

クローン動物生産技術の有効利用

日本学士院会員 入谷 明
京都大学名誉教授・近畿大学理事・
先端技術総合研究所長

クローンとは？

ギリシャ語 = 木の小枝

例えば：

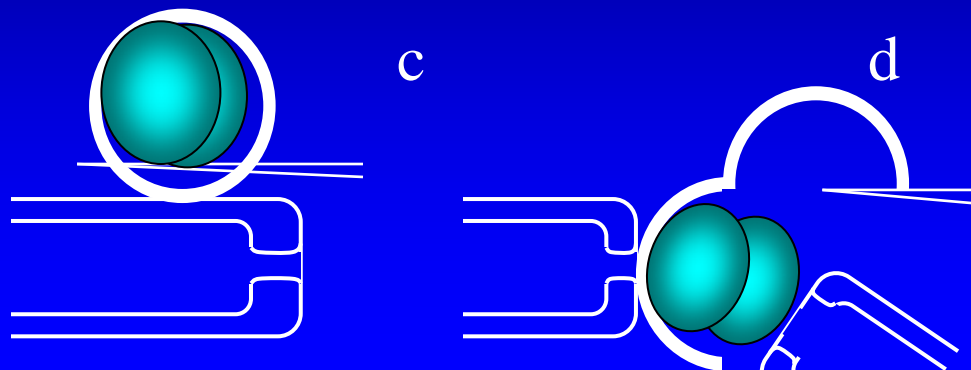
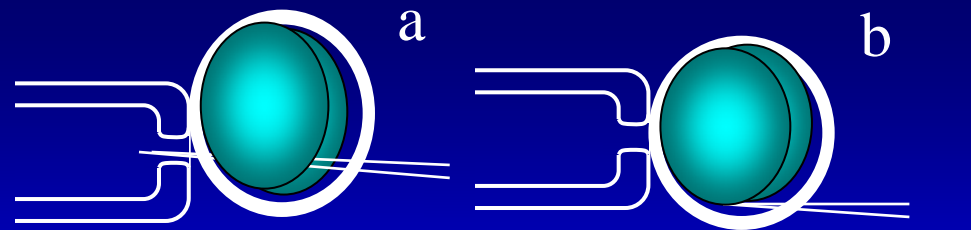


実生は元の親とは似つかぬ花

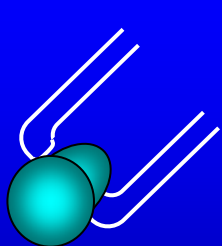
- * 親木の挿し木では親と同じ花
- * 動物では一卵性の双子もクローン



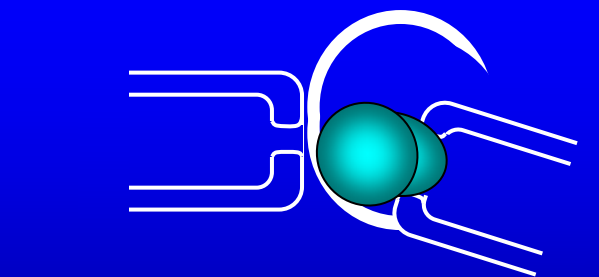
* 遺伝形質の全く同じ生物



透明帯の切開



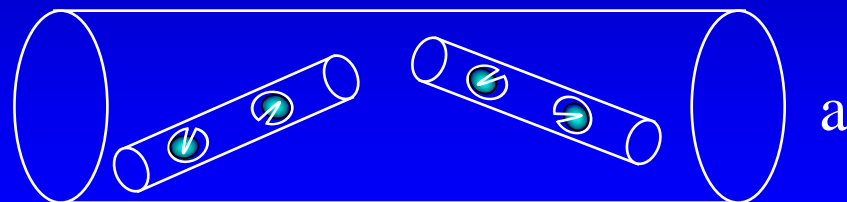
割球分離



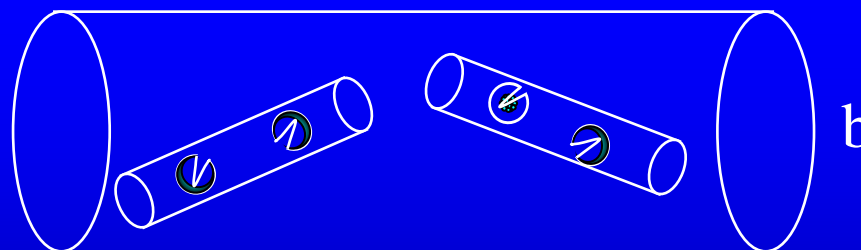
1割球を空の透明帯に挿入



最初の寒天封入



(a) ウサギ又はヒツジ卵管内
3~4日仮培養



(b) 仮培養後回収して、受胎
動物に移植

一卵性双子の生産 (Willadsen, 1979)



