

種々の細胞を用いた体細胞核移植と体細胞クローン牛の作出

濱田由佳子*・富永敬一郎*・柴谷増博*

要 約

ドナー細胞の由来が核移植に及ぼす影響を調べるため、個体毎に3部位から採取した細胞をドナーに用い、核移植後の発生率を調査、比較した。ドナー細胞は、耳由来細胞(3頭)、顆粒膜細胞(5頭)と、胎子皮膚由来細胞(1頭)である。核移植後の融合率、分割率および7日目胚盤胞への発生率を調査し、7日目胚盤胞は免疫2重染色による品質評価を行った。

さらに、体細胞クローン牛を得るため、顆粒膜細胞を用いた核移植で作出した胚の移植試験を行った。

- 1 耳由来細胞、顆粒膜細胞、胎子皮膚由来細胞をドナーに用いた核移植において、融合率、分割率では差があったが、個体、細胞の種類にかかわらず、胚盤胞への発生率には差がみられなかった。
- 2 顆粒膜細胞を用いて行った核移植で作出した胚盤胞を1胚ずつ5頭に移植したところ、2頭が受胎し、それぞれ正常子ウシを分娩した。

Developmental Competence of Bovine Reconstructed Embryos Using Somatic Cells Derived from Various Organs

Yukako HAMADA, Keiichiro TOMINAGA, and Masuhiro SHIBATANI

Summary

The aim of this study was to determine the effect of donor cells from different sources on the developmental competence after nuclear transfer. After serum starvation, donor cells of 3 different sources; ear fibroblasts, granulosa cells and fetal fibroblasts, from 9 different cows were fused with enucleated oocytes and the fused reconstructed oocytes were activated, followed by incubation in a medium with cycloheximide for 5 hours.

The reconstructed embryos were cultured in a medium of CR1aa with Bovine serum albumin (BSA) or fetal calf serum (FCS) for 7 days. The first cleavage rate of reconstructed embryos and the developmental rate to the blastocyst stage and the number of cells of Day 7 blastocysts were examined. To assess the developmental ability to full term, 5 nuclear transfer embryos derived from adult granulosa cells were transferred to 5 recipients.

- (1) There was no significant difference in the developmental rate to the blastocyst stage ($P>0.05$), though there were significant differences in the rates of fusion and first cleavage of reconstructed embryos among sources of donor cells ($P<0.05$).
- (2) Each of the 5 nuclear-transferred embryos were transferred to 5 recipients, and 2 of them were confirmed to be pregnant. Finally 2 apparently normal female calves were delivered, and their birth weights were within the normal range of the Tajima strain of Japanese Black cattle.

キーワード：体細胞核移植, ドナー細胞, ウシ胚, クローン牛

緒 言

世界初のクローンウシは、1998年に日本で誕生した。2002年7月現在では既に312頭の体細胞クローンウシが

全国で出生している。核移植技術は優良遺伝子個体を増産できる新技術であり、体細胞クローンウシの利用についても生産物としての調査が行われ、8月13日に農林水産省から、20日にはアメリカの科学アカデミーから、それぞれ通常の家畜と異なる点はないという発表がなされている。

2002年8月30日受理

* 農林水産技術総合センター部長 (生物工学担当)

著者ら⁴⁾は、体細胞核移植において、ドナー細胞とレシピエント細胞質との融合後に、活性化刺激となる電気刺激を与えることにより、移植可能胚である胚盤胞への発生率が向上することを報告した。

ドナーとなる体細胞はウシ組織の一部を採取して培養することにより無制限に増殖するため、多くの体細胞を容易に確保することができる。卵巣、耳、皮膚、腎臓などからの組織採取が可能であるが、ドナー個体および細胞の違いによって核移植胚の発生率に差がみられるか調査した。

2001年に著者らは作出した胚盤胞の2胚移植による受胎例を得たが、生存産子は得られなかった。そこで、1胚移植による体細胞クローン牛の生産を試みた。

材料及び方法

1. 核移植方法

(1) ドナー細胞の採取および培養

ドナー細胞は、9個体の異なる部位から採取した。

耳由来繊維芽細胞：毛ざりを充分に行ったウシの耳の一部を切断採取し、ペニシリン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシンを添加したPBS-で十分に洗浄後、組織を細切し、グルタミン+10%ウシ血清添加D-MEM(日水)を用いて37.5°C、5%CO₂の気相条件下で培養を行った。

