

クローン家畜生産技術利用による優良家畜作出試験（第3報）

— 体細胞クローン牛の発育および繁殖能力に関する調査 —

Production of Excellent Cattle by Somatic Cell Nuclear Transfer

(Third report)

— Investigation of the growth and breeding ability of
somatic cell-cloned cattle —

山口大輔・根本聰実・渡辺晃行・葦澤圭二郎¹・足立憲隆・赤木悟史²・
高橋清也²・久保正法³

要 約

独立行政法人畜産草地研究所繫養の黒毛和種雌牛の卵丘細胞をドナー細胞として、核移植により体細胞クローン胚を作出した。当センター繫養牛に移植した結果、3頭の雌子牛が得られたので、発育および繁殖能力の調査を行った。発育面においては、ドナー牛と同程度の発育が認められ、発育能力の相似性および正常性が示された。しかし、うち1頭は147日齢で死亡したため、病性鑑定を行った結果、下垂体性小児症および免疫不全と診断された。生存している2頭に関しては、19ヶ月齢で春機発動が認められ、26ヶ月齢で人工授精を行った結果、1頭が受胎したので、繁殖能力に関しても正常であることが示唆された。

キーワード：体細胞クローン、核移植、下垂体性小児症

緒 言

受精卵移植は育種改良などの能力検定の効率化に役立つ技術として期待されている。この技術に、同一遺伝形質を持つ牛を生産することが可能な受精卵および体細胞クローン技術を付加させることで、優良雌牛の増産や種雄牛造成の促進等の可能性が期待される。しかしながらクローン牛の生産効率は低く、流产や過大仔、生後直死などの例が多く報告されている^{1), 2), 3)}。

本県においても、独立行政法人畜産草地研

究所（以下、畜草研）繫養の黒毛和種雌牛卵丘細胞由来の体細胞クローン牛（以下、クローン牛）3頭の作出に成功しており（クローン1, 2, 3）、遺伝子検査により、ドナー牛との遺伝的相似性が確認されている⁴⁾。

今回、作出了クローン牛における正常性と、ドナー牛との発育および繁殖能力に関する相似性を確認するため、体重、体高および繁殖能力について調査を行ったので、その概要を報告する。また、3頭のうち1頭（クローン3）については、147日齢で死亡したため、原因究明のため病性鑑定を行った。その概要もあわせて報告する。

1 現（独）農業技術研究機構 畜産草地研究所

2 （独）農業技術研究機構 畜産草地研究所

3 （独）農業技術研究機構 動物衛生研究所

材料および方法

1 供試牛

供試牛は、前報⁴⁾により作出した黒毛和種雌牛卵丘細胞由来のクローン牛3頭を用いた(クローン1, 2, 3)。

2 調査項目

発育能力については体重(クローン牛およびドナー牛)および体高(クローン牛のみ)の計測を1ヶ月に1度実施した。なお、体高については10ヶ月齢時から測定を開始した。繁殖能力については乗駕行動や外陰部腫脹の観察および直腸検査などによって、主として発情行動の有無を判定した。

3 調査期間

クローン1および2については、生後から27ヶ月齢まで、クローン3については生後から死亡するまでを調査期間とした。

4 飼養管理

母牛とは別飼育とし、人工哺乳を行った。3ヶ月齢時に離乳し、それ以降の飼料は乾草と配合飼料で飼育した。

5 クローン3の病性鑑定

死亡確認後、独立行政法人農業技術研究機構動物衛生研究所へ持ち込み、病性鑑定を実施した。

結果および考察

1 クローン牛の発育能力調査

クローン牛の発育曲線を、標準的な黒毛和種雌牛⁵⁾およびドナー牛のものと比較した。その結果、クローン牛の体重の推移については標準以下ではあるが、ドナー牛と比較した場合、同様に推移しており(図1)、クローン

牛の間でも大きな差は認められなかった。また体高についても、クローン牛の間で差は認められなかった(図2)。

クローン牛の発育調査に関してはいくつか報告されており^{6), 7), 8), 9), 10)}、本多ら⁶⁾は、クローン牛の発育は正常範囲内であり、発育状況も類似していたと報告している。また上村ら⁷⁾は、クローン牛の発育状況を黒毛和種の去勢牛およびドナー牛と比較調査した結果、同様に推移しており、発育過程において特異な点は見当たらないと報告している。今回の調査において、クローン牛の発育は標準より下回って推移しているが、ドナー牛とは近似していた。核移植に用いたドナー牛はもともと発育が悪く、標準以下で推移している。従って、ドナー牛とそのクローン牛の間には、発育面で相似性が認められ、クローン牛はドナー牛の発育に関する表現形質を受け継いでいることが示唆された。発育能力については、今後も調査を続ける。

