

# 乳牛における体細胞をドナー核に用いた核移植産子の生産

笠井裕明・福見善之・刈谷亮介\*<sup>1</sup>・後藤充宏

## 要 約

牛耳部皮膚組織由来細胞をドナー細胞に用い核移植胚の作出を検討し、得られた胚を移植することで産子の生産を試みた。ホルスタイン種育成牛(12 ヶ月齢)から採取した皮膚組織から細胞を分離し 10% FCS 添加 MEM 培地で 3 代継代培養後凍結保存、融解後は同培地で 72 時間培養した後、血清飢餓培地で 5 日間培養し核移植に供試した。核移植は ZFM の融合液中でニードル型チャンバーを用い 19v - 10  $\mu$ sec  $\times$  2 回 / 150  $\mu$ m の条件で直流パルスを通電、その後シクロヘキシミドと牛血清アルブミンを添加した HP - SOF で 5 時間培養した後に BSA 添加 HP - SOF で 72 時間、以降は 10%FCS 添加 199 中に移しマウス胎子線維芽細胞(MFF)と移植時まで共培養した。供試卵数 165 個中分割した卵子数は 71 個(43.0%)、168 時間目において移植可能であると判断できた胚盤胞期胚の発生数は 26 個(15.8%)であった。得られた胚の一部についてホルスタイン種受胎牛 8 頭に移植を行った結果、3 頭が妊娠。うち 1 頭が流産、1 頭が死産し 1 頭の生存産子を得た。

## 目 的

家畜における核移植技術は初期胚に由来する未分化な細胞をドナー核に用い核移植産子を生産<sup>7)</sup>し、分化した成畜の体細胞をドナー核に用いても産子を得ることは不可能であると考えられていた。初期胚由来の細胞をドナー核に用いる受精卵クローンでは一卵性複数産子を生産することで家畜の改良と増産を行うことができる。しかし、ドナー胚の生産過程に受精を行う必要があり、能力の明らかな成牛そのものを直接増産することはできなかった。

1996 年、Wilmut らは体細胞クローン羊ドリーを誕生させ、分化した大人の羊の体細胞をドナー核に用いても核移植産子の生産が可能であることを実証した。この体細胞クローン技術<sup>8)</sup>を乳牛に応用し、ドナー核として多量に供給可能であり、泌乳能力が明白な成牛の体細胞を用いるクローン牛生産方法について検討した。

---

\*1 現 徳島県農林水産部畜産課

## 材料及び方法

### (1) ドナー細胞の作出

核移植に用いたドナー細胞は平成7年度に当場に導入したスーパーカウから生産した胚移植産子雌3頭(全姉妹)の内の1頭から得た(写真1)。

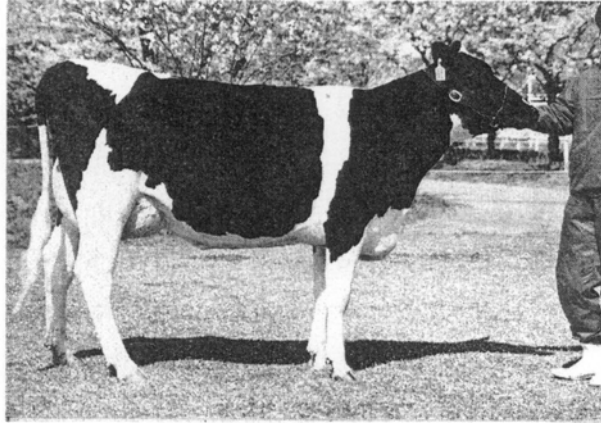


写真1 ドナー牛

ドナー細胞の作出は、この牛の皮膚の一部(耳部)を切断洗浄し、70%メタノールで消毒した後、抗生物質を含むPBS(-)中へ浸漬し、PBS(+ )中で5mm角に細切し、ゼラチンコートされた6cmシャーレにスタンプし10%牛胎子血清(FCS)添加MEM (sigma)培地で2週間培養した。その後、細切片周囲に増殖した細胞<sup>5)</sup>(写真2)を0.125%トリプシンと0.05MEDTAを含むPBS(-)で回収し、ゼラチンコートされた10cmシャーレ1枚に対し $1.0 \times 10^7$ 個程度播種した。

