

体細胞クローン金華豚の発育と繁殖能力

誌名	静岡県中小家畜試験場研究報告 = Bulletin of Shizuoka Swine & Poultry Experiment Station
ISSN	09146520
巻/号	14
掲載ページ	p. 13-16
発行年月	2003年10月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



体細胞クローン金華豚の発育と繁殖能力

Growth and reproductive performances of Jin Hau pig cloned from somatic cell nuclei

柴田昌利・土屋聖子・大竹正剛・河原崎達雄

要約：体細胞クローン技術を活用し、豚遺伝資源を体細胞により保存する方法の有用性を検討するため、体細胞クローン金華豚(以下「クローン豚」)の発育や繁殖能力を通常金華豚(以下「対照豚」)と比較検討し、以下の結果を得た。

1. クローン豚の生時体重は対照豚と差がなく、ウシ等で報告されている過大児は見られなかった。
2. クローン豚の発育は、概ね対照豚の発育曲線の範囲内であった。
3. クローン豚の初回発情日齢は既報の金華豚の成績と同様で、早熟性が確認された。
4. クローン豚は、繁殖能力を有し、産子数、育成率等も対照豚と同様であった。

この結果からクローン豚は、通常金華豚の特徴を有することが明らかとなり、体細胞クローン技術により豚遺伝資源を体細胞により保存することの有用性が強く示唆された。

(静岡中小試研報 14, 13~16, 2003)

はじめに

体細胞クローン動物は1996年のヒツジでの成功(Wilmotら1997)に始まり、ウシ(Katoら1998)、マウス(Wakayamaら1998)などが誕生した。

ブタでは2000年になって初めて2つの方法による成功例が報告され(Onishiら2000, Polejaevaら2000)、その後、遺伝子組換えクローン豚も誕生し、主に医療面での応用の検討がされている(Phelpsら2003)。

また、ブタにおける体細胞クローン技術は、遺伝資源保存の面からも有用な技術として期待されている(大西 2001)。ブタは近親交配により産子数の減少などの弊害が出やすく、少数での系統維持が困難である。さらに、凍結受精卵での保存技術も実用レベルには達していない。その一方で、特に静岡県においては、友好提携をしている中国浙江省から寄贈された希少品種の金華豚や、静岡型銘柄豚として県下各地で産地化が図られている系統造成豚「フジョーク」「フジロック」といった優良品種があり、その遺伝資源の保存方法確立が必要とされている。

そこで、今回、体細胞クローン技術により生み出された金華豚について、有性生殖により生まれ

た通常金華豚の特徴を有しているかについて調査し、体細胞による豚遺伝資源の保存法の有用性について検討した。

材料と方法

体細胞クローン金華豚(以下クローン豚)の概要を表-1に示した。クローン豚は2種類のドナー細胞を用いて顕微注入法により作出した雌、5腹7頭(耳細胞由来3頭、卵管細胞由来4頭)を用いた。対照豚は当场で通常繁殖により生産された金華豚で、8週齢までの発育は2000年9月から2003年1月に分娩された16腹50頭の雌を、25週齢までは1987年4月生まれの2腹20頭を用いた。分娩・育成成績は、分娩日齢333~398日の初産豚6頭のものを用いた。

表-1 体細胞クローン金華豚の概要

No.	生年月日	生時体重	ドナー豚		
			日 齢	性別	使用細胞
S-1	'02. 6. 21	0.95	118日	雌	耳の皮膚
S-2	'02. 6. 21	1.00			
S-3	'02. 7. 26	0.90			
O-1	'02. 10. 9	0.50	1日	雌	卵 管
O-2	'02. 11. 8	0.90			
O-3	'02. 11. 8	1.05			
O-4	'03. 3. 7	1.10			

発育調査は、毎週1回の体重測定を実施した。繁殖能力は、初回発情日齢を発情時の不動反応を指標として調べた。また、当場の通常の雄の精液により人工授精を行い、妊娠期間、分娩産子数、生存頭数、離乳頭数、育成率、産子の平均生時体重、平均3週時体重を調査した。

クローン豚及び対照豚の飼料は当場の慣行法に従い、市販の配合飼料を給与した。統計処理としてt検定を行った。

結果

クローン豚の8週齢までの発育を図-1に示した。平均生時体重は、対照豚の0.87kgに対してクローン豚は0.91kgと差はなく、過大児は1頭も見られなかった。その後、3~5週齢では対照豚と比べ有意に高値で推移したが、6週齢以降再び差は見られなくなり、8週齢では対照豚の14.7kgに対してクローン豚では15.8kgとほぼ同様の値であった。

