

総説

## 超音波診断装置を用いた妊娠末期におけるホルスタイン種 クローン胚由来産子の体重モニタリング法に関する研究

高橋正弘

### 要約

クローン胚由来産子は過大子の発生率が高く、そのため難産および死産の発生率が増加し、さらに出生後の生存率が低下した。ホルスタイン種産子の中手幅もしくは中足幅は生時体重と高い相関性が認められた。妊娠末期に超音波診断法により測定される胎子中手幅、また、その測定値から推定される胎子体重は、産子の中手幅および生時体重と近似していた。よって、妊娠末期の胎子中手幅の測定により生時体重が推定され、過大子が予測される場合には分娩誘起することにより、クローン胚由来産子の難産およびそれに起因する産子の損耗を最小限に防止できることが示された。

キーワード：クローン，難産，ホルスタイン種，中手幅，超音波診断法。

家畜繁殖技術は凍結精液による人工授精，胚移植，体外受精および培養などを経て，クローン技術へと発展してきた。クローン技術が期待されていることとして，家畜では育種改良および増殖 [1, 2]，絶滅が危惧されている希少種の遺伝的資源の保存 [3-5]，人医学では再生医療への応用 [6, 7]，有用物質生産のための遺伝子組換え家畜の生産 [8] などである。しかし，一方で，クローン胚由来産子では過大子，難産，死産および虚弱子など多発することが指摘されており [9-11]，クローン技術のフィールドでの実用化を目指すためには，分娩時においてクローン胚由来産子の生存性を高めることが必要不可欠である。そこで本研究は，それらの問題点を解決するために，調査研究を

実施した。

### 1 ホルスタイン種受精卵クローン胚由来産子の 特徴および分娩状況

クローン胚の作製手順は，以下の通りである。ドナー胚は，5%牛胎児血清加TCM199液 (Earle's salt, Gibco, USA) のドロップ中で，ホールディングピペットとカッティングニードルを用いて，5-6日齢胚の透明帯を切開して胚を透明帯から取り出し，口径の細いパステルピペットを用いてピペッティングにより割球に単離した。胚の割球が移植されるレシピエント卵子は，食肉処理場由来の交雑種（ホルスタイン種雌牛×黒毛和種雄牛）の卵巢から常法 [12] に準じて採取し，体外成熟培養22-24時

間後、顕微操作により10–15%量の細胞質とともに核質を除去した。除核後、CaイオノフォアA23187 (5  $\mu$ M, SIGMA) で5分間、シクロヘキシミド (10  $\mu$ g/ml, SIGMA) で4–6時間浸漬して活性化処理を行った。核移植操作は、単離したドナー割球を活性化処理したレシピエント卵子の透明帯内に挿入し、細胞融合装置 (ECM200, BTX, USA) を用いて電氣的融合処理 (0.75kv/cm, 50  $\mu$ 秒, 2回) を行った。融合液には、0.1mM硫酸マグネシウム, 0.05mM塩化カルシウムを含む0.3Mシュクロース液を使用した。細胞融合処理後のクローン胚の発生培養には、Tervitら [13] の5%牛胎児血清加卵管合成培養液を修正し、5%CO<sub>2</sub>, 5%O<sub>2</sub>, 90%空気, 湿度飽和, 38.5°Cの気相条件下で培養した。クローン胚は、核移植 (= 0日) 後6–7日に形態的に正常な桑実胚–脱出胚盤胞を20%子牛血清加TCM199液 (Earle's salt, Gibco, USA) に入れて0.25mlストローに1胚を封入して移植した。

ホルスタイン種受精卵クローン胚由来産子の特徴と分娩状況について、AIおよびETによる産子と比較検討した (表1)。クローン胚由来産子の生時体重は、AIおよびET産子と比較して有意に大きく (P < 0.05)、在胎日数はAI産

