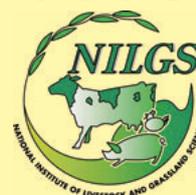


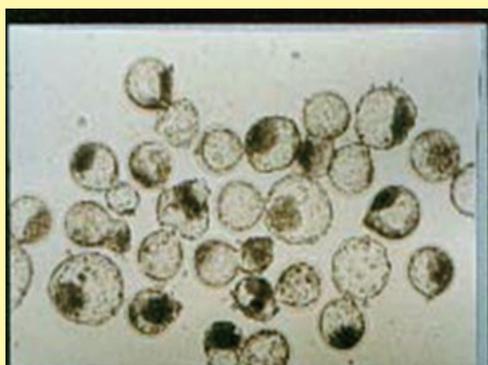
畜産草地研究所
技術リポート8号

ISSN 1347-2712



体細胞クローン牛生産のための 周産期と新生子管理のマニュアル

新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業
「産業利用に向けた体細胞クローン牛に関する技術開発と調査」の成果を中心に



2010年3月

農研機構 畜産草地研究所

【表紙の説明】

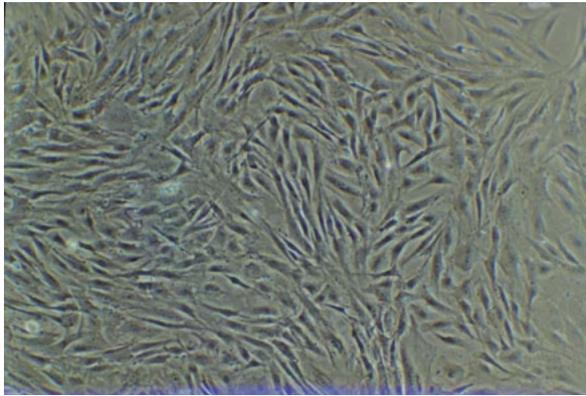
左上：脱出胚盤胞期の体細胞クローン牛胚

右上：娩出直後の体細胞クローン子牛に対する臍帯の結紮処置

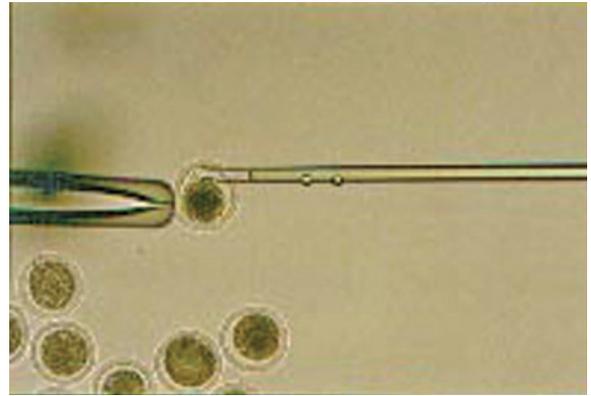
左下：娩出直後の体細胞クローン子牛に対する初乳の給与

右下：同じドナー牛より生産されたホルスタイン種の体細胞クローン雌牛
(鹿児島県肉用牛改良研究所)

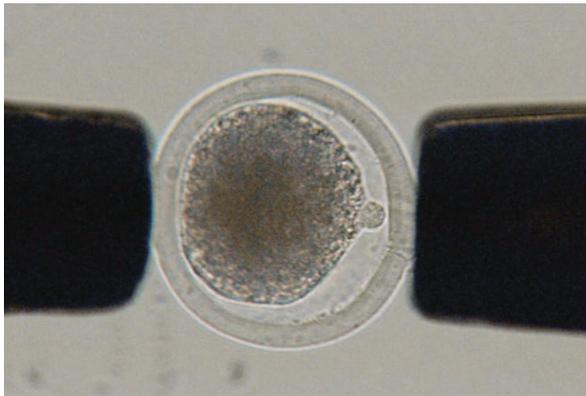
この資料は、新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業「産業利用に向けた体細胞クローン牛に関する技術開発と調査（課題番号：1602）」（2004～2008年）により得られた知見を基にまとめたものである。



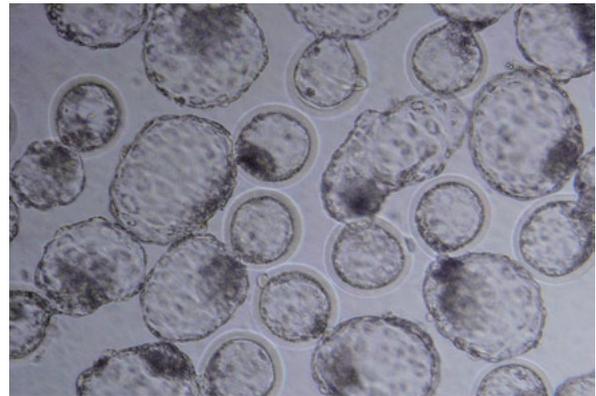
ドナー細胞（牛の皮膚線維芽細胞）



除核した牛卵子へのドナー細胞の挿入



電気刺激のため電極の間に挟み込んだ
体細胞が挿入された除核卵子



発育した牛の体細胞クローン胚
（脱出胚盤胞期）



体細胞クローン技術による名牛「神高福号」(中央)の複製牛(手前4頭)



同じドナー牛より生産したホルスタイン種の雌牛



ドナー牛(奥)、体細胞クローン牛(中)およびリクローン牛(手前)

(鹿児島県肉用牛改良研究所)

技術レポート 8号
体細胞クローン牛生産のための周産期と新生子管理のマニュアル
の刊行にあたって

畜産草地研究所では、「新たな農林水産政策を推進する実用開発事業」において「産業利用に向けた体細胞クローン牛に関する技術開発と調査（課題番号：1602、平成16～20年度）」を中核機関として受託し、「体細胞クローン種畜を作出する際の子牛生産効率の改善」や「体細胞クローン牛やその後代牛の健全性やこれら動物に由来する乳肉の生産物性状の調査」に関する研究に取り組んできた。

得られた成果については、学术论文はもとより、「体細胞クローン牛・後代牛の健全性ならびに生産物性状に関する国内調査報告書（平成20年3月）」などの各種報告書としても公表してきたところである。さらに、今回、本レポートにおいて、体細胞クローン牛を妊娠している母牛の周産期管理と新生子牛管理に関するノウハウをマニュアルとして公表することとした。ここで解説している内容は世界的にも数少ない貴重な技術情報である。

このマニュアルを作成するために用いたデータの多くは、鹿児島県肉用牛改良研究所が担当した上記事業の小課題「体細胞クローン牛における分娩・新生子管理技術の開発（平成16～18年度）」、「母牛および新生子の適正管理による体細胞クローン子牛の生産効率の改善（平成19～20年度）」で得られたものである。同研究所は、体細胞クローン種雄牛「隼人号」の生産（平成10年）以来、畜産草地研究所と共同研究を実施し、体細胞クローン牛の生産技術には定評があり、極めて困難とされる体細胞クローン牛の臨床的な研究を見事に成し遂げた。そこで得られた成果を、今回、マニュアルとして結実させることができた。

このマニュアルでは、研究によって得られたオリジナルな図表を多く用いて、簡潔な表現を心がけているので、牛のクローン研究をこれから行おうとしている初心者はもちろん、臨床経験が豊富なクローン研究者にとっても有益な技術情報になるものと考えている。このマニュアルが体細胞クローン牛の研究現場で活用されることで、体細胞クローン技術が社会的に受け入れられにくい要因とされている低い生産効率の改善の一助となることを念願している。

平成22年3月

(独) 農業・食品産業技術総合研究機構
畜産草地研究所 所長 松本 光人

目 次

マニュアル

1. 体細胞クローン牛胚の移植により受胎した母牛の管理	
(1) 妊娠初期の管理	1
(2) 妊娠後期の管理	3
(3) 周産期の管理	4
①胎子と母体産道のサイズの調査	
②分娩の予知と監視	
2. 母牛の分娩と新生子牛の管理	
(1) 母牛の分娩管理	8
①誘起分娩処置	
②帝王切開	
(2) 体細胞クローン新生子の管理	13
①一般的処置	
②緊急処置	
(3) 体細胞クローン新生子牛の哺育・育成	19

参考資料

1. 体細胞クローン牛を妊娠している母牛のケアと新生クローン子牛の管理	i
鹿児島大学 窪田 力	
2. 体細胞クローン流・死産牛および胎盤における病理所見	ix
農研機構 動物衛生研究所 佐藤真澄	

付 録

マニュアル

1. 体細胞クローン牛胚の移植により受胎した母牛の管理

(1) 妊娠初期の管理

牛体細胞クローン胚をレシピエント牛（母牛）に移植した場合の受胎率は、一般に通常の胚移植による場合と比較して低い（約 30%）ことが知られている。さらに、体細胞クローン胚の受胎を確認した後も、妊娠期間中を通して流産あるいは早死産が通常の胚を移植した場合に比べて高率に発生する（図 1）。

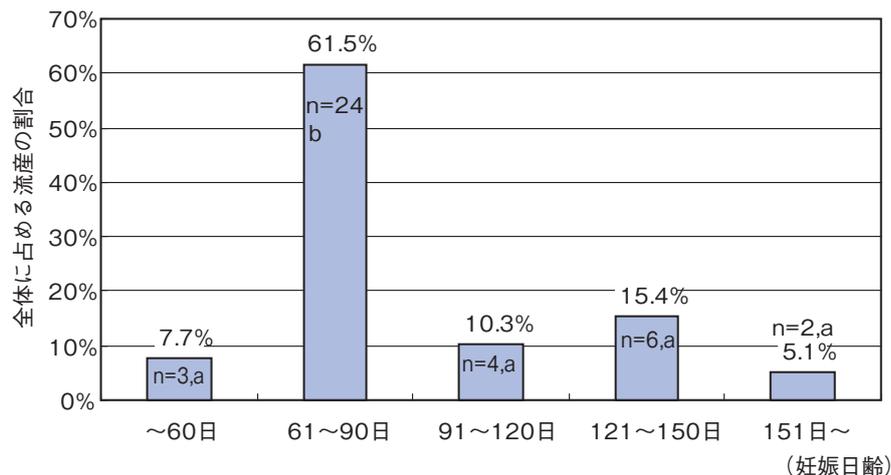


図 1. 体細胞クローン胚の移植における流産の発生時期
(鹿児島県肉用牛改良研究所の事例)
異符号間に有意差 ($P < 0.01$)

流産や早死産（図 2）が多発する原因としては、体細胞クローン胚の発生異常によるもの、胎膜水腫などの妊娠期の異常によるものが考えられている（食品安全委員会、2009）。それらの異常発生を検知するには、妊娠診断時に超音波画像診断装置により子宮腔の大きさ、胎子、胎膜の状態を観察することが有効である。これらの観察は初回の妊娠診断時から分娩に至るまで定期的（毎月）に実施する。



図 2. 胎膜水腫により早死産した体細胞クローン新生子（280 日齢）

超音波画像診断装置を用いた体細胞クローン胎子の体各部位の観察による胎子異常の診断は胎齢40日頃から可能である(図3)。異常胎子の場合は、妊娠中期に至るまでに死滅に至り、流産となることが多い。したがって、胎子に明らかな異常が認められた場合には、母牛に対するリスクを軽減するため、早期にプロスタグランジン F_2a (PGF_2a) の投与による人工的な流産処置をしたほうがよい。

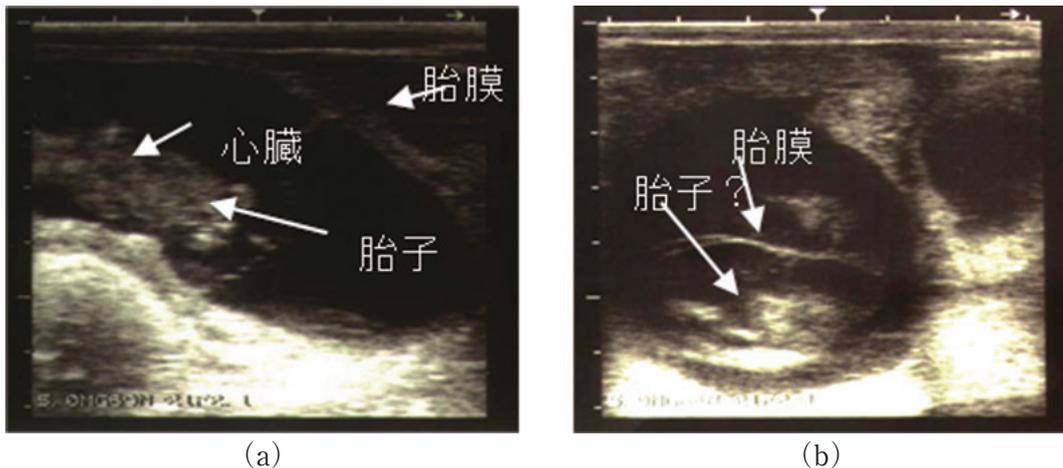


図3. 妊娠60日齢における子宮角の超音波写真

- (a) : 満期まで妊娠が継続した例 (胎子、心臓 (拍動) が確認された)
- (b) : 80日齢で流産した例 (拡張していない胎膜と受胎産物 (胎子?) が確認された)

体細胞クローン胚の移植により受胎した母牛の子宮動脈の血流速度を測定すると、人工授精由来の妊娠時と比べて、各月齢ともに体細胞クローン胎子を妊娠した場合のほうが速い(図4)。しかし、一般に体細胞クローン子牛の生時体重は人工授精由来の子牛に比べて重いため、胎子に大きな異常が認められない場合、子宮動脈血流速度の上昇は胎子のサイズに影響されるものと推測される。

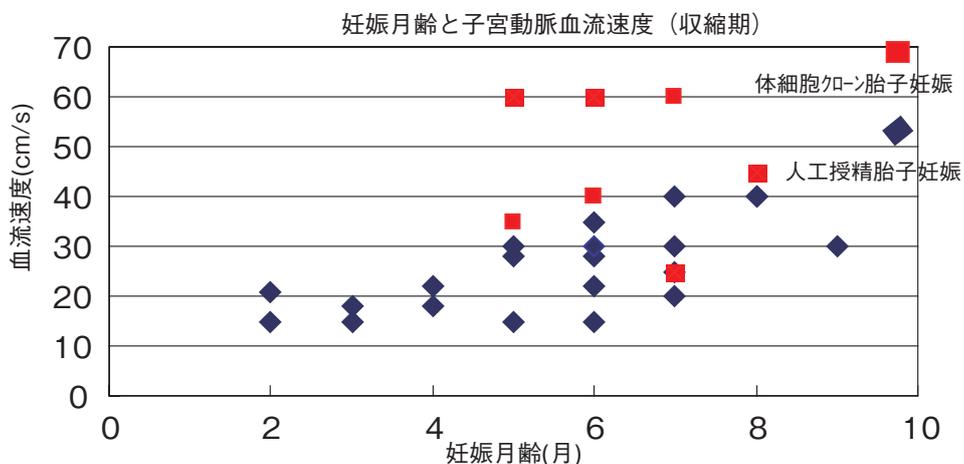


図4. クローン胚移植や人工授精により妊娠した母牛における子宮動脈の血流速度

(2) 妊娠後期の管理

体細胞クローン胎子の妊娠では、妊娠の経過とともに異常が診断できる場合があるので、毎月、母牛を定期的に検査すると同時に、日常の管理には細心の注意を払う。妊娠初期（妊娠90日齢頃まで）には超音波画像診断による胎子の観察が可能であるが、妊娠90日齢以降は胎子が下腹部へ下降するため超音波画像診断が不可能となる。しかし、ドップラー超音波診断装置により、子宮動脈の拍動、速度、血流量から妊娠の継続を確認することができる。なお、母牛の腹囲の異常な増加は胎膜水腫の可能性がある。

