

黒毛和種種雄牛候補に一次選抜された子牛からの 体細胞クローン牛生産手法の検討（第2報）

長谷川清寿 佐々木恵美 安部亜津子 中村亮一 高仁敏光

要約 体細胞クローン産子を種雄牛検定に活用することを目的に、黒毛和種種雄牛候補である5か月齢の雄子牛の体細胞から生産したクローン牛（CH1およびCH2）の発育および肥育成績を調べた。その結果、体重および体高は60週齢時まで概ね相似して推移したが、64から68週齢にかけてCH2の体重が減少し、肥育終了時まで約50kgの体重差を維持した。調査対象としたクローン牛は22ないし23か月齢までの肥育管理が可能で、と殺直前の体重はCH1が746kg、CH2が700kgで、枝肉等級はCH1がA-3、CH2がA-2であった。バラ厚（6.2 vs 6.0cm）および皮下脂肪厚（1.5 vs 1.6cm）の値は近似傾向であったが、枝肉重量（451 vs 415kg）、胸最長筋面積（55 vs 47cm²）およびBMS No.（4 vs 2）は同様な傾向が認められなかった。病理組織学的検査によって、採材可能であった諸臓器（肝、腎、心、肺、脾、骨格筋、皮膚）に構造的な異常所見は認められなかった。これらのことから、適正な飼養管理を行えば、種雄牛の産肉能力検定に体細胞クローン牛が利用できる可能性が推察された。

畜産関係研究機関およびそれに準じる公的機関での勤務者およびその家族161名を対象に体細胞クローンに関する意識調査を行った結果、“体細胞クローン”という言葉への違和感はあるが、当該牛肉を食品として受け入れることへの抵抗感は少なかった。同時に、CH1の食味調査を行い、提供した牛肉サンプルの総合的な食感については9割近く（87.3%）が「おいしい」あるいは「ややおいしい」との回答であったため、体細胞クローン牛肉の食肉利用が不可能ではないと考えられた。

キーワード：牛 体細胞核移植 クローン検定 肥育 病理組織

世界初の体細胞クローンの誕生¹⁾から7年余りが経過し、国内では既に42の研究機関で474頭の体細胞クローン牛が生産された²⁾。これら体細胞クローンに関する知見が徐々に得られ、生育した個体での“クローン牛特有の異常性”は現状での科学水準において明確には認められていない³⁾。並行して、体細胞クローン牛の食品としての安全性に関する調査研究は主にマウス等の実験小動物を用いて行われており、その多くのデータによっても有害な影響は認められていない⁴⁾。そして最近では、牛の体細胞クローン研究は、食品としての直接的な利用を目指す方向性に加え、検定牛として種畜の評価に利用することに重点が置かれるようになってきている⁵⁻⁷⁾。

我々は、体細胞クローン検定モデル⁸⁾の実証とその利用性を検証することを主目的として、種雄牛候補牛の体細胞から2頭の体細胞クローン牛を生産し、それらの初期発育の相似性等を調べ、結果の一部について既に報告した⁹⁾。今回は、それら2頭の体細胞クローン牛の発育、枝肉等を追加的に調査した（調査1）。併せて、1頭の体細胞クローン牛由来の牛肉を用いて食味等の調査を行った（調査2）。

材料および方法

調査1

調査対象（図1）は、1頭の黒毛和種種雄牛候補（H；5か月齢）から採取、分離した皮膚繊維芽細胞をドナー核として核移植¹⁰⁾を行い、2頭の受胎牛から生産した2頭のクローン牛（CH1およびCH2）とした。皮膚組織あるいは血液サンプルを採取して、CH1およびCH2のマイクロサテライトDNA（MS-DNA）多型領域¹¹⁾を解析するとともに、CH1およびCH2ではレシピエント卵子の由来個体が異なるためミトコンドリアDNA（mt-DNA）のD-loop領域の塩基配列^{12,13)}を直接シーケンスして調べた。細胞提供牛およびクローン牛は全て当センター内で生産し、クローン牛は概ね同一の環境下で去勢肥育牛として飼育した。肥育開始月齢は8か月齢（24週齢）に設定し、飼養管理は当センターで作成したマニュアル¹⁴⁾に準拠した。調査対象としたクローン牛は、と殺（CH1：22か月齢、CH2：23か月齢）まで定期的な発育調査（体重および体高）を行った。と殺に伴う調査については、食肉処理場で一般牛と同様な臨床検査およびと畜検査を受けた後に行った。すなわち、と畜検査直後に肉眼所見を記録するとともに病

