

体細胞クローン牛(ホルスタイン種)後代産子の発育性

誌名	鹿児島県畜産試験場研究報告
ISSN	0389357X
著者名	長野,京子 森,浩一郎 窪田,力 今村,正昭 寺脇,志朗 上原,修一
発行元	鹿児島県畜産試験場
巻/号	39号
掲載ページ	p. 53-58
発行年月	2005年12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



（牛体細胞クローン個体の遺伝的能力評価に関する研究）

体細胞クローン牛（ホルスタイン種）後代産子の発育性

長野京子・森浩一郎¹・窪田力²・今村正昭・寺脇志朗³・上原修一
（川辺農業改良普及センター¹，鹿児島大学農学部²，徳之島農業改良普及センター³）

要 約

体細胞核移植技術（クローン技術）の開発は，家畜の改良増殖や家畜からの有用物質生産等，また各種飼養試験研究の供試牛として貢献が期待されている。しかしながら，実用化にあたっては体細胞クローン牛及びその後代産子の正常性，相似性，安全性など解明すべき課題も多い。

そこで，皮膚細胞由来の体細胞クローン牛（2頭：ドナーは同一）に人工授精して得られた産子（後代産子）3頭の12か月齢までの発育性について調査した。

- 1 後代産子の生時体重は，場内人工授精産子（A I牛）雌108頭平均（過去8年間）およびホルスタイン種雌牛標準発育値¹⁾（標準発育値）との間に差は認められなかった。
- 2 後代産子の体重および体高等の推移は，A I牛および標準発育値とほぼ同様な発育状況を示した。
- 3 1日当たり乾物摂取量及び体重当たり乾物摂取量の推移についても，後代産子，A I牛ともに同様な推移を示した。
- 4 後代産子の血液性状については，成分の中にはA I牛との間に差が認められる時期も一部にはあったが，ほぼ正常範囲内であり，多くの項目でA I牛との間に差は認められなかった。
- 5 以上により，12か月齢までの体細胞クローン牛後代産子の発育性において，A I牛との間に差は認められなかった。

緒 言

体細胞核移植技術（クローン技術）の開発は，家畜の改良増殖や家畜からの有用物質の生産等に貢献される技術として期待されている²⁾。

また，遺伝的に同じ個体を複数作出できる利点があり，各種飼養試験研究の供試牛としての価値も高い³⁾。

しかしながら，実用化にあたっては体細胞クローン牛及びその産子の正常性，相似性，安全性など解明すべき課題も多い^{4) 5)}。

そこで，体細胞クローン牛（クローン牛）の正常性や相似性について検討するため，同一ホルスタイン種雌牛の皮膚細胞由来のクローン牛生産に取り組み平成11年1月に1頭，平成12年2～3月に3頭の計4頭が得られた⁶⁾。現在まで，体細胞クローン牛の発育性⁷⁾，繁殖状況⁸⁾，泌乳状況⁹⁾，ルーメン液性状⁹⁾について検討してきた。今回は，皮膚細胞由来のクローン牛に人工授精し得られた後代産子雌3頭と場内A I牛雌3頭を供試し，12か月齢までの発育性について調査を行った。

試験材料および方法

1 供試牛

後代産子3頭とA I牛3頭を供試し，発育・乾物摂取状況及び血液性状について調査した。

また，発育性調査は，標準発育値の比較を行うとともに，体重については過去8年間の場内人工授精産子雌108頭との比較も併せて行った。

2 試験期間

調査は平成12年8月～平成14年8月の期間とし，生時より12か月齢までとした。

3 飼料給与方法

飼料給与方法を表1に示した。生直後サンプル採取した後直ちに体重5%量の初乳を哺乳ボトルで給与しその後3日間生乳を2～2.5kg×2回/日給与した。

その後徐々に生乳から代用乳に切り替え，生後1週間目からはバケツで給与した。生後5週間までは1日2回給与としその後の1週間は1日1回給与とし，6週目で離乳した。

代用乳は、7倍のお湯（39～41℃）に溶かして給与した。人工乳は、人工乳給餌器で生後4日目から離乳まで給与し、離乳後はコンテナにて給与した。3か月以降から人工乳を育成用配合飼料へ徐々に切り替えを行った。粗飼料としては、チモシー乾草を生後7日から飽食給与し、飲水は、生後から自由摂取させた。