顆粒膜細胞：17Gの経腔採卵針(Cook)を用い、経腔的に雌ウシの卵巣から採取した細胞を上述の培養液で継代培養した。

胎子皮膚由来細胞：食肉センターで採取した体長約8cmの胎子の皮膚組織を採取し、PBS-で洗浄後、継代培養を行った。

それぞれの細胞は数代の継代によって増殖させ、10% DMSO(関東化学)+10% MEMで凍結保存した。凍結細胞を融解し、0.5%ウシ血清添加D-MEMを用いた4から7日間の血清飢餓培養によって、細胞周期を同期化してドナー細胞に用いた。

(2) 核移植方法

卵母細胞の採取、成熟培養、除核ならびに核移植は、既報⁴⁾に準じた。食肉センター由来卵巣から採取した卵子を用い、18から19時間の成熟培養後、極体を放出した卵子を選別して、押し出し法により除核した。

Phytohemagglutinin(ナカライ)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囲卵腔へ挿入し、卵子の成熟培養23から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/150μm、25μsec、

1回の直流パルスにより融合させた。融合確認後、ステンレスチャンパー(富士平工業)を用い、再び電気刺激(20V/mm、20μsec)を行い、10μg/mlシクロヘキシミド(Sigma)を添加したCR1aa¹⁰⁾+BSA(Sigma)にて5時間培養し、その後既報¹⁰⁾の培養法により7日間体外培養を行った。

(3) 調査項目

核移植後の融合率(融合胚数/細胞挿入卵子数×100)、分割率(分割胚数/融合胚数×100)および7日目胚盤胞率(胚盤胞数/融合胚数×100)を調べた。7日目胚盤胞については免疫二重染色¹⁰⁾を行い、細胞数と細胞構成を比較した。統計処理は、百分率は角変換後、分散分析を行い、ダンカンの多重検定を行った。胚盤胞の細胞数についてはt検定を行った。

2. 移植試験

黒毛和種雌ウシから採取した顆粒膜細胞をドナーに用いて核移植を行った。黒毛和種5頭を受胎牛とし、核移植由来7日目または8日目胚盤胞を1胚ずつ新鮮胚移植した。

結 果

ドナー細胞の種類別の核移植成績を表1-1に示す。融合率ならびに、分割率において、ドナー細胞間に差がみられたが、胚盤胞発生率において差はみられなかった。また、ドナー細胞の起源別の発生成績を表1-2に示す。融合率のみに差がみられたが、胚盤胞発生率には差はみられなかった。

核移植由来7日目胚盤胞の細胞数を表2-1に示す。内部細胞塊細胞数、栄養膜細胞数、総細胞数ならびに内部細胞塊細胞比率のいずれにおいても、ドナー細胞による品質の差はみられなかった。しかし、表2-2に示すとおり、細胞の起源別の胚盤胞品質は内部細胞塊細胞において、耳由来細胞に比べ、胎子由来細胞で多く、ICM比率も胎子由来ドナーが多かった。さらに、栄養膜細胞数、総細胞数については卵巣由来細胞が耳由来細胞よりも多かった。

黒毛和種雌ウシから採取した顆粒膜細胞をドナーとした核移植によって、発生した5個の胚盤胞を1胚ずつ5頭を受胎牛に移植した結果を表3に示す。2頭(40%)が受胎し、分娩誘起によって、妊娠日齢285日と280日目に、正常分娩で雌子ウシが得られた(図)。

考 察

日本全国で体細胞クローンウシの誕生が続々と報告されている。ドナー細胞として卵丘細胞、耳由来細胞や筋

表 1-1 ドナー別核移植胚の融合率ならびに発生率

ドナー細胞細胞	挿入卵子数	融合数	(%)	分割数	(%)	胚盤胞数	(%)
A (耳：黒毛和種雌)	130	76	(58)	42	(55) ^b	25	(32)
B (耳：黒毛和種雌)	129	66	(51) ^b	48	(72)	30	(45)
C (耳：黒毛和種雄)	170	129	(75) ^a	78	(74)	58	(45)
D (顆粒膜細胞：黒毛和種)	338	184	(54)	152	(82) ^a	67	(36)
E (顆粒膜細胞：黒毛和種)	416	177	(42) ^b	111	(62) ^b	81	(45)
F (顆粒膜細胞：黒毛和種)	703	406	(57)	300	(73) ^x	204	(50)
G (顆粒膜細胞：ホルスタイン種)	302	154	(51) ^b	102	(66)	75	(48)
H (顆粒膜細胞：ホルスタイン種)	103	60	(58)	31	(51) ^{b,y}	27	(45)
I (胎児皮膚：黒毛和種)	34	30	(88) ^a	23	(78)	13	(43)

