

体細胞クローン牛の生産

太田 久由・西木 秀人

Production of Cloned Cow Derived from Somatic Cells.

Hisayoshi OHTA and Hideto NISHIKI

(要旨)

加齢により採卵成績不良となった高能力乳牛3頭の有効利用を目的として、体細胞を採取した。また体細胞クローン胚の効率的生産のため、異なる細胞融合装置と印加電圧の検討を行った。さらに乳量全国1位を記録した高能力乳牛の体細胞を用いて体細胞クローン牛を生産した。

- 体細胞は経膈採卵で得られた卵丘細胞を採取、培養した。増殖した細胞はグリセリンを用いて受精卵移植用ストローに封入し、液体窒素中に合計227本凍結保存した。
- 体細胞クローン胚を効率的生産するため、異なる機種(A, B, C社)と印可電圧(20, 25, 30V)を比較し、生産性(融合率, 胚盤胞発生率, 生産効率)を検討した。融合率はC社30V区が54.8%, 胚盤胞発生率, 生産効率はB社25V区が37.5%及び18.3%と高い値を示した。
- 優良牛の体細胞クローン胚をホルスタイン種未経産牛3頭に2卵ずつ移植したところ、すべての牛が受胎した。1頭は流産したが残りの2頭は双子を分娩し、4頭の体細胞クローン牛が生産された。

まえがき

当試験場では1993年度より高能力乳牛を導入して採卵を行い、都内酪農家に受精卵を配付する事業を行っているが、近年、加齢に伴う採卵数の減少、変性卵率の増加が問題となってきている。これらに対処するため採卵方法の改善や生体卵胞卵子吸引・体外受精による子牛生産を試みてきたが、思うような結果が得られなかった。

こうした中、1996年7月に英国のロスリン研究所において体細胞クローン羊「ドリー」が誕生して、分化した細胞から個体を再生できることが証明された¹⁾。国内においては1998年7月、近畿大学と石川県のグループによって成雌牛の卵管由来細胞を用いた体細胞クローン牛が世界で初めて誕生している。

体細胞クローン技術は細胞提供動物(ドナー)と遺伝的に同一な動物を作出できると考えられているため、畜産分野において優秀な種雄牛や乳牛の複製を可能にするものと期待されている。また遺伝子組替え技術とあわせた医薬用蛋白質の生産や異種臓器移植用ドナー動物の作出、さらに絶滅の恐れのある希少種の復元など、さまざま

な分野での可能性を秘めている。

今回、加齢により採卵成績不良となった高能力乳牛の有効利用を目的として体細胞(ドナー細胞)の採取と保存を行い、さらに「ドリー」と同じ手法を用いて体細胞クローン牛の作出をしたので、その方法ならびに結果を報告する。

材料と方法

1. 体細胞の採取と保存

場繋養の高能力ホルスタイン種3頭(表1)を経膈的に採卵し、卵子に付着している卵丘細胞(=ドナー細胞, 写真1)を採取した。採取した卵丘細胞は10%牛胎児血清(FCS)加DMEMを満した組織培養シャーレ中に入れた。気相条件は5%CO₂, 95%空気, 38.5°Cとし2~4日ごとに継代, 増殖させた。

増殖した細胞は、当场定法に従って0.25ml受精卵移植用ストローに封入し、液体窒素中に凍結保存した。保存液は培養液にグリセリン(Gly)を添加して濃度を10%に調整したものをを用いた。細胞濃度(細胞数/保存液量)は0.25~3×10⁶/mlとなるようにし、2~9継代の間で実施した。

表1 場繋養の高能力ホルスタイン種

名号	生年月日	検定成績(年齢, 搾乳期間, 乳量, 乳脂率)
ホナミMBBブーツ バークード ET	1986. 3. 11	4-2 365日 16, 317kg 3.8%
ホナミMBBエラ バリエント ET	1987. 12. 4	3-2 365日 15, 439kg 3.6%
ホナミMBBテルスター ET	1988. 4. 18	3-6 365日 22, 224kg 4.0%

2. 体細胞クローン牛の作出

(1)細胞融合装置の検討

体細胞クローン胚作出のためには、ドナー細胞と受け皿になる卵子（レシピエント卵子）を電気的に融合させる必要がある。細胞融合装置については各メーカーから市販されているが、効率的に体細胞クローン胚を生産できる機種や融合条件については不明な点が多い。今回、異なる細胞融合装置および印可電圧における体細胞クローン胚の生産性について検討した。