牛において、体細胞クローン新生子は人工授精（AI）や受精卵移植（ET）による新生子と比較して生時体重が最大40%程度重くなることが知られている（表1）。したがって、体細胞クローン新生子の死亡を減らすためには、妊娠後期から周産期の管理、とりわけ分娩時の管理が重要である。

表1. 体細胞クローン産子と人工授精および受精卵移植による産子の生時体重

(a) 体細胞クローン牛

品種	性別	n	平均生時体重 (kg)	最小 (kg)	最大 (kg)	平均在胎日数 (日)
黒毛和種	♂	36	38.9	18	62.2	284.2
	♀	6	35.4	27.5	49.3	288.2
ホルスタイン種	♀	7	63.1	50	79	285.1
交雑種	♂	1	57.2			275.0

(b) 人工授精 / 受精卵移植由来牛

品種	性別	n	平均生時体重 (kg)	最小 (kg)	最大 (kg)	平均在胎日数 (日)
黒毛和種	♂	23	31.2	18	39.1	287.7
	♀	13	31.1	20.2	37.9	286.1

(鹿児島県肉用牛改良研究所の事例)

体細胞クローン牛を妊娠している母牛に制限給餌（低栄養）を行っても、体細胞クローン新生子の生時体重の減少はみられなかったが、人工授精による新生子は、母牛の制限給餌によって生時体重が減少する傾向がある（表2）。このことから、体細胞クローンに発生する過大子は、妊娠期間の飼養管理より、胎子側のエピジェネティックな要因が関与していると考えられる（食品安全委員会、2009）。

表2. 妊娠している母牛の制限給餌による子牛の生時体重の変化

		n	非制限区 (kg)	n	制限区 (kg)
体細胞クローン牛 (♂)	clone-A	2	38.7 ± 10.4	2	43.3 ± 5.3
	clone-B	2	38.5 ± 0.7	2	40.0 ± 8.5
	計	4	38.6 ± 6.0	4	41.6 ± 6.1
人工授精由来牛	♂	7	30.0 ± 4.7	1	29.0 ± 0.0
	♀	9	29.9 ± 3.7	2	25.0 ± 1.4
	計	16	29.9 ± 4.0	3	26.3 ± 2.5

(鹿児島県肉用牛改良研究所の事例)

胎膜水腫を発症している母牛では、胎水の異常増加による著しい腹囲増加が妊娠中～後期に認められる。このような母牛においては、妊娠後期からの周産期管理の際、超音波診断に加え、体重、胸囲、腹囲も測定する。そのデータに基づき、母牛の現状を把握すると同時に、状況に応じ、人工流産を検討する。

(3) 周産期の管理

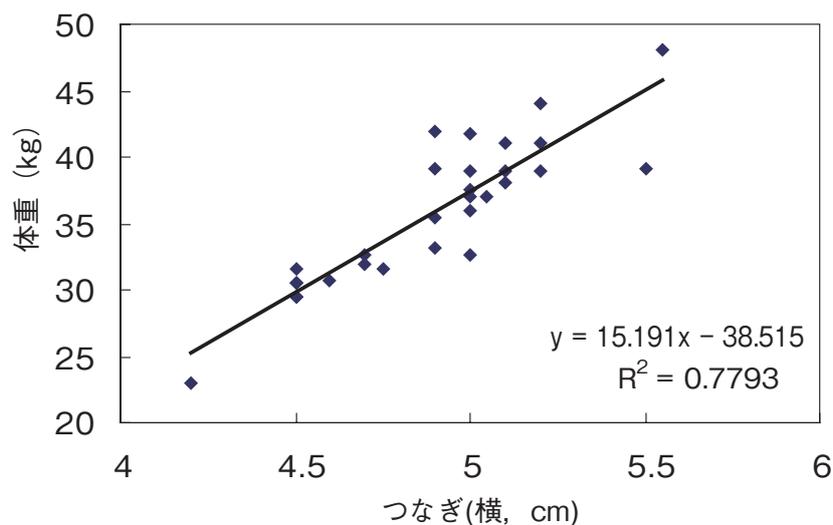
体細胞クローン新生子(胎子)の体重は、人工授精による産子に比べて増加がみられ(表1)、また、妊娠期間が延長する機会が多いことから、分娩予定日の1カ月前から、母牛をよく観察してデータを蓄積し、分娩に備えることが大切である。

① 胎子と母体産道のサイズの調査

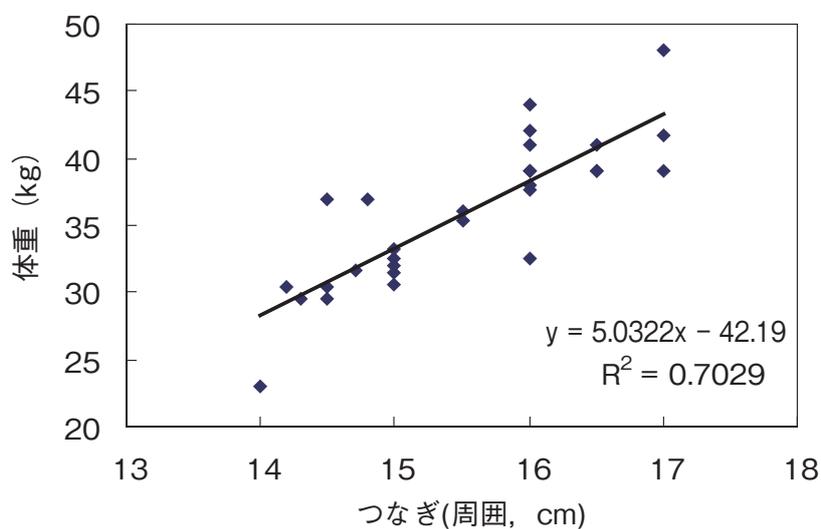
体細胞クローン胎子を妊娠している母牛の周産期管理で最も重要なことは、胎子(産子)の大きさ(サイズ)と母体産道のサイズを把握しておくことである。そのためには、胎子と母体産道のサイズの調査が必要である。産道は骨盤計測(骨盤外計測、骨盤内計測、X線計測)で判定されるが、産業動物臨床の現場では、骨盤内計測を用手内診で行っている。分娩が近づくとつれて産道は弛緩拡大していくので、継続的にサイズを判断する。

胎子の大きさは、母牛の体重や腹囲の増加割合の測定、直腸検査による胎子各部位(蹄、管、鼻鏡の径や長さ)の触診などで推定する。前肢(つなぎ直径とつなぎ周囲長)の大きさと生時体重の相関を図5に示す。このように用手による触診、超音波診断装置により得られた胎子各部位のサイズは生時体重と相関がある。

これらのデータに基づいて、胎子のサイズと母体産道のサイズを比較する。周産期の母牛の経過が順調で推定した胎子サイズに対して母牛産道サイズが胎子の通過に十分であると判断できる場合は、産道を通して胎子を分娩させ、周産期の母牛の経過が悪い(例えば胎水過多、産道が緩まない等の正常な経過でない場合など)、母牛産道サイズが胎子の通過に十分でないと判断される場合は帝王切開術を選択すべきである。



(a) つなぎの直径



(b) つなぎの周囲長

図5. 新生子（生後 24 時間以内）の前肢の大きさと生時体重の関係
（黒毛和種♂、n=29）

② 分娩の予知と監視

分娩を予知するには、直腸温、血中黄体ホルモン濃度、血中グルコース濃度、総白血球数（WBC）、子宮頸管の開口具合が参考となる。直腸温の測定は朝と夕の給餌前の安静時に行う。直近の前回測定時の直腸温から 0.5°C 以上低下を示した場合、約 24 時間後に分娩が開始されることが多い（図 6）。また、黄体ホルモン濃度の低下、血中グルコース濃度と WBC の上昇によっても 24 時間以内に分娩が開始される可能性が大きい。

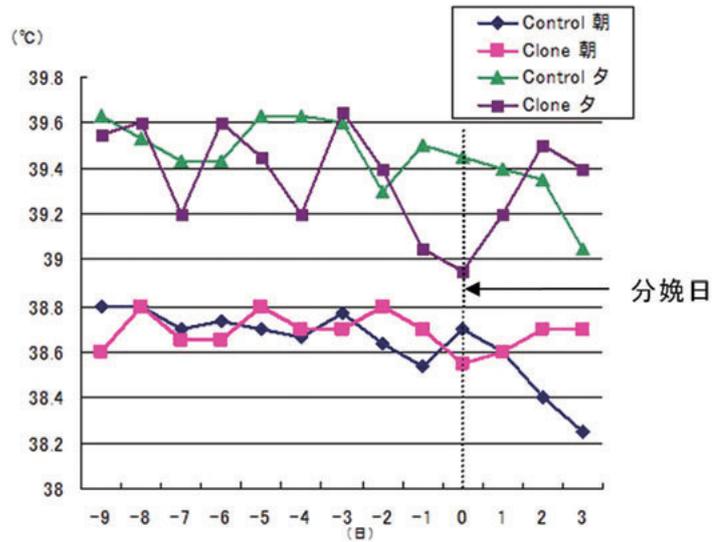


図6. 体細胞クローン胎子を妊娠している母牛における分娩前後の体温変化

一方、産道、特に子宮頸管の開口具合を検査することで、ほぼ正確に分娩開始時刻を予知することができる。一般に、腔内に手を挿入し、手指を伸ばして互いに密着させた状態で、4指が楽に入る程度まで開口すると6時間以内に分娩が始まる（図7）。この検査は、労力や経費もそれほど要しない上、朝夕に実施することで分娩開始の把握が可能であることから推奨される。また、骨盤内の産道の拡大具合の検査とこの検査とを同時に実施できる。



(a)



(b)

(c)

図7. 子宮頸管外口の開口状態の検査

(a)：検査風景、(b)：3指、(c)：4指

さらに、周産期管理を省力的に行うためには、ウェブカメラを活用した監視システム（図8）が有効である。現在では、パソコンや携帯に動画を送るシステム（製品）を活用することで、労力の軽減等を図ることができる。

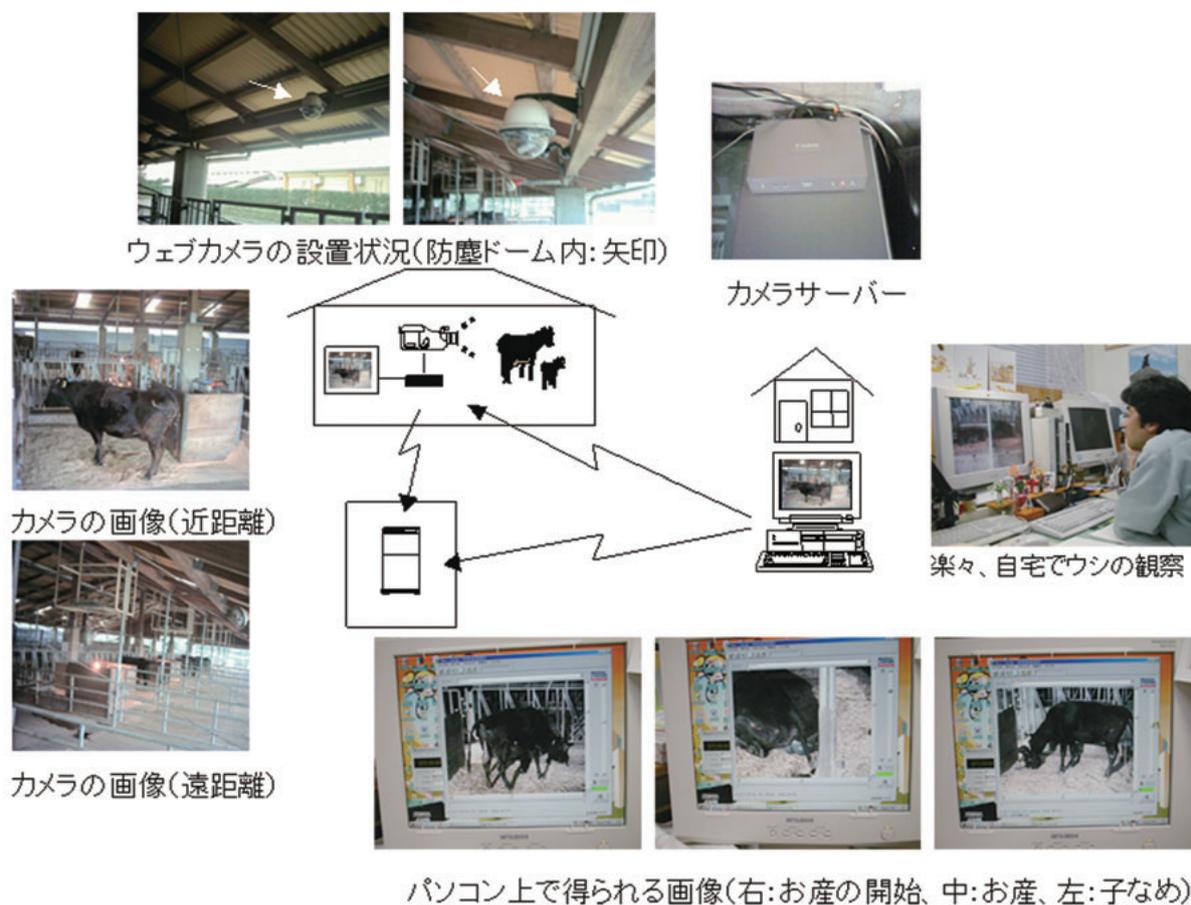


図8. ウェブカメラを用いた分娩監視装置の例

2. 母牛の分娩と新生子牛の管理

(1) 母牛の分娩管理

体細胞クローン胎子妊娠牛の分娩にあたっては、胎子と母牛の産道サイズを比較した結果に基づいて、分娩が始まるまでに経膈分娩または帝王切開を行うかを判断する。なお、同じドナー（細胞）に由来する体細胞クローンでは、生時体重（サイズ）も同様になる傾向がある。

