

# 1. 核移植によるクローン牛作出技術の開発

酪農科：中里 敏・井上哲郎  
園田裕司・吉田豊昭

## 要 約

初期発育段階の受精卵を利用した核移植によって、クローン牛の生産に成功した。

- 1) ドナー割球を注入した卵子28個のうち24個で細胞融合が認められ、融合率は85.7%であった。
- 2) 融合した卵子24個のうち22個が分割し、分割率は91.7%であった。
- 3) 分割した胚をさらに培養した結果、8個の胚盤胞期胚が得られた。
- 4) ドナー割球6個で性別別を行い、雌と判定した。
- 5) 平成8年11月27日、作出した胚盤胞期胚を2胚ずつ4頭の受胚牛に移植したところ、移植後30日目の妊娠鑑定では2頭の受胎を確認したが、うち1頭は2ヶ月齢で流産（胎児確認）した。
- 6) 妊娠を継続した残りの1頭は平成9年8月22日、正常な雌子牛（生時体重28kg）を分娩した。
- 7) 生産されたクローン牛は、平成10年2月13日現在、体高100cm、体重162kgであり、順調な発育を示している。

## 結 言

クローンとは、遺伝子組成が完全に等しい生物の集団のことである。家畜の場合、自然発生的に生じるクローンには一卵性双子があるが、その発生する割合は極めて稀で、牛では1,000回の分娩に対して1例前後とされている。

このため、クローン牛を人為的に作出し、産業的に利用する研究が国内でも農林水産省畜産試験場や家畜改良センターを中心に進められている。

このような中、本県でも初期発育段階の受精卵を利用した核移植によって、クローン牛の生産に初めて成功したので、その概要を報告する。

## 材料及び方法

### 1. ドナー胚

平成8年11月19日、受精後5日目の牛（黒毛和種）から回収した34細胞の胚を用いた。

### 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、21時間培養（38.8℃、5% CO<sub>2</sub>、95% 空気下）後、0.1% ヒアルロニダーゼを含むM2<sup>11</sup>液に浸漬し、ホルテックス、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。

### 表1 核移植胚作出行程

0時間	レシピエント卵の成熟培養開始
	↓
21時間	卵丘細胞の除去・卵子の選別
	↓
22時間	除核
	↓
24時間	複合活性化処理（電気パルス及びシクロヘキシミド処理：6時間）
	↓
	ドナー割球の注入←ドナー割球の単離
	↓
30時間	細胞融合
	↓
	体外培養（7～9日間）
	↓
	胚盤胞期胚の作出・受胚牛への移植

### 3. 除核

成熟培養開始後22～24時間目に高野ら<sup>2)</sup>の方法に準じて行った。すなわち、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20～30%を切開し、次に卵

子の上からガラス針を押し上げ、第1極体とその周囲の細胞質(約30%)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. 複合活性化処理**

除核したレシピエント卵は、成熟培養開始後24時間目にZimmerman Cell Fusion Medium (ZCFM)に移し、1mm幅のステンレスワイヤー電極を用いて、60V/mm、50μ secの直流パルスを1回通電した後、シクロヘキシミド(10μ g/ml)含有BSA(3mg/ml)加CR1aa<sup>3)</sup>培地で6時間(成熟培養開始後30時間目まで)培養した。

なお、電気刺激には島津製作所製の細胞融合装置SSH-10型、チャンバーは同社製のFTC-72を用いたが、複合活性化処理の条件は既報<sup>1)</sup>を参考に決定した。

**5. ドナー割球の単離及び注入**

ドナー胚は、透明帯を大きく切開して細胞塊を取り出し、0.01%トリプシン及び0.05% EDTA加PBS(-)液中で単一の割球に単離し、これらを1個ずつ顕微操作によりレシピエント卵の卵胞腔内に注入した。

なおドナー胚は34細胞であったが、単離出来なかった6細胞で性判別(のちに雌と判定)を行ったため、28個のドナー割球を試験に供試した。

**6. 細胞融合**

ドナー割球を注入した卵子をZCFMに移し、成熟培養開始後30時間目に55V/mm、50μ secの直流パルスを2回通電して細胞融合を行った。

**7. 核移植胚の培養**

融合処理を終えた核移植胚は、1時間後に融合率を確認し、BSA加CR1aa培地で48時間培養した。

その後、あらかじめ卵丘細胞(10<sup>6</sup>個/ml)をシートさせておいた10%CS加CR1aa培地に移し、さらに6日間共培養を行い、胚盤胞への発育率を観察した。

なお、培地は48時間毎に半量ずつ新鮮培地と交換した。

**8. 核移植胚の移植**

核移植により作出した胚盤胞期胚を受胎牛(ホルスタイン種及び黒毛和種各2頭ずつ)に移植し、受胎率を調査した。

また移植後30日目に、超音波診断装置を用いて妊娠診断を行った。

**結 果**

**1. 除核**

成熟培養開始後22~24時間の2時間にレシピエント卵72個の除核操作を行い、表2のとおり60個の除核に成功した。

表2 体外成熟卵の除核率

除核時間	供試卵子数	除核成功卵子数(%)
22~24	72	60(83.3)

