

## 伝説の種雄牛「安福」号をクローン技術で復活



(左から望安福4号、3号、1号 ※3号は2009年1月7日に感染症のため死亡)

### 研究の詳細

#### (1) 研究の背景

飛騨牛ブランドの確立に多大な貢献を果たした種雄牛「安福」号(\*1)は、平成5年9月28日に13歳で老衰のため死亡しました。安福号が埋葬される前に、種雄牛のシンボルとも言える精巣が取り出され、 $-80^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫で冷凍保存されました。安福の優れた遺伝子を、未来の技術によって復活させることができるように希望を託したのです。

安福の死から4年後の1997年、イギリスで世界初の体細胞クローン動物であるヒツジの「ドリー」の誕生が報告されました。体細胞クローン技術を応用すれば、安福と全く同じ優秀な遺伝情報を持つ動物を誕生させることができると期待されました。

しかし、従来の体細胞クローン技術では、一般的に生きて体細胞を用いる必要がありました。一方、安福の精巣は、まるごと冷凍保存されていました。適切な保存処理を行わずに冷凍された細胞は、ほとんどが凍る過程で破壊され死んでしまう(\*2)と考えられていました。従って、安福の冷凍精巣から体細胞クローン動物を作るためには、これまでにない技術が必要になるだろうと予想されました。岐阜県畜産研究所は、平成13年から近畿大学生物理工学部との共同研究により、冷凍精巣組織からの安福復活の可能性を検討してきました。

最近、理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター若山照彦博士らは、凍結して死んだマウスの細胞の核を用いてクローン動物を作成することに成功しました。この報告は、細胞が死んでいても、核が壊れていなければクローン動物を作成しうることを実証しました。

一方、私達は別のアプローチを取りました。もしも冷凍された精巣から生きて細胞を培養することができれば、体細胞クローン動物を作ることができる可能性が飛躍的に高まります。私達は冷凍されたウシの精巣の中から、生きて細胞を取り出し、培養することができるかどうか検討するところから研究を始めました。

#### (2) 研究手法

私達はまず去勢された雄牛の精巣3頭分を用いて予備実験を行いました。精巣をまるごと $-80^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫に入れ、1ヶ月ほど冷凍保存した後に、いくつかの部分に砕いて解凍し、細胞同士を酵素でばらばらにして培養を試みました。

その結果、驚いたことに、特定の部分から生きて細胞を培養することができました。精巣の周りには、精巣本体の他に精巣上体頭部、精巣上体尾部という組織があり、それらは精索組織で身体からぶら下がっています。今回の予備実験では、そのうち精巣上体頭部と、精索組織の部分から、少数ながら増殖する生きて細胞が得られました。

細胞が分裂して増殖するということから、これらの細胞は精子のもとになる生殖細胞ではなく、体細胞であると考えられました。また、細胞の中の遺伝情報も壊れておらず、正常に機能していると考えられました。表1に示すように、これらの細胞を用いてクローン胚を作製し体外培養したところ、仮親に移植可能な「胚盤胞期胚」まで発生することが確認できました。以上の結果は、2007年1月に京都で開催された国際胚移植学会(IETS)で発表しました。

# 参考資料(詳細説明)

表1. 凍結精巣組織から得られた細胞によるクローン胚の体外発育

細胞の由来	実験回数	作成したクローン胚数	卵割した胚数(%)	胚盤胞数(%)
新鮮な耳介組織	3	97	82 (83)	19 (20)
凍結精巣	3	88	69 (77)	19 (22)

安福の精巣からも、同じ手法で生きた細胞を取り出せる可能性があります。しかし安福の場合、死亡時の年齢が13歳と高齢だったことから、細胞が老化している可能性も考えられました。また、安福が夜に死亡してから、翌日精巣が取り出され冷凍されるまでに約12時間あったため、その間に細胞が死んで遺伝情報が壊れ始めている可能性もありました。さらに、もし冷凍された時に細胞が生きていたとしても、それらの細胞が13年間という長い凍結の間、状態が変化することなく生存していたのか不明でした。