3組のヒツジー卵性双子



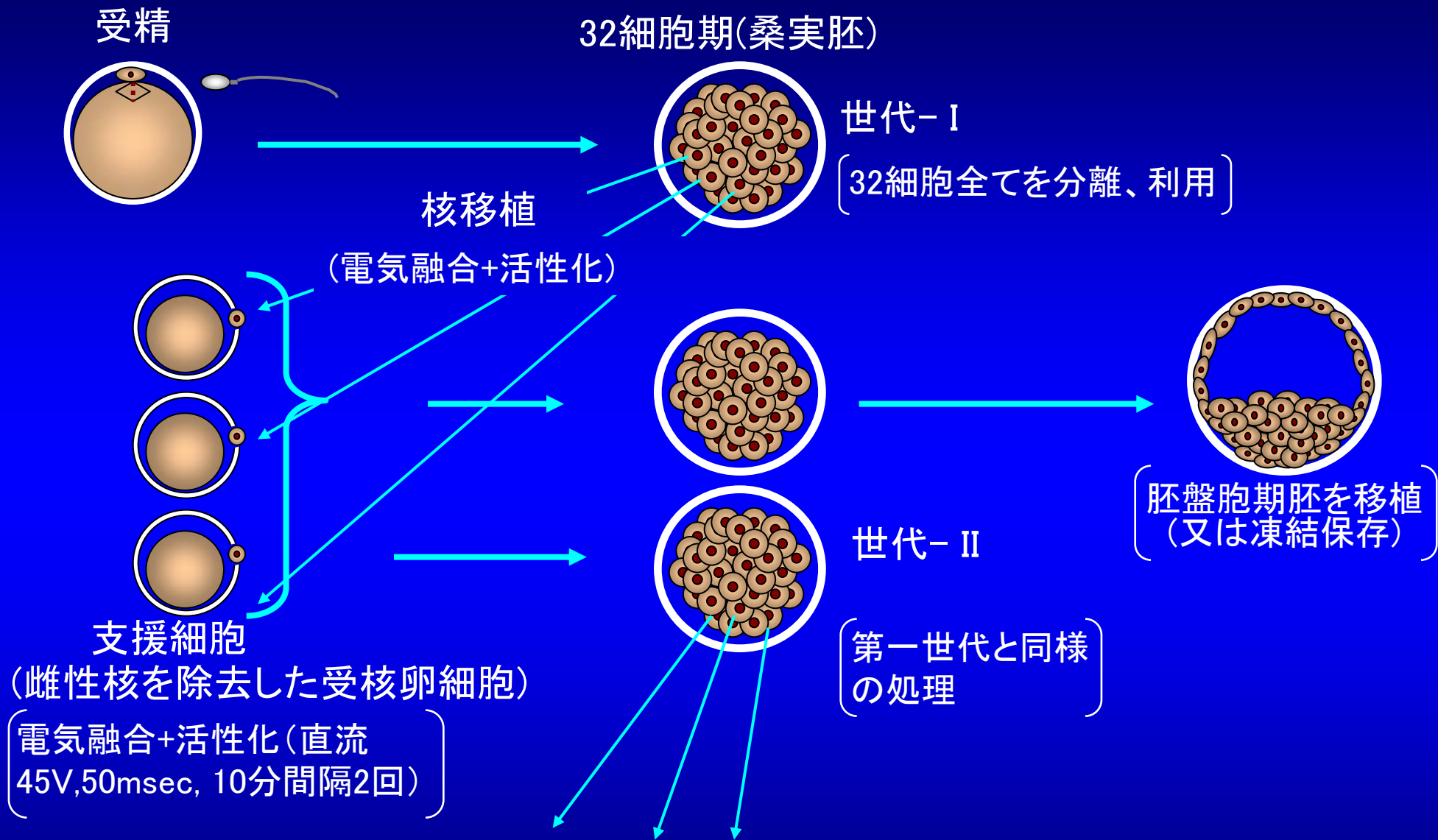
から作られた一卵性五つ子

(1984年ケンブリッジ動物研究所で)



