植→娩出直後に死亡) の卵管上皮および皮膚組織片から分離培養した。M (年齢:10) 由来の卵丘細胞は、卵子複合体の状態を経膈採取 (Ovum Pick-Up: OPU)<sup>19,20)</sup> した後、5%FBS (牛胎子血清) を添加したTCM-199 (Gibco BRL) 内で20時間成熟培養し、核移植に供試した。S由来の卵管上皮および皮膚組織片由来の細胞は、分離培養を10%FBSを添加したDulbecco's modified Eagle medium (D-MEM; Sigma) 内で行い、4および9回の継代後に-80℃で凍結保存した。さらに、10%FBS加D-MEM内で3日間、さらに0.5%FBS加D-MEM内で5日間培養処理した。全てのドナー細胞は、核移植の直前に0.5%FBS加PBS (-) 中に浮遊させた。レシピエント卵子は、摘出卵巣から採取後5%子牛血清添加TCM-199で19~20時間成熟培養を行った後に除核処理した。核移植卵は、直流パルス (30V/150 $\mu$ m、10 $\mu$ sec $\times$ 1回) を通電後、2.5 $\mu$ g/ml Cytochalasin D (Sigma) および10 $\mu$ g/ml Cycloheximide (Sigma) で1時間、さらにCycloheximideで4時間の処理を行い、融合・活性化<sup>21)</sup> した。核移植卵の発生培地は、5%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub>、90%N<sub>2</sub>の気相条件下の血清無添加の改変TCM-199培地 (IVD-101; 機能性ペプチド研究所)<sup>22)</sup> を用いた。発生培養Day7 (核移植日: Day0) 時点での実体顕微鏡下の形態検査で移植可能と判定した胚盤胞期胚は、Day6~7 (発情日: Day0) の機能性黄体を有するホルスタイン種受胎牛に、1または2胚を移植した。胎子の生存性は、胎齢40日目に超音波画像診断装置 (Aloka; SSD-900) を用い、胎子およびその付属物の確認ならびに胎子心拍の有無によって判定した。

#### 体細胞クローンおよび後代産子の調査

調査対象 (図1) は、マイクロサテライトDNA多型領域<sup>23)</sup> の解析によってM由来のクローン個体と確認した“CM”、ならびに、CMの初産次雄牛“PCM-1”および2産次雌牛“PCM-2”の3頭であり、飼育方法は日本飼養標準<sup>24)</sup> に準じた。発育測定値は、(社)日本ホルスタイン登録協会の標準発育値 (雌標準値)<sup>25)</sup> および飼養標準 (雄標準値)<sup>24)</sup> と比

較した。末梢血の採取は生後1か月齢時から1か月間隔で12か月齢時まで行い、自動血球計数器 (MEK-6358; 日本光電) を用いて白血球数 (WBC)、赤血球数 (RBC)、血中ヘモグロビン量 (HGB) および血球容積 (HCT) を測定した。CMの泌乳能力は、牛群検定 ((社)家畜改良事業団) に参加して調査し、2産次について細胞採取牛 (M) の成績と比較した。調査対象牛のと殺および病理組織学的検査は、CMが39か月齢、PCM-1が8か月齢、PCM-2が17か月齢時に行った。

### 成 績

#### 核移植および産子生産

体細胞核移植によるドナー細胞種別の融合率は、卵丘細胞 (M由来; 未継代) が37.9% (36/95)、卵管上皮細胞 (S由来; 継代5回) が72.4% (55/76)、皮膚繊維芽細胞 (S由来; 継代10回) が77.8% (14/18) であった。また、Day7での移植可能胚への発生率は、卵丘細胞が26.0% (7/36)、卵管上皮細胞が36.4% (20/55)、皮膚繊維芽細胞が28.6% (4/14) であった。さらに、卵丘細胞由来の核移植胚を受胎牛へ新鮮移植した結果、受胎率 (胎子数/移植胚数) は50.0% (1/2) であったが、卵管上皮細胞および皮膚繊維芽細胞由来の胚を緩慢凍結後ダイレクト移植した場合には0% (0/10) および33.3% (1/3) であった。卵丘細胞由来の核移植胚の移植で受胎確認した受胎牛から1頭のクローン産子 (CM:2000.7.20出生) が得られ、その出生時胎齢は296日であった。CMは、6か月齢時から発情徴候が定期的に観察され、国内で採取・販売されているホルスタイン種凍結精液の人工授精 (AI) で2頭の産子を分娩した。その内訳は、初産次雄牛 (PCM-1:2002.7.11出生、5か月齢時去勢) および2産次雌牛 (PCM-2:2003.7.1出生) であり、それぞれの出生時胎齢は285および280日であった。