概して、体細胞クローン胎子妊娠牛の妊娠期間は延長することが多く、時には300日を超える長期在胎となる場合もある。妊娠期間の延長は胎子サイズ（体重）の増加をもたらし、難産などの危険性が高くなるので、分娩予定日前に誘起分娩（誘発分娩）処置や長期に延長した場合は帝王切開を行うことが推奨される。

分娩方式の選択肢としては、以下のものがある。

- 1) 誘起分娩処置による経膈分娩
- 2) 無処置の経膈分娩（自然分娩）
- 3) 誘起分娩処置後の帝王切開
- 4) 無処置の帝王切開

これらの中から、妊娠牛や胎子の状態、管理体制などを総合的に勘案して最も安全な分娩が可能と判断される分娩方式を決定する。

分娩が始まり、母牛の産道がさらに開口すると、産道から直接胎子に触れることができるので、胎子の大きさや体位を確認する。胎子が大きすぎる場合や体位が悪い場合には、この時点で経膈分娩を断念し、帝王切開に切り替える。

体細胞クローン産子は出生時に活力が低く、臍帯の収縮が悪いことが多いので、分娩に先立ち、いろいろな状態に対処できるような準備をしておく。分娩時に準備しておきたい器具器材を表3に、また、新生子牛への対応のために準備しておきたい器具器材を表4に示す。帝王切開術を選択した場合、母牛の保定柙場と一般的な外科手術器具器材が必要となる。

表3. 分娩時に準備しておきたい器具器材

	項 目	目 的
1	直腸検査用手袋	胎子、産道の検査
2	直腸検査用ゼリー	胎子、産道の検査、産道の潤滑
3	産科ロープまたはチェーン	胎子の牽引（介助時）
4	産科補助三連滑車等	胎子の牽引（難産介助時）
5	ロープ	胎子牽引等（太さが数種あると便利）
6	タオル	
7	バケツ（お湯）	
	(薬剤)	
1	消毒薬（オスバン等）	器具、外陰部等の消毒
2	エストラジオール製剤	産道の開口
3	プロスタグランジン製剤	陣痛促進
4	オキシトシン製剤	陣痛促進
5	プロサボ	産道の潤滑、異常胎位の整復

表4. 新生子の対応のために準備しておきたい器具器材

	項 目	目 的
1	サッカー	口、気管内胎水の除去
2	酸素吸入器（ボンベ、レギュレーター等）	酸素吸入
3	気管チューブ（8～9.5Fr）	人工呼吸
4	臍帯結紮用ひも（コッフエル等も）	臍帯結紮
5	タオル	胎水拭い
6	聴診器	聴診
7	留置心（24～16G）	血管留置、静脈ラインの確保
8	輸血管・エクステンションチューブ一式	輸血、輸液
9	毛布等	保温
10	布団乾燥機	保温
	(薬剤)	
1	ボスミン	血圧上昇、蘇生
2	ドーパミン	強心、蘇生
3	ドプラム	呼吸促進、蘇生
4	メプチン	気管支拡張
5	デキサメサゾン	浮腫軽減、輸血時ショック防止
6	ミオブロック	筋弛緩（人工呼吸時）
7	輸血パック（400ml）	輸血
8	補液剤（等張リンゲル液）	輸液
9	50%ブドウ糖	輸液
10	重炭酸ナトリウム液	輸液（アシドーシス改善）

① 誘起分娩処置

体細胞クローン胎子の妊娠では、妊娠期間が延長することが多いので、誘起分娩処置を行うことで、胎子サイズの増加を防止し、分娩時の（管理不備による）不作為の事故を防ぐことができる。

通常の分娩では、胎子副腎からの副腎皮質ホルモン分泌が契機となって、母牛での内因性 $\text{PGF}_2\alpha$ の生産、黄体の退行など分娩過程が進行する。そこで、体細胞クローン胎子を妊娠している母牛の誘起分娩では、デキサメサゾンと $\text{PGF}_2\alpha$ の複合投与法を用いる。一般に、 $\text{PGF}_2\alpha$ の投与後 30 時間前後に分娩が開始されるので、十分な管理が可能な時間帯を逆算して誘起分娩処置を実施する。

分娩誘起処置は、子宮頸管の十分な開口が未だ始まっていないタイミングで、分娩の徴候を勘案しながら行う。ただし、子宮頸管が開口していなくても、実際は黄体が退行している場合があり、その際には処置後数時間で分娩が始まる。したがって、分娩誘起処置を行った場合には、処置後から分娩監視を始める。

図 9 のプロトコールでデキサメサゾン 10ml を分娩設定時刻の 54 時間前に投与すると投与後 24 時間以内に黄体が退行し、黄体ホルモン濃度は低濃度となる。また、分娩設定時刻の 30 時間前に $\text{PGF}_2\alpha$ (エストラメイト 1.5ml) を投与することで高率に分娩を誘起できる。しかし、分娩予定日になっても子宮頸管の開口の進捗程度が遅い場合があるので、その際には再度 $\text{PGF}_2\alpha$ を投与する。デキサメサゾンの感作や分娩のストレスが胎子の肺の成熟を促すことが知られていることから、後述する帝王切開を施す際にも誘起分娩処置を行うとよいと考えられる。

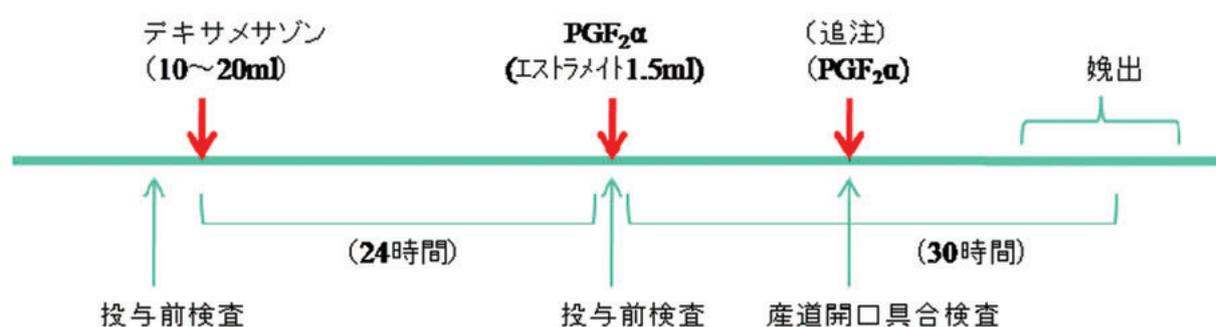
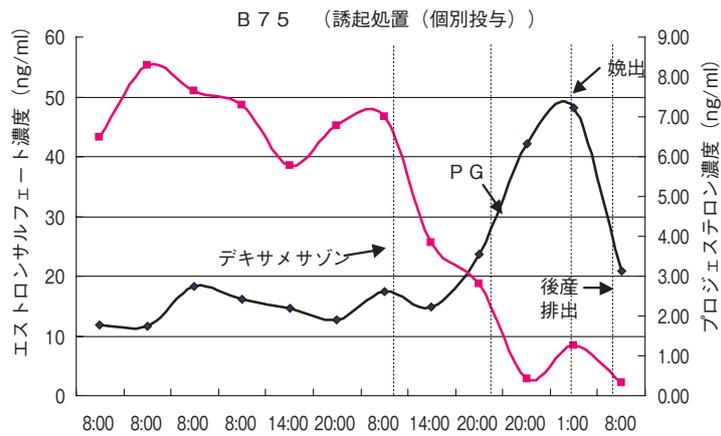


図 9. 個別投与による分娩誘起処置の例

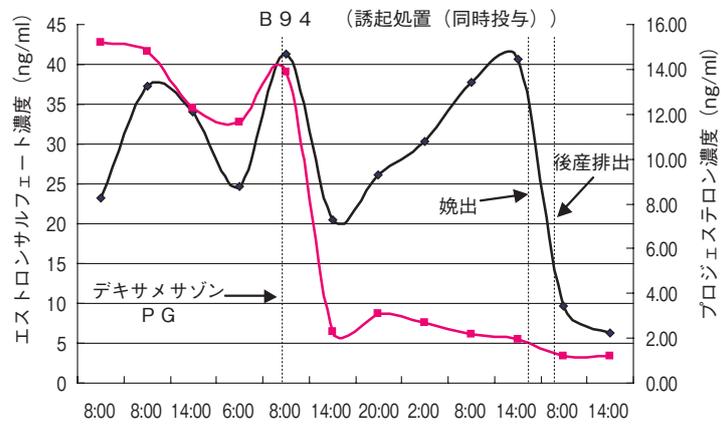
注) 同時投与の場合には娩出予定時間の 30 時間前にデキサメサゾンとプロスタグランジン $\text{F}_2\alpha$ を投与。

また、分娩誘起のために複数の薬剤を使用する場合、これら薬剤を同時に投与する場合がある。人工授精による新生子の場合には、これらの薬剤を同時に投与することが多い。副腎機能が低い（長期在胎の原因とされる）可能性が大きい体細胞クローン胎子の場合、分娩までの経過時間が長い方が母体、胎子ともに分娩への準備ができると期待されることから、デキサメサゾン投与後に一定の時間を置いて $\text{PGF}_2\alpha$ を投与する方法が理論に合致している。

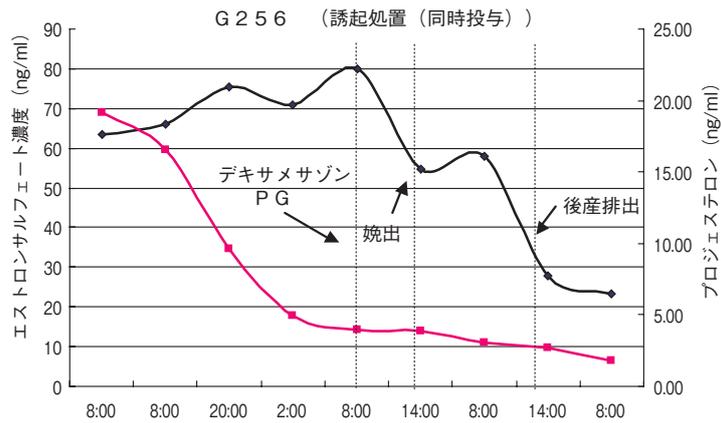
図 10 は誘起分娩処置による $\text{PGF}_2\alpha$ とエストロンサルフェートの分泌動態と娩出や後産排出の時間を調査したデータである。図 10 (a) にはデキサメサゾンと $\text{PGF}_2\alpha$ を個別投与した例を、図 10 (b) にはこれらのホルモン剤を同時投与した例をそれぞれ示す。また、図 10 (c) には、誘起分娩処置時（子宮頸管の十分な開口なし）に黄体が退行していたと考えられる例を示す。この例では処置後数時間で分娩が開始した。



(a) デキサメサゾンと PG を個別投与した例



(b) デキサメサゾンと PG を同時投与した例



(c) 誘起分娩処置時に黄体が退行していたと考えられる例

図 10. 体細胞クローン胎子を妊娠している母牛における誘起分娩処置に伴う血中ステロイドホルモンの動態ならびに分娩

注) ピンクの曲線はプロゲステロンを、また、青色の曲線はエストロンサルフェートをそれぞれ示す。

② 帝王切開

体細胞クローン妊娠牛の帝王切開の手技は一般に行われる場合と内容的に異なることはないが、胎子のサイズが大きいことが多いことを念頭に入れて行う。特に臍部切開では、胎子が大きい場合に、切開部へ胎子の誘導が困難となるか、摘出時に切開部位を拡大させる必要がある。そこで、図11に示すような簡易回転式枡場等を利用した傍正中切開による帝王切開が簡便で優れている。



図 11. 簡易的な回転式枡場による帝王切開

帝王切開術は、キシラジンによる鎮静のみで実施可能である。キシラジンは子宮動脈血流量を低下させるが、これまでに胎子死亡のような事故は起きていない。

以下は、鹿児島県肉用牛改良研究所における左傍正中切開による帝王切開式の手順である。

- 1) 簡易回転式枡場に起立位で保定し、腹帯を2～3本準備する。
- 2) 頸静脈を16G留置針で確保し、キシラジン1.0mlを静注し軽い鎮静をかける。
- 3) 枡場を150度ほど回転させ、斜め仰向けの位置にする（完全な仰臥位よりもやや斜めの方が術者にとって操作が楽である）。
- 4) 臍から乳房までの傍正中を30cm幅で毛剃りし、逆性石けん、イソジン、イソプロピルアルコールで術野を消毒し、術野外をドレープで覆う。
- 5) 2%キシロカイン注20-30mlを切開部の皮下、筋肉内に投与する。
- 6) 臍下15cmほどの部位から乳房前まで左傍正中を切開する。
- 7) 筋層は薄いので容易に腹膜まで達し、腹膜を切開すると膨隆した子宮がみえるので、胎子の頭または前肢を確認する。胎子が産道へ向かっている時（頭位）には、助手は外陰部から手を腔内に挿入し、胎子を子宮内へ押し戻す。
- 8) 胎子の頭または前肢が確保できたら、胎盤部をさけて子宮を切開する。
- 9) 前肢2本のみ確保できた場合は、切開部から手を子宮内に入れて頭を確保し、子宮切開部から頭と前肢2本を子宮外へ出す。
- 10) 8)の状態で再び手を子宮内へ挿入し、臍帯を確認し、臍帯を結紮する。結紮できない場合は、手で臍帯を確保しておく。

- 11) 助手は頭、2本の前肢を持って体軀を子宮外へ引き出す。この時、術者は臍帯を胎子近位側でなく子宮内膜近位側で切断する。
- 12) 新生子を処置する（後述）。
- 13) できる限り胎子付属器官（胎膜、胎水）を子宮外へ排出し、レンベルト2重縫合で子宮を縫合する。
- 14) 腹膜、筋層、皮下織、皮膚の順に縫合する。

なお、母牛における術中の腹圧上昇や覚醒に備えて、予め500ml生理食塩水にキシラジン3mlを溶解したものを準備しておき、必要なときには、50～100mlずつ、適宜、留置針から母牛の頸静脈中に投与する。

体細胞クローン妊娠牛に対する帝王切開では、体細胞クローン胎子摘出時の臍帯切断後の収縮が悪く、臍帯出血や臍静脈内で出血することがある。胎子側の臍帯が短いと、このトラブルが発生した時の処置が困難になるため、胎子を生子宮外へ摘出する時に胎子側の臍帯をできるだけ長く確保できるようにしなければならない。

