

# 優良種雄牛造成に向けた体細胞クローン牛生産技術の検討

児玉英樹・野口龍生\*・鈴木暁之\*\*・福成和博・吉川恵郷

## はじめに

クローン技術はドナー細胞の由来別に受精卵クローンと体細胞クローンに分けられている。体細胞クローン動物は、1997年にWilmutら<sup>2)</sup>が6歳の雌羊の乳腺細胞由来培養細胞を用いて世界初の体細胞クローン羊を作出したことに始まる。国内では1998年にKatoら<sup>9)</sup>が、牛卵丘細胞と牛卵管細胞由来の培養細胞を用いて世界初の体細胞クローン牛作出に成功して以来、国内で多くの研究機関が試験研究に取り組んでいる。岩手県では1998年からクローン技術の研究に取り組み、2001年に初めて成体由来線維芽細胞をドナー細胞とした体細胞クローン牛の生産に成功した。

畜産分野における体細胞クローン技術の利用目的は、高能力牛のクローンを大量に生産し、高品質な生産物を安定的且つ安価に流通させることや、クローン検定による肉用種雄牛の短期造成などが考えられる。現在実施している後代検定法による種雄牛造成は、5年余りの歳月と8頭の間接検定牛を必要<sup>16)</sup>とする。しかし、生後間もない高育種価雄子牛の体細胞クローン牛を生産し、産肉能力検定に用いることで検定期間が約1.5年短縮<sup>16)</sup>できる。また、クローン牛2頭で間接検定牛8頭と同等の信頼度を得られること<sup>9)</sup>から、検定牛導入費と飼養管理費の削減も可能<sup>16)</sup>となる。

そこで、体細胞クローン牛を安定的に生産する技術開発を目的に、再構築胚作出のための発生培養液と受胎性および子牛生産性の検討を行うと共に、多発する流死産の原因究明のため、再構築胚の染色体異常について研究を行ったのでその概要を報告する。

## 試験方法

### 1 核移植の操作手技

#### (1) レシピエント卵子

レシピエント卵子の材料となる卵丘細胞卵子複合体(COC:cumulus-oocyte complex)は、食肉処理場で黒毛和

種、日本短角種、ホルスタイン種及び交雑種から採取した卵巣より吸引した。卵巣輸送液は10~15℃に保温したm-PBS (Dulbecco's modified PBS)を用いた。COCの吸引は2~5mmの小卵胞から18Gの注射針を装着した10mlの注射筒を用いて行い、卵丘細胞が緻密に付着しているものを選別して成熟培養に供した。成熟培養液は、後述の血清添加共培養区では10%牛胎子血清(FCS:Fetal Calf Serum)添加Medium199(Invitrogen Corp.,Carlsbad,CA USA)を、無血清非共培養区ではIVMD101<sup>®</sup>(機能性ペプチド研究所)を用いて温度38.5℃、気相5%CO<sub>2</sub>、95%空気の湿潤条件下で17~18時間培養した。成熟培養後のCOCは、0.1%Hyaluronidase添加M2液(表1)中でピペッティングにより裸化し、第1極体を放出しているものを成熟卵子として選抜した。卵子の除核は、マイクロマニピュレーター(MODEL:MM-88-0,Narishige)を取り付けた倒立顕微鏡(MODEL:IMT-2,OLYMPUS)下で、卵子をホールディングピペットに固定し(図1)、ガラスニードルを透明帯に突き刺した。ホールディングピペットとガラスニードルを擦り合せて透明帯にスリットを入れ(図2)、極体とその近隣細胞質を部分的に押し出すことにより行った(図3)。押し出した細胞質は蛍光染色(10μg/ml Hoechst33342;和光純薬)を施し、UV励起により除核が確認された卵子をレシピエント卵子として供試した。

#### (2) ドナー細胞

ドナー細胞は、生後483、489日齢の黒毛和種肥育牛2頭と生後7~46日齢の高育種価牛の黒毛和種雄産子6頭(表2)の頸部皮膚組織約1cm角を採取した。組織片はPBS(-)とともに50mlのコニカルチューブ(BDファルコン)に入れて室温で研究室に持帰り、アルコールとポピドンヨード液で洗浄消毒後、滅菌した外科ハサミで細切した。細切組織片は10%FCSを添加したDulbecco's modified Eagle medium (SIGMA、以下10%FCS添加DMEM)を入れた直径100mmの組織培養用ディッシュに移し、温度38.5℃、気相5%CO<sub>2</sub>、95%空気の湿潤条件下で培地交換を毎日行いながら約10日間培養した。培養細胞はPBS(-)で2回洗浄後、0.05%EDTA・2Na添加0.125%Trypsin液(表3)を用いてディッシュの底面から剥離した。次いで10mlの

