

クローン家畜生産技術利用による優良家畜作出試験

戸塚 豊・菅原 徹^{※1}・渡辺晃行・戸谷孝治^{※2}

要 約

当センター繫養の種雄牛および供卵牛の耳由来体細胞をドナー細胞とした体細胞クローン胚の作出を試みたところ、どちらからも移植可能なクローン胚を得ることができた。胚盤胞発生率は、種雄牛由来体細胞をドナー細胞として用いた場合27.1%、供卵牛由来体細胞をドナー細胞として用いた場合28.0%であった。また、ドナー細胞の継代回数と胚の発生状況の関係を調べた。継代回数毎に融合率、卵割率、胚盤胞発生率を観察したが、各継代回数でこれらの値間にばらつきが見られ、一定の傾向は認められなかった。

キーワード：体細胞クローン、核移植、線維芽細胞

緒 言

受精卵移植は育種改良などの能力検定の効率化に役立つ技術として期待されている。この技術に、同一遺伝形質を持つ牛を生産することが可能な受精卵および体細胞クローン技術を付加させることで、優良雌牛の増産や種雄牛造成の促進等の可能性が期待される。

そこで、当センター繫養の基幹種雄牛および供卵牛の体細胞をドナー細胞として用い、移植可能な体細胞クローン胚の作出を試みた。それと同時に、ドナー細胞の継代回数と胚の発生状況の関係について調べ、効率的なクローン胚の作出を試みた。

材料及び方法

1. レシピエント卵子の作成

1) 成熟培養

食肉処理場由来牛卵巣の直径5mm以下の小卵胞から、18G注射針をつけたシリンジで卵丘細胞-卵子複合体を吸引した。卵子の周囲に卵丘細胞が密に付着したAランク卵子のみを選別し、成熟培養を行った。成熟培養は、10%ウシ胎児血清(FCS)+TCM199培地で38.5℃、5%CO₂下で、18時間行った。

2) 卵子裸化および除核

成熟培養した卵丘細胞-卵子複合体の卵丘細胞を、0.1%ヒアルロニダーゼ液中でピペティング操作により除去し、卵子を裸化した。これらの裸化卵子のうち、第一極体を放出し、細胞質の均一なもののみを除核した。除核は、10%FCS+TCM199を操作培地とし、透明帯切開後、極体とその周辺の細胞を押し出す方法で行った。押し出した部分をヘキスト33342で染色し、紫外線励起下で極体および核が発光しているものを除核されたと判定し、レシピエント卵子として用いた。

2. ドナー細胞の準備

当センター繫養の基幹種雄牛および供卵牛の耳断片を細かく刻み、10%FCS+D-MEM培地で3代以上継代させ、継代シャーレ内でコンフルエントの状態になったものをドナー細胞として用いた。

3. 細胞融合

成熟培養開始から24時間後を目安に融合用2本の電極で卵子を軽く挟み、レシピエント細胞とドナー細胞の電氣的融合を行った。融合液はZimmerman Mammalian Cell Fusion Medium¹⁾を用いた。融合条件は直流パルスで25V/150μm・10μsec×1回とした。

※1 現 茨城県農林水産部畜産課

※2 現 茨城県農業総合センター農業大学校

4. 活性化処理および発生培養

融合処理後、融合した卵子をシクロヘキシミド (CH) およびサイトカラシンDを加えたCR1aa+0.3%BSA培地に1時間、その後CHを加えたCR1aa+0.3%BSA培地で4時間活性化処理を行った。その後5%FCS+CR1aa培地において気相条件5%CO₂+5%O₂+90%N₂で7~8日間培養した。

5. 胚の発生状況の観察

- 1) ドナー細胞別に供試卵の融合数、融合率、卵割率、胚盤胞数、胚盤胞発生率を調べた。胚盤胞は移植可能なA、Bランク胚をカウントした。
- 2) 種雄牛耳由来ドナー細胞について継代回数毎に、供試卵の融合数、融合率、卵割率、卵割率、胚盤胞数、胚盤胞発生率を調べた。胚盤胞は移植可能なA、Bランク胚をカウントした。

結果および考察

1. ドナー細胞の違いによる胚の発生状況

クローン胚作出の際ドナー細胞として種雄牛耳由来線維芽細胞を用いた場合、融合率68.3%、卵割率65.9%、胚盤胞発生率27.1%であった。また、ドナー細胞として供卵牛由来線維芽細胞を用いた場合、融合率73.3%、卵割率66.9%、胚盤胞発生率28.0%であった(表1)。その結果、種雄牛耳由来および供卵牛耳由来の線維芽細胞をドナー細胞とした場合、どちらを用いても融合率、卵割率、胚盤胞発生率に差はなく、ほぼ同率で胚盤胞が作出できることがわかった。また、2種の細胞から作出した胚盤胞のクオリティに関しても、大きな差は認められなかったことから、優良家畜作出試験のドナー細胞として両者ともに選択可能であることが判明した。

2. ドナー細胞の継代回数と胚の発生状況

種雄牛耳由来の線維芽細胞を継代培養し、各継代時にドナー細胞として核移植を行った。継代回数毎の胚の発生状況を表2に示した。継代回数によって融合率、卵割率ともにばらつきが見られるものの、おおむね50%以上の値を示した。また、各継代回すべてにおいて少なくとも2個以上が胚盤胞まで発生し、胚のクオリティにも大差がみられなかった。

今回の結果では、融合率・卵割率が高くて胚盤胞発生率は低い、融合率は低いが卵割率・胚盤胞発生率が高い、融合率・胚盤胞発生率が高く卵割率が低いといった例があり、これらの率の間に特定の関係は見受けられず、効率的胚盤胞作出可能なドナー細胞の継代回数を特定することはできなかった。

しかし、各継代回において胚盤胞の発生が確認されたことから、クローン技術による効率的な優良家畜作出技術を確立するために、これらの胚を移植し受胎率・分娩率を調べることでドナー細胞の継代による影響の有無を調べる必要があると思われる。

引用文献

- 1) Wolfe, B. A. and D. C. Kraemer. Methods in bovine nuclear transfer. Theriogenology 31 : 5-15, 1992

表1 ドナー細胞の違いによる胚の発生状況

ドナー細胞	融合供試数 (a)	融合数(b)	融合率(%) (a/b)	卵割数 (c)	卵割率 (%) (c/b)	胚盤胞数(d)	胚盤胞率(%) (d/b)
種雄牛耳由来 線維芽細胞	606	414	68.3	273	65.9	112	27.1
供卵牛耳由来 線維芽細胞	161	118	73.3	79	66.9	33	28.0

表2 ドナー細胞（種雄牛由来）の継代回数と胚の発生状況

ドナー細胞継代回数	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	total
融合供試個数(a)	19	24	24	33	24	29	47	17	33	46	296
融合個数(b)	12	15	18	12	20	28	28	8	16	36	193
融合率(%) (b/a)	63.2	62.5	75.0	36.4	83.3	96.6	59.6	47.1	48.5	78.3	65.2
卵割個数(c)	9	5	9	10	10	22	24	6	12	19	126
卵割率(%) (c/b)	75.0	33.3	50.0	83.3	50.0	78.6	85.7	75.0	75.0	52.8	65.3
胚盤胞数(d)	3	4	3	2	3	17	6	2	8	14	62
胚盤胞発生率(%) (d/b)	25.0	26.7	16.7	16.7	15.0	60.7	21.4	25.0	50.0	38.9	32.1