

## クローン家畜生産技術利用による優良家畜作出試験（第4報）

— 体細胞クローン牛の繁殖能力およびその後代産子に関する調査 —

山口大輔・根本聡実・渡辺晃行・葺澤圭二郎<sup>1</sup>・足立憲隆・赤木悟史<sup>2</sup>・  
高橋清也<sup>2</sup>・久保正法<sup>3</sup>

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

— Investigation of the breeding ability of somatic cell-cloned cattle and normality of its progeny calf —

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

### 要 約

独立行政法人畜産草地研究所繁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成した。当センター繁養牛に移植した結果、3頭の体細胞クローン牛が得られ、うち1頭は147日齢で死亡したが、その他の2頭は生存しており、順調に発育を続けている。それらについては、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、2頭とも受胎した。1頭は無事に28.5kgの雌子牛を分娩し、産子は順調に発育している。したがって、体細胞クローン牛が正常な繁殖能力を持つこと、およびその後代が正常に発育することが示唆された。しかし、もう1頭は252日齢で死産した。病性鑑定を行ったところ、ホルモン関係の異常および免疫不全が疑われた。

キーワード：体細胞クローン、核移植、免疫不全

### 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、流死産や過大仔、生後直死などの例が多く報告されている<sup>1), 2), 3), 6)</sup>。本県においても、独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構畜産草地研究所（以下、畜草研）繁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、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<sup>4)</sup>。また前報<sup>5)</sup>では、生存しているクローン牛（ク

ローン 1、2）における正常性およびドナー牛との相同性を示唆する結果が得られている。特に繁殖能力については、2頭に通常の黒毛和種精液による人工授精を行った結果、クローン 2のみ受胎を確認している。

今回、クローン 1 について再度人工授精を行ったところ、受胎を確認することができた。そこで、クローン牛の繁殖能力における正常性、およびクローン牛の後代産子における正常性を調査したので、報告する。

### 材料および方法

#### 1 クローン牛の繁殖能力に関する調査

前報<sup>5)</sup>において受胎が確認されなかったクローン 1 に対して、発情を確認した当日の夕方、および翌日の朝に、黒毛和種の凍結精液を使用して、再度人工授精を行った。妊娠鑑定は、約40日後に超音波診断法によって行った。

#### 2 後代産子の血液生化学的性状に関する調査

1 現（独）農業・生物系特定産業技術研究機構 畜産草地研究所

2 現（独）農業・生物系特定産業技術研究機構 畜産草地研究所

3 現（独）農業・生物系特定産業技術研究機構 動物衛生研究所

クローン2の後代産子から血液を採取し、ドライケミストリー法による血液生化学的性状の調査を行った。項目はNa, K, Cl, Mg, Ca, IP, GOT, GPT, GGT, CPK, ALP, LDH, Amy, BUN, UA, T-Pro, Alb, Cre, Glu, T-Bil, T-Cho, TG, HDL-c, およびFRAで、分娩直後、1日後、2日後、7日後、2週間後、4週間後、2ヶ月後に血液を採取した。また、対照牛については、通常の黒毛和種雌子牛から血液を採取し、同様のタイムスケジュールおよび項目で血液生化学的性状の検査を行った。

### 3 クローン牛の乳質検査

クローン1については死産した翌日に、クローン2については分娩1週間後に乳をサンプルとして採取し、社団法人茨城県畜産協会へ持ち込み、乳質検査を実施した。検査項目は、脂肪率、無脂固形分率、蛋白質率、体細胞数、乳糖率、全固形分率、および尿素とした。

### 4 死産した胎子の病性鑑定

クローン1が死産した後、娩出された胎子の病理解剖を行った。また、臍帯、精巣、肝臓、腎臓、脾臓、小腸、胸腺、肺、心筋、骨格筋、甲状腺、および脳の一部をサンプルとして採取し、独立行政法人農業・生物系特定産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 クローン牛の繁殖能力に関する調査

クローン1に対して、再度人工授精を行い、約40日後に超音波による妊娠鑑定を行ったところ、受胎を確認することができた。そこで、既に受胎が確認されているクローン2とともに、繁殖能力における正常性を調査した(表1)。その結果、クローン2は、受胎後285日目に自然分娩により22.5kgの雌子牛を分娩した。通常の黒毛和種雌牛の妊娠期間が285日とされていることから、クローン2における妊娠期間については、正常であると考えられた。また、得られた産子の体重も22.5kgであり、クローン牛に見られる過大子<sup>1), 2), 3), 10)</sup>ではなく、正常範囲内と考えられた。さらに、分娩直後から産子に対して哺育行動をとっており、産子も順調に発育している。森ら<sup>9)</sup>は、ホルスタインのクローン牛後代産子について、過大子ではなく、ホルスタイン種の平均生時体重であったと報告している。加藤ら<sup>6)</sup>は、体細胞クローン牛について、発育性および繁殖性について特に異常が

ないものと報告している。またEnrightら<sup>11)</sup>は、体細胞クローン雌牛は正常な繁殖能力をもつことを示唆している。今回の結果やこれらの報告から、クローン牛の繁殖能力における正常性が示唆された。