\* 現岩手県北家畜保健衛生所、\*\* 現岩手県農林水産部畜産課

メスピペットにPBS (-) を7ml吸引して、ディッシュを洗うように細胞を回収し、尖底遠沈管に移して遠心した。細胞液の遠心条件は全て1,200rpmで5分間とした。上清を吸引除去し細胞数を計測後、 $5.0 \times 10^5$  cellsを継代培養に、残りは凍結保存した。継代培養は10%FCS添加DMEMを入れた直径100mmの組織培養用ディッシュを用いて、前述の温度と気相条件下で4～5日毎に20代目まで行った。凍結処理は細胞数 $2.0 \sim 2.5 \times 10^5$ あたり0.5mlの凍結保存液 (Cell stock medium) (表4) を加えてピペティングし、クライオチューブに0.5mlずつ分注後、 $-80^\circ\text{C}$  で保存した。ドナー細胞の作出は凍結した細胞を核移植の8日前に融解し、10% FCS添加DMEMを10ml入れた尖底遠沈管に直接投入後、遠心した。上清を吸引除去後に10%FCS添加DMEMを4ml加えて数回ピペティングし、直径60mmの細胞培養ディッシュに移して前述の温度と気相条件下で3日間培養した。その後培養液を0.5% FCS添加DMEMに置換して5日間継続培養した<sup>25)</sup>。培養細胞は、核移植直前に前述と同様の方法で底面から剥離し、0.5%FCSを添加したPBS(-) を4ml用いて細胞を回収後遠心した。上清を吸引除去後に、0.5%FCS添加PBS (-) を1～2ml加えたものをドナー細胞浮遊液とした。

(3) ドナー細胞の挿入および細胞融合並びに活性化処理方法  
レシピエント卵子囲卵腔内へのドナー細胞の挿入は、 $50 \mu\text{g/ml}$  Phytohemagglutinin (和光純薬) 添加20mM-HEPES buffered TCM199内で行った。細胞融合は、融合液 (Zimmerman mammalian cell fusion medium) <sup>23)</sup> 中で直流パルス ( $25\text{V}/150 \mu\text{m}, 10 \mu\text{sec} \times 1$  回を通电) による電気

刺激で行った<sup>2)</sup> (図4)。電気刺激には細胞融合装置 (MODEL:LF101,BEX)とニードル型電極 (MODEL:CUY5100-100,ユニークメディカルイマダ) を使用した。融合した卵子の活性化処理は、 $2.5 \mu\text{g/ml}$  Cytochalasin D (SIGMA) および $10 \mu\text{g/ml}$  Cycloheximide (Wako) で1時間、 $10 \mu\text{g/ml}$  Cycloheximideで4時間の培養<sup>26)</sup>により行い、発生培養に供した。

## 2. 試験設計

### (1) 発生培地の比較検討

活性化処理後の再構築胚は、血清添加共培養区と無血清非共培養区に分けて培養を行った。前法の培養液はCR1aa<sup>1017)</sup>を用い、温度 $38.5^\circ\text{C}$ 、気相5%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub>、90%N<sub>2</sub>の湿潤条件下で核移植後48時間まで培養した。さらに培養液を5% FCS添加CR1aaに置換して温度 $38.5^\circ\text{C}$ 、気相5%CO<sub>2</sub>、95%空気の湿潤条件下でウシ卵丘細胞と共培養を行った。なお、ウシ卵丘細胞はマイトマイシン (Mytomycin-C,協和発酵) 処理したものを使用した。後法の無血清非共培養区は、培養液にIVD101<sup>9)</sup>を用い、温度 $38.5^\circ\text{C}$ 、気相5%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub>、90%N<sub>2</sub>の湿潤条件下で培養を行い、培養開始後48時間目に約80%の培地交換を行った。核移植胚の培養は10日間行い、核移植後48時間目の分割胚率と5～10日目までの胚盤胞発生率をそれぞれ調査した。なお、培養液の比較に用いた細胞は、表2のAとBの2種類で、それぞれ9回ずつ計18回行った。

### (2) 再構築胚の移植

核移植後6～8日目の胚盤胞期再構築胚は(図5)、頸

表1. 0.1%Hyaluronidase添加M2液(100ml)の組成と調整方法

①NaCl (Nakalai ; Cat No, 313-20)-----	553mg
②KCl (Wako ; Cat No, 163-03545)-----	36mg
③KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Wako ; Cat No, 169-04245)-----	16mg
④MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (Wako ; Cat No, 131-00405)-----	29mg
⑤NaHCO <sub>3</sub> (Nakalai ; Cat, No312-13)-----	35mg
⑥D(+)-Glucose, anhydrous (Nakalai ; Cat No, 168-06)-----	100mg
⑦Pyruvic acid sodium salt (Sigma ; Cat No, P-2256)-----	3.6mg
⑧Phenol Red Solution, 0.5% (GIBCO BRL ; CatNo, 15100-043)-----	200 $\mu$ l
⑨DL-Lactic acid sodium salt (Sigma ; Cat No, L-7900)-----	332 $\mu$ l
⑩CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O (Wako ; Cat No, 031-00435)-----	25mg
⑪HEPES (Wako ; Cat No, 346-01373)-----	497mg
⑫Antibiotic stock (Pc+Sm)-----	100 $\mu$ l
⑬Hyaluronidase (Sigma ; Cat No, H3506)-----	87.5mg
⑭Polyvinylpyrrolidone (Nakalai ; Cat No, 283-14)-----	1,000mg

