

体細胞クローン牛の作出および相似性の検討

谷口俊仁・柏木敏孝・野口浩和¹・山本喜彦²

農林水産総合技術センター 畜産試験場

Production of Somatic Cell Clone Calf and Study of Similarity

Shunji Taniguchi, Toshitaka Kashiwagi, Hirokazu Noguchi and Yoshihiko Yamamoto

Livestock Experiment Station

Wakayama Research Center of Agriculture, Forestry and Fisheries

緒言

近年の核移植によるクローン牛作出技術の進歩により,国および都道府県の研究機関,大学などを中心に国内で 950 頭を越えるクローン牛が生産されている.体細胞クローン技術は,理論的に同じ遺伝形質を有する個体が無数に作出できることから,将来的には高能力な種雌牛や肥育牛の増産による牛群改良や種雄牛検定の精度向上・迅速化などへの応用が期待されている技術である.そしてクローン技術の実用化に向けて,複数の研究者らにより発育性・繁殖性・産肉性などについて様々な調査・研究がされており(金山ら,2002, 長野ら,2002, 米内ら,2002),クローン牛の正常性や相似性が確認されている.さらに体細胞クローン牛由来生産物の安全性試験の結果(社団法人畜産技術協会,2002)より,一般の牛と差が認められなかったことから,体細胞クローン牛肉および乳の流通開始が期待されている.

我々は平成 10 年度から牛の体細胞クローン技術に関する研究を近畿大学先端技術総合研究所および近畿大学生物理工学部遺伝子工学科と共同で実施している.今回我々は,体細胞クローン牛の作出に成功し,さらに生まれた体細胞クローン牛と細胞提供牛との遺伝的・発育性について相似性調査をおこなったので報告する.

材料および方法

1. ドナー細胞の調整

当場で育成中の 2 頭の黒毛和種雌子牛(1ヶ月齢:きくきよ号,やすとく号)の耳殻から無菌的に採取した 5mm 角程度の肉片を 10%FCS 加 D-MEM でよく洗浄後,さらに 1mm 角以下に細切り,同培地で再びよく洗浄したものを組織培養用シャーレ上で 1 時間以上静置(5%CO₂, 95% air),肉片周囲のシャーレ表面上に細胞が付着しているのが確認できたウェル内に同培地を静かに入れ,培養を継続した.培養継続後,付着細胞がコンフルエントになったものについて,順次細胞の継代をおこなった.細胞の継代はトリプシンにより付着細胞をシャーレ表面上から剥離・浮遊させた後,10%FCS 加 D-MEM で細胞を 2 回以上遠心洗浄し,継代前の 1/3~1/4 の細胞濃度でシャーレ上に再浮遊しておこなった.5~10 代の継代培養後,コンフルエントになった培養細胞の培地を 0.5%FCS 加 D-MEM に交換して血清飢餓培養をおこなった.核移植のドナーには 7~10 日間血清飢餓培養後,トリプシンにシャーレ表面上から剥離・浮遊させ,0.5%FCS

¹ 現在:畜産課

² 現在:紀南家畜保健衛生所

加 D-MEM で 2 回以上遠心洗浄した細胞を用いた。

2. レシピエント卵細胞質の調整

食肉処理場由来の牛卵巣の表面上に見える小卵胞（直径 2～8mm）から吸引採取した卵丘卵子複合体（COC）のうち、卵丘細胞層が 3 層以上密に付着したものを選別し、5%NBCS 加 TCM199 で洗浄後、成熟培養した（5%CO₂, 95% air）.20 時間の成熟培養後、COC を 5mg/ml ヒアルロニダーゼ液で 5～10 分間処理し、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した。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を用いて第 1 極体部分の透明帯をカット、第 1 極体とその直下の卵子細胞質を透明体の外へ押し出すことにより除核をおこない、レシピエント卵細胞質を調整した。

3. 体細胞核移植

レシピエント卵細胞質の囲卵腔にドナー細胞を 1 細胞ずつ注入後、Zimmermann cell fusion medium 内で融合用電極により電気融合処理（DC26V/150um, 10 μ sec×2, BTX-2001）した。融合確認後、再構築胚を 5uM Ca イオノフォア 5 分間処理および 10ug/ml シクロヘキシミド 6 時間処理による活性化処理をおこない、その後 5%NBCS 加 CR1aa で 7 日間培養（5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂）した。なお、ドナー細胞の調整、レシピエント卵細胞質の調整および体細胞核移植については近畿大学先端技術総合研究所内の施設を用いて実施した。

