

体細胞核移植技術における融合後の活性化刺激が 核移植胚の発生率に及ぼす影響

濱田由佳子*・冨永敬一郎*・柴谷増博*・有吉哲志**

要 約

体細胞核移植による移植可能胚の作出率を向上させるため、黒毛和種雌牛の顆粒膜細胞を用いて行った核移植において、融合後に電気による活性化刺激が発生率に及ぼす影響を検討した。成熟培養18~19時間後に除核した卵子とドナーとなる顆粒膜細胞を30V/150 μ m, 25 μ secの電気刺激で融合後、電気による活性化刺激を行わない対照区、融合15~30分後に電気による活性化刺激(20V/mm, 20 μ sec)を行う活性化区を設けた。また活性化刺激の回数を1回区と2回区に区分した。核移植を0日として、1日目の分割率、7日目の胚盤胞率を調査した。また、発生した核移植胚盤胞の子牛への発生能を見るため、6胚を3頭の黒毛和種牛に2胚ずつ移植した。

- 1 体細胞核移植の融合後に電気による活性化刺激を行った活性化区は、対照区よりも分割率、胚盤胞への発生率は有意に高かった。また、電気による活性化刺激は1回区と2回区ではその後の発生率に差が見られなかった。
- 2 融合後、活性化刺激を行った核移植により発生した胚盤胞を移植し、3頭が受胎した。しかし、1頭は妊娠103日で流産し、1頭は妊娠232日で尿膜水腫のため帝王切開を実施したが、子牛は呼吸せず死亡した。残りの1頭は妊娠270日で双子を娩出したが、死産であった。

Effects of Electro-stimulation of Somatic Nuclear-transfer Oocytes after Electro-fusion on The Following Development in Cattle.

Yukako HAMADA, Keiichiro TOMINAGA, Masuhiro SHIBATANI
and Tetsushi ARIYOSHI

Summary

The present study was undertaken to investigate the effects of fusion between an enucleated oocyte and a granulosa cell on the developmental competence in vitro and in vivo in cattle. In vitro-matured oocytes were enucleated after maturation culture for 18-19 h. A single granulosa cell was fused electrically with an enucleated oocyte by a single pulses of 30V \cdot DC/150 μ m for 25 μ sec in Zimmerman fusion medium. Nuclear transferred oocytes were subjected to a single DC pulse of 20V/mm for 20 μ sec, 15 to 30 minutes after fusion in order to examine the effect of activation after fusion on the development to the blastocyst stage. To determine the effect of the number of pulses for activation on the development, nuclear transferred oocytes were activated once at 15 to 30 min (single activation) or twice at 15 min-intervals (repeated activation) after fusion by a single DC pulse. After treatments, the reconstructed oocytes were immediately cultured in CR1aa medium containing 10 μ g/ml cycloheximide for 5 h and then cultured in the same medium without cycloheximide. The nuclear transplanted embryos were cultured according to the method of Tominaga et al¹²⁾. The cleavage rates on day 1 and developmental rates to blastocysts on day 7 were estimated. To assess the developmental ability of blastocysts to term, 2 embryos per cow were transferred to 3 Japanese black cows.

- (1) Both rates of cleavage and development to the blastocyst stage in the group of repeated activation were significantly higher than those in the group of nuclear transferred oocytes without activation. There was, however, no significant difference between groups of single and repeated activation.
- (2) All recipient cows became pregnant. One recipient aborted twin fetuses on day 103 of gestation. A single fetus was obtained from a hydrallantoic cow by Caesarian section on day 232, and twin stillborn calves were delivered by vaginal delivery on day 270 of gestation. Body weight of the single calf on day 232 was 20.0kg, and those of the stillborn twin calves were 25.7kg and 17.5kg.

From the results of the present study, it was concluded that activation after fusion stimulates the developmental ability of nuclear transferred oocytes to the blastocyst stage.