ドナー細胞は屠場由来のF1卵子に附着していた卵丘細胞を10%FCS加DMEM中で4～5代培養し、凍結保存後融解、培養したものをを用いた。

供試卵子は屠場由来のF1卵子を5%子牛血清（CS）加TCM-199中で18～20時間成熟培養後、ヒアルロニダーゼ処理により卵丘細胞を除去し、第一極体放出かつ卵細胞質均質なものをを用いた。

除核はサイトカラシンBを含んだ20%CS-PBS中で第一極体付近の透明帯をガラスニードルで切開し、核を含む細胞質を全体の4分の1程度押し出した（写真2）。

ドナー細胞はトリプシン処理を施して一個一個単離したものを透明帯の切開部位からインジェクションピペットを用いて一卵子につき一個ずつ挿入した（写真3）。

細胞融合装置は本試験場で従来から使用していたもの（C社）と、体細胞クローンが生産された後に発売された2社（A、B社）を比較した。印可電圧は他の研究施設において25Vで体細胞クローン牛生産の実績のあるA社を対照区とした。B及びC社はそれぞれ20、25及び30Vの3区設定した。通電時間は各区共に10μ秒、通電回数は1回とし、Zimmermann Cell Fusion Medium中で操作を行った。電極（チャンバー）は卵子

の細胞質とドナー細胞を密着させて左右から卵子を固定できるニードル型電極を用いた（写真4）。C社は融合チャンバーの形式が指定されており、今回用いたニードル型は対象外であったが、電圧、通電時間等を統一して試験を実施した。

細胞融合終了後、5μモル/mlカルシウムイオノフォア液に5分間おいて活性化処理を施し、引き続き10μg/mlシクロヘキシミド液で6時間培養後、5%CS-CR1aaで7～9日間培養した。気相条件は体細胞培養と同様とした。

各社の融合装置ごとに融合率、胚盤胞発生率（胚盤胞発生数/融合数）、胚の生産効率（胚盤胞発生数/供試卵子数）について比較検討した。

(2)体細胞クローン胚作出と未經産牛への移植

採取した高能力乳牛『テルスター』（93年3.5年型乳量全国1位）の卵丘細胞（12年4月6日採取、4継代）を用いて2-(1)と同様の方法で体細胞クローン胚を作出した（写真5）。細胞融合装置はA社、印可電圧は25Vとし、融合率、胚盤胞発生率、生産効率を調査した。

作出した胚のうち6個を、発情を同期化したホルスタイン種未經産牛3頭に2個ずつ移植して受胎率をみた。

結 果

1. 体細胞（ドナー細胞）の採取と保存

高能力牛3頭からのべ5回の経膈採卵・体細胞の採取を行なった。高能力牛2頭（名号ブーツ及びエラ）については1回ずつ採取し、それぞれ8、6代目まで継代培養した。増殖した細胞はそれぞれ27本及び74本ストローに封入し、凍結保存した。テルスターについては3回行い5～9代目まで継代培養した。増殖した細胞は合計126本凍結保存した（表2）。

表2 採取した体細胞の保存状況

継代数	凍 結 保 存 ス ト ロ ー 数					
	名号	ブーツ	エラ	テルスター		
	体細胞採取日	11. 9. 7	11. 9. 9	12. 4. 6	12. 10. 9	13. 5. 31
2		11	—	—	—	—
3		5	—	—	—	—
4		2	22	6	—	7
5		—	25	7	16	13
6		6	27	7	17	—
7		—	—	6	24	—
8		3	—	16	—	—
9		—	—	7	—	—
合計		27	74	49	57	20

2. 体細胞クローン牛の作出

(1)細胞融合装置の検討

各試験区に58~148個の卵子を用いた。融合率はC社30V区が54.8%と最も高い値を示し、対照区(A社)が50.7%、B社25V区が48.8%の順になった。B社20V区とC社20V区がそれぞれ25.8%、22.4%となり、他区に対して有意に低い値となった。

胚盤胞発生率はB社25V区が37.5%と最も高い値を示し、C社25V区の35.7%、対照区の32.0%の順に高かった。

生産効率はB社25V区が18.3%と最も高い数値を示し、対照区の16.2%、C社25V区の15.6%の順に高かった。B、C社の20V区はそれぞれ6.1及び3.4%となり、前出の2区に比べ有意に低い値となった(表3)。