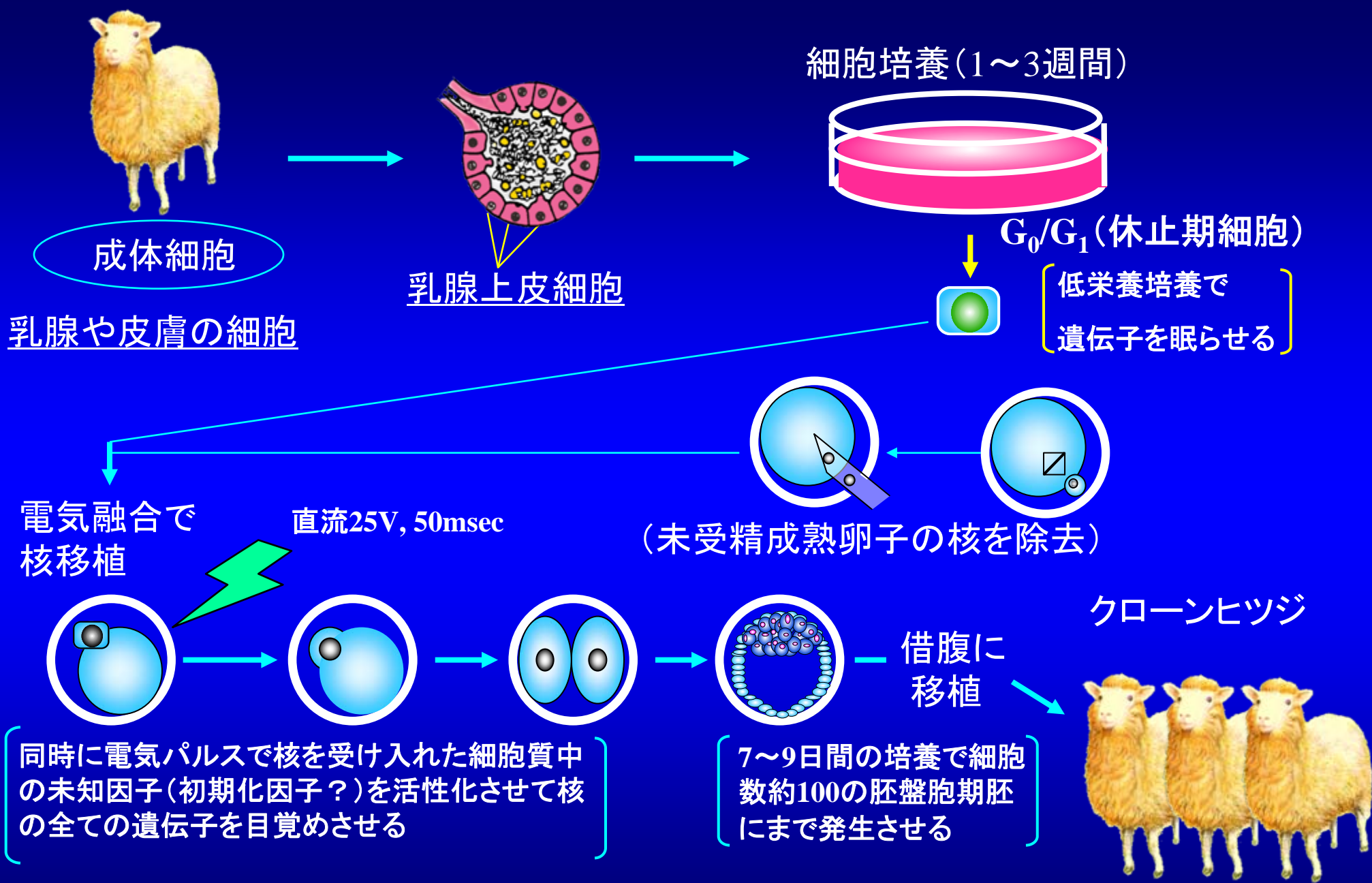
から作られた一卵性三つ子

(1981年ケンブリッジ動物研究所で)



ヒツジ、ウシにおける初期胚細胞を用いた
クローニング(受精卵クローン)



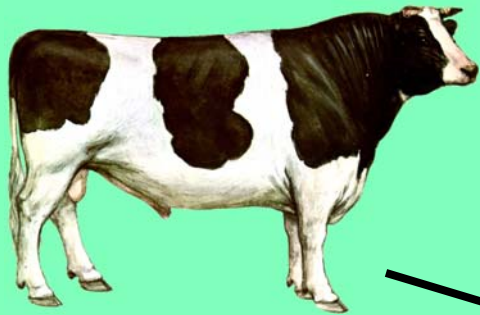


体細胞核移植によるクローンヒツジの作製

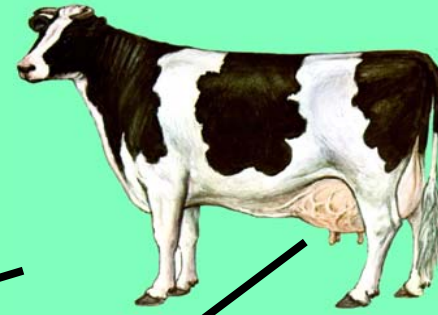


ウイルマツト博士来訪(近畿大学先端技術総合研究所)

♂ : 20,000kg乳量



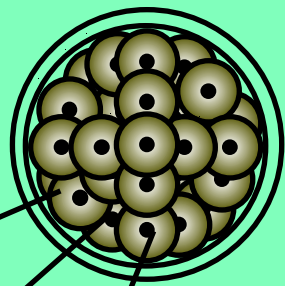
♀ : 20,000kg乳量



X

受精卵

(遺伝子の組成不明)



クローンウシの能力は不明

乳腺細胞

(はるかに多数、能力証明済み)



クローニング

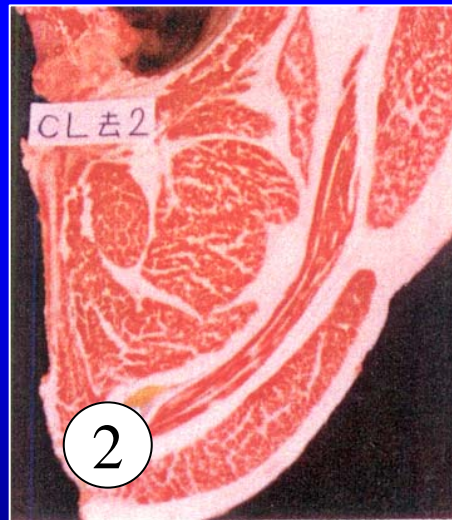
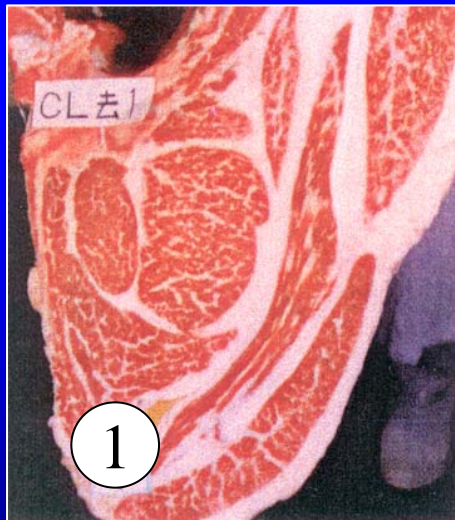


能力20,000kg保証付き

体細胞クローンは受精卵の細胞からのクローンよりはるかに有利
(原図)



大分県では、最高級の肉牛の種雄牛(糸福)が老齡(18歳)になり、そのコピー牛(夢福-Iと夢福-II)が背中の筋肉の細胞から再生された。



体細胞クローン肉牛(平成12年9月11~12日生、家畜改良センター十勝牧場)

クローン牛およびその生産物の性状調査

(財)畜産生物科学安全研究所

動物自身の生理学的正常性

乳用種—妊娠3, 6, 9ヶ月、分娩後3, 6週

肉用種—生後21~28ヶ月の間に3~4回

血液検査: 赤血球、白血球、血色素等12項目

総蛋白、総コレステロール等25項目

一般牛、受精卵クローン牛、体細胞クローン牛間で比較

生乳および肉片(9部位)の成分(含量/100g)

一般成分(水分、蛋白質、脂質、糖質等)

アミノ酸18種類、脂肪酸21種類

生乳および肉の消化試験(凍結乾燥パウダー)

* 人工胃液および腸液による消化試験

* ラットを用いた試料添加給与試験

上記について蛋白を指標とする消化

生乳および肉のマウス腹壁法によるアレルギー試験

凍結乾燥物の抽出液を腹腔内注射による感作

14日後開腹、再度腹壁注射＝アレルギー活性

ラットでの生乳、肉の配合飼料給与による飼養試験

生乳凍結乾燥物：2.5%，5%，10%濃度の基礎飼料

肉凍結乾燥物：1%，2.5%，5%濃度の基礎飼料

(1群各10匹の計20匹、14週間給与)

