

初期胚クローン技術による子牛の生産

森本一隆

要 旨

体外受精に由来する初期胚をドナー核とした再構築胚を作成し、借り腹牛に胚移植することにより、クローン牛の生産に成功した。

- 1 レシピエント卵子の複合活性化処理には、 $10\mu\text{M/ml}$ のCaイオノフォアと $10\mu\text{g/ml}$ のシクロヘキサミドを用いた。
- 2 細胞融合には島津SSH10と1mmギャップのワイヤーチャンバーを用い、直流電圧 $80\sim 90\text{V}\times 50\mu\text{sec}$ ×2回の条件で行った。
- 3 融合した再構築胚を7日間培養後、胚盤胞まで発育したものを受胎牛4頭に移植したところ、1頭で受胎した。
- 4 クローン子牛は平成11年1月28日に誕生した。しかし、生後2日で死亡した。

結 言

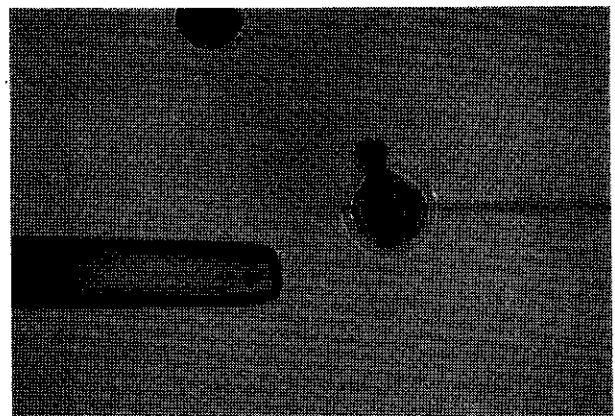
イギリスのロスリン研究所において体細胞クローン羊のドリーが誕生して以来、体細胞クローン技術が一般の人にも知られるようになり、注目集めているところである¹⁾²⁾。クローン技術は革新的繁殖技術としてその実用化に大きな期待がされている。我が国においても石川畜試と近大のグループによる牛の体細胞クローン子牛の誕生以来、次々に体細胞クローン子牛が誕生している。また、初期胚クローン技術では既に我が国では400頭以上³⁾が誕生しており、発育性、クローン牛間の相同性等の試験に供されている。

鳥取県においても、平成9年度より本格的にクローン技術の研究に着手し、初期胚クローン技術により受胎に成功し、平成11年1月に第1号牛が誕生した。

材料及び方法

卵子の採取及び成熟培養

実験に供した卵子は、鳥取県食肉センターで屠畜された牛から採取した。採取した卵巣を 30°C 程度に保温した抗生物質入り生理食塩水に入れて実験室まで輸送し、19Gの注射針を付けた注射器で卵巣を吸引することにより、卵子を採取した。未受精卵の成熟培養は10%FCS加TCM199培地により5% CO_2 38.5 $^{\circ}\text{C}$ で20～22時間培養することで行った。



押し出し法による除核

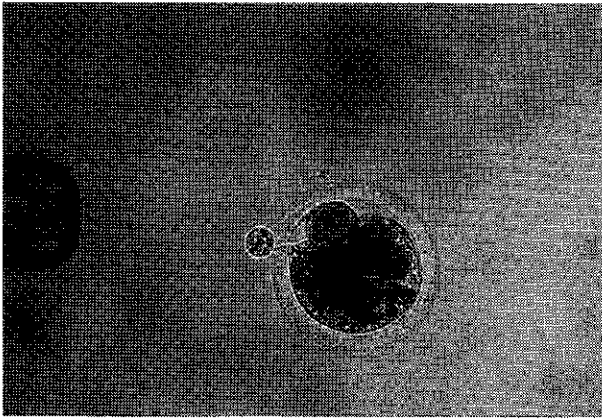
実験1 融合条件の設定

0.1%ヒアルロニダーゼ加PBS-で完全に裸化した卵子を、押し出し法⁴⁾により細胞質の一部を除去（写真1）、その後除去した細胞質を再びインジェクションした卵子（写真2）を材料に、細胞融合装置SSH-10の融合条件を検討した。使用した融合チャンバーは1mmギャップのワイヤーチャンバー（写真3）、融合液はZFMであった。また負荷した電圧は70, 80, 90, 100, 120V、通電時間は30または $50\mu\text{sec}$ で通電回数は2回であった。