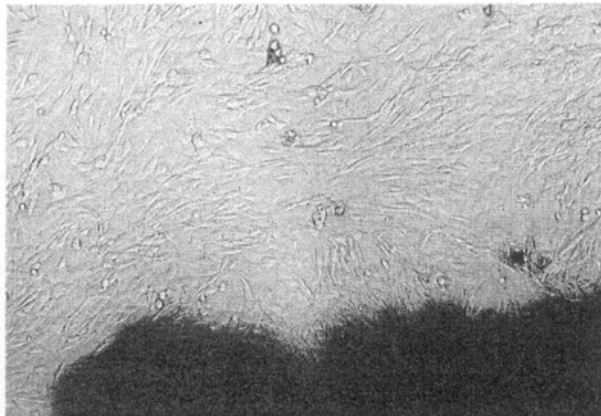


写真2 皮膚片から増殖した細胞

次に、72時間培養しコンフルエントになった時点で回収したシャーレ1枚分の細胞およそ $3.0 \times 10^7$ を新たに $1.0 \times 10^7$ 個ずつに分けて3枚のシャーレに継代した。同様の操作を2回繰り返した後、得ら

れた細胞を DMSO(sigmaD - 2650)を耐凍剤として凍結保存した。次にこの細胞を核移植に供試する 8 日前に融解し, 10%FCS 添加 MEM で 72 時間培養した後, 血清飢餓培地(0.5%FCS 添加グルタミン 不含 MEM)で 5 日間培養し核移植に供試した。

## (2) 核移植

レシピエント卵子には食肉センターから持ち帰った卵巣の表面に存在する直径 5mm 以下の卵胞から吸引採取した卵子を 10%FCS 添加 199 培地で 20~22 時間成熟培養後核を取り除いたものを用い, 融合操作後活性化処理を行った。融合機には EYELA(東京理科 ECF - 100)を用い, 胚の再構築は ZFM(Zimmerman cell fusion medium)を融合液にし, ニードル型チャンバーでドナー細胞とレシピエント卵子を卵胞腔内で接触させ 19v - 10  $\mu$  sec  $\times$  2 回 / 150  $\mu$  m の条件で直流パルスを通電した(写真 3)。

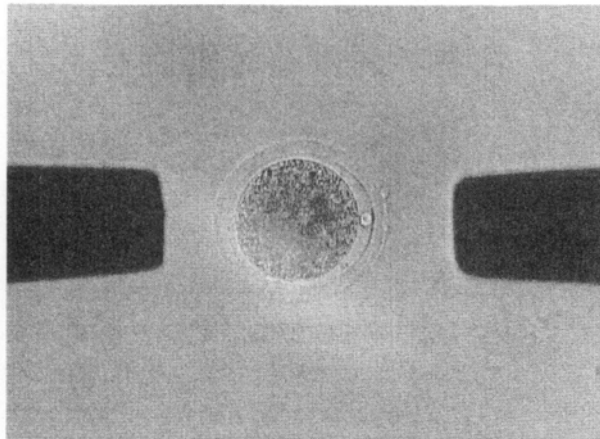


写真 3 融合

その後 10  $\mu$  g / ml シクロヘキシミドと 3mg / ml 牛血清アルブミンを添加した HP - SOF(ペプチド研)で 5 時間培養した後に 3mg / ml BSA 添加 HP - SOF(5%CO<sub>2</sub> - 5%O<sub>2</sub> - 90%N<sub>2</sub>)で 72 時間, 72 時間目以降は 10%FCS 添加 199 中に移しマイトマイシン処理したマウス胎子線維芽細胞(MFF)と移植時まで共培養(5%CO<sub>2</sub> - 95%air)した。移植は発情終了後 7~8 日目のホルスタイン種乳用牛に 1 または 2 胚移植した。

## (3) 分娩誘起

2 頭の妊娠牛については 270 日目から定時的に分娩兆候を観察し, 280 日目を過ぎても分娩兆候が微弱であった 1 頭については分娩誘起を行った。分娩誘起には合成副腎皮質ホルモン剤(デキサメタゾン)20mg を 280 日目に臀部筋肉内に 1 回投与し, その 24 時間後に PGF<sub>2</sub> (エストラメイト)3ml の追加投与を行い分娩状況を観察した。

