

ホルスタイン種体細胞クローン育成雌牛の過排卵処理成績及び後代牛の生産

笠井 裕明, 福見 善之, 渡辺 裕恭, 立川 進

要 約

クローン牛をドナー牛として活用することを目的に、同一ドナー細胞由来のホルスタイン種体細胞クローン育成牛について過剰排卵処理を実施、成績を人工授精由来同居育成牛及びドナー牛と比較し、得られた胚の一部について受胎牛へ移植した。供試牛は、ホルスタイン種経産牛の継代培養した卵丘細胞をドナー細胞に用いて誕生した体細胞クローン3頭（Ⅰ区）で生後14ヶ月齢に達したところで過剰排卵処理前周期における卵胞及び黄体の消長と小卵胞数を連日観察し3頭の相似性を比較した。過剰排卵処理では排卵後3または4日目にE製剤を1mgを投与し、投与から4～9日後にFSH製剤の漸減投与を実施、その成績を人工授精由来産子3頭（Ⅱ区）及びドナー牛と比較するとともに一部の胚について性判別を実施し受胎牛に移植した。その結果、過剰排卵処理前周期において、供試牛全頭で排卵後黄体形成に伴い直径14～18mmに達する主席卵胞の発育が観察され、平均小卵胞数はⅠ区が 20.7 ± 6.0 個/日、Ⅱ区が 10.6 ± 3.9 であった。過剰排卵処理周期ではE製剤投与により主席卵胞の直径は各個体毎に前周期の主席卵胞より比較して小さく直径10～14mmであった。過剰排卵処置開始時における小卵胞数はⅠ区 18.0 ± 3.5 個、Ⅱ区 11.0 ± 7.0 、処置後の推定黄体数は各々 9.3 ± 1.5 、 7.6 ± 3.0 、回収胚数は 5.3 ± 1.5 、 6.3 ± 3.5 であった。Ⅰ区で得られた胚8個を性判別した結果、雄4、雌4個で、受胎牛5頭に各々1個移植したところ2頭で妊娠が確認された。当研究所で飼育中の体細胞クローン牛3頭は同居牛と同様に過剰排卵処理に反応し、胚の回収が可能であり、正常に後代を生産できることがわかった。

1 目 的

正常に誕生した体細胞クローン牛の繁殖能力を明らかにし、供卵牛としての活用方法を探るため、同一ドナー細胞由来ホルスタイン種育成雌牛3頭について過剰排卵処理を実施し、その反応性及び採卵成績を人工授精由来同居育成牛3頭と比較するとともに、得られた胚を移植し後代牛の生産を実施し、若干の知見を得たので報告する。

2 材料および方法

(1) クローン牛の生産及び育成

供試牛は平成13年度に当研究所内で誕生した、同一ドナー細胞由来のホルスタイン種育成雌牛3頭¹⁾で、哺育期間は誕生から3日間は初乳、45日目まで代用乳、3ヶ月齢時まで人工乳で哺育した。育成期間は12ヶ月齢時まではTDN(可消化養

分総量)79.8、CP(粗蛋白質)16.6%の濃厚飼料(表1)を1日2回分離給与、粗飼料はスーダンとアルファルファ乾草を自由菜食となるよう給与、野外放飼場を併設した施設で2頭単位で群飼した。なお、給与飼料成分の構成について日本標準飼料成分表(1995年版)²⁾の値を基に設計した。

対照区にはクローン牛の誕生と同時期に生産された人工授精由来産子3頭を用い、クローン牛と同様の飼養管理によって育成期を管理した。なお、過剰排卵処理開始は試験区、対照区ともに生後14ヶ月齢時である。

(2) 採卵及び移植

クローン間の斉一性を確認するため、生後13ヶ月齢に達したところで超音波診断装置(SSD1200)を用い、過剰排卵処理前周期における卵胞及び黄体の消長と小卵胞数を連日観察し3頭を比較した。卵胞数では各個体ごとにSSD1200の映像を毎

