

クローン牛生産技術の確立

(2)体細胞クローン牛の生産

比嘉直志 山城存 千葉好夫

I 要 約

種雄牛造成におけるクローン検定への応用を図るため、種雄牛の照溝号をドナーとした体細胞クローン胚を作出するとともに、延べ49頭に移植を行なった。その結果、胚盤胞発生率は14.9%、受胎率は12.2%であった。妊娠維持した2頭の母牛からそれぞれ帝王切開により、63kgの照溝1および53kgの照溝2を得た。しかし、照溝1は約1カ月齢で死亡した。生産されたクローン牛とドナー牛との鼻紋の比較により相似性が認められたが、個体の識別は可能であった。血液生化学検査によりクローン産子の生後の総タンパクが低い傾向にあった。また、照溝2は4カ月齢時点で順調に発育中である。

II 緒 言

種畜改良および優良種畜の増殖技術は、畜産の基盤として重要となっている。中でも、核移植によるクローン牛の生産技術は、優良牛増産や種雄牛造成など改良増殖を促進させる技術として注目されており、すでに国内の40の研究機関で318頭の体細胞クローン牛が生産されている¹⁾。この核移植技術を産肉能力検定に応用することで、種雄牛検定の世代間隔短縮、正確度の向上による改良の効率化が期待される^{2, 3)}。今回、体細胞クローン牛を生産し、種雄牛造成におけるクローン検定への応用を図る目的で、種雄牛候補牛の耳由来の細胞より体細胞クローン牛2頭を生産したので概要を報告する。

III 材料および方法

1. 試験期間および場所

試験期間は2001年8月から2003年3月、沖縄県畜産試験場で実施した。

2. 核移植操作

ドナー細胞は、17カ月の照溝号の耳から採取し培養した。その後の一連の操作は、前報⁴⁾に準じて行なった。融合操作は成熟培養開始25から27時間目で行ない、卵子活性化は5mMのCaイオノフォアで5分間、その後シクロヘキシミドを10 μ g/ml添加したTissue Culture Medium199培地で5時間行なった。発生培養は、IVD101培地(機能性ペプチド研究所製)を用い38.5 $^{\circ}$ C、5%CO₂、5%O₂の気相下で行なった。核移植成績として、融合率、分割率および胚盤胞率を調査した。

3. クローン胚の移植および凍結

核移植にあわせて発情同期化した受卵牛に胚盤胞を1胚または2胚移植した。また、一部胚は凍結保存後に移植に供した。凍結液には子牛血清を20%添加した修正リン酸緩衝液を基材とし、10%エチレングリコール+0.1Mシュクロースを耐凍剤として用いた。胚齢30日目で超音波診断装置を用いて妊娠を確認し、妊娠牛は、60日目で再度直腸検査にて妊娠鑑定を行なった。胚移植成績として、受胎頭数、流産数および分娩産子数を調査した。

4. クローン妊娠牛の分娩対策

分娩予定日の1カ月前に直腸検査を実施し、過大胎子の可能性があったため、金山ら⁵⁾の方法で予定日にあわせて3日前より分娩誘起処置を行ない、帝王切開で分娩させた。

5. クローン産子の哺乳育成

誕生した2頭の産子は、生時および1日後に体重を測定し、人工初乳を給与した。その後は代用乳で人工哺乳を行なった。代用乳給与量は、40g/kgW^{0.75}としたが給与初期から消化不良性の下痢がみられたため、便の状況に応じて給与量を減量した。また、固形飼料は、知念ら⁶⁾の給与法を参考にし行なった。すなわち、生後10日齢より人工乳を給与し、31日齢より3cm程度に切断した市販のチモ

シーグラス乾草で混合飼料 (TMR) とした。粗飼料含量については、一部変更し10%から60日齢で20%含量になるように増量調整した。給与量は日本飼養標準肉用牛(2000年版)⁷⁾の子牛からDG1.0kgに必要な養分要求量を算出して給与した。