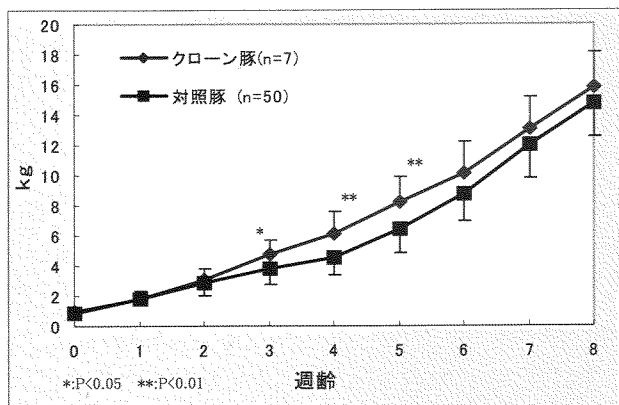


図-1 クローン豚の発育 I

ドナー細胞別のクローン豚個々の発育成績を図-2、3に示した。耳細胞由来クローンでは同腹のS-1, S-2の間でも発育にバラツキが見られたが、概ね対照豚の平均以上、平均+2SD(標準偏差)以下の範囲内で推移した。これは、耳細胞を提供したドナー豚も同様であった(図-2)。卵管細胞由来クローン豚も発育にバラツキが見られたが、概ね対照豚の平均±2SDの範囲内で推移した(図-3)。

