

共催公開シンポジウム「21世紀の北海道畜産・草地の展望」

畜産の先端技術がひらく新たな展望

北海道立畜産試験場 南橋 昭

はじめに

1997年の英国のDr. Wilmutらの体細胞クローン羊「Dolly」誕生の報告は、世界に衝撃を与えた。一旦分化した細胞は全能性を失うという常識が覆されたのである。その後、マウスにおいても体細胞クローンの作出が可能となり、体細胞核移植を利用したトランスジェニック動物の作出など関連の研究が大きく進展した。また、ヒトゲノムプロジェクトによりヒトの全塩基配列がほぼ解明され、家畜においても全塩基配列が明らかになる日も近いと思われる。われわれの分野でもDNAマーカー育種、牛胚の性判別、感染症や遺伝病の遺伝子診断など、DNAや遺伝子を用いた研究が行われ、一部実用化も始まっている。先端技術と言われる技術はこの他にもIT関連技術など非常に幅広い。しかし、これらを網羅することは到底無理である。そこで、ここでは、このうちのごく一部、牛の胚移植関連の研究に限定して、当試験場の成績を交えて技術ごとにその概要を紹介し、話題提供とする。

1. 胚移植と体外受精

1) 胚移植

胚移植は、1972年以来急速に発展し、日本においても牛の改良増殖の手段として定着している。農林水産省の統計によると、体内受精胚の移植頭数や産子数は年々増加しており、1998年度の移植頭数が49,000頭、産子数が15,000頭である。受胎率は、ここ10年間変化がなく、新鮮胚で50%、凍結胚で45%である。また、現在ではアメリカ、カナダだけでなく、日本においてもホルスタイン種雄牛の70%以上は胚移植により生産されたものとなっている。

2) 体外受精

体外受精は、事故や疾病により、自身で出産ができず、また、過剰排卵処理による胚採取もできない場合の遺伝資源を残す最後の手段としての利用が考えられる。また、肉牛では、食肉処理場でと殺された黒毛和種の再生産が考えられ、実際に家畜改良事業団が黒毛和種の体外受精胚を供給しており、良好な成績が得られている。

さらに、近年、超音波診断装置を用いて、生体の卵巣から直接卵子を採取する経膈採卵法(OPU)が開発され、これと体外受精を組み合わせることにより、胚が得られるようになった。OPU-体外受精により1週間に1回1-5個程度の胚が得られる。うまくいけば、過剰排卵処理による胚

採取より多くの胚が得られる。また、妊娠中の牛にも適応できることから、過剰排卵処理による胚採取と組合せることも可能である。

3) 種雄牛生産と牛群の遺伝的改良

オランダの1999年における酪農家戸数は39000戸、経産牛頭数は160万頭で、日本と大きな差はないが、15年ほどで、精液および胚の輸入国から輸出国に変貌した。オランダでは、CR Deltaという酪農家の組合組織が、乳牛改良事業のすべてを行なっている。CR Deltaでは、世代間隔の短縮を最重点課題としている。過剰排卵処理による胚採取とOPU-体外受精により、候補種雄牛と種雄牛生産用ドナー候補牛から胚を作成し、それらから生産した産子を検定するとともに選抜して候補牛にも用いている。この乳牛改良プログラムにより、1998年と1999年にアメリカTPIの1位となる種雄牛を作出している。

一方、乳用牛評価報告2001-1の評価結果によれば、日本の検定牛の遺伝的能力は1981年から順調に伸びており、それに伴って乳量も順調に伸びている。これらは、育種理論と共に、それらの育種理論を実現するための繁殖技術、すなわち人工授精や胚移植による成果と考えられる。また、1996年生まれの子牛の父牛では、国内種雄牛と海外種雄牛の遺伝的能力の差がほとんどなくなっている。このことは、世界で通用するホルスタイン種雄牛が日本にも存在することを意味している。日本も、乳牛改良プログラムを採用し胚移植やOPU-体外受精を駆使することにより、精液や胚の輸出国になることは、夢ではない。

