

体細胞クローン牛の病理所見

佐藤真澄

農研機構動物衛生研究所

要 約

鹿児島県肉用牛改良研究所で生産された体細胞クローン（NT）牛流・死産 25 例について、その病理学的特徴を明らかにするために検索を行った。死因の多くは、臍帯血管退縮不全に関連するものや過大子等に起因する難産によるものであったが、妊娠中の異常産ウイルス感染によるものも 4 例あった。妊娠満期を過ぎた胎盤の強固な上皮絨毛結合や血清中 ACTH 値の低下、下垂体における ACTH 陽性細胞の著明な減数は NT 牛にみられる在胎期間延長を裏付ける所見と考えられた。観察された所見は品種、性別、核ドナーによって一定の傾向があるものの、同一核ドナー由来でも異なる所見を示す場合もあり、NT 牛の流・死産における病理学的特徴を明確にすることはできなかった。一方、肥育 NT 牛（計 3 例）、NT 後代牛およびその肥育牛（計 19 例）では NT 牛でみられたような所見は観察されなかった。

キーワード：体細胞クローン牛、流・死産、胎盤、病理所見

1. はじめに

1998 年に我が国で初めて体細胞クローン牛が誕生して以来、同技術で多くの子牛が生産されてきた。しかし、これらの動物では流・死産、胎子の異常、過大子や在胎期間の延長等が高率に起こることが指摘されてきた。その実態を明らかにすることを目的として、農林水産省技術会議プロジェクト「体細胞クローン動物安定生産技術の確立研究（平成 11～17 年度）」の一環として、鹿児島県肉用牛改良研究所で生産された流・死産あるいは生後直死した体細胞クローン牛および胎盤や臍帯等の胎子付属物について病理組織学的検査を行った。

2. 体細胞クローン（NT）牛およびその後代牛について

2.1 流・死産牛の病理所見

皮膚の培養線維芽細胞から取り出した核を、除核した

成熟卵細胞質に移植して 7 日間体外発生培養をした胚を性周期の同調した受胎牛に移植することによって生産された（Kubota ら 2000）NT 牛のうち、流・死産および新生子死あるいは鑑定と殺例（黒毛和種 [JB] 雄 14 例・雌 4 例、ホルスタイン [H] 雌 5 例・交雑種雄 1 例）、死産した第 2 代 NT（リクローン）牛 1 例（Kubota ら 2004）について病理組織学的検査を行った。検査例の一部を表 1 に示す。対照として人工授精（AI）によって生産された牛（3 頭）を用いた。その結果、流・死産あるいは生後直死した例のうち 8 例（JB 雄 3 例、H 雌 4 例 [同一核ドナー由来]、交雑種 1 例）で生時体重 50kg 以上の過大子症候群（LOS）がみられた。在胎期間の延長は、満期に帝王切開したものを除いた、4 例（JB 雄 3 例・雌 1 例）で認められた。在胎期間延長と LOS とは必ずしも一致しなかった。流・死産例の死因は、臍帯血管退縮不全に関連するもの、発生異常、過大子に起因する難産等で、新生子死例の死因は換気不全や治療後のショック

表 1. 流・死産または新生子死したクローン牛の詳細

	NT-1	NT-3	NT-4	NT-5	NT-6	NT-7	NT-8	NT-9	NT-10	NT-11	NT-12	NT-13	NT-14	NT-15	NT-16	NT-17	NT-18	NT-19	NT-20	NT-21	NT-22	ReNT-1
品種	交雑種	JB	JB	JB	JB	JB	H	H	H	H	H	H	H	JB	JB	JB	JB	JB	JB	JB	JB	JB
核ドナー	Fetus-A	Fetus-B	Calf-A	Bull-C	Bull-C	Cow-a	Cow-b	Cow-b	Cow-b	Cow-b	Cow-c	Cow-d	Cow-d	Cow-d	Bull-D	Bull-D	Bull-E	Bull-E	Bull-E	Bull-F	Bull-F	Bull-C'
性別	♂	♂	♂	♂	♂	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂
A, S, ND, K	ND(16h)	ND(13d)	ND(22d)	S	S	S	A	S	S	S	S	S	ND(2d)	S	S	K	S	S	S	S	A	S
CS	CS	CS	CS	—	CS	—	CS	—	—	CS	CS	—	—	CS	CS	CS	CS	CS	—	—	—	CS
胎齢 (日)	275	296	284	291	299	293	241	283	286	288		270	283	275	275	279	288	288	295	268	229	277
生時体重 (kg)	57.2	33.0	32.5	32.5	30.7	27.5	49.8	79.0	58.0	72.3		49.3	42.0			63.0	38.0	41.5	60.0	55.0		43.0
死因	臍帯出血	臍帯感染	肝内索からの出血	アカバネウイルス抗体 +	ウイルス抗体 +	ウイルス抗体 +	発生異常	過大子に起因する難産	胸腔内後代静脈破裂	アイノウイルス抗体 +			(治療後のショック)	(双子フリーマーン)	(双子)		(双子)	(双子)				臍帯血管からの出血