2 クローン牛の繁殖能力調査

クローン牛の繁殖能力について調査した。クローン3は147日齢で死亡したために繁殖能力を調査することができなかつたが、クローン1および2については、19ヶ月齢時に乗駕などの発情行動もみられ、直腸検査により粘液漏出や子宮の収縮性、また卵巣には成熟卵胞も認められたので、これを春機発動とした。その後の発情周期は23~30日で回帰している。また26ヶ月齢時には、2頭とも一般的な繁殖供用開始体重および体高⁵⁾に十分達していると判断したため、人工授精を行った。5週間後に超音波画像診断装置により妊娠鑑定を行った結果、クローン2が受胎していることが確認された。

井上ら¹¹⁾は、ホルスタインのクローン雌牛に人工授精を行ったところ、受胎が確認され、発育性や繁殖性は正常であると報告しており、

森ら¹²⁾の調査では、ホルスタインのクローン雌牛と人工授精によってうまれた雌牛とで、排卵周期に大きな違いは認められず、クローン雌牛に人工授精を行ったところ、受胎・分娩したと報告している。また、厚生労働省の「クローン技術を利用した動物性食品の安全性について」の中間報告書¹³⁾では、「少なくとも生存してうまれた子牛の発育性やその受胎性に、体細胞由来であるがゆえの特殊性は見出すことができない」としている。

今回、クローン1および2については、19ヶ月齢時において春機発動が確認された。さらに、畜草研で繁養されている同じドナー牛由来のクローン牛は、13ヶ月齢で春機発動が確認されている。この差が飼養されている環境要因によるものなのか、レシピエント卵子のミトコンドリアDNAの違いによるものな

のかは明らかではないが、武田¹⁴⁾は、レシピエント卵子のミトコンドリアDNAの違いが、表現形質にある程度の違いが現れる可能性があることを示唆している。従って、今後さらに同じドナー牛由来で、かつレシピエント卵子の異なるクローン牛の間で、相似性の調査を行う必要がある。

さらにクローン2については、人工授精を行った結果、受胎が確認された。これにより、受胎にいたるまでの繁殖能力における正常性が確認できた。今後は分娩前後の状況や後代産子の発育についても、正常性の調査を行っていく予定である。また、クローン1が初回授精で受胎しなかった原因は不明であるが、今後さらに人工授精あるいは受精卵移植を行い、繁殖能力における正常性について調査していく。

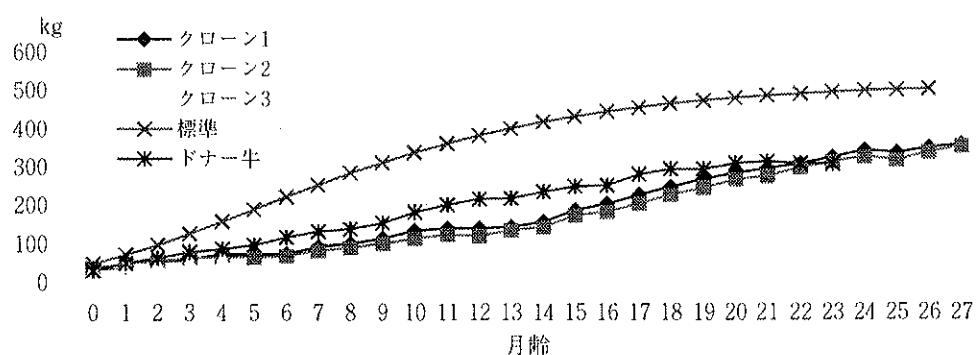


図1：体細胞クローン子牛の体重変化

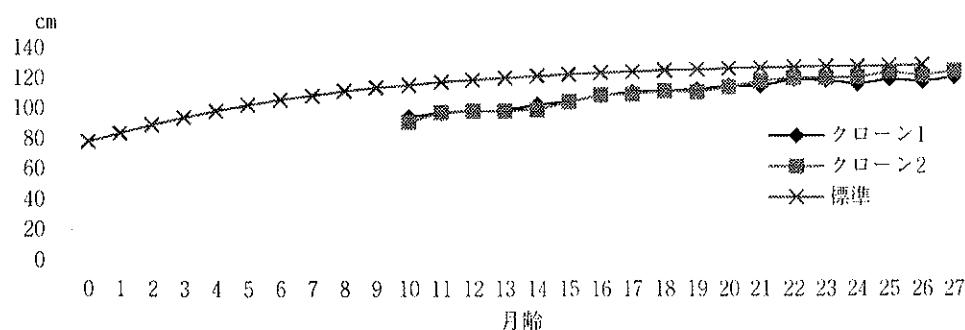


図2：体細胞クローン牛の体高変化

3 死亡したクローン牛の病理所見

剖検所見では、下垂体、甲状腺、肝臓および胸腺の形状が非常に小さく、薄かった。心臓は、心室の筋肉が薄く、心室内膜は肥厚、白色化していた。骨は非常に薄くかつ細く、特に頭蓋骨と肋骨で顕著であった。脂肪はゼラチン様で白色化していたことから、栄養状態が悪かったことが推察された。