4 調査項目および調査方法

発育性調査については、毎週1回朝の飼料給与前に測定を行った。調査項目は、体重、体高、十字部高、体長、胸深、尻長、腰角幅、寛幅、胸囲、腹囲、管囲とした。

乾物摂取量については、生後4か月まで毎日、それ以降は毎月第2週目の5日間、予め計量しておいた給与量から飼料給与前に計量した残飼量の差から求めた。供試飼料として、生乳・代用乳・人工乳・育成用配合飼料・チモシー乾草を用い、原則として9時と16時の2回給与とした。

供試飼料は無作為に抽出し、60℃、48時間通風乾燥後、ステンレス製ウィー型粉砕器で粉砕したものをサンプルとして用い、成分分析を行った。飼料の成分値を表2に示した。

血液成分については、生後（初乳を飲む前）・6・12・18・24時間後に採血を行った。生後1週間は毎日採血を行い、2週間目以降4週齢まで週1回、それ以降は月1回の採血を実施した。生後2日目以降の採血は朝の飼料給与前に実施し、分析用サンプルは、EDTA-2K添加の真空採血管（2ml）、プレーン真空採血管（8ml）を用い、頸静脈からの採血は10mlとした。

血球成分分析は、EDTA-2K添加の採血サンプルを速やかに動物用自動血球計数装置（PCE-170）にて測定した。一般成分分析は3,500rpm、4℃で20分間遠心分離後、生化学自動分析装置（富士ドライケム3030）にて測定を行った。

表1 供試飼料給与方法

日 齢	生 乳	代 用 乳	人 工 乳	育 成 用 配 合 飼 料	チモシー乾草	水
0～3	2～2.5kg×2回/日					自由飲水
4～6	1～1.2kg×2回/日	100g×2回/日	給与開始			
7～8	0.5～0.6kg×2回/日	200g×2回/日			給与開始(微量)	
9～35		400g×2回/日				
36～42		400g×1回/日				
43		離 乳				
90～				給与開始(人工乳から徐々に)		

表2 供試飼料の成分分析値

(単位：乾物中%)

区 分	代用乳	人工乳	育成用配合飼料	チモシー乾草
乾物(DM)	97.1	91.9	90.1	91.3
粗蛋白(CP)	26.7	18.9	19.9	5.9
粗脂肪(EE)	21.3	5.6	3.1	1.3
粗繊維(CF)	0.4	5.3	6.5	33.7
粗灰分(CA)	6.4	6.7	7.0	5.5
NFE	45.2	63.5	63.6	53.6
TDN	113.3	80.6	79.9	55.4

代用乳・人工乳・配合飼料TDNについては、最低保証成分値

チモシー乾草TDNについては、単回帰式 $TDN = -1.199CF + 95.8$ により推定

結果および考察

1 発育性

発育性調査の供試牛を表3に示した。後代産子3頭の生時体重は、それぞれ38.5、44.1、42.2kgであり、場内A I牛雌108頭（過去8年間）平均、標準発育値と差は認められず、全て自然分娩であった。

参考としてクローン牛平均も併せて示したが、クローン牛の生時体重は、A I牛に比べ重いことが知られており、窪田ら¹⁰⁾は、黒毛和種雄で約20%程度生時体重が重かったと報告している。ホルスタイン種雌クローン牛での場内報告においても13%程度重く同様な結果が得られており⁷⁾、全て帝王切開にての分娩となった。