また、胎膜の状態、胎水の色調等から、体細胞クローン胎子の生理状況を把握できる場合があるので、異常と診断されたら摘出新生子のケアには細心の注意を払う。

(2) 体細胞クローン新生子の管理

分娩した体細胞クローン新生子では、全く問題のない経過をたどる場合もある反面、危篤に陥る場合も少なくない。新生子の緊急処置を行う場合は、生後10分足らずの間に適切な処置をできるか否かにその成否がかかってくるので、人員、役割分担、手順をあらかじめ決めておくようにする。体細胞クローン新生子が娩出される時の対応フロー図を図12に例示する。

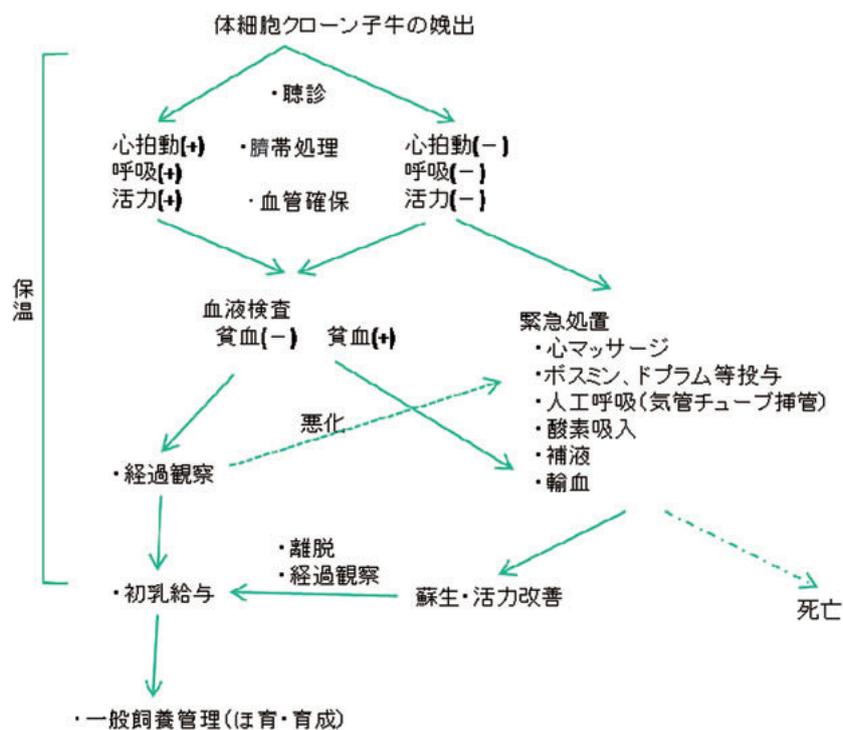


図 12. 体細胞クローン新生子が娩出した場合の対応

分娩後の体細胞クローン新生子に対する適切な緊急処置が速やかにできるように日頃から準備しておきたい器具器材類を図13に示す。また、おもな医薬品リストを表5に示す。



気管チューブ



サッカー



酸素吸入器

図 13. 緊急処置のために準備しておきたい器具器材

表 5. 準備しておきたいおもな医薬品

商品名	一般名	用途	規格	メーカー	用法	作用
ボスミン	エピネフリン	血圧上昇・蘇生	1mg/1ml 1 管	第一三共	1ml 静脈内、 気管内	皮膚血管の収縮作用・ 強心作用
ドーパミン	塩酸ドーパミン	強心剤	100mg/5ml 1 管	アイロム 大洋薬品 小林化工 ニプロファーマ	500ml 生食に 溶解し点静	心収縮力、 心拍出量を 増加
ドプラム	塩酸ドキサプラム	呼吸促進	20mg/1ml 1 バイアル	キッセイ薬品	1ml / 回 静脈内	呼吸中枢を 興奮させる
メプチン	プロカテロール塩酸塩	気管支拡張薬	0.01% /0.5- 5ml 1 管	大塚製薬	1ml / 回 静脈内	気管支拡張
ミオプロック	臭化パンクロニウム	筋弛緩 (人工呼吸時)	4mg 1 管	シェリング・プラウ	0.5ml / 回 静脈内	骨格筋弛緩剤
デキサメサゾン	デキサメタゾン	浮腫軽減 輸血時ショック防止	20mg/20ml 1 バイアル	川崎製薬 理研畜産化薬 田村製薬	10ml / 回 皮下	副腎皮質 ホルモン

体細胞クローン新生子においては、過大子や虚弱子のほか、臍帯、四肢、胎盤などの形態上の異常（図14～16）、呼吸困難、体温異常などの生理機能上の異常が認められることが少なくない（食品安全委員会、2009）。これらの異常は、いずれも一般牛においても認められる類のものである。重度な異常を有する新生子の救命は困難であるが、軽微な異常の中には、新生子の緊急措置や注意深い管理によって救命できるものもある。なお、これらの異常を発生させるおもな原因としては、エピジェネティックな乱れが指摘されている（食品安全委員会、2009）。



図 14. 体細胞クローン新生子（生存例）の胎盤における異常所見
大きく、形状がいびつ（ID; C6）

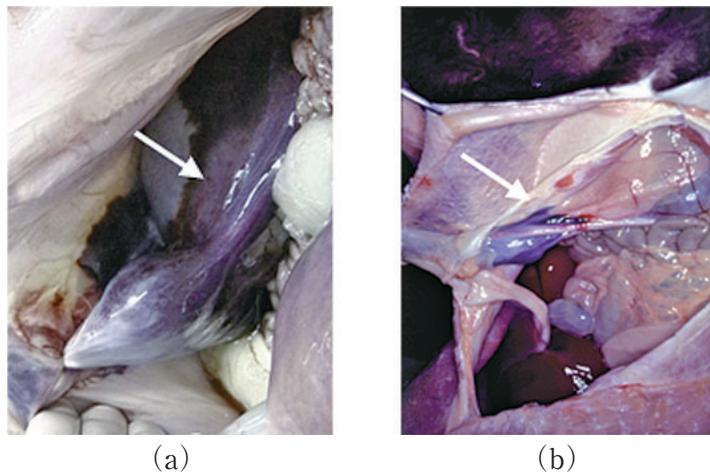


図 15. 体細胞クローン新生子の尿膜管における異常所見
(a)：尿膜管の退縮不全による貧血により生後死亡した
体細胞クローン牛（ID；C5）；尿膜管の退縮不全に
より多量の血液の貯留（矢印）が見られる。
(b)：人工授精由来産子；尿膜管が退縮している（矢印）。



図 16. 体細胞クローン新生子の外観（雄）
(a)：成雄の容貌、巻毛、発達した後駆、尿膜管の
退縮不全による貧血により生後死亡（ID；C5）。
(b)：外観に異常は見られない生存例（ID；C11）

自然分娩、帝王切開のいずれにかかわらず、体細胞クローン新生子に対しては、出生直後の臨床獣医学に則った管理を確実に行う。すなわち、娩出（摘出）された新生子は、直ちに乾いたタオル等で胎水を拭い取ると同時に心拍数、心拍動の強さ、呼吸の有無、呼吸の力強さ等を確認し、異常が認められなければ、一般的処置を行う。一方、異常が認められる場合には適切な緊急処置を速やかに行う。

① 一般的処置

臍帯を再度確実に結紮するとともに、その際、臍帯の付着部を触れて臍静脈の拍動が感じられるかどうかを確認する。この拍動は臍静脈の収縮不全に起因すると考えられる。この拍動は数時間続く場合がある。生後しばらくしてから状態が悪くなる例があるため、少なくとも自力起立し哺乳するまで監視を続ける。また、血液検査を行うことで、子牛の状態を裏付ける情報を得るべきである。

② 緊急処置

ただちに静脈ラインの確保（頸静脈）を行うとともに酸素吸入を行う。酸素吸入は市販の缶タイプでは数分間しか持続しないため、レギュレーター付酸素ポンペを準備することで、数時間の対応が可能となる。

心拍動を触知できないときには、心臓マッサージをするとともに、ボスミン注（エピネフリン製剤）1mℓの静脈内投与を行う。ボスミン注は肺からも吸収されるため、静脈内投与が困難な時は気管内投与も可能である。

心拍動がない時には、気道の確保のために気管チューブを挿管する必要がある。新生子牛にはヒト用の8～9.5Frの気管チューブが使用可能である。反芻動物は口が大きく開かないこと、舌隆起があることからステントを用いるが、気管チューブ挿管は、経験すれば挿管できるようになるので、事前にチューブ挿管を練習しておいたほうがよい。

一般蘇生術に従い、心臓マッサージ、人工呼吸を行い、ボスミン注、ドプラム注射液（塩酸ドキサプラム製剤）の投与を随時行う。心拍動が回復しても自発呼吸がない時は、ドプラム注射液1mℓを静脈内に投与する。ドプラム注射液に反応すれば、数分間自発呼吸が行われるので、聴診しながら、必要に応じて酸素吸入、輸液、輸血を行う。

前述のように臍静脈内への出血があると出血性の貧血がみられるので、頸静脈ラインを確保した時点で赤血球数とヘマトクリット値を測定する。

人工授精由来産子の出生直後の赤血球数は700万/mℓ、Ht値は30%程度であるが、出血をしている体細胞クローン産子では400万/mℓ以下、20%以下へ低下する場合が多いので、デキサメサゾン3mℓ投与した後、輸血を行う。牛では、赤血球凝集反応がほとんどおこらないので、輸血ドナーは健常な雌牛のもので差し支えない（ただし、牛白血病などの陽性牛は除く）。母牛の分娩前に800mℓの血液を血液バッグに採取しておき、分娩にあわせて38℃に保温しておければ理想的である。

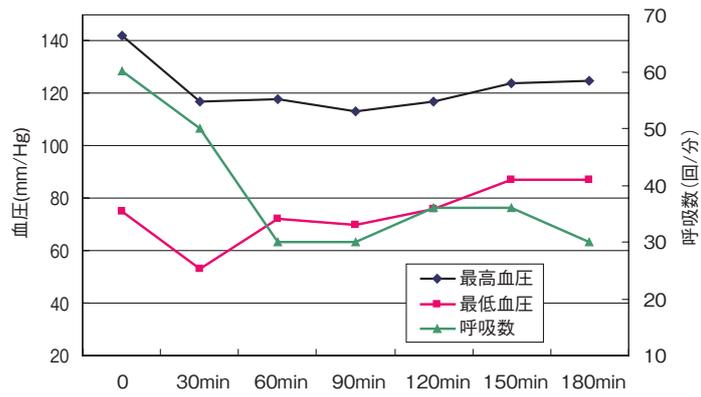


図 17. 撓側皮静脈の留置針による確保と薬剤投与

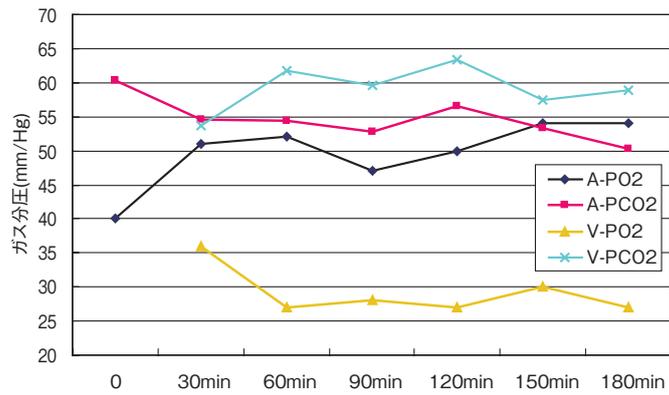
緊急処置下にある動物は体温の自己調節ができないので、保温にも気を配る。保温のほか、呼吸管理も行い、産子の状況を見ながら、撓側皮静脈の確保を行う（図 17）。持続静脈内薬剤等投与を行う場合、頸静脈は外れやすいため、撓側皮静脈を留置針（+インジェクションプラグ）で確保することで長時間の薬剤静脈内投与が可能で、不使用時のヘパリン充填により 3～4 日間継続使用が可能である。

体細胞クローン新生子は臍帯に問題がある場合が多いので、胎水を飲んでいない場合の新生子逆さ吊りは行うべきでなく、サッカー（吸引機）のような機器を用いるようにする。もし、可能であれば、新生子の血圧、血液ガス、血液 pH および体温など生理機能のモニタリングも行った方がよい（図 18(a)～(d)）。それによって、新生子の状態をより正確に把握できるようになる。

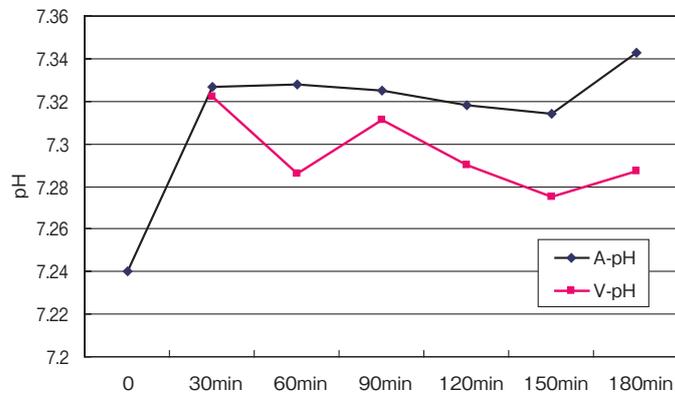
これまでの分娩例から、体細胞クローン新生子は一般に呼吸器系機能が脆弱であることがわかっているので、血液ガスのモニタリングは、新生子の生命維持のため有効な手段である。出生直後の新生子牛は少なくとも呼吸性のアシドーシスに陥っているが、十分に呼吸ができれば出生後 30 分以内に PO_2 （血中酸素分圧）、 PCO_2 （血中二酸化炭素分圧）は、通常レベルまで改善される。



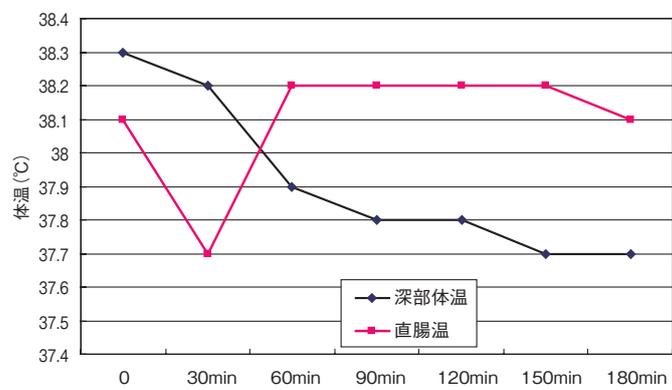
(a) 血圧



(b) 血中ガス分圧



(c) 血液 pH



(d) 体温

図 18. 体細胞クローン新生子における生理機能のモニタリング結果の例

血液ガス測定器では、動脈血採取が必要なことからパルスオキシメーターを用いることで動脈採血せずに酸素飽和度をモニタリングできる。皮膚にメラニン色素が多い黒毛和種牛では、耳介の毛剃りとともに表皮を薄く削ることでパルスオキシメーターの利用が可能となる（図19）。