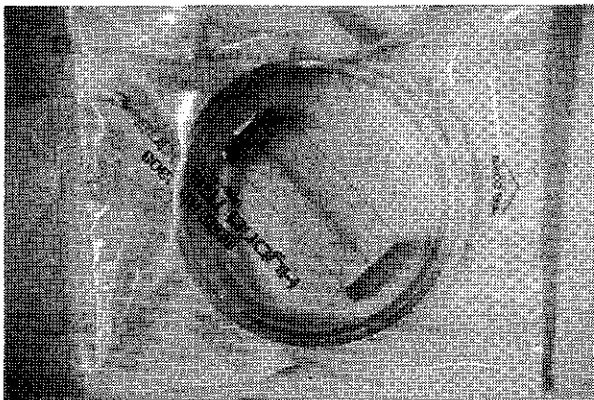
実験2 単為発生試験

細胞の活性化条件を確認するために、単為発生試験を行った。

22時間TCM-199培地により成熟培養した卵子を、0.1%ヒアルロニダーゼ加PBS-で処理し完全に裸化、第一極体の出ている卵子を選抜し供試した。活性化処理



レシピエント卵へのインジェクション



細胞融合チャンバー

は、 $10 \mu\text{M}/\text{ml}$ のCaイオノフォアPBS-で5分間処理した後、 $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ サイトカラシンD- $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ シクロヘキサミド- 0.3% BSA加CR1aaで6時間インキュベートすることにより行い、その後48時間目までは 0.3% BSA加CR1aaで $5\% \text{CO}_2 \cdot 5\% \text{O}_2$ の気層条件で、それ以降は 10% FCS加CR1aaで $5\% \text{CO}_2$ 38.5°C の条件で7日間培養し、発生を観察した。

実験3 初期胚クローン試験

実験2と同様の方法により成熟培養し、裸化した成熟卵子を、 $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ サイトカラシンD加TCM-199中で押し出し法により除核、 $10 \mu\text{M}/\text{ml}$ のCaイオノフォアPBS-で5分間処理した後、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ シクロヘキサミド- 0.3% BSA加CR1aaで6時間インキュベートすることにより活性化処理した。活性化処理の4時間目位より初期胚に由来するドナー細胞をインジェクションした。使用したドナー細胞は、定法により作成した体外受精胚または凍結体内受精胚であった。細胞融合には、実験1と同様の融合液と融合チャンバーを用いた。融合条件は80または90Vの電圧と30または $50 \mu\text{sec}$ の通電時間の組合せ×2回で行った。

融合後、最初の48時間は 0.3% BSA加CR1aaで $5\% \text{O}_2 \cdot 5\% \text{CO}_2$ 38.5°C の条件で、それ以降は 10% FCS加CR1aaで $5\% \text{CO}_2 \cdot 38.5^\circ\text{C}$ の条件で培養し、発生につ

いて観察した。

7日目に胚盤胞になったものについて、受胚牛への移植を試みた。

結 果

実験 1

電圧70Vと通電時間30または $50 \mu\text{sec}$ の組合せでは、融合率 $44.4 \sim 57.9\%$ と融合率が低かった(表1)。電圧80~100Vと通電時間30または $50 \mu\text{sec}$ の組合せでは、融合率 $80.0 \sim 100\%$ と高い融合率が得られた。ただし、電圧が高くなるほど、融合後経過観察中に卵子が死滅する傾向が見られた。電圧120Vでは通電直後に卵子が破壊される率が高く融合率は 37.5% となった。