体重の推移を図1に示した。後代産子、A I牛及び標準発育値の上限と同様な発育を示した。また、クローン牛は標準発育値上限よりも高く推移した。

体高、体長、胸囲の推移を図2、3、4に示した。後代産子、A I牛、クローン牛の体各部は、標準発育値とほぼ同様な発育状況を示した。

また今後、引き続き調査を行い、発育状況についてさらに検討していく必要がある。

2 乾物摂取量

乾物摂取量調査については発育性調査と同供試牛を用いた。

1日当たりの乾物摂取量の推移を図5に示した。クローン牛は高く推移する傾向にあったが、後代産子とA I牛はともに同様な推移を示した。

体重1kg当たり1日乾物摂取量の推移を図6に示した。後代産子、A I牛、クローン牛ともに、ほぼ同様な摂取量の推移を示した。

表3 供試牛の概要

区 分	生年月日	生時体重(Kg)	分娩状況	在胎日数
後代産子1	H14.3.14	38.5	自然分娩	281
後代産子2	H14.8.29	44.1	自然分娩	280
後代産子3	H14.3.28	42.2	自然分娩	280
後代産子平均		41.6±2.8		280.3±0.6
A I牛1	H12.8.5	43.4	自然分娩	272
A I牛2	H12.8.6	40.0	自然分娩	279
A I牛3	H12.8.19	51.0	自然分娩	277
A I牛平均		44.8±5.6		276.0±3.6
場内A I牛(雌108頭)	—	40.9±5.5		
標準発育値	—	40.0(34.2~45.8)		
体細胞クローン牛(雌3頭)平均		55.2±6.3	帝王切開	278±6.9