JB：黒毛和種 H：ホルスタイン種 A：流産 S：死産 ND：新生子死（生存時間・日）K：鑑定殺 CS：帝王切開核ドナー；核ドナー毎に色分けして示す 生時体重；橙色セルは過大子症候群（LOS）を示す

ク等であった。多くの NT 牛が生産された 1998 年に全国で流行したアカバネウイルスやアイノウイルス等異常産ウイルスによる流・死産も 4 例で認められた。多くの NT 例に共通して臍帯血管の退縮不全・腫大・脆弱化が著明に観察され（図 1）、生時これに起因する臍帯血管からの出血が原因で死亡したものもあった。これらの臍帯では組織学的に水腫性変化や結合組織の疎な分布として認められたが、これは臍帯血管の容易な断裂を示唆す



図 1. 腹腔内肉眼写真。臍帯血管は、人工授精（AI）例（左）では著明に退縮しているが、体細胞（NT）クローン例（右）では退縮不全を示し多量の血液を貯留している。

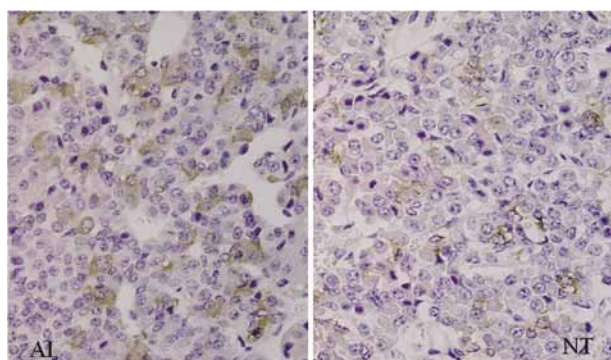


図 2. 下垂体。抗 ACTH 家兔血清を用いた免疫組織化学的染色。NT（右）では AI（左）よりも ACTH 陽性細胞（茶色に染色されている）数がかなり少ない。

る所見であった。過大子と考えられた例の一部に肝臓の線維化が、また、腎臓では髄質における尿細管の減少や間質の水腫等がみられた。以上の所見は、ある程度同一の核ドナー由来のクローンに偏る傾向がみられた（鬼塚ら 1999；Sato ら 1999；Sato ら 2002c；佐藤ら 2005）。

2.2 内分泌器官の病理所見

甲状腺は、出生直後の AI 全例で濾胞上皮細胞が顕著に活性化し、濾胞が不整形を呈していたのに対し、ほとんどの NT 例の濾胞は休止期に近い所見を示し、濾胞内コロイドの著明な充満がみられた。また、NT 牛のほぼ全例で濾胞の大小不同がみられた。

下垂体では、分娩発来に関与するホルモンである ACTH 陽性細胞は、AI 牛では NT 牛の約 2 倍を示し、血漿中 ACTH も NT 牛では AI 牛よりも低値を示した（図 2）（Sato ら 2000；佐藤ら 2001）。これらは NT 牛における在胎期間延長を裏付ける所見であった。血漿中の ACTH 量および免疫組織化学的染色を元に算出した ACTH Index（ACTH 陽性細胞数／前葉細胞数）を表 2 に示す。