クローン豚の25週齢までの発育成績を図-4に示した。クローン豚は対照豚とほぼ同様の発育を示した。

なお、成長したクローン豚の体型は、背がくぼみ、腹が垂れる金華豚の特徴を有していた(写真-1)。

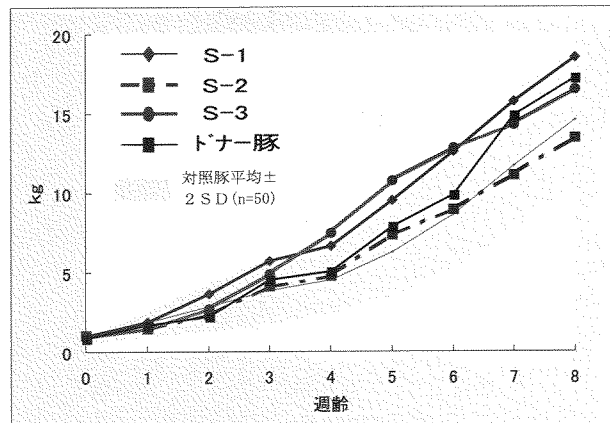


図-2 耳細胞由来クローン豚の発育

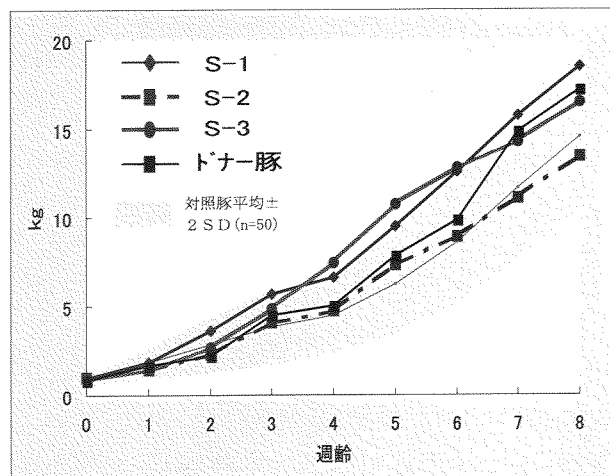


図-3 卵管細胞由来クローン豚の発育

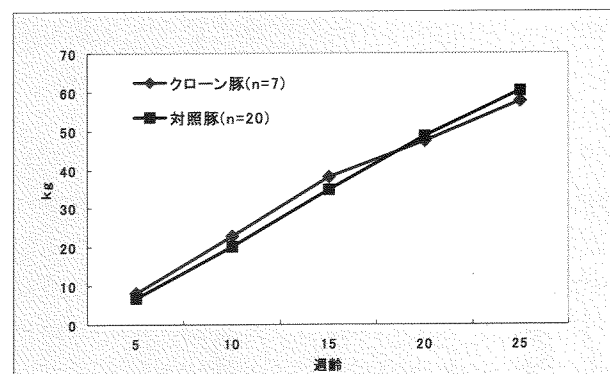


図-4 クローン豚の発育 II

クローン豚の初回発情日齢を表-2に示した。クローン豚は、1頭(S-2)を除き、97~125日齢で初回発情を示した。

クローン豚の分娩・育成成績を表-3に示した。S-1については、泌乳量が少なく、産子を人工哺育したため、離乳頭数、育成率、産子3週時体

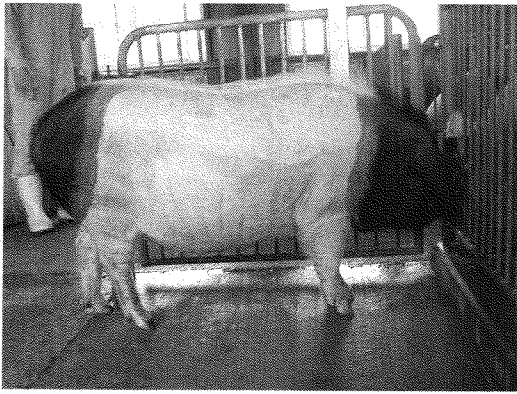


写真-1 10ヶ月齢時のクローン豚 (S-3)

表-1 体細胞クローン金華豚の概要

No.	生年月日	生時体重	ドナー豚		
			日 齢	性別	使用細胞
S-1	'02. 6. 21	0.95	118日	雌	耳の皮膚
S-2	'02. 6. 21	1.00			
S-3	'02. 7. 26	0.90			
O-1	'02. 10. 9	0.50	1日	雌	卵 管
O-2	'02. 11. 8	0.90			
O-3	'02. 11. 8	1.05			
O-4	'03. 3. 7	1.10			

表-2 クローン豚の初発情日齢

豚 No.	初発情日 齢	体 重
S-1	125	57.5
S-2	175	51.7
S-3	97	42
O-1	114	28
O-2	113	42.5
O-3	106	37.5
O-4	102	36
平均	118.9	42.2

表-3 クローン豚の繁殖・育成成績

	妊 娠 期 間	産子数	生 存 頭 数	離 乳 頭 数	育成率	産子平均体重	
					生 時	3週時	
S-1*	112	13	11	(10)	(90.9)	0.6	(2.53)
S-2	113	9	9	8	88.9	0.76	3.64
S-3	114	13	11	10	90.9	0.69	2.93
クローン豚平均 ^a	113	11.7	10.3	9	90	0.68*	3.25
対照豚	113.8	11	10	9.5	95	0.88	4.15

a:母乳の出が悪く人工哺乳とする。b:()内の数値を含まない。
*:P<0.05

重は、参考値とし、クローン豚平均値には含んでいない。クローン豚は平均産子数11.7頭、生存頭数10.3頭、離乳頭数9頭で、対照豚との差は見られなかった。しかし、産子の平均体重は、生時・

3週時とも対照豚に比べ低値であった。

考 察

体細胞クローン家畜のうちウシについては、1998年の成功以来国内でも多くの機関で研究がされている。体細胞クローン牛は、流死産や生後直死の率が高く、過大児も多く見られるが(久保2003)、正常に発育したものは乳牛・肉牛ともにドナー牛や人工授精産子等と同様の発育を示すと言われている(上村ら2000, 坂下ら2002, 長野ら2002)。

一方、ブタでは過大児等の分娩直後の異常は見られず、その後も正常な発育が観察されている(Onishi 2000, Polejaeva 2000, Yin 2002)が、品種の特性に関する検討はなされていない。

今回、中国浙江省原産の金華豚の体細胞から作成したクローン豚について、発育や繁殖能力を調査したところ、当場のクローン豚の生時体重も対照豚と差は認められず、過大児は1頭も見られなかった。その後の発育では、生後3~5週後の体重が対照豚と比べ有意に高かったが、これは、クローン豚は一腹の産子数が受精卵由来産子を含め5~6頭と対照豚の半分以下であり、母豚も金華豚に比べ大柄の欧米種のため、特に哺育後期の栄養状態が良好であったことによると考えられた。有意差は6週目には無くなり、その後25週齢までの発育も対照豚と差がなかったことから、発育は概ね対照豚と同様であったと思われる。

金華豚は他の中国豚同様早熟であり、郎ら(1984)は、平均103日齢(88~124日齢)で典型的な発情兆候を示したと報告している。クローン豚の初回発情日齢を発情時の不動反応を指標に調査したところ、1頭(S-2)を除き、その範囲内であり、早熟性が確認された。なお、S-2については、明瞭な不動反応が確認される以前にも、周期的な食欲減退等発情を疑わせる兆候は観察された。耳の皮膚細胞由来のクローン豚3頭に対し、当場の通常金華豚の精液により人工授精を行った。3頭とも1発情期における人工授精(2~4回)により受胎し、自然分娩により出産した。