同列の異符号間に有意差あり (a, b, x, y: P<0.05)

表 1-2. ドナー細胞由来別核移植成績

ドナー細胞細胞	挿入卵子数	融合数	(%)	分割数	(%)	胚盤胞数	(%)
耳	429	271	(63) ^a	169	(62)	113	(42)
卵巣	1862	981	(53) ^a	696	(71)	454	(46)
胎児皮膚	34	30	(88) ^b	23	(78)	13	(43)

同列の異符号間に有意差あり (a, b: P<0.05)

表 2-1 核移植 7 日目胚盤胞の品質

ドナー細胞	供試胚数	内部細胞塊細胞 (ICM) 数	栄養膜細胞 (TE) 数	総細胞数 (Total)	内部細胞塊細胞比率 (%)
A (耳：黒毛和種雌)	15	24.9	60.3	85.2	29.3
B (耳：黒毛和種雌)	15	18.8	56.0	74.8	25.1
C (耳：黒毛和種雄)	49	16.5	54.9	71.4	23.1
D (顆粒膜細胞：黒毛和種)	9	20.8	53.0	73.8	28.2
E (顆粒膜細胞：黒毛和種)	25	19.6	62.8	82.4	23.8
F (顆粒膜細胞：黒毛和種)	117	19.8	62.7	82.5	24.0
G (顆粒膜細胞：ホルスタイン種)	20	17.9	62.7	80.5	22.2
H (顆粒膜細胞：ホルスタイン種)	24	23.8	60.6	84.4	28.2
I (胎児皮膚：黒毛和種)	15	23.4	56.4	80.0	29.3

表 2-2 ドナー細胞由来別核移植 7 日目胚盤胞の品質

ドナー細胞由来	供試胚数	ICM 数	TE 数	Total	ICM比率 (%)
耳	79	18.5 ^a	56.1 ^a	74.6 ^a	24.8 ^a
卵巣	195	20.1 ^{a,b}	62.0 ^b	82.1 ^b	24.5 ^a
胎児皮膚	15	23.4 ^b	56.4 ^{a,b}	80.0 ^{a,b}	29.3 ^b

同列の異符号間に有意差あり (a, b: P<0.05)

表3 核移植胚の移植成績

移植頭数	受胎頭数	(%)	分娩頭数	体 重
5	2	(40)	2	1号: 23.6kg 2号: 21.6kg

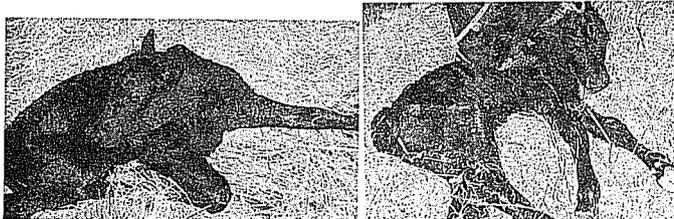


図. クローン産子(左: 1号 右: 2号)

肉由来細胞などが用いられ、それぞれ正常な子ウシが得られている。しかし、通常の妊娠と比べ、体細胞クローンは流産や出生直後に死亡する例が多い。体細胞クローンの生産率はドナー細胞の由来によって異なる可能性も報告^{5),7),9)}されており、細胞の選択が生産効率を高める一つの要因とも考えられる。

個体別に採取したドナー細胞を用いて核移植を行った結果から、融合率、分割率ではドナー細胞による有意差が見られた。

直流パルスによる融合では、ドナー細胞の大きさ、形態、準備方法によって融合率が異なる。ドナー細胞に、同一個体から採取した、卵丘細胞、耳由来繊維芽細胞、卵管上皮細胞、子宮由来細胞の4種類を用いたChoら²⁾の実験によると、卵丘細胞と耳由来繊維芽細胞では高い融合率が得られ、卵管上皮、子宮由来細胞よりも有意に高い値であった、と述べている。融合にはドナー細胞とレシピエント細胞質との接着状態が大きく影響するという報告もある³⁾。本実験では、融合率の高いと言われている細胞種のみを用いているが、極端に大きさの違うドナー細胞はみられなかった。融合率に差がみられたのは、細胞の形態または、個体差によるものと思われる。

分割率についても、個体によって差がみられたが、胚盤胞への発生率では差がみられなかった。また、細胞の起源による分類でも発生率には差がみられなかった。ドナー細胞種が異なっても、胚盤胞発生率には差がみられないという報告^{1),6),7),10)}は多くあり、今回の結果もそれを支持した。

