あたらしい技術で家畜をつくる

加藤容子

はじめに

ヒトは栄養源として動物性タンパク質を必要とし、哺乳動物・鳥類・魚類などを食糧として摂取している。食糧としての動物は、太古は狩猟により得ていたが、次第に馴化させるようになり、続いてより良い形質を持つ個体を育種選抜し、現在では良い形質をもつ個体を作り出すまでに至っている。すなわち、採取→馴化→育種→作出という過程でそれぞれ種々の技術が開発され、畜産としての発展を遂げたといえる。

畜産業は、現在、日本の農業生産額の三割を占めるといわれているが、鯨肉を除く肉類の平成23年の概算自給率は54%（飼料自給率を考慮すると8%）であり、昭和40年の値である90%（42%）と比較すると、約60%まで低下している。この理由は飼料を含む穀物の自給率の低さに起因する。一方で、日本人は牛肉に対する思い入れが強く、世界の牛肉消費量ではベスト10に入るほど嗜好性が高く、国内では、地域毎に数多くのブランド牛を作り出すほど思い入れが強い。本稿では、食糧生産効率を向上させたいという目的のために、先人達の努力によって積み重ね推進されてきた畜産繁殖技術について概説したい。

人工授精

人工授精とは、選抜された優良形質の雄か

ら年間数千頭規模の雌に授精させることが可能となる家畜改良技術のなかで最も重要な技術の一つである。人工授精の最初の成功例は、1780年にイタリアでSpallanzani^{1,2)}らが子イヌを産ませた報告であるといわれている。日本では、1896年に新山らがウマで試みた報告が最初で、その後、時代と共に対象がウシへ移行し、本格的に実施されるようになった。1920年代は新鮮な精子が用いられていたが、その後は凍結保存した精子が用いられるようになった。人工授精の技術により、少数の優秀な雄動物の遺伝形質を受け継いだ多数の産子を生産することが可能となった。平成23年には約138万頭のウシが人工授精により誕生している。

体外受精

体外受精とは、体内で生じる受精を体外で再現させる技術であり、Chang³⁾は、1951年に精子が受精するためには「受精能獲得」という生理現象が必須であることを明らかにし、ついで、1959年にウサギで最初の産子作出に成功した⁴⁾。その後、ゴールデンハムスター、ラット、マウスといった多くの実験動物で成功が続き、1978年にはSteptoeとEdwards⁵⁾がヒトで最初の成功を報告した（2010年ノーベル賞授与）。ウシでは、1982年にBracketts⁶⁾らが最初の体外受精の成功を報告し、1985年には世界で初めて花田章氏らが、体外成熟培養させた卵子を

体外受精して子牛の生産に成功した⁷⁾。

受精卵（胚）移植

受精卵（胚）移植技術とは胚を母体へと戻して後期発生を促す技術であるが、胚移植の成功は1890年のHeape⁸⁾によるウサギの報告から始まり、家畜では1934年にWarwickら⁹⁾がヒツジで、ついで、ヤギ、ブタ、ウシにおいて報告されたが、これらの成功例は全て開腹手術によるものであった。1965年には杉江侑氏ら¹⁰⁾が世界に先駆けて、非外科的手術による胚移植法をウシで報告し、現在ではこの手法が主流となっている。

一卵性の複数子をつくる技術

通常、一つの受精卵からは一頭の個体しか得られないが、一つの受精卵から様々な方法で複数の産子を得ようとするのが以下に述べる技術である。「割球分離法」は、受精後の胚の割球をそれぞればらばらにして育てるもので、受精卵のもつ調節卵としての能力を利用する技術である。「胚の切断法」は桑実胚～胚盤胞を機械的に二つに分離する方法である。

割球分離法

1959年、Tarkowski¹¹⁾は、マウスを用いて2細胞期割球から1卵性の双子を得ることに成功した。その後、ヒツジとウシの4細胞期由来単

PROFILE

加藤容子
(かとう ようこ)
近畿大学農学部教授
専門：動物発生工学、家畜繁殖学

一割球や、ヒツジの8細胞期由来単一割球から産子が誕生している。このことは、それぞれの割球が調節卵としての能力すなわち全能性を保持していることを意味している。一方、安定して一卵性双子が得られるのは2細胞期までであり、4細胞期以降の発生時期では、一つの割球から一頭の個体を得るのは困難であることが分かった¹²⁾。