過大子症候群を示す全例の副腎で、性別・品種に関わらず肉眼的な腫大がみられたが、これらは組織学的には皮質領域の増殖によるものであった。髄質における皮質細胞の結節性過形成が JB 雌 1 例と H 雌 5 例で、ノルアドレナリンを産生するクロム親和性細胞の減数が JB 雄 2 例、雌 1 例、H 雌 4 例でみられた（図 3）。また、髄質における結合組織の増生が JB 雌 5 例、雌 1 例で認められた（Sato ら 2005）。これらの所見と品種や性別、ドナーとの関連は不明であった。しかし、同様の所見は 1 歳齢で事故死した NT 例でもみられたことから、流・死産と関連する所見ではないと考えられた。

2.3 免疫機能

死産および妊娠満期に試験と殺した NT 牛（5 例）の腸管関連リンパ組織（GALT；回腸パイエル板および回盲部腸間膜リンパ節）について白血球膜抗原に対するマ

表 2. 下垂体前葉における ACTH 陽性細胞数および血漿 ACTH 値

	AI-1	AI-2	AI-3	NT-1	NT-3	NT-4	NT-5	NT-6	NT-7	NT-8	NT-9	NT-10	NT-11
品種	JB	JB	JB	交雑種	JB	JB	JB	JB	JB	H	H	H	H
核ドナー				Fetus-A	Fetus-B	Calf-A	Bull-C	Bull-C	Cow-a	Cow-b	Cow-b	Cow-b	Cow-b
性別	♀	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♀	♀	♀	♀	♀
A, S, ND, K	K	K	K	ND(16h)	ND(13d)	ND(22d)	S	S	S	A	S	S	S
CS	CS	CS	CS	CS	CS	CS	—	CS	—	CS	—	—	CS
胎齢	278	285	275	275	296	284	291	299	293	241	283	286	288
生時体重	39.0	37.6	37.6	57.2	33.0	32.5	32.5	30.7	27.5	49.8	79.0	58.0	72.3
死因ほか				臍帯出血	臍帯感染	臍静脈出血	ウイルス性異常産	ウイルス性異常産	ウイルス性異常産	発生異常	過大子に起因する難産	胸腔内後大静脈出血	ウイルス性異常産
下垂体前葉													
ACTH Index		13.23	13.06		6.87		6.76	6.89		6.80	7.86	7.27	9.41
血漿 ACTH 値 (pg/ml)		440	110		5以下	5以下		12		28	5以下	16	5

ACTH Index=ACTH陽性細胞数／前葉細胞数

ウスモノクローナル抗体（抗 CD3, CD4, CD8, WC1, panB, GM-1, MHC classII）を用いて SAB 法による免疫組織化学的検査を行った結果、GALT では、NT 牛と AI 牛の間に組織構造およびそれぞれの免疫担当細胞の分布や局在の差は認められなかった。NT 牛では胸腺の萎縮がみられるなど、免疫関連組織の機能低下があるという報告（Renard ら 1999）もあるが、われわれが検索した NT 牛ではそのような所見は得られなかった。

2.4 肥育牛・後代牛の病理所見

肥育した NT 牛（JB 2 例）では、腎臓において肥育用飼料に起因すると考えられる結石がみられたものの、その他の臓器では病理組織学的な著変は認められなかった（Tian ら 2005）。

種雄牛を核ドナーとするクローン牛（第1世代 NT）精液の AI により生産した後代（子牛：6 例，肥育：9 例）およびリクローン牛（第2世代 NT）精液の AI により生産した後代牛（子牛：1 例，肥育：3 例）では NT 牛にみられたような、著明な在胎期間延長や過大子傾向、臍帯血管の退縮不全等は認められず、また全身諸臓器に肉眼的・組織学的な異常は認められなかった（窪田ら 2001）。

3. 胎 盤

3.1 光学顕微鏡・電子顕微鏡観察

帝王切開時、外科的に採取した胎盤について光学顕微鏡、電子顕微鏡による観察を行った。NT 全例（生存例を含む）の胎盤で肉眼的な腫大および不整な形状が観察された。組織学的には、絨毛膜細胞（trophoblast）の過形成が顕著で、妊娠満期を過ぎた例でも上皮絨毛の強い結合と不整な陥入（図4）がみられた。電子顕微鏡観察では母体胎盤（子宮内膜上皮細胞）は不規則な長さ・幅の微絨毛を有しており、上皮絨毛間の結合部では、妊娠満期の AI 牛では母体胎盤（子宮内膜細胞）と胎児胎盤（絨毛膜細胞）分離がみられたのに対し、NT では満期を過ぎた例でも通常は妊娠中期までにみられる接着結合（tight junction）が認められる部位も存在した（図5）。これらの所見は、流・死産した NT 牛、生存して誕生した NT 牛との間で差異は認められなかった（佐藤ら 2001；Sato ら 2001b；Sato ら 2002a；Sato ら 2002b）。