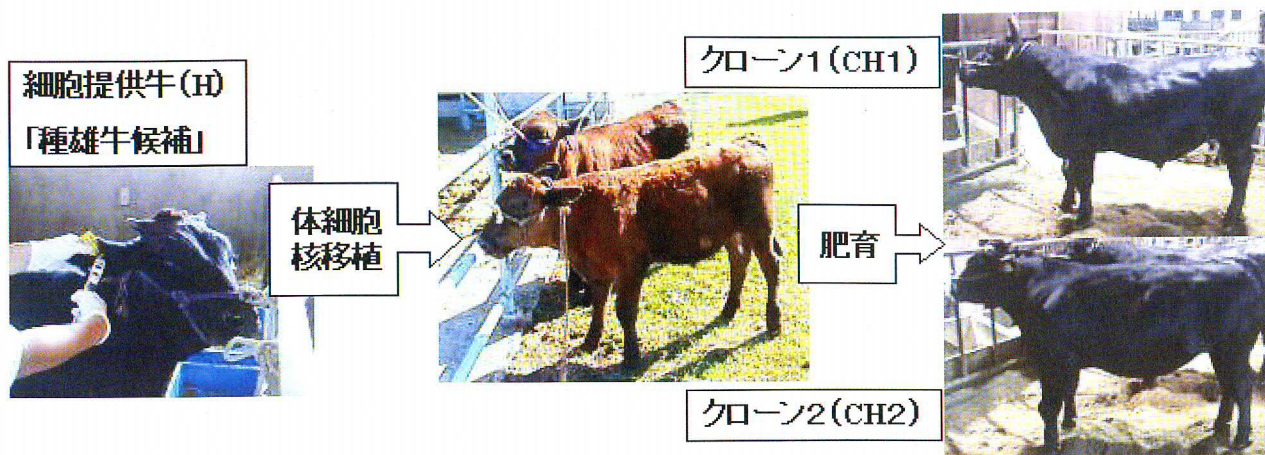


図1 調査対象とした体細胞クローン牛

CH1およびCH2について、マイクロサテライトDNA型は細胞提供牛と一致し、ミトコンドリアDNA型はD-loop領域のダイレクトシーケンスによって同じ型と判定。

理組織学的検査のためのサンプリングを行い、その翌日に枝肉調査を行った。ただし、調査用サンプルを除き、と体の全ての部位は焼却処分した。

調査2

体細胞クローンに関する意識および食味調査は、2005年7月から12月に行った。調査方法は、事前に作成した調査票を食肉サンプル（CH1の枝肉の一部を食肉用に加工）と同時に被験者に渡し、それを回収する方法で行った。調査票の設問は、体細胞クローン牛肉の食品としての利用性を中心テーマとして設定した（詳細については割愛）。被験者の範囲は、畜産関係研究機関およびそれに準じる公的機関での勤務者およびその家族で、調査への理解が可能かつ協力の意志が署名で確認できる者に限定した（鳥根県内外13機関、161名）。被験者に提供する食肉サンプルの採取部位は任意とし、調理方法はそれぞれの被験者の自由とした。