表3 各細胞融合装置および電圧における体細胞クローン胚の生産性

	試験区	供試卵数	融合数(%)	胚盤胞数(%)	生産効率(%)
A社	25V	148	75 (50.7) ^a	24 (32.0)	16.2 ^a
B社	20V	66	17 (25.8) ^b	4 (23.5)	6.1 ^b
	25V	82	40 (48.8) ^a	15 (37.5)	18.3 ^a
	30V	62	30 (48.4) ^a	8 (26.7)	12.9
C社	20V	58	13 (22.4) ^b	2 (15.4)	3.4 ^{bc}
	25V	64	28 (43.8) ^a	10 (35.7)	15.6 ^{ab}
	30V	62	34 (54.8) ^a	9 (26.5)	14.5 ^{ab}

異符号間で有意差あり P<0.05

(2)体細胞クローン胚の作出と未經産牛への移植

のべ166個の供試卵に対し、融合卵数70個(42.2%)、胚盤胞数30個(42.9%)、生産効率18.1%であった(表4)。

移植した受胎牛3頭すべてにおいて受胎が確認されたが、1頭は妊娠141日目に双子を流産した。残りの2頭は妊娠を継続し、そのうちの1頭については妊娠278

日目にプロスタグランジン、副腎皮質ホルモンによる分娩誘起処置を施し、翌日、帝王切開により双子の産子(1号、2号)を摘出した。残りの1頭については妊娠279日目に分娩誘起処置をして、翌日双子の産子(3号、4号)を自然分娩させた(表5)。体細胞クローン産子4頭は出世後の蘇生、発育ともに良好であった。

表4 核移植における融合、胚盤胞数、生産効率及びその割合

供試卵数	融合卵数(%)	胚盤胞数(%)	生産効率
166	70 (42.2)	30 (42.9)	18.1%

融合卵率=融合卵数/供試卵数×100

胚盤胞率=胚盤胞数/融合卵数×100

生産効率=胚盤胞数/供試卵数×100

表5 体細胞クローン胚の移植成績

移植頭数	受胎頭数	分娩頭数
3	3 (100%)	2 (双子2組) (%)

妊娠141日目に1頭流産。

考 察

(体細胞の採取と保存)今回はドナー細胞として卵丘細胞を選んで培養、凍結保存した。卵丘細胞は卵子周囲に顆粒状に付着しており、経膈採卵によって比較的簡単

に採取、培養が可能である。また屠殺の必要性のないこと、採取された動物の身体的な負担が比較的少ないというメリットも大きい。特に乳牛の場合は検定成績が出た後に供卵牛や搾乳牛としての活用を図りながら、同時に体細胞保存・クローン牛生産が可能である。機材の必要

性、回収した卵子の数や卵丘細胞の付着の有無などにも左右されるが、経膈採卵による卵丘細胞の採取は、雌牛の体細胞確保と培養において意義のある手法であると考えられる。

また、今回凍結に用いたストローは受精卵移植用で、融解時の破損、その後の培養における細菌汚染などは見られなかった。体細胞クローン生産が目的であれば、一般的に使用するセラムチューブでなくとも十分対応でき、最小限必要な分だけ利用可能で、無駄の少ない方法であると考えられた。

(融合装置の検討) 融合率はB、C社の20V区は20%台であり、それ以外はおおむね50%前後の値であった。今回用いた機種では20Vの印可電圧では若干弱かったようで、卵細胞質への体細胞の取り込みが不十分であると推察された。それ以外の区ではおおむね50%前後の値であったが、胚盤胞の発生率は対照区も含めて30V区のほうが、25V区に比べて低くなる傾向があった。30V区では融合が完了した後にレシピエント卵子細胞膜の破壊されたものがいくつか観察され、生産効率も低くなる傾向にあった。このことから印加電圧の適正範囲は25V前後であると考えられる。

今回は印可電圧のみを変えて試験を行ったが、融合率や胚盤胞発生率は細胞の種類、パルス幅、印加回数、培養方法などの要素によっても変化することが各研究機関から報告されている²⁾⁻¹¹⁾。これらの条件については統一した見解は示されおらず、不明な点も多い。一般的に体細胞クローン胚は受精卵クローン胚や体外授精胚と比較して胚盤胞発生率や生産効率が低い傾向にある。安定的な体細胞クローン胚生産のためには、今後もこれらの点について検討していく必要がある。しかしすべての条件について詳細に検討を重ねていくのはかなりの労力と時間を要する。従って、各研究機関で独自のプロトコルを持ちつつ、必要に応じて柔軟に諸条件を決定していくのが現段階では最善であると考えられる。