クローン1は、受胎後252日目に死産した。国内の公的研究機関において、平成14年9月までに、クローン雌牛の後代産子は52頭得られており、その中で死産が3頭確認されている。また、クローン雄牛の後代産子は49頭得られており、その中で死産が1頭確認されている<sup>8)</sup>。今回のケースでは、2頭中1頭が死産したという結果が得られたが、前述の報告を考慮すると、クローン牛が後代産子を死産する確率は極めて低いことが示唆された。

### 2 死産した胎子の病性鑑定

死産胎子を確認後、ただちに病理解剖を行ったが、剖検所見では著変は認められなかった。組織所見では、胸腺において皮質に認められるリンパ球が少ないこと(図1)、および脾臓ではリンパ球がほとんどないことが認められた(図2)。また、甲状腺においては、コロイドが全くないことが認められた(図3)。これらの結果から、脾と胸腺の所見からは免疫不全が、甲状腺の所見からはホルモン関係の異常が示唆された。

### 3 後代産子の血液生化学的性状の調査

クローン2の後代産子について、血液生化学的性状に関する調査を行った結果、正常の範囲内であった(表2)。また、対照牛と比較して大きな差は認められなかった。従って、クローン牛の後代産子の血液生化学的性状に関して、正常性が示唆された。

### 4 クローン牛の乳質検査

クローン1および2について、乳質検査を行った(表3)。クローン2に関して、その後代産子が順調に発育していることから、哺育行動および乳質に関する正常性が示唆された。クローン1に関しては、死産してしまったので哺育行動に関する正常性を調査することができず、また、クローン1および2における乳質の差が、クローン1の死産につながったかどうか不明であった。加藤ら<sup>6)</sup>は、黒毛和種について、クローン牛と同時期に育成された他の繁殖雌牛の乳質を比較したところ、蛋白質率、乳糖率、無脂固形分率については、特に異常な数値はなかったと報告している。またWalshら<sup>7)</sup>は、ホルスタインについて、クローン牛および通常の搾乳牛の全固形分率、脂肪率、乳糖率、および蛋

白質率を比較したところ、顕著な差は認められなかったと報告している。クローン1および2のドナー牛については、乳質検査を行っていないので比較はできないが、これらの報告があることから、乳質においてもドナー牛との相性が認められる可能性が考えられた。

表1：体細胞クローン牛の繁殖能力調査状況

	第1回 AI 日	使用精液	第2回 AI 日	使用精液	分娩予定日	分娩日	妊娠期間	結果
クローン1	H15.3.11	千穂 (2本)	2003.6.17~18	安福秀 (4本)	H16.3.28	H16.2.24	252日	死産
クローン2	H15.3.19	千穂 (2本)			H15.12.30	H15.12.29	285日	正常

表2：体細胞クローン牛の後代産子の血液生化学的性状

項目	単位	検体	血液採取日						
			直後	1日後	2日後	7日後	2週間後	4週間後	2ヶ月後
Na	mmol/L	対照	143.5	137.5	141.5	139.5	137	135.5	136
		後代	126	133	121	135	145	149	143
K	mmol/L	対照	4.2	5.45	4.05	5.35	5.15	4.75	4.7
		後代	4.4	5.1	4.5	5.1	5.2	4.9	4.9
Cl	mmol/L	対照	97.5	88	97	94.5	95.5	95.5	94.5
		後代	87	93	82	88	94	101	98
Mg	mg/dl	対照	2.5	2.2	2	2.1	2	2	1.5
		後代	2.1	2.8	2.5	2.6	1.9	<0.2	2.2
Ca	mg/dl	対照	11.65	11.6	11.65	11.05	10.8	10.4	10.8
		後代	11.8	11.9	11.7	11.7	12	<3.0	10.8
IP	mg/dl	対照	7.4	7.3	7.45	9.65	9.4	8.65	7.85
		後代	5.8	6.4	6.4	9	10.1	9.8	9.4
GOT	IU/L	対照	64	51	52.5	29.5	33	38	42.5
		後代	<10	61	47	24	27	47	32
GPT	IU/L	対照	11	10	10	10	10	15	10
		後代	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
GGT	IU/L	対照	1500	1138	996	368.5	164	92.5	21
		後代	12	>1500	914	292	94	40	23
CPK	IU/L	対照	870.5	265	92	50	50	117	97.5
		後代	210	229	<50	104	83	139	331
ALP	IU/L	対照	1804	1045	1216	1436.5	1765	1547	850
		後代	593	2016	1673	2561	1092	274	594
LDH	IU/L	対照	626.5	699.5	831	664.5	763	804	958.5
		後代	223	392	420	461	339	507	509
Amy	IU/L	対照	427	568.5	565	723.5	596	654	631.5
		後代	454	518	604	>800	>800	<10	472
BUN	mg/dl	対照	6	5.5	5	16.5	13	11	8
		後代	6	6	7	13	10	11	8
UA	mg/dl	対照	1	1	1	1	1	1	1
		後代	1.1	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
T-Pro	g/dl	対照	6.6	6.75	7	6.4	6.35	6.45	5.95
		後代	3.8	5.5	5.7	6	6	5.8	5.6
Alb	g/dl	対照	2.55	2.65	2.7	2.85	3.2	3.25	3.3
		後代	2.3	2.4	2.5	3.1	3.1	3.6	3.6
Cre	mg/dl	対照	2.85	1	1	0.8	0.75	0.8	0.7
		後代	2.1	1.6	1	0.8	0.7	0.5	0.7
Glu	mg/dl	対照	91.5	124	111	113.5	113.5	112.5	91
		後代	35	112	120	99	97	111	79
T-Bil	mg/dl	対照	0.8	0.75	0.45	0.2	0.2	0.2	0.2
		後代	0.2	0.6	0.3	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
T-Cho	mg/dl	対照	50	50	50.5	110.5	133	139	164.5
		後代	<50	<50	<50	80	79	77	127
TG	mg/dl	対照	25	36	74	47.5	41	27.5	46.5
		後代	<25	<25	34	51	59	39	33
HDL-c	mg/dl	対照	10	16.5	34.5	82.5	89.5	92	101.5
		後代	<10	<10	28	68	71	67	97
FRA	$\mu$ mol/l	対照	185	194.5	195	257.5	317.5	346	306.5
		後代	247	188	215	246	296	361	365