成 績

調査1

体細胞クローン牛CH1とCH2のMS-DNA型は、体細胞を採取したHと同一タイプであった。また、CH1とCH2のmt-DNA型（図2）も同一タイプであった。

発育測定値（図3）について、体細胞クローン牛の体重は生時ではCH1が52.8kg、CH2が44.4kgであり、細胞提供牛H（35.8kg）と比べて大きい傾向であったが、64週齢まで概ね相似して推移した。その後、CH2の体重が64から68週齢にかけて36kg減少してCH1との体重差は約50kgとなり、そのまま肥育終了時まで推移した。体高については、飼養期間中概ね相似して推移した。肥育成績（表1）について、と殺直前の体重はCH1が746kg、CH2が700kgであり、肥育期間中のDGはそれぞれ0.90および0.75であった。（社）日本食肉格付協会による枝肉検査¹⁵⁾の結果、枝肉重量、ロース芯面積、バラ厚、皮下脂肪厚、

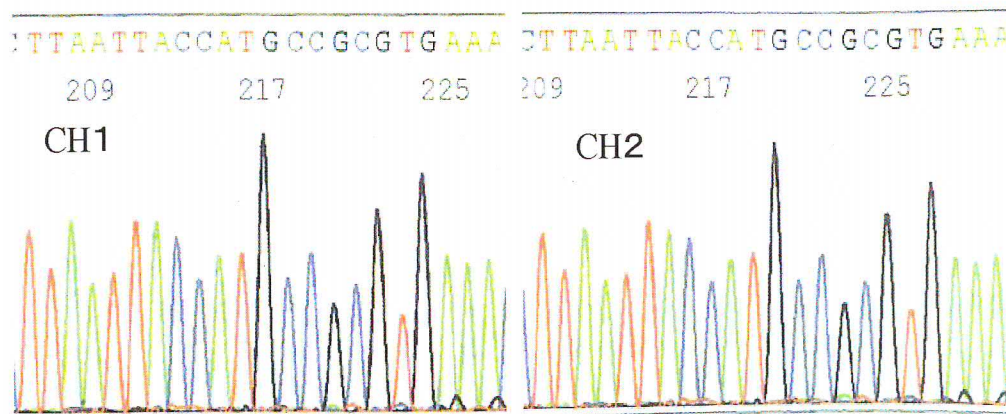


図2 mtDNAのD-loop領域の塩基配列解析

ダイレクトシーケンスによって塩基配列を決定、その一部を示す。2頭の体細胞クローン牛（CH1およびCH2）のmtDNA型は同タイプ。

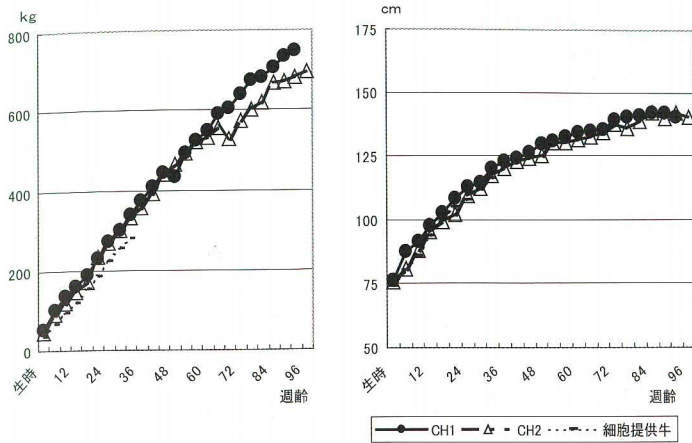


図3 発育値の推移

体細胞クローン牛（CH1およびCH2）は概ね同一環境で飼養管理を行い、生後から2週間間隔で体重（左図）および体高（右図）を測定。細胞提供牛については32週齢までの発育値を示す。

表1 肥育成績

調査項目	体細胞クローン牛	
	CH1	CH2
と殺時月齢	22	23
週齢	94	99
日齢	664	693
体重 (kg)	746	700
肥育期間中の一日当たり増体量 (kg)	0.90	0.75
枝肉重量 (kg)	451	415
胸最長筋面積 (cm ²)	55	47
バラ厚 (cm)	6.2	6.0
皮下脂肪厚 (cm)	1.5	1.6
推定歩留 (%)	73.7	72.9
BMS No.	4	2
肉色 No.	3	4
枝肉等級	A-3	A-2

