

ホルスタイン種乳用牛における体細胞クローン牛の双子生産

笠井 裕明・福見 善之・後藤 充宏

要 約

継代培養した卵丘細胞をドナー細胞に用いて核移植を行い、クローン産子の双子生産を行った。経膈採卵装置を用いて生体内から吸引採取した卵丘細胞-卵子複合体4個を10%FCS添加DMEM培地で2週間培養し増殖した卵丘細胞を8代継代培養後ドナー細胞とした。核移植には、この細胞を凍結融解後2日間培養したあとに血清飢餓処理して用いた。レシビエント卵子には食肉センター由来の卵巣から当所の常法により採取した卵子をIVMD101で20~22時間成熟培養後除核し、融合操作後活性化処理を行った。胚の再構築はZFMを融合液にし、23v-10 μ sec \times 2回/150 μ mの条件で直流パルスを通電した。その後10 μ g/mlシクロヘキシミドと3mg/mlBSAを添加したCR1aaで5時間培養し、IVD101で移植時まで38.5 \pm 、低酸素条件で培養した。移植は培養開始後144時間目の胚盤胞期胚をホルスタイン種経産牛へ2または3胚移植した。その結果、供試卵子数は194個で、融合率83.0、分割率79.4、胚盤胞期胚の発生率は43.8%であった。8頭の受胎牛に21胚移植した結果、5頭が受胎し、内1頭が74日目に発情回帰、1頭が247日目に12及び44kgのクローン胎子を流産した。分娩予定日に達した3頭では1頭が269日目に帝王切開で31.0、54.0kg、1頭が279日目に分娩誘起で41.0、57.0kgの生存産子を生産し、1頭が275日目に分娩誘起で37.0、45.0kgの産子を死産した。なお、生存産子4頭中1頭は誕生後約6時間死亡したが残りの3頭は現在育成中である。以上のことから、ホルスタイン種体細胞クローンでは再構築胚を複数胚移植することで双子生産が可能であった。

目 的

体細胞クローン牛の生産においては流産の発生が多くまた、正常妊娠期間を経た後に生産されたクローン牛でも死産、生後直死等の発生が多く生存産子の生産率は低い¹³⁾。

ホルスタイン種においては分娩事故を防ぐために過大子の発生を未然に予防することが重要であり、帝王切開でクローン牛を摘出できても受卵牛の泌乳性は期待できないため、野外においてクローン牛を誕生させることはできない。

今回、我々はクローン産子を経膈的に分娩させることを目的に、体外受精卵の2胚移植による双子生産技術を^{2,4,5)}もとに、体細胞クローン産子の双子生産について検討を行い若干の知見を得たので報告する。

方 法

(1) 核移植

ドナー細胞の作出

ホルスタイン種経産牛から経膈採卵装置を用い卵巣より吸引採取した 10 個の卵丘細胞-卵子複合体より，4 個を選別し 3.5 mm のゼラチンコートディッシュ(池本)を用い 10% 牛胎子血清(FCS)添加 DMEM(Gibco)で 2 週間培養し(写真 1 2) 増殖した卵丘細胞をトリプシンと EDTA を含む PBC(-) で回収し 8 代継代培養した。培養後は，1.8MEG-0.3MSuc-BSA-PBC で 0.25ml のストローに吸引後，プログラムフリーザーを用い凍結保存した。

核移植および再構築胚の培養

ドナー細胞には前述の細胞を融解後 2 日間 10%FCS 添加 DMEM 培地で培養後 0.5%FCS 添加 MEM(グルタミン不含)で 5 日間血清飢餓処理後核移植に用いた。レシビエント卵子には食肉センターから持ち帰った卵巣の表面に存在する直径 5 mm 以下の卵胞から吸引採取した卵子を IVMD101 で 20 ~ 22 時間成熟培養後核を取り除いたものを用い 融合操作後活性化処理を行った。融合機には LF101。胚の再構築は ZFM(Zimmerman cell fusion medium)を融合液にし，ニードル型チャンバーでドナー細胞とレシビエント卵子を囲卵腔内で接触させ 23v-10 μ sec \times 2 回/150 μ m の条件で直流パルスを通電した。その後 10 μ g/ml シクロヘキシミドと 3 mg/ml 牛血清アルブミンを添加した CR1aa で 5 時間培養した後に IVD101 で移植時まで培養を行った。