4. クローン胚の移植

核移植後 7 日目に桑実胚～胚盤胞期胚まで発生したクローン胚を 20%NBCS 加 m-PBS ストロー中で 37°C に保持しながら、当場に輸送、発情同期化した 7 頭の未經産交雑種雌牛の黄体側子宮角に 1 または 2 胚移植した。

5. 分娩誘起

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

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	クロプロステノール	
20mg s.c.	1mg i.m.	分娩予定
	エストリオール	
	20mg i.m.	

6. 産子の相似性調査

得られた産子とドナー細胞提供牛との遺伝的同一性を確認するため、社団法人畜産技術協会附属動物遺伝研究所に依頼して既報によりマイクロサテライト多型解析(Inoue-Murayama ら, 1997)をおこなった。

また、得られた産子はドナー細胞提供牛と同様の方法で以下に示した飼料給与法で育成し、9 ヶ月齢までの発育の比較（体重、体高、十字部高、胸深、腰角巾、胸囲、腹囲）をおこなった。飼料給与法は、生後 1 週目に母子分離後、代用乳（TDN105%, DCP24%）300g を 1.8 リットルの温湯に溶解し哺乳ボトルで給与（45 日齢まで朝夕 2 回、46～60 日齢まで朝のみ 1 回）し、濃厚飼料は 90 日齢まで人工乳（TDN77%, DCP19%）を 1 日あたり 3kg を上限として給与、91 日齢以後は育成用配合飼料（TDN68%, DCP14%）を給与した。粗飼料は全期間チモシー乾草を不断給与した。

結 果

1. 体細胞クローン牛の作出

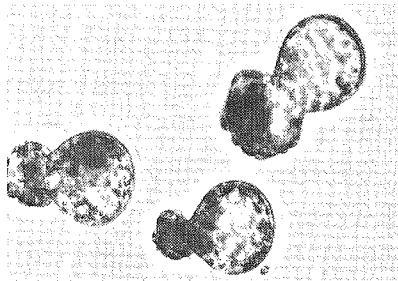
体細胞核移植の結果、きくきよ由来の細胞から6個、やすとく由来の細胞から5個の発生胚が得られた(第2表および第1図)。発生した胚のうち、9胚を発情同期化した7頭の未経産交雑種雌牛の黄体側子宮角に1または2胚移植した(第3表)。移植した雌牛7頭のうち1頭で妊娠が確認された。直腸壁を介した触診により胎児の蹄冠部直径が約5cm以上と判断された妊娠271日目から分娩誘起を開始し、妊娠273日目に27kgの雌子牛が娩出された。産子は娩出後1時間で起立し、外見上の異常は特に認められなかった(第2図)。

第2表 子牛から採取した体細胞による核移植成績

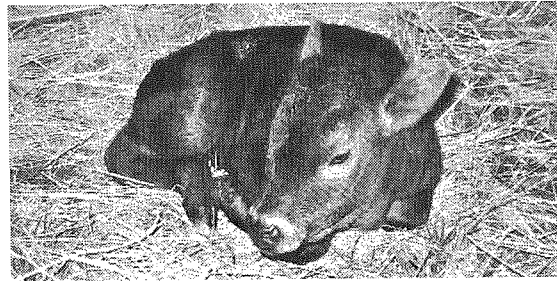
ドナー細胞	供試卵数	融合卵数 (%)	卵割胚数 (%)	発生胚数 (%)
きくきよ	63	31 (49.2)	22 (71.0)	6 (19.4)
やすとく	68	42 (61.8)	29 (69.0)	5 (11.9)

第3表 クローン胚の移植および分娩成績

ドナー細胞	移植	移植頭数	受胎頭数 (%)	分娩頭数 (%)
きくきよ	1胚	4	1(25.0)	1(100.0)
	2胚	1	0(0.0)	—
やすとく	1胚	1	0(0.0)	—
	2胚	1	0(0.0)	—