#### 【調整方法】

- 100mlのメスシリンダーに約60mlのDDWを入れ、①～⑨までの試薬を順次溶解する。
- CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>Oは約5mlのDDWで溶解し、1. の液に加える。
- HEPESは約5mlのDDWで溶解し、0.2N-NaOHでpHを7.4に修正し2. の液に加える。
- Antibiotic-stockを加えて、DDWで100mlにメスアップする。
- ⑬と⑭を加えて静置して溶解する。
- 濾過滅菌後 $-20^\circ\text{C}$ で保存する。

表2. 核移植に使用したドナー細胞

細胞ID	品 種	性別	採材日齢	細胞採取部位	細胞の種類	継代数
A	黒毛和種	雌	489	頸部皮膚	線維芽細胞	5~7
B	黒毛和種	雄	483	頸部皮膚	線維芽細胞	3~6
C	黒毛和種	雄	14	頸部皮膚	線維芽細胞	3~4
D	黒毛和種	雄	7	頸部皮膚	線維芽細胞	4~5
E	黒毛和種	雄	46	頸部皮膚	線維芽細胞	4
F	黒毛和種	雄	27	頸部皮膚	線維芽細胞	1
G	黒毛和種	雄	10	頸部皮膚	線維芽細胞	1
H	黒毛和種	雄	9	頸部皮膚	線維芽細胞	2,21

表3. 0.05%EDTA・2Na添加0.125%Trypsin液(100ml)の組成と調整方法

①EDTA・2Na(Nakalai;CatNo,151-11)	100mg
②Dulbecco'sPBS(-)(Nissui;Cat No,05913)	1,920mg
③D(+)-Glucose,anhydrous(Nakalai;Cat No,168-06)	200mg
④Tris(GIBCOBRL;Cat No,15504-012)	600mg
⑤Phenol Red Solution,0.5%(GIBCO BRL;Cat No,15100-043)	160 $\mu$ l
⑥2.5%Trypsin(GIBCO BRL;Cat No,15090-046)	10ml

## 【調整方法】

- 250mlのメスシリンダーに約100のDDWを入れ、①~⑤の試薬を順次溶解する。
- DDWを加えて200mlにメスアップし、1N-HClでpHを7.6に修正する。
- ⑥を加えて濾過滅菌後、4°Cで保存する。

表4. Cell Stock Medium(50ml)の組成と調整方法

A medium	7.5ml
DMEM (Sigma ; Cat No, D-5796)	45ml
D(+)-Glucose,anhydrous (Nakalai ; Ca tNo, 168-06)	10,000mg
HEPES (Wako ; Cat No, 346-01373)	119.2mg
Dimethyl sulfoxide (Sigma ; Cat No, D-2625)	5ml
Fetal Calf Serum	37.5ml

## 【調整方法】

- A medium (DMEM45ml+Glucose10,000mg+HEPES119.2mg) を調整する。
- A medium7.5mlにDMSO5mlとFCS37.5mlを加えて、濾過滅菌後使用する。

管経由法により黒毛和種2頭、日本短角種2頭、交雑種30頭、計34頭に1胚ずつ新鮮胚移植した。妊娠鑑定は、胚移植後21~28日に超音波診断装置(SSD500,ALOKA)を用いて行い、胎子が確認できたものを受胎と判定した。受胎確認後、流産胎子の確認および発情回帰日を流産発生日齢とした。また、クローン牛の出生時の胎齢と体重は、2003年2月から2004年5月に当所で人工授精又は体内胚移植により生産された黒毛和種子牛16頭と比較を行った。

## (3) 死亡牛の病理検査

死亡したクローン牛の病理解剖検査は岩手県中央家畜保健衛生所で行った。組織検査は主要臓器、胸腺、副腎、甲状腺、舌、結腸、骨格筋、脊髄、下垂体および脳の一部を10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、定法に従ってパラフィン切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色(HE染色)を施し鏡検した。また、材料の一部は独立

行政法人農業技術研究機構動物衛生研究所に送付して病理組織学的検査を行った。

## (4) ドナー細胞と再構築胚の染色体検査

ドナー細胞の染色体検査は、生後7日齢の黒毛和種子牛1頭から採取した頸部皮膚由来線維芽細胞を継代3代目で凍結保存したものをを用いた。試験回数は2回行い、細胞分裂中期像を示す264個の細胞の染色体数を計測した。分裂阻止は、細胞を10% FCS添加DMEMで48時間培養後、100  $\mu$ g/mlColcemid Solution (GIBCO) で2~3時間継続培養することにより行った。分裂阻止した細胞は、Trypsin処理後に尖底遠沈管に回収し遠心後に上清を吸引除去した。低張処理は沈渣に1% Sodium Citrateを1ml加え室温で30分間行った。弱固定は-20°Cに冷却した固定液(メタノール:酢酸=3:1混合液)を1ml加えることにより行い、遠心後上清を吸引除去した。固定は、沈渣に固定液を5ml加えて再浮遊し、遠心と上清固定液を