6. 鼻紋採取, 体型測定および血液生化学検査

ドナー牛との鼻紋比較のため、クローン産子の照溝1および照溝2の鼻紋をそれぞれ採取した。また、照溝2の発育調査のため、体型測定を月1回、1から4カ月齢時で行なった。血液生化学検査のための採血を生後0, 1および4日齢で行ない、その後は照溝1では4週齢時、照溝2では8週齢時までの各週齢で行なった。生化学検査はスポットケム(SP-4410)、血球数測定はcelltac α (MEK-6258)を用いて測定した。対照牛として現場で人工哺育している2頭の子牛も照溝2と同様に採血し、平均値を対照とした。

IV 結果および考察

1. 核移植成績

核移植および発生成績を表1に示した。861個の卵子に核移植を実施した結果、融合率は71.0%、融合後2日目の分割率は68.9%および7から8日目の胚盤胞率は14.9%であった。

表1 核移植および発生成績

供試卵子数	融合率(%)	分割率(%)	胚盤胞率(%)
861	71.0(611/861)	68.9(421/611)	14.9(91/611)

注) ()内は卵子数を示す。

2. クローン胚の移植成績

移植成績を表2に示した。延べ49頭に移植を行なった結果、新鮮1胚移植で10頭中2頭、新鮮2胚移植で16頭中3頭、凍結2胚移植で10頭中1頭の受胎が確認され、受胎率は12.2%であった。しかし、直腸検査で30から60日齢の間で4頭の流産が確認された。妊娠を継続した2頭からそれぞれ1頭の産子が得られた。

表2 移植成績

移植胚	移植頭数	受胎数	流産数	産子数
新鮮1胚	10	2(20.0)	1	1
新鮮2胚	16	3(18.8)	2	1
凍結1胚	13	0(0.0)	0	0
凍結2胚	10	1(10.0)	1	0
合計	49	6(12.2)	4	2

注) ()は受胎率を示す。

3. 分娩時の状況

分娩状況, 生時体重および1日齢体重を表3に示した。妊娠を維持した2頭とも過大胎子の可能性があり、分娩発来にみられる外陰部の腫脹や乳房の肥大などの徴候が微弱であったため、予定日に合わせた分娩誘起処置を施した。その結果、1頭は分娩予定日に、もう1頭は予定日前日に陣痛が現れ、帝王切開によって63kgの照溝1および53kgの照溝2を産出することができた。今回の分娩誘起および帝王切開は、クローン牛分娩に際し事故を未然に防止できる有効な手段であったと考えられた。2頭の生時体重は、日本飼養標準肉用牛(2000年版)⁸⁾の黒毛和種雄の生時体重37.6kgよりも大きく過大子であった。また、産子間での体重差は10kgであった。照溝1は全身浮腫の状態で産出されたが、翌日には解消され、5kgの体重減少が観察された。また、生後より哺乳欲に乏しく下痢がみられ、2週齢頃より哺乳の拒絶、元氣消沈した。そのため、高カロリー輸液等の治療を行なったが生後33日目で死亡した。病理組織所見では、胸腺の萎縮、リンパ節および脾臓のリンパ球の減少などから免疫不全と診断された。また、脾臓外分泌腺のチモーゲン顆粒の減少から消化機能不良が示唆された。照溝2は生時の浮腫もなく、哺乳欲も強かったが生後2カ月頃まで消化不良性の下痢や肺炎を併発した。しかし、その後は4カ月齢まで順調な発育をして

いる。

表3 分娩状況，生時体重および1日齢体重

産子	分娩状況	生時体重	1日齢体重
照溝1	分娩誘起・予定日帝王切開	63kg	58kg
照溝2	分娩誘起・予定1日前帝王切開	53kg	52kg

4. ドナー牛とクローン牛の鼻紋比較

ドナー牛である照溝号の鼻紋を写真1に，クローン牛の鼻紋を写真2および3に示した。和牛の審査⁹⁾によると鼻紋は大別すると3つの型があり，ドナー牛およびクローン牛の鼻紋は下縁中央の唇溝を中心として紋状が放射状をなすC型に分類された。各個体間の紋状は似通っており，相似性は高いと思われたが個体の識別は可能であった。