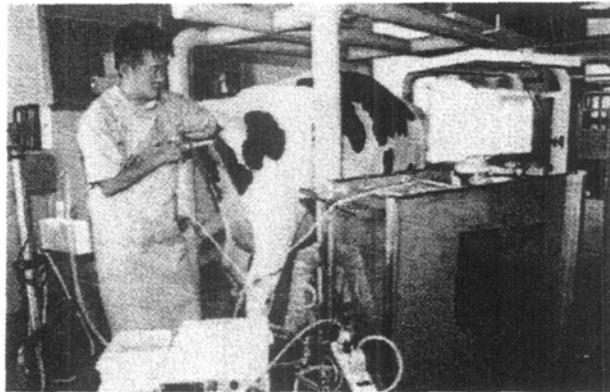


写真 1 経膈採卵

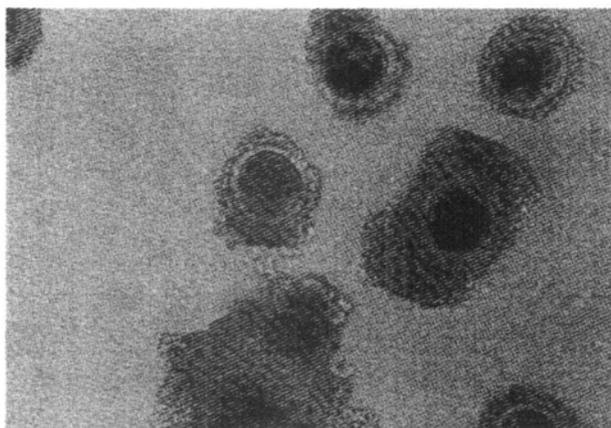


写真2 採取した卵丘細胞-卵子複合体

(2) 体外受精

体外受精胚の作出はレシピエント卵子の作出と同様に培養した卵子を、凍結精液を用いBO液で 5×10^6 個/mlの濃度に調節した100 μ l精子ドロップ中に卵子10個程度を加え媒精を行い、その6時間後に卵子を洗浄、ピペティングにより卵子を裸化処理し、CR1aa区では3mg/ml牛血清アルブミン(BSA)添加CR1aa培地750 μ lに50個の割合で卵子を加え、5%CO₂-air、38.5で媒精終了後から48時間培養し、その後は5%FCS添加CR1aaで192時間目まで5%CO₂-5%O₂-90%N₂、38.5の条件で培養した。IVD101区は媒精終了後よりIVD101750 μ lに対し裸化卵子50個を加え192時間目まで培養した。

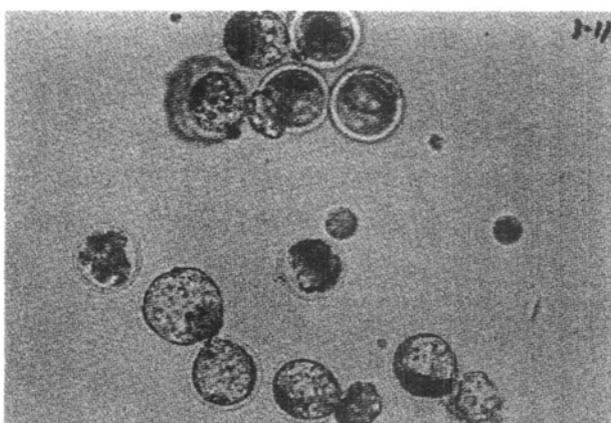


写真3 再構築胚

(3) 移植および妊娠診断

移植はPGF2（プロスタグランジン類縁物質）で発情誘起したホルスタイン種経産牛の発情終了後6あるいは7日目の子宮角に、2胚移植では両側、3胚移植では黄体側に2個、非黄体側1個新鮮胚移植した。妊娠診断は移植後およそ60日目に直腸膈法により行った。

結 果

(1) 核移植成績

4回の試験で供試卵数は194個中融合卵数161(83.0%)、分割卵数154(79.4%)、融合後144時間目における胚盤胞期胚数は19(9.8%)、後期桑実期～初期胚盤胞期数は36(18.6%)、168時間後に胚盤胞期以降までステージの進んだ胚は85個(43.8%)であった(表1, 写真3)。