子と比較して有意に長かった (P < 0.05)。また、クローン胚由来産子の分娩難易度および難産率はいずれも対照群に比較して高く (P < 0.05)、尾位、死産、過大子および球節が攣縮・屈曲した状態の突球などが多発した (表2)。

受精卵クローン胚由来産子の在胎日数が延長するほど、生時体重が増加し、生時体重が増加すると分娩難易度も高くなる傾向が認められ、難産で生まれたものと正常分娩で生まれたものの生時体重は、それぞれ58.0  $\pm$  7.0kgと49.3  $\pm$  6.0kgであり有意な差が認められた (P < 0.05)。クローン胚由来産子は過大子の発生率が高く、そのため難産および死産の発生率が増加し、さらに出生後の生存率が低下することが示唆された。

産子の生時体重と母牛の骨盤サイズ (腰角幅, 寛幅, 坐骨幅および尻長) と難産率の関係 (表3) では、母牛の腰角幅において、NT区の難産群ではNT区の正常分娩群やAI・ET区の正常分娩群および難産群と比較し、有意に (P < 0.05) 大きかった。母牛の寛幅において、AI・ET区の難産群はNT区およびAI・ET区の正常分娩群と比較して、有意に (P < 0.05) 大きかった。産子の生時体重がある一定以上を超えると、骨盤サイズにかかわらず難産に陥るリスクが高

表1 受精卵クローン胚由来産子 (NT), 人工授精 (AI) および生体由来胚移植 (ET) によるホルスタイン種産子の出生状況

産子	生時体重(kg)	在胎日数(日)	分娩難易度	難産率 (%)
NT (n = 30)	51.9 $\pm$ 7.4 <sup>a</sup>	283.4 $\pm$ 5.4 <sup>a</sup>	2.2 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	30.0 <sup>a</sup>
♂ (n = 14)	53.9 $\pm$ 5.6	284.9 $\pm$ 5.0	2.4 $\pm$ 0.6	35.7
♀ (n = 16)	50.1 $\pm$ 8.5	282.0 $\pm$ 5.6	2.0 $\pm$ 0.7	25.0
AI (n = 1571)	45.2 $\pm$ 5.5 <sup>b</sup>	280.8 $\pm$ 5.8 <sup>b</sup>	1.7 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>	12.7 <sup>b</sup>
♂ (n = 859)	46.5 $\pm$ 5.5	281.2 $\pm$ 5.6	1.8 $\pm$ 0.7	15.1
♀ (n = 712)	43.5 $\pm$ 5.2	280.3 $\pm$ 5.9	1.7 $\pm$ 0.7	9.7
ET (n = 81)	45.3 $\pm$ 5.6 <sup>b</sup>	282.7 $\pm$ 7.5 <sup>a</sup>	1.8 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>	13.6 <sup>b</sup>
♂ (n = 45)	47.3 $\pm$ 5.3	285.0 $\pm$ 8.2	1.8 $\pm$ 0.8	13.3
♀ (n = 36)	42.7 $\pm$ 5.1	279.9 $\pm$ 5.4	1.7 $\pm$ 0.7	13.9

平均値  $\pm$  標準偏差, 同列異符号間で有意差あり (P < 0.05)。

分娩難易度: 1: 自然分娩, 2: ごく軽い介助, 3: 大人2–3人の牽引, 4: 多人数の牽引, 5: 帝王切開, 切胎術など外科的処置。分娩難易度3以上を難産。

表2 受精卵クローン胚由来産子 (NT), AIおよびETによるホルスタイン種産子の尾位, 死産, 過大子および突球の発生率

	尾位率 (%)	死産率 (%)	過大子率 (%)	突球率 (%)
NT (n=30)	23.3 <sup>a</sup> (7/30)	16.7 <sup>a,b</sup> (5/30)	10.0 <sup>a,b</sup> (3/30)	20.0 <sup>a</sup> (6/30)
AI (n=1571)	5.2 <sup>b</sup> (82/1,571)	3.8 <sup>c</sup> (60/1,571)	0.6 <sup>c</sup> (9/1,571)	1.8 <sup>b</sup> (28/1,571)
ET (n=81)	4.9 <sup>b</sup> (4/81)	4.9 <sup>b,c</sup> (4/81)	1.2 <sup>b,c</sup> (1/81)	1.2 <sup>b</sup> (1/81)

同列異符号間で有意差あり (P<0.05).  
過大子: 生時体重が60kg以上.

