

2. ウシ体細胞クローン胚の体外発生と移植成績

酪農科：中里 敏・井上哲郎¹⁾

谷山 敦・清松邦章²⁾

(¹⁾現畜産課, ²⁾現県北家畜保健衛生所)

要 約

成牛由来の体細胞を除核した卵子に核移植し、クローン胚を作出した。この胚を発情同期化した受胎牛に新鮮胚移植した結果、受胎が認められ産子が得られた。

- 1) 成牛の卵巣及び皮膚より細胞を採取し、これらの細胞を10%牛胎子血清 (FBS) 加D-MEM培地で5日間以上培養し、ドナー細胞とした。除核した牛成熟卵子 (レシピエント卵) にドナー細胞を挿入し、電気パルスで融合させた後、サイトカラシンD (2.5 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$) とシクロヘキシミド (10 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$) で1時間、さらにシクロヘキシミド (10 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$) で4時間活性化処理した。
- 2) 作出したクローン胚を10%子牛血清 (CS) 加CR1aa¹⁾と卵丘細胞との共培養系で8日間培養したところ、卵丘細胞由来で14.2%、皮膚細胞由来で13.8%が胚盤胞に発育した。
- 3) 発育した胚盤胞を発情同期化した受胎牛に新鮮胚移植したところ、卵丘細胞由来で7頭中2頭、皮膚細胞由来で45頭中13頭が受胎した。

その後、卵丘細胞由来で1頭流産が発生したが、1頭の体細胞クローン産子 (黒毛和種、生時体重45kg、誘起分娩) が得られた。

一方、皮膚細胞由来ではこれまでに9頭の流産が発生したが、4頭が妊娠を継続している。

- 4) 得られた体細胞クローン産子については、体高、体重ともに人工授精により生産された黒毛和種雌牛と変わらない順調な発育を示している。また、血液検査により、産子がクローン個体であることが推察された。

目 的

体細胞クローン羊「ドリー」の誕生によって、成熟・分化した動物の細胞から新たな個体が複製されることが明らかになったが、この技術を牛に応用し、すでに能力の明らかな個体の複製を多数作出することにより、牛の改良・増殖の効率化を図ることが可能になると期待されている。

そこで、今回、我々は成牛由来の体細胞をドナー細胞として細胞融合条件について検討した。また、作出したクローン胚は新鮮胚移植し、その受胎性について調査した。

方 法

1. ドナー細胞

1) 卵丘細胞

食肉処理場由来の黒毛和種雌牛の卵巣から未成熟卵子を吸引採取後、卵子を取り除いた残りの液に含まれる細胞をディスパーゼで処理し、10% CS加TCM199で増殖させた。

2) 皮膚細胞

黒毛和種雄牛の耳の皮膚 (母指頭大) を採材後、実験室内に持ち込み、無菌的に5mm角程度に細切した。これを抗生物質・抗真菌剤 (SIGMA A7292...ペニシリン10,000単位、ストレプトマイシン10mg、アンホテリシンB25 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$) を添加した10%FBS加D-MEMで10~14日間培養し、初代培養細胞を得た。

増殖した卵丘細胞及び皮膚細胞は、10%FBS加D-MEMにより細胞培養フラスコ (25cm²) で38.6℃、5%CO₂、95%空気の条件下で培養した。また、これらの細胞は7日前後で継代したが、残りの細胞は細胞凍結保存液 (セルバンカー) を用いて凍結し、液体窒素中で保存した。

なお実験には、凍結保存した細胞を融解後、血清飢餓培養を行わず5~6日間培養し、細胞が単層のシートになった状態 (約80%コンフルエント) で実験に供した。

2. レシピエント卵

食肉処理場由来の牛卵巣から未成熟卵子を採取し、18時間培養(38.6℃, 5%CO₂, 95%空気下)後、0.1%ヒアルロニダーゼを含むM2液に移し、ボルトテックスとピペッティング操作により卵丘細胞を除去した。