#### 産子の調査

発育値に関する調査の結果 (表1)、生時体重 (kg) は、CM (52.0) およびPCM-2 (47.0) が雌標準値 (40.0) と比べて大きく、PCM-1 (39.6) が雄標準値 (47.0) と比べて小さい値であった。12か月齢時での発育測定値 (体重: kg、体高: cm) は、CM (389.0、130.5) およびPCM-2 (414.0、130.0) であり、いずれの個体も雌標準値 (327.5kg、122.4cm) を上回った。また、PCM-1の5か月齢時の発育値 (188.0kg、102.0cm) は雄標準値 (195.0kg、106.0cm) と比べてやや低値を示したが、極度の発

育鈍化は認められなかった。

一般血液所見については、それぞれの測定値を同一飼養管理下の非クローン牛から生産したAI産子（3頭）と比較した（図2）。調査対象牛のWBCは、2か月齢時までの幼齢期ではAI産子と比べて低値を示したが、3か月齢以後は概ね同レベルで推移した。また、クローン個体であるCMのRBC、HGBおよびHCTは、1～2か月齢の測定時ではAI産子の測定値を下回る傾向がみられたが、3か月齢時以後はAI産子と概ね同レベルで推移した。

泌乳成績（表2）について、CMの2産次の乳量（305日補正）は10,930kgであり（初産次は9,092kg）、Mの2産次の成績（11,500kg）とほぼ同等であった。乳成分（乳脂肪率、乳蛋白質率）についても、CM

（4.0%、3.2%）とM（4.1%、3.1%）の成績は同レベルであった。また、CMの初産次および2産次の乳量および乳成分は、AI産子（各産次について2例ずつを比較対照、CMと同時期に同一飼養管理下で飼養）と比べ、著しい相違がみられなかった。

全ての調査対象牛は、計画的な殺によって外貌所見、剖検による臓器等の肉眼所見および組織所見を観察したが、特筆すべき異常は認められなかった（表3）。CMは生時から両眼球の角膜が突出していたが、機能障害による臨床的症状は確認されなかった。また、組織学的検査は主要臓器（肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺臓、胸腺、甲状腺、リンパ節、生殖器、消化器、脳）を中心に行ったが、構造的な異常は検出されなかった（図3：CM、図4：PCM-2）。

表1 出生経過および発育測定成績

調査対象	出生時胎齢 (分娩誘起)	体重(kg, ( )内は標準値)			体高(cm, ( )内は標準値)	
		生時	6か月齢	12か月齢	6か月齢	12か月齢
CM	296日	52.0	184.0	389.0	107.0	130.5
	(有り)	(40.0)	(172.4)	(327.5)	(104.5)	(122.4)
PCM-1	285日	39.6	188.0*	-	102.0*	-
	(無し)	(47.0)	(195.0)*		(106.0)*	
PCM-2	280日	47.0	233.0	414.0	110.0	130.0
	(無し)	(40.0)	(172.4)	(327.5)	(104.5)	(122.4)

\*5か月齢時での値。

表2 泌乳成績

産次	調査対象	補正乳量 (kg・305日)	平均実乳量 (kg/日)	乳脂肪率 (%)	乳蛋白質率 (%)	無脂固形分率 (%)
1	CM	9,092	23.7	4.5	3.5	9.1
	対照-1*	10,647	26.0	4.3	3.6	9.1
	対照-2*	10,696	26.4	4.0	3.3	9.1
2	M	11,500	34.8	4.2	3.1	8.6
	CM	10,930	30.2	4.0	3.2	8.8
	対照-2*	10,922	27.3	4.1	3.3	9.0
	対照-3*	11,424	35.0	4.0	3.5	9.1

