

産業利用に向けた体細胞クローンに関する技術開発と調査

Technology Development and Investigation Concerning Somaclone for Industrial Application

梅木英伸¹⁾・木下正徳

要 旨

体細胞クローン産子が、分娩後正常な成長をできる胚が移植時に解れば、クローン牛の生産は飛躍的に向上すると考えられることから、本試験では遺伝子診断よって正常性の判定を行った凍結胚の移植及び新鮮胚移植後に遺伝子診断を行い、受胎した牛について妊娠、分娩、産子等を調査し、遺伝子診断法の有効性について検討した。

1. 体細胞クローン胚を 145 胚作成してバイオプシーを行い、そのうち 110 サンプルの細胞切片を京都大学へ送付して、遺伝子診断により胚の判定を行った。
2. 胚の判定後に移植を行った凍結胚は、判定 3 胚、4 胚、3 胚、× 3 胚の計 13 胚で、3 頭が受胎(2 頭、× 1 頭)したが、胚 1 頭、× 胚 1 頭はその後早期流産した。
3. 胚の判定前に、胚 2 胚、× 胚 4 胚、判定不可 4 胚の計 10 胚を新鮮胚移植した結果、4 頭が受胎(胚 2 頭、判定不可 2 頭)したが、判定不可 1 頭はその後早期流産した。
4. 妊娠を継続していた 4 頭のうち 1 頭は、胚移植後 252 日目から膣より出血が続き 259 日目に帝王切開により産子を取り出したが死産であった。その後 2 頭が分娩誘起後助産により正常に分娩したものの、最後の 1 頭は分娩誘起後に助産により分娩したが、産子は呼吸不全により生後直死した。
5. 正常に分娩した 2 頭のうち 1 頭の生時体重は 27.2Kg と小さく、体重・体高・胸囲ともに黒毛和種正常発育曲線の下限値をやや下まわっているが順調に発育している。また、もう一頭の生時体重は 46.0Kg であり、黒毛和種正常発育曲線の上限值とほぼ同様な発育を示している。

以上のことから、京都大学で実施した体細胞クローン胚判定法の有効性については、受胎した 判定の 1 頭が分娩まで至らなかったこと、及び供試牛の個体数が少なかったことから結論を出すに至らなかった。

(キーワード：体細胞クローン胚、遺伝子診断、正常性)

背景及び目的

体細胞クローン牛生産技術は、能力の優れた雄牛及び雌牛を多数生産ができ、高品質の畜産物が低コストに生産が図れる技術であると考えられる。また、出生・成長の各段階で死亡を免れた体細胞クローン牛の発育性¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾、産肉性⁶⁾⁷⁾⁸⁾、繁殖能力¹⁾²⁾³⁾⁴⁾は、一般牛と比較して有意な差は認められず⁹⁾¹⁰⁾、米内ら¹¹⁾は、ホルスタイン種体細胞クローン牛の正常な

成長、繁殖および泌乳を認めたことを報告している。

しかし、体細胞クローン牛生産において、早期流産率の高さ・過大児による分娩事故、生後直死の多発、虚弱な子牛の死亡率の高さなど低い生産性¹⁾¹²⁾¹³⁾が、クローン牛の生産について消費者などからの懐疑的な目が注がれる原因となっている。

そこで、体細胞クローン産子が分娩後正常な成長をできる胚が移植時に解れば、クローン牛の生産は

1) 豊後大野家畜保健衛生所

飛躍的に向上すると考えられることから、遺伝子診断により判別した正常・異常クローン胚の品質評価の有効性を調査するために、遺伝子判別後の凍結胚移植または、新鮮胚移植後に遺伝子判別を実施して、移植後の妊娠、分娩、産子等の調査を行い、遺伝子診断法の有効性について検討する。

材料及び方法

1. 食肉処理場からの卵子採取方法

食肉処理場で採取した卵巣を、約 30 に調整した生食水入りの保存瓶に入れ持ち帰り、20 %非働化子牛血清 + 0.4 %血清アルブミン(SIGMA)添加修正ダルベッコの PBS(以下 m-PBS)を吸引した 18G 注射針付き食肉処理場卵巣吸引採取装置(Tama-Q、富士平)を用いて、2 ~ 5 mm 径の卵胞から卵胞液とともに卵子を吸引採取した。採取液をシャーレに移して鏡検し m-PBS に回収した。卵子は卵丘細胞の付着状態等によって以下の 6 段階¹⁵⁾の卵子グレードに分類した。