表2 病理組織学的検査成績

	CH1	CH2
臓器の肉眼所見	出血性肝炎，肺炎，腸漿膜炎，その他著変なし	壊死性肝炎，肺炎，その他著変なし
組織所見（採材臓器：肝，腎，脾，肺，心，骨格筋，皮膚）	肝の富脈斑，鋸屑肝様所見，細気管支内に若干の細胞浸潤などがみとめられたが，基本構造に著変なし	肝の線維化・石灰化，肝・腎などで好酸球や巨細胞の浸潤などが認められたが，基本構造に著変なし
総合所見	全ての所見が一般の肥育牛で認められている所見である 組織所見において，基本構造に著変が認められない	



図4 第6・第7肋骨間切開面
枝肉等級は，CH1がA-3，CH2がA-2.

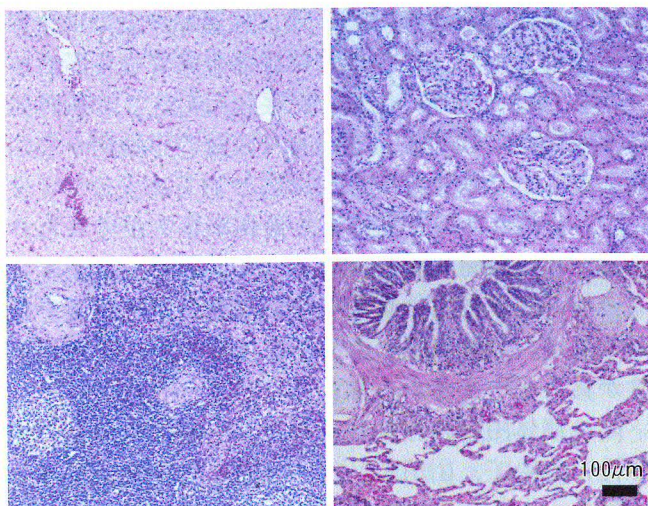


図5 体細胞クローン牛（CH1）の主要臓器における組織像
肝（左上），腎（右上），脾（左下）および肺（右下）に
構造的異常は認められない。

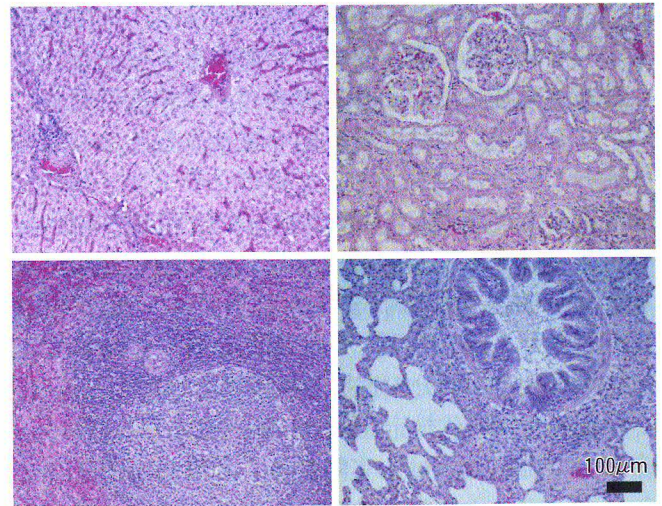


図6 体細胞クローン牛（CH2）の主要臓器における組織像
肝（左上），腎（右上），脾（左下）および肺（右下）に
構造的異常は認められない。

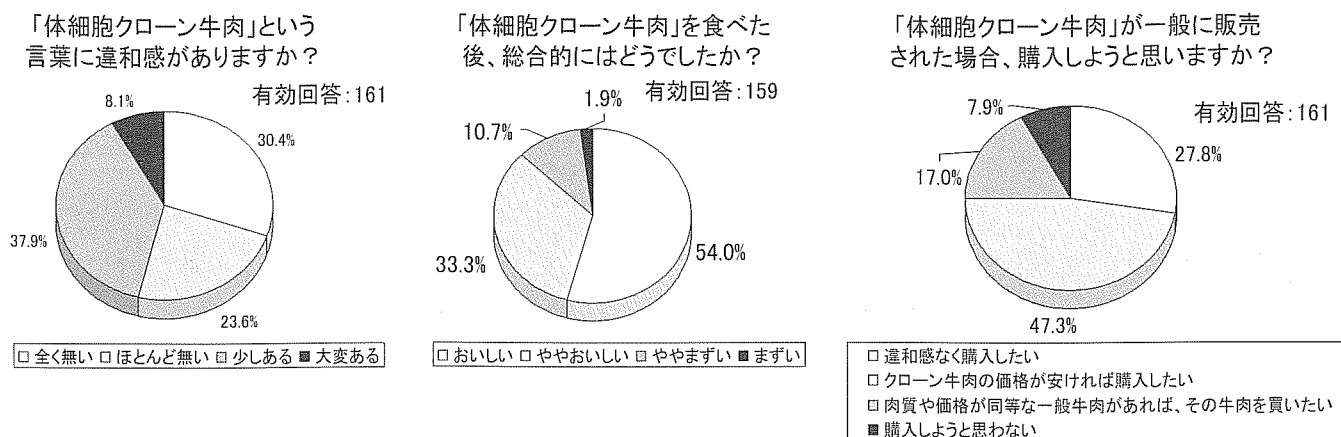


図7 食味調査結果の概要

被験者総数161名。性別は男性125名 (77.6%)、女性36名 (22.4%)。所属別では県関係機関37名 (23.0%)、それ以外124名 (77.0%)。

BMS No.等が総合評価され、枝肉等級 (歩留一肉質) はCH1がA-3、CH2がA-2であった (図4)。また、と畜検査および病理組織学的所見 (表2) は、肥育牛で日常的に確認されている所見¹⁶⁾であった。特に、採材可能であった諸臓器 (肝、腎、心、肺、脾、骨格筋、皮膚) の組織像 (図5、6) において、構造的な異常所見は認められなかった。

調査2