(胚の作出と移植)

高能力乳牛テルスターの卵丘細胞を用いた試験でも胚盤胞発生率、生産効率等は2-(1)の試験と大きな変化はなかった。

今回使用したドナー細胞は血清飢餓処理を施さず、すべてコンフルエント状態のものを凍結し、使用する2日前に融解、培養した。Wilmutらは血清飢餓培養を行い、ドナー細胞の細胞周期をG0/G1期にしたものを用いることで、効率的に胚盤胞が発生し体細胞クローンが得られたと報告している¹⁾。今回、血清飢餓をしなくても胚盤胞の発生率、生産効率など比較的良好であった。これは細胞周期のなかでG0/G1期にとどまる期間がもっとも長いので、必然的にその細胞を選択する可能性が高いこと、またM期(分裂期)の後にあたり、他の周期に比べ細胞が小さく選択可能であったことなどが考えられる。実際、他研究機関でも血清飢餓処理を施さず

に体細胞クローン牛生産の報告^{2), 4), 5)}があり、本研究もこれらと同様な結果となった。

移植試験では3頭の未経産牛に2卵ずつ移植してすべて受胎した。例数は少ないが受精卵移植を上回る好成績で、体細胞クローン胚であっても受胎性に問題はないことが確認された。しかし、体細胞クローン受胎牛は死産や生後直死などの事故率が極めて高いことが報告されている。農林水産省の統計¹²⁾によると14年9月末現在で318頭の体細胞クローン牛が生産されており育成・試験中なものは141頭と半数以下である。また流産率も高く、安定期といわれる妊娠100日目を過ぎても多発している。本試験で141日目に流産した胎児の病理組織検査を家畜衛生試験場に依頼したところ、胎盤に石灰沈着が見られた。これ以外にも体細胞クローンの病変として繊維芽細胞の増生(過大子)、骨格筋・骨髄の異常、免疫不全、甲状腺のコロイド形成不全など多くの症例が報告されている¹³⁾。これらは体細胞クローン特有ではなく一般の牛にも見られるもので、体細胞クローンに多発する原因は分かっている。ゲノムインプリンティングに関連する細胞の初期化機構に原因があるとされているが、不明な点が多く、安定的な体細胞クローン生産のためにはさらに研究を進めていく必要がある。

本試験ではリスクを少しでも減らす目的で2卵移植し、過大子による事故率低減を期待した。その結果、出生した体細胞クローン産子4頭の体重は29.0kg~36.2kgと、平均的なホルスタイン種を下回り、分娩における母牛や産子の事故もなかった。分娩時の安全性をより確保するために分娩誘起処理を施し、計画的に産子を取り出した効果も大きいと思われた。

体細胞クローン産子4頭の分娩直後の蘇生とこれまでの生育状況は良好である。今後は4頭の体細胞クローン牛が細胞提供牛の『テルスター』と泌乳能力の点でどの程度同一性を示すかが重要な調査項目であろう。乳牛の飼養環境がけっして良いとは言えない東京都内で年間2万kgは望めないかもしれないが、高能力乳牛の体細胞クローンを保有している研究機関は少ないと思われるので、あらゆるデータを採材して検討を加えていく予定である。また今後、体細胞クローン生産物を利用していくには正常性(安全性)の証明と消費者の理解、受け入れが不可欠なので、国や関係機関と連携した調査、研究行っていく必要がある。

謝 辞

本試験を実施するにあたり、帝王切開を執刀してくださった大野獣医科医院の大野獣医師に深謝いたします。

文 献

- 1) Willmut, I, Schnieke A. E, McWhir, J, Kind A. J & Campbell K. H. S Viable offspring derived from