胚の切断法

コンパクションを生じた桑実胚や胚盤胞を二つに機械的に切断分離する手法であり、ヒツジでは1984年にGaticaらのグループ¹³⁾ならびにWilladsen and Godkeのグループ¹⁴⁾で7～8組の一卵性双子が、ウシでは1982年にOzilら¹⁵⁾が6組の一卵性双子を誕生させている。しかしながら、双子以上の複数の産子をつくることは細胞数の不足からほぼ不可能であった¹²⁾。

核移植技術

以上のように、受精卵を分離あるいは切断して、一卵性の双子を作り出すことは可能となっ

たが、一卵性の複数を作り出すことは困難であることも明らかになった。実験動物のように遺伝的制御がなされていない家畜では、たとえ一卵性の双子であったとしても、同一遺伝形質を持つ個体を作出することは基礎的研究に大きく貢献したが、生産という側面からは、良い遺伝形質を保持する均一な個体を、双子より多く得るための技術が望まれるようになった。

核移植技術は、染色体（核）を除いた卵子（レシピエント）に外来の核（ドナー）を導入して作り上げた卵子を育てて個体を得る技術である。動物の核移植は、1952年にBriggs and King¹⁶⁾ がヒョウガエルの胞胚期の細胞をドナーとした核移植卵からオタマジャクシを誕生させたのが最初である。その後、1962年にGurdon¹⁷⁾ は、アフリカツメカエルのオタマジャクシ小腸の細胞核をドナーとした核移植卵から生殖能力をもつカエルまで育てることに成功した（山中伸弥教授のiPS細胞研究とともに2012年ノーベル賞授与）。その後、哺乳動物では、1983年に初めてMcGrath and Solter¹⁸⁾ によりマウス前核期卵（受精直後の卵子）の核を入れ替えて正常なマウスまで育てたという報告がなされ、日本では1985年に角田幸雄教授ら¹⁹⁾ により追試が成功した。哺乳動物における核移植の最初の確実な成功例である。

次に、レシピエント卵細胞質として染色体を除去した「除核未受精卵」が用いられるようになった。除核未受精卵を用いた核移植では、ドナー細胞核の情報が一旦、卵子の中で「初期化」

され、あたかも受精直後のような状態にまで引き戻されて再び発生がはじまる。除核未受精卵を用いた核移植では、如何に「初期化」が適切に生じるかが重要である。ドナーとして受精卵の割球を用いる場合を受精卵核移植（クローン）、体細胞を用いる場合を体細胞クローンと呼んでいる。体細胞クローン技術は、ドナーと同一の遺伝情報を持つ個体を複製できることから、畜産業には画期的な技術革新となりえる。

受精卵核移植（受精卵クローン）

1983年に前核期卵の核置換が成功した当初は、レシピエント卵細胞質として前核期卵が用いられて研究が進められたが、ドナー細胞のステージが4細胞期を越えると、ドナーとレシピエントの発生ステージがかけ離れすぎるためバランスが崩れ、核移植卵が発生できないことが分かった。1986年にWilladsen²⁰⁾ は、除核未受精卵をレシピエントとして、8～16細胞期の割球をドナーとした核移植をおこなって正常な子ヒツジを得た。現在のクローン技術はこの報告が基盤となっている。より多くの一卵性子を作出するために、受精卵核移植胚由来の割球を、再度核移植するという「継代核移植」も実施され、1個の受精卵から40個まで複製でき（Takanoら、1997年²¹⁾）、継代核移植胚を移植すると2～6頭のクローンウシが作出できた（Stice and Keefer、1993年²²⁾、Takanoら、1997年²¹⁾）。また、最初の体細胞系列である栄養外胚葉においてもクローン作出に成功してい