一般状態、体重、飼料摂取量、尿検査(8項目)

感覚反射機能、自発運動量、機能観察、性周期

終了時血液検査(11項目)、血液生化学検査(23項目)

剖検、器官重量(脳、下垂体、胸腺、甲状腺、心臓、肺

肝臓、脾臓、副腎、生殖器官)

マウスを用いた生乳、肉給与による変異原性試験

(小核試験)

試験試料を14日間給与し、骨髄の小核保有赤血球

出現頻度測定：変異原性(染色体異常誘発能)の検査



将来イヌのクローン

効率が良くなれば;

介助犬や捜索犬の増数や

ペットの再生なども可能？





ガウル(野生牛)の皮膚細胞

(死後、細碎して培養、繊維芽細胞誘導、凍結保存)

融解

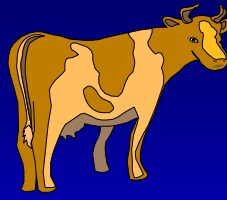
細胞培養



低栄養培養(休止期細胞を誘導)



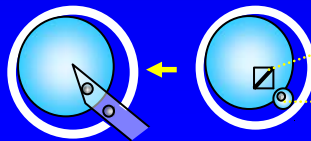
G₀/G₁期細胞



家畜牛の卵巣

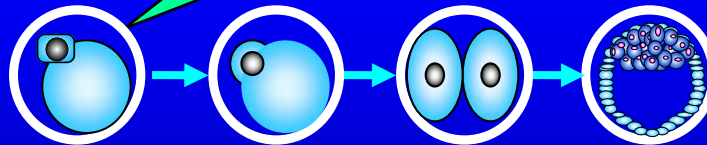
(未成熟卵子の体外培養)

成熟卵子



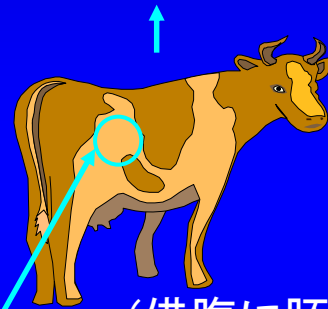
雌性核と極体除去

電気融合で核移植
2.5kV/cm, 15msec.



核移植再構築胚をイオノマイシンで活性化し、DNAを再編成(リプログラミング)

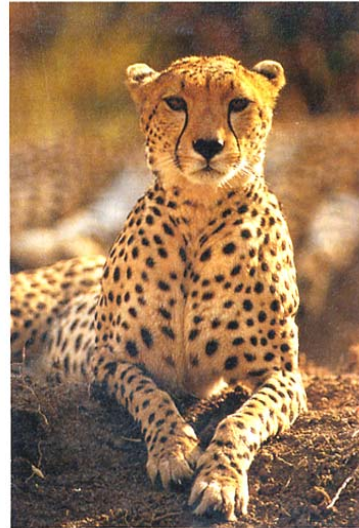
クローンガウル(ノア)



(借腹に胚移植)

7日間の体外培養で胚盤胞期胚まで発生

家畜牛(2n=60)の卵細胞への野生牛ガウル(2n=58)の異種間体細胞核移植によるクローンガウルの生産



クローン動物の候補者

クローンで増やそうとしている絶滅危惧種の例。

左上の写真から時計回りにボンゴ、ジャイアントパンダ、スペインアイベックス、オセロット、ガウル、チーター

Gift to right: CHARLES V. ANGELO Procter & Gamble, Inc. (Donor); FRANK LANTING Monkey Pictures, Mount panzhi; JOHN SANCALOSI Peter Arnold, Inc. (Donor); MARTIN VERDIER Peter Arnold, Inc. (Donor); POLAND SETTE Peter Arnold, Inc. (Donor); GERRY ELLIS Jackson Pictures (Donor)