- fetal and adult mammalian cells. Nature 358, 810-813, 1997.
- 2) 億正樹・上村佳代・小財千明・青山嬢：体細胞クローン技術の有効性の検討. 奈良畜研報, 第26号, 18-24, 1999.
 - 3) 藤田達男・志村英明・梅木英伸・赤峰正雄・志賀一穂：体細胞クローン牛生産技術の確立に関する研究. 大分畜試験成績報告書, 第30号, 71-76, 2001.
 - 4) 戸塚豊・菅原徹・渡辺晃行・戸谷孝治：クローン家畜生産技術利用による優良家畜作出試験. 茨城畜セ研報, 第31号, 17-19, 2001.
 - 5) 谷口雅律・佐藤敬明・小邦朋子・守田智・松本道夫：体細胞クローン技術の確立. 熊本農研セ試験成績書, 124-127, 2001.
 - 6) 中原仁・窪田力・高橋清也・今井裕：融合装置の違いが体細胞クローン胚の発生に及ぼす影響. 第14回東日本受精卵移植技術研究会大会要旨, 64-65, 1999.
 - 7) 横田昌巳・赤木悟史・淵本大一郎・野口龍生・志水学・高橋清也・近藤守人・居在家義昭：ドナー細胞の違いが体細胞核移植胚の発生に及ぼす影響. 第16回東日本受精卵移植技術研究会大会要旨, 48-49, 2001.
 - 8) 中原仁・小田頼政・有安則夫・坂部吉彦：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. 岡山総合畜セ研報, 5-8, 2001.
 - 9) 及川俊徳・高田直和・菊池武：体細胞クローン牛生産技術の確立. 宮城県畜試験成績書, 51-53, 2000.
 - 10) 神藤学・大町雅則・清水景子・小柴哲也・岩崎説雄・高木優二：優良種畜の安定的大量生産技術の開発（第4報）. 山梨酪農試験研究成績書, 63-65, 2000.
 - 11) 林尚徳・平尾一平：体細胞核移植における融合条件の検討. 岐阜肉用試畜研報, 5-9, 2000.
 - 12) 農林水産省 農林水産技術会議事務局：家畜クローン研究の現状について, 2000.
 - 13) 第5回核移植技術検討全国検討会会議資料：体細胞クローンの病理, 2001.