第1図 胚盤胞期胚に发育したクローン胚



第2図 誕生した体細胞クローン子牛

2. 産子の相似性調査

マイクロサテライト多型解析の結果、使用した23のマーカー全てでクローン牛と細胞提供牛との間で一致し、クローン牛を分娩した交雑種雌牛とクローン牛との間では一致しなかった(第4表)。

发育については、体重は誕生後1ヶ月齢までは細胞提供牛が上回ったが、その後クローン牛が上回り9ヶ月齢時点で30kg以上の差がみられた(第5表)。体高・十字部高・腰角幅については、両者の間に大きな差はみられなかった(第5および6表)。腹囲については、細胞提供牛が若干下回る傾向がみられた(第6表)。

第4表 マイクロサテライト多形解析によるクローン産子の由来判定結果

マーカー	受卵牛	ドナー	クローン	マーカー	受卵牛	ドナー	クローン
DIC089	85,95	87,95	87,95	INRA130	107,109	109,109	109,109
DIK102	130,132	130,132	130,132	BM103	143,157	147,147	147,147
DIK097	196,200	188,192	188,192	ILST93	183,185	181,183	181,183
DIK020	175,187	177,177	177,177	DIK093	236,236	240,240	240,240
RM041	92,92	90,92	90,92	DIK023	99,103	89,99	89,99
BM5004	131,135	131,131	131,131	DIK069	158,160	158,162	158,162
CYP21	190,194	188,200	188,200	DIK010	183,193	183,183	183,183
BM4505	239,241	239,243	239,243	DIK024	232,236	238,238	238,238
DIK106	109,109	105,109	105,109	BM6026	164,166	164,164	164,164
DIK068	151,157	143,157	143,157	ETH185	258,258	234,258	234,258
DIK039	208,234	228,234	228,234	ILSTS6	283,291	285,287	285,287
DIK096	241,249	255,255	255,255				

第5表 クローン牛と細胞提供牛の发育比較(1)

月 齢	クローン体重	ドナー体重	標準发育(%体重)	クローン体高	ドナー体高	標準发育体高
0	27.0		28.0	67.0		67.0
1	39.0	49.0	50.6	71.0	71.0	74.4
2	61.0	52.0	73.2	77.5	77.0	80.9
3	56.0	72.5	95.8	84.5	83.5	86.6
4	96.5	88.5	118.4	89.0	89.0	91.6
5	131.0	112.0	141.0	93.0	92.0	95.9
6	155.5	132.5	163.6	98.0	96.0	99.8
7		154.0	186.2		100.0	103.1
8	209.0	183.0	208.8	104.5	103.0	106.1
9	236.0	203.0	231.4	105.5	104.0	108.7

単位: kg

単位: cm

(※): 日本飼養標準による黒毛和種雌牛の標準发育

第6表 クローン牛と細胞提供牛の発育比較(2)

月 齢	クローン 十字部高	ドナー 十字部高	クローン 腰角幅	ドナー 腰角幅	クローン 胸囲	ドナー 胸囲	クローン 腹囲	ドナー 腹囲
0	68.0		16.0		75.0		75.0	
1	74.0	75.0	17.5	17.0	77.0	80.0	85.0	82.0
2	80.5	79.0	20.0	18.5	90.0	89.0	105.0	101.0
3	87.5	84.0	22.5	21.0	100.0	100.5	125.0	119.0
4	93.0	91.0	25.0	21.0	104.0	105.0	126.0	125.0
5	95.0	94.0	26.0	25.5	113.0	112.0	150.0	141.0
6	100.0	98.0	31.0	29.0	122.0	117.0	154.0	148.0
7		102.5		30.0		126.0		156.0
8	108.0	105.0	32.5	31.0	139.0	135.0	167.0	159.0
9	108.0	107.0	32.5	32.0	140.0	138.0	172.0	169.0

