

ホルスタイン種受精卵クローン牛 2 頭 (一卵性双子)の発育・泌乳状況調査

笠井 裕明, 福見 善之, 後藤 充宏*, 渡辺 裕恭, 片山 正敏**, 立川 進

要 約

受精卵クローン技術により生産した双子のホルスタイン種乳用雌牛についてその育成・泌乳状況を調査した。育成期間は日本飼養標準に基づく同一飼料給与により2頭ともにホルスタイン種標準発育値よりも高く良好な発育を示した。また、305日間の泌乳検定成績ではクローン牛間で549kgの差を認め、AIによる全姉妹2組よりも差が大きかったが、ドナー胚提供牛より良好な泌乳成績を示した。また、体型審査及び体測値においては乳用牛の特質に差が認められたがその他の形質ではAIによる全姉妹と同様に相似性は高かった。

1 目 的

受精卵をドナー核に用いた核移植技術により受精卵クローン牛の安定生産が可能となりつつあり、肉用牛では斉一性のとれた枝肉成績が実証され、実用化段階にある^{1, 2, 3)}。乳牛では生産物の表示段階で分別して集乳・販売することが難しく、現時点で乳用受精卵クローン牛を直接農家が管理するのは困難であるが、研究段階においてはその受精卵クローン技術により誕生する一卵性多子の相似性について、実用性を実証しておく必要がある⁴⁾。そこで、今回、我々は受精卵クローン技術により生産した一卵性双子のホルスタイン種乳用牛について最小単位ながら、日本飼養標準に基づく飼料給与を行い、その発育性及び泌乳成績等を調査し若干の知見を得たので報告する。

2 方 法

(1) クローン牛の生産

ドナー胚の生産は当所の常法により実施して、過剰排卵処理後4日目に回収したホルスタイン種経産牛の桑実期体内受精由来胚を用いた⁵⁾。

核移植には食肉センターから持ち帰った廃棄予定牛卵巣に存在する直径2mm前後の卵胞から採取

した卵子-卵丘細胞複合体を10%牛胎子血清(FCS)添加199培地でおよそ22時間成熟培養させ、卵丘細胞除去後第一極体を放出した卵子より押し出し法により除核を行い、カルシウムイオノフォアにより活性化誘起した後、シクロヘキシミドを用いおよそ4~5時間活性化処理したものをレシピエント卵子としてドナー細胞と電気的に融合させた。融合後は3mg/ml牛血清アルブミン添加CR1aaで48時間、38.5℃で低酸素培養(5%CO₂-5%O₂-90%N₂)した後に同一条件で移植時まで5%FCS添加CR1aaで培養し、融合から144時間目に胚盤胞期に達した胚を受胎牛に移植した。

(2) 育成試験

クローン牛の育成期間中における発育状況を把握するため、日本飼養標準⁶⁾に基づく同一飼料給与によってその発育状況を比較検討した。

哺育期間は誕生から3日間は初乳、45日目まで代用乳、3カ月齢時まで人工乳で哺育した。育成期間は12カ月齢時までは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頭で群飼した(表3)。なお、給与飼料成分の構成について日本標準飼料

* 徳島県畜産課, ** 徳島県産業廃棄物対策室

成分表 (1995 年版)⁷⁾ の値を基に設計した。体重・体格及び飼料摂取量は生後 3 カ月より毎月定期的に測定し、日本飼養標準におけるホルスタイン種育成雌牛の標準発育値⁸⁾を基準にしてその値を比較した。

表 1 核移植成績

核移植数	融合数 (%)	胚盤胞期胚数 (%)
17	14 (82.4)	5 (29.4)

表 2 受精卵クローン牛生産状況

受胚牛	移植胚数	妊娠	妊娠期間	産子	生時体重	備考
1	2	-) 双子 38kg
2	2	+	278	2	35kg	



写真 1 受精卵クローン牛 2 頭と受胚牛

表 1 哺育・育成期間給与飼料

哺育期間 (0 ~ 90 日目)	給 与
0 ~ 3 日 :	初 乳
4 ~ 45 日 :	代用乳 + 乾草
46 ~ 90 日 :	人工乳 + 乾草
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) 泌乳能力調査及び体型審査

