

ウシ体細胞核移植におけるドナー卵丘細胞のロスコビチン処理 あるいは血清飢餓処理が核移植成績に及ぼす影響

富永敬一郎*・濱田由佳子**・岩木史之*・柴谷増博*

要 約

ウシ体細胞核移植に用いるドナー細胞に対するロスコビチン (サイクリン依存性キナーゼ阻害剤) 処理, あるいは血清飢餓処理が再構築胚の発生成績及び受胎牛への移植成績に及ぼす影響を比較した. 経膈採卵で採取した卵丘細胞に由来する継代ドナー細胞を 10% ウシ胎仔血清 (以下 FCS と呼ぶ) 加 Dulbecco's minimum essential medium (以下 DMEM と呼ぶ) 液に 15 μ M ロスコビチンを添加して 24 時間培養 (ロスコビチン処理区) するか, あるいは 0.5% FCS 添加 DMEM 液で 4~7 日間培養 (飢餓処理区) した. レシピエント卵子として, 食肉センター由来ウシ卵子を成熟培養後, 0.25% ヒアルロンダーゼを含む PBS (-) 液を用いて裸化し, 除核した. 継代した細胞をトリプシン-EDTA で剥離後, ドナー細胞としてレシピエント細胞質へ挿入した. 30V/0.15mm, 25 μ s の直流パルスにより融合させ, 融合卵子には 20V/mm, 20 μ s の電気刺激により活性化を行った. 10 μ g/ml シクロヘキシミドと 2.5 μ g/ml サイトカラシン D を含む CR1aa 液で 1 時間処理後, シクロヘキシミドのみを含む CR1aa 液で 4 時間処理し, 発生培養液へ移した. 分割率, 8 細胞期胚率及び 7 あるいは 8 日目胚盤胞率を計測した. 免疫蛍光 2 重染色により内部細胞塊細胞と栄養膜細胞を別々に数え, 7 日目胚盤胞の細胞構成を比較した. ロスコビチン処理区の一部の再構築胚盤胞を受胎牛に 1 個ずつ移植した.

- 1 ドナー細胞の細胞周期調整法による融合率, 分割率, 胚盤胞への発生率, 7 日目胚盤胞の細胞数及び細胞構成には差がみられなかった.
- 2 ロスコビチン処理による細胞周期調整法により作成した再構築胚盤胞の移植により, 2 頭の正常子ウシが得られた.
- 3 ロスコビチン処理は血清飢餓と同様にドナー細胞の細胞周期調整に利用できることが明らかになった.

Synchronization of Donor Cell Cycle by Roscovitine Treatment in Bovine Nuclear Transfer

Keiichiro TOMINAGA, Yukako HAMADA, Fumihiro IWAKI and Masuhiro SHIBATANI

Summary

The aim of this study was to determine the effect of donor cells treated by roscovitine (R) (cyclin dependent kinase inhibitor) on the developmental competence of embryos after nuclear transfer and the caving rate following transfer and to compare with those by serum starvation (SS). Donor cells of succession, which were derived from cumulus oocphorus collected by ovum pick up were cultured in the medium of Dulbecco's minimum essential medium (DMEM) with 0.5% fetal calf serum (FCS) for 4-7 days (SS), or with 10% FCS containing 15 μ M R for 24 hours. These donor cells were fused with enucleated oocytes and fused reconstructed oocytes were activated, followed by incubation in CR1aa medium with 10 μ g/ml cycloheximide (C) and 2.5 μ g/ml cytochalasin D for 1 hour. Embryos were transferred to CR1aa medium containig C for 4 hours. They were cultured in the CR1aa medium with bovine serum albumin or FCS for 7 days. The first cleavage rate of reconstructed embryos and the

2005年8月8日受理

* 兵庫県立農林水産技術総合センター

** 元兵庫県立農林水産技術総合センター

developmental rate to the blastocyst stage and the number of cells of Day 7 blastocysts were examined. To assess the ability to continue development to full term, 5 nuclear transfer embryos derived from adult granulosa cells treated with R were transferred to 5 recipients.