吸引する操作を3回繰り返した後に、10mlの固定液を加え-20℃で一晩放置して行った。スライドガラス上への展開は既報<sup>1)</sup>に準じて行い、十分乾燥させた標本を5%ギムザ染色液で10分間染色、水洗乾燥後、光学顕微鏡で観察した。

再構築胚の染色体検査は、前述の供核細胞を用いて血清添加共培養系で作出した。核移植後7日目の胚盤胞期胚45個を用いた。検査は分裂阻止方法を100 $\mu$ g/ml Colcemid Solution (GIBCO) 含有培地で10時間培養とする以外は既報<sup>1)</sup>に従って実施した。

#### (5) 統計処理

血清添加共培養区と無血清非共培養区における核移植後の融合率、分割胚率、発生胚率および再構築胚の受胎率、流産発生率についての有意差検定はカイ二乗検定法により、クローン牛群と対照群（人工授精：AI、受精卵移植：ET）の在胎日数、生時体重の有意差検定はt検定によりそれぞれ行った。

## 試験結果

### 1 再構築胚の培養条件と分割胚率および胚盤胞発生率

核移植および発生培養成績は表5に示した。核移植卵の融合率と核移植後48時間目の分割胚率は、血清添加共

表5. 再構築胚の培養条件と分割胚率および胚盤胞発生率

区分	細胞ID	試験回数	核移植卵数	融合(%) 胚数	分割(%) 胚数	発生(%) 胚数
血清添加 共培養区	A	9	150	100 (66.7)	87 (87.0)	50 (50.0) a
	B	9	146	122 (83.6)	102 (83.6)	49 (40.2) ab
計		18	296	222 (75.0)	189 (85.1)	99 (44.6) a
無血清非 共培養区	A	9	189	124 (65.6)	112 (90.3)	30 (24.2) c
	B	9	155	125 (80.0)	102 (81.6)	39 (31.2) bc
計		18	344	249 (72.4)	214 (85.9)	69 (27.7) c

※：a, b, c異符号間に有意差有り (P<0.05)  
分割率と発生率は融合胚数に対する割合

表6. 再構築胚の受胎成績

(平成16年9月末現在)

区分	移植頭数	受胎(%) 頭数	流産(%) 頭数	分娩頭数	妊娠継続頭数
血清添加共培養区	26	10 (38.5)	4 (40.0)	5	1
無血清非共培養区	9	3 (33.3)	2 (66.7)	1	0
合計	35	13 (37.1)	6 (46.2)	6	1

表7. クローン産子とAI又はETにより生産された子牛の分娩状況の比較

区分	頭数	在胎日数*	(範囲)	生時体重**	(範囲)
クローン群	6	293.0日	(289~301)	40.5kg	(26~52)
対照群	16	290.1	(285~295)	33.2	(25~40)

\* 在胎日数 (P<0.17)

\*\* 生時体重 (p<0.18)

培養区が222/296個 (75.0%)、189/222個 (85.1%) であり、無血清非共培養区の249/344個 (72.4%)、214/249個 (85.9%) と有意な差を認めなかった。しかし、胚盤胞発生率は血清添加共培養区が99/222個 (44.6%) であり、無血清非共培養区の69/249個 (27.7%) より有意に高率であった (P<0.05)。

### 2 再構築胚の受胎成績

再構築胚の受胎率は13/35頭 (37.1%) であった。また、流産の発生は胎齢46~118日に6/13頭 (46.2%) 認めた。なお、血清添加共培養区と無血清非共培養区の受胎率と流産発生率には有意差を認めなかった (表6)。

### 3 クローン牛とAI又はETにより生産された子牛の分娩状況の比較

本試験で生産した黒毛和種のクローン牛6頭の平均在胎日数は293.0日であり、対照群の290.1日と比較して延長する傾向にあった (P<0.17)。また、クローン牛の平均生時体重は40.5kgであり、対照群の33.2kgより大きくなる傾向にあった (P<0.18) (表7)。

### 4 体細胞クローン牛の分娩状況

クローン産子では50kg以上の過大産子が2例認めら

表 8. 体細胞クローン子牛の分娩状況

(平成16年 9 月末現在)

産子番号	細胞ID	品種	発生地	在胎日数	生時体重 (kg)	分娩形態	経過
1	B	黒毛	CR1	289	26	自然分娩	生後 3 日齢で死亡
2	B	黒毛	IVD	290	28	自然分娩	生後45日齢で死亡
3	C	黒毛	CR1	294	41	自然分娩	生存
4	D	黒毛	CR1	292	52	介助分娩	生存
5	D	黒毛	CR1	301	52	帝王切開	生存
6	F	黒毛	CR1	292	44	誘起分娩	生存