以上より融合電圧は80~90Vが適当と考えられた。

表1 細胞融合条件の検討

| 電圧 V | 通電時間 μsec | 供試数 | 融合数 | 融合率 % |
|---------|-------------------------|-----|-----|----------|
| 70 | 30 | 9 | 4 | 44.4 |
| 70 | 50 | 19 | 11 | 57.9 |
| 80 | 50 | 10 | 8 | 80.0 |
| 90 | 30 | 10 | 9 | 90.0 |
| 90 | 50 | 20 | 16 | 80.0 |
| 100 | 30 | 4 | 4 | 100.0 |
| 100 | 50 | 19 | 16 | 84.2 |
| 120 | 50 | 8 | 3 | 37.5 |

実験 2

Caイオノフォアとシクロヘキサミドを組み合わせた活性化処理により、処理48時間後の分割率 82.7% 、処理5日後の桑実胚率 69.0% 、処理7日目の胚盤胞率 69.0% の発生率が得られた(表2)。

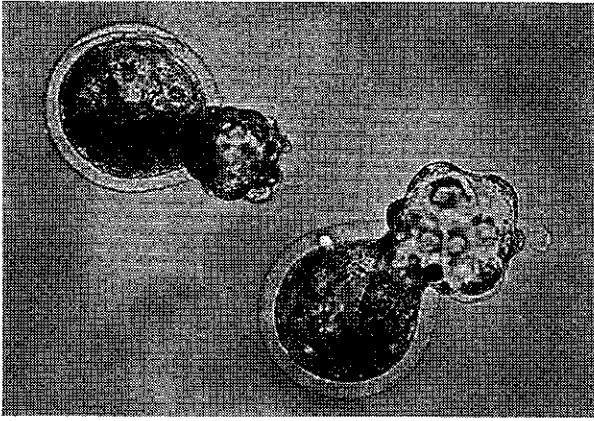
以上より、Caイオノフォアとシクロヘキサミドによる複合活性化処理は、卵子の活性化に有効であることが確認された。

表2 単為発生試験

| 供試数 | 48時間 | | 5日目 | | 7日目 | |
|-----|--------|----------|--------|--------|--------|--------|
| | mono | 4~7 cell | 8 cell | mor | bl | ex |
| 29 | 5 | 17 | 7 | 20 | 7 | 13 |
| (%) | (17.2) | (58.6) | (24.1) | (69.0) | (24.1) | (44.8) |

実験 3

全体で120卵子に融合を実施し、融合したものが92卵子であり、融合率は 76.7% であった。融合したもののうち、分割が見られたものが49卵子で分割率は 53.2% 、胚盤胞まで発生したものは11卵子(写真4)であった。実験途中でコンタミンにより実験を中止したものを除いた



胚盤胞まで発生したクローン胚

発生率は17.2%であった(表3)。

ドナー核に体外受精による新鮮胚(桑実胚)を用いた場合の融合率、分割率、胚盤胞発生率はそれぞれ83.6%、64.3%、17.9%であった(表4)。また、凍結体内受精胚(桑実胚)を融合率、分割率、胚盤胞発生率はそれぞれ67.9%、36.1%、16.7%であった。新鮮胚に比べ凍結胚をドナー核に用いた場合の融合率、分割率が低かったことは、凍結による細胞への傷害のためと考えられた。

表3 再構築胚の作出試験

| 実験日 | ドナー | 融合実施 | 融合 | 分割 | 胚盤胞 | 備考 |
|------|--------|------|------|------|------|------|
| 3.24 | IVF新鮮 | 14 | 14 | 8 | — | ザツリ |
| 4.21 | IVF新鮮 | 38 | 28 | 19 | 5 | 2頭移植 |
| 5.21 | VIVO凍結 | 13 | 9 | 3 | 2 | 1頭移植 |
| 6.9 | VIVO凍結 | 24 | 15 | 4 | 2 | |
| 6.30 | IVF新鮮 | 15 | 14 | 9 | — | ザツリ |
| 8.4 | VIVO凍結 | 16 | 12 | 6 | 2 | 1頭移植 |
| 計 | | 120 | 92 | 49 | 11 | 4頭移植 |
| (%) | | | 76.7 | 53.2 | 17.2 | 1頭受胎 |