- (1) There was no significant difference ($P>0.05$) in the rates of fusion, first cleavage of reconstructed embryos and the developmental rate to the blastocyst stage between R and SS treatments.
- (2) Each of 5 nuclear-transferred embryos was transferred to 5 recipients, and 3 recipients were confirmed to be pregnant.

One was aborted at early gestation stage and finally 2 apparently normal female calves were delivered, and their birth weights were within the normal range of Tajima strain of Japanese Black cattle.

- (3) These results demonstrated that R treatment is as useful as SS treatment for synchronizing the cell cycle of donor cells in bovine nuclear transfer.

キーワード：体細胞核移植，ロスコビチン，ウシ胚，クローンウシ

緒言

哺乳動物における核移植技術は稀少動物，あるいは高価値動物を効率的に，しかも大量に生産できる手段を提供し，遺伝子組換え動物の生産にも大きく貢献している。

ウシでは核移植した再構築胚の胚盤胞への発生率が高く，子ウシ生産の成功例も多いが，正常子ウシの生産率が5%以下と低く，妊娠中の流産，分娩前後や誕生後1週間以内の死亡も多い^{9,25)}ことから，我が国では未だ実用面でウシの改良増殖への応用に至らず，食品としての利用も自粛されている。

体細胞核移植のドナー細胞を成熟促進因子 (maturation promoting factor: 以下MPFと呼ぶ) 活性の高い分裂中 (以下Mと呼ぶ) 期の卵子細胞質と同調させる必要があるため，ドナー細胞の細胞周期の調節が成功の大きな鍵と言われている。一般に，休止 (以下Gと呼ぶ) 期の休眠細胞が用いられ，ヒツジでの成功²⁶⁾以来，マウス²⁴⁾，ウシ¹⁰⁾，ブタ¹⁹⁾の種々の哺乳動物で体細胞クローン動物が作出されている。

G0/G1期の休眠細胞を作成する方法として，低濃度のウシ胎仔血清 (以下FCSと呼ぶ) を用いた血清飢餓処理が多く利用されている^{21,25,28,29,30)}が，飢餓培養では，細胞にアポトーシスが誘起され¹⁴⁾，さらに血清の通常濃度を添加した培養細胞を用いた核移植に比べ，胎仔死亡率が高い⁵⁾ことが指摘されている。核移植による子ウシ生産には必ずしもG0期調節は必要でなく²⁾，G0期よりG1/合成 (以下Sと呼ぶ) 期細胞の方が，活性化したレシピエント卵細胞質と同調し易い¹³⁾ことも示されている。

血清飢餓処理の他に，可逆的に処理前の状態に回復できるロスコビチン⁴⁾，スタウロスポリン³⁾やアフィディコリン²⁷⁾等の細胞周期調節物質が利用されている。特に，サイクリン依存性キナーゼ阻害剤であるロスコビチンは細

胞周期をG0/G1期に同期化でき，MPF活性を抑制することにより，卵子を卵核胞 (以下GVと呼ぶ) 期に停止させ²¹⁾，あるいはヒト線維芽細胞を効果的にG0/G1期に停止させる¹⁸⁾。ロスコビチン処理を解除すると，GV期卵子はMII期に移行し¹⁸⁾，G0/G1期に停止した細胞はS期に進む²¹⁾。最近，顆粒膜細胞の核移植試験において，ロスコビチン処理は血清飢餓処理より分娩後の子ウシの生存率が高いことが報告された⁴⁾。

著者ら⁷⁾は，血清飢餓処理した但馬ウシ卵丘細胞を利用することにより正常子ウシを生産したことを報告したが，本研究では増殖期にロスコビチン処理することによりG0/G1期へ同調した卵丘細胞を用いて，体細胞核移植を試み，血清飢餓処理による核移植成績と比較した。