2. 胚の性判別と精子の雌雄分別

1) PCR法による胚の性判別

胚の性判別の目的は、言うまでもなく、必要な性の産子を得ることである。現在、胚の性判別には、通常PCR(Polymerase Chain Reaction)法を用いる。マイクロマニピュレーションにより胚の一部の細胞(10個程度)を採取し、PCR装置にかけ、電気泳動を行う。雄であれば、その細胞の中にある雄に特異的な塩基配列がPCR法により増幅され、電気泳動によりバンドとなって検出される。性判別のために一部の細胞を採取した胚の受胎率は、体外受精胚と同様に新鮮胚では体内受精胚と遜色無いが、凍結胚では30%以下であり、これも細胞採取によるダメージの回復あるいは凍結方法の改善が必要である。

2) LAMP 法による胚の性別判別

当試験場では、今年度より LAMP 法を用いた性別判別キットの開発に取り組んでいる。LAMP 法は、栄研化学が開発した新しい遺伝子増幅技術で、短時間に温度変化なしに大量に目的の塩基配列を増幅させる方法である。遺伝子診断では PCR 法に置き換わる国産の次世代技術として期待されている。LAMP 法は、(1)4 つのプライマーで、6 つの領域を規定しているため、特異性が高い、(2)温度の上げ下げなどの操作は要らないため、増幅に特殊な装置を必要とせず、操作が簡単、(3)塩基配列や条件の最適化で反応時間を 10-30 分間に短縮可能、(4)使用する酵素が 1 種類で、独自技術でライセンスが不要なため、安価にすることが可能、(5)増幅効率もよく、300bp 以下であれば、1 時間で 10 μ g の増幅産物ができると、増幅した塩基配列の検出が電気泳動なしに目視で可能等の特徴がある。牛胚の性別判別では、細胞の採取は PCR 法による胚の性別判別と同様であるが、PCR 法による雄に特異的な塩基配列の増幅が LAMP 法に置き換わることにより、その後の電気泳動が不要となり、迅速に安価に判定が可能となる。おそらく、細胞の採取から、判定まで 1 時間程度で終了するようになると思われる。

3) 胚の性別判別を利用した乳牛の後継雌牛生産

LAMP 法を用いることにより、短時間に安価に胚の性別判別が可能になる。さらに、性別判別胚に適した凍結方法が開発され、平均の受胎率が 40% を越えれば、本技術は普及する可能性が十分ある。ホルスタインの後継雌牛生産に性別判別胚を用いた場合、生まれてくる子牛はすべてホルスタインの雌牛であるので、必要な頭数だけ胚を移植すれば、残りの牛には黒毛の精液あるいは胚を移植できることになる。この場合、酪農家から肉資源としてのホルスタイン雄子牛が生産されなくなる可能性があり、酪農家だけでなく、肉牛農家の状況も大きく変ると考えられる。

4) 精子の雌雄分別

日本においては家畜改良事業団がフローサイトメーターによる X 精子と Y 精子の分別に取り組んでいる。これまで、いろいろな方法が試みられてきたが、有効な方法はなく、X 精子と Y 精子の相対的 DNA 含量の差に基づいて分別する方法が、現在のところ唯一再現性のある方法である。実際には、精子の DNA を蛍光色素(ヘキスト 33342) で染色し、フローサイトメーターに流して、レーザー光を照射する。X 精子と Y 精子では DNA 含量が違うため、蛍光強度が異なり、これを検出器で検出する。検出した蛍光強度に応じて、精子 1 つ 1 つを正あるいは負に荷電し、電極により精子を振り分けて分取する。レーザー

光を常に精子頭部の扁平な面に照射しなければ、蛍光強度の検出は不可能であるが、精子を常に一定の方向に流れるように制御することが非常に難しい。また、精子すべてを分別できるわけではなく、通常 10% が X 精子、10% が Y 精子、残りの 80% は分別不能となる。さらに、分別により精子がダメージを受け、分別する速度が遅いため、少数の精子が使用できるのみである。2000 年の報告によれば、分取精度は X 精子、Y 精子ともに 90% 以上であり、顕微授精および人工授精により産子を得ているが、分取速度が 40 万/時と非常に遅く、実用には耐えない。