\*対照（1-3）は全て場内生産牛で、CMと同時期に搾乳。

表3 病理組織検査成績

調査対象	月齢	外貌所見	剖検所見	組織所見
CM	39	両眼球の角膜突出 ほか異常なし	肉眼的著変なし	諸臓器について構造的な異常無し
PCM-1	8	異常なし	肉眼的著変なし	諸臓器について構造的な異常無し
PCM-2	17	異常なし	左心室弁膜部に小嚢胞 ほか著変なし	諸臓器について構造的な異常無し

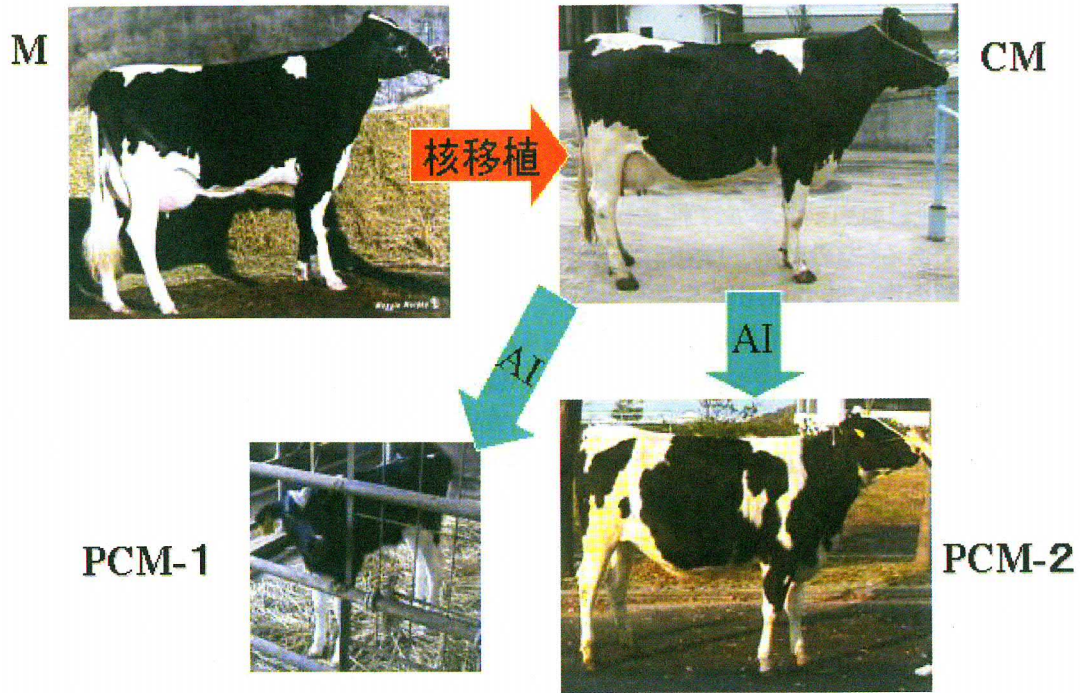


図1 細胞採取牛 (M) から作出した体細胞クローン個体 (CM) およびその後代産子 (PCM-1, PCM-2)