体細胞クローンに関する意識および牛肉の食味調査 (図7) の結果、「体細胞クローン牛肉という言葉への違和感」は半数近く (46.0%) が感じており、「総合的なおいしさ」について、9割近く (87.3%) が「おいしい」あるいは「ややおいしい」とした。さらに、今後一般販売された場合の購入意欲については、「価格が安ければ購入する」との回答が半数近く (46.7%) を占め、「購入しない」としたのは1割に満たなかった (7.9%)。

考 察

種雄牛選抜における体細胞クローン検定の意義について、広岡^{17,18)}は育種学的な見地からその有効性を述べている。すなわち、1頭のクローンメンバーを解体して検定する体細胞クローン検定の正確度は、一種雄牛当たり7頭の後代を持つ後代検定に相当するという論説である。また、古川¹⁹⁾は、遺伝率0.4程度とされる経済形質 (例：脂肪交雑) において、クローン検定2頭分の選抜の正確度を算出した場合、その正確度は後代検定10頭分に相当するとしている。そして、山田ら⁶⁾は、実際に黒毛和種体細胞クローン牛とそのドナー牛を2セット用いて比較し、その結果として、環境要因とみられる発育差が認められるが、BMS No.や胸最長筋の粗脂肪含量などでの相

似性を示唆している。さらにまた、クローン牛間では高い相似性が認められるが、個体のコンディションが大きく影響するとも指摘している。

我々は、5か月齢の種雄牛候補から2頭のクローン牛を生産し、産肉能力検定モデル⁸⁾の提示を実験当初の目標とした。この生産モデルによれば、後代検定の結果が判明する約6か月前に、クローン検定の結果が判明することとなる。しかし、種雄牛候補が実際には種畜として利用されなかったため、想定していたモデルを実証することができなかった。このため、今回の調査では、出生から育成期の発育については細胞提供牛とクローン牛2頭、肥育成績についてはクローン牛2頭間での比較を試みた。

