

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）

－体細胞クローン牛の生産－

戸塚 豊^{*1}・菅原 徹^{*2}・渡辺晃行・根本聰実・赤木悟史^{*3}・高橋清也^{*3}・
足立憲隆^{*3}・武田久美子^{*3}・戸谷孝治^{*4}・葦澤圭二郎

要 約

農林水産省畜産試験場（現、独立行政法人畜産草地研究所）繫養の黒毛和種雌牛の卵丘細胞をドナー細胞として核移植により体細胞クローン胚を作出した。作出された体細胞クローン胚のうち12個を新鮮胚で、当センター繫養の黒毛和種、ホルスタイン種、交雑種の計12頭に1胚ずつ移植したところ、3頭が受胎した。受胎した3頭は帝王切開により分娩を行い3頭の雌子牛が得られ、遺伝子検査の結果同一ドナー由来クローン牛であることが確認された。3頭の生時体重は31.0kg, 37.5kg, 31.0kgで標準的な黒毛和種雌の生時体重に近かった。また3頭とも臍帯が太く、うち1頭は組織が脆弱であったが、その他に形態的な異常は認められなかった。

キーワード：体細胞クローン、核移植、卵丘細胞

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。しかしながらクローン牛の生産効率は低く、実用化技術とするためには多くの問題があることから、生産効率に影響する要因を解明し、体細胞クローン技術を確立していくことが必要となっている。

そこで、体細胞クローン牛の作出を試みるとともに、クローン胚の効率的な作出条件の検討を行うこととした。前報¹⁾ではドナー細胞の由来及び継代回数と胚の発生状況の関係について検討し、雌雄とも耳皮膚由来細胞からのクローン胚作出が可能であること、継代回数による融合率、卵割率、胚盤胞発生率への影響はないことを報告した。本報では農林水産省畜産試験場（現、独立行政法人畜産草地研究所）繫養の黒毛和種雌牛の体細胞を

ドナー細胞として作出された体細胞クローン胚の移植を行い、体細胞クローン牛の作出を試みたので、その概要を報告する。

材料及び方法

1. 体細胞クローン胚の作出

(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°C, 5%CO₂, 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%ヒアルロニダーゼ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、

*1 現 茨城県北家畜保健衛生所

*2 現 茨城県農林水産部畜産課

*3 独立行政法人農業技術研究機構畜産草地研究所

*4 現 茨城県農業総合センター農業大学校

20%FCS+TCM199を操作培地とし、透明帶切開後、極体とその周辺の細胞を押し出す方法を行った。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

農林水産省畜産試験場（現、独立行政法人畜産草地研究所）繫養の黒毛和種雌牛（図1）の卵丘細胞をドナー細胞として用いた。卵丘細胞は経腔採卵装置を用いて卵巣より吸引採取した卵丘細胞—卵子複合体由来である。この卵丘細胞—卵子複合体から、10%FCS+D-MEM培地（Gibco）で培養し、3回目の継代培養後3日間10%FCS+D-MEM培地（Gibco）で培養した卵丘細胞（A区）、もしくは10%FCS+TCM199培地（Gibco）で20時間成熟培養後卵子を分離した卵丘細胞（B区）をドナー細胞として用いた。

3. 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 Medium³⁾を用いた。融合条件は直流パルスで25V/150μm・10μsec×1回とした。

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CR1aa³⁾+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CR1aa+0.3%BSA培地において気相条件5%CO₂+5%O₂+90%N₂で2日間培養し、それから7日目まで5%FCS+CR1aa培地と卵丘細胞の共培養（気相条件5%CO₂）で培養した。

5. クローン胚の移植

受胚牛は当センターに繫養しているホルスタイン種、黒毛和種及び交雑種の経産牛で、プロスター・グランジンF_{2a}で発情誘起した。発情終了後7日目に形態的に正常と判定したクローン胚を新鮮胚で1胚移植した。妊娠診断は移植後30日目と60日目に超音波診断装置で行い、妊娠鑑定後分娩まで発生状況を観察した。