クローン牛はドナー牛と同様に生後 19 ヶ月齢で人工授精により妊娠させ、分娩後は TDN71.9,

CP15.9, CFib(粗繊維)17.9%成分の飼料(表4)を TMR 給与し、2 回/日搾乳で分娩後泌乳開始日より、毎月 1 回定期的に測定した乳量から WOOD 曲線⁹⁾を用いて分娩後 305 日間の推定乳量を計算する牛群検定事業に登録し、検定成績と補正値を調査し、人工授精と受精卵移植により誕生したクローン牛とは系統の異なる 2 組の全姉妹との間で泌乳能力と一般外貌の相似性についてはホルスタイン種登録協会体型審査員の審査成績から比較を行った。

(4) 過剰排卵処理

泌乳検定期間中に、FSH 製剤(アントリン:36AU)を用いた過剰排卵処理を当研究所の慣行に従い実施し、その採卵成績を比較検討した。

表 2 泌乳期給与飼料(コンプリートフィーディング)

スーダン乾草	: 17.9%	大豆粕	: 3.8%
エンバク乾草	: 4.3%	綿 実	: 2.2%
アルファ乾草	: 8.9%	TDN	: 71.9%
乳 配	: 42.8%	CP	: 16.1%
ビートパルプ	: 17.8%	CFib	: 17.9%
圧ペン麦	: 2.3%	ADF	: 19.8%
		NDF	: 34.8%

3 結 果

(1) 受精卵クローン牛の生産

ホルスタイン種経産牛より採取した桑実期胚 1 個から 5 個のクローン胚を作出した(表 1)。この内 4 個を 2 頭のホルスタイン未経産牛に 2 胚ずつ移植した、1 頭が 278 日目に 35.0kg(165 号)と 38.0kg(166 号)の双子の雌産子を分娩した(表 2, 写真 1)。

(2) 受精卵クローン牛の育成調査

試験期間中供試牛は要求量に対し十分な栄養摂取水準で推移し、12 カ月齢時の体重及び体高は 165, 166 号ともに各々 353kg, 376kg 及び 130.0cm, 131.4cm に発育し、ホルスタイン雌育成牛の人工授精適期体重・体格へ生後 12 カ月齢時には到達し、2 頭の間には顕著な差は認められなかったが、