一方、アメリカの XY 社が、分取精度が 90% で、分取速度が X 精子と Y 精子それぞれ 2,000/秒の精子専用のフローサイトメーターを開発したことが、1999 年に報告された。分取速度は家畜改良事業団のもの 18 倍である。このフローサイトメーターを家畜改良事業団が 2 台、ジェネティクス北海道が 1 台導入し、検討中である。現在のところ人工授精に十分な数のストローを生産するには、このフローサイトメーターを 10 台あるいは数十台並べて、24 時間フル稼働する必要がある、それでも精子濃度の低いストローを使わざるを得ないと思われる。しかし、今後さらに、ノズルおよびソフトウェアの改良が進むと考えられ、そうなれば、世界の畜産は大きく変ると思われる。

3. 核移植

1) 初期胚核移植

当試験場では、ドナー細胞として、32-64 細胞期の胚を用いている。これらの胚の割球をばらばらにし、それぞれをドナー細胞とする(理論的には一卵性の 32-64 子となる)。一方、レシピアント卵子は、体外受精と同様に体外で成熟させ、核を取り除いて用いる。レシピアント卵子の活性化処理およびドナー細胞とレシピアント卵子の細胞融合後、胚(クローン胚)を移植可能な段階まで体外で培養する。

クローン胚の受胎率は、新鮮胚移植においても体内受精胚や体外受精胚に比べかなり低く、当試験場においても受胎率は 30% 程度である。さらに、流産も 20% 程度、死産や生後直死等も 20% 程度発生するため、最終的なクローン牛の作出は 20% 程度になってしまう。したがって、現在の技術レベルでは、ドナー細胞として 32-64 細胞期の胚を用いた場合、10~20 個の胚盤胞が得られ、これらをすべて移植すると、2~4 頭のクローン牛が作成できる。当試験場では、昨年 5 月に誕生した 7 頭が最多である。日本国内では、2001 年 3 月 31 日現在で 578 頭が誕生し、そのうち 153 頭が食肉として出荷されている。

2) 初期胚核移植を利用した乳牛の後継雌牛の生産

初期胚核移植による乳牛の後継雌牛の生産は、胚の性判別よりさらに効率的である。1回の胚採取からの雌子牛の生産を胚の性判別と比較してみる。1回の胚採取で6個の正常胚が回収されたとする。そのうち3個は雌胚であるので、それを受胎牛に移植すると受胎率50%で1.5頭の雌産子が得られる。核移植の場合は、性判別した3個の雌胚を用いて核移植を行う。上記の計算を当てはめれば、ドナー胚1個から3頭程度のクローン牛が得られる。したがって、3個のドナー胚からは9頭のクローン牛が得られることになる。受胎率が低いため、受胎牛は多数必要であるが、実に6倍の効率である。

3) 体細胞核移植

基本的な手技は、活性化処理および細胞融合を除き、初期胚核移植と同様である。体細胞核移植によるクローン胚の受胎率は、初期胚核移植と同様30%程度である。流産は30%程度、死産や生後直死等は40%程度発生するため、最終的なクローン牛の作出は10%程度になってしまう。受胎牛は多数必要であるが、初期胚核移植と異なり、ドナー細胞が無限に得られるため、得られるクローン牛の数も無限である。当試験場では、雌のホルスタインおよび雄の黒毛和種のクローン牛がそれぞれ1頭および2頭得られている。日本国内では、2001年3月31日現在で222頭が誕生している。

4) 黒毛和種種雄牛の産肉能力検定

当場では、胚移植を用いた全兄弟検定により黒毛和種種雄牛の造成を行なっている。優良雌牛6頭に優良種雄牛を交配して、過剰排卵処理による胚の採取を実施し、1組合せ当り22個、6組で合計132個の胚を採取する。それらの胚を受胎牛に移植し、1組合せ当り5頭、6組で合計30頭の全兄弟雄子牛を生産する。それぞれの組から発育等に優れた1頭ずつ合計6頭を選定し、直接検定を実施する。同時に残りの雄子牛4頭合計24頭を去勢して間接検定と同様の方法で肥育する。直接検定および去勢牛の発育と肉質の成績から6頭の直接検定牛の能力を判定し、2頭を選抜する。この2頭の間接検定を実施し、最終的な種雄牛としての評価を行う。当試験場では、この方法により、2000年度に脂肪交雑と皮下脂肪厚に優れた深晴波号を作出した。全兄弟牛を体細胞クローン牛あるいは初期胚クローン牛に置き換えて検定を実施することで、全兄弟検定で見られた発育や肉質の兄弟間のばらつきが小さくなり、検定精度が向上するものと思われる。後代検定が不要となれば検定期間も短縮される。