6. クローン牛の分娩

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⁴⁾の方法で受胚牛に分娩誘起を行い、帝王切開で分娩させた。

7. クローン牛の確認と遺伝子調査

分娩されたクローン牛は、受卵牛との親子関係のないことおよびドナー牛との遺伝的同一性を確認するため、血液を採取し家畜改良事業団中央研究所に依頼して、DNAマークによる親子判定と個体識別を行った。

またクローン胚の作出に使用されたレシピエント卵子の識別のため、Takedaら⁵⁾の方法によるミトコンドリアDNAのPCR解析を行った。すなわちミトコンドリアDNAの高変異部位であるD-loop領域の塩基配列の違いをPCR-SSCP（一本鎖高次構造多型）法によって検出する方法で、SSCPに用いるPCR断片は、D-loop領域内の高変異部位（308bp）を増幅した断片、およびD-loop全領域をターゲットとしたプライマーで増幅したものを利用酵素HpaIIで2箇所切断した断片の2種類である。

また形態的差異の有無をみるため、鼻紋を採取した。

結果及び考察

1. クローン胚の作出状況

クローン胚作出状況を表1に示した。ドナー細胞とした卵丘細胞は、継代培養したA区と継代培養しないB区の2種類であった。いずれの方法で作出したドナー細胞からもクローン胚を作出することができた。しかしながら融合率、胚盤胞発生率は、継代培養を行ったA区の方が高く（P<0.05）、クローン胚の作出には継代培養をした細胞の方がドナー細胞として適していることが示唆された。

また今回はドナー細胞に血清飢餓処理を行っていないが、クローン胚作出は可能であった。

2. クローン胚の移植と分娩状況

クローン胚の移植と分娩の結果を表2、3に示した。

A区及びB区のドナー細胞から作出されたクローン胚53個のうち、A区7個とB区5個の計12個

のクローン胚を、ホルスタイン種7頭、黒毛和種2頭、交雑種3頭計12頭に1胚ずつ移植した。その結果A区由来で2頭、B区由来で1頭が受胎し、3頭とも無事分娩した（図2、3、4、5）。

前述したとおりクローン胚の作出に際しては、ドナー細胞に血清飢餓処理をおこなっていないことから、クローン牛作出には血清飢餓処理が必ずしも必要ではないことが示唆された^{6,7)}。これは、体細胞をドナー細胞とした場合、細胞周期でG₀/G₁期の細胞であれば、個体発生が可能である⁸⁾ことから、血清飢餓処理以外の方法でもG₀/G₁期に誘導できたためと推察された。

3頭のクローン牛の生時体重は31.0kg, 37.5kg, 31.0kgで、日本飼養標準の黒毛和種雌の生時体重31.4kg⁹⁾と比べやや大きかった。また3頭とも臍帯が太く、うち1頭は臍帯組織が脆弱で、結紮後通常の臍の状態になるまで1週間以上かかった（図6）。

また臍帯以外には形態的異常は認められず、起立までに要した時間も、59分、28分、63分といずれも約1時間程度で特に異常はなかった（図4）。

これまでの報告^{10,11)}では体細胞クローン牛の場合、生時体重の大きい過大仔が多い傾向があることが報告されており、また分娩時の事故による死産、生後直死の例も多く報告¹²⁾されている。しかしながら茨城県畜産センターでは、事故等もなく標準に近い生時体重でクローン牛が生まれ、形態的異常も認められなかったことから、体細胞クローンの分娩にあたっては分娩予定日前後の帝王切開が、事故等の防止に有効であると考えられる。

3. クローン牛の確認と親子判定

遺伝子検査の結果、3頭のクローン牛はすべてドナー牛と遺伝的に同一であることが推定されたことから、同一のドナー細胞に由来するクローンであることが確認された。また受胎牛とクローン牛との親子関係は3組とも矛盾するという結果が得られ、3組とも遺伝的親子関係はないことが確認された。