さらに実体顕微鏡下で、第1極体を放出し、かつ細胞の色調が均一な卵子のみを選抜し、レシピエント卵として用いた。

3. 除核

成熟培養開始後19~21時間目に20%CS加TCM199+サイトカラシンD(2.5μg/ml)中で、選抜したレシピエント卵の第1極体を指標にマイクロマニピュレーターに取り付けたガラス針で透明帯の20%程度を切開し、次に卵子の上からガラス針を押し下げ、第1極体とその周囲の細胞質を透明帯の切り口から押し出すことにより、第2減数分裂中期の染色体を除去した。

4. 核移植・細胞融合・活性化処理

レシピエント卵の卵胞腔内にドナー細胞を挿入し、成熟培養開始後23~24時間目に電気パルスで細胞融合を行った。融合後直ちに、サイトカラシンD(2.5μg/ml)とシクロヘキシミド(10μg/ml)で1時間、さらにシクロヘキシミド(10μg/ml)で4時間活性化処理した。

なお、細胞融合にはZimmerman Cell Fusion Mediumを使用し、皮膚細胞を用いて細胞融合条件を比較した。

すなわち、及川ら²⁾の成績を参考にし、電圧120V/mmの条件で、パルス幅を10~50μ秒と変化させ胚盤胞発生率を比較した。

5. 体外培養

活性化処理後、ウシ血清アルブミン(3mg/ml)加CR1aaで36時間培養後、10%CS加CR1aaに移し、卵丘細胞との共培養を行い、胚盤胞への発生率を観察した。

6. クローン胚の移植

作出した胚盤胞を発情同期化した受胎牛(ホルスタイン種、F1、黒毛和種)に1~2胚移植し、受胎率を調査した。なお、妊娠鑑定は超音波診断装置または直腸検査により、最終発情日から30日前後に行った。

7. 体細胞クローン産子の発育

体高、体重について毎月1回測定した。また健康状態を毎日観察し、異状があればその都度治療を行った。

結果及び考察

1. 体細胞クローン胚の体外発生

表1に卵丘細胞及び皮膚細胞をドナー細胞として用いた場合の核移植成績を示した。

作出したクローン胚を8日間体外で培養したところ、卵丘細胞由来で14.2%、皮膚細胞由来で13.8%が胚盤胞に発育し、卵丘細胞と皮膚細胞では胚盤胞の発生率に差はみられなかった。

次に、皮膚細胞を用いて細胞融合条件を比較した。

表1 体細胞クローン胚の体外発生と移植成績

細胞	パルス (V/mm, μ秒)	供試 個数	胚盤胞発生 個数 (%)	移植 頭数	受胎 頭数 (%)	流産	産子数
卵丘細胞	120, 25	162	23 (14.2)	7	2 (28.6)	1	1
皮膚細胞	120, 10	42	2 (4.8)	-			
"	120, 15	43	5 (11.6)	1	0		
"	120, 25	615	104 (16.9)	29	9 (31.0)	5	
"	120, 30	22	3 (13.6)	1	0		
"	120, 50	32	2 (6.3)	-			
"	20, 10(※)	469	53 (11.3)	14	4 (28.6)	4	
皮膚細胞 (計)		1, 223	169 (13.8)	45	13 (28.9)	9	

※20V/150μm, 10μ秒(ニードル型電極) その他はワイヤー型電極

胚盤胞発生率=胚盤胞発生個数/供試個数 受胎率=受胎頭数/移植頭数

すなわち、電圧120V/mmの条件で、パルス幅を10～50μ秒と変化させ胚盤胞発生率を比較したところ、電圧120V/mm、パルス幅25μ秒の条件で胚盤胞発生率が高かった。

2. 体細胞クローン胚の移植成績

発育した胚盤胞を発情同期化した受胎牛に新鮮胚移植したところ、卵丘細胞由来で7頭中2頭(受胎率28.6%)、皮膚細胞由来で45頭中13頭(受胎率28.9%)が受胎した。