注) CR1 (血清添加共培養)  
IVD (無血清非共培養)

れた。これらはドナー細胞が同一で、血清添加共培養法により作出した再構築胚由来産子であった。分娩状況は 1 頭が介助を要し、もう 1 頭は胎齢301日に達していたため、帝王切開により娩出した (表 8)。

5 死亡したクローン牛の剖検および病理組織所見

誕生した 6 頭のうち 2 頭は生後 3 日 (No 1) および 45 日齢 (No 2) に死亡した。生後 3 日齢で死亡したクローン牛は、肉眼的に心室中隔閉鎖不全や右肺中間葉發育不良を観察した。組織学検査では顕著な脂肪肝と脳幹部の空胞形成が認められた。45日齢で死亡したクローン牛は、右側前葉と左側中葉の肺炎と腎皮質部の間質に索状白色巣の散在が観察された。組織学検査では肺に広範な出血と好中球の浸潤、骨格筋には硝子様変性や絮状変性などがそれぞれ観察された。なお、2 頭の他の臓器の所見は

表 9 に示した。

6 染色体検査成績

ウシの 4 代継代した皮膚由来線維芽細胞の 256/264 個 (97%) が正倍数性 (2n=60) を示した (表10)。しかし、この細胞をドナー核とした胚盤胞期胚の染色体数的異常胚率は 36/38 個 (94.7%) と高率であった。なお、異常胚の 30/36 個 (83.3%) が正常な二倍体細胞と異常細胞が混在する染色体モザイクであった (表11)。

表10. ドナー細胞の染色体数

細胞の種類	線維芽細胞
継代数	4
試験回数	2
染色体計測細胞数	264
正倍数性 (2N=60)	256 (97.0%)
異数性	8 ( 3.0%)

表 9. 死亡したクローン牛の剖検および病理組織所見

産子番号	1	2
剖検所見	1. 心室中隔閉鎖不全、アランチウス閉鎖不全、右心室壁の肥厚 2. 両側肺の点状出血、尖葉から中間葉の水腫性無気肺、右中間葉發育不良 3. 胸腺の著しい發育不良、胸部胸腺の出血 4. 気管および気管支腔に泡沫液とともに多量のミルク貯留・栓塞 5. 左側頸部から胸部皮下織の著しい水腫 6. 胆嚢および十二指腸粘膜の充血 7. 回腸の弛緩と多量の黄色便貯留 8. 盲腸から直腸に多量の黄色・水分に乏しい便の貯留 9. 直腸粘膜の充血と彌爛散在 10. 腎盂の拡張と膀胱の膨満 11. 脂肪肝	1. 肺炎 (右側前葉、左側中葉) 2. 腎皮質部の間質に索状白色巣の散在 3. 胸部胸腺の萎縮および全身リンパ節における皮質領域の菲薄化 4. 右心室の拡張 5. 軽度の脂肪肝
病理組織所見	肝：顕著な脂肪肝 腎：一部に尿細管の拡張 肺：肺胞中隔の肥厚、水腫、好中球の浸潤、線維素の析出、一部に点状出血、化膿性肺炎 胸腺：皮質はやや菲薄化 結腸：陰窩の拡張、鬱血 脳：脳幹部の白質を主体に多数の空胞形成	肝：軽度の脂肪肝、好中球増多、赤血球食現象 脾：白脾髄は未発達、赤脾髄に鬱血と赤血球食現象 腎：髓質に囊胞散見 心：鬱血 肺：広範な出血、角化上皮が散見、好中球の浸潤、場所によっては水腫 胸腺：皮質の菲薄化 扁桃：濾胞のリンパ球はほとんど消失 リンパ節：濾胞未発達 骨格筋：硝子様変性、絮状変性、マクロファージの貪食

表11. 再構築胚の染色体分析結果

処理胚数 (A)	45		
分裂中期像を有する胚数 (B)	38	(84.4%)	B/A * 100
正常胚数 (C)	2	( 5.3%)	C/B * 100
異常胚数 (D)	36	(94.7%)	D/B * 100
-----			
(異常胚の内訳)			
多倍体 (E)	1	( 2.8%)	E/D * 100
染色体モザイク (F)	30	(83.3%)	F/D * 100
判定不可 (G)	5	(13.9%)	G/D * 100

## 考 察

今回我々は、体細胞クローン牛を安定的に生産する技術開発を目的に、再構築胚の効率的な発生培養方法と再構築胚の受胎性および子牛生産性について検討した。また、多発する流産の原因究明のため再構築胚の染色体異常について検討を行った。その結果、再構築胚作出のための発生培養方法は、胚盤胞発生率が高率であることからCR1aaを用いた共培養が優れていた。CR1aaは、ウシ体外受精胚の発生培養液としての有効性が数多く報告されており<sup>10)12)17)</sup>、ウシ体外受精胚を卵丘細胞と共培養すると胚盤胞発生率が高くなることも報告されている<sup>32)0)</sup>。今回の試験から、再構築胚においても体外受精胚と同様に良好な成績が得られることがわかった。