**2. ドナー割球の注入**

成熟培養開始後28~30時間の2時間で、すべてのドナー割球をレシピエント卵に注入した。

**3. 細胞融合**

ドナー割球を注入した卵子28個のうち24個で細胞融合が認められ、融合率は85.7%であった。

**4. 核移植胚の発生**

核移植胚の培養成績は表3に示したとおり、融合した卵子の24個のうち22個が分割し分割率は91.7%であった。

また、分割した胚をさらに培養した結果、8個の胚盤胞(36.4%)が得られた。

表3 核移植胚の培養成績

細胞融合卵	分割卵(%) <sup>1)</sup>	胚盤胞(%) <sup>2)</sup>
24	22(91.7)	8(36.4)

1) 細胞融合卵数に対する百分率

2) 分割卵数に対する百分率

**5. 核移植胚の移植**

平成8年11月27日、作出した胚盤胞期胚を2胚ずつ4頭の受胎牛に移植したところ、表4のとおり移植後30日目の妊娠鑑定では2頭の受胎を確認したが、うち1頭は2ヵ月齢で流産(胎児確認)した。

妊娠を継続した残りの1頭は平成9年8月22日、正常な雌子牛(生時体重28kg)を分娩した。

表4 核移植胚の移植成績

移植頭数	受胎頭数(%) <sup>1)</sup>	流産頭数(%) <sup>2)</sup>
4	2(50.0)	1(50.0)

1) 移植頭数に対する百分率

2) 受胎頭数に対する百分率

## 6. クローン牛の発育

生産されたクローン牛は、平成10年2月13日現在、体高100cm、体重162kgであり、順調な発育を示している。

### 考 察

本試験では、成熟培養開始後21時間目に卵丘細胞の除去を行い、22～24時間目に除核操作を行った。

卵丘細胞の除去はボルテックス及びピペッティング（卵の太さと同じ径のピペットを使い、卵の周囲に付着している卵丘細胞を除去する）によって行うため、機械的操作により第1極体が遊離するものが認められた。石井ら<sup>5)</sup>は卵丘細胞除去操作により第1極体と卵子核が遊離する割合は、卵丘細胞除去までの成熟培養時間が18～19時間の場合で9.1%、22～23時間の場合は36.1%であり、除核操作を第1極体の遊離が少ない成熟培養18～19時間で行った場合の除核率83.9%は22～23時間の61.5%に比べ有意に高かったと報告していることから、今後我々も培養時間を18～19時間と短くした場合について検討していきたいと考える。

次に除核操作では、いわゆる押し出し法を用いたが、この手法は操作がきわめて容易であり、短時間で高率に除核することが可能であった。また、操作に習熟すれば2時間で100個の除核も可能であると思われる。

一方、除核時の細胞質の除去割合は30%を目安に実施したが、一部のレシピエント卵でZCFMに移した際、ドナー割球と細胞質がシュリンクし膜面が離れて融合処理が出来ないものが認められた。したがって、ドナー割球の注入にあたっては割球の大きさを考慮した除核レシピエント卵の選別が必要であり、また割球と細胞質の膜面が接着するような技術的工夫が必要と思われる。

核移植胚の培養には今回卵丘細胞を用いたが、培養の途中で核移植胚が卵丘細胞に包み込まれ透明帯のスリットから押し出されないよう頻りに卵丘細胞から剥離する必要があったことから、今後は高橋らの報告<sup>6)</sup>にあるように、核移植胚に対し物理的影響の少ないマウス線維芽細胞について検討していきたいと考える。

移植試験の結果、2頭の受胎が確認されたものの単子生産にとどまった。流産の原因は不明であるが、少なくとも外見的には異常は認められなかった。

今回、初期発育段階の受精卵を利用した核移植により、クローン牛生産に成功した。しかしながら、クローン牛の生産効率は顕微操作の巧拙が融合率、発生率あるいは胚の品質にまで影響すると言われていた。今後、例数を積み重ね一定水準以上の技術を習得し、効率的な生産を図っていきたい。また、生産されたクローン牛については発育、能力の相似性等についても調査していきたい。

### 謝 辞

本研究の実施にあたり、御指導いただいた農林水産省畜産試験場細胞操作研究室（現：生殖工学研究室）各位に感謝いたします。

また、卵巣の採材に御協力いただいた佐世保食肉衛生検査所各位並びに受胎牛の選定・移植に御協力いただいた渡辺康孝氏、植村真吾氏に深謝します。

### 参考文献

- 1) 山内一也・豊田裕・森庸厚・岩倉洋一郎：マウス胚の操作マニュアル，近代出版，254-255(1989)
- 2) 高野 博・新田良平・加藤容子・角田幸雄：核移植実験系における電気刺激時の温度条件の検討，繁殖技術会誌，15-19(1991)
- 3) C. F. Rosenkrans Jr., N. L. First: Culture of bovine zygotes to the blastocyst stage: Effects of amino acids and vitamins, Theriogenology, 35, 266(1991)
- 4) 中里 敏・永井晴治・藤山雅照・佐々木正憲：ウシ体外成熟卵子の活性化誘起処理，長崎畜試研報，6，1-4(1997)
- 5) 石井俊昭・市野清博・松崎伸生・松岡一仁・島屋桂子：核移植によるクローン胚生産技術の検討（第1報），平成9年度日本産業動物獣医学会年次大会講演要旨，124-125(1997)
- 6) 高橋清也・中川邦昭・永田建一・塩谷康生・富塚常夫・小島敏之・今井裕：牛胚の核移植法：融合時期および共培養条件の検討，第85回日本畜産学会大会発表要旨，8(1992)
- 7) S. Takahashi, T. Tokunaga, H. Imai: Co-culture system using mouse embryonic fibroblast cells for in vitro fertilized and nuclear transplanted bovine embryos, Theriogenology, 41, 311(1994)