組織所見では、下垂体において成長ホルモンを産生する α 細胞が極めて少なかった(図 7, 8)。脾臓の外分泌腺には、zymogen 顆粒がみられなかった(図 3, 4)。リンパ系については、リンパ球の形成が悪かった(図 5, 6)。また、結腸および直腸には、重度のコクシジウムの寄生がみられた。

以上のことから、クローン 3 は成長ホルモンの産生が極めて悪かったと推察され、この影響で成長が阻害されたことによる下垂体性小児症と診断された。また、リンパ球の形成が悪かったことから、免疫不全が疑われた。

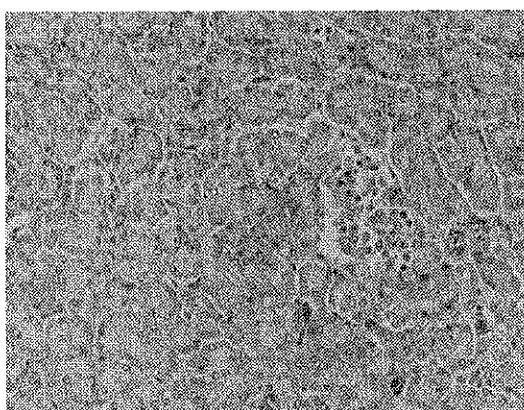


図 3：脾臓 1

さらに脾臓の zymogen 顆粒がみられなかつたことから、消化酵素の外分泌が不十分であつたことが推察された。したがつてクローン 3 は、内分泌系の異常による小児症に加え、栄養の消化・吸収が不十分なことによる栄養不足、さらに免疫不全による感染症への抵抗性の低下により死亡したと考えられる。

クローン牛においては、受胎後の早期胚死滅や流産、過大仔に伴うと思われる死産や生後直死は多く報告されている。また育成段階の牛においても種々の死亡例が報告されてはいるが、その多くは免疫不全や甲状腺の異常であり、クローン 3 のような症例は他に例がない¹⁵⁾。クローン 3 は、クローン胚を作出する過程においてドナー細胞の培養方法や、レシピエント卵子の由来が他の 2 頭の場合と異なつており、それがクローン 1, 2 との正常性の差となつて現れた一因ではないかと考えられた。

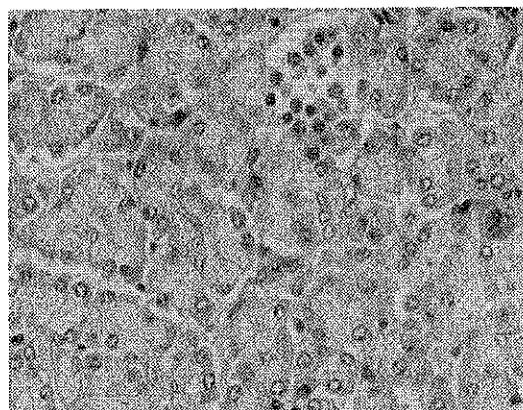


図 4：脾臓 2 (拡大)



図 5：リンパ 1

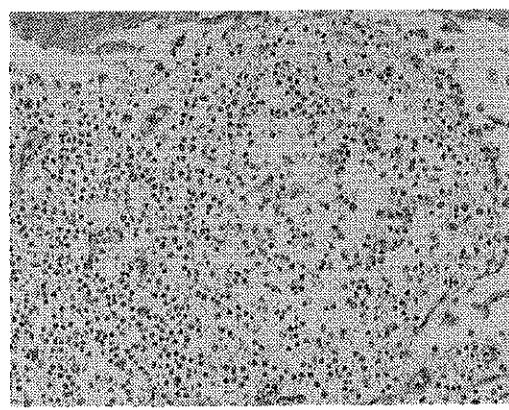


図 6：リンパ 2 (拡大)