しかし、発生率が同等でも、個体への発生能には差がみられるという報告^{5),6)}と、みられなかったという報告²⁾があり、実際に移植試験を行なってみなければ正確な結果は分からない。限られた飼養頭数のなかでの移植試験には制限があるため、胚盤胞の品質評価として、細

胞数の計測を行った。その結果、内部細胞塊細胞(ICM)数、栄養膜細胞(TE)数、総細胞数、ならびにICM比率に個体差はみられなかった。しかし、細胞の起源別では耳由来細胞が他区よりも少なく、胎子由来細胞のICM比率は他区よりも多かった。これら細胞数の多少が子牛の生産に影響を及ぼす可能性があるが、核移植胚の細胞数では、個体への発生能は評価できないという報告¹⁰⁾もあり、正確に評価するには、核移植胚の遺伝子発現や、DNAのメチル化状態を調査するなどの詳細な解析が必要と考えられている¹⁰⁾。

体細胞核移植胚の移植においては、核移植操作、体外培養が原因と思われる流産や、過大子、生後直死が多く発生することが問題となっている^{4),10)}。核移植胚の受胎例では妊娠後期の流産も多く見られているが、今回受胎した2頭は流産もなく、分娩誘起により正常な雌子ウシを分娩し、子ウシの虚弱といった症状も認められなかった。Katoら⁷⁾およびLucasら¹⁾によっても生産率の高い細胞のロットが存在することが示唆されている。例数は少ないが、本実験で用いたドナー細胞、核移植方法ならびに培養方法は良好であると考えられる。

個体ごとに採取したすべての細胞で核移植胚の作成が可能であった。また、それらの一部の胚の移植により正常な雌子ウシが得られた。今後は得られたクローンの相似性等を調査するのに加え、他の個体から採取した核移植胚の移植によって、クローンウシの作出を試み、その正常性を確認したい。

謝辞

卵巣採取にご協力頂いた、食肉衛生検査センターの皆様感謝いたします。

引用文献

- (1) A. Lucas-Hahn, E. Lemme, K.-G. Hädeler, H.-G. Sander, and H. Niemann (2000): The source of fibroblast affect in vivo development of cloned bovine embryos. : *Theriogenology*. 57, 433
- (2) Cho, J. K., B. C. Lee, J. I. Park, J. M. Lim, S. J. Shin, K. Y. Kim, B. D. Lee, and W. S. Hwang (2002) : Development of bovine oocytes reconstructed with different donor somatic cells with or without serum starvation. : *Theriogenology*. 57, 1819-1828

- (3) Dominko, T., M. Mitalipova, B. Haley, Z. Beyhan, E. Memili, B. Mckusick and N. L. First (1999) : Bovine Oocyte Cytoplasm Supports Development of Embryos Produced by Nuclear Transfer of Somatic Cell Nuclei from Various Mammalian Species. : *Biol Reprod.* 60, 1496-1502
- (4) 濱田由佳子, 富永敬一郎, 柴谷増博, 有吉哲志 (2000) : 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. 兵庫農技研報. 38, 1-4
- (5) Heyman, Y., P. Chavatte-Palmer, D. LeBourhis, S. Camous, X. Vignon, and J.P. Renard (2002) : Frequency and Occurrence of Late-Gestation Losses from Cattle Cloned Embryos. : *Biol Rprod.* 66, 6-13
- (6) 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 feruses (13 case studies): *Theriogenology.* 51, 1451-1465
- (7) 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
- (8) 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
- (9) Numabe T, Kikawa T, Kikuchi T, and Horiuchi T. (2000) : Production efficiency of Japanese black calves by transfer. : *Theriogenology.* 54, 1409-1420
- (10) Poothapillai Kasinathan, Jason G. Knott, Pedro N. Moreira, Amy S. Burnside, D. Joseph Jerry, and James M. Robl (2001) : Effect of fibroblast donor cell age and cell cycle on development of bovine nuclear transfer embryos in vitro. : *Biol Reprod.* 64, 1487-1493
- (11) Renard, J. P., Qi Zhou, D. LeBourhis, P. Chavatte-Palmer, I. Hue, Y. Heyman, and X. Vignon (2002) : Nuclear transfer technologies : between successes and doubts. : *Theriogenology.* 57, 203-222
- (12) 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
- (13) 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
- (14) Wells, D. N., Misica P. M., and Tervit H. R., (1999) : Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult muralgranulosa cells. : *Biol Rprod.* 60, 996-1005
- (15) Young, L. E., and H. R. Fairburn, (2000) : Improving the safety of embryo technologies : possible role of genomic imprinting. : *Theriogenology.* 53, 627-648