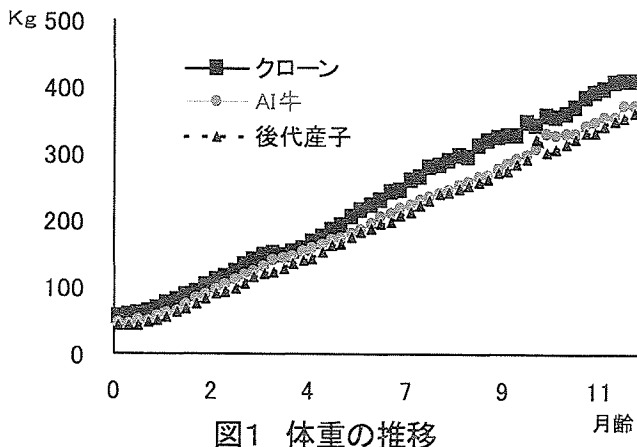


図1 体重の推移

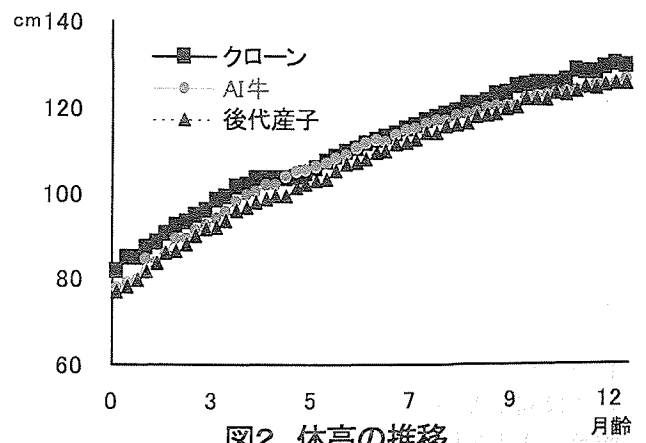
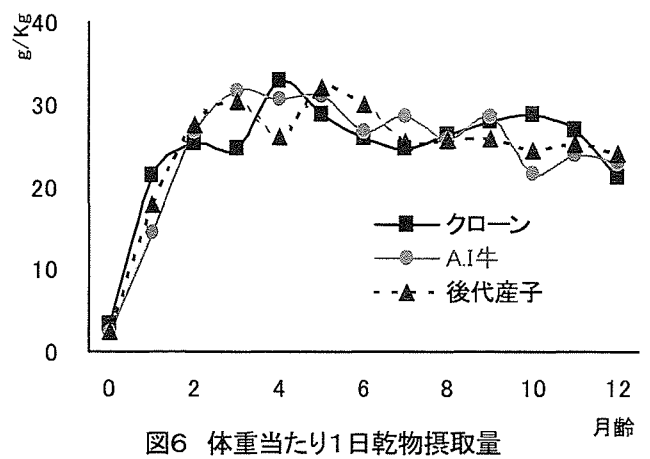
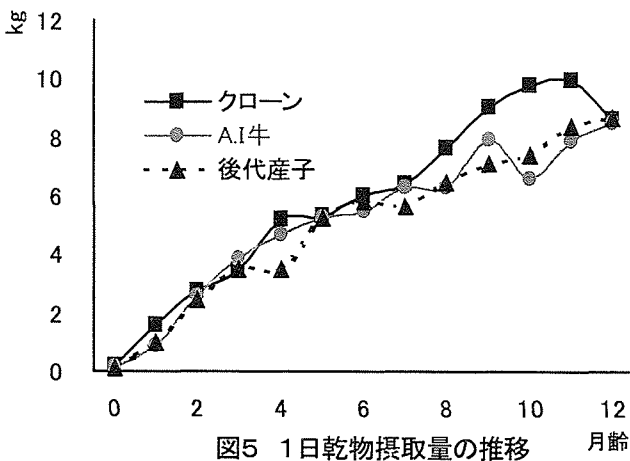
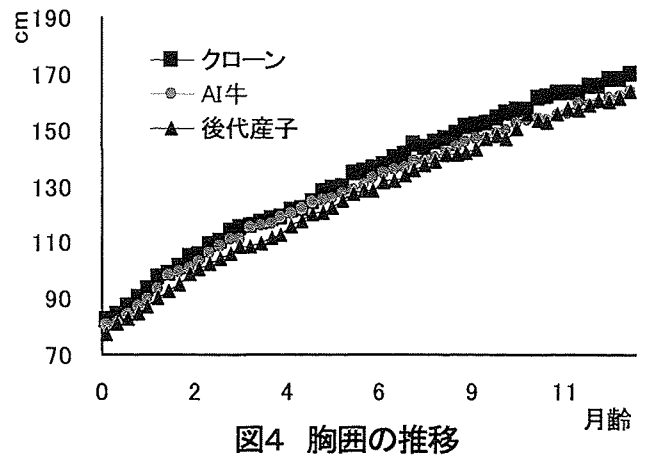
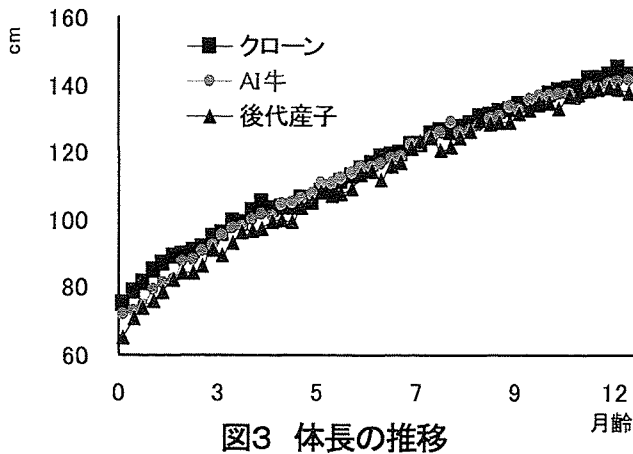