日ビデオに録画し、直径およそ 2mm 以上 5mm 未満のものを小卵胞として左右両方の卵巣に存在する合計数をカウントし記録した。また、5mm 以上のものは中～大卵胞とし、直腸検査により卵巣図を作成しながら、超音波診断装置により補足的にその直径を確認した。また、対照区の 3 頭についても同様の観察を行った。

過剰排卵処理では試験区、対照区ともに排卵後 3 または 4 日目に E 製剤 (ギナンドール) を 1mg 臀部筋肉内に投与し、E 製剤投与から 4～9 日後に FSH 製剤の漸減投与により過剰排卵処理を実施し、ホルモン剤に対する反応性を臨床症状を中心に観察し、その採卵成績についてもクローン間及び両区間で比較した。また、得られた胚の一部については PCR 法により性判別を実施し受胚牛に移植した。

表 1 育成期間給与飼料

| 育成期間 (91～365 日目) | | |
|------------------|-----------|---------------|
| スーダン | : 2.5kg | 大豆粕 : 0.193kg |
| アルファ | : 0.5kg | 魚粉 : 0.002kg |
| トウモロコシ | : 1.1kg | TDN : 71.9% |
| フスマ | : 1.56kg | CP : 14.7% |
| 脱皮大麦 | : 0.144kg | DG : 0.7kg/日 |

3 結 果

過剰排卵処理前周期において、供試牛全頭で排卵後黄体形成に伴い直径 14～18mm に達する主席卵胞の発育が観察され、平均小卵胞数は試験区が 20.7 ± 6.0 個/日、対照区が 10.6 ± 3.9 であった。過剰排卵処理周期では E 製剤投与により主席卵胞の直径は各個体毎に前周期の主席卵胞より比較して小さく直径 10～14mm であった。過剰排卵処置開始時における小卵胞数は試験区 18.0 ± 3.5 個、対照区 11.0 ± 7.0 、処置後の推定黄体数は各々 9.3 ± 1.5 、 7.6 ± 3.0 、回収胚数は 5.3 ± 1.5 、 6.3 ± 3.5 であった。

表 2 供試牛

| 区 | 生産方法 | 母牛 (細胞提供牛) | 番号 |
|----|------|---------------|-----|
| 試験 | クローン | 8号(卵丘細胞) | 188 |
| | クローン | 8号(卵丘細胞) | 190 |
| | クローン | 8号(卵丘細胞) | 191 |
| 対照 | 人工授精 | 14号 | 31 |
| | 人工授精 | 14号 | 32 |
| | 人工授精 | 21号 | 34 |

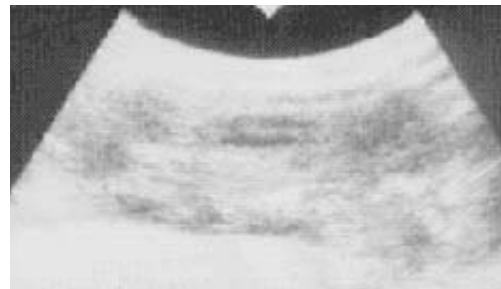


写真 1 小卵胞 (直径 5mm 未満)



写真 2 中～大卵胞 (直径 5mm 以上)

表 3 卵巣観察機材等

| |
|--------------------------------|
| 超音波診断装置 : アロカ製 (SSD1200, 7.5M) |
| 卵胞の分類 |
| 小卵胞 : 直径 2mm 以上～5mm 未満 |
| 中～大卵胞 (主席卵胞) : 5mm 以上 |

試験区で得られた胚 8 個を性判別した結果、雄 4、雌 4 個で、受胚牛 5 頭に各々 1 個移植したところ 2 頭で妊娠が確認された。また、対照区では 10 個を性判別した結果、雄 4、雌 6 個で 4 頭に各々 1 個移植し 3 頭で妊娠が確認された。