表1 無血清培地(IVD101)を用いた初期胚の培養成績

培養液	供試胚	供試卵数	融合率 (%)	分割率 (%)	144 h後		168 h後
					CM～eBla	Bla～	Bla～
CR1aa ^{*1}	IVF	183		134(73.2)	33(18.0)	26(14.2)	60(32.8)
IVD101 ^{*2}	IVF	205		168(82.0)	62(30.2)	13(6.3)	62(30.2)
IVD101	NT	95	72(75.8)	69(72.6)	13(10.5)	8(8.4)	46(50.0)
		29	27(93.1)	25(86.2)	4(13.8)	0(0)	7(24.1)
		22	20(90.9)	19(86.4)	5(22.7)	2(9.1)	11(50.0)
		48	42(87.5)	41(85.4)	14(29.2)	9(18.8)	21(43.8)
	計	194	161(83.0)	154(79.4)	36(18.6)	19(9.8)	85(43.8)

※1：5%FCS添加CR1aa, ※2：無血清培地(機能性ペプチド研)

なお、体外受精由来胚の培養試験の結果、分割率は各々73.0、82.0%、培養144時間目における後期桑実期～初期胚盤胞期胚発生率は18.0、30.2%、胚盤胞期胚の発生率は14.2、6.3%、168時間目に胚盤胞期以降までステージが進んだ率は32.8、30.2%であった(表1)。

(2) 移植および妊娠分娩成績

延べ8頭の受卵牛に対し再構築胚21個を移植した結果、5頭で妊娠が確認されたが、74日目に1頭が発情回帰し、247日目に1頭が反転性裂体と水腫胎を流産、3頭が正常妊娠期間に達した。この内1頭が269日目に帝王切開により31.0、54.0kgの双子、1頭が275日目に誘起分娩により37.0、45.0kgの双子、1頭が279日目に誘起分娩により41.0、57.0kgの双子を生産した(表2)。生産された6頭中2頭は死産で、4頭は生存産子であったが、1頭が誕生からおよそ6時間後に死亡し、残りの3頭は生存中である(図1)。

表 2 再構築胚の移植成績

牛番号	産 歴	移植胚数	培養時間	ステージ	妊 娠	妊娠期間	産子数	産子数
158	初	3	144	B1a	+	279	2	誘起分娩
157	初	3	144	Hg- B1a	+	247	2	流 産
161	初	3	144	C M	+	275	2	誘起分娩
116	3	3	168	Hg- B1a	+	74		
151	2	3	168	B1a	-			
159	初	2	144	B1a	+	269	2	帝王切開
142	3	2	144	B1a	-			
139	2	2	144	C M	-			

(3) 流死産子および生直死産子

6頭のクローン牛の内、生後6時間余りで死亡した1頭と死産の2頭について病理解剖を行った結果、直死した1頭と死産した1頭では羊水の誤飲が確認された。また、組織検査の結果、直死した1頭で肝臓の軽度の脂肪変性及び実質性甲状腺腫、死産した1頭で肝臓の線維化及び副腎髄質の過形成、別の1頭では実質性甲状腺腫が認められた(表3、写真4、5)。

表 3 クローン産子流産分娩成績

牛番号	移植胚数	妊娠期間	産子数	産子番号	産子体重	産子の状態	死 因 等
157	3	247	2		12	反転性裂体	
					44	水腫胎	
159	2	269	2	1	31	生 存	
				2	54	生 存	
161	3	275	2	3	37	死 産	実質性甲状腺腫
				4	45	死 産	羊水誤飲・肝の線維化
158	3	279	2	5	41	生 存	
				6	57	生直死	実質性甲状腺腫・脂肪肝

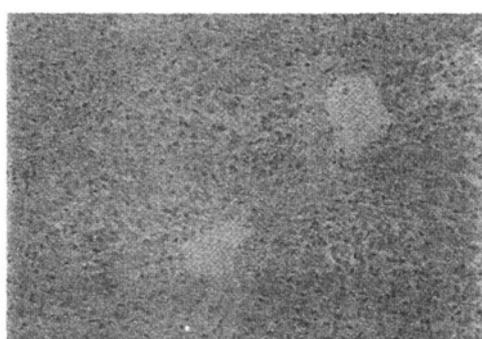


写真 5 肝臓(4号)

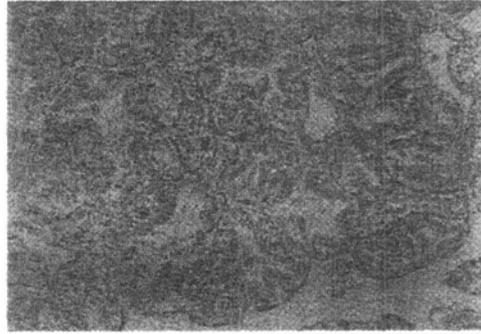


写真5 甲状腺(3号)