アマミノクロウサギ



イリオモテヤマネコ



シマフクロウ



ツシマヤマネコ

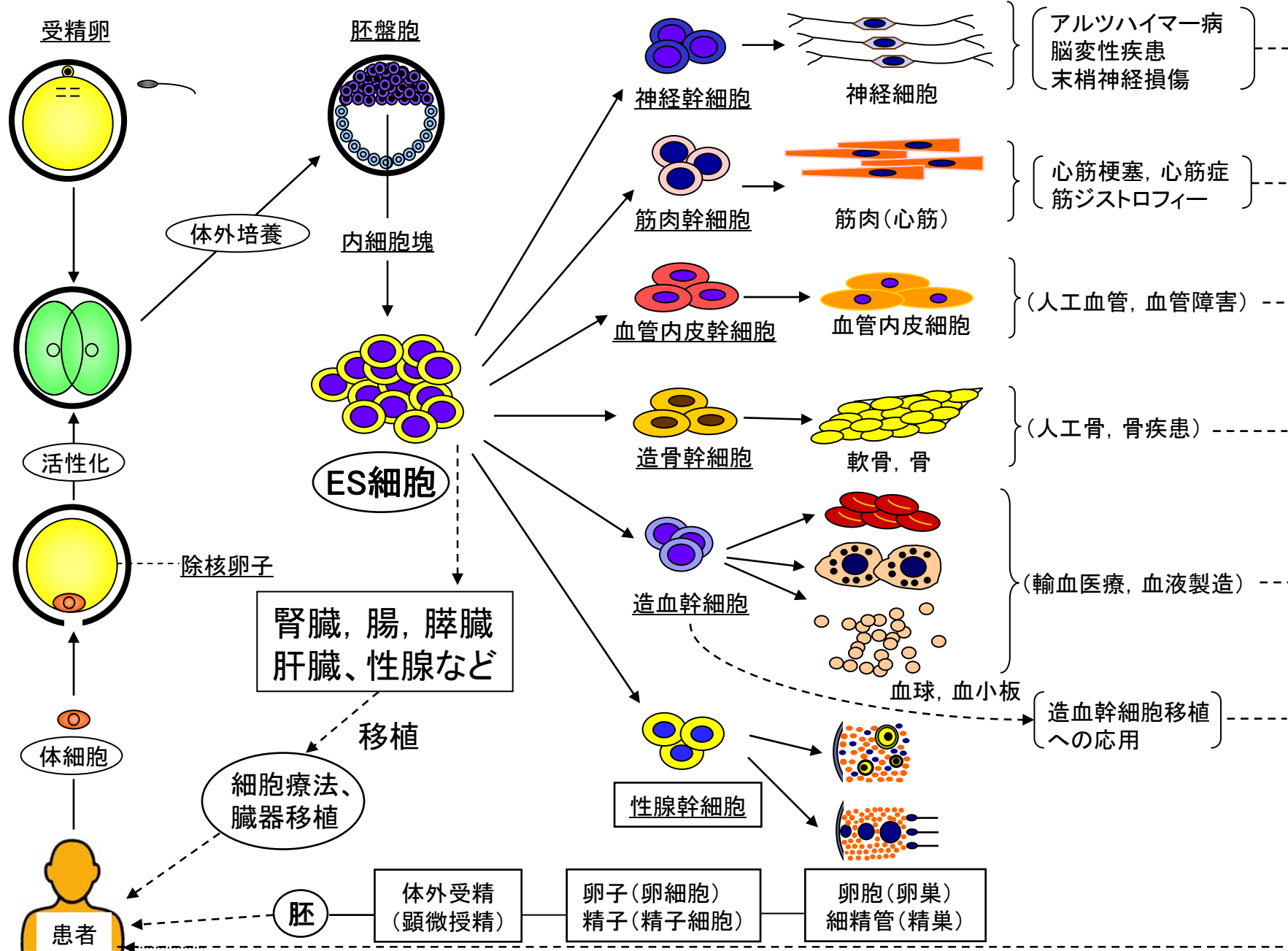


トキ



ヤンバルクイナ

将来クローン技術で増やしたい日本国内での身近な希少種



ヒト体細胞クローン～万能細胞,ES細胞を用いた移植医療 (Nakahata改変)

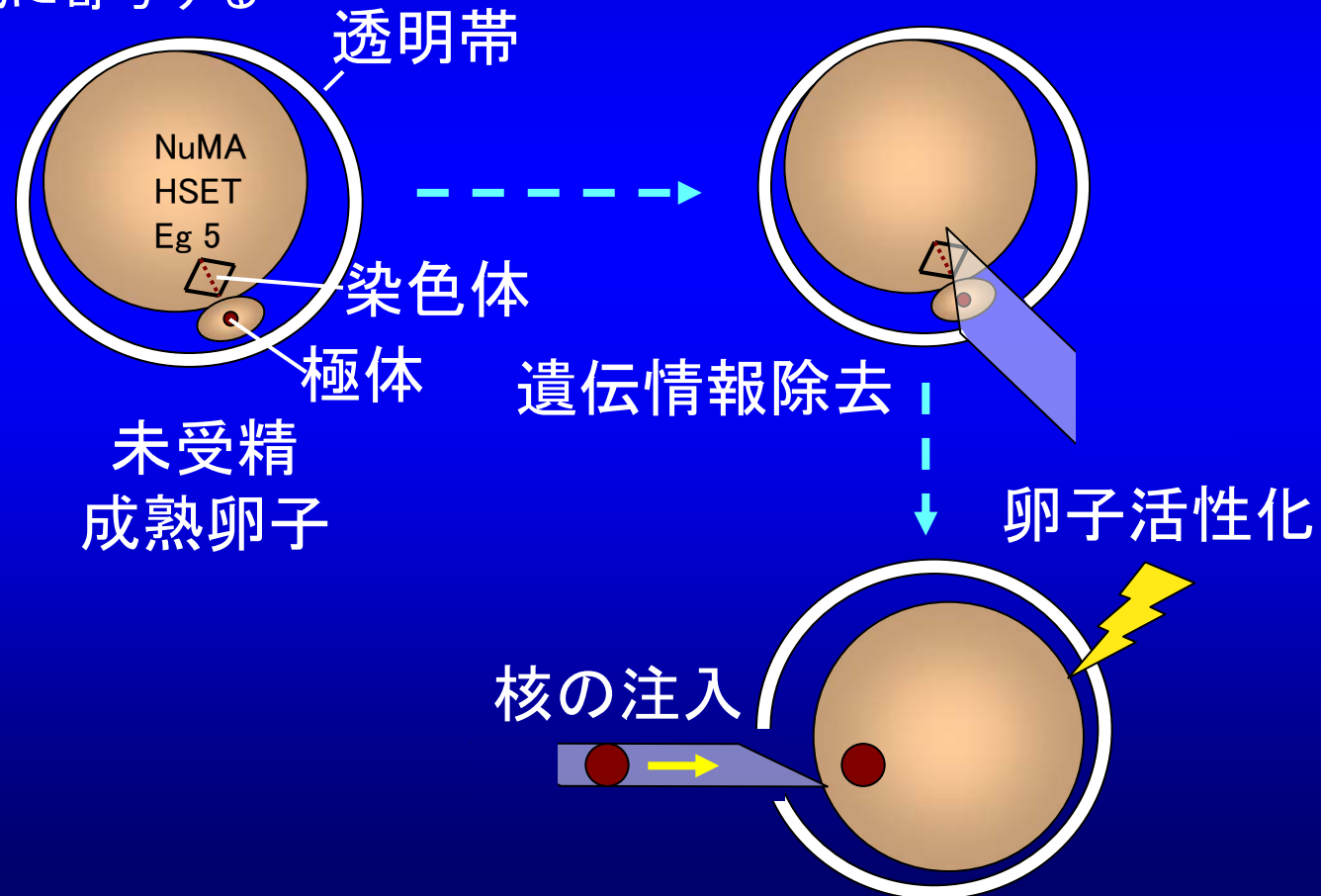
霊長類～ヒトにおける体細胞核移植不成功の理由

(三種のタンパク質が除核と同時に除去される)