クローン牛より得られた胚を移植し妊娠した受胎牛は正常妊娠期間を経過し、自然分娩によって生存産子を生産した。また、クローン牛本牛も過

剰排卵処理後の人工授精によって妊娠し生存産子を正常分娩によって生産した。

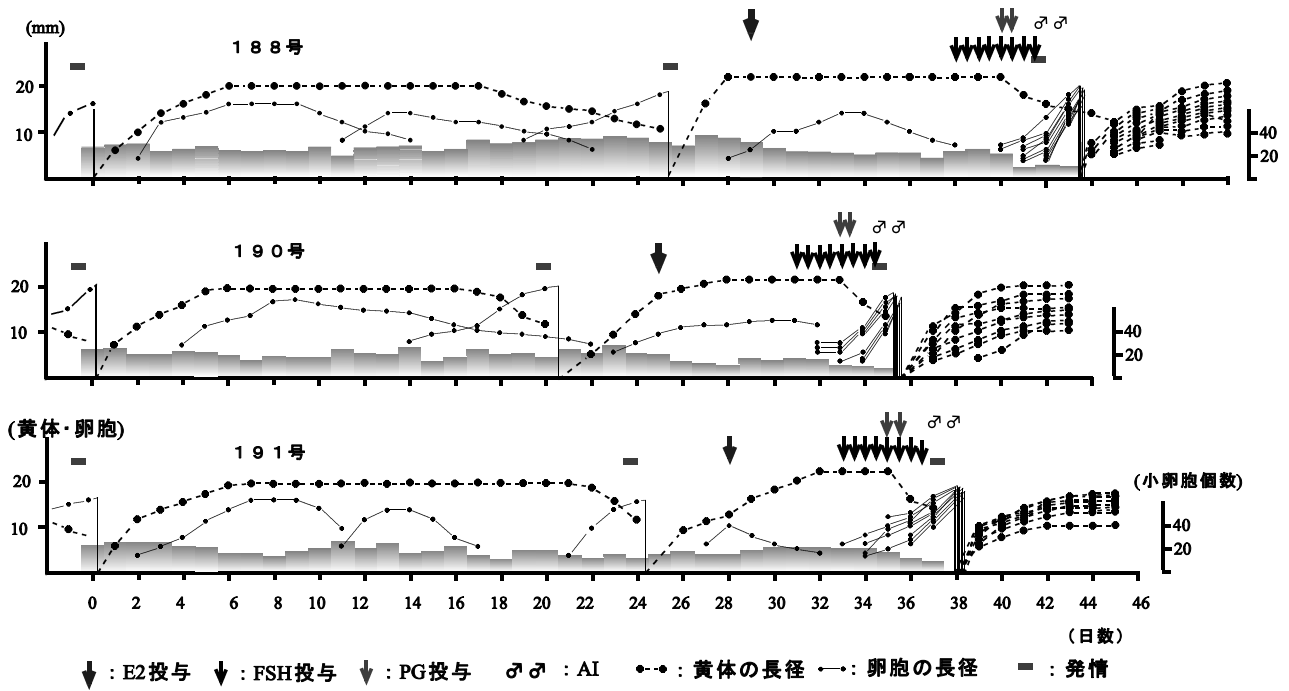


図1 試験区：過剰排卵処理前後の卵巢における卵胞及び黄体の消長と小卵胞数の推移

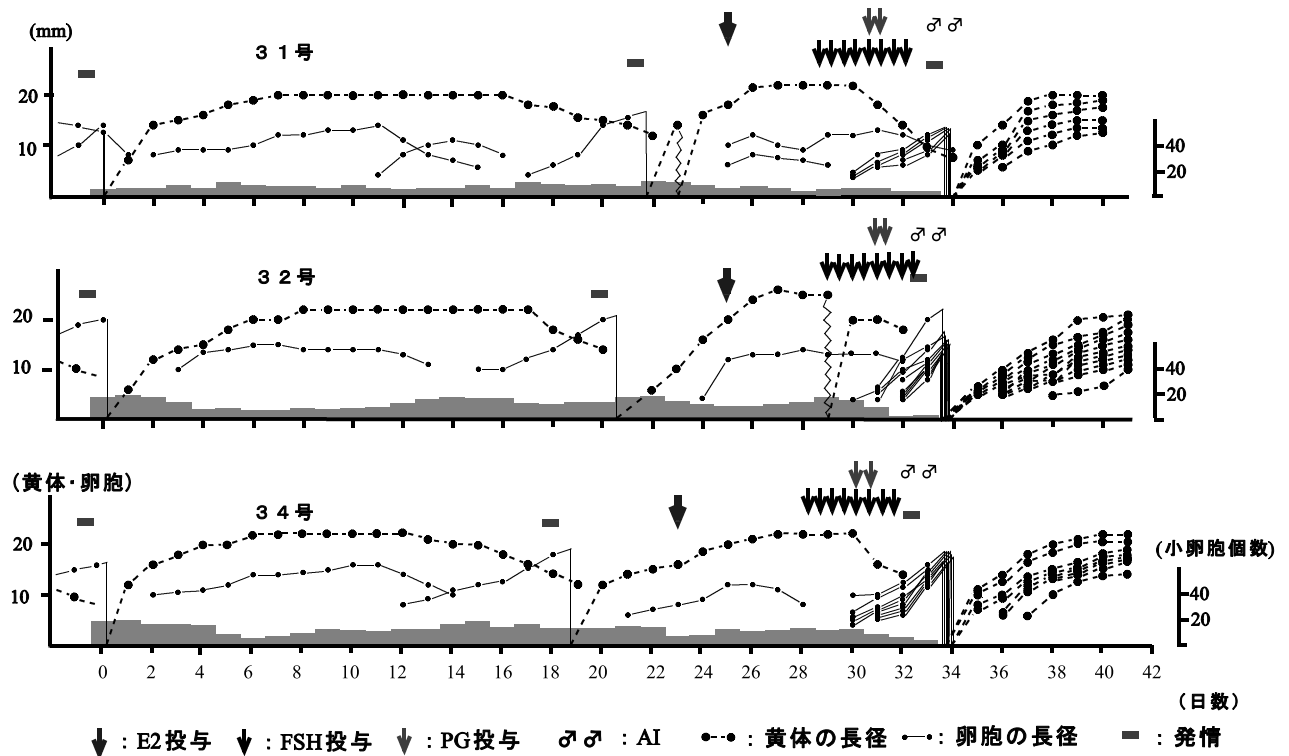


図2 対照区：過剰排卵処理前後の卵巢における卵胞及び黄体の消長と小卵胞数の推移

表 10 ホルスタイン種体細胞クローン育成牛及び同居育成牛に対する過剰排卵処理成績

| 区 | | 小 卵 胞 数 | | | 平 均 黄体数 | 平 均 回収胚数 |
|-------|-----|------------|------------|------------|------------|-------------|
| | | 前周期平均 | E 投与時 | 処置開始時 | | |
| クローン牛 | 188 | 26.3 ± 4.6 | 25 | 22 | 11 | 7 |
| | 190 | 18.7 ± 3.5 | 21 | 15 | 8 | 4 |
| | 191 | 16.3 ± 4.1 | 13 | 18 | 9 | 5 |