材料及び方法

1 細胞周期検査

S期細胞検査法としてプロモ・デオキシ・ウリジン (以下BrdUと呼ぶ) ラベリング・ディテクション・キット (Roche社製) を用いてカバーガラスに張り付けた細胞を染色した。簡単に方法を説明すると，10 μ g/ml BrdU添加培養液で1時間培養後，0.9%クエン酸液で15分間低張処理し，4°Cカルノア液 (酢酸：メタノール=1:3) で1分間固定後，空气中で乾燥した。次に，スライドガラス上に置いたカバーガラスに1枚につき50 μ lのヌクレアーゼを添加した抗BrdUを滴下し，パラフィルムで覆い，保湿箱内にスライドガラスを置き，37°Cで30分間培養した。PBS (-) 液で3回洗浄後，1枚につき50 μ lの抗マウスIg蛍光色素反応液をスライドガラス上に置いたカバーガラスに滴下し，パラフィルムで覆って，アルミホイルで包んだ保湿箱内にスライドガラスを置き，37°C，30分間培養した。さらに，PBS (-) 液で3回洗

浄し、スライドガラス上にカバーガラスの細胞面を下にしてマウンティング・メEDIUM (KRP 社製) で封入し、蛍光顕微鏡 (オリンパス社製) を用いて、B 励起、200 ~ 400 倍で観察した。

8 ~ 12 代継代した卵丘細胞をロスコピチン処理、あるいは血清飢餓処理 (FCS 濃度: 0.05% あるいは 0.5%) 後、グロウス・メEDIUM (10% FCS, 10% トリプトース・フォスフェート・ブロス, 1% 重曹添加 Dulbecco's minimum essential medium (日水社製) (以下 DMEM と呼ぶ)) (以下 GM と呼ぶ) に戻し、1 時間の BrdU 処理で蛍光色素を取り込んだ S 期細胞を計測して、経過時間別に S 期細胞比率を算出し、血清飢餓処理解除後の経過時間による S 期細胞比率の変化を調べた。

2 核移植方法

(1) ドナー細胞の採取及び培養

但馬ウシの卵胞から卵丘細胞を経路的に採取し、GM 液を用いて 37°C, 5% CO₂ の気相条件下で数日に亘り細胞を継代し、10% ジメチル・スルフォキサイド (以下 DMSO と呼ぶ) (関東化学社製) を含む DMEM 液で 2 年間凍結保存しておいた細胞を融解後、継代してドナー細胞として用いた。前日から 15 μM ロスコピチンを添加した DMEM 液で処理、あるいは 4 ~ 7 日間 0.5% FCS 添加 DMEM 液を用いた血清飢餓培養によって、細胞周期を G0/G1 に同期化したドナー細胞を用いた。

(2) 核移植方法

卵子の採取、成熟培養、除核ならびに核移植については、既報²⁷⁾ 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。フィト・ヘモ・アグルチニン (ナカラ社製) を添加した 20% FCS 加 TCM199 (Gibco BRL 社製) 液の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、卵子成熟培養 23 ~ 24 時間後に細胞融合装置 (BTX 200) とニードル型電極 (富士平工業社製) を用い、Zimmerman 液²⁹⁾ 中で 30V/150 μm, 25 μsec, 1 回の直流パルスにより融合させた。融合確認後、ステンレスチャンバー (富士平工業社製) を用い、再び電気刺激 (20V/mm, 20 μsec) を行い、10 μg/ml シクロヘキシミド (Sigma 社製) を添加した 3mg/ml ウシ血清アルブミン (Sigma 社製) (以下 BSA と呼ぶ) を含む CR1aa²⁰⁾ 液で 5 時間培養し、その後既報²²⁾ 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/細胞挿入個数 × 100)、分割率 (分割胚数/融合胚数 × 100)、7 日目胚盤胞率及

び 8 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 2 重蛍光染色²³⁾ を行い、細胞数と細胞構成を比較した。統計処理では、7 日目胚盤胞の細胞数については t 検定を行い、百分率を角変換し、分散分析後、ダンカンの多重検定を行った。