出生から24週齢までの発育値は、調査対象とした2頭のクローン牛間では極めて相似しており、細胞提供牛とも相似していた。肥育飼養期間中では、体高発育値はクローン牛間で相似して推移した。その一方、体重発育値については、64週齢時までは相似して推移したが、その後大幅な体重発育の停滞を示したクローン個体 (CH2) が存在した。この個体には同時期から軽度の視覚障害や四肢の浮腫がみられたことから、体重減少の主要原因としては、ビタミンAコントロールの失宜による摂食不良²⁰⁾が考えられた。ただ、体重発育が飼育管理の影響を受けやすいことを考慮すれば、体高発育値の推移で相似性を判断すれば、調査対象としたクローン牛間に発育相似性があるといえるかも知れない。

同一個体由来の体細胞クローン牛間の産肉性の相似性について、山田ら⁶⁾は、4頭の体細胞クローン去勢牛から得られた枝肉成績について分析し、BMS No.および皮下脂肪厚のバラツキがその他の項目 (枝肉重量、胸最長筋面積およびバラ厚) と比べて

大きいという結果を得ている。また、坂下ら⁵⁾は、2頭の体細胞クローン去勢牛の肥育試験を行い、枝肉重量（437 vs 414kg）とBMS No.(7 vs 9)以外の形質、すなわち胸最長筋面積（58 vs 56cm²）、バラ厚（8.7 vs 8.7cm）および皮下脂肪厚（3.3 vs 3.3cm）で、全きょうだい牛や分割卵クローンと比べて相似性が高いと報告している。同様に我々の成績を比較した場合、バラ厚（6.2 vs 6.0cm）および皮下脂肪厚（1.5 vs 1.6cm）で相似性が高く、枝肉重量（451 vs 415kg）、胸最長筋面積（55 vs 47cm²）およびBMS No.(4 vs 2)では相似性が低いと考えられた。既報と必ずしも一致しないところがあるため、調査対象としたクローン牛間の枝肉成績が総合的に相似しているかどうかを明確に断言することができなかった。しかしながら、今回の肥育および枝肉調査での重要なポイントは、(1) 22ないし23か月齢までの肥育管理が可能であったこと、(2) と殺後の病理組織学的検査で体細胞クローン技術に起因すると考えられる所見はTianらの報告²¹⁾と同様に検出されなかったことである。したがって、適正な飼養管理を行えば、種雄牛の産肉能力検定に体細胞クローン牛が利用できる可能性が推察された。そして、体細胞クローン検定を実際に種雄牛検定に利用することを想定すれば、(1) 体細胞採取時期やクローン牛生産数を含めた調査設定、(2) 検定成績の信頼性やその活用方策、(3) クローン検定を実際に行う場合の費用対効果などが今後の検討課題になると考えられた。

検定に用いたクローン牛が食肉としての出荷や販売ができれば、検定コストを低減させることができると思われる。しかし、体細胞クローン牛由来生産物は、現状では食用としての出荷・販売が自粛され、このことがコスト試算の障壁となっている。また、国内では、食肉としての成分分析⁶⁾や慢性毒性試験¹⁾が試みられ、クローンに関する意識調査結果²²⁻²⁴⁾も公表されてきている。その反面で、体細胞クローン由来牛肉の食味調査は稀少で詳細な報告は見あたらない。以上の点から、我々は体細胞クローンに関する意識および食味調査が重要であると考えた。今回の調査の対象とした被験者は、“体細胞クローン”という言葉への違和感はあるが、当該牛肉を食品として受け入れることへの抵抗感は比較的小さいことが推察された。また、提供した体細胞クローン牛肉サンプルの食感概ね良好であったと判断できたため、仮に出荷・販売が可能な状況になれば、食肉利用が不可能ではないと考えられた。さらに、