| 平 均 | 3 | 20.7 ± 6.0 | 19.0 ± 6.1 | 18.0 ± 3.5 | 9.3 ± 1.5 | 5.3 ± 1.5 |
| 同 居 牛 | 31 | 7.2 ± 1.6 | 4 | 4 | 5 | 3 |
| | 32 | 12.9 ± 3.4 | 11 | 18 | 11 | 10 |
| | 34 | 11.9 ± 3.7 | 13 | 11 | 7 | 6 |
| 平 均 | 3 | 10.6 ± 3.9 | 9.3 ± 4.7 | 11.0 ± 7.0 | 7.6 ± 3.0 | 6.3 ± 3.5 |

表 11 体細胞クローン育成牛及びドナー牛由来産子の生産状況

| 牛 | 過剰排卵処理回数 | 採取胚数 | 移植頭数 | 産子数 (♂:♀) | 産子体重 (kg) |
|------|----------|------|------|-----------|----------------|
| ドナー牛 | 4 | 31 | 11 | 4(2:2) | 50, 44, 38, 36 |
| 188 | 1 | 7 | 5 | 2(0:2) | 35, 28 |
| 190 | 1 | 4 | 0 | 1*(0:1) | 22 |
| 191 | 1 | 5 | 0 | 1*(1:0) | 38 |