表3 受精卵クローン胚由来産子 (NT), 人工授精 (AI) および生体由来胚移植 (ET) 由来産子を娩出した雌牛の骨盤サイズ (腰角幅, 寛幅, 坐骨幅, 尻長) と分娩状況

産子由来	分娩状況	生時体重(kg)	腰角幅 (cm)	寛幅 (cm)	坐骨幅 (cm)	尻長 (cm)
NT (n=30)	正常分娩 21 (70.0%)	49.3±6.0 <sup>a</sup>	56.5±2.9 <sup>a</sup>	51.1±2.0 <sup>a</sup>	38.7±3.0	54.7±2.0
	難産 9 (30.0%) <sup>a</sup>	58.0±7.0 <sup>b</sup>	59.8±2.7 <sup>b</sup>	53.5±3.6 <sup>a,b</sup>	39.5±3.9	55.4±2.6
AI・ET (n=110)	正常分娩 97 (88.2%)	44.5±5.1 <sup>c</sup>	57.2±2.9 <sup>a</sup>	51.5±2.2 <sup>a</sup>	38.6±2.9	54.3±2.1
	難産 13 (11.8%) <sup>b</sup>	47.4±7.6 <sup>a,c</sup>	57.9±2.1 <sup>a</sup>	53.0±2.3 <sup>b</sup>	39.0±2.8	54.9±2.0

同列異符号間で有意差あり (P<0.05)

くなる傾向が認められており, 難産の発生には, 母牛の骨盤サイズ以上に産子の生時体重がかなりの影響を及ぼすと考えられた.

受胎牛の周産期疾病の発生率は, 受精卵クローン胚由来産子の受胎牛が66.7% (20/30) であり, ホルスタイン種ET産子の受胎牛の発生率30.6% (11/36) より2倍以上有意に (P<0.01) 高いことが認められた.

ホルスタイン種受精卵クローン胚 (NT) および生体由来胚移植 (ET) 由来産子を分娩した受胎牛の繁殖状況は, 以下の通りであった. 受精卵クローン胚由来産子を分娩した受胎牛20頭における分娩後の初回AI受胎率 (%) は, 正常分娩群で46.7% (7/15), 難産群0% (0/5), 合計35.0% (7/20) で, 空胎日数は160.1±92.8日であった. ET産子の受胎牛29頭における初回AI受胎率 (%) は, 正常分娩群42.9% (12/28), 難産群0% (0/1), 合計41.4% (12/29), 空胎日数は124.7±68.3日であった. NT区で初回AI受胎率が低く, 空胎日数が長くなる傾向が認められたものの, 有意差は認められなかった.

2 ホルスタイン種受精卵クローン胚由来産子における中手幅および中足幅と生時体重の関係  
娩出直後のホルスタイン種産子の中手幅もしくは中足幅の最狭部横径幅 (皮膚-骨-皮膚) をノギスにより測定し, 生時体重や難産との関係を調査した.

ホルスタイン種産子 (n=187) の中手幅と生時体重の関係は,  $y = 2.152x_1 - 15.015$ ,  $r = 0.780$  (P<0.05), そのうち, ホルスタイン種クローン胚由来産子 (n=30) については,  $y = 1.662x_1 + 0.907$ ,  $r = 0.740$  (P<0.05), ホルスタイン種AIおよびET産子 (n=157) では,  $y = 2.232x_1 - 17.527$ ,  $r = 0.780$  (P<0.05) であった.