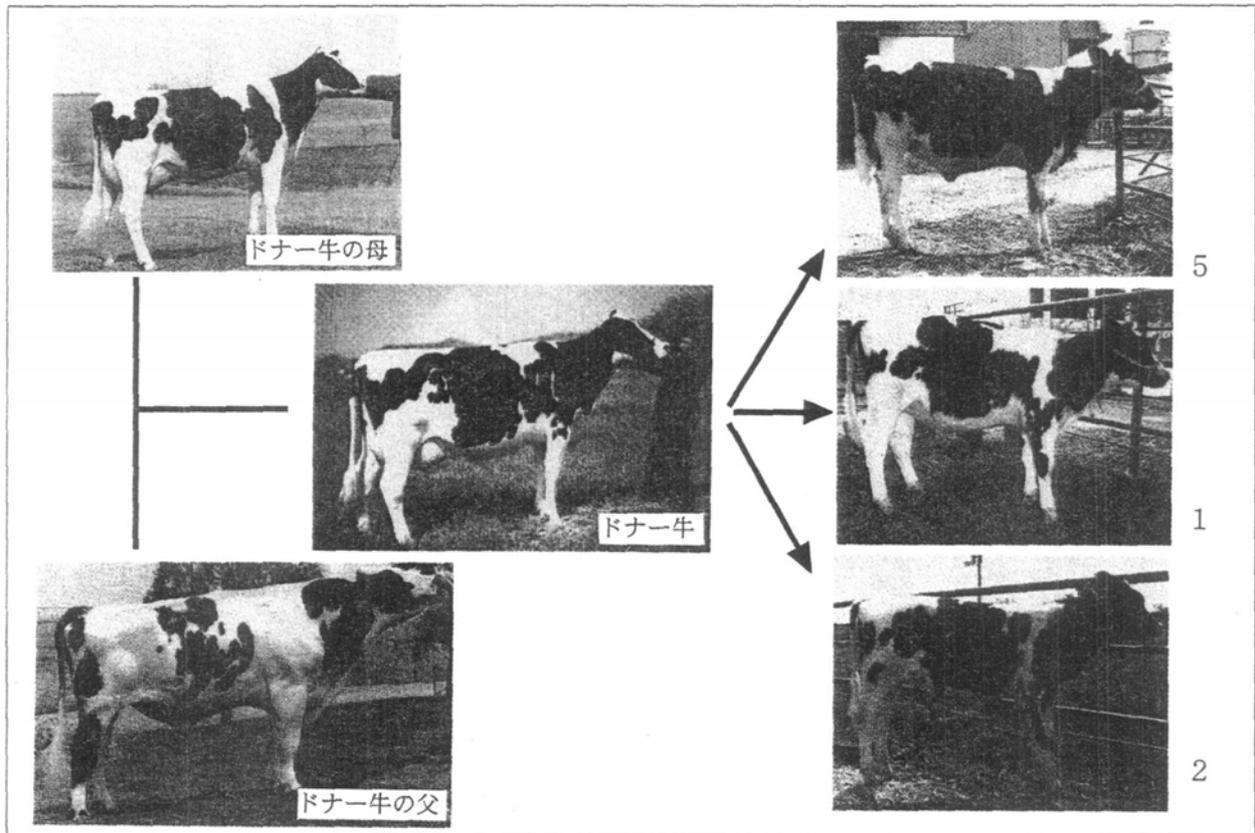


図1 ドナー牛およびその父母と3頭の生存クローン産子

考 察

我々の研究所では、牛皮膚組織由来線維芽細胞をドナー細胞に用い5%FCS 添加 CR1aa で作出した再構築胚を移植した結果、44 kgの生存産子と54 kg、62 kgの水腫胎子を生産した⁸⁾。

産子はいずれも1胚移植の単子であった。今回の再構築胚の複数胚移植では、胎子の確認できた4頭がすべて双子であった。例数が少ないため、比較することはできないものの、体内受精由来胚を用いた双子生産⁹⁾に比べ、双子の生産率は高くなることも考えられる。今後例数を重ねていきたい。