表3：体細胞クローン牛の乳質検査

項目	単位	供試牛	
		クローン1	クローン2
脂肪率	%	0.24	1.5
無脂固形分率	%	16.27	19.43
蛋白質率	%	12.12	14.82
体細胞数	1000/ml	1452	427
乳糖率	%	3.15	3.61
全固形分率	%	16.51	20.93
尿素	mg/dl	27	5

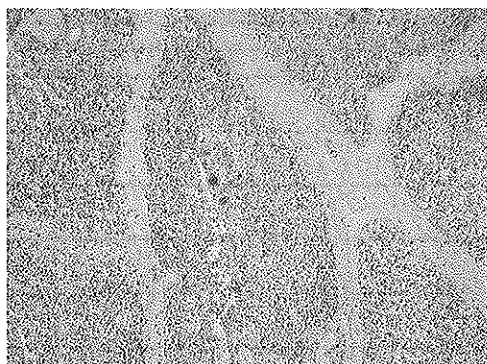


図1：胸腺

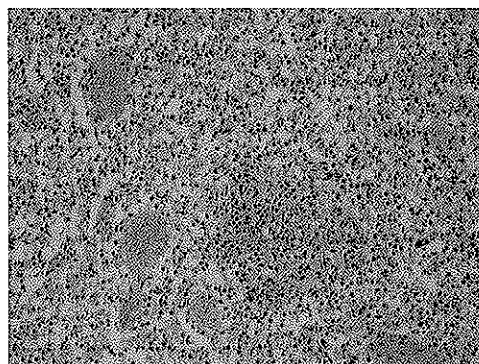


図2：脾臓

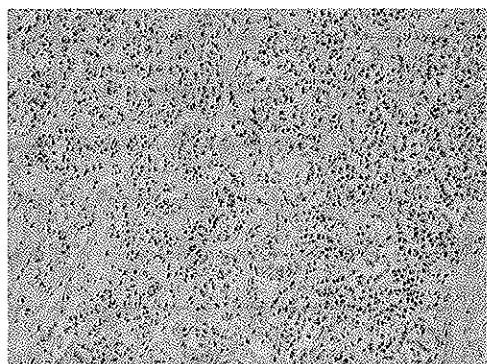


図3：甲状腺

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、卵巣採材においてご協力いただきました県北食肉衛生検査所、並びに茨城県中央食肉公社の皆様に深謝いたします。

## 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) 山口ら(2003). 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). 茨城畜セ研報, 35:55-60
- 6) 加藤ら(2003). 体細胞クローン牛の正常性について(第1報). 岐阜県畜研研報, 3:27-36
- 7) Walsh, K. et al (2003). Cloning Stem-Cells. 5(3):213-219
- 8) 農林水産省生産局畜産部(2004). 第8回核移植技術全国検討会議資料
- 9) 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
- 10) 笹井ら(2001). ホルスタイン種乳用牛における体細胞クローン牛の双子生産. 徳島県畜研, 1:6-11
- 11) Enright, P. et al (2002). Biology of Reproduction. 66:291-296

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

— Investigation of the breeding ability of  
somatic cell-cloned cattle and normality of its progeny calf —

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. However, one of three calves died on its 147<sup>th</sup> day, but other 2 calves have existed, growth is continued normally. They reached puberty at 19 months of age, and conceived by AI at 26 months. One was safely delivered of a heifer calf of 28.5kg, and calf is growing favorably. This suggests somatic-cell cloned cow has normality of the breeding ability, and its progenies will grow normally. But one of two cows, which stillborn on its 252<sup>th</sup> day, was diagnosed as thymic hypoplasia and immune insufficiency, as a result of performing disease analysis.

Key words: Somatic cell-cloned calve, Nuclear transfer, immune insufficiency