国際胚移植学会の後、すぐに安福の精巣を用いた実験を開始しました。安福の凍結精巣(\*3)から、精巣上体頭部と精索の部分を分離し、予備実験と同じ手法で解凍して細胞培養を試みました。5日間の培養後、ごく少数ながら、プラスチックシャーレの底面に張り付いた細胞が見つかりました。細胞が張り付くということは、細胞が生きて活動しており、分裂増殖できる可能性があります。少数の細胞を効率的に増やすため、細胞の増殖能力を高める培養液を用いて培養を続けました。

細胞がある程度増殖できたところで、クローン胚作成実験を行いました。また一部の細胞は凍結保存して近畿大学に輸送し、細胞の正常性の検査とクローン胚の作成が行われました。

表2に示すように、合計16個のクローン胚が、仮親1頭に1個ずつ移植されました。その結果、5頭が妊娠しました。このうち1頭は妊娠約6ヶ月目で流産してしまいましたが、残りの4頭は無事に分娩に至りました。

表2. 安福の凍結精巣から得られた細胞によるクローン胚の発生

細胞の由来	培養したクローン胚数	胚盤胞数(%)	受胚雌へ移植した胚数	妊娠した受胚雌数(%)	生存産子数
凍結された安福の精巣	204	43 (21)	16	5 (31)	4
新鮮な耳介組織	106	41 (39)	-	-	-

### (3) 研究成果

平成19年11月30日、安福の体細胞クローン第1号(\*4)が誕生しました。出産予定日に産まれるように仮親に分娩誘起ホルモンを投与し、軽い分娩介助により正常に生まれました。生時体重が18.5kgと小さい牛でしたが、健康状況は良好でした。

平成20年3月5日にクローン第2号(\*5)が誕生しました。この時は子牛が非常に大きいことが予想されたので、帝王切開により娩出させました。産まれた子牛の体重は47.5kgでした。このクローン第2号は、残念ながら生後2日で死亡してしまいました。

第3号と第4号(\*6)は、平成20年7月22日と31日に、第1号と同様に軽い分娩介助により、正常に生まれました。それぞれ生時体重は32kgと30kgでした(第3号は2009年1月7日、5ヶ月齢で感染症のため死亡)。

クローン第1号、3号および4号は人工哺乳で育てられ、「望安福(のぞみやすふく)」と命名されました。生まれたクローンウシを遺伝子検査した結果、流産した胎子と死亡した子牛を含むすべてのクローンウシが安福号と同じ遺伝情報を持っていることが証明されました。クローンウシは、流死産などの事故が多いといわれていますが、今回は、5頭の妊娠から4頭が分娩に至り、3頭のクローンウシが正常に生まれました。このことは、13年もの間凍結されていた臓器の細胞が、完全な状態で保存されていたことを実証したものです。

# 参考資料(詳細説明)

## (4)今後の発展について

安福の遺伝資源をクローン技術によって復活させることは長年の夢であり、挑戦的な課題でした。しかし、本研究で用いた体細胞クローン技術そのものは新しいものではありませんでした。

本研究におけるブレイクスルーは、13年間、しかもそのうち10年間は、細胞が長期間生存できないと考えられている-80℃で冷凍保存されていた動物組織の中に、完全な遺伝情報を持った細胞が、生きた状態で残っていたということです。この生きた細胞を培養して増やすことができたからこそ、既存の技術を用いてクローンを作ることができたのです。

本研究で用いた動物組織は精巢でしたが、冷凍しても細胞が生き残る組織は他にもあるのではないかと考えています。このブレイクスルーによって、これまで遺伝資源が体細胞として保存されていなかった絶滅動物などにもクローン再生の道が開ける可能性があります。

体細胞クローン家畜の食用利用については、米国FDAなどから安全であるという研究報告が出されています。日本では、平成20年4月1日付けで厚生労働省から体細胞クローン技術を用いて産出された牛及び豚並びにそれらの後代に由来する食品の安全性について食品健康影響評価を食品安全委員会に依頼し、調査・審議が開始されています。先ごろ、この専門家ワーキンググループから、クローン動物の食品としての安全性を認める報告書をまとめる方針との報道がありました。