写真1 照溝

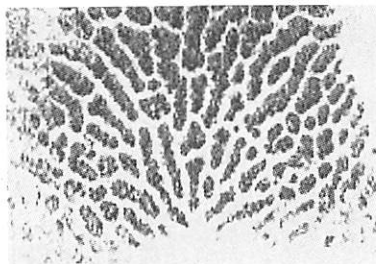


写真2 照溝1

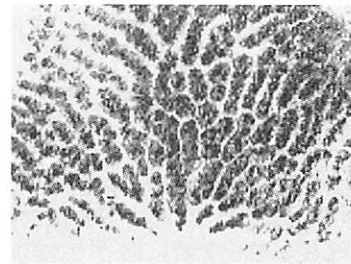


写真3 照溝2

5. 照溝2の発育成績

照溝2の体型測定値および1日当たり増体量(DG)を表4に，体重および体高値の発育曲線を図1および図2に示した。生後2カ月齢までの下痢および肺炎により，DGは0.33~0.41kgと低く推移したが，疾病の回復した3から4カ月齢では，DGは0.83~1.06と高くなり，発育曲線に沿って順調に推移している。

表4 照溝2の体型測定値およびDG (kg, cm)

月齢	体重	体高	十字部高	体長	胸深	胸幅	かん幅	腰角幅	坐骨幅	尻長	胸囲	腹囲	DG
1	62	84	87	80	37	19	19	24	11	28	93	109	0.33
2	76	87	90	85	38	21	22	25	13	30	98	113	0.41
3	105	92	96	92	41	23	28	26	14	32	106	132	0.83
4	136	98	100	100	43	25	30	27	15	35	117	146	1.06