キーワード：体細胞核移植, 融合活性化, ウシ胚

緒 言

1997年にイギリスで世界初の体細胞クローン動物である羊のドリーが誕生し、成体から採取した細胞をドナーとして行う核移植により、分化した細胞からの個体生産が可能になった。すでに分化した体細胞を用いることにより、優良遺伝子個体の増産や、希少遺伝子個体の増産・再生といった応用が期待できる。

特に、我が国ではウシを生産する技術として、従来から行われていた体外受精に伴う胚培養技術や双子生産に伴う胚操作技術などの基礎技術があり、体細胞核移植技術も多くの追試^{6),7)}が行われている。既に200頭を越える体細胞クローンウシが出生し、100頭以上が生存しており、その繁殖性や食品としての安全性が調査されている。しかし、生存産子率は平均して約10%にしかすぎず、核移植技術の改良を検討する必要がある。

核移植技術においては様々な器具、機械を使用するため、条件設定などは核移植の実施機関により様々である。特に、ドナー細胞とレシピエント卵子の融合・活性化において、融合に用いられる電気刺激が活性化を同時に引き起こすとされていたが、近年は融合後、再度活性化刺激を与えると胚盤胞の発生率が向上したと報告されている^{1),3),11),12)}。そこで本実験では、移植可能胚である核移植胚盤胞の作出効率を向上させるため、ドナー細胞の融合後、電気による活性化刺激の有無が核移植胚の発生にどのように影響するかを調査した。また、作出された核移植由来胚盤胞の子牛への発生能を見るため、移植試験を行った。

材料及び方法

1 ドナー細胞の採取および培養

経腔的に黒毛和種雌牛の卵巢から回収した顆粒膜細胞をグルタミン+10%血清添加D-MEM(日水)により37.5°C, 5% CO₂の気相条件下で継代培養を行った。数代の継代培養により、増殖した細胞を10% DMSO(関東化学)+10% MEMにより凍結保存した。凍結細胞を融解し、継代後コンフルエントになった細胞か、0.5%血清添加D-MEMによる4~7日間の血清飢餓培養により、細胞周期を同期化した細胞を核移植のドナーに用いた。核移植前に0.05% EDTA・2 Na添加0.125% Trypsin(Gibco BRL)液を用いて細胞を剥離し、0.5%血清加PBS液にてドナー細胞浮遊液とした。

2 核移植方法

食肉センター由来卵巢から採取した卵子を用い、既報⁴⁾に準じて成熟培養を行った。18~19時間後に卵子に付着している卵丘細胞をピペッティングにより裸化し、

極体を放出した卵子を選別後、押し出し法により除核した。除核できたものをレシピエント細胞質として用いた。Phytohemagglutinin-P(ナカライ)50 μ g/mlを添加した20% CS加TCM 199(Gibco BRL)ドロップ中でドナー細胞をレシピエント卵子の围卵腔へ挿入し、卵子の成熟培養23~24時間後に融合装置(BTX 200)とニードル型電極(富士平工業)を用い、30V/150 μ m, 25 μ sec, 1~2回の直流パルスにより融合させた。融合後、活性化処理した再構築胚は10 μ g/mlシクロヘキシミド(Sigma)を添加したCR 1 aa¹⁰⁾+BSA(Sigma)にて低酸素条件で5時間培養し、その後既報¹⁰⁾の培養法を用いて体外培養を行った。

3 実験区分

融合処理後、融合胚に電気による活性化刺激を行う試験区と活性化刺激を行わない対照区を設けた。活性化処理区にはステンレスチャンバー(富士平工業)を用い、電気刺激(20V/mm, 20 μ sec)を15分間隔で2回かけ、その後の発生率を調査した。

また、電気による活性化刺激回数を1回区と2回区に分け、その後の発生率を調査した。

移植試験では、黒毛和種3頭を受胚牛とし、核移植由来7日目胚盤胞を2胚ずつ片側子宮角へ移植した。

4 調査項目

核移植後の融合率(融合数/融合供試数)、分割率(分割数/融合数)および7日目胚盤胞率(胚盤胞数/融合数)を調べた。統計処理は、カイ二乗検定を用いた。

結 果

活性化刺激の有無による核移植後の発生率を表1に示した。電気による活性化刺激を行った活性化区は分割率、胚盤胞率において、対照区よりも有意に高い値であった。また、活性化刺激の1回区と2回区では、分割率、発生率に差は見られなかった(表2)。

活性化刺激を行った後発生した胚盤胞を2胚ずつ3頭を受胚牛に移植した結果を表3に示した。3頭を受胎例が得られたが、生存産子は得られなかった。

考 察

本実験では、ウシの体細胞核移植による移植可能胚の作出効率を向上させるため、融合と活性化に着目し、融合後の電気刺激による活性化が核移植胚の発生率に及ぼす影響を検討した。