NuMA: Nuclear Mitotic Apparatus 細胞分裂の際に極の形成と維持に必要

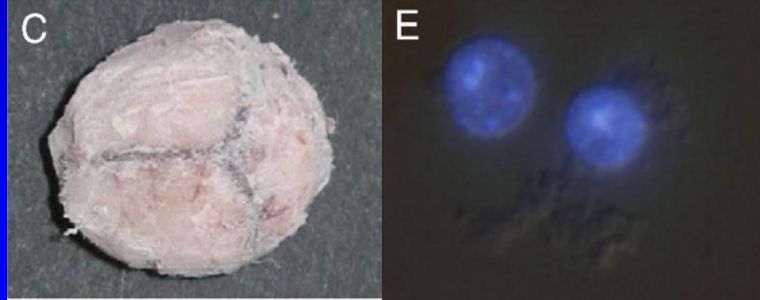
HSET: 減数分裂時に紡錘体、星状体形成に必要

Eg5: 紡錘糸形成に寄与する





A. -20°C 凍結マウス



C. 凍結状態の脳組織

E. ヘキスト33342で
染まった脳細胞核



F. 脳細胞核移植ES細胞の
核移植で生まれたクローン
マウス

死後16年間 -20°C に凍結保存されたマウスからの
クローンの誕生 (Wakayamaら、2008)

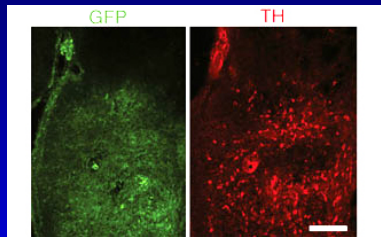
死後13年間冷凍保存された黒毛和種雄牛「安福」の 臓器の細胞から復活

- ・1993年に伝説の種雄牛「安福」号が、老衰のため死亡。12時間後、精巣を何の処理もせずにそのまま13年間(10年間は -80°C)冷凍保存。
- ・冷凍精巣の特定の組織に、生きた細胞があることを発見し、細胞の培養に成功。
- ・この細胞から体細胞クローンで健康な子牛を作出。
- ・…凍結保護剤を一切使わず、13年間もの間凍結された臓器からクローン技術で、死亡した優良家畜の再生に成功した世界初の報告。



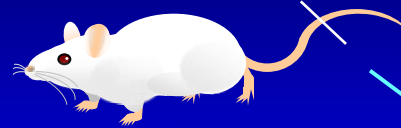
復活した「安福クローン」と安福の銅像

ntESC-DA(ドーパミン)
神経細胞移植



組織像

6ODHAにより、
パーキンソン病発症



行動テスト

尾端採取

神戸理研へ

核移植

胚盤胞作製

GFP(緑色蛍光蛋白質)
遺伝子導入

ntESC作成
(核移植胚性幹細胞)