今回の試験では再構築胚の流産発生率は46.2%であった。再構築胚の流産発生率について、中原ら<sup>15)</sup>は6/7頭(85.7%)、森ら<sup>13)</sup>は5/13頭(38.5%)であったと報告している。一方、関沢ら<sup>18)</sup>は牛体内胚移植では35/399頭(8.8%)、Hoshi<sup>19)</sup>は無血清培地または血清添加培地で作出した牛体外受精胚で、それぞれ9/61頭(14.8%)、3/22頭(13.6%)であったと報告している。これらと比較しても再構築胚の流産発生率は明らかに高率である。流産の発生原因については、病原体が関与するもののほか、ヒトでは自然流産胎児の半数が染色体異常を伴うことが知られている<sup>1)</sup>。そこで再構築胚の染色体検査を行った結果、染色体数的異常が高率に認められ、その多くは正常な二倍体細胞と異常細胞が混在する染色体モザイクであった。岩崎は<sup>7)</sup>体内胚と体外胚の染色体異常頻度は20.0%と44.2%であり、二倍体と四倍体の染色体モザイクが多かったことを、Viuffら<sup>21)</sup>は体内胚と体外胚の染色体モザイクの割合がそれぞれ25%と72%であったことをそれぞれ報告している。これらと比較しても、本研究の再構築胚の染色体数的異常胚率は高率であり、多発する流産に関与している可能性が示唆された。

誕生した体細胞クローン牛6頭のうち過大産子が2頭認められた。これら2頭のドナー細胞は同一であり、核

移植胚は血清添加培地で作出したものであった。森安ら<sup>14)</sup>は生時体重50kgを超える黒毛和種のクローン産子7頭のうち5頭が分娩時や分娩直後の事故、骨格異常に由来する起立不能等により死亡したと述べていることから、クローン牛の安定生産のためには過大産子の発生原因の究明が必要である。岩田ら<sup>8)</sup>は斉一な黒毛和種牛群を用いて作出した体内受精卵と体外受精卵由来産子について調査したところ、血清添加培地で作出した体外受精卵由来産子の体重は、体内受精卵に比べて有意に重く、70kgを超える子牛が確認されたと述べている。また、Hoshi<sup>19)</sup>は血清添加培地由来黒毛和種体外受精産子の生時体重(雄18~71kg、雌20~53kg)は無血清培地由来産子の生時体重(雄23~42kg、雌18~45kg)よりばらつく傾向にあることを報告している。これらのことから、過大産子発生原因究明の一つとして、血清添加培地と無血清培地で作出した再構築胚由来クローン牛の生時体重の比較検討を行う必要があると思われた。

死亡した2頭の子牛は同一ロットの細胞から生産されたクローン牛であった。その死因はそれぞれ異なり、1頭は心奇形、他方は全身骨格筋の変性及び肺炎であり、これら2頭の病変は久保ら<sup>11)</sup>が報告した多彩な病気の範疇に入るものと考えられた。

## 摘 要

我々は体細胞クローン牛生産のため、再構築胚の発生培養液の検討と受胎性および生産性を確認すると共に再構築胚の染色体数的異常について検討を行った。その結果、核移植後5~10日目までの胚盤胞発生率は、CR1aaを用いた血清添加共培養区は99/222個(44.6%)であり、IVD101を用いた無血清非共培養区の69/249個(27.7%)より有意に高率であった。再構築胚の受胎率は13/35頭(37.1%)であり、流産発生は胎齢46~118日に6/13頭(46.2%)認められた。受胎率と流産発生率は両区の差は認められなかった。

誕生した体細胞クローン牛6頭の平均在胎日数は対照群より3日延長し、生時体重はクローン牛群が重く、50kg以上の過大産子が2頭認められた。胚盤胞期再構築胚の染色体数的異常胚率は94.7%(36/38)と高く、異常胚の83.3%(30/36)が二倍体細胞と異常細胞が混在する染色体モザイクであった。