消費者を意識しながら行政サイドとの意志疎通を図っていく必要性を再認識できたという点で、我々にとって極めて意義深い調査結果であった。その一方で、この種の調査では不特定多数の一般消費者からの意見が十分に得られることが理想であるが、今回の調査においては被験者を畜産関係者に限定したため、必ずしも一般消費者の意見と一致するものではないことも認識しておく必要がある。そして、これらの調査結果は、黒毛和種牛由来の材料を用いた核移植およびその周辺技術を開発する場合、あるいは、それらの技術を子牛生産や育種改良手法として検討していく場合の礎としたい。

謝 辞

この研究に係る病理組織検査にご協力いただいた、独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構動物衛生研究所佐藤真澄氏、ならびに県家畜衛生研究所および食肉衛生検査所の関係諸氏に深謝いたします。また、体細胞クローンに関する意識および食味調査にご協力いただいた関係者の皆様方に感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) kato Y., et al. *Science*, 282: 2095-2098. 1998.
- 2) 農林水産省農林水産技術会議事務局. 家畜クローン研究の現状について, <http://www.s.affrc.go.jp/docs/press/2005/1128b.htm>, 2005.
- 3) 熊谷 進. 「バイオテクノロジー応用食品の安全性確保及び高機能食品の開発に関する研究」分担研究報告書, <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/clone/index.html>, 厚生労働省. 2003.
- 4) 財団法人畜産生物科学安全研究所. クローン牛生産物性状調査の概要, http://www.maff.go.jp/www/press/cont/20020813press_2.html, 農林水産省. 2002.
- 5) 坂下邦仁ら. 鹿児島県畜産試験場研究報告, 36: 29-33. 2002.
- 6) 山田信一ら. 日本畜産学会報, 75: 165-177. 2004.
- 7) 児玉英樹ら. 岩手県農業研究センター研究報告, 5: 81-87. 2005.
- 8) 長谷川清寿ら. 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, 35-42. クローン国際シンポジウム企画委員会. つくば. 2003.
- 9) 長谷川清寿ら. 鳥根県立畜産試験場研究報告,

- 37: 1-5. 2004.
- 10) Takahashi S., et al. *Cloned Animal and Placentation*. 30-35. Yokendo. Tokyo. 2000.
- 11) Yazawa S., et al. *Animal Science and Technology*, 68: 1166-1169. 1997.
- 12) 春海 隆ら. 日本畜産学会報, 65: 149-151. 1994.
- 13) 武田久美子. 日本畜産学会報, 68: 1161-1165. 1997.
- 14) 成相伸久ら. 鳥根県立畜産試験場研究報告, 37: 19-24. 2004.
- 15) 社団法人日本食肉格付協会. 枝肉取引規格解説書 (牛枝肉取引規格編), 東京. 1988.
- 16) 鳥根県食肉衛生検査所. 業務概要 (平成15年度版), 8-14. 2004.
- 17) 広岡博之. 日本畜産学会報, 71: 19-25. 2000.
- 18) 広岡博之. 畜産の研究, 59: 1291-1300. 2005.
- 19) 古川 力. 日本胚移植学雑誌, 23: 88-94. 2001.
- 20) 奥田 稔ら. 日本獣医師会雑誌, 36: 528-533. 1983.
- 21) Tian X. C., et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 102(18): 6261-6266. 2005.
- 22) 総理府世論調査. クローンに関する有識者アンケート調査, <http://www8.cao.go.jp/survey/clone.html>, 総務省. 1998.
- 23) 社団法人畜産技術協会. 畜産の新技術に関するアンケート調査結果, 東京. 2004.
- 24) みえ・サイエンスアカデミー. クローン牛についてのアンケート結果と考察, <http://www.msa.pref.mie.jp/enq/chiku2/result.htm>, 三重県科学技術振興センター. 2004.