166号が体重でやや重い傾向を示した(図1, 2)。

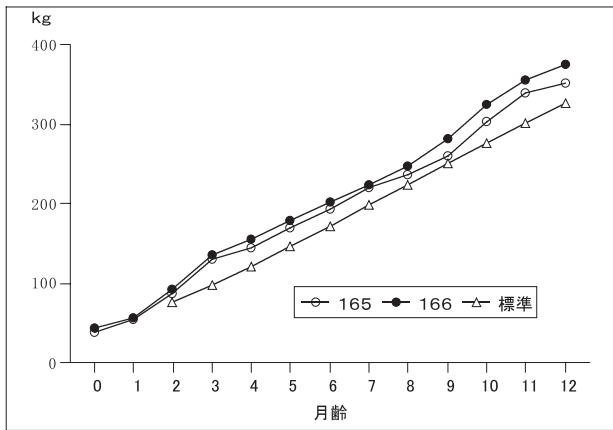


図1 クローン牛の体重の推移

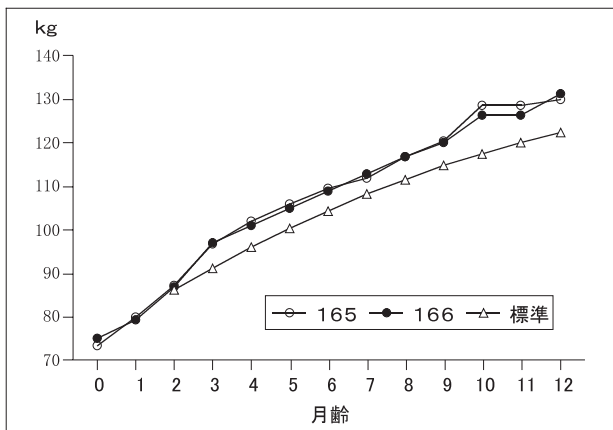


図2 クローン牛の体高の推移

(3) 繁殖状況

生後19カ月齢で人工授精した結果、2頭とも妊娠し、各々275日目及び277日目に47kgの雌産子をそれぞれ自然分娩した(表5, 写真2)。

(4) 泌乳状況調査

受精卵クローン牛の泌乳開始から305日間の乳量の検定数値(補正值), 乳脂率, 乳蛋白率, 無



写真2 受精卵クローン牛2頭と各々の後代牛

表5 受精卵クローン牛繁殖状況

牛番号	受胎月齢	妊娠期間	分娩年月日	分娩産子	
				性	体重
165	19	277	H12. 8. 11	♀	47kg
166	19	275	H12. 8. 10	♀	47kg
6	14		H10. 7. 21	♀	
7	17		H10. 9. 22	♀	
10	17		H11. 2. 12	♀	
11	17		H11. 2. 21	♂	

脂固形分率は165号が8,041 kg (10,038 kg), 3.9%, 3.1%, 8.5%, 166号が7,601 (9,489), 3.8, 3.2, 8.8であった。なお、ドナー牛は6,175 (7,639), 3.4, 3.1, 8.6であった(表6, 図3)。

二組の全姉妹では人工授精により誕生した同腹双子(6, 7号)が6,565 kg (8,109 kg), 4.3 kg, 3.6 kg, 9.1 kg 及び6,590 (8,418), 4.1, 3.5, 9.0, 受精卵移植により誕生した全姉妹(10, 11号)が7,569 (8,691), 3.8, 3.3, 8.1及び7,731 (8,913), 4.1, 3.4, 8.9であった。なお、受精卵クローン牛のドナー牛は6,175 (7,601), 3.4, 3.1, 8.6であった(表6)。

(5) 体型審査結果

体型審査の結果、決定得点及び各部の得点で受精卵クローン牛2頭の決定得点に3点の差が認められた。特に乳用牛の特質においては差が大きかった。なお、体型審査受審時における体格測定各部の測定値には、顕著な差は認められなかった(表7, 8, 9)。

(6) 過剰排卵処理成績

検定実施期間中に行った過剰排卵処理では泌乳量が多かった165号の採卵成績は低く、乳量の少なかった166号は1回あたりの4.3個の正常胚回収率であった(表10)。

4 考 察

受精卵クローン技術によって誕生した2頭は同腹双子であり、成長、分娩の時期はほぼ同じであった。また、育成段階においては同一の育成牛

表 6 受精卵クローン牛の泌乳能力

組	牛番号	乳量 (kg)	補正值 (kg)	平均 (kg/日)	乳脂肪 (%)	乳蛋白 (%)	無脂固形 (%)	備考
1	165	8,041	10,038	26.4	3.9	3.1	8.5	核移植に
	166	7,601	9,489	24.9	3.8	3.2	8.8	よる双子
	ドナー	6,175	7,639	20.2	3.4	3.1	8.6	
2	6	6,565	8,109	20.9	4.3	3.6	9.1	AIによ
	7	6,590	8,418	20.8	4.1	3.5	9.0	る双子
3	10	7,569	8,691	22.5	3.8	3.3	8.8	ETによ
	12	7,731	8,913	22.9	4.1	3.4	8.9	る全姉妹

