

育種改良を目的としたクローン家畜生産技術の応用に関する研究(第1報) (クローン牛の効率的な作出方法の開発)

山口大輔・鈴木亘・足立憲隆・赤木悟史¹・高橋清也¹・渡辺伸也¹

A study of cloned animal production aimed for breeding (First report)
(Development of an effective method for the cloned cattle production)

Daisuke YAMAGUCHI, Wataru SUZUKI, Noritaka ADACHI, Satoshi AKAGI¹, Seiya TAKAHASHI¹,
Shinya WATANABE¹

要 約

体細胞クローン技術は高能力な家畜の複製、育種改良の効率化や遺伝資源の保存に利用できる技術として期待されている。この技術を育種改良の効率化に応用する中で、検定に利用するクローン牛を効率的に作出する必要がある。その方法として、核移植後2日目の8細胞期胚3個から透明帯を除去し、シャーレ底面のくぼみ内で胚同士を接着させながら発生培養を行う「集合法」に注目し、集合胚の発生能、細胞数および受胎能について検討した。その結果、集合胚は非集合胚(通常の核移植胚)より有意に高い発生率を示し(95% vs. 56%, $p < 0.01$)、また総細胞数(95±39 vs. 172±77, $P < 0.01$)およびICM細胞数(36±15 vs. 65±39, $P < 0.05$)が有意に増加した。これらのことから、集合法によって核移植胚の発生能の向上および細胞数の増加が可能になることが示唆された。また、核移植後7～8日目の集合胚を同期化した受胎牛に移植した結果、集合胚の受胎率は非集合胚より高い傾向を示し(80% vs. 30%)、うち1頭からクローン牛を作出することに成功した。これらのことから、集合法によって核移植胚の受胎能を向上させることができ、効率的にクローン牛の作出が可能になることが示唆された。

キーワード：体細胞クローン牛、核移植、集合胚

緒 言

体細胞クローン技術(以下、クローン技術)は同一遺伝形質を持つ動物を生産できる技術として期待されている。畜産分野においては、ドナー牛との遺伝的相同性や発現形質におけるクローン牛同士の相似性および斉一性を利用した優良雌牛の増産や種雄牛造成の効率化などへの応用が考えられている¹⁾。

国内でクローン技術に関する研究が進められた結果、現在までに511頭のクローン牛が誕生し、102頭が育成・試験中であることから²⁾、クローン技術は一定のレベルに達していると考えられる。しかし、クローン牛においては、受胎後の早期胚死滅や流産、過大子に伴うと思われる死産や生後

直死が多く報告されており^{3), 4), 5), 6), 7)}、これらがクローン牛の作出効率の低下を招いている。その原因の一つに、生体由来胚と比較したときの核移植の細胞数の少なさが挙げられているが⁸⁾、胚を複数個集合させて一つの胚として発生させる「集合法」をクローン技術に応用することで、これを改善できる可能性がある^{9), 10), 11)}。

そこで本試験では、クローン牛の効率的な作出方法を開発することを目的として、集合法によって作出した核移植胚(以下、集合胚)における発生能、細胞数および受胎能について調査し、その有効性について検討した。

材料および方法

1 成熟培養

食肉処理場由来牛卵巣の直径5 mm以下の小卵胞から、18G注射針をつけたシリンジで卵丘細

1 (独)農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所

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(以下、FBS)を加えたTCM-199で38.5°C、5% CO₂で20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% hyaluronidase液中でピペッ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、20% FBSを加えたTCM-199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染色液(10μg/ml Hoechst33342を加えたPBS)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。

3 ドナー細胞の準備

茨城県肉用牛研究所に繋養されている種雄牛候補「明安の2」の耳由来線維線維芽細胞を、5~7日間血清飢餓培養を行ったものを使用した。

4 細胞融合

レシピエント卵子の成熟培養開始から24時間後を目安に、融合用2本の電極でレシピエント卵子とドナー細胞を軽く挟み、電気的融合を行った。融合液はZimmerman Mammalian Cell Fusion Mediumを用いた。融合条件は直流パルスで25V/150μm・10μsec×1回とした。