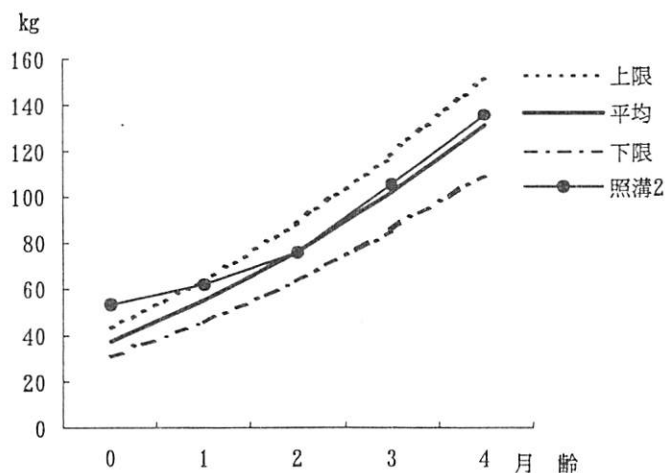


図1 照溝2の体重推移

注) 標準発育曲線は日本飼養標準の黒毛和種雄牛をもとに作成。

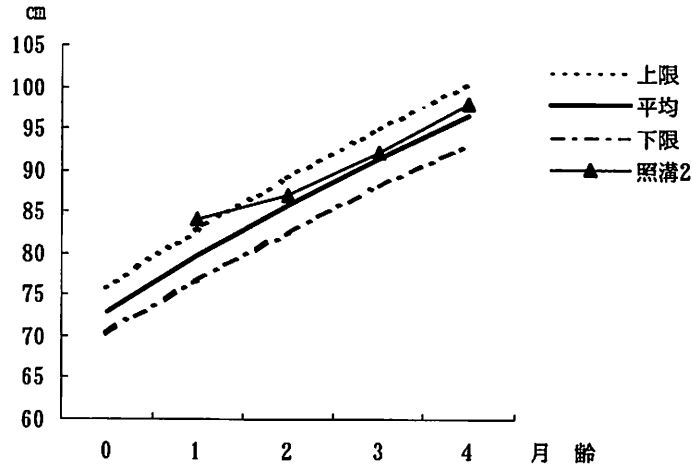


図2 照溝2の体高推移

注) 標準発育曲線は日本飼養標準の黒毛和種雄牛をもとに作成。

6. 血液生化学検査

血液検査および生化学検査結果を図3～10に示した。照溝1は、長期の治療および死亡のため2, 3週齢および5週齢以降が未採血となっている。赤血球数は、照溝1, 2および対照で生後から同様に増加傾向にあった。白血球数は各個体で異なった変動をし、照溝1は低く推移した傾向にあり、免疫不全との関連があるものと思われた。また、照溝2は、初期の肺炎罹患に起因すると思われる白血球数の上昇が生後1から4週齢で観察されたが治療効果にともない減少しており、免疫機能の反応が示されている。ヘマトクリット値はクローン牛でやや高い傾向にあった。総タンパクおよびアルブミンは、クローン牛で低い傾向にあり、生後で特に総タンパクが低かったが、照溝2では8週齢で対照牛とほぼ同じ値になった。BUN, GOTは照溝2と対照で、同様な推移を示したが、照溝1はBUNが4日齢頃より、GOTが死亡直前の4週齢で高く推移しており、腎や肝の機能不全があったものと思われた。アミラーゼは、照溝2および対照の推移において生後1日から1週齢でいったん上昇し、その後3週齢頃から一定レベルで推移する傾向にあるが、照溝1については初期の上昇も小さく他の個体よりも著しく低く推移しており、病理組織所見に推察された消化機能の不良が裏付けされると思われた。また、新生子牛の血清アミラーゼの測定は、消化機能不良の判定の一助になるものと思われた。

