

受精卵核移植によるクローン牛の作出

谷口 俊仁・柏木 敏孝・野口 浩和・山本 喜彦

農林水産総合技術センター 畜産試験場

Production of Cloned Calf by Embryo Nuclear Transfer

Shunji Taniguchi, Toshitaka Kashiwagi, Hirokazu Noguchi and Yoshihiko Yamamoto

*Livestock Experiment Station
Wakayama Research Center of Agriculture, Forestry and Fisheries*

緒 言

受精卵クローニング技術は、遺伝的に同じ個体を複数作出でき、遺伝資源の少ない本県においては、この技術が県内肉用牛および乳用牛の改良に大きく貢献できると期待されている。本県では、平成10年度からクローニング技術研究に着手しており、平成12年12月、追試例ではあるものの受精卵クローニング牛の作出に成功したので、その概要を報告する。

材料および方法

1. 卵巣

牛卵巣は食肉処理場でと殺解体された雌牛から採取し、20~25°Cの生理食塩水中に保持して実験室に持ち帰った。

2. 卵子の吸引

卵巣の表面に見える小卵胞(2~8mm)から18Gの注射針およびシリンジを用いて卵丘卵子複合体(cumulus-oocyte-complex: COC)を吸引採取し、卵丘細胞層が3層以上密に付着したものを選別した。

3. 卵子の保存

採取されたCOCを直ちにタンパク合成阻害剤のシクロヘキシミド(cycloheximide: CHX)(Longeranら, 1997, Saekiら, 1997, 1998)を10μg/ml含む5%子牛血清(CS)加TCM199で洗浄後、同培地の50μlドロップ内にCOCを10個ずつ入れ、培養した(5%CO₂, in air)。

4. 卵子の成熟培養

成熟培養開始時間を調整するためにCHX添加TCM199内で保存しておいたCOCを5%CS加TCM199(0.02AU/ml FSH, 1μg/ml E₂)で洗浄後、同培地の50μlドロップ内にCOCを10個ずつ入れ、20時間おこなった(5%CO₂, in air)。

5. 受精卵核移植

成熟培養後のCOCは生体由来新鮮4日目胚の割球をドナーとして受精卵核移植をおこなった。すな

わち、COCを5mg/mlヒアルロニダーゼ液で5～10分間処理後、ボルテックスおよびピペッティングにより卵丘細胞を完全に剥離、第1極体放出卵子のみを選別後マイクロマニピュレーターにより第1極体放出部の透明帯をカット、サイトカラシンBを5μg/ml含む20%CS加m-PBS中で押し出し法により除核後、5μM Caイオノフォア5分間、Zimmerman cell fusion medium中でチャンバー型電極により電気パルス(DC40V/mm, 50μsec, BTX-2001)およびCHXを10μg/ml含むTCM199中で6時間培養による複合活性化処理をおこない、レシピエント卵子を作出した。

レシピエント卵子の囲卵腔にはトリプシン処理とピペッティングにより割球分離したドナー割球をマイクロマニピュレーターで1卵子当たり1割球ずつ注入し、Zimmerman cell fusion medium中でチャンバー型電極により電気融合処理(DC100V/mm, 25μsec×2, BTX-2001)をおこなった。融合処理後の再構築胚は5%CS加CR1aaで5%CO₂, 5%O₂, 90%N₂の気相下で7～9日間培養した。

6. 発生胚の凍結・移植

培養7または8日目に胚盤胞まで発生した再構築胚は1.5Mプロパンディオール(PD)+0.1Mシーカロース(Su)または1.5Mエチレングリコール(EG)+0.1M Suを耐凍剤として用いたダイレクト法により凍結保存をおこなった。

凍結保存した胚を融解し、発情7日目の交雑種雌牛の黄体側子宮角に1胚または2胚移植をおこなった。移植された受卵牛は胎齢60日前後に超音波妊娠

診断装置による妊娠鑑定をおこなった。

第1表 分娩誘起処理法

1日目AM	2日目AM	3日目PM
デキサメサゾン 20mg s.c.	クロプロステノール 1mg i.m.	分娩予定 エストリオール 20mg i.m.

7. 分娩誘起

分娩予定日3週前から直腸を介して胎児の蹄冠部直径を測定し、直径が約5cm以上となり胎児の体格が充分であると判断された時点で、金山(2000)の方法により分娩誘起をおこなった(第1表)。