3 移植試験

ロスコピチン処理した細胞から得られた 5 個の再構築 7 日目胚盤胞を 5 頭の黒毛和種受胎牛に 1 個ずつ新鮮胚移植した。

結 果

ドナー細胞の細胞周期について、BrdU を用いた S 期細胞検査法により測定した結果、S 期細胞比率はロスコピチン処理及び血清飢餓処理により 23% から 1 ~ 3% まで減少した。処理解除後、S 期細胞比率は 4 時間までは増加しなかったが、ロスコピチン処理では 6 時間には 10%、8 時間には 18% まで増加した。一方、血清飢餓処理では 6 時間では 5% 以下であったが、10 時間には 5 ~ 12% まで、12 時間には 12 ~ 15% まで増加した。飢餓解除 8 時間の S 期細胞比率の推移は 2 種類みられ、飢餓処理血清濃度にかかわらず、増加しない場合がみられた。処理解除後ロスコピチン処理では 6 時間には 10% まで増加したが、血清飢餓処理では 8 ~ 12 時間で 10% となりロスコピチン処理がより早く S 期へ移行した (図 1)。

核移植成績では融合率、分割率及び 7 日目、8 日目胚盤胞発生率において処理による差はみられなかった (表 1)。

核移植由来 7 日目胚盤胞の細胞数では内部細胞塊細胞数、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、ドナー細胞の処理による品質の差はみられなかった (表 2)。

移植成績ではロスコピチン処理した 5 個の胚盤胞を 1 胚ずつ 5 頭の受胎牛に移植した結果、3 頭 (60%) が受胎し、1 頭は流産したが、2 頭が分娩誘起によって、妊娠日齢 285 日と 280 日目に、正常な雌子ウシを分娩した (図 2)。

考 察

本研究では既法²⁷⁾ と同一のロスコピチン処理した継代細胞を用いて核移植を行い、発生した胚盤胞を移植して体細胞クローンウシを生産した。血清飢餓及びロスコピチン処理により、S 期細胞は殆どみられなくなり、ロスコピチン処理では血清飢餓処理より処理解除後早く S 期へ移行した。Kurosaka ら¹³⁾ は 0.2% 血清を用いて飢餓処

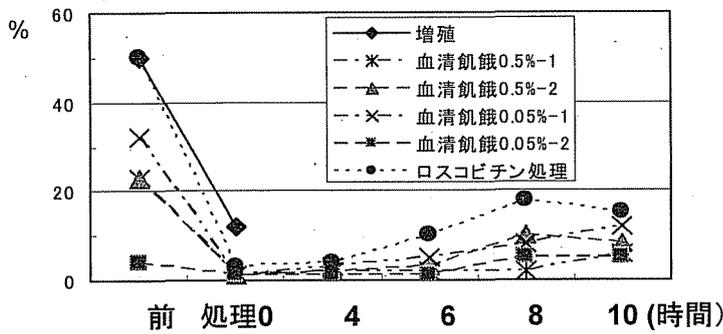


図1 ロスコピチン処理及び血清飢餓処理解除後のS期細胞の割合(1時間当たり)の変化
 注:表示時間はBrdU取り込み時間(1時間)を含まない。6時間目血清飢餓0.5%-1区及び0.05%-2区とロスコピチン処理とに有意差(P<0.05)。



図2 クローン産子(上:C-3 下:C-4)

表1 処理別核移植胚の融合率ならびに発生率

処理方法	供試卵子数	融合数	(%)	分割数	(%)	7日目胚盤胞数	(%)	8日目胚盤胞数	(%)
ロスコピチン	283	186	(65.6)	139	(79.5)	90	(47.8)	104	(57.5)
血清飢餓	251	183	(78.4)	143	(78.8)	106	(54.5)	113	(61.1)

表2 処理別核移植7日目胚盤胞の品質

処理方法	供試胚数	内部細胞塊細胞数	栄養膜細胞数	総細胞数	内部細胞塊細胞比率(%)
ロスコピチン	63	23.0	70.1	93.6	20.7
血清飢餓	78	23.1	70.0	92.8	22.9