一般に核移植では、除核した未受精卵と核を提供する細胞を融合させて、再構築胚を作成する。従って、分化した体細胞をドナーとして利用する場合、核移植後に正

表 1. 活性化処理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 | 融合供試数 | 融合数 | 融合率 (%) | 分割数 | 分割率 (%) | 胚盤胞数 | 胚盤胞率 (%) |
|-----|-------|------|-------|-----|---------|-----|-----------------|------|-----------------|
| 試験区 | + | 4 | 136 | 74 | 54 | 57 | 77 ^a | 32 | 43 ^A |
| 対照区 | - | 5 | 54 | 30 | 55 | 10 | 33 ^b | 5 | 16 ^B |

同列内の異符号間に有意差有り (a, b : P<0.01 A, B : P<0.05)

表 2. 活性化処理回数による核移植胚の発生率

| 活性化刺激 | 実験回数 | 融合供試数 | 融合数 | 融合率 (%) | 活性化数 | 分割数 | 分割率 (%) | 胚盤胞数 | 胚盤胞率 (%) |
|-------|------|-------|-----|---------|------|-----|---------|------|----------|
| 1回区 | 6 | 201 | 116 | 57 | 52 | 33 | 63 | 25 | 48 |
| 2回区 | 6 | | | | 52 | 32 | 61 | 27 | 50 |

表 3. 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 | H12.12.5 | H13.3.11 流産 | 103 | 8 cm, 8 cm (双子) |
| B | H12.11.28 | H13.7.11 帝王切開 (尿膜水腫) | 232 | 20kg (単子) |
| C | H12.11.24 | H13.8.14 死産 | 270 | 25.8kg, 17.4kg (双子) |

常に発生するためには、分化した体細胞核は未分化の状態に戻される (初期化) 必要がある。そのためには、レシピエントである除核未受精卵とドナー細胞の細胞周期の同調が重要であると考えられている²⁾。

細胞の増殖期には間期 I (G1) 以外の細胞周期にある体細胞が多く存在するが、血清飢餓培養を一定期間行うと、培養細胞の90%以上がG0/G1期になる。一方、細胞質を提供する成熟未受精卵は第二減数分裂中期 (MII期) で停止しており、細胞質中にある卵成熟促進因子 (MPF) 活性が非常に高くなっている。活性化刺激によって MPF は急速に減少する²⁾ が、体細胞核移植では活性化前の MPF 活性の高い細胞質とドナー細胞を融合させた場合にのみ胚発生が見られる。

従来の体細胞核移植法では、融合時の電気刺激を活性化の電気刺激と兼ねさせていた¹⁾。そこで、融合電圧を25から50Vに上昇させたり、パルス幅を13から50μsecに広げたりして検討したが、高い電圧や、長いパルス幅の条件では細胞質の崩壊が起こり、発生率の改善には至らなかった。

加藤ら⁹⁾は融合の電気刺激の後に、活性化を促進する目的で、融合卵に再度電気刺激を行っている。そこで、本実験では融合胚に改めて電気刺激を行った結果、活性

化刺激を行った試験区では、分割率、ならびに胚盤胞への発生率が有意に向上した。しかし、活性化刺激の1回区と2回区では発生率には差がなく、1回の活性化刺激で充分と思われた。

核移植操作では、融合に用いる機械や電極は実施機関により様々であり、一概に比較できないが、本実験での融合時の電気刺激条件では活性化が不十分だったと考えられる。融合後、再度電気刺激を加えることにより、十分な活性化が引き起こされ、発生率が向上したと思われた。一方、Shinら¹⁰⁾の報告によると、直流パルスによる融合後、電気による活性化刺激を再度与えた場合、電気刺激が多すぎることによる異常分割や細胞質の崩壊がみられる。しかし、本実験での活性化の電圧は融合電圧に比べて弱いため、そのような異常分割は見られなかった。

本法により、作出した胚盤胞の移植により、受胎例が得られ、核移植胚の受胎性が証明された。しかし、流産や胎盤の異常、死産が起こり、正常産子は得られなかった。核の初期化が不十分なため、遺伝子発現の異常が生じ、胎子の内分泌機能の異常や胎盤機能の異常が起こることが報告されている^{5), 9)}。しかし、核移植に用いる細胞種やロットによっては高い生産率が得られるものもあ