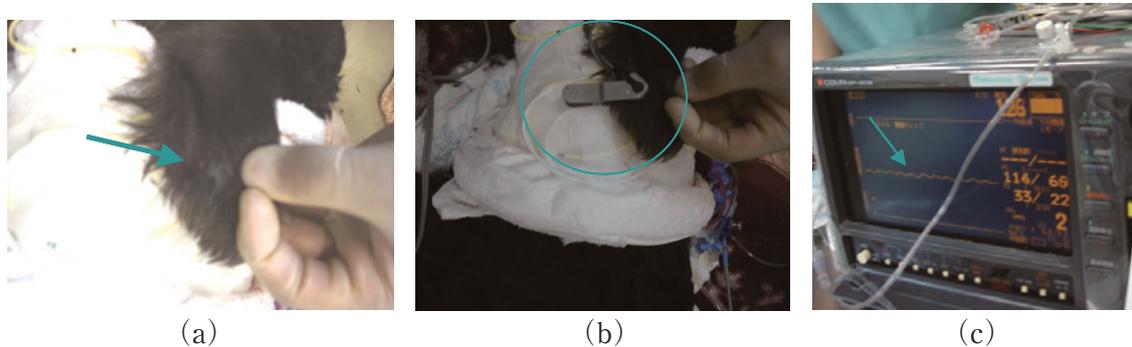


図19. 測定風景とパルスオキシメーター

- (a)：パルスオキシメーター装着部位の耳介の毛剃りと表皮の剥離（矢印）
- (b)：パルスオキシメーターの装着（○囲い）
- (c)：生体情報モニター（COLIN）に表示された動脈血酸素飽和度（矢印；持続的に動脈血中の酸素濃度を示している）

呼吸、心拍動、血液正常などの状態が安定したら、酸素吸入を中止して、初乳を投与する。酸素吸入を中止して数分内に再び新生子の活力が低下するような場合は、酸素吸入を再開する。

なお、体細胞クローン牛が出生した場合には、その生死にかかわらず、事実が生じた月の翌月10日までに所定の様式で農林水産省に異動報告を提出する（農林水産省、2009）。

(3) 体細胞クローン新生子牛の哺育・育成

体細胞クローン新生子は虚弱である場合が多い。そこで、子牛の生存率を高め、また、よい発育成績を得るために、たとえ、レシピエント牛が和牛で、雌牛による哺育が可能であっても、人工哺育を実施したほうがよい。

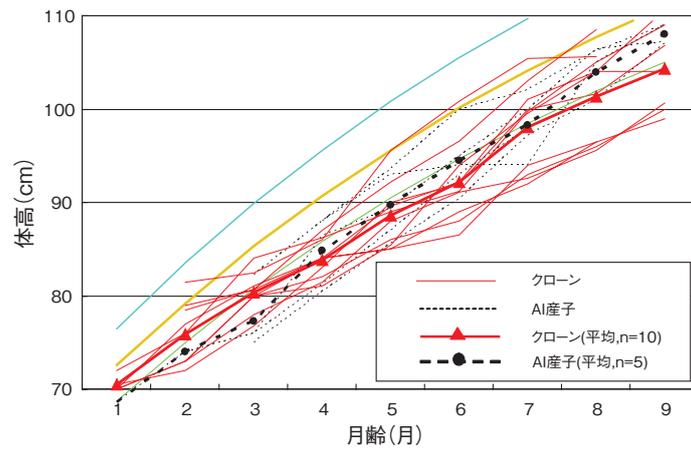
黒毛和種の人工哺育にあたっては、従来の給与量である600g/日（3.6ℓ）を1,000～1,200g/日（6～7.2ℓ）へ給与量を増量すればよい（表6）。ホルスタイン種の場合も黒毛和種に準じ、代用乳の給与量を増やせばよい。

この人工哺育法によって、自然哺乳産子より発育が劣るとされている人工哺乳産子の発育が改善される（図20）。

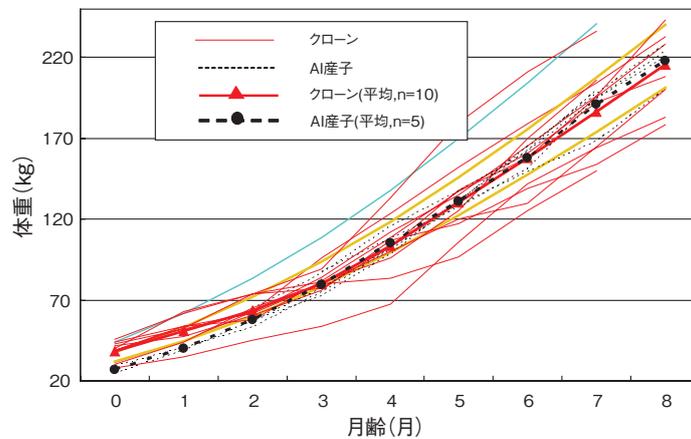
表6. 哺乳量の例（強化プログラム）

週齢	日齢	代用乳給与量			飼料給与量 (g/日)	
		朝	昼	夕	モーレット	乾草
1	0	カーフサポート ダッシュ (人工初乳、1袋) 湯 0.8ℓ	—	カーフサポート ダッシュ (人工初乳、1袋) 湯 0.8ℓ	—	—
	1～7	V ミルク 300g (湯 1.8ℓ)	V ミルク 300g (湯 1.8ℓ)	V ミルク 300g (湯 1.8ℓ)	—	—
2	8～14	V ミルク 500g (湯 3ℓ)	—	V ミルク 500g (湯 3ℓ)	100	10
3～4	15～28	V ミルク 600g (湯 3.6ℓ)	—	V ミルク 600g (湯 3.6ℓ)	100	10
5	29～35	V ミルク 500g (湯 3ℓ)	—	V ミルク 500g (湯 3ℓ)	400	40
6	36～42	V ミルク 600g (湯 3.6ℓ)	—	—	820	80
7	43～49	—	—	—	1620	180

(始めは子牛が飲みきる量)



(a) 体高



(b) 体重

図 20. 改良した人工哺育による体細胞クローン子牛（黒毛和種♂）の体重と体高

体細胞クローン牛における病死率は、60日齢頃までは一般牛よりも高い傾向がある（図21）。したがって、この時期は、新生子の経過を詳細に観察し、病的症状を発見した場合は、速やかな措置を行うようにする。

病死、事故死、淘汰、廃用あるいは試験と殺などの理由で体細胞クローン牛が死亡した場合は、事実が生じた月の翌月10日までに所定の様式で農林水産省に異動報告を提出する（農林水産省、2009）。

なお、病死率が一般牛のものと同等になる200日齢以降は、体細胞クローン牛に対する特別の管理体制を解除してもよい。

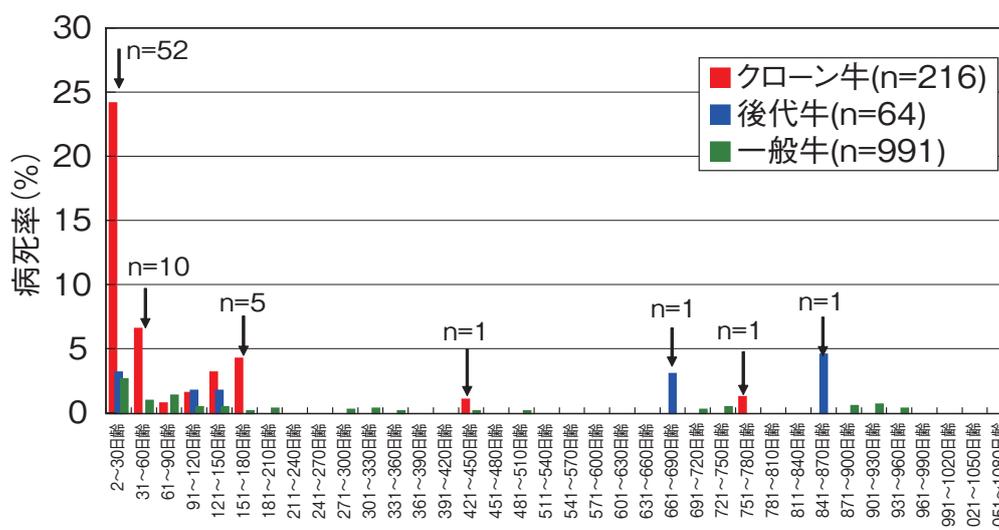


図21. 体細胞クローン牛、後代牛及び一般牛における病死率の推移（ホルスタイン種・雌及び黒毛和種・雌雄、死産と生後直死を除く）

注1) 1カ月ごとの期間に区切り、病死頭数をその期間当初の生存頭数で割って求めた病死率をプロットした。

注2) 畜産草地研究所(2008)より転載

引用文献

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所（2008）体細胞クローン牛・後代牛の健全性ならびに生産物性状に関する国内調査報告書。

http://nilgs.naro.affrc.go.jp/result/clone_shiryu/v1-kokunai_chosa.pdf

<http://www.fsc.go.jp/senmon/sinkaihatu/s-clone-wg-dail/s-clone-wg1-siryu7.pdf>

内閣府食品安全委員会（2009）新開発食品評価書「体細胞クローン技術を用いて産出された牛及び豚並びにそれらの後代に由来する食品」。

http://www.fsc.go.jp/emerg/hyoukasho_shinkaihatu_clone.pdf

農林水産省（2009）家畜クローン研究の情報の収集及び公表について。

<http://www.s.affrc.go.jp/docs/clone/pdf/tuutian.pdf>

執筆者：窪田 力^{2,3}・林 史弘¹・山口 浩^{2,3}・瀬戸口浩二¹・磯部知弘¹・池田省吾¹
 (1 鹿児島県肉用牛改良研究所、2 元鹿児島県肉用牛改良研究所、3 鹿児島大学農学部)

おわりに

「体細胞クローン牛の生産効率の低さ」は、「国民理解の醸成不足」と並んで体細胞クローン技術を社会的に受け入れられにくくしている要因のひとつである。体細胞クローン牛の生産効率を低くしている主な要素としては、妊娠期間を通じて発生する流産（いわゆる妊娠の安定期が存在しない）、死産や生後直死の多発（両者とも、出産頭数の15%程度）および生後1カ月以内の病死多発（生存新生子の25%程度）をあげることができる。

最近の分子生物学的研究の発展により、これらが発生する原因としては、クローン胚におけるエピジェネティックな乱れ（遺伝子のメチル化異常など）が指摘されている。しかし、現時点では、クローン胚におけるエピジェネティックな乱れの制御やエピジェネティックな乱れをもつクローン胚の選別・除去が困難である。そのため、体細胞クローン牛の生産効率を高めるための対処法としては、対症療法的ではあるが、体細胞クローン牛生産時に周産期と新生子の管理を徹底することが現実的である。

本マニュアルは、この現実的な対応をより確実なものにするために、旧高度化事業に研究課題を応募した平成16年当時から企画していた。課題採択後、マニュアルに関係する研究課題は、臨床的な研究実績が豊富な鹿児島県肉用牛改良研究所に分担していただいた。5年の研究期間のあいだには、研究課題遂行の主力であった窪田 力博士が鹿児島大学農学部に出向するなど予期せぬ事態も発生した。しかし、同研究所関係者の全面的な協力を得て、無事、臨床的な要素の多い、困難な研究課題を成し遂げたうえ、年度末の多忙な時期に重なったにもかかわらず、本マニュアルも完成させることができた。

本マニュアルの原稿作成の過程においては、鹿児島大学農学部教授、小島敏之博士ならびに実用技術開発事業・専門PO、岡野 彰博士に校閲をお願いし、有益な助言をいただいた。このマニュアルの刊行は、上記の諸先生をはじめとした多くの関係者のご理解とご協力によって可能となった。関係されたすべての皆様に感謝の意を表したい。

新たな農林水産政策を推進する実用開発事業
（旧 先端技術を活用した農林水産研究高度化事業）
産業利用に向けた体細胞クローン牛に関する技術開発と調査
（課題番号：1602、平成16～20年度）
研究総括者 渡邊 伸也
（農研機構 畜産草地研究所 高度繁殖技術研究チーム）

参 考 资 料

体細胞クローン牛を妊娠している母牛のケアと新生クローン子牛の管理

鹿児島大学農学部

窪田 力

1. はじめに

体細胞クローン羊ドリーの誕生〔Campbell et. al (1996)〕以来、体細胞クローン牛の生産について多くの研究が実施され、1998年に最初のクローン牛が報告された〔Kato et. al (1998)〕。以降に多くのクローン生産例とともに体細胞クローン牛生産における低受胎性、流死産の発生、生後直死など生産性の問題点も報告されている〔Kubota et. al (2000)〕。これらの問題はその後クローン牛市場流通についてのコンプライアンスに多大な影響を与えたことは事実であろう。その後、体細胞クローン牛の低生産性を改善する研究や技術開発が行われ、現在では生産性の改善の兆しが見えている。本項では、現在、細胞クローン牛の生産を行う場合での体細胞クローン胚移植により妊娠した借り腹牛（母牛）のケアと新生クローン子牛の管理について紹介する。

2. 体細胞クローン胚移植により妊娠した母牛のケア

体細胞クローン（以下クローン）胚移植の受胎率は～50%と報告されている。一般に行われているドナー牛から採取した胚の移植による受胎率が約50%（*In Vivo*新鮮胚移植：農水省資料）であることから、クローン胚移植による受胎率は*In Vivo*胚移植より低いことになる。しかし、近年、Aoyagiらはドナー細胞の処理を変えることで非常に高率に胚を作出し、高い受胎率が得られたこと〔Ideta et. al (2007)〕を報告しており、これはクローン胚の作出技術の改良が大きな影響と考えられ、特にドナー細胞の処理と初期化法の改良によって胚移植受胎率が*In Vivo*胚移植と同等まで改善出来ることを示唆している。