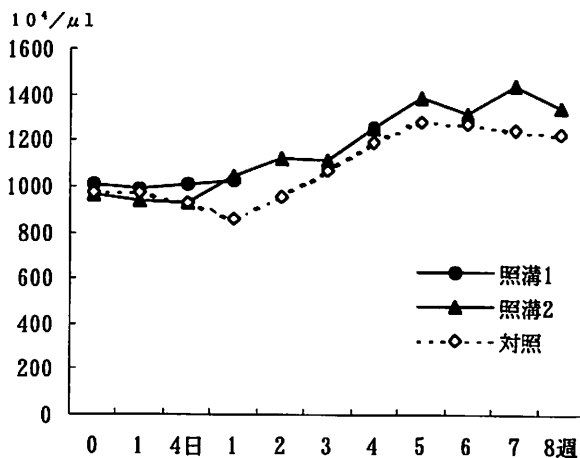


図3 赤血球数

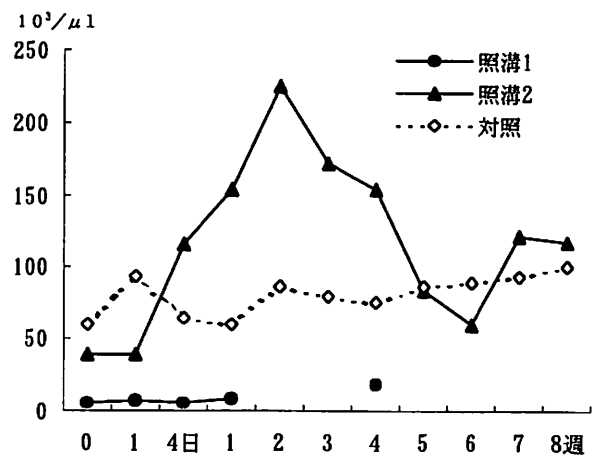


図4 白血球数

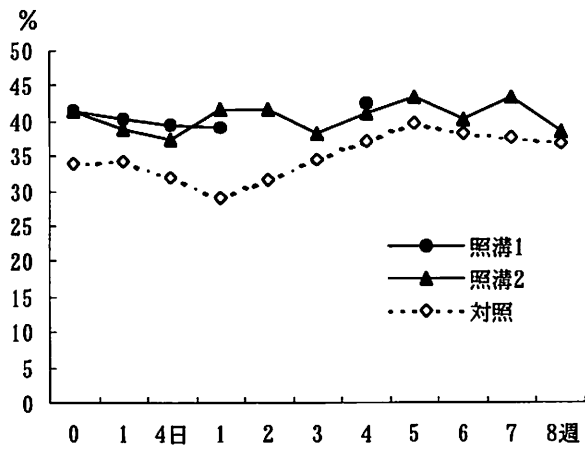


図5 ヘマトクリット値

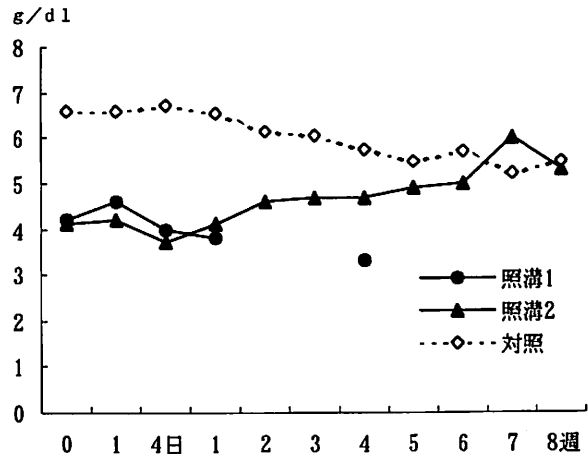


図6 総タンパク

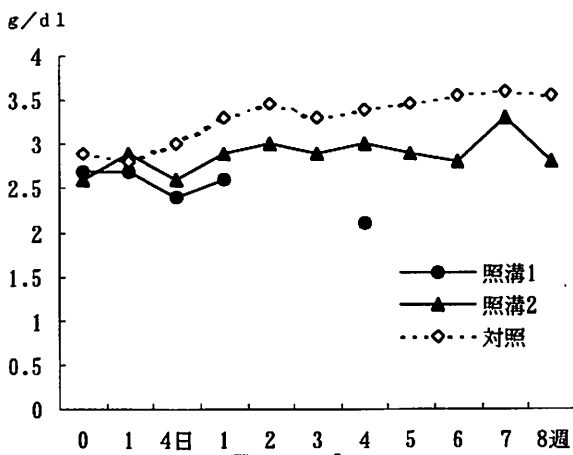


図7 アルブミン

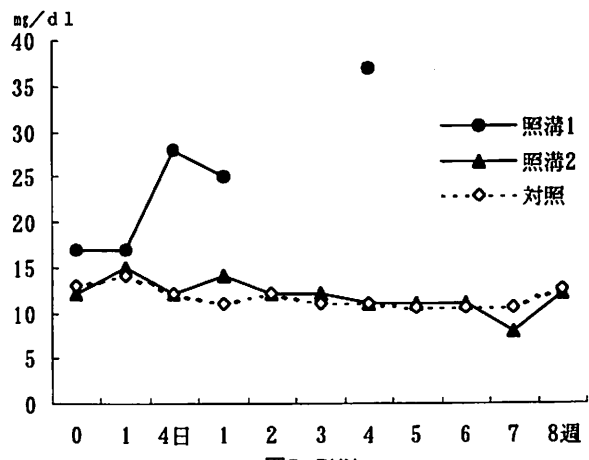


図8 BUN

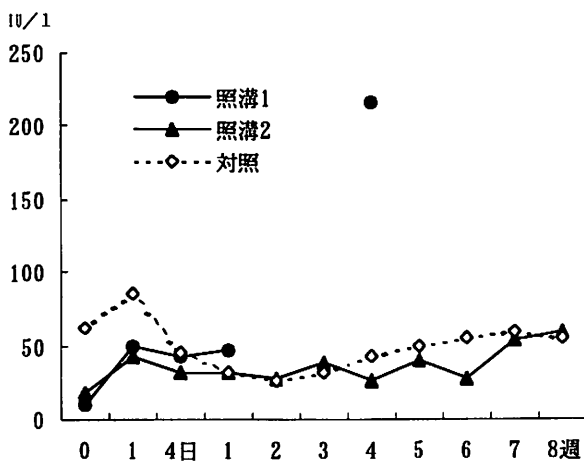


図9 GOT

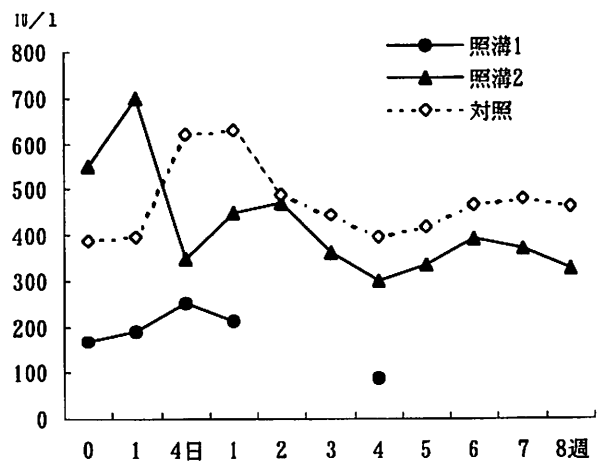


図10 アミラーゼ

今回、種雄牛候補牛の体細胞クローン胚を作出し、胚移植することでクローン産子を得ることができた。しかし、クローン検定を実施する上で胚発生率や受胎率など生産性に十分な成果を得ることができず、今後の課題となった。クローン牛では、流死産、生後直死が多く報告¹⁾されており、それら異常性の要因の一つとして、DNAメチル化の異常との関連性を示唆する報告¹⁰⁾やドナー細胞の状態がその後の遺伝子発現の状態に関与する報告がある¹¹⁾。今回誕生した63kgの産子も通常の2倍近い体重であり、産出直後の全身浮腫の状態からも何らかの変異をきたしていたものと思われた。しかし、正常に発育する個体もあることから、核移植操作の一連の技術見直しにより、改善できる可能性は高いと思われた。

謝 辞

クローン牛の病理組織学的検索にご協力いただきました、独立行政法人動物衛生研究所疫学研究部病性鑑定室室長久保正法氏に深く感謝の意を表します。

V 引 用 文 献

- 1) 農林水産技術会議事務局技術安全課, 2002, 家畜クローン研究の現状について
- 2) 古川力, 2001, クローン技術を応用した肉牛の育種システム, 日本胚移植学雑誌, 23, 88-94