*: 本牛の AI 産子

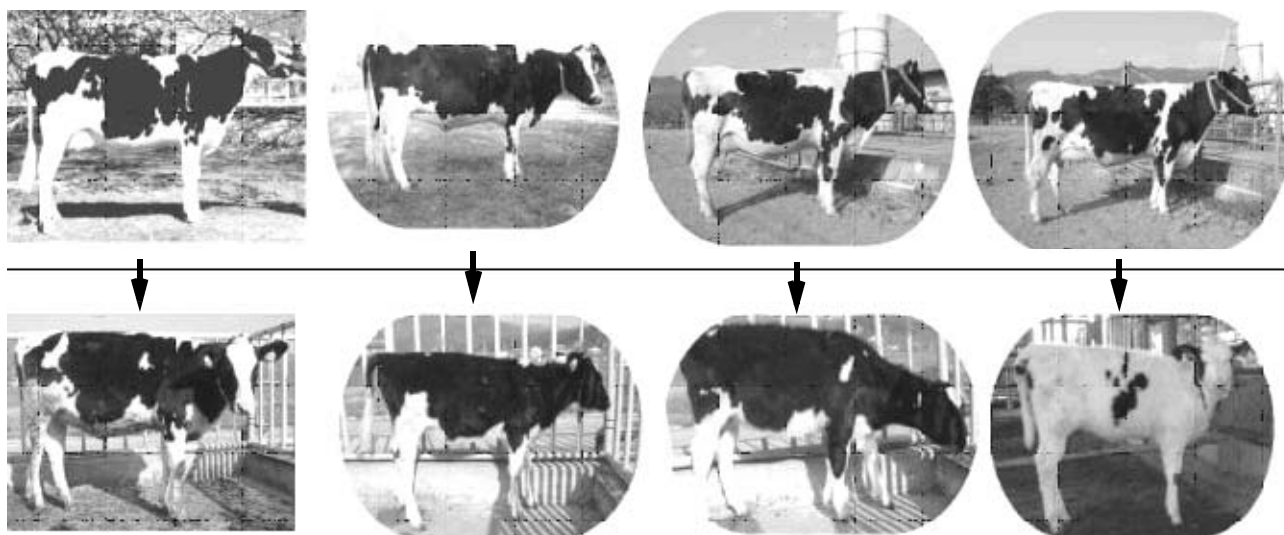


図 3 ドナー牛 (上段左) とクローン牛 3 頭及び各々の後代牛 (下段)

4 考 察

今回試験に用いた体細胞クローン牛 3 頭は同じドナー牛から経膈採卵装置により採取した卵丘細

胞を継代培養して得た細胞をドナー細胞として作出した 3 頭であった。同時期に誕生した体細胞クローン牛は合計 6 頭であるが、3 頭は死産及び生後直死で死亡し、実質性甲状腺腫等の異常が認めら

れている¹⁾。しかし、生存産子として誕生した3頭の哺育・育成期間の発育状況は、一般同居牛と比較しても特別に異常は認められなかった。

牛の発情周期中では一群の卵胞が発育する卵胞波が2～3回出現し、それぞれの卵胞波では1個の主席卵胞が発育してくる^{3, 4, 5)}。周排卵期における卵巢動態を超音波診断装置を用いて観察した結果、供試牛全頭で排卵後黄体の形成に伴い、主席卵胞の発育が観察され、主席卵胞の発育する直前に小卵胞数が増加する傾向が試験区対照区双方で観察され、クローン牛の周排卵期における卵巢動態は人工授精由来牛と同様に正常であったといえる。

過剰排卵処理周期において主席卵胞の発育を抑制することを目的にエストラジオール製剤を投与したところ、両区においてその発育は抑制され過剰排卵処理前周期の主席卵胞と比較してその大きさは各個体毎に小さくなり、過剰排卵処理により主席卵胞が排卵に至ることはなかった。ホルモンのフィードバック作用により内因性のFSHの分泌が抑制されたためと考えられ、この現象は両区において共通して観察された。