クローン胚移植による受胎確認後に流産が多数に発生することが知られ、我々もクローン胚移植で妊娠した牛の70%が流産したことを報告している。これは前述の低受胎率とともにクローン牛生産性の低下の大きな原因の一つである。牛の生産現場での受胎確認は、繁殖後40日齢以降に直腸検査による用手法で子宮、胎膜、卵巣（黄体）の触診により診断されており、クローン胚移植後の受胎確認も同様に用事によるが多かった。一般的な繁殖でも早い妊娠日齢では早期の胚死滅が起こることが知られているが、クローン胚移植による受胎確認を超音波診断装置で実施した場合、図1のように子宮内に胎膜は存在するものの胎子形状が異常であったり、無胎子であったりするケースが認められた。これらの妊娠は維持出来るものでなく、胎齢60日齢くらいまでに子宮腔に胎水、胎膜とも消滅した。このことから、約40日齢での受胎確認後の頻発した流産の発生は、受胎確認に超音波診断装置を用い、正常胎子も確認することで低減させることができると考えられる。しかし、クローン胚移植による受胎では、胎盤の形成が充実してくる90日齢以降にも流産が散見されることから、受胎した母牛については妊娠期間中に定期的に受胎確認と異常の有無を診断するべきである。しかし、クローン胚の発生異常はドナー細胞の初期化の程度によるものであり、処理する技術改良により改善されると考えられる。また、妊娠中期から後期にかけて胎膜水腫が発生することも知られている。胎膜水腫は一般の繁殖にも発生し、遺伝病または先天の遺伝子異常により発生する〔浜名ら(2006)〕。胎膜水腫と診断された場合には、母牛の生命と難産をさけるために人工流産が選択されるが、クローン胎子妊娠の場合にも、その産子の形態は浮腫、胎水嚥下多量などの異常がみられ（図2）、これも定期的な受胎診断で早期に診断出来る。

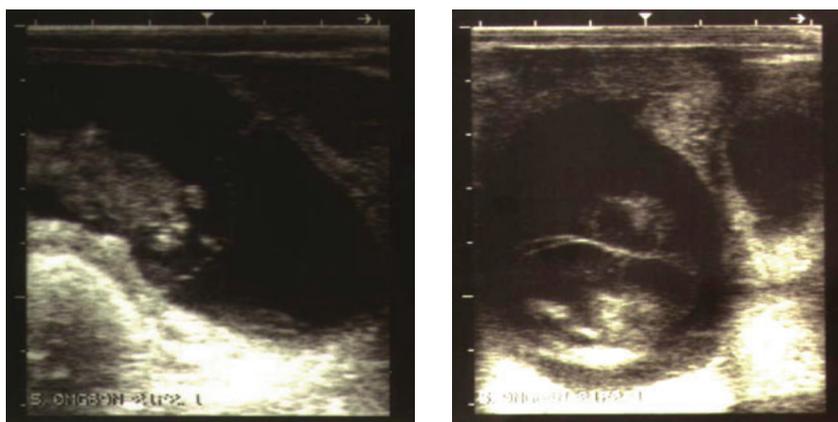


図1. 妊娠日齢60日の子宮内のイメージ（超音波診断装置による）
 (左) 正常な胎子像が認められる
 (右) 胎膜に包まれた塊（胎子の形状をしていない）が認められ、90日目で流産



図2. 胎膜水腫と診断されたクローン胎子（280日齢）

体外受精胚移植由来の産子には、過大子症候群（Large Calf Syndrome: LCS）が発生することが知られている〔Constant, F. et. al. (2006)〕。LCSには、妊娠期間の延長、産子の過体重、生直後産子の虚弱（起立までの時間延長、吸入行動微弱等）が特徴で、クローン産子にもLCSと同様な場合が診られる。妊娠期間中の定期的な受胎診断により、異常が診断でき、それ以外の胎子、子宮内（胎水、胎盤）は人工授精による妊娠と同様に経過するが、周産期（妊娠末期）においては過大胎子による母牛のケアが必要である。クローン産子の生時体重は人工授精由来の産子に比べて～2倍ほど増加していることがあり、その場合、母牛への物理的影響（腹腔内スペース）が大きい。牛は単胎動物であるが、自然排卵においても希に双子を受胎する場合がある。このような双子妊娠の場合、通常の妊娠期間よりも1週間程度早く分娩が行われる。これは双子妊娠による腹腔内スペースとのかねあいであると考えられている。しかし、クローン産子の場合、単胎であることと、かなりの過大子であってもクローン胎子

の副腎機能が弱いため（佐藤先生の項参照）、逆に妊娠期間が延長される。このため、妊娠末期における母牛のケアが必要であるが、積極的に母牛のケアをすることより、過胎子に対応するため難産へのケアが行われる。妊娠期間中の胎子の発育は母牛の栄養状態にも左右されることが知られており、通常、妊娠中期から後期にかけて母牛へは TDN や DCP などの栄養成分として給与飼料の添加や増加がおこなわれる。そこで、実験的にクローン胎子の受胎確認後から分娩時までの母牛の見かけ上の体重を増加させないように管理した。つまり、黒毛和種牛であれば 30～40kg の産子（胎子）が生まれ、他に受胎副産物として胎膜、胎盤、胎水で、妊娠末期には 60kg 前後の受胎産物を子宮に入れることになるので、普通に管理されれば妊娠末期の母牛は少なくとも +60kg 以上の体重増加がある。今回の調査では、受胎確認から分娩時までの見かけ上の体重を変化させないように管理するため、実質上の母牛の体重は -60kg 以上となっており、つまり低栄養の条件下で妊娠期間を過ごすことになり、胎子へは十二分に栄養等が供給されないと考えられる。このような場合、通常の繁殖で生産される産子の生時体重は低下することになる。しかし、生産されたクローン牛は過胎子であった。このことから、母牛へのケアでクローン胎子の発育（過胎子）を制御できる可能性は少なく、特に LCS について、Aoyagi らがクローン胚の作成の方法により低減できる可能性を報告していることから [Ideta et. al (2007)]、クローン胚、胎子の遺伝子発現によるものと考えられる。

妊娠後期からは定期的な受胎診断とともに母牛の体重、胸囲、腹囲を測定することは、母牛の管理に有効である、異常な体重、胸囲、腹囲の増加は、前述の胎膜水腫の診断に寄与するし、過胎子を予見させるものである。動物の生産のために分娩は最大の出来事であり、通常の繁殖の場合でも分娩は管理者にストレスを与えることになる。クローン牛の生産も同様で、かつクローン胎子（産子）が LCS の特徴を有する場合があるので、妊娠末期（周産期）の管理は特に重要である。母牛の日常の管理の他、定期的な受胎確認、各部位の測定がなされるべきであるが、同時に分娩の様式について検討を加えることになる。分娩の様式とは、胎子が子宮－子宮頸管－膈－外陰部を経過するいわゆる普通の分娩が可能か、帝王切開術により胎子を摘出するか、である。これには、胎子のサイズと母牛の（産道の）サイズのバランスを推測することが必要となる。胎子の体重やサイズを正確に推測することは困難であるが、妊娠中期から後期にかけて腹腔底部（腹部）に下垂していた胎子は末期にかけて産道に向かい始めるため、末期には直腸検査をすることで胎子の蹄、繫、頭部に触診できることがある。これらのサイズと生時体重は相関関係にあることから、サイズを手または超音波診断装置で計測することで生時産子のサイズを推測でき、母牛の体型、産道のサイズ等と比較検討を行い、分娩様式を決めることが大切である。帝王切開術は、胎子を摘出する日、時間がはっきりとすること、分娩時の事故を回避できることから有効な方法である。しかし、母牛は次の繁殖に 4ヶ月間程度の回復期間を要する。

また、前述 LCS により妊娠期間の延長が起こることが多い。延長されることで、胎子の体重・サイズも大きくなり、いっそうの難産の可能性が高まるため、この場合には誘起分娩処置が行われる。一般に誘起分娩では副腎皮質ホルモン、プロスタグランジンが使用されるが、クローン胎子妊娠の場合も、これら単独または組み合わせで誘起分娩を行うことができ、プロスタグランジン投与から 30 時間を目処に分娩が行われる。我々は、前述帝王切開術を行う際にも前日までに誘起分娩処置を施している。

分娩の始まりの予兆を知ることは、管理はもちろん分娩時の無用な事故を防止するために有効である。分娩の 24 時間～半日前に母牛の体温（直腸温）が約 0.5℃ 低下する。また、母牛の血中グルコース値、白血球数が増加することが知られており、クローン胎子妊娠母牛も

同様である。しかし、これらには測定誤差もあるため、一日数回、用事により子宮頸管の開口具合を調べるのが分娩の予知にもっとも有効である。これにより4指以上に頸管が開口すると分娩が開始しており、数時間後には破水や胎子娩出が行われる。また、ウェブ監視カメラは、常時、母牛を観察できることから、非常に有効である。娩出時には、産道と胎子のサイズを再度勘案して、十分な産道の開口で産子を娩出させるべきである。分娩後の母牛は問題とされる点はなく、ケアも通常の産後のケアで十分である。帝王切開術を施す場合、誘起分娩処置をしていても初乳の生産が遅れたり（数日後）、量が少ないことがあるので、必要量の初乳の準備が必要である。

3. 新生クローン子牛の管理

前述のようにクローン子牛はLCSの症状を示す場合がある。クローン子牛のLCSは、体外受精由来産子にみられるLCSとはいくぶん異なり、適切に獣医学的処置を施さない場合には致死性である場合がある。しかし、LCSを示さないクローン子牛は、生後30分程度で自己起立して初乳を吸飲するなど、いわゆる通常の子牛と変わることなく、また、核移植時のドナー細胞の処理法によりクローン子牛にLCSの症状がみられないという報告もある。また、致死性な症状や特別な介助が必要なことは娩出～数日の間で、以降はいわゆる普通の子牛と同じ管理で十分であることから、娩出直後の新生クローン子牛の管理は重要である。妊娠時の定期診断で異常がみられた場合、産子はLCSである可能性が高く、また、クローン子牛は研究や調査などはっきりとした目的を持って生産されることから、産子の生死は大きな影響を及ぼすことから娩出時ケアの体制を整えておくべきである。

新生クローン子牛でLCSの症状を示す場合、生時体重の増加、起立時間までの延長、吸乳行動の虚弱が現れるが、そのような子牛には特徴的に臍帯の退縮不全が診られる。臍帯は尿管、臍動脈、臍静脈の3種からなるが、娩出時の臍帯切断時に臍動脈の収縮が弱く、肺循環に代わるにもかかわらず切断部から大量の出血を起こす。この出血は腹腔内の臍動脈内や臍帯漿膜下に貯留するため（佐藤先生の項写真）クローン子牛の外観からわからない。また、自発呼吸が弱い場合も多い。この2点は、生直後のクローン子牛に致死性であるため、適切な処置が同時に進行されないといけない。帝王切開術だと、胎子を子宮から摘出する際に臍帯を結紮することができるが、自然分娩の場合、娩出時に臍帯が自然に切断されるので、娩出直後に臍帯の切断具合を確認し、出血がある場合はただちに結紮をすべきである。しかし、前述のように血腫を腹腔内に作るため、そのような場合には臍帯を結紮しても貧血の症状を示すことになり対処が必要である。また、自発呼吸が弱いまたは無呼吸の場合と並列する場合があるので、臍帯を結紮後、呼吸に問題ある場合、ただちに口内、気管内の胎水除去や、人工呼吸、呼吸促進剤の投与を実施する。一般に子牛生産現場で無呼吸や胎水を飲んでいない場合、後肢を持って子牛を吊り下げることで刺激や胎水の排出を促すが、前述のように臍帯に問題がある場合があるので、クローン子牛の場合には推奨できない。我々のクローン子牛LCSの対応を以下に示す。①臨床経験のある獣医師2名で対応する（呼吸管理と臍帯管理）、②娩出後ただちに臍帯を結紮し臍部の触診（退縮不全時には動脈拍動を長時間強く触知できる）と聴診器で心音聴取、他の獣医師は呼吸様式を確認すると同時に頸静脈ライン確保、③無呼吸の場合：気管チューブ（8-9Fr）挿管して人工呼吸（酸素吸入）とサッカーで気管内胎水等を吸引除去、呼吸促進剤を投与、呼吸微弱の場合：サッカーで口内、気管内胎水等を吸引除去後、マスクで酸素吸引、呼吸促進剤を投与、④採血して赤血球数、PCVを測定、⑤保温、皮膚マッサージ、呼吸管理しながら、産子の状態により処置を続ける、とう側皮静脈ラインの確保（頸静脈ラインははずれやすい）、⑥④の採血から10分後に再度赤血球数、PCVを測

定し、④より低下または赤血球数 500 万/ml、PCV30%以下の場合（腹腔内に血腫ある疑い）、輸血。これらを 20 分内で行うことになるが、呼吸様式が改善できれば 1 時間程度の処置で危機的状态から離脱することが大半である。

臍帯の退縮不全がある場合、その臍帯のサイズが太いことも明らかである。外見上は浮腫もあるように見える。妊娠期間の中子宮動脈の血流量をクローン胎子妊娠牛と人工授精による妊娠牛で比べた場合、クローン胎子妊娠母牛の血流量が多く、これは胎盤（佐藤先生の項）、臍帯のサイズ、過大子、に結びつくのかは不明であるが、クローン妊娠時の差違である。また、クローン産子生直後からの血液成分と推移を調べてみると、赤血球と PCV 以外に人工授精由来産子と差違はみられない（図 3）。赤血球数と PCV は前述の生直後の出血によるものと考えられ、適切に対処できれば、血液学的にもクローン産子に異常はみられず、生後 1 週齢には差がみられなくなる。呼吸管理では、問題がある場合に酸素の吸入が大切である。産道を通って娩出直後の産子は血圧が高く、アシドーシスの状態である。呼吸を開始することで肺循環に代わり、血圧も下降、安定するとともに、動脈血中 pH、酸素分圧 (PO₂) が増加し、二酸化炭素分圧 (PCO₂) が低下し、生後 30 分にはアシドーシスも改善し安定する。CLS 時に呼吸が弱いまたは無呼吸であると産子に対して厳しいアシドーシス状態が続くことになるので、呼吸の管理が重要で、うまく対処できれば数分から 1 時間程度で大半が普通の呼吸様式になる。その際には PO₂ の測定が呼吸、循環の目安になるが、フィールドでは機器や動脈血採血が困難と思われる。フィールドではパルスオキシメーターが使用でき、黒毛和種牛のように皮膚表層にメラニン色素を有する場合には耳介一部を剃毛し、表層を薄く剥皮することで、簡便に継続的に PO₂ を測定できる。

生直後にこれらの処置を行っても改善出来ないまたは死亡するクローン産子がいる。我々もこれら生直後死した産子の遺伝子の異常を報告しており [Wendy, D et. al. (2001), Xue, F. et. al. (2002), Yang, L. et. al. (2005), Zhang, S. et al. (2004)], 前述の流産の発生と同じように遺伝子、遺伝子発現の異常によることが推測され、これらは臨床獣医学的処置で改善できる可能性は少なく、クローン胚作出の技術開発と改良に期待される。

娩出後のクローン産子は初乳を 12 時間以内に摂取することで血中 IgG 値も増加し、移行免疫を得ることができる。その後、成長や発育の報告がされているが、免疫不全症の報告