5 活性化処理および発生培養

融合処理後、融合した卵子を10% FBS、10μg/ml cycloheximideおよび2.5μg/ml cytochalasin Dを加えたTCM-199に1時間、その後10% FBS、10μg/ml cycloheximideを加えたTCM-199で4時間活性化処理を行った。その後IVD101において気相条件5% CO₂、5% O₂、90% N₂で2~3日間培養した。

6 集合胚の作出

集合胚の作出は、赤木らの報告¹³⁾に準じて行った。すなわち、核移植後2日目の8細胞期胚を、0.5% pronaseで10~15分間処理して透明帯を除去した。50μg/ml phytohemagglutininを加えたTCM-199のドロップ内において、透明帯を除去した胚3個を、培養シャーレの底面に針で作った“くぼみ”の中に入れて20分間接着

させた。その後、IVD-101のドロップ内において、上記と同様に作ったくぼみに接着した胚を移動し、気相条件5% O₂、5% CO₂、90% N₂でさらに5~6日間培養した。また、集合処理を行わなかった核移植胚を、上記と同じ条件で培養して対照区とした。

7 細胞数の測定

核移植後7~8日目における内部細胞塊(Inner Cell Mass:以下、ICM)の細胞数および総細胞数の測定は、赤木らの報告¹²⁾に準じて二重免疫染色法により行った。

8 ガラス化保存

作出した集合胚の保存および融解は、渡辺らの報告¹⁴⁾に準じてアルミプレートガラス化法により行った。なお移植する際には、融解後に生存を確認するため、IVD101で6~18時間培養し、形態的に正常と判定された胚を移植した。

8 移植

受胚牛は、(独)畜産草地研究所あるいは当センターで繋養している黒毛和種および交雑種の経産牛を用いた。発情終了後7~8日目に、形態的に正常と判定したクローン胚を新鮮胚あるいはガラス化胚で1頭につき1胚移植した。妊娠診断は移植後30~40日目に超音波診断装置を用いて行った。

9 分娩

クローン牛の分娩は、分娩時の事故を防ぐため、分娩予定日翌日もしくは2日前に金山らの方法¹⁵⁾に準じて受胚牛に分娩誘起を行った。

結果

集合胚の体外発生成績を表1に示した。非集合処理区では、61個の8細胞期胚から34個の胚盤胞が得られたのに対し(55.7%)、集合処理区では60個の8細胞期胚から20個の集合胚を作出したところ、うち19個の胚盤胞が得られ(95.0%)、有意に高い発生率を示した(p<0.01)。

集合処理区の1個あたりの平均総細胞数、ICM細胞数およびICM構成率を調査した結果を表2に示した。総細胞数では、非集合処理区が95個であったのに対し、集合処理区では172個と有意に増加した(p<0.01)。ICM細胞数では、非集合処理区が36個であったのに対し、集合処理区では65個と有意に増加した(p<0.05)。ICM構成率はいずれの区も38%と差は認められなかった。

集合処理が受胎成績に及ぼす影響としては、非集合処理区では、10頭の受胎牛に移植したところ3頭が受胎したが(30.0%)、いずれも90日以内に流産した。集合処理区では6頭の受胎牛に移植したところ4頭が受胎し(66.7%)、有意な差は認められないものの、受胎率が高い傾向を示した。うち3頭は90日以内に流産したが、1頭が妊娠期間

287日目に36.7kgのクローン産子を分娩した。

表1 集合処理が体外発生に及ぼす影響

区	8細胞期胚数 (個)	集合胚数 (個)	胚盤胞数 (個)	発生率 (%)
非集合処理区	61	—	34	55.7 ^A
集合処理区	60	20	19	95.0 ^B

異符号間に有意差有り (^{A,B}<0.01)