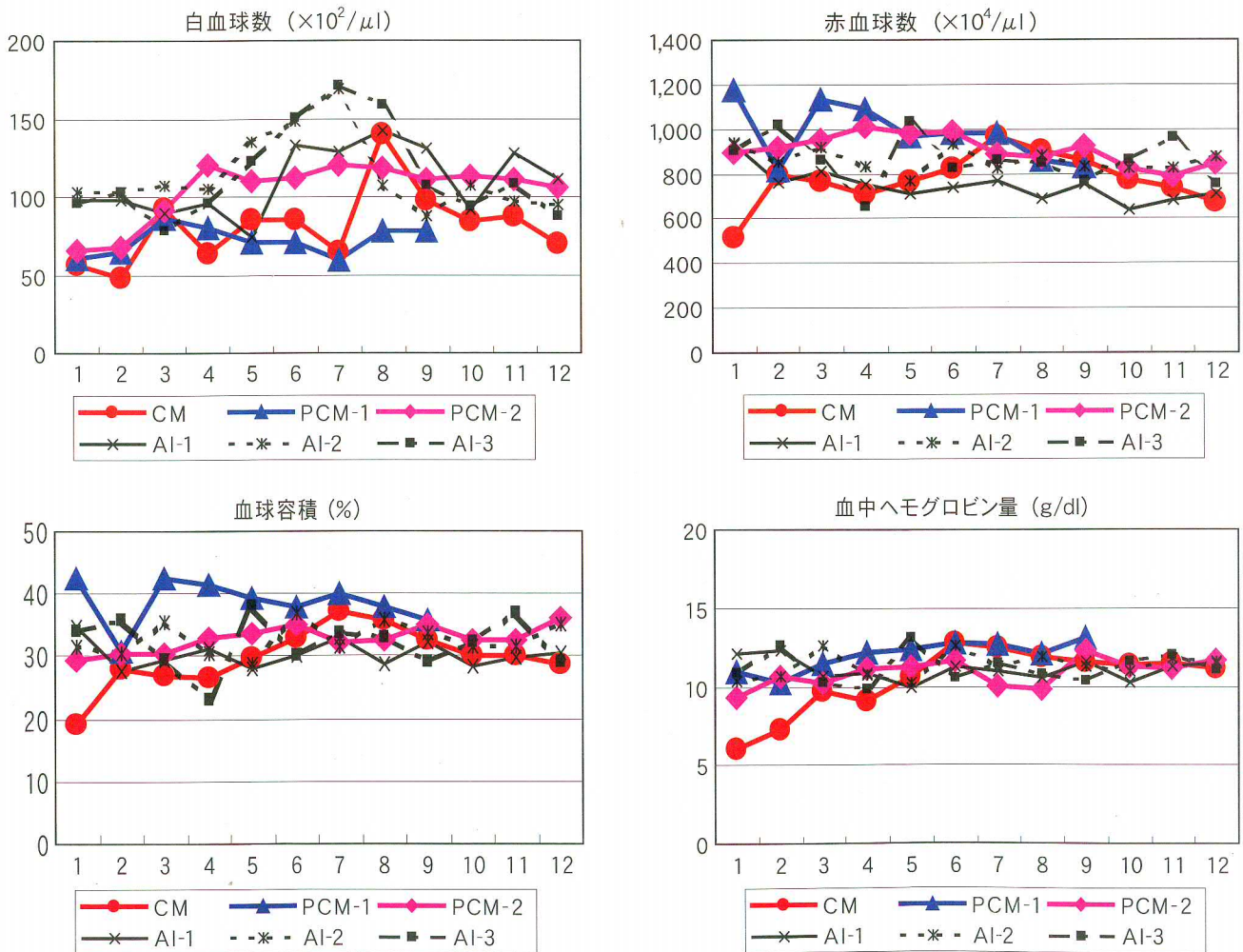


図2 血液所見の推移

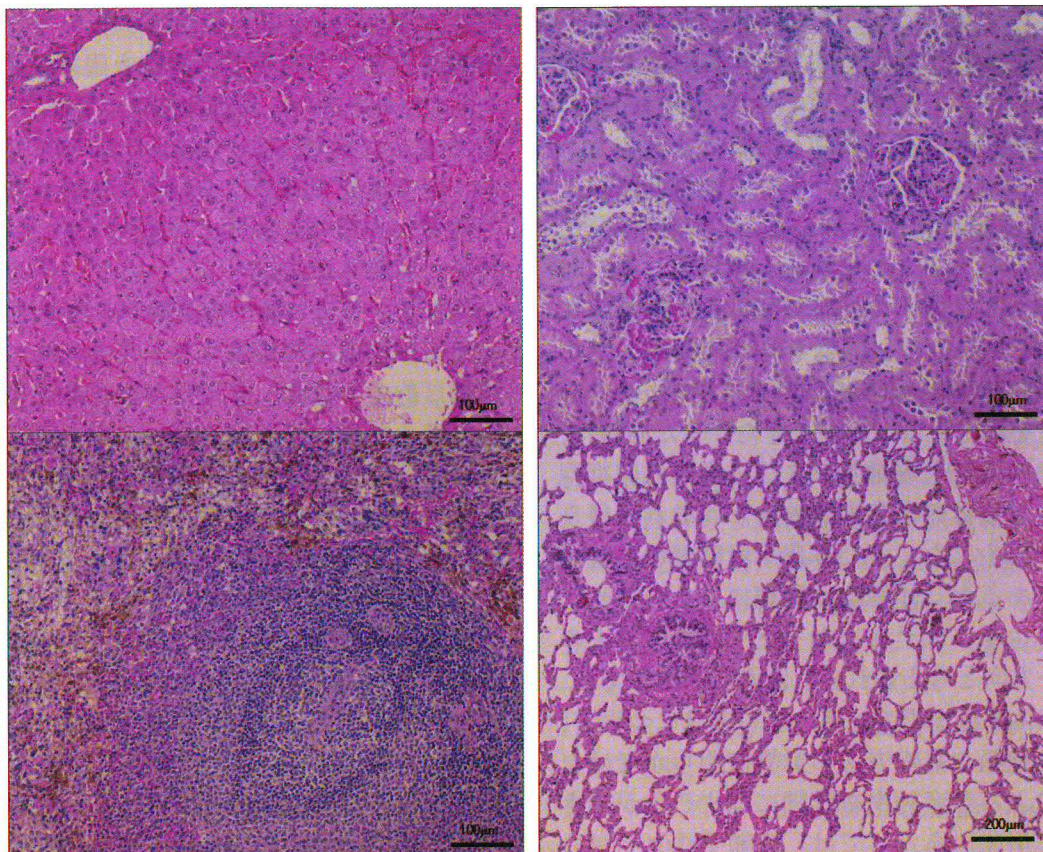


図3 体細胞クローン個体 (CM) の主要臓器における組織像  
肝 (左上)、腎 (右上)、脾 (左下) および肺 (右下) に構造的異常は認められない。

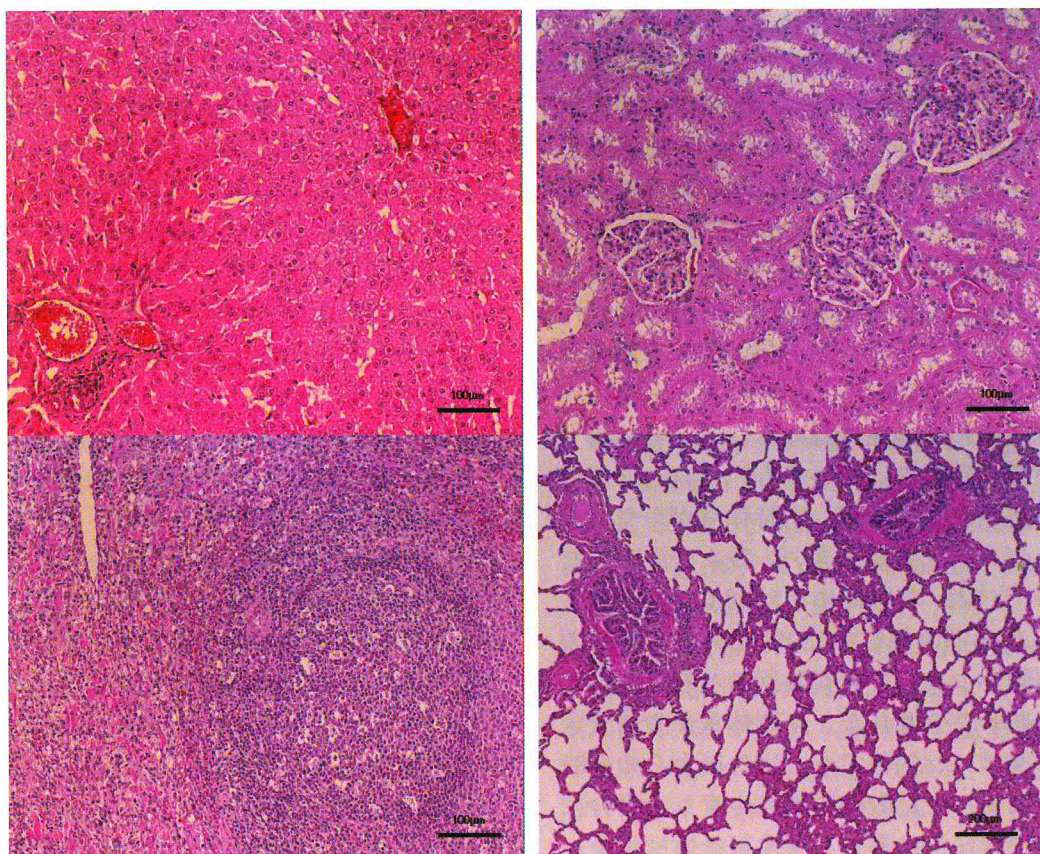


図4 体細胞クローンの後代産子 (PCM-2) の主要臓器における組織像  
肝 (左上)、腎 (右上)、脾 (左下) および肺 (右下) に構造的異常は認められない。

## 考 察

我々は既に、OPUで採取後に成熟培養した卵丘細胞を核移植のドナー細胞に用いて黒毛和種由来の体細胞クローン牛の生産に成功したことを報告し、その利点として (1)特定個体からの体細胞採取および翌日の核移植が可能であること、(2)OPUは発情周期に関係なく行えることに加え、核移植材料としての卵丘細胞および卵子の同時採取も可能であることを指摘した<sup>26)</sup>。