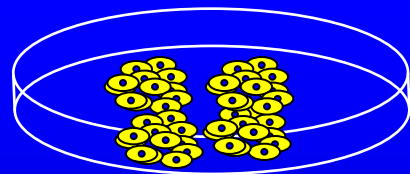
eGFP分離-増殖

ニューヨークへ

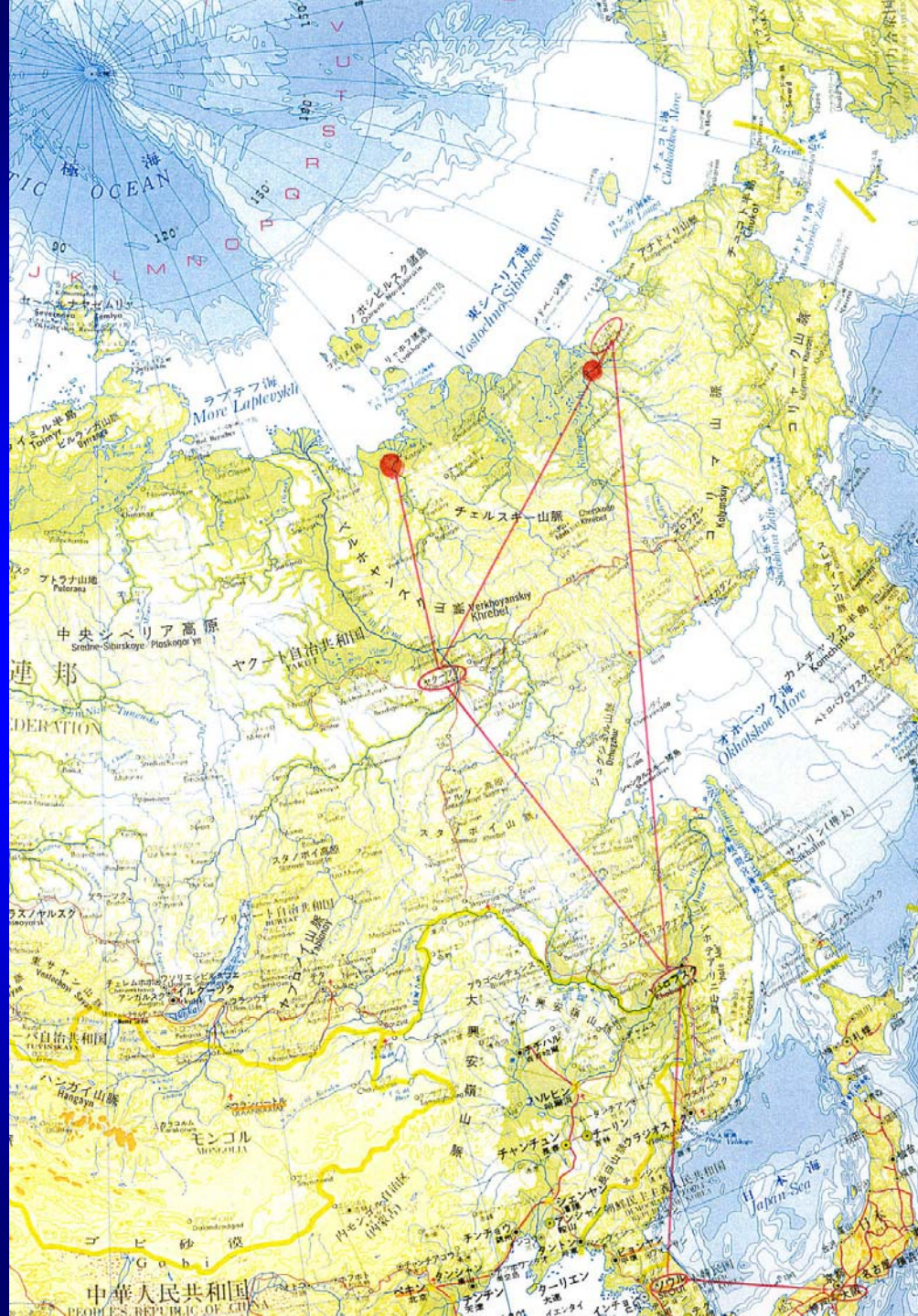
行動テスト

症状改善

Pitx3/TH



自己のES細胞で自己を治療する初の試み



連邦

DERATION

スバ自治共和国

スバ自治共和国

スバ自治共和国

スバ自治共和国

スバ自治共和国

スバ自治共和国

スバ自治共和国

ヤクート自治共和国

ヤクート自治共和国

ヤクート自治共和国

ヤクート自治共和国

ヤクート自治共和国

ヤクート自治共和国

ヤクート自治共和国

ヤクート自治共和国

ヤクート自治共和国

ヤクート自治共和国

ヤクート自治共和国

ヤクート自治共和国

ヤクート自治共和国

ヤクート自治共和国

ヤクート自治共和国

シベリア

シベリア

シベリア

シベリア

シベリア

シベリア

シベリア

シベリア

シベリア

シベリア

シベリア

シベリア

シベリア

シベリア

シベリア

オホシベリヤ海

オホシベリヤ海

オホシベリヤ海

オホシベリヤ海

オホシベリヤ海

オホシベリヤ海

オホシベリヤ海

オホシベリヤ海

オホシベリヤ海

オホシベリヤ海

オホシベリヤ海

オホシベリヤ海

オホシベリヤ海

オホシベリヤ海

オホシベリヤ海

中華人民共和国
PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA

日本海
Japan Sea



エドマ層(永久凍土)



ツンドラ(シベリア)