3.2 免疫組織化学的検査

妊娠満期の NT 牛の胎盤においては trophoblast の過形成が観察されたことから流・死産、新生子死あるいは健康に誕生した NT の胎盤について、増殖期細胞マーカーである PCNA（Proliferating cell nuclear antigen, 核内 DNA 合成に関連）、細胞周期の G1, S, G2, M 期に発現する Ki67 抗原に対する抗体を用いて免疫組織化学的染色を行ったところ、妊娠満期 AI 牛の trophoblast および母体胎盤（子宮内膜上皮細胞）では陽性像がみら

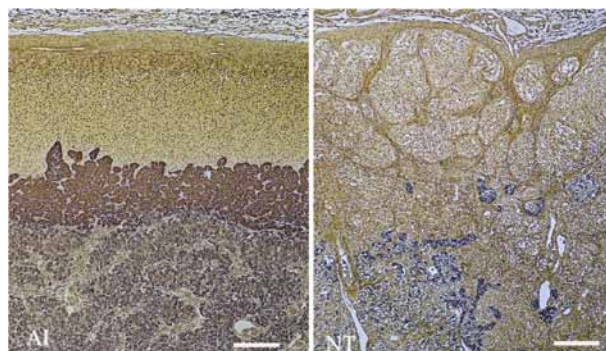


図3. 副腎。Cherukian-Schenck 染色。AI（左）では皮質（黄褐色部）髄質（黒色部）の境界に不整はなく明瞭であるが、NT（右）では皮質の結節状構造、陥入がみられ、髄質細胞の減少が認められる。

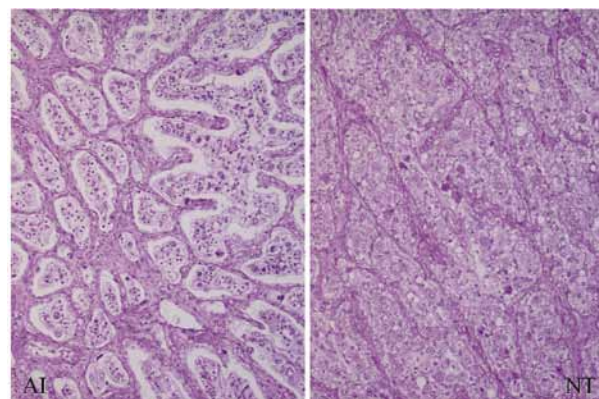


図4. 妊娠満期の胎盤。PAS 反応。AI（左）では母胎盤（子宮内膜上皮細胞）と胎児胎盤（trophoblast）の間に間隙がみられるが、NT（右）では妊娠満期においても上皮絨毛の強い結合が認められる。

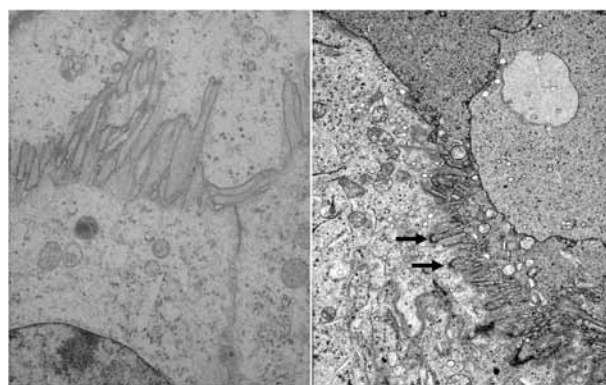


図5. 妊娠満期 NT の胎盤。透過電子顕微鏡写真。不規則な長さ・幅の微絨毛がみられ（左）、妊娠満期においても上皮絨毛間に強い結合（tight junction, 矢印）が認められる。