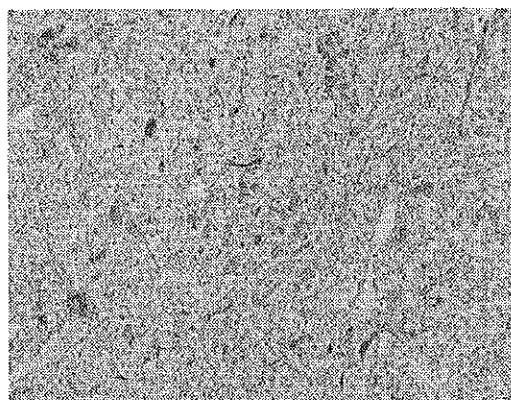


図 7：下垂体 1

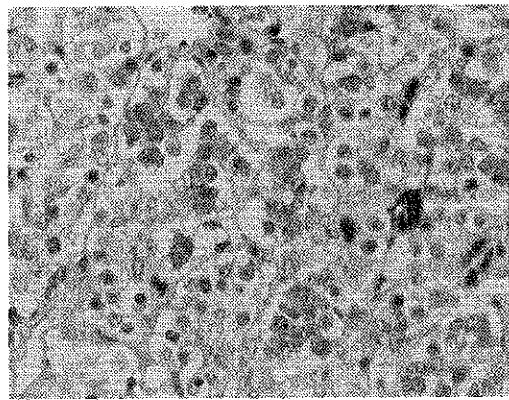


図 8：下垂体 2（拡大）

謝　　辞

稿を終えるにあたり、ご指導いただきました独立行政法人農業技術研究機構畜産草地研究所家畜育種繁殖部生殖細胞研究室の皆様、並びにクローン 3 の病性鑑定を実施していただきました同動物衛生研究所病性鑑定室久保正法室長に深謝いたします。

引用文献

- 1) Kato, Y. et al (2000). Journal of Reproduction and Fertility. 120:231-237
- 2) 沼辺孝 (2000). 牛胎児発育に関する考察. 第 15 回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会講演要旨, 16 : 8-10
- 3) 農林水産省農林水産技術会議 (2002). 家畜クローン研究の現状について
- 4) 戸塚ら (2001). クローン家畜生産技術利用による優良家畜作出試験（第 2 報）. 茨城畜セ研報, 33 : 43-49
- 5) 農林水産省農林水産技術会議事務局 (2000). 日本飼養標準肉用牛 (2000 年度版)
- 6) 本多ら (2003). 体細胞クローン牛の遺伝的相同性および発育性について. 福島畜試研報, 10 : 13-16
- 7) 上村ら (2000). 体細胞クローン牛の発育調査. 奈良県畜試研報, 27 : 16-19
- 8) 渋谷 (2000). 体細胞クローン牛の確立に関する研究 (1) 体細胞クローン牛の遺伝的相同性調査. 大分県畜試研報, 29 : 102-107
- 9) 坂下ら (2002). 体細胞クローン去勢牛の肥育成績. 鹿児島県畜試研報, 35 : 28-36
- 10) 長野ら (2002). 体細胞クローン牛(ホルスタイン種)の発育性. 鹿児島県畜試研報, 35 : 83-88
- 11) 井上ら (2002). 体細胞クローン牛生産技術の確立に関する研究 (2) 乳用牛における体細胞クローン利用技術の確立. 大分県畜試研報, 31 : 69-71
- 12) 森ら (2002). 体細胞クローン牛の初産分娩時までの繁殖状況. 鹿児島県畜試研報, 36 : 34-40
- 13) 熊谷 (2000). クローン技術を利用した動物性食品の安全性について 中間報告書. 厚生労働省
- 14) 武田 (2001). 牛の核移植操作とミトコンドリア DNA 変異. 畜産の研究, 55 : 43-46
- 15) 農林水産省生産局畜産部 (2003). 第 7 回核移植技術全国検討会議資料

Production of Excellent Cattle by Somatic Cell Nuclear Transfer
(Third report)

— Investigation of the growth and breeding ability of
somatic cell-cloned cattle —

Daisuke YAMAGUCHI, Satomi NEMOTO, Akiyuki WATANABE, Keijirou NIRASAWA, Noritaka ADACHI,
Satoshi AKAGI, Seiya TAKAHASHI, Masanori KUBO

Summary

Somatic cell-cloned embryos were reconstructed by nuclear transfer using the cumulus cells of a Japanese Black cow at National Institute of Livestock and Grassland Science. As a result of the transfer to the cows at Ibaraki Prefectural Livestock Research Center, three calves were born, delivered by a Caesarian Section. They were examined for their growth and breeding ability. On the growth side, the calves grew at the same rate as the donor cow of the same grade. They reached homogeneity and normality. However, one of three calves, which died on its 147th day, was diagnosed as hypophysistic infantilism and immunity insufficiency, as a result of performing disease analysis. As for the breeding ability of the two calves that survived, they reached puberty at 19 months of age, and one conceived by AI at 26 months. These results suggest normality of the growth and breeding ability.

Key words: Somatic cell-cloned calf, Nuclear transfer, hypophysistic infantilism