## 結果

述べ 6 回の核移植によって 165 個の卵子を供試した結果, 分割卵数 71(43.0%), 168 時間目における胚盤胞期胚及び脱出中の胚盤胞期胚数(写真 4)は 26 個(15.8%)であった(表 1)。

この内の 12 個を 8 頭ホルスタイン種経産または未経産牛に移植した結果 3 頭が受胎し、1 頭が 90 日目に流産、1 頭が分娩誘起、他の 1 が自然分娩により各 1 頭の産子を娩出した(表 2)。

この内、自然分娩により誕生した 1 頭は生時体重 53.5kg、胎膜・胎盤重量 13.0kg で娩出直後に死亡した。誘起分娩した 1 頭の生時体重は 44.0kg で現在も生存中である(写真 5)。

表 1 核移植成績

| 試験回数 | 供試卵数 | 分割卵数 (%) | 胚盤胞期胚数 (%) |
|------|------|----------|------------|
| 1    | 22   | 8(36.4)  | 3(13.6)    |
| 2    | 26   | 15(57.7) | 5(19.2)    |
| 3    | 24   | 12(50.0) | 4(16.7)    |
| 4    | 25   | 10(40.0) | 5(20.0)    |
| 5    | 28   | 12(42.9) | 4(14.3)    |
| 6    | 40   | 14(35.0) | 5(12.5)    |
| 計    | 165  | 71(43.0) | 26(15.8)   |

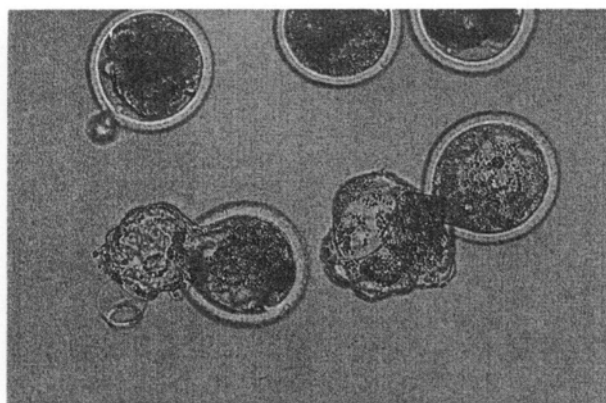


写真 4 脱出中の胚盤胞期胚

表 2 核移植胚移植成績

| 受胎牛    | 移植胚数 | 妊娠 | 妊娠期間 | 生時体重 | 胎膜胎盤 |
|--------|------|----|------|------|------|
| ホルス(経) | 2    | +  | 282  | 44.0 | -    |
| ホルス(未) | 1    | -  |      |      |      |
| ホルス(未) | 2    | -  |      |      |      |
| ホルス(経) | 2    | -  |      |      |      |
| ホルス(未) | 1    | +  | 279  | 53.5 | 13.0 |
| ホルス(未) | 1    | +  | 流産   |      |      |
| ホルス(未) | 1    | -  |      |      |      |
| ホルス(未) | 2    | -  |      |      |      |
| 計      | 12   | 3  |      |      |      |