れなかったのに対し、NT 牛（流・死産および新生子死例）では多くの陽性像が認められた。生存 NT 牛では JB, H それぞれ 1 例ずつの trophoblast においてわずかな陽性像が認められたが、子宮内膜上皮細胞に陽性像は認められなかった。また、NT 牛生存 4 例、死産 2 例、流産 1 例、新生子死 2 例の胎盤について、妊娠満期の母牛血中で増加するホルモンとして知られているエストロンサルフェート（OS）の局在を検索したところ、流産例（胎齢 241 日）以外の trophoblast および子宮内膜上皮細胞

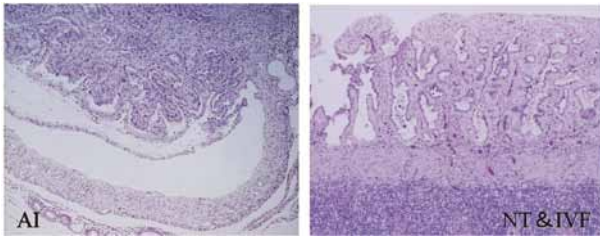


図 6. 胎齢 60 日の胎盤。HE 染色。AI (左) では明瞭な胎盤 (宮阜) 形成がみられるが、NT&IVF (右) では胎盤の発育は著しく悪い。

に陽性像がみられたものの、生存・死産の間に差異は認められなかった。AI 例でも同様の陽性所見はみられず、OS の局在について、NT に起因する特徴は認められなかった。

3.3 NT 以外の胎盤との比較

胎盤について観察される所見が NT 技術によるものかどうかを確認するため、胎齢初期の胎盤に関して、NT 技術以外で生産された例との比較を行った。胎齢 60 ～ 70 日の胎盤形成を、NT 胚移植 (NT: 1 例)、NT 胚と体外受精 (IVF) 胚の同時移植 (NT&IVF: 1 例)、過排卵処理胚移植 (MOET: 2 例) について病理検査を行い、AI 牛 (AI: 2 例) のそれと比較したところ、AI では 10 ～ 30mm の胎盤が確認されたのに対し、NT および NT&IVF では胎盤の発育はきわめて悪かった (図 6)。trophoblast の多層化は NT と NT&IVF で顕著に、MOET でまれに認められた。AI ではこのような所見はみられなかった (長谷川ら 2003)。

また、胎齢 184 日の体外受精胚移植 (IVF-ET) 受胎牛について胎盤形成状態を観察したところ、妊角のみに胎盤が形成されていたが、組織学的な異常は認められなかった。さらに、同例胎子の諸臓器にも肉眼的、組織学的な著変は認められなかった。

4. おわりに

NT 牛では、胎盤 trophoblast の過形成、臍帯血管退縮不全、内分泌器官の異常など病理学的特徴を有していたが、これらは全てに共通して観察される所見ではなかった。下垂体における ACTH 陽性細胞数の減少と妊娠満期の胎盤における trophoblast と子宮内膜上皮細胞の強固な接着は、NT 牛における分娩発来の遅延や在胎期間延長に関連した所見であると考えられた。流・死産あるいは生後直死した NT 牛の病理学的特徴を品種や核ドナーを加味してとりまとめたところ、肝臓の線維化、腎尿細管の形成不全等いくつかの所見は核ドナー牛の品種や性別、個体によって同様の傾向を示すこともあったが、同一核ドナー由来の NT 牛でも全く異なる所見を示す場合もあった。このことから、本研究では NT 技術によって生産された牛に共通する明確な病理学的特徴を明

らかにすることはできなかった。

ある 20 歳の種雄牛由来の NT 牛では、ドナー細胞 (線維芽細胞) を採取した時点でかなり高齢であったにもかかわらず、4 頭の健康な NT 牛が生産され (Kubota ら 2000)、うち 2 頭は種雄牛として正常な後代を生産し、さらに正常な第 2 代クローン (リクローン) 牛が作出された (Kubota ら 2004)。残り 2 頭の NT 牛は肥育・と殺されたが、病理学的な異常は認められず、食肉 (肉量、肉質) としても非常に良い成績が得られた (Tian ら 2005)。こうした例があることを考慮すると、クローン牛の病理学的特徴を明確にするためには、それぞれ同一の核ドナー牛・レシピエント卵子・核移植技術等によって生産された複数の個体について比較検討し、データを蓄積することが重要であると考えられた。