他の体細胞クローン動物でも、繁殖性やその産子も正常であることが報告されているが(窪田ら2001, 森ら2002, Tamashiroら2001)、今回のクローン豚の分娩については、妊娠期間、産子頭数、生存頭数、離乳頭数において、同条件の対照豚と

同様の値であることが確認された。なお、産子の平均生時体重で有意差が認められたが、クローン豚の分娩の例数が少なく、その値も対照豚の最低値(生時0.65kg)と差はないことから、今後、例数の増加を待って判断したいと考える。

以上の結果から、体細胞クローン技術により生産された金華豚も通常の繁殖により生まれた金華豚と同様の特徴を有していることが明らかとなった。したがって、体細胞クローン技術を活用することにより豚遺伝資源を体細胞により保存することの有用性が強く示唆された。

今後は、産肉性や肉質について、クローン豚の産子を用いて検討したい。

参考文献

- 上村佳代・億正樹・小財千明・青山譲. 2000. 体細胞クローン牛の発育調査. 奈良県畜産試験場研究報告第27号, 16-19.
- Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y, 1998, Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, 282: 2095-2098.
- 久保正法. 2003. 牛のクローン流死産胎児および死亡子牛の病理学的所見について. 国際シンポジウムクローン家畜とその安全性講演抄録・ポスター発表要旨集. 60-61.
- 窪田力・野崎聡・西浩二・新福由香・川久保耕三・轟木淳一・溝下和則・山口浩・田原則雄. 2001. 体細胞クローン雄牛の繁殖性. 鹿児島県肉牛改良研究所研究報告第6号, 42-45.
- 郎介金・莫自強・徐継初・銭元葵・張冠春. 1984. 金華猪生殖器官及性機能発育的研究Ⅱ. 母猪生殖器官及性機能発育. 浙江農業大学学报, 49-55.
- 森浩一郎・長野京子・窪田力・岡本光司・寺脇志朗・児島浩貴・上宮田正己・上原修一・高橋清也・徳永智之. 2002. 体細胞クローン牛の初産分娩時までの繁殖状況. 鹿児島県畜産試験場研究報告第36号, 34-40.
- 長野京子・森浩一郎・窪田力・岡本光司・寺脇志朗・児島浩貴・上宮田正己・山下光則. 2002. 体細胞クローン牛(ホルスタイン種)の発育性. 鹿児島県畜産試験場研究報告第35号, 83-88.
- 大西彰. 2001. 体細胞クローン豚の開発とその後展望. 畜産の研究. 55 12:1274-1278.
- Onisi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, Hanada H, Perry AC, 2000, Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science*, 289: 1188-1190.
- Phelps CJ, Koike C, Vaught TD, Boone J, Wells KD, Chen SH, Ball S, Specht SM, Polejaeva IA, Monahan JA, Jobst PM, Sharman SB, Lamborn AE, Garst AS, Moore M, DemetrisAJ, Rudert WA, Bottino R, Bertera S, Trucco M, Starzl TE, Dai Y, Ayares DL, 2003, Production of alpha 1,3-galactosyltransferase deficient pig. *Science*, 299: 411-414.
- Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page PL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A, Campbell KH, 2000, Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 407:86-90.
- 坂下邦仁・窪田力・田原則雄・岡野良一・西博巳・川畑健次・大園正陽・別府成・米丸光政. 2002. 胎児由来体細胞クローン去勢牛の肥育成績. 鹿児島県畜産試験場研究報告第36号, 29-33.
- Tamashiro KL, Wakayama T, Akutsu H, Yamazaki Y, Lachey JL, Wortman MD, Seeley RJ, D' Alessio DA, Woods SC, Yanagimachi R, Sakai RR, 2002, Cloned mice have an obese phenotype not transmitted to their offspring. *Nature Medicine*, 8: 215-216.
- Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R, 1998, Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 394: 369-374.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH, 1997, Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385: 810-813.
- Yin XJ, Tani T, Yonemura I, Kawakami M; Miyamoto K, Hasegawa R, Kato Y, Tsunoda Y, 2002, Production of cloned pig from adult somatic cells by chemically assisted removal of maternal chromosomes. *Biology of Reproduction* 67:442-446.