表2 集合処理が細胞数に及ぼす影響

区	1個あたりの 平均胚盤胞数 (個)	1個あたりの 平均総細胞数 (個)	1個あたりの 平均ICM細胞数 (個)	ICM構成率 (%)
非集合処理区	17	95±39 ^A	36±15 ^A	38.3±11.5
集合処理区	11	172±77 ^B	65±39 ^B	38.0±21.0

異符号間に有意差有り (^{A,B}<0.01, ^{a,b}<0.05)

考 察

本試験では、クローン牛を効率的に作出することを目的に、集合胚の発生能、細胞数および受胎能について調査し、その有効性について検討した。牛におけるクローン技術に集合法を応用した報告は少ないが、赤木らは、3個の8細胞期胚を集合させたところ、総細胞数⁹⁾ およびICM構成率¹¹⁾が有意に増加したと報告している。橋本ら¹⁰⁾は、有意な差は認められないものの、集合胚の総細胞数は通常の核移植胚と比較して多い傾向にあり、受胎率についても80.0%と高い傾向を示したと報告している。

Boiani ら⁸⁾は、マウスにおいて核移植胚を2個集合させたところ、胚の細胞数が増加し、受胎率が向上したと報告している。その要因として、核移植胚は細胞数が少なく、細胞間の情報伝達が不足していることが考えられることから、核移植胚を複数個集合させて細胞数を増加させることで、情報伝達不足を補うことができ、その結果と

して発生能および受胎能の向上につながる可能性があるとして示唆している。

今回の我々の試験では、通常の核移植胚では55.7%の発生率であったのに対し、集合胚では95.0%と有意に高い発生率を示した。ICM構成率は差が認められなかったものの、集合胚の総細胞数およびICM細胞数は有意に増加した。受胎率については、通常の核移植胚では30.0%であったのに対し、集合胚では66.7%と高い傾向を示した。上述の報告を加味すると、これらの結果は、核移植胚を集合させることで細胞数が増加し、それにともない細胞間の情報伝達が補われ、核移植胚の発生能および受胎能が向上したことを示すと考えられた。

以上のことから、8細胞期の核移植胚3個を集合法により集合させ、1個の集合胚として発生させることで、細胞数の増加、発生能および受胎能が改善し、クローン産子の作出効率が向上することが示唆された。

参考文献

- 1) 熊谷, 2003, クローン技術を利用した動物性食品の安全性について(最終報告書), 厚生労働省
- 2) 農林水産省, 2006, クローン牛の異動報告のとりまとめについて
- 3) Kato Y., et al, 2000, *J. Reprod. Fertil.*, 120, 231-237
- 4) 沼辺孝, 2000, 第15回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会講演要旨, 第16号, 8-10
- 5) 農林水産省農林水産技術会議, 2002, 家畜クローン研究の現状について
- 6) 加藤ら, 2003, 体細胞クローン牛の正常性について(第1報), 岐阜県畜研研報, 3, 27-36
- 7) 戸塚ら, 2002, クローン家畜生産技術利用による優良家畜作出試験(第2報), 茨城畜セ研報, 35, 55-60
- 8) Boiani M. et al, 2003, Pluripotency deficit in clones overcome by clone-clone aggregation: epigenetic complementation?, *EMBO J.*, 22, 5304-5312
- 9) 赤木ら, 2006, ウシ核移植集合胚の発生能と Oct4 mRNA 発現解析, *J. Reprod. Dev.*, 52, 117
- 10) 橋本ら, 2002, クローン牛の新たな作出技術の開発, 第100回日本畜産学会講演要旨, 101
- 11) Akagi S. et al, 2005, In vitro development of aggregated nuclear transferred embryo derived from bovine cumulus cells, *Reprod. Fertil. Dev.* 17, 162
- 12) Akagi S. et al, 2003, Developmental potential of bovine nuclear transfer embryos and postnatal survival rate of cloned calves produced by two different timings of fusion and activation, *Mol. Reprod. Dev.*, 66, 264-272
- 13) 渡辺ら, 2005, バイオプシー家畜胚の保存技術の確立(第1報), 38, 59-62
- 14) 金山ら, 2000, 分娩期の管理, 第15回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会講演要旨, 16, 13-15