ホルスタイン種産子の中足幅と生時体重の関係では,  $y = 2.169x_2 - 7.204$ ,  $r = 0.684$  (P<0.05), そのうち, ホルスタイン種クローン胚由来産子は,  $y = 1.360x_2 + 15.878$ ,  $r = 0.487$  (P<0.05), ホルスタイン種AIおよびET産子は,  $y = 2.268x_2 - 10.087$ ,  $r = 0.711$  (P<0.05) であった.

中手幅もしくは中足幅が大きくなるほど難産

の発生は増加し、難産の発生率は、中手幅が30mm未満の場合は6.7% (7/105)であり、中手幅が30mm以上の場合は32.9% (27/82), 中足幅が26mm未満の場合は9.8% (11/112)であり、中手幅が26mm以上の場合は30.7% (23/75)で、それぞれ両群の間に有意な差が認められた ( $P < 0.01$ )。中手幅もしくは中足幅の測定により生時体重や難産の推測が可能であることが示された。

### 3 超音波診断装置を用いた妊娠末期におけるホルスタイン種クローン胚由来産子の体重モニタリング

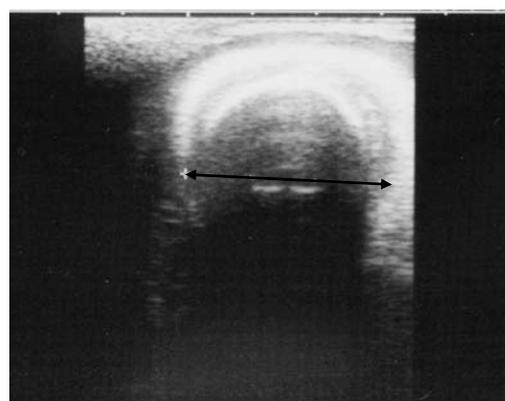
ホルスタイン種クローン胚由来産子は、過大子による難産や死産の発生率が高い。そこで、妊娠末期においてその胎子体重をモニタリングし、生時体重を推測することが必要不可欠である。本試験では、ホルスタイン種クローン胚のETにより単子で妊娠しているホルスタイン種経産牛14頭 (受精卵クローン胚由来胎子妊娠牛11頭, 体細胞クローン胚由来胎子妊娠牛3頭) を対象に、分娩予定日のおよそ1カ月前より1週間おきに胎子中手幅を超音波診断装置により測定し、その値から胎子体重を推測した。なお、体細胞クローン胚の作製手順は、受精卵クローン胚と同様であり、供核細胞としては、11才のホルスタイン種経産牛の大腿部筋肉細胞を用いた。

直腸壁を介して探触子を胎子前肢もしくは後肢にあて、胎子の中手もしくは中足における最狭部横径幅 (皮膚-骨-皮膚) を測定した。背側と腹側の測定値に差は認められなかったが、エコー画像としては異なって描出されるため、それぞれのエコー画像を例示した (図1)。超音波診断装置は、大動物用超音波断層装置EUB-905 ((株)日立メディコ, 東京) を用いた。探触子はEUP-032T (5 MHz) を使用し、Bモードにより測定した。

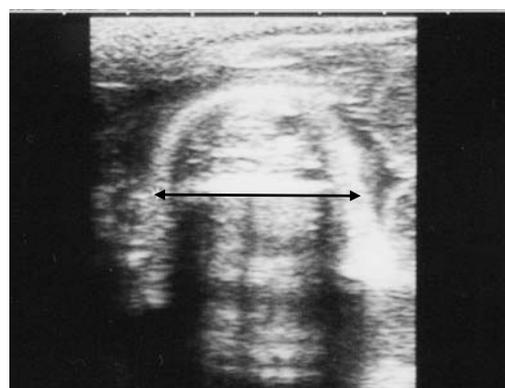
ホルスタイン種経産牛13頭において、分娩前1週間内の胎子中手幅および推定胎子体重 ( $30.2 \pm 2.2\text{mm}$ ,  $50.0 \pm 4.7\text{kg}$ ) は、産子の中手幅