文 献

- 長谷川清寿, 佐藤真澄, 大島一修, 佐々木恵美, 安部亜津子, 高仁敏光. 2003. 生産手法が異なる牛胚の子宮内での消長と胎子および胎盤の組織学的検索. 第 11 回日本胚移植研究会大会講要 53.
- 窪田力, 野崎聡, 轟木淳一, 溝下和則, 長野京子, 佐藤真澄, 高橋清也, 居在家義昭. 2001. 体細胞クローン牛の繁殖性. 鹿児島県肉用牛改良研究所研究報告 42-45.
- 鬼塚剛, 佐藤真澄, 田中省吾, 窪田力, 田原則雄, 渡邊洋一郎, 米丸俊朗. 1999. 流・死産または死亡した体細胞クローン牛の病理組織学的検索. 第 128 回日本獣医学会講要 174.
- 佐藤真澄, 窪田力, 田中省吾, 鬼塚剛, 田原則雄, 川崎健一, 堀脇浩孝. 2001a. 体細胞クローン牛流・死産子の内分泌器官および胎盤の病理学的検討. 第 131 回日本獣医学会講要 127.
- 佐藤真澄, 窪田力, 田中省吾, 鬼塚剛, 田原則雄, 川崎健一, 堀脇浩孝. 2001b. 体細胞クローン牛胎盤の電子顕微鏡的観察. 第 132 回日本獣医学会講要 225.
- 佐藤真澄. 2005. 体細胞クローン牛の病理. 第 139 回日本獣医学会 (獣医臨床繁殖学シンポジウム) 講要 141.
- Kubota C, Yamakuchi H, Todoroki J, Mizoshita K, Tabara N, Barber M, Yang X. 2000. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA* 97 (3), 990-5.
- Kubota C, Tian XC, Yang X. 2004. Serial bull cloning by somatic cell nuclear transfer. *Nature Biotechnology* 22 (6), 693-4.
- Renard JP, Chastant S, Chesne P, Richard C, Marchal J, Cordommie N, Chavatte P, Vignon X. 1999.

- Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. *Lancet* 354 (9163) , 1489-91.
- Sato M, Onitsuka T, Kubota C, Tanaka S, Tabara N, Watanabe Y, Tamotsu M, Oozono M, Todoroki J, Mizoshita K, Yamakuchi H, Kawasaki K, Horiwaki H, Takahashi S, Izaike Y. 1999. Studies on the stillbirth of calves cloned by nuclear transfer from somatic cells. 1. Histopathological observations. 17th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology Proc.256.
- Sato M, Kubota C, Tanaka S, Onitsuka T, Tabara N, Todoroki J, Mizoshita K, Yamakuchi H, Kawasaki K, Horiwaki H. 2000. Studies on the stillbirth of calves cloned by nuclear transfer from somatic cells. 2. Observations on the endocrine organs and the placentas. 18th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology Proc.239.
- Sato M, Kubota C, Tanaka S, Onitsuka T, Tabara N, Todoroki J, Mizosita K, Yamakuchi H, Kawasaki K, Horiwaki H. 2001. Studies on the stillbirth of calves cloned by nuclear transfer from somatic cells. 3. Electron microscopical observations on the placentomes. 19th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology Proc.224.
- Sato M, Kubota C, Tanaka S, Onitsuka T. 2002a. Histopathological observations of the placentas of calves cloned from somatic cells. *Cloning and Stem Cell* 4, 295.
- Sato M, Kubota C, Tanaka S, Onitsuka T. 2002b. Studies on the stillbirth of calves cloned by nuclear transfer from somatic cells. 4. Pathological observations on the conceptus. 20th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology Proc.193.
- Sato M., Kubota, C., Tanaka, S, Onitsuka, T. 2002c. Pathological characteristics of the calves cloned from somatic cells. *Veterinary Pathology* 39: 629.
- Sato M, Kubota C, Tanaka S, Rosol T J. 2005. Histopathological study on the adrenal glands of bovine clones. *Veterinary Pathology* 42, 723.
- Tian X C, Kubota C, Sakashita K, Izaike Y, Okano R, Tabara N, Curchoe C, Jacob L, Zhang Y, Smith S, Bormann C, Xu J, Sato M, Andrew S, Yang X. 2005. Meat and milk compositions of bovine clones. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA* 128, 6261-6266.