以上のことから、再構築胚の発生培養は、CR1aaを用いた卵丘細胞との共培養が有効であり、同法による体細胞クローン牛の生産が可能であった。

しかし、体細胞クローン牛を安定的に生産するために

は、流産発生率の低減と過大産子発生原因の究明が課題として残された。

## 引用文献

- 1) 阿部達生・藤田弘子編集 (1997) 新染色体異常アトラス,南江堂, P5-40
- 2) Akagi S,Takahashi S,Adachi N,Sugawara T,Tozuka H,Toya T,Nirasawa K, Yamamoto M,Shimizu M,Izaike Y(2002),Production of calves by nuclear transfer using non-cultured and cultured cumulus cells,Theriogenology57:393
- 3) 福田芳詔 (1992) 共培養によるウシ初期胚の発生—卵丘細胞との共培養,Journal of Reproduction and Development38,No6:157-164
- 4) 古川力, (2001), クローン技術を応用した肉牛の育種システム, 日本胚移植学雑誌23,No3:88-94
- 5) 長谷川清寿, 赤木悟史, 高橋清也, 居在家義昭, 岡崎尚之, 安部茂樹 (2001), ウシ摘出卵巣由来卵丘細胞—卵子複合体からの体細胞核移植胚の作出, 日本胚移植学雑誌23,No2:61-66
- 6) Hoshi H (2003), In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer,Theriogenology59:675-685
- 7) 岩崎説雄 (1992), 体外受精由来ウシ胚の品質評価に関する研究, Journal of Reproduction and Development38, No6:109-119
- 8) 岩田尚孝, 赤松真一, 南直治郎 (1998) 齊一な牛群を用いて作成した体外受精・体外発育卵と体内受精・体内発育卵に由来する子牛生時体重の比較, Journal of Reproduction and Development44,No6:33-38
- 9) Kato Y,Tani T,Sotomaru Y,Kurokawa K,Kato J,Doguchi H,Yasue H (1998), Eught Calves Cloned from Somatic Cells of a Single Adult, Science282:2095-2098
- 10) 小西正人, 青柳敬人 (1994), ウシ体外受精由来胚の胚盤胞への発育に関する合成培地の検討,Journal of Reproduction and Development40,No5:1-4
- 11) 久保正法 (2003), 牛のクローン流死産胎子および死亡子牛の病理学的所見について, 国際シンポジウムクローン家畜とその安全性ポスター成果選:65-66
- 12) 窪田力, 轟木淳一, 溝下和則, 山口浩, 猪八重悟, 後藤和文 (1997) CR1aa培地で発生した体外受精由来胚の品質と受胎能, 日本胚移植学雑誌19,No1:7-12
- 13) 森浩一郎, 窪田力, 児島浩貴, 寺脇志朗, 轟木淳一, 大田均, 佐藤真澄, 上宮田正己, 山下光則 (2002), 体細胞クローン牛の作出状況, 鹿児島県畜産試験場研究報告第35号:52-57
- 14) 森安悟, 平山博樹, 南橋昭, 澤井健, 陰山聡一, 尾上貞雄, 酒井稔史, 山本裕介, 森清一 (2002) 受精卵クローン牛の効率的生産技術, 北海道農業研究会議(成績会議)資料
- 15) 中原仁, 小田頼政, 有安則夫, 坂部吉彦 (2001), ドナー細胞の違いがクローン牛の生産効率に及ぼす影響,岡山県総合研究センター研究報告第12号:5-8
- 16) 野口龍生, 児玉英樹, 鈴木暁之, 西田清, 吉川恵郷 (2003) 体細胞クローンウシを利用した黒毛和種種雄牛造成の可能性, 国際シンポジウム「クローン家畜とその安全性」ポスター成果選
- 17) Rosenkrans CF Jr,First NL (1991), Culture of bovine zygotes to the blastocyst stage:effects of amino acids and vitamins,Theriogenology35:266
- 18) 関沢文夫, 斉藤光男, 久利生正邦, 飛田府宣, 荒井徹, 中原達夫 (1996), 牛胚移植後の流産発生状況, Journal of Reproduction and Development42,No5:25-27
- 19) 鈴木秋悦, 佐藤英明共編 (2001) 卵子研究法,養賢堂 :282-285
- 20) 高田直和, 塚本章夫, 黒川洋介, 塩谷康生 (1991), 牛体外受精卵の発育に及ぼす卵丘細胞の影響, 家畜繁殖学雑誌37,No1:9-13
- 21) Viuff D,Greve T,Avery B,Hyttel P,Brockhoff PB,Thomsen PD (2000), Chromosome aberrations in in vitro-produced bovine embryos atdays 2-5 post-insemination,Biology of Reproduction63:1143-1148
- 22) Wilmut I,Schnieke AE,McWhir J,Kind AJ,Campbell KH (1997), Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells,Nature385:810-813
- 23) Wolfe BA,Kraemer DC (1992), Methods in bovine nuclear transfer,Theriogenology37:5-15