図2 体高の推移



3 血液性状

血液性状の調査においても発育性、乾物摂取量調査と同供試牛を用いた。

ただし、クローン牛については、出生直後輸血を1頭実施したため供試牛より除外し2頭の平均となっている。

血球関連成分として赤血球数、白血球数の推移について図7、図8に示した。窪田ら¹⁰⁾は4週齢までの黒毛和種雄の体細胞クローン牛と人工授精産子との調査でクローン産子の赤血数、白血球数が有意に低く、胎児期から生直後の造血機能が低いことが示唆されたと報告している。ホルスタイン種雌での場内報告においても試験期間を通して正常範囲ではあったがクローン牛の方がAI牛より低く推移する傾向がみられ、特に生後3日目までは有意に低く ($p < 0.05$)、赤血球数については同様な結果が得られている⁷⁾。一方、後代産子、AI牛間では7か月時点で差はみられたが、

ともに正常範囲であり、他の全ての期間において差は認められなかった。

白血球数については、後代産子、AI牛、クローン牛間ともに全期間において差は認められなかった。

タンパク関連成分として血清蛋白質、血清尿素態窒素を図9、10に、血清酵素関連成分として血清コレステロール、血清グルコースを図11、12に、ミネラル関連成分として血清カルシウム、血清リンを図13、14に示した。