表3 処理方法別移植成績

移植頭数	受胎頭数	(%)	分娩頭数	(%)	備考
5	3	60.0	2	40.0	C-3, C-4*

* 生時体重及び妊娠期間: C-3 26.3kg 275日, C-4 25.8kg 284日

理を行い、細胞周期を調節したドナー細胞による核移植再構築胚では、G0期からは6~9時間でS期へ移行するが、G1期からは6時間以内に移行することを報告した。これらのことから本研究のドナー細胞の細胞周期を推定すると、血清飢餓処理ではG0期であったが、ロスコピチン処理ではG1期であったと思われる。

本研究の核移植成績では融合率、分割率及び7日目8日目胚盤胞発生率において差がみられなかった。また、移植試験には制約があるため、胚盤胞の品質を細胞数で評価した。7日目胚盤胞の細胞数では内部細胞塊細胞数、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、ドナー細胞処理による品質の差はみられなかった。Gibbonsら⁴⁾は顆粒膜細胞を体細胞核移植のドナー細胞として用い、ロスコピチン処理は血清飢餓処理よりG0/G1期の比率が高く、胚盤胞発生率が低く、細胞数は少ないことを報告し、両者に差がなかった本研

究の結果と異なっている。

G1期とG0期細胞の形態的な区別は困難であるが、Wellsら²⁶⁾は血清飢餓処理によるG0期、あるいは分裂直後の細胞採取によるG1期細胞を用いた核移植で、妊娠率は変わらなかったが、出生後の子ウシ死亡率がG1期はG0期よりが高かったことを報告した。さらに、Wellsら²⁷⁾は血清飢餓、蛋白キナーゼ阻害剤であるスタウロスポリン及びDNAポリメラーゼ特異的阻害剤であるアフィディコリン処理によってウシ胎仔線維芽細胞をG0期、早期G1期あるいは後期G1期に分類した。これらの細胞を使って核移植を行った結果、胚の発育率では後期G1期が低く、子ウシ生産率ではG0期が高く、離乳時生存子ウシ率では差がみられなかったが、誕生後の生存率はG1期がG0期に比べ高い傾向がみられた。

一方、血清飢餓で培養すると、細胞にアポトーシスが誘起される¹⁴⁾こと、さらに通常濃度の血清を添加して培

養した細胞を用いた核移植より胎仔の死亡率が高いことも報告されている⁵⁾。

著者らは血清飢餓処理した卵丘細胞を用いて体細胞クローンウシを生産したことを報告し⁷⁾、本研究でも正常子ウシを既報⁷⁾と同率で生産した。しかし、Cibelliら²⁾は振り動かし法によるG1期細胞を用いた核移植で子ウシを生産したが、コンフルエント状態でG0期になった細胞からは妊娠180日以降の生存子ウシが得られなかったことを報告した。さらに、Gibbonsら⁴⁾は移植では受胎率に差はないが、ロスコピチン処理が血清飢餓処理より胚盤胞当たりの子ウシ生産率及び分娩後の子ウシの生存率が高いことを報告し、本研究の結果とは異なっている。

細胞数の多少が子ウシの生産に影響を及ぼす可能性はあるが、核移植胚の細胞数のみでは、個体への発生能は評価できないという報告¹²⁾があり、体細胞核移植再構築胚の移植において、核移植操作が原因と思われる妊娠初期から後期までの広い範囲での流産や、過大子、生後直死が多く発生することも報告されている^{5,25)}。

本研究でも1頭が妊娠初期に流産したが、妊娠した2頭は分娩誘起により正常な雌子ウシを分娩し、子ウシの虚弱も認められなかった。Katoら¹¹⁾及びLucasら¹⁶⁾は生産率の高い細胞のロットが存在することを報告し、クローンウシの生産率がドナー細胞の由来によって異なる^{8,11)}ことも示されている。このような理由によって、本研究とGibbonsら⁴⁾の子ウシ生産で差が生じたと考えられ、例数は少ないが、本研究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ったと思われる。