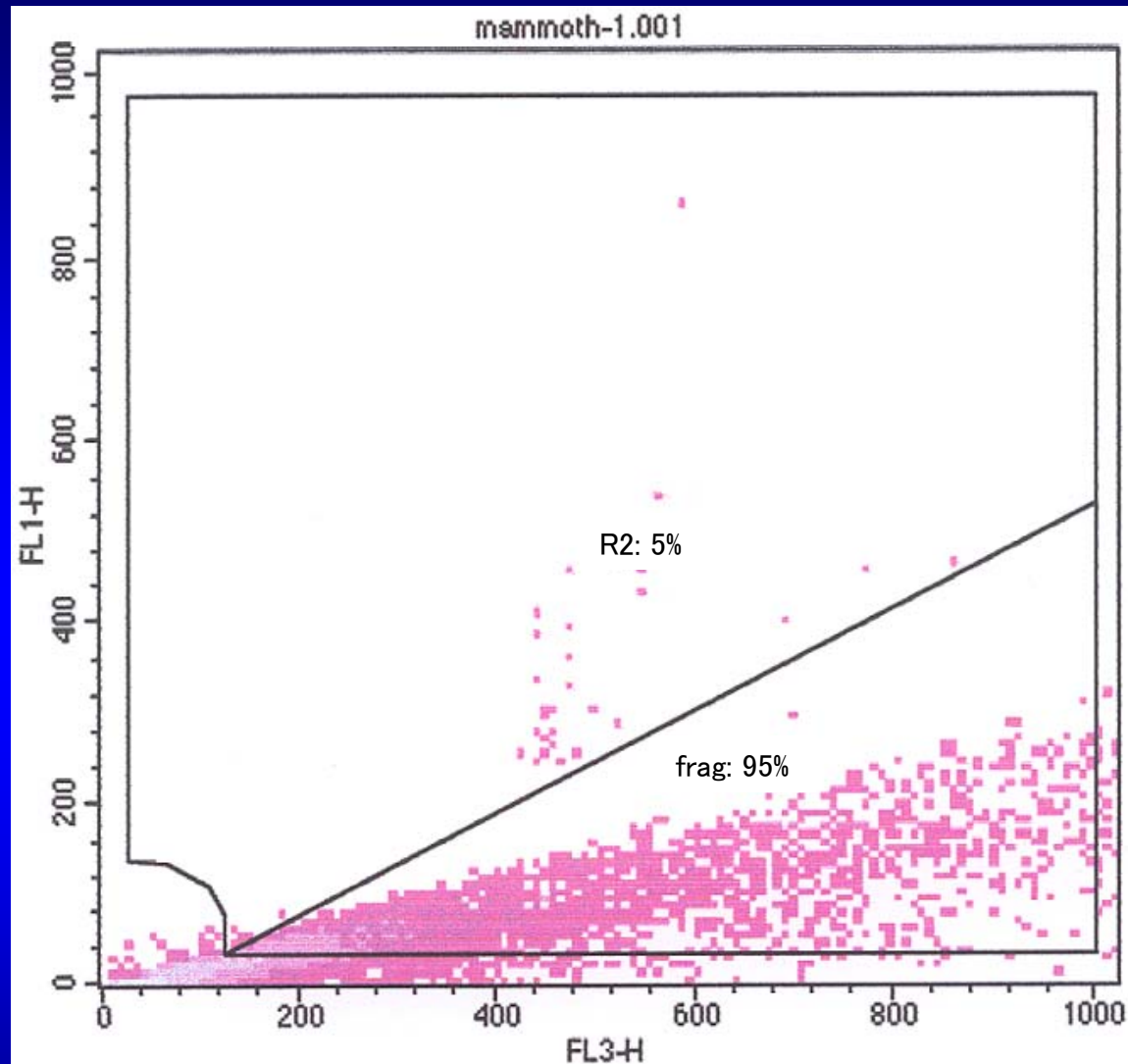
2002年8月東北シベリヤ・マクスノーハ(北緯71°)
の永久凍土での発掘作業



左図の約2.3倍拡大

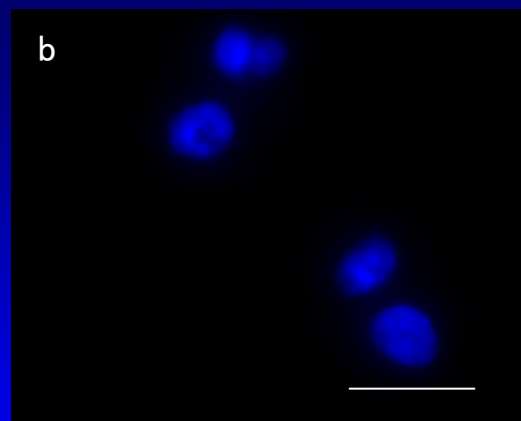
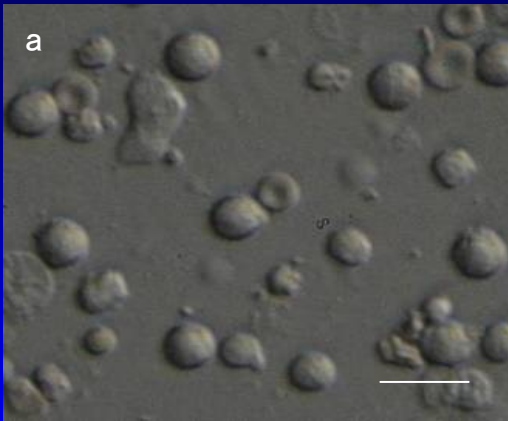


発掘されたマンモスの右前脚
(部分的に茶色の毛(矢印)が見られる)



マンモス骨髄細胞のフローサイトメトリーによる解析結果

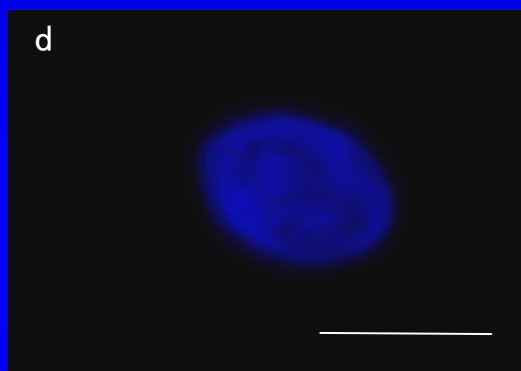
(4~5%の断片化していない核が見られる)



マウス骨髄細胞

a : 回収後のマウス骨髄細胞

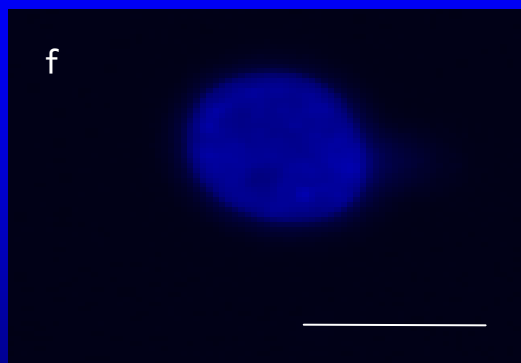
b : 回収骨髄細胞のHoechst染色



ウシ凍結中手骨

c : 融解後の中手骨

d : 回収骨髄細胞のHoechst染色



マンモス凍結右前肢骨

e : 融解後の骨髄付き肢骨

f : 回収骨髄細胞のHoechst染色

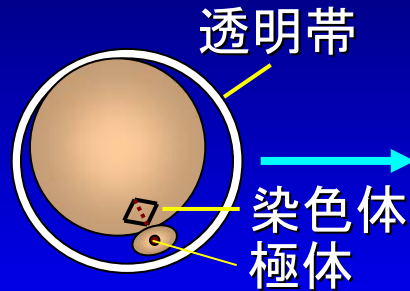
Scale bar: 10 μ m

マウス、ウシ、マンモスの骨髄細胞の回収後の核染色

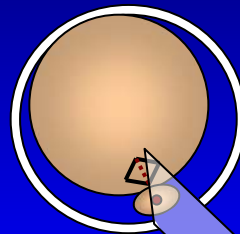
体細胞核移植法による古生物の復活



ゾウ
(現世種、雌)

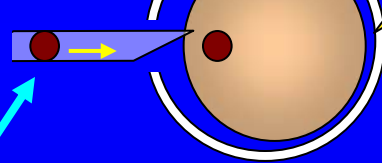


未受精の
成熟した卵子



遺伝情報を取り除く

核の注入



卵子を
活性化



赤ちゃんマンモスの誕生

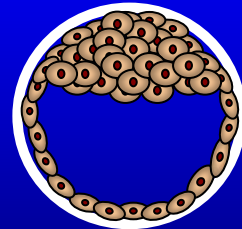


マンモスの冷凍死体
(雌・雄どちらでもよい)

核を取り出す



培養



培養後、胚を
代理母の雌へ移植



代理母となる
雌のゾウ