4. 遺伝子操作

1) 遺伝子修復

当試験場では、平成12年度から、種雄牛の遺伝病を克服するために遺伝子修復技術の開発に取り組んでいる。家畜にはヒトと同様に多くの遺伝病が存在している。例えば牛では、白血球粘着不全症(BLAD)、シトルリン血症、DUMPS、赤血球膜異常症、第XIII因子欠乏症、チェディアック・ヒガン症候群(CHS)、慢性間質性腎炎(クローディン16欠損症)などが知られており、これらのほとんどは原因遺伝子の1~数塩基にのみ変異あるいは欠失が見られるものである。これらの疾病は、DNA診断法により集団からのキャリアの排除が進められているが、完全に排除することは難しい。最近、遺伝子修復(gene repair)と呼ばれる技術が開発され、1~数塩基程度の塩基配列だけを入れ換えて、正常な状態に修復できることが報告されている。遺伝子修復には正常な塩基配列を持ったキメラプラスト(chimeroplast)と呼ばれる人工的に合成されたオリゴヌクレオチドを標的細胞に導入する。導入されたキメラプラストが特定の標的ヌクレオチドと結合し、あとは細胞が本来持つ遺伝子修復機構により修復される。遺伝子修復では、ベクター(レトロウイルスなど)などを使用しないため、遺伝子の相同組換えは起こらない。また、キメラプラスト自体もゲノム中に一切の痕跡を残さず、修復された配列以外は元のままである。この技術と体細胞核移植技術を用いることにより、優秀な牛の変異(不良)遺伝子のみが修復でき、遺伝病の排除が可能となる。

2) 遺伝子組換え(トランスジェニック)

遺伝子組換え動物を得る方法には、目的の遺伝子を直接前核期胚の前核に注入するマイクロインジェクション法やウイルスベクターの感染能力を使用した方法などがあるが、いずれも家畜では遺伝子組換え個体の得られる確率は低い。近年、体細胞核移植が可能になったことにより、体細胞に目的の遺伝子を導入し、遺伝子が導入された体細胞を用いて核移植を行うことにより、遺伝子組換え動物の作出が容易になった。問題は、体細胞は細胞分裂の回数が限定されていることから、遺伝子の導入された細胞だけを分別する方法、それらを増殖させる方法(培養)が難しいことである。また、体細胞核移植特有の問題ではないが、遺伝子の挿入される部位と量の制御は非常に困難である。

遺伝子組換えの目的は、畜産物の質と量、飼料効率、抗病性など経済形質に関する遺伝子を導入し、優良家畜を生産すること、成長ホルモン、インターフェロン、ラクトフェリン、プラスミノゲンアクチベーター、アンチトロンビンなどの有用生理活性物質や医薬品を生産させ

ること、疾患モデル動物の作出、移植用臓器の生産などである。1998年にアメリカのジェンザイムトランスジェニック社が遺伝子組換えヤギで生産したヒト・アンチトロンビンⅢのフェーズⅢ臨床試験を開始し、2000年の販売承認を目指していると報告されている。いわゆる動物工場が現実のものとなってきている。

最後に

今後、胚の性判別や精子の雌雄分別が実用レベルに達すれば、酪農畜産現場が大きく変化するであろう。また、体細胞核移植による家畜の

生産が可能となったことにより、遺伝子組換えやその応用が手の届くところまで来ており、これらの研究の影響は畜産にとどまらず、医療分野など他分野へ広がっている。一方、胚移植における採取胚数や受胎率は、ここ10年間変化していない。これらの向上のためには、妊娠成立機構の解明や供胚牛や受胎牛の飼養管理面からのアプローチが必要であり、育種および繁殖はもちろんであるが、他分野の研究蓄積が重要である。いずれの研究分野においても他分野との連携が必要である。