結果

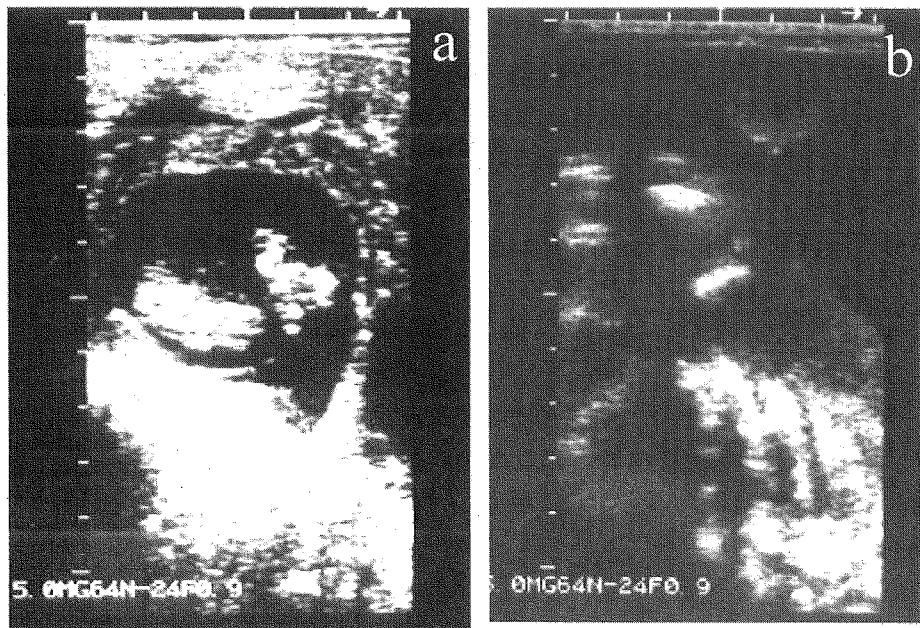
採取した受精後4日目胚の割球をドナーとして受精卵核移植をおこなった結果、23個の胚盤胞が発生し、そのうち22胚をPDおよびEGを耐凍剤としたダイレクト法により凍結保存した(第2,3表)。凍結保存した胚のうち、18胚について13頭の受卵牛に1または2胚の移植をおこない、そのうち1頭で受胎が確認された(第1図、第3表)。

第2表 核移植成績

核移植胚数	ドナー胚数	融合数(%)	分割数(%)	胚盤胞発生数(%)	凍結胚数
65	5	56(86.2)	50(89.3)	23(41.1)	22

第3表 移植成績

凍結方法	凍結個数	受胎頭数/移植頭数	(うち1胚移植)	(うち2胚移植)
PD	7	0/6	(0/6)	(0/0)
EG	15	1/7	(1/2)	(0/5)



第1図 受精卵クローン胎子の超音波妊娠診断装置映像
(a) : 56日齢 (b) : 139日齢

胎齢270日時に、直腸を介して測定した胎児の蹄冠部直径が約5cm以上となったことを確認したうえで、分娩誘起処理を開始した。処理開始後54時間目に産科チェーンを用いて雌子牛を娩出した。生時体重は29kgであった。娩出後1時間で起立し、受卵牛の乳房に吸い付き初乳を飲むのが観察された(第4表、第2図)。

第4表 分娩成績

在胎日数	性別	生時体重	誘起処理開始～ 娩出までの時間
272日	雌	29.0kg	54hr

考 察

受精卵クローン技術により一つの優良受精卵由来複数子の生産が可能で、優良牛の増産・改良や複数子による飼養試験の精度向上が期待されているほか、一般の飼養管理においても牛群の均質化による作業の簡略化が期待されている。今回1つのドナー胚から1頭の受精卵クローン産子を得た。このことは、当場においてもクローン牛作出が可能であるとの証明にはなったものの、この技術をより活用するために、1胚由来の複数産子の生産技術の確立が必要と考えられる。そのためには、核移植後の胚発生および発生胚の品質などの向上に努める必要があると考えられる。

核移植技術の進歩によりクローン牛の生産頭数が年々増加しているものの、クローン牛分娩前後の死流産などの事故が多発しており問題となっている。金山は特に分娩期の事故が頻発している体細胞



第2図 哺乳中の受精卵クローン子牛と受卵牛

クローン牛の分娩期管理においてデキサメサゾン、クロプロステノールおよびエストリオールを用いた分娩誘起処理をおこなうことで高率に体細胞クローン牛を無事に出生させることが可能であることを示している。さらに、その分娩誘起処理において、処理開始から50～56時間の間に約8割の牛が娩出されていることも示している。今回、金山の方法で分娩誘起をおこない、開始54時間後に受精卵クローン牛を無事に娩出した。このことから、この分娩誘起法はクローン牛や血統的に過大子が予測される牛の分娩期の管理の効率化に有効な分娩誘起法であることが示唆された。

摘要

受精卵クローン牛を作出するため、食肉処理場由来卵巣から回収した卵子をレシピエント、生体由来4日目胚をドナーとして受精卵核移植をおこない、発生胚を凍結保存し、保存した胚を融解後、受卵牛に移植した。移植した13頭のうち1頭で妊娠が確認され、胎齢272日時に生時体重29kgの受精卵クローン牛を分娩した。

引用文献

金山佳奈子、家畜改良センターだより、35:4-5. 2000.

Longeran, P., Khatir, H., Carolan, C. and Mermilliod, P. : Bovine blastocyst production in vitro following inhibition of oocyte meiotic resumption for 24 hours. Theriogenology 47: 293. 1997.

Saeki, K., Nagao, Y., Kishi, M. and Nagai, M. : Developmetal capacity of bovine oocytes following inhibition of meiotic resumption by cycloheximide or 6-dimethylaminopurine, Theriogenology 48: 1161-1172. 1997.

Saeki, K., Nagao, Y., Kishi, M., Nagai, M. and Iritani, A. : Timing of completion of the first meiotic division in bovine oocytes after maintenance of meiotic arrest with cycloheximide and their subsequent development, J. Vet. Med. Sci. 60: 523-526. 1998.

Summary

To produce cloned calf by embryo nuclear transfer, we carried out nuclear transfer with oocytes obtained from slaughterhouse ovary as recipient and 4 day embryos obtained from Japanese Black cow as donor. Blastcysts derived from nuclear transfer were frozen and preserved in liquid nitrogen. The frozen blastcysts were thawed and transferred nonsurgically to 13 recipient heifers. One heifer of transferred heifers became pregnant and bore calf at 272 days of gestation.