

研究成果の紹介

1 体細胞核移植による但馬クローン牛作出の試み

ねらいと成果

1997年に世界初の体細胞クローン動物のヒツジが誕生し、不可能とされていた分化した細胞からの個体生産が可能となった。日本では新たな畜産技術として注目され、多くの道府県の試験場などでウシの生産技術として研究されている。雌雄のクローンウシとも、正常な繁殖性を有することが確認されているため、細胞を保存しておけば同一遺伝子のウシを再生し、利用することが出来る。

しかし、既に260頭を越える体細胞クローンウシが誕生しているものの、生存頭数は124頭と少ない。分化している細胞の核をドナーとして用いるため、遺伝子の初期化が完全に行われず、流産や生後直死の割合が高く、生産効率は約10%である。

そこで、生産効率を向上させるためには核移植によって作出される移植可能胚である胚盤胞の発生率を向上させることが必要である。本実験では、体細胞を用いた核移植技術の活性化条件の改善を試み、高い胚盤胞への発生率が得られた。さらに、優秀雌ウシから採取した体細胞によるクローンウシ生産のため、移植試験を行い、3頭の受胎例を得た。

内 容

1 融合卵子への活性化刺激と胚盤胞発生率

体外成熟卵子を除核後、除核卵子の囲卵腔にドナ

ーとなる細胞を挿入し、25Vから30V 25 μ sec 1回の直流パルスにより両者を融合させた。融合卵子への活性化条件を検討するため、再度活性化刺激（直流パルス20V 20 μ sec 1回）を与える区と与えない区を設けた。活性化刺激後シクロヘキシミドを含んだ発生培地で5時間培養し、核移植胚の8日後の発生率を比較した。その結果、融合卵子へ活性化刺激を行った区が胚盤胞への発生率が高かった（表1）。

2 核移植胚の移植試験

黒毛和種雌牛の卵丘細胞をドナーとした核移植によって作出された7日目胚盤胞を、2胚ずつ3頭の受胎牛片側子宮角へ新鮮胚移植した。3頭の受胎例が得られたが、生存産子は得られなかった（表2）。受胎牛Aは103日目で流産し、受胎牛Bは232日目で尿膜水腫のため帝王切開を行ったが、胎子は生存しなかった。受胎牛Cは、270日目で死産であった。

今後の方針

融合胚に活性化刺激を加えて発生した胚盤胞の一胚移植を試み、体細胞クローンウシの早期生産を目指す。

濱田由佳子（中央農技・生物工学研究所）

表 1. 活性化刺激の有無による核移植胚の発生率

区分	活性化刺激	実験回数	供試胚数	融合数	融合率 (%)	分割数	分割率 (%)	胚盤胞数	胚盤胞率 (%)
試験区	有り	4	136	74	54.4	57	77.0 ^a	32	43.2 ^A
対照区	無し	5	54	30	55.6	10	33.3 ^b	5	16.7 ^B

カイ二乗検定、異符号間に有意差有り(a,b:P<0.01 A,B:P<0.05)

表 2. 核移植胚の移植成績

受胎牛	移植年月日	状況	胎子の日齢	胎子の体長または体重
A	2000/12/5	2001/3/11 流産	103	8cm, 8cm(双子)
B	2000/11/28	2001/7/11 帝王切開(母牛尿膜水腫)	232	20kg(単子)
C	2000/11/24	2001/8/14 死産	270	25.8kg, 17.4kg(双子)