る²³⁾。とはいえ、受精卵クローンではドナーとして提供できる割球（細胞）数に限りがあるため、同一遺伝形質個体の作出には限りがあった。

生殖系列上細胞の核移植

受精卵クローンの延長線上には、生殖系列細胞を対象とした核移植研究がある。初期胚割球はドナーとして使用できる数に制限があるため、均一な遺伝形質をもち、かつ、より数が多い細胞集団が探索された。まずは、将来、精子や卵子に分化する運命上にある生殖系列上の細胞集団を対象として、受精から発生を辿りながら、割球→内部細胞塊（ICM）→原始外胚葉→始原生殖細胞をドナーとした核移植卵の発生能が調べられた。その結果、始原生殖細胞では、出現直後ではクローン個体の作出に成功しているが、それ以降では、親から受け継いだインプリンティングの様式をその個体独自の性の様式に書き換える時期にあたるため、発生に必要な遺伝子発現が不安定となることから、クローン個体を形成できないことがマウスを用いた研究で明らかとなった^{24, 25)}。1996年にはCampbellら²⁶⁾により、培養した胚盤細胞からクローン個体が得られたという画期的な報告がなされたが、翌年、同じ研究グループから以下に述べる体細胞核移植成功の報告がもたらされた。始原生殖細胞にみられたインプリンティング遺伝子の再修整は、体細胞では生じない。このことが体細胞クローン作出を可能とした。

体細胞核移植

1997年、Wilmutら²⁷⁾は、成体ヒツジの体細胞（乳腺細胞）をドナーとした核移植を行い、生殖能力を持つ個体をつくりだした。これが哺乳動物のみならず、両生類のカエルでも成功していなかった「動物」における、最初の成体体細胞クローンである。1997年以降、他の哺乳動物においても相次いで追試が成功し、ウシでは翌年の1998年に筆者らの研究室で成功し²⁸⁾、その後、マウスやヤギなど約20種の動物種で同種・異種間の体細胞クローン動物の作出が報告されている²⁹⁾。しかしながら、成功率は比較的高いウシで20%以下、ブタやヒツジでは実験動物と同様、数%程度であり死亡率が高い。

現在、受精卵クローンウシは任意表示による出荷が可能、体細胞クローンウシは安全性についての評価案が示されているにも関わらず、まだ出荷は認められていない³⁰⁾。また、ブタにおける体細胞クローンは、ウシとは異なり、大部分が畜産分野ではなく、遺伝子組換え技術と組み合わせた代替臓器など医学分野への応用を念頭においた基礎研究に利用されている。

おわりに

体細胞クローン技術は、これまで先人達の努力により積み重ねられて来た様々な家畜改良増産技術の延長線上に位置しており、現在もその先端にある技術といえるが、最初の報告から16年経過した現在でも、成功率は低く、まだ

応用に結びついていない技術である。成功率の低さは、「初期化」が不十分であることに起因するが、実験動物を用いた研究でも16年間殆ど向上していない。平成23年3月31日現在の統計から、受精卵クローンウシ（730頭）と体細胞クローンウシ（589頭）の生存率を比較すると、死産：10対14%、生後直死：5対16%、病死：14対25%、事故死：3対2%であり、事故死の率がほぼ同じであるのに対して、それ以外の死因による死亡率はいずれも体細胞クローンで高い。家畜では食糧にすることが最終目的となるため、少なくとも受精卵クローンと同等の生存率まで向上させなければ、社会に受け入れられないかもしれない。検討すべき事項がまだ多く残されているといえる。

本稿は、日本畜産学会第115回大会公開講演会で発表した内容をまとめたものである。最後に、このような機会を与えて下さった、前多敬一郎東京大学教授ならびに角田幸雄近畿大学教授に深謝したい。