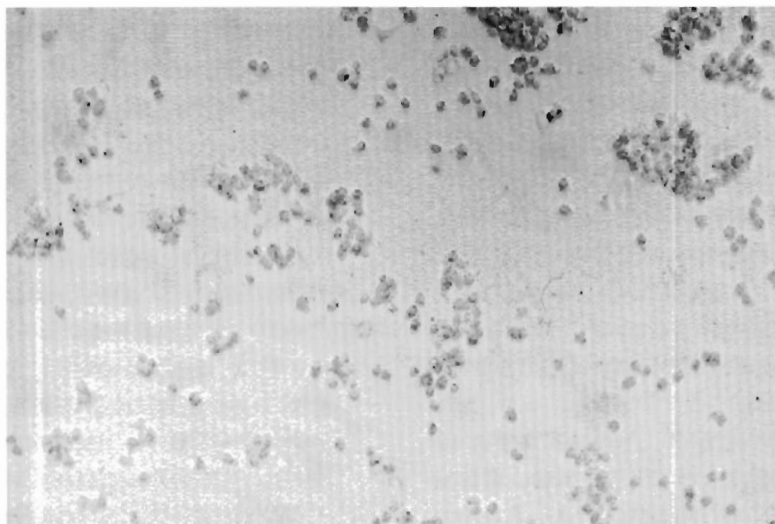


写真1 高能力牛の卵丘細胞

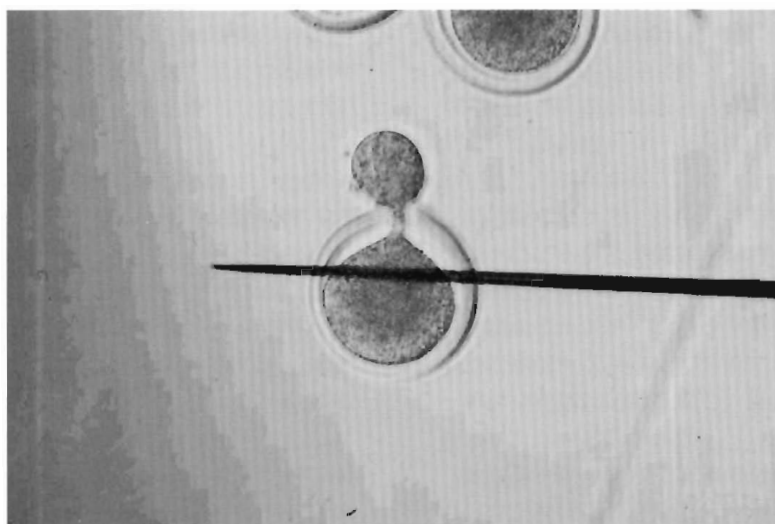


写真2 卵子の除核

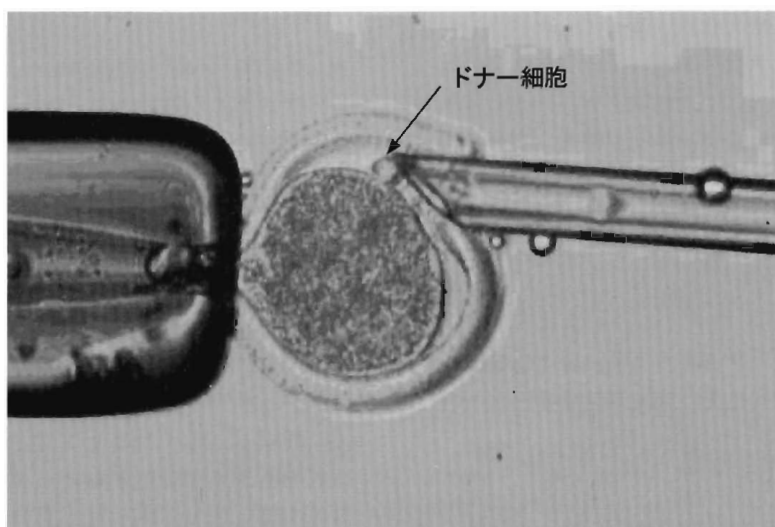


写真3 除核卵子への卵丘細胞の挿入

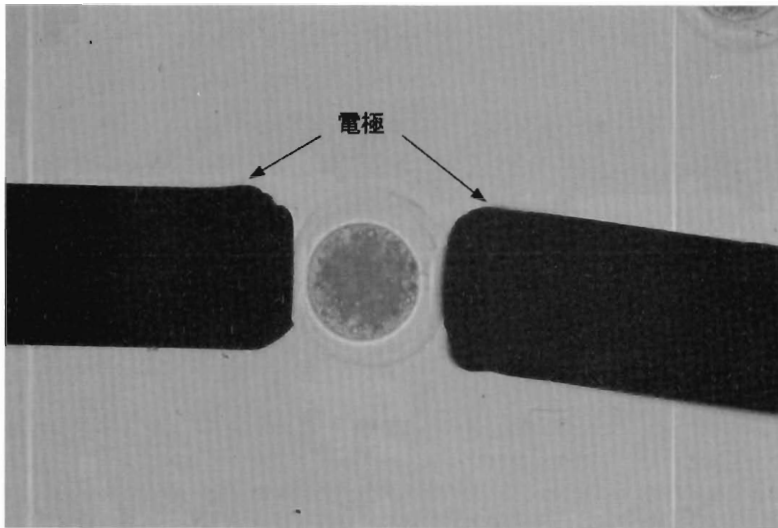


写真4 卵子と卵丘細胞の電気融合

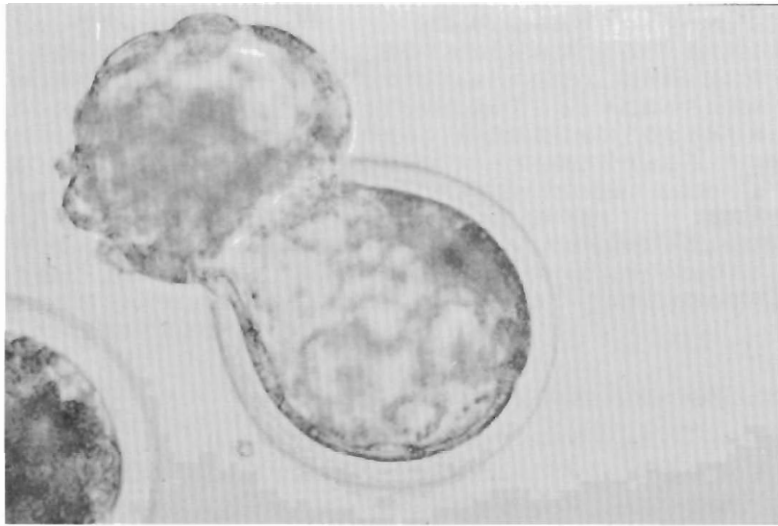


写真5 体細胞クローン胚



写真6 テルスターの体細胞クローン