および生時体重 ( $30.0 \pm 2.1\text{mm}$ ,  $51.2 \pm 5.5\text{kg}$ ) と近似していて、分娩1週間前では超音波診断法により生時体重を推定できると思われた (表4)。

胎子中手幅が30mm以上で分娩誘起を実施したA群は、胎子の中手幅が30mm以上で分娩誘起を実施しなかったB群と比較して、在胎日数で2.2日短いにもかかわらず、生時体重で1.9kg大きかった (表5)。A群では、1頭で難産が発生し4頭は正常分娩であり、死産の発生はなく、もし分娩誘起を実施していなければ、さらに在胎日数が延長して生時体重が増加し、過大子症候群で難産になった可能性は高いと考えられた。B群では、胎子中手幅が30mm以上であったが分娩誘起を実施せず、2頭とも正常分娩であり、死産の発生はなかった。胎子中手幅が30mm未満



(背側面)



(腹側面)

矢印間を測定, 1目盛り10mm.

図1 妊娠末期における牛胎子中手のエコー画像

表4 妊娠末期におけるホルスタイン種クローン胎子の中手幅測定による推定胎子体重とその分娩状況

受胎牛 No	胎子中手幅 (mm) (推定胎子体重, kg)					産子中手幅 (mm)	生時体重 (kg)	在胎日数 (日)	分娩難易度	性	産子中足幅 (mm)	備考
	分娩前の日数											
	35-29	28-22	21-15	14-8	7-1							
(受精卵クローン産子)												
1	-	30.8 (51.3)	-	27.3* (52)	32.9 (55.8)	32	54	290	2	♂	28	*中足幅
2	-	○	○	30 (49.5)	31.1 (51.9)	31.5	52	275	2	♂	27	分娩誘起
3	○	28.5 (46.3)	28.8 (47)	30 (49.5)	32.1 (54.1)	32	53	280	2	♂	27	
4	-	27.3 (43.7)	27.2 (43.5)	26.4 (41.8)	28.1 (45.5)	28	47	282	1	♀	25	
5	-	24.9 (38.6)	○	○	27 (43.1)	26.5	52	286	2	♀	24	
6	-	○	28.6 (46.5)	29.2 (47.8)	○	31	50	288	2	♀	27.5	
7	-	-	-	27.8 (44.8)	29.6 (48.7)	29.5	45	277	2	♀	27	
8	○	○	30.2 (50)	29.8 (49.1)	31.1 (51.9)	31.5	56	289	2	♀	27.5	分娩誘起
9	-	-	×	○	31.2 (52.1)	30	56	282	1	♀	25	分娩誘起
10	-	-	25.4 (39.6)	27.2 (43.5)	27 (43.1)	27.5	40	276	2	♀	25	
11	×	○	○	○	27.2 (43.5)	27	44	287	1	♀	22	
(体細胞クローン産子)												
12	29.5 (48.5)	×	○	30.9 (51.5)	31.9 (53.6)	31.5	58	285	2	♀	27	分娩誘起
13	31.3 (52.3)	○	-	31.2 (52.1)	32.4 (54.7)	32	55	283	3	♀	27	分娩誘起
14	-	○	-	×	31.1 (51.9)	30.5	54	265	5	♀	25	受胎牛の脱臼帝王切開手術, 死産

○: 中手幅もしくは中足幅の測定不可であったが胎子の体の一部に触知可能.

×: 中手幅もしくは中足幅の測定不可で, また胎子にも触知不可.

-: 実施せず.