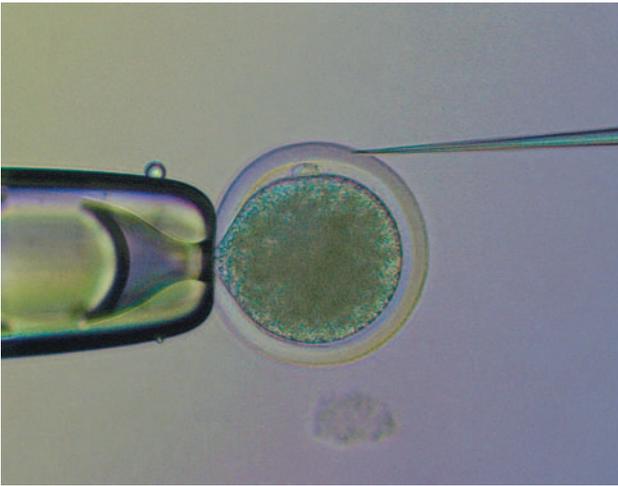


図1. 第1極体の位置に注意して卵子を固定

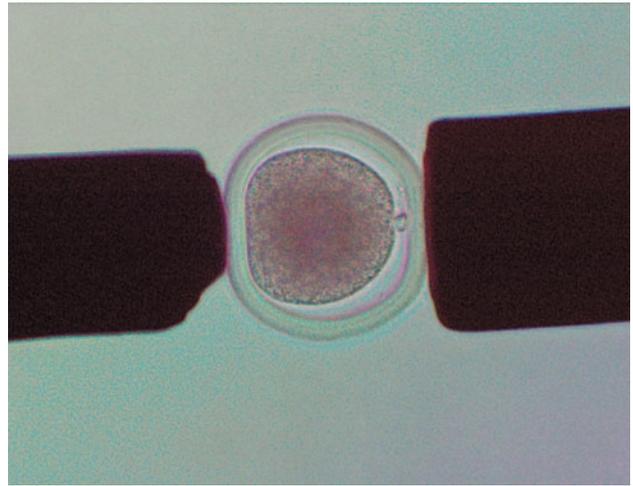


図4. 電気刺激による細胞融合

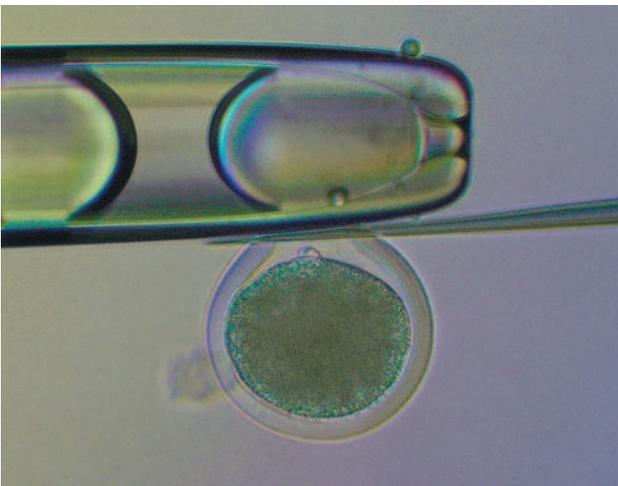


図2. 透明帯にスリットを入れる

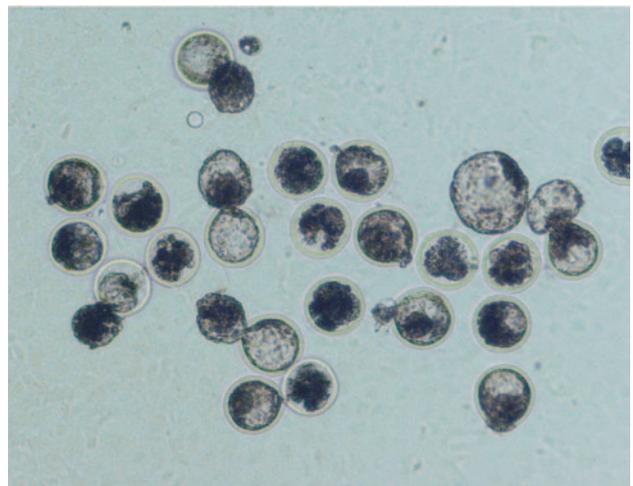


図5. 核移植後7日目の再構築胚

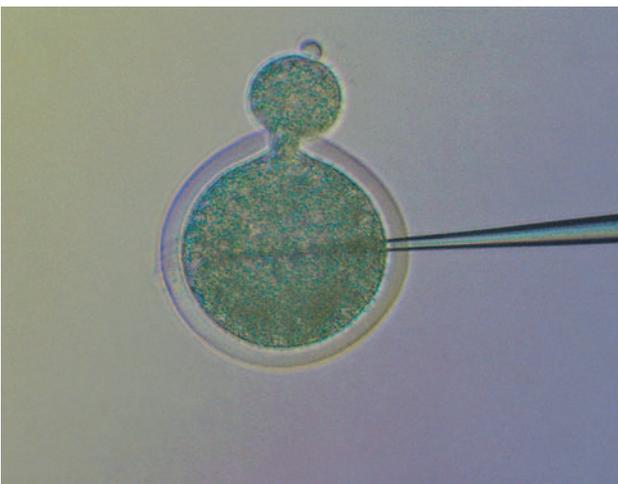


図3. 第1極体とその近隣細胞質を押し出す