今回の試験で正常妊娠期間に達して誕生した6頭の体重は31~57 kgで、極端に過大な例は認めら

れず、すべて経膈分娩させられる大きさであった。一般に双子分娩では産子の体重は単子に比べ軽いことが確認されている^{1, 2)}が、培養液を IVD¹⁰¹³⁾に変更したこと、移植する再構築胚の培養時間を短くした¹⁰⁾こと等も胎子の体重の影響したと考えられる。しかし、双子間の体重差は 8~23 kg もあり、体内受精由来胚の移植で誕生する双子に比べ差は大きいと思われる^{2, 11)}。また、ドナー牛の生時体重は 40 kg であったことから、クローン産子 6 頭との間に斉一性は認められなかった。レシビエント卵子が同一牛由来の卵巣から採取したものでないことやドナー細胞の由来が百個以上の卵丘細胞であることもその原因に含まれると考えられる。

ホルスタイン種のクローン産子では生時体重が 50 kg を境として過大なものでは生後直死が増加することが確認されている⁹⁾。今回の試験でも誕生後 6 時間余りで死亡した 1 頭は、安産で生まれたものの 57 kg と比較的大きな胎子であり、誕生後は起立及び初乳を吸飲できないほど虚弱であった。羊水の誤飲が確認されたが甲状腺や肝臓にも異常が認められた。甲状腺の異常は 37 kg の死産胎子においても確認され、体重が軽い段階で誕生させても、これらの異常を解決しなければ生存産子の生産率を向上させることは難しと考えられる。

今後は、例数を重ねるとともに、再構築胚の選別技術について検討したい。なお、生存中の 3 頭のクローン産子については同一飼料給与により発育性調査を実施する予定である。

稿を終えるに当たり、クローン牛の死亡原因究明についてクローン牛の病理組織検査をしていただいた独立行政法人農業技術研究機構動物衛生研究所 久保正法先生に深謝いたします。

参考文献

- 1) 堂地修, 今井敬, 高倉宏輔, 武田哲夫, 橋谷田豊, 高橋博人, 有山賢一 人工授精後の胚移植によるウシの双子生産(1994)農林水産省家畜改良センター調査試験報告書 1 10-13.
- 2) 後藤充宏, 鴻野文男, 小鹿野義一 牛体外受精胚の移植試験 徳島県畜産試験場研究報告(1992)33 : 1-5.
- 3) 星宏良, 佐藤威, 山下祥子, 阿部宏之, 佐田竜一, 辻井弘忠, 後藤太一 無血清培地によるウシ体外培養胚の生産と胚移植 Tiss.Cult.Res.Commun(1999)18 : 163-172.
- 4) 今川智久, 大石克己, 小鹿野義一 受精卵移植による牛の双子生産技術 徳島県畜産試験場研究報告(1989)30 : 1-6.
- 5) 今川智久, 大石克己, 後藤充宏, 小鹿野義一 受精卵移植による牛の双子生産技術 徳島県畜産試験場研究報告(1990)31 : 2-6.
- 6) 居在家義昭, 鈴木修, 島田和宏, 竹之内直樹, 小杉山基昭, 高橋政義 黒毛和種の 2 胚及び 3 胚移植における早期胚死滅の発生様相と多胎妊娠率, 子牛分娩率(1991) 畜産試験場研究成果情報 551-52.
- 7) 泉徳和 ウシの双子分娩(1988) 家畜人工授精 128 : 26-33.
- 8) 笠井裕明, 福見善之, 刈谷亮介, 後藤充宏 乳牛における体細胞をドナー核に用いた核移植産子の

生産 徳島県畜産試験場研究報告(1999)40 : 1-4.

- 9) 小岩井農牧(株) 家畜受精卵移植技術研究組合平成 10 年度研究開発報告書(1998)85-1 08.
- 10) M.Kuran, J. J. Robinson, M. J. Ranilla, M. E. Staines and P. J. Broadbent Incidence of fetal oversiz ein relation to developmental stage of in vitro cultured ovine embryo at transfer Theriogenol ogy(1999)51:240.
- 11) 高倉宏輔, 堂地修, 今井敬, 高橋博人, 有山賢一 切断二分離胚移植によるウシの双子生産(1994) 農林水産省家畜改良センター調査試験報告書 17-9.
- 12) Williams, T. J. Elsdon, R. P. and Seidel, G. E. Jr. (1984) Pregnancy rates with bisected bovine e mbryos.Theriogenology 22:521-531。
- 13) 体細胞クローン牛の移動報告資料(2001)農林水産技術会議