

クローン牛生産技術の確立

(1) 体細胞クローン胚の作出における融合条件の検討

比嘉直志 山城存 千葉好夫

I 要 約

体細胞クローン胚を作出するため、精巣由来細胞を用いて融合時の電圧を1V刻みで25~28V/150 μ mまで変化させ、融合率および発生率を調査した。その結果、電圧が27V/150 μ mの条件で融合率、分割率および胚盤胞率が最も高く、それぞれ84.4%、86.8%および23.7%であった。また、作出した胚の一部を新鮮胚または凍結胚移植を行なった結果、超音波診断装置で凍結2胚移植した2頭に受胎を確認した。

II 緒 言

国内では1998年に体細胞クローン牛誕生が報告されて以来、多くの研究機関で体細胞クローン牛の分娩の報告がある¹⁾。当研究室でも育種改良に体細胞クローン牛を活用するため、核移植技術によるクローン牛生産の研究に今年度より着手した。クローン胚を効率的に作出するためには、ドナー細胞の調整から細胞融合および胚の培養など一連の処理操作を効果的に設定する必要がある。そこで、今回はドナー核を導入するための細胞融合条件を検討するとともに、作出した胚の移植を試みた。

III 材料および方法

1. 試験期間および場所

試験期間は2000年11月から2001年3月、沖縄県畜産試験場で実施した。

2. 試験方法および調査項目

ドナー細胞とレシピエント卵子の電氣的融合時に、通電時間を15 μ secに固定後、電圧を1V刻みで25~28V/150 μ mまで変化させる4区に203個の卵子を分けて、それぞれ融合率および発生率を調査した。融合率は通電30分後、発生率は融合後2日目の分割率および7日目の胚盤胞率を調査した。また、作出したクローン胚を移植し、胚齢40から50日目に超音波診断装置で受胎確認を行なった。

3. 材料の調整および核移植

1) ドナー細胞の準備

核移植に用いたドナー細胞は、靱血去勢で得られた子牛の精巣由来細胞を用いた。採取した組織は、抗生物質を含む生理食塩液に投入し、イソジン液および70%アルコール液で消毒した後、生理食塩液中で5mm角に細切し、細胞塊を35mmシャーレに10%牛胎子血清加DMEM培地で4日間培養した。細胞塊除去後、コンフルエントになった時点で継代した。核移植する5から7日前に0.5%牛胎子血清加DMEM(グルタミン不含)培地で血清飢餓培養した。核移植時に0.05%トリプシン+0.53mMのEDTA液で細胞を単離して使用した。

2) レシピエント卵子の準備

食肉処理場屠畜牛由来の卵巣より採取した卵子の中から卵丘細胞が2層以上付着したものを、成熟培養に供した。成熟培養は、0.02AU/mlFSH+5%子牛血清加TCM199培地で18~20時間、38.5 $^{\circ}$ C、5%CO₂、95%空気の気相下で培養した。

3) 核移植操作

(1) 成熟卵子の裸化

成熟培養した卵子を0.5%ヒyaluronidase液に5分間処理後、ピペッティングにより卵丘細胞を除去し卵子の裸化を行なった。

(2) 除核

裸化卵子を5%子牛血清加TCM199培地中でホールディングピペットを用いて吸引固定し、カッティング

ニードルで第1極体付近の透明帯を切開、次に、カッティングニードルで卵子を上から押さえ込み、透明帯の切開部より細胞質の3割程度を第1極体とともに押し出して除核を行なった。

(3)インジェクション

除核卵子の透明帯切開部よりインジェクションピペットを挿入し、卵卵腔内にドナー細胞1個を注入した。

(4)細胞融合

細胞の注入が完了した卵子を融合液 (Zimmerman cell fusion medium) 中に投入し、ニードル型電極で卵子細胞質とドナー細胞が接着するにはさみ込み直流パルスで1回通電した。細胞融合は、成熟培養開始24~26時間目で実施し、細胞融合装置は、LF-101 (ベックス社製) を用いた。