- G 1 : 透明帯の周囲を卵丘細胞が 4 層以上取り囲んでいる
- G 2 : 透明帯の周囲に卵丘細胞が 1 ~ 3 層(放線冠細胞も含む)付着している
- G 3 : 卵丘細胞が透明帯の周りに部分的(1/3 以下)に付着している
- G 4 : 完全に裸化されている
- G 5 : 卵丘細胞が膨化している
- G 6 : 卵丘細胞の付着状態に拘わらず卵細胞質が変性している

以上の卵子グレードの分類より、G 1、G 2 の採取卵子を供試卵子とした。

2. 卵子の成熟

卵子の成熟は 0.02AU/ml FSH(アントリン、デンカ)と 1 μ g/ml Estradiol-17 (SIGMA)および 0.2mM ビルビン酸(SIGMA)を加えた 5 %非働化牛胎児血清(GIBCO)添加 TCM-199(GIBCO)で 3 回洗浄し、1 胚当たり 10 μ l の同培養液に卵子を移し、CO₂インキュベーター(38.9、5 % CO₂、in air、湿潤)で 18 時間培養して卵子の成熟を促した。

2. 体細胞クローンの作出方法

当場で繋養していた種雄牛「糸福」、「第 2 夢福」の筋肉細胞から、志賀ら¹⁵⁾の方法により作出した。

3. 胚の培養

活性化処理終了後、EGF100ng/ml、IGF- 50ng/ml、0.3 % BSA(SIGMA)添加 mSOF¹⁶⁾に移し、3 回洗浄後、1 胚当たり 5 μ l の mSOF のドロップに移し、マルチインキュベーターで培養を行った(38.9、90% N₂、5 % CO₂、5 % O₂、湿潤)。

4. 胚のバイオプシー方法

発生培養後 7 ~ 8 日目に、胚盤胞および拡張胚盤胞に発育したクローン胚のバイオプシーは、倒立顕微鏡にマイクロマニプレーターを左右に 2 台(左; 保持用、右; 切断用)と右に更に 1 台(細胞を透明帯から出し入れの為にマイクロピペット用)の計 3 台を取り付けて行った。倒立顕微鏡の境台上に、m-PBS を入れた 100 × 100mm のシャーレ中に胚を置き、ホールディングピペット内の m-PBS で保持し、透明帯をガラスニードルにより 1/3 ~ 2/3 程度切開し、囲卵腔内にマイクロピペット内の m-PBS を吹き込み、細胞を透明帯から外に出した。この細胞にガラスニードルを上から下へ降ろして細胞の一部を切除し、残った細胞は自身の透明帯に還納した。

採取した細胞は遺伝子診断用の Buffer に保存し、京都大学に送り遺伝子診断に用いた。

5. 胚の判定方法

クローン胚の正常性の判定は京都大学において、Hsp70、Snurf、Cytokeratin19 の遺伝子発現量によって評価し判定¹⁷⁾を行った。

6. 胚の凍結保存方法

バイオプシー後の胚は、以下の 2 方法で凍結した。ストロー内ワンステップ法は、mPBS を基調液とした 10 %グリセロール液を耐凍剤として用い、胚を 3.3 %、6.7 %および 10 %グリセロール加 mPBS でそれぞれ 5 分間浸漬した後 0.25ml (IVM、CASSOU 社製 straw、フランス)プラスチックストローに充填した。ストローへの充填は、融解後のグリセロール除去のための 0.6M シュークロース加 mPBS を先に充填し(約 8.5cm)、10 %グリセロール加 mPBS でストローの先端部を洗浄した後に 3mm の空気層を作成し 10 %グリセロール加 mPBS

内の胚とともにストローに吸引し充填した(1.5cm)。ストローの冷却は無水エタノールを入れたプログラムフリーザー (ET1: FHK 社製) を用い、20 から - 5.5 まで毎分 - 1 で冷却、この間 - 3.5 に達した時点で 0.6M シュークローズ加 mPBS 部分を液体窒素で冷やしたピンセットではさんで植氷。 - 5.5 で 10 分間保持後、毎分 - 0.3 で - 35 まで冷却し液体窒素に投入した。

ダイレクト法は胚を 1.8M エチレングリコール +0.1M シュークローズ加 mPBS に浸漬した後、0.25ml ストローに充填した。ストローの冷却はストロー内ワンステップ法と同じプログラムフリーザーを用いて、 - 7 10 分間保持 (- 7 浸漬 1 分後植氷) 後、毎分 - 0.3 で - 30 まで冷却し液体窒素に投入した。

7. 胚の融解方法

ストロー内ワンステップ法は、ストローを液体窒素ボンベから出し、空中で 10 秒間保持後、35 の温水に 11 ~ 15 秒間水平に保持し融解。ストローのシール部を持ち 1 ~ 2 回強く振り下ろし、10%グリセロール加 mPBS 層と 0.6M シュークローズ加 mPBS 層を混合させた後、ストローを 35 の温水中にシール部を上にし 7 分間立て、ストロー内でグリセロールを除去した。