るため、そのような細胞や、一連の技術の解析が必要である。近年、ウシの体細胞核移植においては、MII期のレシピエント卵中にドナー核を長くおいた方が胚盤胞までの作出効率がよいと報告されている¹⁾。これは、すでに分化しているドナー細胞を用いて個体を生産するため、レシピエント卵の細胞質に存在する、遺伝子の初期化を促す因子に核をさらすという点で有利であると考えられているが、産子までの発生についての検討はされていない。本実験で作出した核移植胚の移植によっても流産や早産が発生したため、核移植技術について、さらに検討する必要がある。また本実験では2胚移植を実施し、高い受胎率が得られたものの、生存産子を得られなかった。これは、受胎牛が黒毛和種であったため、母体への負担が大きくなったことも一因と考えられる。

一方、体外培養による過大子といった異常もすでに報告されている⁸⁾が、今回の早産、死産胎子から判断して、本実験で用いた培養方法ではそのような例は観察されていない。

融合後の活性化刺激により、核移植後の移植可能胚である胚盤胞の発生率が高まった。正常産子を得るまでに至らなかったが、今回の結果を踏まえて、体細胞クローンウシの早期生産を目指したい。

謝 辞

卵巣採取にご協力頂いた、加古川食肉衛生検査センターの皆様、また、受胎牛の管理にご協力いただいた農業共済組合東播基幹診療所の皆様に感謝いたします。

引用文献

- (1) Akagi, S., Takahashi, S., Yokota, M., Noguchi, T., Taniyama, A., Fuchimoto, D. and Izaïke, Y. (2001) : The timing of fusion and chemical activation in nuclear transfer affects developmental potential of bovine embryos. : *Theriogenology*. 55, 252
- (2) Campbell, K. H. S., Ritchie, W. A. and Wilmut, I. (1993) : Nuclear-cytoplasmic interactions during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos: Implications for deoxyribonucleic acid replication and development. : *Biol Reprod*. 49, 933-942
- (3) Fulka, J. Jr., Loi, P., Ledda, S., Moor, R. M. and Fulka, J. (2001) : Nucleus transfer in mammals : How the oocytes cytoplasm modifies the transferred nucleus. : *Theriogenology*, 55, 1373-1380
- (4) 濱田由佳子, 富永敬一郎, 有吉哲志 (2000) : 黒毛和種牛の経膈採卵・体外受精由来胚を用いた核移植. *兵庫農技研報*. 36, 1-6
- (5) Hill, J.R., Roussel, A. J., Cibelli, J. B., Edwards, J. F., Hooper, N. L., Miller, M. W., Thompson, J. A., Looney, C. R., Westhusin, M. E., Robl, J. M. and Stice, S. L. (1999) : Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies) : *Theriogenology*. 51, 1451-1465
- (6) Kato, Y., Tani, T. and Tsunoda, Y. (2000) : Cloning of calves from various somatic cell types of female adult, newborn and fetal cows. : *J. Reprod. Fertil.*, 120, 231-237
- (7) Kubota, C., H. Yamaguchi, J. Todoroki, K. Mizoshita, N. Tabara, M. Barber, and X. Yang (2000) : Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(3), 990-995
- (8) Kruip, T. A. M. and den Daas, J. H. G. (1997) : In vitro produced and cloned embryos: effects in pregnancy, parturition and offspring : *Theriogenology*. 47, 42-52
- (9) 松崎正敏, 志賀一穂, 岡野良一, 柴伸弥, 常石栄作 (2000) : 体細胞クローン子牛の内分泌性状 : 第97回日本畜産学会講演要旨. 179
- (10) Resenkrans, C. F. Jr. and First, N. L. (1993) : Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes in vitro. : *J. Anim. Sci.* 72, 434-437
- (11) Shin, S. J., Lee, B. C., Park, J. I., Lim, J. M. and Hwang, W. S. (2001) : A separate procedure of fusion and activation in an ear fibroblast nuclear transfer program improves preimplantation development of bovine reconstituted oocytes : *Theriogenology*. 55, 1697-1704
- (12) Tominaga, K., Hamada, Y., Yabuue, T., and Ariyoshi, T. (2000) : Effect of linoleic acid-albumin on post-thaw survival of in vitro-produced bovine embryos at the 16-cell-stage. : *J. Vet. Med. Sci.* 62 (4), 465-467
- (13) Yin, X. J., Tani, T., Kato, Y. and Tsunoda, Y. (2000) : Development of rabbit parthenogenetic oocytes and nuclear transferred oocytes receiving cultured cumulus cells. : *Theriogenology*. 54, 1469-1476