(5)活性化処理および発生培養

通電30分後に融合の確認を行ない、融合した卵子を活性化処理し発生培養を行なった。卵子の活性化は、5mMのCaイオノフォアで5分間、その後10 μ g/mlシクロヘキシミド加TCM199培地で5時間行ない、発生培養はIVD101培地 (機能性ペプチド研究所) を用い38.5 $^{\circ}$ C、5%CO₂、5%O₂の気相下で行なった。

4. 胚の移植および凍結

移植可能胚は、新鮮胚で1頭、凍結胚で3頭に移植を行なった。凍結液には20%子牛血清加mPBSを基材とし、10%エチレングリコール+0.1Mトレハロースを耐凍剤として用いた。

IV 結果および考察

1. 核移植成績

融合電圧を変化させた場合の融合率および発生成績を表1に示した。

融合電圧を25~28Vまで1V刻みで変化させた場合の融合率は、54.8%、70.8%、84.4%および66.2%であった。25~27Vまでは電圧を上げることで融合率は上昇し27Vで最大となったが、逆に28Vでは、細胞膜の崩壊する卵子が増えたため融合率は低下した。

分割率は、それぞれ82.6%、73.5%、86.8%および82.2%で27Vが最も高かった。

胚盤胞率は、それぞれ17.4%、20.6%、23.7%および20.0%で27Vが最も高かった。

移植可能なクローン胚を効率よく作出するためには融合率を高めることが重要であるが、今回使用した精巢由来細胞では27Vが融合率および発生成績が最もよい傾向にあった。

体細胞をドナー細胞とした核移植の融合率は、38~90.1%の報告²⁻⁵⁾があり今回の試験ではおおむね良好な成績が得られたが、ドナー細胞の種類により融合率に違いがあることが指摘されており²⁾、今後使用する細胞の種類によって適正な印加電圧、印加時間および印加回数を検討していく必要がある。

表1 融合電圧を変化させた場合の融合率および発生成績 (個, %)

融合条件	供試卵子数	融合率	分割率	胚盤胞率
25V	42	54.8(23/42)	82.6(19/23)	17.4(4/23)
26V	48	70.8(34/48)	73.5(25/34)	20.6(7/34)
27V	45	84.4(38/45)	86.8(33/38)	23.7(9/38)
28V	68	66.2(45/68)	82.2(37/45)	20.0(9/45)

注1) 融合条件の印加時間は15 μ sec/150 μ mとした。

2) () 内は、卵子数を示す。

2. 胚移植成績

移植成績を表2に示した。新鮮2胚移植を1頭、凍結1胚移植を1頭および凍結2胚移植を2頭に実施した結果は、凍結2胚移植を行なった2頭に受胎が確認された。今回使用した精巢由来細胞でも受胎が可能であることが確認された。

表2 移植成績

移植胚	移植頭数	受胎	不受胎
新鮮2胚	1	0	1
凍結1胚	1	0	1
凍結2胚	2	2	0

V 引用文献

- 1)農林水産技術会議事務局先端産業技術研究課畜産局，2000，家畜クローン技術の現状について
- 2)林尚徳，平尾一平，2000，体細胞核移植における融合条件の検討，岐阜県肉用牛試験場研究報告，38，5-9
- 3)億正樹，上村佳代，小財千明，青山譲，1999，体細胞クローン技術の有効性の検討，奈良畜試研報，26，18-24
- 4)一丸仁，坂井隆宏，長友邦夫，1998，受精卵移植関連新技術の実証および普及に関する試験(4) 体細胞を用いたクローン牛作出に関する試験①，佐賀県畜産試験場試験研究成績書，35，5-8
- 5)野口龍生，千葉伸，鈴木暁之，1999，核移植技術による優良種畜の大量生産技術の開発，岩手県農業研究センター畜産研究所試験成績書，36-37

研究補助：宮城広明，玉本博之