しかし、クローンウシの生産にはドナー細胞や核移植方法のみならず、再構築胚の培養方法も大きく影響すると考えられるため、胚の細胞数や細胞構成の他に染色体異常¹⁵⁾、遺伝子発現やDNAのメチル化パターン³¹⁾等の項目についても調査する必要がある。

本研究とGibbonsら⁴⁾の結果からロスコピチン処理によるクローンウシ生産を考察すると、体細胞核移植のドナー細胞としてロスコピチン処理によるG1期細胞を用いると、血清飢餓処理によるG0期細胞を用いた場合と同等に胚盤胞及びそれらの移植による正常子ウシを生産することが可能であると思われる。

謝 辞

卵巣採取にご協力頂いた、兵庫県食肉衛生検査センターの皆様へ感謝します。

引用文献

(1) Alessi F, S. Quarta, M. Savio, F. Riva, L. Rossi, L. A.

Stivala, A. I. Scovassi, L. Meijer and E. Prosperi (1998): The cyclin-dependent kinase inhibitors olomoucine and roscovitine arrest human fibroblasts in G1 phase by specific inhibition of CDK2 kinase activity: *Exp. Cell. Res.* 245, 8-18

(2) Cibelli, J. B., S. L. Stice, P. G. Golueke, J. J. Kane, J. Jerry, C. Blackwell, F. A. Ponce de Leon and J. M. Robl. (1998): Cloned transgenic calves produced from non-quiescent fetal fibroblasts: *Science* 280, 1256-1258

(3) Crissman, H. A., D. M. Gadbois, R. A. Tobey and E. M. Bradbury (1991): Transformed mammalian cells are deficient in kinase-mediated control of progression through the G1 phase of the cell cycle: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7580-7584

(4) Gibbons, J., S. Arat, J. Rzucidlo, K. Miyoshi, R. Waltenburg, D. Respass, A. Venable and S. Stice (2002): Enhanced survivability of cloned calves derived from Roscovitine-treated adult somatic cells: *Biol. Reprod.* 66, 895-900

(5) Edwards, J. L., C. M. Dorado, T. J. Wilson and F. N. Schicj (2001): Development of cloned embryos reconstructed with serum fed or starved adult granulosa cells: *Theriogenology* 55, 265

(6) 濱田由佳子・富永敬一郎・柴谷増博・有吉哲志 (2002): 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

(7) 濱田由佳子・富永敬一郎・柴谷増博 (2003): 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: *兵庫農技研報* 39, 1-5

(8) 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. Reprod.* 66, 6-13

(9) Hill, J.R., A. J. Roussel, J. B. Cibelli, J. F. Edwards, N. L. Hooper, M. W. Miller, J. A. Thompson, C. R. Looney, M. E. Westhusin, J. M. Robl and S. L. Stice (1999): Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies): *Theriogenology* 51, 1451-1465

(10) Kato Y., T. Tani, Y. Sotomaru, K. Kurokawa, J. Kato, H. Doguchi, H. Yasue and Y. Tsunoda (1998): Eight calves cloned from somatic cells of a single adult: *Science* 282, 2095-2098