その後、卵丘細胞由来で1頭流産が発生したが、1頭の体細胞クローン牛(黒毛和種、生時体重45kg、誘起分娩)が得られた。

一方、皮膚細胞由来ではこれまでに9頭の流産が発生したが、4頭が妊娠を継続している。

体細胞クローン牛の流産の原因については、上村ら³⁾や須藤ら⁴⁾の報告にもあるように胎盤の異常によるもの、臍帯部の水腫が認められるもの、解剖所見

ならびに病理学的調査の結果に異常が認められないものもあり、今後、これらの発生機序について、他県と情報交換しながら検討していく必要があると思われる。

3. 体細胞クローン産子の発育

本牛は黒毛和種の雌であったが、出生時の体重は45kgと大きく、過大子の傾向がみられた。しかし、母牛がホルスタイン種の経産牛であったこともあり、分娩介助には至らなかった。

出生後の発育は、図1、図2に示すとおり体高、体重とも人工授精による黒毛和種の雌牛と変わらない順調な発育を示している。

なお、本牛は2ヶ月齢で下痢の発生が認められ、さらに6ヶ月齢では結膜炎に罹病したが、いずれもその症状は軽度であり、1～2回の治療により治癒した。

謝 辞

卵巣の採材に御協力いただいた佐世保食肉センター(株)並びに佐世保市食肉衛生検査所の方々に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Rosenkrans, Jr. C. F. and First N. L.: Culture of bovine zygotes to the blastocyst stage: effects of amino acids and vitamins, Theriogenology 35, 266 (1991)
- 2) 及川俊徳・高田直和・菊地 武: ウシ由来体細胞をドナー核に用いた核移植, 宮城県畜産試験場試験成績書, 51-53 (2000)
- 3) 上村佳代・億 正樹・小財千明・青山 譲: 牛体細胞クローン妊娠子宮の解剖所見と病理学的調査, 奈良県畜産試験場研究報告27, 20-24 (2000)
- 4) 須藤慶子・川島敬二・小淵裕子・砂川政広: ホルスタイン種牛の皮膚由来細胞をドナー細胞とした体細胞クローン胚の生産と移植受胎例, 群馬県畜産試験場研究報告7, 33-38 (2000)

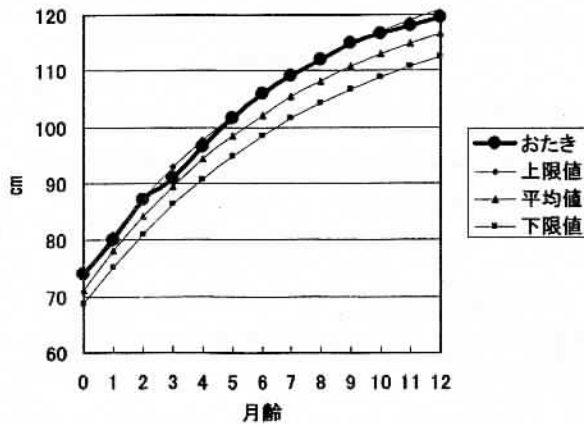


図1 体高の推移(黒毛和種・雌)

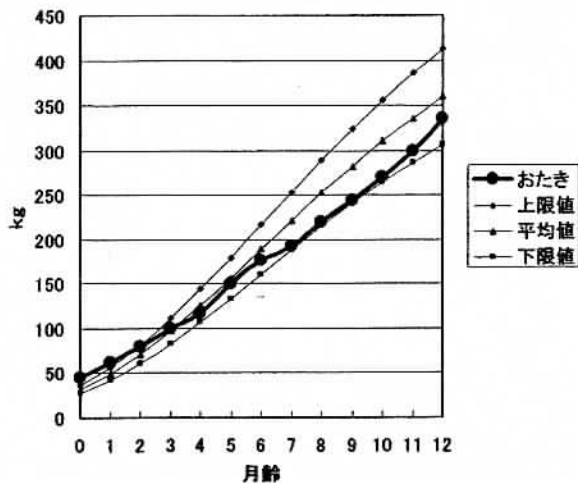


図2 体重の推移(黒毛和種・雌)