表4 ドナー核の種類と再構築胚の作出効率

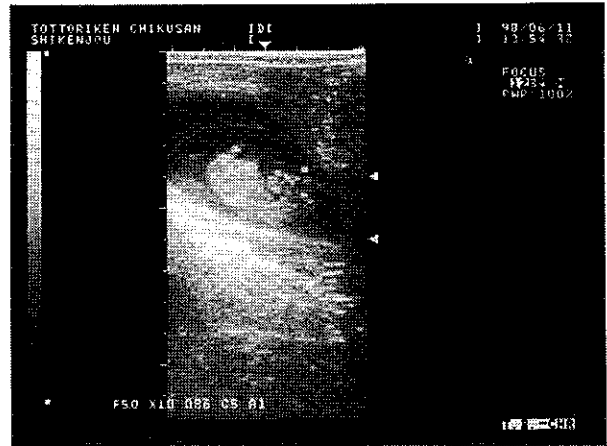
| ドナー細胞 | 融合実施 | 融合 | 分割 | 胚盤胞 |
|--------|------|--------|--------|--------|
| IVF新鮮 | 67 | 56 | 36 | 5 |
| (%) | | (83.6) | (64.3) | (17.9) |
| VIVO凍結 | 53 | 36 | 13 | 6 |
| (%) | | (67.9) | (36.1) | (16.7) |

以上の実験で得られた胚盤胞9個を受胎牛4頭に2胚または3胚移植したところ、2胚移植した1頭で受胎が確認された(写真5)。この受胎例については予定日より2日早く平成11年1月28日に誕生した(写真6)。出生時には外貌等に特に異常は見られなかったが、虚弱であったため保温や輸液等の看護処置を行ったが2日後の1月30日に死亡した。原因究明のため死亡子牛の病理検

査材料を農林水産省家畜衛生試験場に送付した。

考 察

以上のように、初期胚をドナー核としたクローン牛の生産は技術的には可能になった。しかし、現在のところ胚盤胞発生率が低いため、クローン子牛の数は2頭程度しか期待できない。胚盤胞発生率を高くする融合条件及び培養条件の改善が必要と考えられる。



受胎したクローン牛



出生直後のクローン子牛

クローン胚の生産を効率的に行うためにはドナー核に凍結胚を用いるほうが有利だが、凍結胚では融合率、分割率が低いため、胚のクオリティを落とさない胚の凍結保存技術の確立が必要と考えられる。生産された再構築胚の凍結保存技術も今後の検討課題である。

また、クローン子牛では、妊娠中の流産、分娩直後の死亡、分娩の遅延、過大児等が多いことが問題となっており⁵⁾、今回報告した子牛も生後2日で死亡した。これら妊娠に関わる問題点の原因究明と分娩後の死亡を防ぐための看護処置の確立が必要と考えられる。

初期胚クローンでは、4、5頭がクローン子牛の限界といわれており、また能力についても不明であること等が、実用技術とする上での問題点と考えられる。

体細胞クローンでは、理論的にはクローン頭数の限界

がなく、能力の判明した牛のクローンを作ることができる。現在体細胞クローンで子牛の受胎を目指して、ドナー細胞及び融合条件の検討を重ねているところである。

稿を終えるにあたり、卵巣の採取にご協力いただいた鳥取県食肉衛生検査所の皆様に感謝いたします。

文 献

- 1) 畜産技術、524号；2～21、1999
- 2) 今井裕・高橋清也、畜産の研究、第1巻；1180～1186、1997
- 3) 平成11年4月農林水産技術会議発表「家畜クローン技術の現状について」
- 4) 佐藤秀俊、畜産技術、476号；18～21、1995
- 5) 下平乙夫、畜産技術、498号；25～29、1996