表5 胎子中手幅および分娩誘起の有無と産子中手幅 (mm), 生時体重 (kg), 在胎日数 (日), 分娩難易度の関係

群(頭数)	胎子中手幅(mm)	分娩誘起の有無	産子中手幅(mm)	生時体重(kg)	在胎日数(日)	分娩難易度
A (n = 5)	≥30mm	有	31.3±0.8 <sup>a</sup>	55.4±2.2 <sup>a</sup>	282.8±5.1	2.0±0.7
B (n = 2)	≥30mm	無	32.0±0.0 <sup>a</sup>	53.5±0.7 <sup>a,b</sup>	285.0±7.1	2.0±0.0
C (n = 5)	<30mm	無	27.7±1.2 <sup>b</sup>	45.6±4.4 <sup>b,c</sup>	281.6±5.0	1.6±0.5

平均±標準偏差.

同列異符号間で有意差あり(p<0.05).

で分娩誘起を実施しなかったC群は, A群より生時体重で9.8kg小さく, 5頭とも正常分娩であった.

これらより, 超音波診断装置により過大子が

予測される場合には, 分娩誘起などの処置をすることで, 難産およびそれに起因する死産および生後直死を最小限に防止できることが示された.

本研究の遂行にあたり、ご指導とご校閲を賜りました帯広畜産大学畜産学部の三宅陽一教授、小岩井農場技術研究センターの後藤太一前所長および岩手大学農学部の家義昭教授に深甚なる謝意を表します。また、研究を進めるにあたりご協力いただきました家畜バイテクセンターの土屋秀樹氏および農場職員に感謝いたします。最後に、この総説は2007年度に岐阜大学連合大学院に提出した論文を元に作成いたしました。ページ数の都合上、かなり簡略化し、説明不足のところも多々あるとおもわれます。詳細については、既発表の以下3論文を参考にさせていただきます。① 日獣会誌 2000; 53: 387-390, ② J Reprod Dev 2001; 47: 105-108, ③ J Vet Med Sci. 2005; 67: 807-811.

#### 引用文献

- [1] Hirooka H. Evaluation of testing schemes with clones for carcass traits in beef cattle. *Anim Sci J*, 71, J19-J25 (2000)
- [2] Ruane J, Klemetsdal G, Sehested E. Views on the potential impact of cloning on animal breeding and production. *Acta Agris Scand Sect A Animal Sci*, 47, 209-212 (1997)
- [3] Lanza R, Cibelli J, Diaz F. Cloning of an endangered species (*Bos Gaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning*, 2, 79 (2000)
- [4] Wells D, Misica P, Tervit H. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. *Reprod Fertil Dev*, 10, 369-378 (1998)
- [5] Wells D, Misica P, Tervit H. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol Reprod*, 60, 996-1005 (1999)
- [6] Dai Y, Vaught T, Boone J. Targeted disruption of the  $\alpha$ 1, 3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nature Biotechnology*, 20, 251-255 (2002)
- [7] Lai L, Kolber-Simonds D, Park K. Production of  $\alpha$ 1, 3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*, 295, 1089-1092 (2002)
- [8] Brink M, Bishop M, Pieper F. Developing efficient strategies for the generation of transgenic cattle which produce biopharmaceuticals in milk. *Theriogenology*, 53, 139-148 (2000)
- [9] Garry F, Adams R, McCann J. Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning. *Theriogenology*, 45, 141-152 (1996)
- [10] Willadsen S, Janzen R, McAlister R. The viability of late morulae and blastocysts produced by nuclear transplantation in cattle. *Theriogenology*, 35, 161-170 (1991)
- [11] Yang X, Anderson G. Micromanipulation of mammalian embryos: principles, progress and future possibilities. *Theriogenology*, 38, 315-335 (1992)
- [12] Hamano S, Kuwayama M. In vitro fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of individual donors: A comparison between the cutting and aspiration method. *Theriogenology*, 39, 703-712 (1993)
- [13] Tervit H, Whittingham D, Rowson L. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J Reprod Fert*, 30, 493-497 (1972)