- 3) 広岡博之, 1997, 新しい繁殖技術を用いた牛の育種計画, ETニュースレター, 20, 79-87
- 4) 比嘉直志・山城存・千葉好夫, 2000, クローン牛生産技術の確立(1)体細胞クローン胚の作出における融合条件の検討, 沖縄畜試研報, 38, 7-9
- 5) 金山佳奈子・後藤祐司・小林修司・遠山牧人・新納正之・橋谷田豊・今井敬・米内美晴・小島敏之, 2000, クローン妊娠牛の周産期管理技術 3 分娩管理, 東日本家畜受精卵移植技術研究会大会, 16, 13-15
- 6) 知念雅昭, 玉城政信, 島袋宏俊, 2001, 子牛育成技術の確立(9)混合飼料(TMR)給与による粗飼料含量の違いが黒毛和種哺乳子牛の発育に及ぼす影響, 沖縄畜試研報, 39, 36-44
- 7) 農林水産省農林水産技術会議事務局編, 2000, 日本飼養標準 肉用牛(2000年版), 中央畜産会, 20-21
- 8) 農林水産省農林水産技術会議事務局編, 2000, 日本飼養標準 肉用牛(2000年版), 中央畜産会, 183
- 9) 全国肉用牛協会, 1995, 和牛の審査, 第49回肉用牛長期高等研修会テキスト, 18
- 10) Yong K.K., Deog B.K., Young H.C., An S.C., Kyung K.L., and Yong M.H., 2001, Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos, *Nature Genetics*, 28, 173-177
- 11) Kimiko I., Takashi K., Jiyoung L., Narumi O., Keiji M., Yoko N., Kentaro T., Tomoko K.I., Fumitoshi I. and Otsuo O., 2002, Faithful expression of imprinted genes in cloned mice, *Science*, 295, 297