今回も、同様な方法で処理したホルスタイン種由来の卵丘細胞を核移植に用い、クローン個体の生産を実証することができた。また同時に、死産胎子由来の卵管上皮細胞および皮膚繊維芽細胞からのクローン個体の生産も試みたが、それは優良な遺伝資源を再生したいという農家段階での要望に応じた実験であった。体細胞核移植による胚生産は可能で、個体生産には至らなかったものの、将来の技術利用の一方向と考えられた。ただし、本報では、核移植から個体生産までの一連のプロセスについて、ドナー細胞の種類や継代方法の影響が明らかではなく、核移植による生産効率を詳細に示すことができなかった。実用化にあたっては、繁殖手法としての一層の検討が必要である。

ホルスタイン種由来の体細胞クローン雌牛の育成過程での発育および繁殖性について、問題視するような報告はみあたらない。長野ら<sup>27)</sup>によれば、皮膚繊維芽細胞由来の体細胞クローン個体の生時体重(53.5-62.2kg)はAI産子(40.0-51.0kg)や標準値(40.0kg)<sup>25)</sup>よりも高い数値を示したが、その後の発育は同等かそれ以上で良好であったとしている。Heymanら<sup>28)</sup>は50頭ものクローン牛を調査し、その生時体重(49.3±11.0kg)はAI産子(40.6±5.6kg)と比べて大きい傾向であったが、統計的な有意差は認められなかった( $p<0.05$ )としている。同時に、その後の発育経過に異常性は認められないと結論づけている。いずれの報告においても、クローン個体の異常性は否定されているが、生時体重がやや大きい傾向で、そのバラツキも大きい。我々が生産したクローン個体(CM)の生時体重は52.0kgでやや大きい傾向であり、標準値<sup>25)</sup>の130%であった。その後の発育は順調かつ良好で、複数回のAIを行うことなく、2頭の産子を分娩した。生時体重がやや大きい傾向にあるクローン個体でも、出生後からの一般的な管理方法によって比較的順調に生育した場合には、その発育や繁殖性に異常を来す可能性は少ないと思われた。今回はドナー細胞採取牛の生時体重が不明であること、例数が少ないことなどで論拠不足