ダイレクト法は、ストローを液体窒素ボンベから出し、空中で 11 ~ 15 秒間保持後、30 の温水に 12 秒間浸漬し融解した。

8. 融解胚の培養方法及び生存性の判定

凍結法で融解した胚は融解後のランクを観察後 mPBS に移し、2 ~ 3 時間の短時間培養 (38.5、in air、湿潤) によって胚の囲卵腔の形態、胞胚腔の形成や拡張度合い等により生存性を確認し、生存と判定した胚を移植に用いた。

9. 胚の移植方法

胚の移植は、当场で飼養している黒毛和種経産牛または交雑種 (ホルスタイン種 × 黒毛和種) 経産牛を受卵牛とした。

受卵牛を柵場に保定し直腸内の糞を排出し、仙骨と第 1 尾椎間の麻酔部位を毛刈りして後軀を水洗後、アルコール綿花で消毒して 3 ml の 2% 塩酸リ

ドカイン (2%キシロカイン注、藤沢薬品) で尾椎硬膜外麻酔を行った。尾を保定し外陰部を水洗、アルコール綿花で消毒した後、消毒した腔鏡を挿入して腔部を開口し、移植器 (カスー式牛移植器、CASSOU 社製、フランス) を腔壁に触れないようにして外子宮口に挿入して腔鏡を除去した。移植は頸管経由法により非外科的に黄体が確認された卵巢と同側の子宮角の基部から中央部の部位に 1 胚移植した。

10. 妊娠診断

妊娠診断は胚移植後 30 日目前後に、直腸壁から超音波診断装置 (日立メディコ社製 ECHOPAL ; EUB405B、リニア探触子 T 型 7.5MHz ; EUP-033J) の探触子を挿入し、胎児のビートを確認したものを受胎とした。

11. クローン産子の発育調査

産子の体重、体高、胸囲は、分娩日から毎週 1 回 7 日間隔で測尺した。

11. 調査項目

- 1) 受胎状況
- 2) 分娩状況
- 3) 産子の発育状況

結果及び考察

1. 体細胞クローン胚の作成と処理状況

作成した体細胞クローン 145 胚のうち 125 胚についてバイオプシーを実施し、そのうち 110 サンプルの細胞切片を京都大学へ送付した。

2. 移植・受胎状況

(1) 凍結胚移植の受胎状況

クローン胚を凍結して融解後生存性が確認され胚のうち、遺伝子発現の高い順から判定 3 胚、4 胚、3 胚、× 3 胚の計 13 胚を移植した。

その結果、3 頭が受胎 (2 頭、× 1 頭) したが、胚 1 頭 (移植後 55 日目)、× 胚 1 頭 (移植後 27 日目) はその後早期流産した (表 1)。

(2) 新鮮胚移植の受胎状況

胚の判定前に新鮮胚を 10 胚移植したが、その後の移植した胚の判定結果は 胚 2 胚、× 胚 4 胚、判定不可 4 胚であった。

表3 分娩状況

産子No	サンプル番号	ドナー細胞	胚品質	分娩日	在胎日数	体重	産子状況	備考
1	H19-46	第2夢福		H20.11.27	259	37Kg	死産	252日目出血有、帝王切開(腐敗臭)
2	H20-2	糸福		H21.1.28	278	46Kg	生存	分娩誘起開始(H21.1.26)、助産
3	H20-4	糸福		H21.1.26	276	27.2Kg	生存	分娩誘起開始(H21.1.24.)、助産
4	H20-9	糸福	判定不可	H21.2.16	276	44Kg	生後直死(呼吸不全)	分娩誘起開始(H21.2.14)、助産