また採取した鼻紋を比較したところ3頭とも異なる鼻紋であった。したがって同一細胞由来のクローン間でも個体識別ができる可能性があることが示唆された。

表1. 卵丘細胞をドナー細胞としたクローン胚の作出成績

処理区	継代培養	供試数 (個)	融合数 (個)	融合率 (%)	胚盤胞数 (個)	胚盤胞発生率 (%)
A	有	80	69	86.3 ^a	31	44.9 ^a
B	無	112	76	67.9 ^b	22	28.9 ^b

融合率=融合数／供試数×100、胚盤胞発生率=胚盤胞数／融合数×100

a,b : 同一列内異符号間に5%水準で有意差あり（ χ^2 検定）。

表2 クローン胚の移植成績

処理区	移植胚数	移植頭数	受胎頭数	受胎率 (%)	分娩頭数	
A	7	7(ホル)	2	28.6	2	クローン1, クローン2
B	5	5(黒2・F ₁ 3)	1	20.0	1	クローン3

ホル: ホルスタイン種、黒: 黒毛和種、F₁: 交雑種

表3 分娩産子の状況

処理区	受胎牛品種	分娩方法	生時体重
クローン1	A	ホルスタイン種	31.0kg
クローン2	A	ホルスタイン種	37.5kg
クローン3	B	交雑種	31.0kg

4. クローン牛のミトコンドリアDNA

3頭のクローン牛及びドナー細胞について、ミトコンドリアDNAのD-loop領域の高変異部位と全領域のPCR-SSCP解析結果を写真7 A, Bに示した。ドナー細胞とクローン牛のミトコンドリアDNAの泳動パターンはいずれも一致しなかったことから、クローン牛のミトコンドリアはレシピエント卵子由来であることが示唆された。またクローン1とクローン2はミトコンドリアDNAの泳動パターンが一致したことから、レシピエント卵子が同一個体の卵巣由来である可能性が示唆された。

謝 辞

体細胞クローン受胎牛の帝王切開による分娩に際し、技術提供ならびにご指導いただいた茨城県獣医師会産業動物獣医師部会の先生方に深く感謝の意を表します。

引用文献

- 1) 戸塚ら (2001) 茨城畜セ研報, 第31号 : 17-19
- 2) Wolfe, B. A. and D. C. Kraemer. (1992) Methods in bovine nuclear transfer, Theriogenology, 31:5-15
- 3) 社団法人畜産技術協会 (1995) 牛受精卵移植マニュアル
- 4) 金山ら (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 : 13-15
- 5) Takeda, K. et al (1999) Journal of Reproduction and Fertility, 116, 253~259
- 6) Shiga, K. et al (1999) Theriogenology, 52, 527~535
- 7) Mohamed Nour, M. S. et al (2000) Journal of Reproduction and Development, 46, 85~92
- 8) Campbell, K. H. S. et al (1997) Nature, 380, 64 ~66
- 9) 農林水産省農林水産技術会議事務局 (2000) 日本飼養標準肉用牛 (2000年版)
- 10) Kato, Y. et al (2000) Journal of Reproduction and Fertility, 120, 231~237
- 11) 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
- 12) 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



図1. 体細胞クローン牛のドナー牛



図2. 分娩直後の体細胞クローン牛
(クローン1)



図3. 分娩直後の体細胞クローン牛
(クローン2)



図4. 起立したクローン2(分娩後28分)



図5. 分娩直後の体細胞クローン牛
(クローン3)



図6. 分娩直後のクローン牛の臍帯
(クローン1)