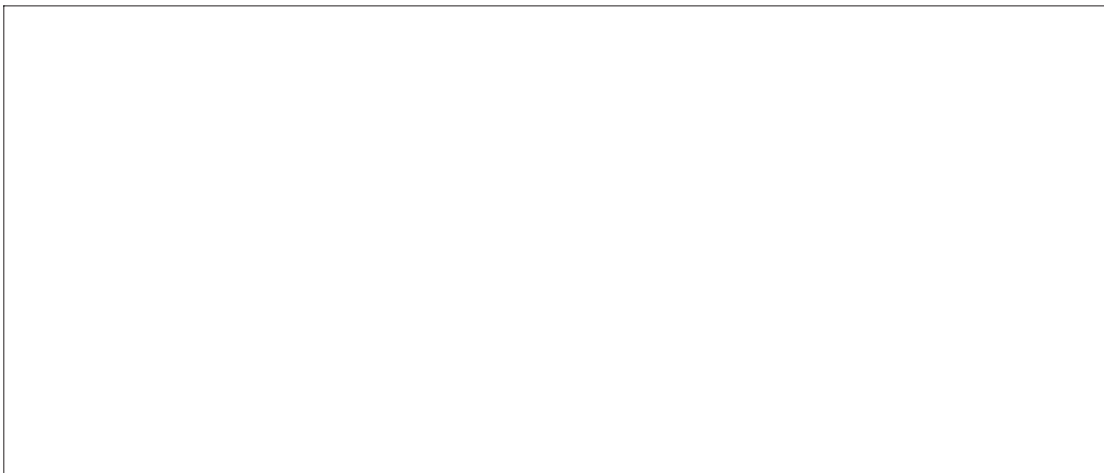


図 3 受精卵クローン牛 2 頭の泌乳状況

表 7 体型審査結果 I (決定得点及び各部得点)

牛	審査年齢	産次	一般外貌	肢蹄	特質	体積	乳器	決定得点
165	3-03	初	82	76	81	82	80	80
166	3-03	初	80	76	72	83	77	77
6	2-06	初	82	79	84	82	80	81
7	2-00	初	81	82	83	82	84	83
10	2-07	初	79	81	80	80	80	80
11	2-07	初	81	79	82	81	81	81

舎で 2 頭群飼で管理し、同一飼料の給与により管理したため、体高体重ともにホルスタイン種育成雌牛の平均値を上回り良好な発育状況を示した。相似性においては、体高の測定値は近い値で推移したが、体重では、分娩時の生時体重が 3kg 重かった 166 号が 165 号よりも若干大きな値で推移した。

同一ドナー胚由来の双子ではあるものの、レシピエント卵子については食肉センター由来卵巣から無作為に出して融合させたため同一牛由来でないこと考えられ、細胞質の影響で体重に差がでたことも考えられるが今後ミトコンドリア等を解析して検討を図りたい。繁殖成績では、ともに、人工

表 8 体型審査結果Ⅱ（線形形質）

牛	決定 得点	外 貌				尻		肢 蹄			乳 房				乳頭		
		高 さ	強 さ	深 さ	鋭 角	角 度	幅	側 望	後 望	蹄 角	前 付	後 高	後 幅	懸 垂	深 さ	配 置	長 さ
165	80	7	6	6	5	6	5	6	8	7	5	7	5	9	7	6	3
166	77	8	6	6	3	5	5	5	6	7	7	6	6	3	7	4	5
6	81	9	5	6	6	6	4	5	4	5	7	7	5	6	7	5	5
7	83	9	6	6	8	4	7	5	9	4	8	9	5	5	8	4	5
10	81	4	6	6	7	5	4	6	5	5	7	7	4	6	7	5	2
11	80	5	5	6	6	4	5	5	5	6	7	7	5	7	8	6	2

表 9 体型審査時体側値

牛	体高	体長	尻長	胸深	胸囲	腰角幅	寛幅	管囲
165	141.8	168.0	55.8	77.8	199.0	57.6	50.2	19.0
166	140.6	163.4	56.2	77.6	204.0	57.2	52.6	19.5
6	148.4	165.0	53.5	79.2	201.0	54.1	51.8	20.0
7	150.6	167.1	52.0	78.4	195.0	52.6	50.8	19.6
10	137.0	159.0	52.4	72.9	183.0	54.4	50.4	17.5
11	135.0	167.6	51.9	71.0	181.0	51.8	48.2	18.0