単位：cm

考 察

受精卵クローン牛および体細胞クローン牛は国内で現在までに950頭以上の出生が確認されているが、特に体細胞クローン牛では流産や分娩時の死産・生後直死が多発することが知られており大きな問題となっている。この原因の一つとして、体細胞クローン牛の産子が通常より過大となることが考えられている。今回我々は、産子の過大を防止する方策として分娩3週前から直腸検査で胎児の蹄冠部直径を測定し、胎児が過大となる前に分娩誘起処理をおこない、正常な生時体重(27kg)の体細胞クローン牛の娩出に成功した。今回はこの一例のみではあるが、過大になる以前から定期的に胎児の大きさを測定することで分娩誘起の開始時期を決定し、その結果産子の過大が防止されたことから、過大子となる可能性の高い体細胞クローン牛の分娩前の管理に有効であると考えられた。

得られた産子と細胞提供牛の遺伝的な同一性の検討をマイクロサテライト多型解析によりおこなった結果、使用した23マーカー全てで産子と細胞提供牛との間で一致した(第4表)。Inoue-Murayamaら(1997)はこれら23マーカーを用いた解析により理論的には31兆頭の個体識別と3700万頭の父牛の識別が可能であり、黒毛和種の総数が約150万頭であることから、今回得られた産子は細胞提供牛の遺伝子を受け継いだ体細胞クローン牛であることが示された。

得られたクローン牛と細胞提供牛の発育の比較については、体重および腹囲で細胞提供牛よりクローン牛が上回った(第5および6表)。これは、細胞提供牛が育成中に下痢を繰り返す、正常な発育を示さなかったためと考えられる。一方、体高・十字部高・腰角幅など骨格の発育については、両者の間に特に差はみられなかった(第5および6表)ことから、発育面においてもある程度の相似性が示された。

摘 要

体細胞クローン牛を作出するため、当场で育成中の黒毛和種雌牛の耳殻から採取・培養した細胞をドナーとして体細胞クローン胚を作成した。体細胞クローン胚を移植した7頭の受精卵のうち1頭で妊娠が確認され、生時体重27kgの雌子牛が娩出された。得られた産子と細胞提供牛との間の遺伝的同一性確認のため、マイクロサテライト多型解析をおこない、産子が細胞提供牛のクローン牛であることが確認された。さらにクローン牛と細胞提供牛との発育性における相似性の比較をおこなった結果、体高・十字部高・腰角幅など骨格の発育について相似した発育を示した。

謝 辞

本研究の実施にあたり、ご指導を賜った近畿大学生物理工学部遺伝子工学科入谷明教授、佐伯和弘教授

をはじめ諸先生方、マイクロサテライト多型解析を実施していただいた社団法人畜産技術協会附属動物遺伝研究所竹田晴子研究員および体細胞クローン胚の作成に協力いただいた近畿大学生物理工学部遺伝子工学科の学生諸氏に深謝する。

引用文献

- Inoue-Murayama, M., Hirano T., Watanabe T., Mizoshita K., Yamakuchi H., Nakane S. and Sugimoto Y. :Individual identification and paternity control of Japanese Black cattle based on microsatellite polymorphism. *Ann.Sci.Tecnol* 68: 443-449. 1997
- 金山佳奈子, 米内美晴. 同一細胞由来体細胞クローン牛の発育. 日本畜産学会第 100 回大会講演要旨: 223. 2002
- 金山佳奈子. 体細胞クローンの分娩期管理. 家畜改良センターだより 35: 4-5. 2000
- 長野京子, 森浩一郎, 窪田力, 岡本光司, 寺脇志朗, 児島浩貴, 上宮田正己, 高橋清也, 徳永智之. 体細胞クローン牛の育成期の繁殖状況. 日本畜産学会第 100 回大会講演要旨: 224. 2002
- 社団法人畜産技術協会. クローン牛の生産物性状調査事業報告書. 2002
- 米内美晴, 安宅倭, 別府哲郎. 体細胞クローン牛の繁殖成績と初産次泌乳量. 日本畜産学会第 100 回大会講演要旨: 224. 2002

Summary

To produce somatic clone calf, we reconstructed nuclear transfer embryos using somatic cells as a donor, obtained from Japanese Black calf raising in our station. One of seven heifers being transferred the embryos was pregnant and bred female calf, 27 kilograms weight. To confirm genetical sameness between bred calf and donor calf, we analyzed microsatellite polymorphism and certificated bred calf as a clone of donor calf. Moreover, comparing growth degree of clone calf with donor calf, they developed similarly in skeletal structure.