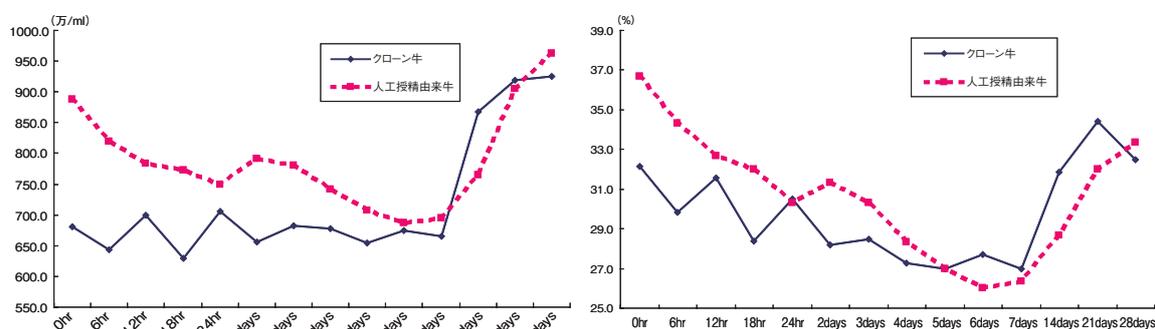


図 3. 体細胞クローン子牛と人工授精由来子牛の生直後から 28 日齢までの赤血球数 (左) と PCV (右) の推移



図4. クローン牛

(左) クローン子牛4頭（前）とドナー牛（後）

(中) ホルスタイン種のクローン子牛3頭

(右) 奥からドナー牛、クローン牛、リクローン牛

が1例あり〔Renard, J.P. et. al. (1999)〕、その他は順調に発育したており〔Tian, X.C. et. al. (2005)〕、哺乳期、育成期を普通に過ごすこととなる。また、我々は世界で初めてクローン牛の体細胞から次のクローン牛の作出に成功しているが、産子は健全であった〔Kubota, C. et. al. (2004)〕。

4. おわりに

体細胞クローン産子の生産に拘わる研究が開始された時代、分化した体細胞核を初期化することで再び個体を作成するという前代未聞の研究の中、低受胎、流産、生後直死の発生など、当初は手探りで対処していたことを思い出します。牛が産業動物として位置づけられていたことから、臨床獣医学として周産期の十分な獣医療の対応ができていなかったことも大きかったと考えます。これまで述べたようにクローン産子の生産には、遺伝子レベルでコントロールできていないところが存在しています。しかし、現在では、妊娠母牛の管理、周産期の管理、クローン産子の管理について、発生学、獣医学、畜産学等の学術と臨床経験から多くのことがわかり、それぞれに対応することが可能となっています。今後もクローン胚の作出からクローン牛の生産まで研究、調査が行われることで、データの蓄積と共にさらに安定したクローン牛生産が可能となると期待しています。

引用文献

- Campbell, K.H. et. al. (1996) Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 380(6569): 64-6.
- Constant, F. et. al. (2006) Large Offspring or Large Placenta Syndrome? Morphometric Analysis of Late Gestation Bovine Placentomes from Somatic Nuclear Transfer Pregnancies Complicated by Hydrallantois. *Biol Reprod*, 75: 122 - 130.
- Ideta, A. et. al (2007) Early development in utero of bovine nuclear transfer embryos using early G1 and G0 phase cells. *Cloning Stem Cells*, 9(4): 571-80.
- Kato, Y. et. al. (1998) Eight Calves Cloned from Somatic Cells of a Single Adult. *Science*, Dec 1998; 282: 2095.
- Kubota, C. et. al. (2000) Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 990-995.

- Kubota, C. et. al. (2004) Serial bull cloning by somatic cell nuclear transfer. *Nat. Biotechnol.* 22: 693-694.
- Tian, X.C. et. al. (2005) Meat and milk compositions of bovine clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 6261-6266.
- Renard, J.P. et. al. (1999) Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. *Lancet*, 353: 1489-91.
- Wendy, D et. al. (2001) Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: Aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 13734 - 13738.
- Xue, F. et. al. (2002) Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. *Nat. Genet.* 31: 216-220.
- Yang, L. et. al. (2005) Expression of imprinted genes is aberrant in deceased newborn cloned calves and relatively normal in surviving adult clones. *Mol. Reprod.* 71: 431-438.
- Zhang, S. et al. (2004) Genomic imprinting of in *H19* n Naturally Reproduced and Cloned Cattle. *Biol. Reprod.* 71: 1540-1544.
- 浜名克己 et. al. 獣医繁殖学(2006) 胎膜と胎子の水腫 : 355-357.

注) 平成 21 年度問題別研究会「体細胞クローン技術の現状と将来展望」(畜産草地研究所資料、21-5) より転載

体細胞クローン流・死産牛および胎盤における病理所見

(独) 農研機構 動物衛生研究所
佐藤真澄

1. はじめに

畜産繁殖分野の新技术である体細胞クローン技術によって1998年に我が国で初めて体細胞クローン牛が誕生して以来、多くの子牛が誕生したが、これらの動物では流・死産、胎子の異常、過大子や在胎期間の延長等が高率に起こることが指摘されてきた。そこで、その実態を明らかにすることを目的として、われわれは、農林水産省技術会議プロジェクト「体細胞クローン動物安定生産技術の確立研究（平成11～17年度）」の一環として、鹿児島県肉用牛改良研究所で生産された流・死産あるいは生後直死した体細胞クローン牛および胎盤や臍帯等の胎子付属物について病理組織学的検査を行ったので概要を紹介する。

2. 体細胞クローン (NT) 牛およびその後代牛について

A. 流・死産牛の病理所見

皮膚の培養線維芽細胞から取り出した核を、除核した成熟卵細胞質に移植して7日間体外発生培養をした胚を性周期の同調した受胎牛に移植することによって生産された [Kubota et al. 2000] NT牛のうち、流・死産および新生子死あるいは鑑定と殺例（黒毛和種 [JB] 雄14例・雌4例、ホルスタイン [H] 雌5例・交雑種雄1例）、死産した第2代NT（リクローン）牛1例（Kubota et al. 2004）について病理組織学的検査を行った。対照として人工授精（AI）によって生産された牛を用いた。その結果、流・死産あるいは生後直死した例のうち8例（JB雄3例、H雌4例 [同一核ドナー由来]、交雑種1例）で生時体重50kg以上の過大子症候群（LOS）がみられた。在胎期間の延長は、満期に帝王切開したものを除いた、4例（JB雄3例・雌1例）で認められた。在胎期間延長とLOSとは必ずしも一致しなかった。流・死産例の死因は、臍帯血管退縮不全に関連するもの、発生異常、過大子に起因する難産等で、新生子死例の死因は換気不全や治療後のショック等であった。多くのNT牛が生産された1998年に全国で流行したアカバネウイルスやアイノウイルス等異常産ウイルスによる流・死産も4例で認められた。多くのNT例に共通して臍帯血管の退縮不全・腫大・脆弱化が著明に観察され（図1）、生時これに起因する臍帯血管からの出血が原因で死亡したものもあった。これらの臍帯では組織学的に水腫性変化や結合組織の疎な分布として認められたが、これは臍帯血管の容易な断裂を示唆する所見であった。このほか、肝臓の線維化、腎尿細管の形成不全等がみられる例もあった。表は流・死産あるいは生後直死したNT牛（JB雄18例：雌3例、H雌6例）の病理学的特徴について品種や核ドナーを加味してまとめたものである [鬼塚ら (1999)、Sato, et al. (1999)、Sato et al. (2002c)、佐藤ら (2005)]。

表 体細胞クローン流・死産牛の病理組織所見

品種	NT-1	NT-3	NT-4	NT-5	NT-6	NT-7	NT-8	NT-9	NT-10	NT-11	NT-12	NT-13	NT-14	NT-15	NT-16	NT-17	NT-18	NT-19	NT-20	NT-21	NT-22	ReNT-1	
	交雑種	JB	JB	JB	JB	JB	H	H	H	H	H	H	H	JB	JB	JB	JB	JB	JB	JB	JB	JB	
性別	Fetus-A	Fetus-B	Calf-A	Bull-C	Bull-C	Cow-a	Cow-b	Cow-b	Cow-b	Cow-b	Cow-c	Cow-d	Cow-d	Cow-d	Bull-D	Bull-D	Bull-E	Bull-E	Bull-E	Bull-F	Bull-F	Bull-C'	
A, S, HD, K, CS	♂	♂	♂	♂	♂	♀	A	S	S	S	S	S	HD	S	S	K	S	S	S	S	A	S	
胎齢	05	05	05	—	05	—	45	263	266	266	05	—	—	05	05	05	05	05	—	—	—	05	
生時体重	27.2	33.0	32.5	32.5	30.7	27.5	49.8	79.0	58.0	72.3	—	—	—	—	—	—	63.0	38.0	41.5	60.0	55.0	—	43.0
肝臓																							
線粒体	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	++	—	+	—
腎臓																							
皮質																							
糸球体メサンギウム細胞増殖	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
線粒体	—	—	—	—	—	—	—	P+	—	—	—	—	—	—	—	—	±	±	±	±	—	—	—
髄質																							
尿細管数減少	+	—	—	—	—	—	+	—	—	+	+	—	—	—	P±	+	+	—	+	—	+	P+	
尿細管間質水腫性	+	—	—	—	—	—	+	+	—	+	+	—	—	—	P+	+	+	—	+	—	+	P+	
乳腺																							
間質水腫性	+	—	—	—	—	—	+	+	—	+	+	—	+	—	P+	+	—	+	+	—	+	+	
副腎																							
肉眼所見																							
腫大	+	—	—	—	+	++	+	++	++	+	—	—	—	—	—	—	+	+	+	++	+	—	
表面の凹凸	+	—	—	—	+	+	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—	±	—	—	—	—	—	
皮髄構造不整	—	—	—	—	—	+	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
皮質																							
線粒体																							
細胞の形(S球状, C柱状)	S	S	S	S	S, C	S, C	S, C	S	S, C	S, C	C	—	—	S	C	C	C	S	S, C	S	S	—	
細胞配列*	Ir	Ir	Mx	Mx	Mx	Mx	Mx	Mx	Mx	Mx	Mx	—	—	Mx	Ar	Mx	Ar	Mx	Mx	Ir	Mx	—	
球状帯細胞の(結節性)過形成	—	—	—	—	—	+	—	±	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
弓状構造層	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	+	—	—	
髄質																							
束状構造(線状)不明	+	—	—	—	—	P+	—	—	P+	P+	—	—	—	—	—	—	—	P+	—	—	—	—	
出血	+	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
帯の幅の狭小化	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
副腎																							
帯の狭小化	—	—	—	—	—	—	±	—	—	—	—	—	—	—	—	±	±	—	±	—	—	—	
毛細血管血流うっ滞	+	—	+	++	+	—	+	+	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
髄質																							
細胞配列の不整	—	—	—	—	—	+	—	—	++	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
皮質細胞の結節性過形成	—	—	—	—	+	+	+	—	++	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
結合組織の過形成	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
クロム親和性細胞の減少	—	—	—	—	—	NT	+	—	—	++	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

* Ir: 不規則な細胞, Ar: 弓状構造, Mx: IrとArの混合

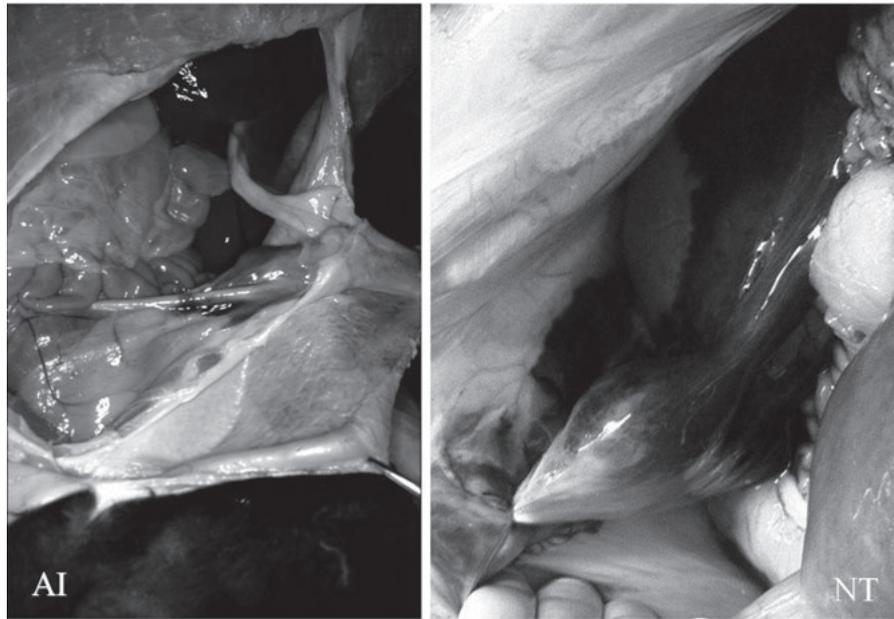


図1
NTの臍帯血管(右)では退縮不全・腫大がみられる。

B. 内分泌器官の病理所見

甲状腺は、出生直後の AI 全例で濾胞上皮細胞が顕著に活性化し、濾胞が不整形を呈していたのに対し、ほとんどの NT 例の濾胞は休止期に近い所見を示し、濾胞内コロイドの著明な充満がみられた。また、NT 牛のほぼ全例で濾胞の大小不同がみられた。

下垂体では、分娩発来に関与するホルモンである ACTH 陽性細胞は、AI 牛では NT 牛の約 2 倍を示し、血漿中 ACTH も NT 牛では AI 牛よりも低値を示した [Sato et al. (2000)、佐藤ら (2001)]。これらは NT 牛における在胎期間延長を裏付ける所見であった。

過大子症候群を示す全例の副腎で、性別・品種に関わらず肉眼的な腫大がみられたが、これらは組織学的には皮質領域の増殖によるものであった。髄質における皮質細胞の結節性過形成が JB 雌 1 例と H 雌 5 例で、ノルアドレナリンを産生するクロム親和性細胞の減数が JB 雄 2 例、雌 1 例、H 雌 4 例でみられた。また、髄質における結合組織の増生が JB 雌 5 例、雌 1 例で認められた [Sato et al. (2005)]。これらの所見と品種や性別、ドナーとの関連は不明であった。しかし、同様の所見は 1 歳齢で事故死した NT 例でもみられたことから、流・死産と関連する所見ではないと考えられた。

C. 免疫機能

死産および妊娠満期に試験と殺した NT 牛（5 例）の腸管関連リンパ組織（GALT；回腸パイエル板および回盲部腸間膜リンパ節）について白血球膜抗原に対するマウスモノクローナル抗体（抗 CD3、CD4、CD8、WC1、panB、GM-1、MHC classII）を用いて SAB 法による免疫組織化学的検査を行った結果、GALT では、NT 牛と AI 牛の間に組織構造およびそれぞれの免疫担当細胞の分布や局在の差は認められなかった。NT 牛では胸腺の萎縮がみられるなど、免疫関連組織の機能低下があるという報告 [Renard et al. (1999)] もあるが、われわれが検索した NT 牛ではそのような所見は得られなかった。