であるが、Youngら<sup>29)</sup>が指摘するように核移植から胎子娩出までの過程で正常性を阻害する要因が存在するかも知れない。体細胞クローン雌牛へのAIによって出生した後代牛(PCM-1およびPCM-2)の発育については、本調査において、生時から育成過程での発育の異常性はほとんど認められず、“正常な個体”と判断した。

体細胞クローン個体の若齢期の血液性状について、窪田ら<sup>6)</sup>は黒毛和種由来雄子牛を対象に調査し、4週齢(約1か月齢)までは赤血球数および白血球数がAI産子と比べて有意に低いことを報告している。さらに、長野ら<sup>27)</sup>はホルスタイン種由来雌牛について調べ、同様な成績を得ている。今回の調査では1か月齢未満での検査は詳細に行っていないが、1~2か月齢時点での体細胞クローン個体(CM)の数値は既報を裏付けるものであり、胎子期から4週齢までの幼齢期にかけて造血機能が低い状態であることが推察された。CMの後代産子(PCM-1およびPCM-2)では、このような傾向は顕著ではなく、比較対象としたAI産子とほぼ同様に推移した。

乳用種では泌乳能力がその個体の経済的価値を左右することから、細胞採取したドナー牛と同等の能力をクローン個体が発揮できるかどうか重要なポイントである。ドナー牛(M)とそのクローン(CM)の2産次を比較した場合、搾乳時期が10年以上隔たっていたものの、乳量および乳成分が概ね同レベルであった。さらに、飼養環境の影響を受けやすい指標であるため、同一時期に飼育したAI産子を比較の対象としたが、CMの成績は初産次、2産次ともにほぼ同レベルであった。長野ら<sup>30)</sup>も、3頭のクローン牛を用いて初産次の成績を同様に比較検討しているが、ドナー牛およびAI産子との差がみられなかったと報告している。これらのことから、飼養標準<sup>24)</sup>に基づいた一般的な栄養管理によれば、クローン個体として期待される能力を発揮させることができると考えられた。将来的には、後代産子に関するデータの蓄積、検討も重要であろう。

世界で初めての体細胞クローン牛が誕生してから約7年が経過し、この技術における流死産や生後直死例あるいは計画的淘汰例を中心とした病理学的検査<sup>11,31)</sup>が行われてきた。一部の体細胞クローンの異常性が指摘されながらも、体細胞クローンに特徴的な病理所見を特定するまでには至っておらず、従来の病理診断の域を超える情報は得られていない<sup>11)</sup>。我々はこの調査において、クローン個体および2頭の後代産子をと殺して、病理組織学的観察を試みた。

その結果として、組織所見において主要臓器の構造的な異常は認められなかったことから、今回調査対象とした牛については病理組織学的見地から“正常”と判断した。しかし、佐藤<sup>32)</sup>が提案したように、継続的かつ詳細な病理学的検索は極めて重要であり、実用化を念頭に置いた場合には必須と考えられた。

今回我々が行った調査は、“体細胞クローン個体の発育や生理機能等の正常性”を確認することが目的であった。しかし、この“正常性”を証明するための調査の項目や方法については、統一的な見解が見あらず、それらについてはむしろ今後の課題とされている<sup>11)</sup>。本報告では、体細胞クローン個体およびその後代産子において、明らかな異常性は検出されず、“正常”であったと結論づけた。しかしながら、胚作出から泌乳までの一連のプロセスとしては1例のみの観察にとどまっております、普遍的な事実として捉えることは不可能であった。ただし、このような調査例が国内で蓄積されることによって、客観的に信頼されるデータになり得ると思われる。本県で繁養されている乳用種を用いた同様な研究は、当面休止せざるを得ない状況が、将来においてクローン技術のフィールド応用があるとするならば、我々の調査成績がその時点で利用されることを期待したい。