小卵胞数は両区ともに個体間のばらつきが大きいものの試験区では平均16個以上と卵巢における小卵胞数は多く特別に少ない個体は認められず、斉一性はある程度あるように考えられたが、対照区では少ないものでは数個の単位で推移し多い個体との差が顕著であった。

卵巢に存在する小型(3～6mm)の卵胞数と過剰排卵反応には正の相関関係が報告されている^{6, 7)}。今回の採卵結果では、両区において小卵胞数に差はみられたものの推定黄体数、回収胚数に顕著な差はなかった。卵巢に存在する小卵胞のなかでも退行過程にあるものや発育中のものど様々な卵胞があると考えられる。また、今回の試験では過剰排卵処理の時期を全頭同じ季節にそろえることができなかつたため、推定黄体数と小卵胞数との間に相関関係は見いだせなかつた。

得られた、胚の一部についてPCR法による性別を実施した結果、雄雌の比率は1:1であった。また、5個のクローン牛由来胚を移植したところ2頭で妊娠が確認され、28, 35kgの後代牛が誕生し、クローン牛本牛2頭も過剰排卵処理後の人工授精により妊娠し、各々22, 38kgの後代牛を分娩した。4頭の後代牛ではあるが、いずれの産子も正常妊娠期間を経た後に生存産子として誕生し、後代牛の中には流死産あるいは生後直死、過大子として誕生してくる傾向はみられなかった。また、クローン牛生産で懸念される羊膜水腫等の症状を示す受胎牛もみられなかった。

受精の過程が無い体細胞クローン胚の生産では通常の胚発生に伴うゲノムのメチル化状態の低下はみられず高いメチル化状態が維持され、その後の産子の正常性に関係する重要な要因になると考えられる⁸⁾。しかし、正常に誕生し発育した体細胞クローン牛から、採卵して得た体内受精由来胚では、後代牛が正常に誕生したことから、体細胞クローン牛生産にみられる遺伝子発現異常は、後代牛の生産においては無いものと予想された。

以上のことから、当研究所において生存産子として誕生し正常に発育した体細胞クローン3頭は一般牛と同様に過剰排卵処理で体内受精卵の回収が可能であり、得られた胚を移植することで後代牛を安定生産できることが実証された。今後は体細胞クローン後代牛の生産能力について実証していく予定である。

文 献

- 1) 笠井裕明、福見善之、後藤充宏 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 徳島県立農林水産総合技術センター畜産研究所報告(2001)1:6～11
- 2) 農林水産省農林水産技術会議事務局編 日本標準飼料成分表. 1995年版. 中央畜産会. 東京(1995)
- 3) Kaneko H, Terada T, Taya K, Watanabe G, Sasa-

- moto S,Hasegawa Y,Igarashi M.Ovarian follicular dynamics and concentrations of oestradiol $1-17\beta$, progesterone,luteinizing hormone and follicle stimulating hormone during the periovulatory phase of the oestrous cycle in the cow.Reprod Fertil Dev 1991;3:529 ~ 535
- 4) Savio JD,Keenan L,Turzillo AM,Lavoir M.Pattertn of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers.J Reprod Fertil 1988;83:663 ~ 671.
- 5) 小林修一, 生水誠一, 河部恭一, 高岸実, 加藤武市, 福井幸昌, 内海恭三. 牛発情周期における卵胞動態の超音波画像診断装置による解析と過剰排卵反応. 日畜学報 1997;68(1):45 ~ 53.
- 6) Romeo A,Albert J,Brink Z,Seidel Jr GE.Numbers of small follicles in ovaries affect superovulation response in cattle.Theriogenology 1991;3:265 (abstract)
- 7) Van der Schans A, Van der Westerlaken LAJ, de Wit AAC,Eyestone WH,de Boer HA.Ultrasound-guided transvaginal collection of oocytes in cow.Theriogenology 1991;35:288 (abstract)
- 8) Kang YK,Yeo S,Kim SH,Koo DB,Park JS,Wee G,Han JS,Oh KB,Lee KK,Han YM.Precise recapitulation of methylation change in early cloned embryos.Mol Reprod Dev. 2003;66: ~ 37