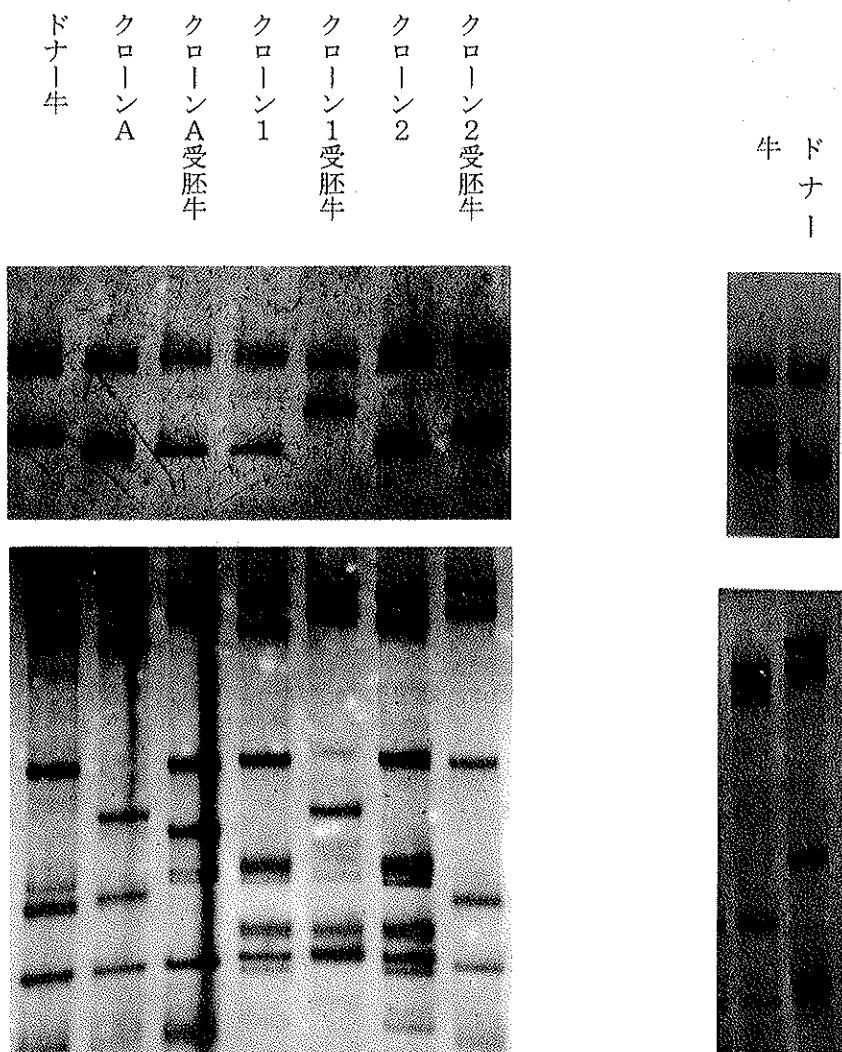


図7 A. 体細胞クローニング牛とドナー牛及び受胚牛のミトコンドリアDNAのPCR-SSCP解析
(上 高変異部位、下 制限酵素*Hpa II*処理断片)

図7 B. 体細胞クローニング牛とドナー牛及び受胚牛のミトコンドリアDNAのPCR-SSCP解析
(上 高変異部位、下 制限酵素*Hpa II*処理断片)

注：クローンAは同一ドナー牛由来の畜産草地研究所のクローン牛

Production of excellent cattle by somatic cell nuclear transfer (the second report) -
Production of the somatic cell-cloned cattle

Yutaka TOZUKA, Toru SUGAWARA, Akiyuki WATANABE, Satomi NEMOTO, Satoshi AKAGI,
Seiya TAKAHASHI, Noritaka ADACHI, Kumiko TAKEDA, Takaharu TOYA and Keijiro
NIRASAWA

Summary

The reconstructed embryos were produced by nuclear transfer cloning using the cumulus cells as the donor nuclear source that were collected by an ovum pick-up from a Japanese black cow reared at National Institute of Livestock and Grassland Science. Of 12 embryos non-surgically transferred to 12 recipient cows that were Japanese black, Holstein and hybrid at Ibaraki Prefectural Livestock Research Center, three calves were generated by a Caesarian birth. DNA analyses confirmed that these calves were genetically identical to the same donor cow. Birth weights of three calves were 31.0 kg, 37.5 kg and 31.0 kg, respectively, and almost the same as the standard birth weight of Japanese black females. All calves had the thick navel cord, and the navel tissue of one calf was weak and breakable.

Key words: Somatic cell, Nuclear transfer, Cumulus cell, Somatic cell-cloned cattle