望安福が安福と同様に良い肉を生産するかどうかを研究することは、クローン家畜の同一性の研究として興味深いところですが、現在の飛騨牛生産は、もう安福の精液はほとんど使われず、安福の子供や孫にあたる優れた種雄牛が活躍する世代になっています。それでも、安福の遺伝資源が、「死んだ」状態から「生きた」状態に復活できたことは、極めて大きな意義を持つと考えています。和牛の「霜降り」や「おいしさ」を生み出す原因を研究するためには、遺伝子の場所やDNA配列だけでなく、遺伝子の生み出すタンパク質の機能や、さらにはタンパク質によって作られる脂肪酸の構成などを研究する必要があると考えられるようになってきています。これらの研究のためには生きた動物がなくてはならないものです。

安福が生きていた時代にはできなかった研究を、今なら望安福によって行うことができます。特に安福は、飛騨牛の特徴であるきめ細やかな霜降り「コザシ」を生み出した種雄牛です。望安福を研究することで、「コザシ」の肉ができる秘密が解明できるかもしれません。

## 補足説明

### \*1 「安福」号

昭和55年4月1日に兵庫県美方郡で誕生した安福(幼名「福美」)は、翌年の種雄牛オークションで1000万円で岐阜県に落札され、岐阜県畜産研究所に繋養されました。

安福は昭和59年の間接検定で岐阜県歴代種雄牛トップの好成績を収め、安福精液の交配ブームを起こしました。安福の産子は優れた霜降り肉を生産し、子牛価格は当時全国一の高値を記録しました。安福の産子を中心に、きめ細やかな霜降りを誇る和牛肉「飛騨牛」ブランドが確立しました。

安福は岐阜県での12年間で、飛騨牛を代表する種雄牛として活躍しましたが、平成5年9月28日、老衰のため13歳で亡くなりました。安福の精液によって生まれた子牛は現在までに約4万頭にのぼり、安福のもたらした経済効果は岐阜県内だけでも100億円以上になるだろうとされています。岐阜県内のみならず、全国で共用されている約68万頭の黒毛和種のうち、およそ30%は安福の血を引いていると見積もられています。さらに、全国で150頭もの安福の血を引く種雄牛が誕生しており、安福が黒毛和種の育種改良に果たした功績は非常に大きなものです。

### \*2 ほとんどが凍る過程で破壊され死んでしまう

細胞を凍結保存する場合、ただ単に冷凍庫に放りこんだだけでは、細胞の中で氷の結晶が成長して細胞膜を破り、細胞は死んでしまいます。そこで細胞を「凍結保護物質」を含む培養液に入れて凍結する必要があります。細胞がばらばらになっていない組織や臓器を、細胞を生かしたまま凍結保存するためには、組織や臓器の内部まで凍結保護物質を浸透させる必要があります。これは現在でも困難な技術です。

安福の精巢は、凍結保護物質をいっさい使うこともなく、ただ単に-80℃の冷凍庫に放り込んで冷凍し、10年間保存されていました。その後-196℃の液体窒素の中に移して3年間保存され、合計13年間も保存されていました。従来の考えでは、安福の精巢の細胞はほとんど全て破壊されているだろうと思われました。-80℃の冷凍庫は、普通の冷蔵庫の冷凍室(-20℃)に比べると、細

## 参考資料(詳細説明)

胞の保存に良いとされていますが、 $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存された精液は、1~2年で精子に運動性が低下することが知られており、長期保存には適していないことが知られています。これは、氷晶の安定限界温度が $-130^{\circ}\text{C}$ であるからといわれています(最新発生工学、入谷明著より)。

### \*3 安福の冷凍精巢



13年間冷凍されていた安福の精巣です。アルミホイルに包まれた状態で、まるごと凍結してありました。

### \*4 クローン第1号



2007年11月30日、誕生直後の「望安福1号」です。生時体重は18.5kgでした。2009年1月8日現在も健康です。

### \*5 クローン第2号



2008年3月5日、誕生直後のクローン第2号です。生時体重は47.5kgでした。この個体は残念ながら2日後に死亡しました。

### \*6 第3号と第4号



2008年7月22日と31日に生まれた「望安福3号」(左)と「望安福4号」(右)です。生時体重はそれぞれ32kgと30kgでした。

※第3号は2009年1月7日、感染症のため死亡しています。