No1号牛



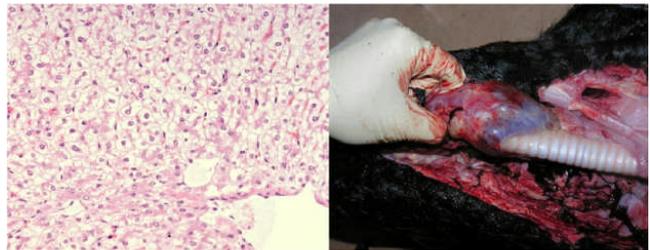
No2号牛



No3号牛



No4号牛



肝細胞の植物細胞様変化

肥大した甲状腺

写真2 No4号牛の著変

写真1 クローン産子の分娩状況

4. クローン産子の発育状況

生存しているクローン牛の発育状況は、2号牛産子の生時体重は 27.2Kg と小さく、体重・体高・胸囲ともに黒毛和種正常発育曲線の下限値をやや下ま

わっているが、順調に発育している。

また、3号牛産子の生時体重は 46.0Kg であり、黒毛和種正常発育曲線の上限値とほぼ同様な発育を示している(図1)。

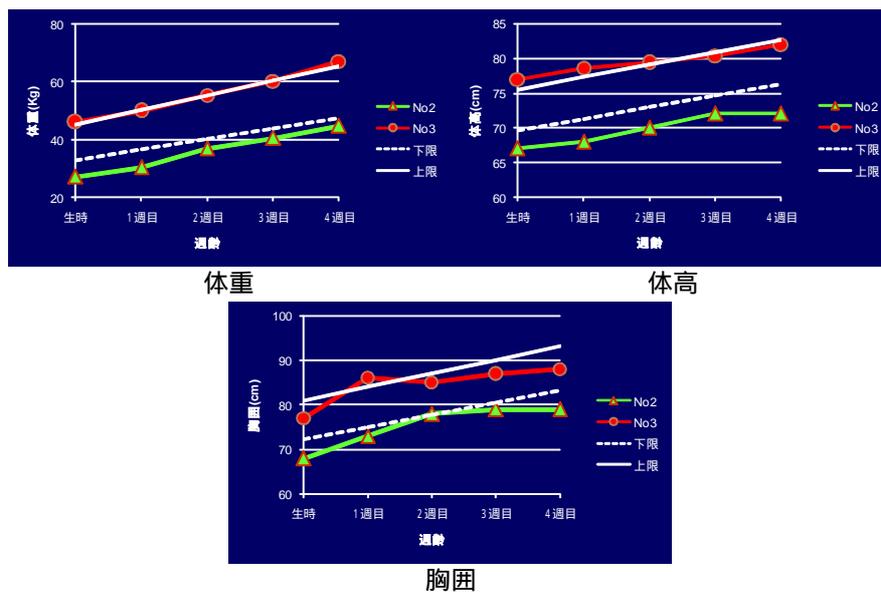


図1 クローン産子の発育状況

以上のことから、体細胞クローン胚を用いて遺伝子診断により正常判定を行い、凍結胚、新鮮移植を行った結果、受胎した正常判定の2胚は正常に分娩・発育を確認したが、受胎した判定の1頭は分娩まで至らなかったこと、供試牛の個体数が少なかったことから、京都大学で実施した体細胞クローン胚判定法の有効性については不明である。

しかし、渡辺ら⁹⁾¹⁰⁾は、出生・成長の各段階で死亡を免れた体細胞クローン牛の発育性は、一般牛と比較して有意な差は認められないと報告していることから、今回実施した判定法の正確度が現在より向上すれば、細胞クローン産子の分娩時の事故低減、その後の正常な成長が可能で、クローン牛の生産性は向上し、体細胞クローン牛に対する消費者の理解へのアピールが期待できると考えられた。

引用文献

- 1) 志賀一穂・梅木英伸・志村英明ほか
大分畜試報告, 30: 55-61. 2001.
- 2) 加藤誠二・林登・林尚徳ほか
岐阜畜研究報告, 3:27-36. 2003.
- 3) 山口大輔・根本聡美・渡辺晃行ほか
茨城畜セ研報告, 35: 55-60. 2003.
- 4) 笠井幸治・佐野文彦・齋藤美英ほか
静岡畜試報告, 12: 4-5. 2006.
- 5) 本田巖・篠木忠・原恵ほか
福島畜試報告, 10: 13-16. 2003.
- 6) 志賀一穂・久々宮公二・志村英明ほか
大分畜試報告, 33: 12-15. 2004.
- 7) 坂下邦仁・窪田力・田原則雄ほか
鹿児島畜試報告, 35: 28-40. 2002.
- 8) 坂下邦仁・窪田力・田原則雄ほか
鹿児島畜試報告, 36: 28-40. 2002.
- 9) Watanabe S., et al
J Reprod Dev, 54: 6-17. 2008
- 10) 渡辺伸也・永井卓.
日本胚移植学雑誌, 29: 14-28. 2007
- 11) Yonai M., et al
J Dairy Sci, 88: 4097-4110. 2005.
- 12) 森浩一郎・窪田力・児島浩貴ほか
鹿児島畜試報告, 35: 52-57. 2002.
- 13) 比嘉直志・山城存・千葉好夫.
沖縄畜試研報, 40: 5-10. 2002.
- 14) 坂口真一・井口光国・小林直彦ほか
日本胚移植学雑誌, 17: 94-100, 1995
- 15) Shiga, K., et al.
Theriogenology, 52: 527-535, 1999
- 16) Takahashi, S., et al.
Theriogenology, 37: 963-978, 1992
- 17) 黄捷・中本善之・朴志秀ほか
第 15 回日本胚移植研究大会講演要旨, 2008