血清コレステロールについては後代産子、AI牛との間に差が認められる時期もあったが正常範囲内と考えられ、多くの調査時点で差は認められなかった。

他の成分は全ての調査期間において後代産子とAI牛の間に差は認められなかった。

血液性状についても今後、引き続き調査を行い、さらに検討していく必要がある。

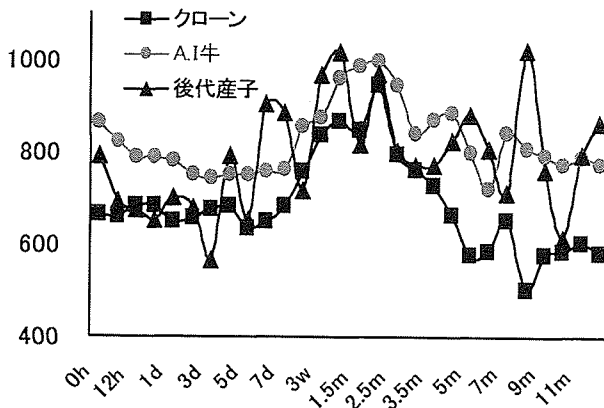


図7 赤血球数の推移

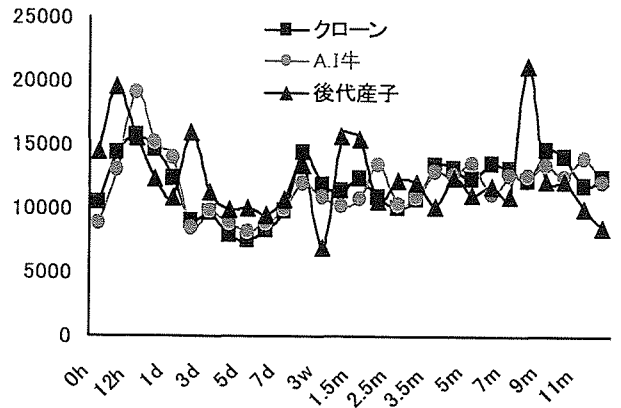


図8 白血球数の推移

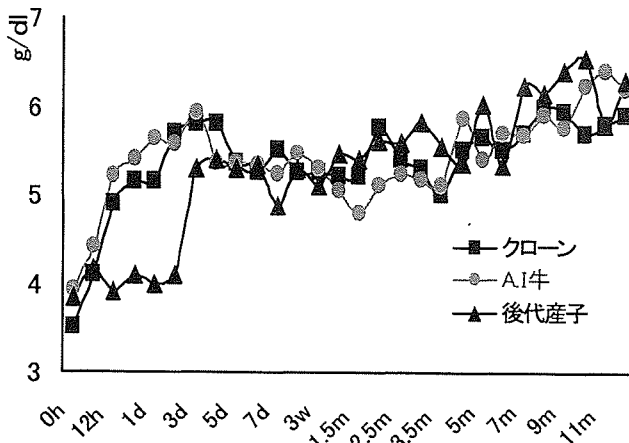


図9 血清蛋白質の推移

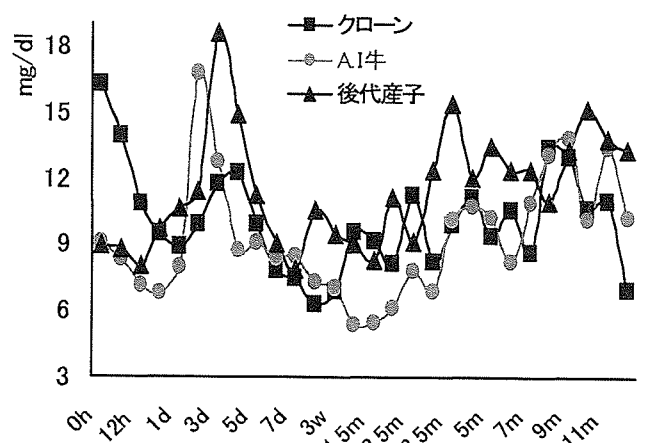


図10 血清尿素態窒素の推移

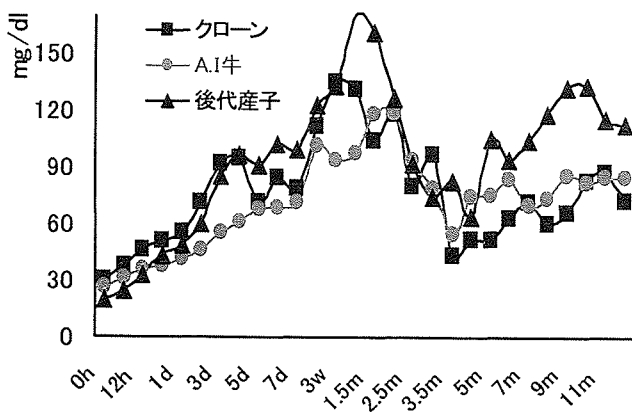


図11 血清コレステロールの推移

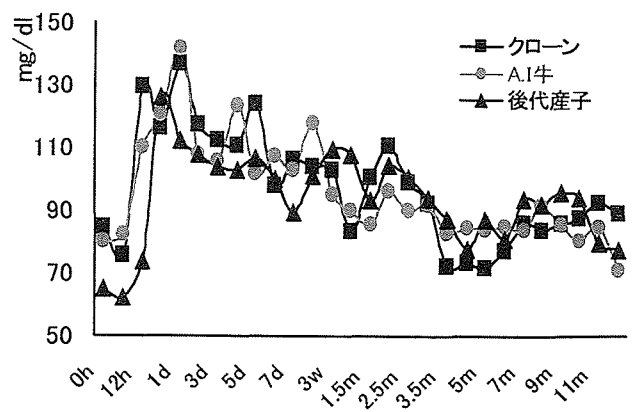


図12 血清グルコースの推移

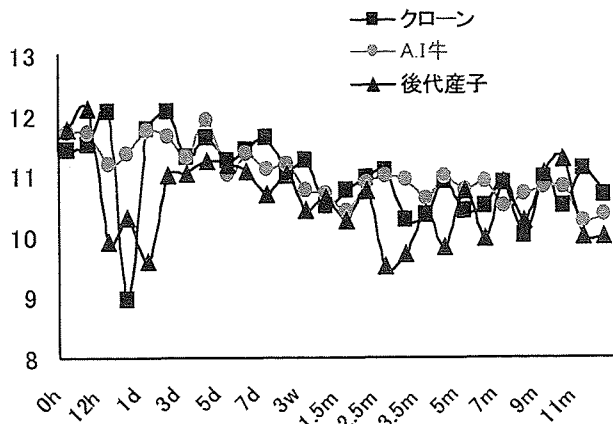


図13 血清カルシウムの推移

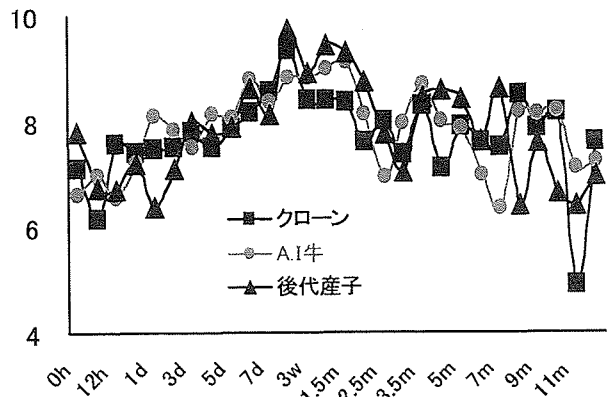


図14 血清リンの推移

まとめ

クローン牛の正常性や相似性について検討するため、同一ホルスタイン種雌牛の皮膚細胞由来のクローン牛生産に取り組み4頭が得られ⁶⁾、現在まで、クローン牛の発育性⁷⁾、繁殖状況⁸⁾、泌乳状況⁹⁾、ルーメン液性状⁹⁾について検討し、A I牛との間に差は認められなかった旨を報告してきた。

今回は、クローン牛に人工授精し得られた後代産子雌3頭と場内A I牛雌3頭を供試し、12か月齢までの発育性について調査を行った。生時体重および体重、体高等の推移、1日当たり乾物摂取量および体重当たり乾物摂取量の推移についても、後代産子、A I牛ともに同様な推移を示した。血液性状については、成分の中にはA I牛との間に差が認められる時期も一部にはあったが、ほぼ正常範囲内であり、12か月齢までの体細胞クローン牛後代産子の発育性において、A I牛との間に差は認められなかった。