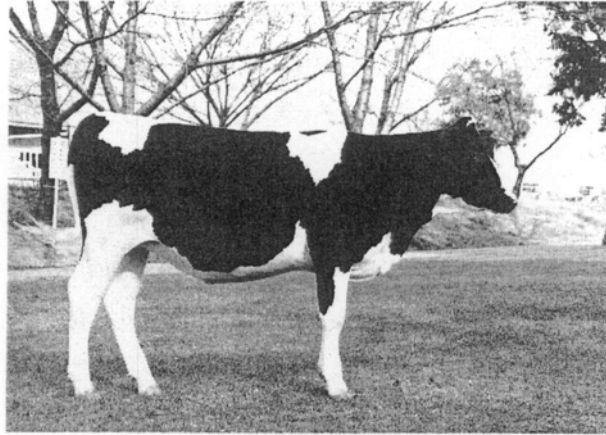


写真5 体細胞クローン1号牛

## 考 察

初期胚由来の細胞をドナー核に用いた場合、ドナー細胞の細胞周期はS期である割合が高いことが知られている。このことからレシピエント卵子にはカルシウムイオノフォアやシクロヘキシミドを用いた複合活性化処理<sup>1)</sup>を行ない細胞期を同調する必要があったが、血清飢餓培養した継代細胞をドナー核に用いた場合、その殆どがG0期であるため、融合と同時に活性化処理を行う方が2倍体の核を効率的に再構築できることが知られている<sup>2)6)</sup>。今回の試験でも融合と活性化処理を同時に行い、核移植胚の発生が確認できた。

ドナー細胞の培養方法では皮膚組織由来細胞を培養した場合、継代回数が少ない段階では数種類の細胞が混ざり合って培養されていることが確認され、継代回数が進むにつれて線維芽細胞に純化される<sup>9)</sup>。また、継代回数と核移植産子生産との関係では、継代回数がある程度進んだ段階で産子が得られている<sup>3)</sup>。今回の試験では継代回数が4代と比較的少ない回数の細胞を核移植に供試したが、受精卵クローン同様に正常妊娠期間を経過したところで生存産子として娩出可能であることが解ったが、例数が少ないため詳細に検討するにはいたらなかった。今後はドナー牛の年齢や細胞の分離方法及び継代回数等について検討する必要があるように思われる。2頭の分娩牛の内、1頭では妊娠280日目を経過しても顕著な分娩兆候の発生は認められなかったため、合成副腎皮質ホルモンの投与により分娩を誘起した。胎子の娩出は誘起剤投与後48時間目であり、当场で行った人工授精で妊娠した分娩牛に対する誘起分娩と同様の経過をたどり分娩に至った<sup>4)</sup>。他の1頭では、妊娠279日目に分娩兆候が現れ、分娩に至ったが重度の助産後、臍帯部分からの出血により娩出直後に死亡した。生時体重は53.5kgであり分娩牛が未経産であることから初産分娩産子としてはやや大きかった。分娩後胎膜・胎盤も排出されその重量は13.0kgで、確認できた35個の胎盤の直径は6~17cmであった。また、解剖所見には各臓器に著変は認められなかった。

受精卵クローンでは同一ドナー胚由来のクローン産子にも生時体重のバラツキ<sup>10)</sup>が認められているが、今回の体細胞クローン産子においても生時体重に9.5kgの差が認められた。

以上のことから，分化した成牛の細胞であってもドナー核に用いた場合，一定の割合で移植可能な胚盤胞期胚が作出され，移植により核移植胚由来の産子生産が可能であることが解った。今後は，例数を重ねるとともに得られた産子の発育状況・泌乳能力についてドナー細胞提供牛及びその全姉妹2頭との間で比較検討する予定である。

## 文献

- 1) 青柳敬人，小西正人 J Reprod Dev 1994;40:j5 - j11.
- 2) Campbell KHS, Mc Whir J, Rltchi WA & Wilmut I Nature 1998;380:64 - 66
- 3) 窪田力，山口浩，轟木淳一，溝下和則，田原則雄 鹿児島県肉用牛改良研究所 日本畜産学会大会講演要旨 1999;95:64
- 4) 大石克己，後藤充宏，山本隆行 徳島県畜産試験場研究報告 1990;31:7 - 10
- 5) 細胞培養技術 日本生化学会編 新生化学実験講座 18 東京化学同人
- 6) 志賀一穂，藤田達男，広瀬啓二，大分県畜産試験場試験成績報告書 1998;27:50 - 55
- 7) Willadsen. S. M Nature.320:63 - 65
- 8) Wilmut I, Schnike AE, McWhir J, Kind AJ & Campbell KHS Nature1997;358:810 - 813
- 9) 山口浩，窪田力，溝下和則，轟木淳一，田原則雄鹿児島県肉用牛改良研究所 1999;4:20 - 21
- 10) Yazawa S, AoyagiY,Konishi M,Takedomi T Theriogenology 1997;48:641 - 650.