## 謝 辞

本試験の実施にあたり、終始ご助言、ご指導いただいた独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構畜産草地研究所生殖細胞研究室の高橋清也、赤木悟史の両氏に感謝の意を表します。また、病理組織検査にご協力いただいた、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九州支所臨床病理研究室佐藤真澄氏、ならびに県出雲農林振興センター家畜衛生部および家畜衛生研究所の関係諸氏に深謝いたします。

## 参 考 文 献

- 1) Kato Y., et al. *Science*, 282: 2095-2098, 1998.
- 2) 農林水産省農林水産技術会議事務局. 家畜クローン研究の現状について, <http://www.s.affrc.go.jp/doc/press/2004/1118b.htm>, 2004.
- 3) Kato Y., et al. *Journal of Reproduction and Fertility*, 120: 231-237, 2000.
- 4) Sakaguchi M., et al. *Journal of Reproduction and Development*, 46: 265-269, 2000.
- 5) 野崎 聡ら. 鹿児島県肉用牛改良研究所研究報告, 6: 1-5, 2001.
- 6) 窪田 力ら. 鹿児島県肉用牛改良研究所研究報告, 6: 32-41, 2001.
- 7) Enright B.P., et al. *Biology of Reproduction*, 66: 291-296, 2002.
- 8) Chavatte-Palmer P., et al. *Biology of Reproduction*, 66: 1596-1603, 2002.
- 9) 市瀬広武・吉田進昭. 実験医学, 18(12): 146-152, 2000.
- 10) 宮川周士・白倉良太. 遺伝子医学, 4(2): 54-57, 2000.
- 11) 熊谷 進. 「バイオテクノロジー応用食品の安全性確保及び高機能食品の開発に関する研究」分担研究報告書, <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/clone/index.html>, 2003.
- 12) Bousquet D., Blondin P. *Cloning and Stem Cells*, 6(2): 190-197, 2004.
- 13) Pace M.M., et al. *Biology of Reproduction*, 67: 334-339, 2002.
- 14) Goto Y., et al. *Animal Science Journal*, 70: 243-245, 1999.
- 15) 中原 仁ら. 岡山県総合畜産センター研究報告, 12: 5-8, 2001.
- 16) 森浩一郎ら. 鹿児島県畜産試験場研究報告, 35: 52-57, 2002.
- 17) 新藤 学ら. 平成13年度山梨県酪農試験場試験研究報告書, 35-36, 2002.
- 18) 笠井裕明ら. 徳島県立農林水産総合技術センター畜産研究所研究報告, 3: 8-13, 2003.
- 19) 今井 敬. 高度畜産新技術実用化促進事業報告書. 1-9. 家畜受精卵移植技術研究組合. 東京. 1998.
- 20) Hasegawa K., et al. *Journal of Reproduction and Development*, 45: a15, 1999.
- 21) Takahashi S., et al. *Cloned Animal and Placentation*. 30-35. Yokendo. Tokyo. 2000.
- 22) Aoyagi K., et al., *Journal of Reproduction and Development*, 45: 129-134, 1999.
- 23) Yazawa S., et al. *Animal Science and Technology*, 68: 1166-1169, 1997.
- 24) 農林水産省農林水産技術会議事務局. 日本飼養標準・乳牛, 中央畜産会. 東京. 1999.
- 25) 日本ホルスタイン登録協会. ホルスタイン種雌牛の標準発育値, 東京. 1995.
- 26) 長谷川清寿ら. 鳥根県立畜産試験場研究報告, 36: 33-37, 2003.

- 27) 長野京子ら. 鹿児島県畜産試験場研究報告, 35: 83-88, 2002.
- 28) Heyman Y., et al., *Cloning and Stem Cells*, 6(2): 111-120, 2004.
- 29) Young L. E., Fairburn H. R. *Theriogenology*, 53: 627-648, 2000.
- 30) 長野京子ら. 鹿児島県畜産試験場研究報告, 38: 58-63, 2004.
- 31) Sato M., et al., *Veterinary Pathology (53th Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists)*, 39(5): 629, 2002.
- 32) 佐藤真澄. 第139回日本獣医学会講演要旨, 141, 2005