D. 肥育牛・後代牛の病理所見

肥育した NT 牛（JB 2 例）では、腎臓において肥育用飼料に起因すると考えられる結石がみられたものの、その他の臓器では病理組織学的な著変は認められなかった [Tian et al. (2005)]。

種雄牛を核ドナーとするクローン牛（第 1 世代 NT）精液の AI により生産した後代（子牛：6 例、肥育：9 例）およびクローン牛（第 2 世代 NT）精液の AI により生産した後代牛（子牛：1 例、肥育：3 例）では NT 牛にみられたような、著明な在胎期間延長や過大子傾向、臍帯血管の退縮不全等は認められず、また全身諸臓器に肉眼的・組織学的な異常は認められなかった [窪田ら (2001)]。

3. 胎盤

A. 光学顕微鏡・電子顕微鏡観察

帝王切開時、外科的に採取した胎盤について光学顕微鏡、電子顕微鏡による観察を行った。NT 全例（生存例を含む）の胎盤で肉眼的な腫大および不整な形状が観察された。組織学的には、絨毛膜細胞（trophoblast）の過形成が顕著で、妊娠満期を過ぎた例でも上皮絨毛の強い結合と不整な陥入（図 2）がみられた。電子顕微鏡観察では母体胎盤（子宮内膜上皮細胞）は不規則な長さと同幅の微絨毛を有しており、上皮絨毛間の結合部では、妊娠満期の AI 牛では母体胎盤（子宮内膜細胞）と胎子胎盤（絨毛膜細胞）分離がみられたのに対し、NT では満期を過ぎた例でも通常は妊娠中期までにみられる接着結合（tight junction）が認められる

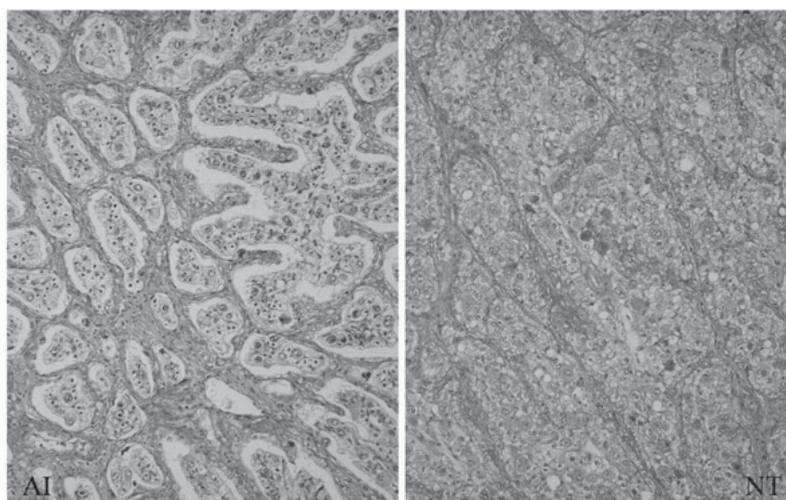


図 2

NT 胎盤（右）では上皮絨毛の強い結合が認められる。

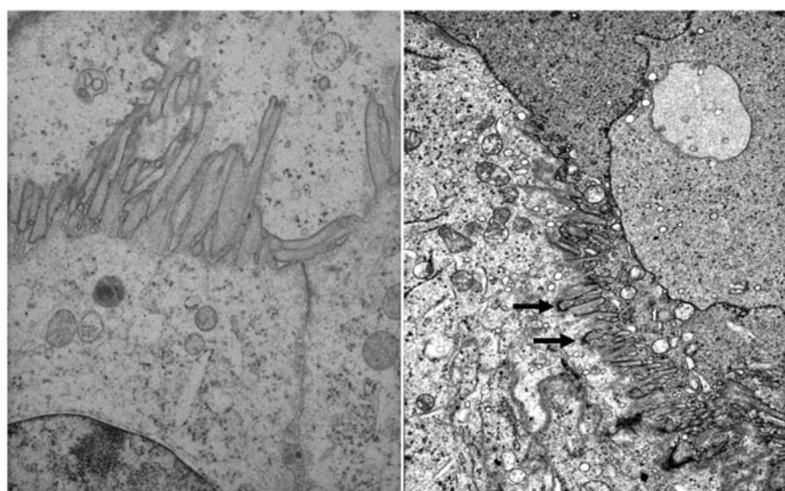


図 3

左：不規則な長さ・幅の微絨毛 右：tight junction（矢印）

部位も存在した（図 3）。これらの所見は、流・死産した NT 牛、生存して誕生した NT 牛との間で差異は認められなかった [佐藤ら (2001)、Sato et al. (2001b)、Sato et al. (2002a)、Sato et al. (2002b)]。

B. 免疫組織化学的検査

妊娠満期の NT 牛の胎盤においては trophoblast の過形成が観察されたことから流・死産、新生子死あるいは健康に誕生した NT の胎盤について、増殖期細胞マーカーである PCNA (Proliferating cell nuclear antigen、核内 DNA 合成に関連)、細胞周期の G1、S、G2、M 期に発現する Ki67 抗原に対する抗体を用いて免疫組織化学的染色を行ったところ、妊娠満期 AI 牛の trophoblast および母体胎盤（子宮内膜上皮細胞）では陽性像がみられなかったのに対し、NT 牛（流・死産および新生子死例）では多くの陽性像が認められた。生存 NT 牛では JB、H それぞれ 1 例ずつの trophoblast においてわずかな陽性像が認められたが、子宮

内膜上皮細胞に陽性像は認められなかった。また、NT 牛生存 4 例、死産 2 例、流産 1 例、新生子死 2 例の胎盤について、妊娠満期の母牛血中で増加するホルモンとして知られているエストロンサルフェート (OS) の局在を検索したところ、流産例 (胎齢 241 日) 以外の trophoblast および子宮内膜上皮細胞に陽性像がみられたものの、生存・死産の間に差異は認められなかった。AI 例でも同様の陽性所見はみられず、OS の局在について、NT に起因する特徴は認められなかった。

C. NT 以外の胎盤との比較

胎盤について観察される所見が NT 技術によるものかどうかを確認するため、胎齢初期の胎盤に関して、NT 技術以外で生産された例との比較を行った。胎齢 60～70 日の胎盤形成を、NT 胚移植 (NT:1 例)、NT 胚と体外受精 (IVF) 胚の同時移植 (NT&IVF:1 例)、過排卵処理胚移植 (MOET:2 例) について病理検査を行い、AI 牛 (AI:2 例) のそれと比較したところ、AI では 10～30mm の胎盤が確認されたのに対し、NT および NT&IVF では胎盤の発育はきわめて悪かった (図 4)。trophoblast の多層化は NT と NT&IVF で顕著に、MOET でまれに認められた。AI ではこのような所見はみられなかった [長谷川ら (2003)]。

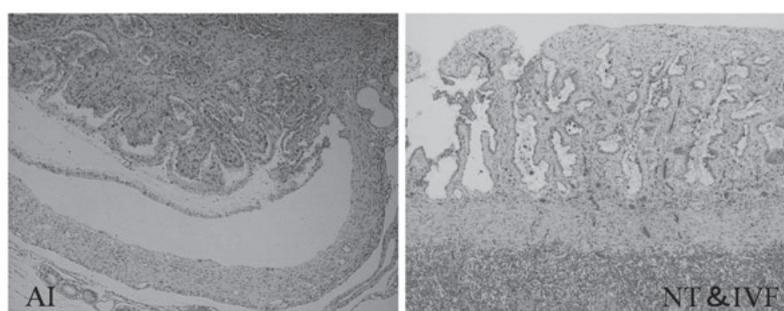


図 4

NT&IVF (右) では胎盤の発育は著しく悪い。

また、胎齢 184 日の体外受精胚移植 (IVF-ET) 受胎牛について胎盤形成状態を観察したところ、妊角のみに胎盤が形成されていたが、組織学的な異常は認められなかった。さらに、同例胎子の諸臓器にも肉眼的、組織学的な著変は認められなかった。

4. おわりに

NT 牛では、胎盤 trophoblast の過形成、臍帯血管退縮不全、内分泌器官の異常など病理学的特徴を有していたが、これらは全てに共通して観察される所見ではなかった。下垂体における ACTH 陽性細胞数の減少と妊娠満期の胎盤における trophoblast と子宮内膜上皮細胞の強固な接着は、NT 牛における分娩発来の遅延や在胎期間延長に関連した所見であると考えられた。流・死産あるいは生後直死した NT 牛の病理学的特徴を品種や核ドナーを加味してとりまとめたところ、肝臓の線維化、腎尿細管の形成不全等いくつかの所見は核ドナー牛の品種や性別、個体によって同様の傾向を示すこともあったが、同一核ドナー由来の NT 牛でも全く異なる所見を示す場合もあった。このことから、本研究では NT 技術によって生産された牛に共通する明確な病理学的特徴を明らかにすることはできなかった。

ある 20 歳の種雄牛由来の NT 牛では、ドナー細胞 (線維芽細胞) を採取した時点でかなり高齢であったにもかかわらず、4 頭の NT 牛が生産され [Kubota et al. (2000)]、うち 2 頭

は種雄牛として正常な後代を生産し、さらに正常な第2代クローン（リクローン）牛が作出された [Kubota et al. (2004)]。残り2頭のNT牛は肥育・と殺されたが、病理学的な異常は認められず、食肉としても非常に良い成績が得られた [Tian et al. (2005)]。こうした例があることを考慮すると、クローン牛の病理学的特徴を明確にするためには、それぞれ同一の核ドナー牛・レシピエント卵子・核移植技術等によって生産された複数の個体について比較検討し、データを蓄積することが重要であると考えられた。

引用文献

- 長谷川清寿・佐藤真澄・大島一修・佐々木恵美・安部亜津子・高仁敏光(2003)生産手法が異なる牛胚の子宮内での消長と胎子および胎盤の組織学的検索. 第11回日本胚移植研究会大会講要 53.
- 窪田力・野崎聡・轟木淳一・溝下和則・長野京子・佐藤真澄・高橋清也・居在家義昭(2001)体細胞クローン牛の繁殖性. 鹿児島県肉用牛改良研究所研究報告 42-45.
- 鬼塚剛・佐藤真澄・田中省吾・窪田力・田原則雄・渡邊洋一郎・米丸俊朗(1999)流・死産または死亡した体細胞クローン牛の病理組織学的検索. 第128回日本獣医学会講要 174.
- 佐藤真澄・窪田力・田中省吾・鬼塚剛・田原則雄・川崎健一・堀脇浩孝(2001a)体細胞クローン牛流・死産子の内分泌器官および胎盤の病理学的検討. 第131回日本獣医学会講要 127.
- 佐藤真澄・窪田力・田中省吾・鬼塚剛・田原則雄・川崎健一・堀脇浩孝(2001b)体細胞クローン牛胎盤の電子顕微鏡的観察. 第132回日本獣医学会講要 225.
- 佐藤真澄(2005)体細胞クローン牛の病理. 第139回日本獣医学会(獣医臨床繁殖学シンポジウム)講要 141.
- Kubota, C., Yamakuchi, H., Todoroki, J., Mizoshita, K., Tabara, N., Barber, M., Yang, X. (2000) Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA* 97(3):990-5.
- Kubota, C., Tian, X.C., Yang, X. (2004) Serial bull cloning by somatic cell nuclear transfer. *Nature Biotechnology* 22(6):693-4.
- Renard, J.P., Chastant, S., Chesne, P., Richard, C., Marchal, J., Cordommie, N., Chavatte, P., Vignon, X. (1999) Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. *Lancet* 354 (9163):1489-91.
- Sato, M., Onitsuka, T., Kubota, C., Tanaka, S., Tabara, N., Watanabe, Y., Tamotsu, M., Oozono, M., Todoroki, J., Mizoshita, K., Yamakuchi, H., Kawasaki, K., Horiwaki, H., Takahashi, S., Izaike, Y. (1999) Studies on the stillbirth of calves cloned by nuclear transfer from somatic cells. 1. Histopathological observations. 17th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology Proc.256.
- Sato, M., Kubota, C., Tanaka, S., Onitsuka, T., Tabara, N., Todoroki, J., Mizoshita, K., Yamakuchi, H., Kawasaki, K., Horiwaki, H. (2000) Studies on the stillbirth of calves cloned by nuclear transfer from somatic cells. 2. Observations on the endocrine organs and the placentas. 18th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology Proc.239.
- Sato, M., Kubota, C., Tanaka, S., Onitsuka, T., Tabara, N., Todoroki, J., Mizosita, K., Yamakuchi, H., Kawasaki, K., Horiwaki, H. (2001) Studies on the stillbirth of calves

cloned by nuclear transfer from somatic cells. 3. Electron microscopical observations on the placentomes. 19th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology Proc.224.

Sato, M., Kubota, C., Tanaka, S., Onitsuka, T. (2002a) Histopathological observations of the placentas of calves cloned from somatic cells. *Cloning and Stem Cell* 4: 295.

Sato, M., Kubota, C., Tanaka, S., Onitsuka, T. (2002b) Studies on the stillbirth of calves cloned by nuclear transfer from somatic cells. 4. Pathological observations on the conceptus. 20th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology Proc.193.

Sato, M., Kubota, C., Tanaka, S., Onitsuka, T. (2002c) Pathological characteristics of the calves cloned from somatic cells. *Veterinary Pathology* 39: 629.

Sato, M., Kubota, C., Tanaka, S., Rosol, T. J. (2005) Histopathological study on the adrenal glands of bovine clones. *Veterinary Pathology* 42: 723.

Tian, X. C., Kubota, C., Sakashita, K., Izaike, Y., Okano, R., Tabara, N., Curchoe, C., Jacob, L., Zhang, Y., Smith, S., Bormann, C., Xu, J., Sato, M., Andrew, S., Yang, X. (2005) Meat and milk compositions of bovine clones. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA* 128: 6261-6266.

注) 平成 21 年度問題別研究会「体細胞クローン技術の現状と将来展望」(畜産草地研究所資料、21-5) より転載

本技術レポートから転載・複製を行う場合は、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所の許可を得て下さい。

技術レポート 8号

体細胞クローン牛生産のための周産期と新生子管理 のマニュアル

新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業

「産業利用に向けた体細胞クローン牛に関する技術開発と調査」
の成果を中心に

発行日 2010年3月31日

発行 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構

畜産草地研究所

<http://nilgs.naro.affrc.go.jp/>

〒305-0901 茨城県つくば市池の台2

Tel 029-838-8600 (代表)

編者 渡邊伸也