参考文献

- 1) Spallanzani, L., *Dissertazioni di Fisica animale e vegetabile*, Modena, 1780.
- 2) Capanna, E., Lazzaro Spallanzani: At the Roots of Modern Biology. *J.Exp.Zool.*, 285:178-196, 1999.
- 3) Chang, MC, Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*. 168(4277):697-698, 1951.
- 4) Chang, MC, Fertilization of rabbit ova in vitro. *Nature*. 184(Suppl 7):466-467, 1959.
- 5) Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*. 2(8085):366, 1978.
- 6) Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol Reprod*. Aug;27(1):147-158, 1982.
- 7) 花田 章・塩谷康生・鈴木達行, 体外成熟卵子の体外受精により得られた牛胚の非外科的移植による受胎出産例. 第78回日畜大会講要, I -36, 1986年.
- 8) Heape, W. Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother. *Proc. R. Soc. Lond., Biol. Sci.* 48, 457-459, 1890.
- 9) Warwick, BL., Berry, RO., Harlacher, WR., Results of mating rams to Agora female goats. *Proc. Am.Soc. Animal Prod.*, 27th Ann Meet, 225-227, 1934.
- 10) Sugie, T. Soma, T, Onuma, H., Studies on the ova transfer in cattle, with special reference to a successful transplantation by means of non-surgical techniques. *The Japanese journal of animal reproduction (Preliminary Report)* 10, 124-127, 1965.
- 11) Tarkowski, AK., Experiments on the development of isolated blastomers of mouse eggs. *Nature*. 184:1286-1287, 1959.
- 12) 加藤容子, クローン個体の作出からみた「核移植と核のリプログラミング」, *MedicalBio*, 2009.9月号.
- 13) Gatica R, Boland MP, Crosby TF, Gordon I., Micromanipulation of sheep morulae to produce monozygotic twins. *Theriogenology*. Apr;21(4):555-560, 1984.
- 14) Willadsen SM, Godke RA. A simple procedure for the production of identical sheep twins. *Vet Rec*. 114(10):240-243, 1984.
- 15) Ozil JP, Heyman Y, Renard JP. Production of monozygotic twins by micromanipulation and cervical transfer in the cow. *Vet Rec*. 110(6):126-127, 1982.
- 16) Briggs R, King TJ., Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 38(5):455-463, 1952.
- 17) Gurdon, JB., Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. *Dev Biol*. 4:256-273, 1962.
- 18) McGrath J, Solter D. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science*. 17;220(4603):1300-1302, 1983.
- 19) 角田幸生, 安井 司, 徳永智之, 内田 駿, 杉江 佑, マウス前核の置換と置換卵の移植による産子の生産, *家畜繁殖学雑誌*, 31(3), 130-134, 1985.
- 20) Willadsen SM. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*. 320(6057):63-65, 1986.
- 21) Takano H, Kozai C, Shimizu S, Kato Y, Tsunoda Y. Cloning of bovine embryos by multiple nuclear transfer. *Theriogenology*. 47(7), 1365-1373, 1997.
- 22) Stice SL, Keefer CL. Multiple generational bovine embryo cloning. *Biol Reprod*. 48(4), 715-719, 1993.
- 23) Tsunoda, Y. and Kato, Y. Not only inner cell mass

- cell nuclei but also trophectoderm nuclei of mouse blastocysts have a developmental totipotency. J.Reprod.Fertil., 113, 181-184, 1998.
- 24) Kato,Y. and Tsunoda,Y., Germ cell nuclei of male fetal mice can support development of chimeras to midgestation following serial transplantation. Development, 121, 779-783, 1995.
- 25) Kato,Y., RideoutIII.W.M., Hilton,K., Barton, S.C., Tsunoda,Y., Surani,M.A., Developmental potential of mouse primordial germ cells. Development, 126, 1823-1832, 1999.
- 26) Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. Nature. 380(6569), 64-66, 1996.
- 27) Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature. 385(6619), 810-813, 1997.
- 28) Kato,Y., Tani,T., Sotomaru,Y., Kurokawa,K., Kato,J., Doguchi,H., Yasue,H., Tsunoda,Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. Science, 282, 2095-2098, 1998.
- 29) Kato,Y Tsunoda,Y. Role of the donor nuclei in cloning efficiency: can the ooplasm reprogram any nucleus? Int. J. Dev. Biol. 54: 1623-1629, 2010.
- 30) 2009年6月25日に食品安全委員会の食品健康影響評価が取りまとめられ、「体細胞クローン牛及び豚並びにそれらの後代に由来する食品は、従来の繁殖技術による牛及び豚に由来する食品と比較して、同等の安全性を有すると考えられる。」との結論が示された。

.....

参考図書

家畜胚の移植、杉江信編著、養賢堂、1989年
科学技術者のための実践生命倫理、角田幸雄編著、昭和堂、
2012年