表 10 受精卵クローン牛及びドナー牛の採卵成績

牛 番号	補正乳量 (kg/産)	体型得点 (特質)	採卵 回数	総回収胚数 (個/回)	分割胚数 (個/回)	胚盤胞期胚数 (個/回)	Aランク (個/回)	Bランク (個/回)
165	10,038	81	3	5(1.7)	4(1.3)	4(1.3)	4(1.3)	0(0)
166	9,489	72	3	16(5.3)	13(4.3)	13(4.3)	13(4.3)	0(0)
ドナー	7,639		3	32(10.7)	25(8.3)	23(7.7)	23(7.7)	0(0)

授精によって妊娠させることに成功し、妊娠に至るまでの受精回数も2回ずつであった。また、妊娠期間も正常値の範囲内であり、産子の体重はともに47kgであった。2頭の受精卵クローン牛の繁殖性は正常であるといえる。

泌乳状況調査では牛群検定数値より補正值で549kg/305日の差が認められた。他の双子では309kg/305日及び222kg/305日で小さく、受精卵クローン牛の泌乳成績の相似性は一般の全姉妹と比べ低かった。育成期間体重の低かった165号が日

乳量で1.5kg多く泌乳し乳用牛としての特質に優れており、逆に166号は日乳量が少なかった代わりに体重の増加は165号より大きく、泌乳末期に受けた体型審査において特質で9点の差を生む結果となった。なお、2頭の受精卵クローン牛はドナー牛との比較においては乳量の改良が進み、いずれも泌乳量の増加がはかれている。

体型審査時における体高、体調等の各部体側値では2頭に極端な差は認められなかったもので、一般外貌の得点も81、79点と2点の差であった

が、ボディコンディションスコア (B.C.S) では 165 号が 3.25, 166 号が 3.5 であったことから、泌乳量が劣っていた 166 号の BCS は大きく、乳牛としての特質は劣っており、決定得点において 3 点の差の原因になったと考えられる。

採卵成績では、乳用牛の特質に優れていた 165 号が 166 号に比べ回収胚数が少なく、逆に 166 号では安定した回収胚率であった。採卵は 2 頭同時に 3 回実施した。泌乳量が少なく、泌乳によるストレスが低かったため 166 号の成績が高かったと考えられる。

以上のことから、当研究所で生産した受精卵クローン技術による一卵性双子は、改良の効果により、ドナー牛よりも高能力であったが、双子間での相似性は、一般の全姉妹牛間よりもやや低く、特に、乳用牛としての特質に差が認められ、泌乳能力の差に関係する栄養状態の違いが採卵成績に対しても差を及ぼしたと考えられる。また、体型審査から、一般外貌の相似性は他の全姉妹間同様に高かった。今後は、核移植に用いるレシピエント卵子の表現形質に対する効果について検討を重ねる予定である。

参考文献

- 1) 古沢剛, 西村隆光, 水原孝之, 三宅俊三 受精卵クローン肥育牛の相似性 山口県畜産試験場研究報告 (2002) 17: 1 ~ 9.
- 2) 撫年浩 核移植クローン牛の肥育成績 肉用牛高度肥育技術推進事業平成 10 年度報告書: 6 ~ 8
- 3) 森安悟, 澤井健, 平山博樹, 陰山総一, 北野則泰, 堀川盟夫, 玉田学, 南橋昭 北海道における核移植技術の利用 国際シンポジウムクローン家畜とその安全性ポスター成果選 2003: 27 ~ 33
- 4) 家畜受精卵移植技術研究組合 農林水産業・食品産業等先端産業技術開発事業「体細胞等を利用したクローン家畜生産技術の開発」平成 14 年度研究開発報告書 105 ~ 118.
- 5) 笠井裕明, 刈谷亮介, 後藤充宏 牛核移植におけるドナー胚の最適利用ステージの検討 徳島県畜産試験場研究報告 (1998) 39: 1 ~ 5.
- 6) 農林水産省農林水産技術会議事務局編 日本飼養標準. 1999 年版. 中央畜産会. 東京 (1999)
- 7) 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)
- 8) ホルスタイン種雌牛の標準発育値 (社)日本ホルスタイン登録協会 平成 7 年 11 月 (1995)
- 9) Wood, P.D.P. 1969. Factors affecting the shape of the lactation curve in cattle. *Anima. Prod.* 11: 307 ~ 316