(11) Kato, Y., T. Tani and Y. Tsunoda (2000): Cloning of

- calves from various somatic cell types of female adult, newborn and fetal cows : *J. Reprod. Fertil.* 120, 231-237
- (12) Kasinathan, P., Jason G. Knott, Pedro, N. Moreira, S. Amy., D. Burnside, D. J. Jerry and M. J. 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
- (13) Kurosaka, S., Y. Nagao, N. Minami, M. Yamada and H. Imai (2002) : Dependence of DNA Synthesis and In Vitro Development of Bovine Nuclear Transfer Embryos on the Stage of the Cell Cycle of Donor Cells and Recipient Cytoplasts: *Biol. Reprod.* 67, 643-647
- (14) Kues, W. A., M. Anger, J. W. Carnwarth, J. Motlik and H. Nieman (2000) : Cell cycle synchronization of porcine fibroblasts: effects of serum deprivation and reversible cell cycle inhibitors : *Biol. Reprod.* 62, 412-419
- (15) Li, G-P., T. D. Bunch, K. L. White, K. I. Aston, L. N. Meerdo, B. J. Pate and B. R. Sessions (2004) : Development, chromosomal composition, and cell allocation of bovine cloned blastocyst derived from chemically assisted enucleation and cultured in conditioned media: *Mol. Reprod. Dev.* 68, 189-197
- (16) Lucas-Hahn A., E. Lemme, K. G. Hadeler, H. G. Sander and H. Niemann (2000) : The source of fibroblast affect in vivo development of cloned bovine embryos : *Theriogenology* 57, 433
- (17) McDermand D. (1991) : The viability of late morulae and blastocysts produced by nuclear transplantation in cattle: *Theriogenology* 35, 161-170
- (18) Mermillod P., M. Tomanek, R. Marchal and L. Meujer (2000) : High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF kinase activity: *Mol. Reprod. Dev.* 55, 89-95
- (19) Onishi A, M. Iwamoto, T. Akita, S. Mikawa, K. Takeda, T. Awata, H. Hanada and A. C. F. Perry. (2000) : Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei: *Science* 289, 1188-1190
- (20) Resenkrans, C. F. Jr. and N. L. First (1993) : Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes in vitro: *J. Anim. Sci.* 72, 434-437
- (21) Stice, S.L. and N. L. First (1993) : Progress towards efficient commercial embryo cloning. : *Anim. Reprod. Sci.* 33, 83-98
- (22) Tominaga, K., Y. Hamada, T. Yabuue and T. Ariyoshi (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
- (23) Tominaga K. and Y. Hamada. (2004) : Efficient production of sex-identified and cryosurvived bovine in vitro-produced blastocysts: *Theriogenology* 61, 1181-1191
- (24) Wakayama T, A. C. F. Perry, M. Zuccotti, K. R. Johnson and R. Yanagimachi (1998) : Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei: *Nature* 394, 369-374
- (25) Wells, D. N., P. M. Misica and H. R. Tervit (1999) : Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells: *Biol. Rprod.* 60, 996-1005
- (26) Wells, D. N, A. Miller, J. Oliver, F. Tucker, J. Forsty, M. Berg, K. Cockrem, B. Oback and H. R. Tervit (2002) : Greater post-natal viability with G0 compared to G1 donor cells following somatic cell nuclear transfer in cattle: *Cloning and stem cells* 4 (3), 296-297
- (27) Wells, D. N., G. Laible, F. C. Tucker, A. L. Miller, J. E. Oliver, T. Xiang, J. T. Forsyth, M. C. Berg, K. Cockrem, P. J. L. Huillier, H. R. Tervit and B. Oback (2003) : Coordination between donor cell type and cell cycle stage improves nuclear cloning efficiency in cattle: *Theriogenology* 59, 45-59
- (28) Wilmut I, A. E. Schnieke, J. McWhir, A. J. Kind and K. H. S. Campbell (1997): Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. : *Nature* 385, 810-813
- (29) Wilson, J. M., J. D. Williams, K. R. Bondioli, C. R. Looney, M. E. Westhusin and D. F. Mecalla (1995) : Comparison of birth weight and growth characteristics of bovine calves produced by nuclear transfer (cloning), embryo transfer and natural mating: *Anim. Reprod. Sci.* 38:73-83
- (30) Willadsen S. M., R. E. Janzen, R. J. Mc Alister, B. F. Shea, G. Hamilton and D. McDermand (1991) : The viability of late morulae and blastocysts produced by nuclear transplantation in cattle: *Theriogenology* 35, 161-170
- (31) Young, L. E. and H. R. Fairburn (2000) : Improving the safety of embryo technologies, possible role of genomic imprinting: *Theriogenology* 53, 627-648
- (32) Zimmerman, U. and J. Vienken (1982) : Electric field-induced cell-to-cell fusion: *J. Membr. Biol.* 67, 165-182