今後、クローン牛同様後代産子の正常性・相似性等を解明するため、発育性・繁殖性・泌乳性等の検討をさらに進めていく必要がある。

参考文献

- 1) (社)日本ホルスタイン登録協会：ホルスタイン種雌牛の標準発育値。H7.11
- 2) 今井裕. クローン技術の現段階と展望, 畜産の研究, 第54巻, 1: 126-131. 2000
- 3) 広岡博之. クローン牛を用いた実験計画の評価, 日本畜産学会会報, 第62巻. 11:1104-1106. 1991
- 4) 永井次郎. クローン動物の流れと問題, 畜産の研究, 第52巻. 12:1270-1276. 1998
- 5) 高橋清也. クローン技術の安全性, 畜産の研究, 第55巻. 12:1267-1273. 2001
- 6) 森浩一郎・窪田力・児島浩貴・寺脇志朗・轟淳一他. 体細胞クローン牛の作出状況. 鹿兒島県畜産試験場研究報告, 35:52-57. 2002
- 7) 長野京子・森浩一郎・窪田力・岡本光司・寺脇志朗・児島浩貴他. 体細胞クローン牛(ホルスタイン種)の発育性. 鹿兒島県畜産試験場研究報告, 35:83-88. 2002
- 8) 森浩一郎・長野京子・窪田力・岡本光司・寺脇志朗・児島浩貴他. 体細胞クローン牛の初産分娩時までの繁殖状況. 鹿兒島県畜産試験場研究報告, 36:34-40. 2002
- 9) 長野京子・森浩一郎・窪田力・今村正昭・寺脇志朗他. 体細胞クローン牛(ホルスタイン種)の泌乳状況. 鹿兒島県畜産試験場研究報告, 38:58-63. 2004
- 10) 窪田力・岡本光司・轟淳一・溝下和則・山口浩・田原則雄. 体細胞クローン雄牛の血液成分(生後1か月までの生化学成分). 鹿兒島県肉用牛改良研究所研究報告第6号32:39-40. 2001