

# 1. ウシ体細胞クローン胚の体外発生とクローン産子の生産

酪農科：中里 敏<sup>1)</sup>・小笠原俊介  
谷山 敦・松尾 信明  
(<sup>1)</sup>現 畜産課)

## 要 約

黒毛和種雄牛の皮膚細胞をドナー細胞として体細胞クローン胚を作成し、この胚を発情同期化した受胎牛に新鮮胚移植した結果、受胎が認められクローン産子が得られた。

- 1) 平成12年度に移植・受胎した10頭のうち7頭に流産が発生したが、3頭の体細胞クローン牛が得られた。このうち、1頭は生後5日目に病死、1頭は生後直死したが、1頭の生存子牛が得られた。
- 2) 13年度は、作出したクローン胚のうち23.1%が胚盤胞に発育した。また、発育した胚盤胞を受胎牛に新鮮胚移植したところ、23頭中8頭が受胎し(受胎率34.8%)、これまでに5頭が分娩した。このうち2頭はそれぞれ生後24日目及び8日目に病死し、また3頭は死産であった。

## 目 的

黒毛和種雄牛の皮膚細胞をドナー細胞として、クローン胚を作成した。得られたクローン胚は新鮮胚移植し、受胎性についての調査を実施した。また、死産及び生後死亡した子牛は病理解剖を行い、原因究明に供した。

## 方 法

### 1. ドナー細胞

凍結保存した皮膚細胞を融解後、血清飢餓培養を行わず5～6日間培養し、細胞が単層のシートになった状態(約80%コンフルエント)で実験に供した。

### 2. レシピエント卵

食肉処理場由来の牛卵巣から未成熟卵子を採取し、18～20時間培養(38.5℃、5%CO<sub>2</sub>、95%空気下)後、0.1%ヒアルロンダーゼを含むM2液に移し、ボルテックスとピペッティング操作により卵丘細胞を除去した。

さらに実体顕微鏡下で、第1極体を放出し、かつ細胞の色調が均一な卵子のみを選抜し、レシピエント卵として用いた。

### 3. 除核

20%子牛血清(CS)加TCM199+サイトカラシンD(2.5 μg/ml)中で、選抜したレシピエント卵の第1極体を指標にマイクロマニピュレーターに取

り付けたガラス針で透明帯の20%程度を切開し、次に卵子の上からガラス針を押し下げ、第1極体とその周囲の細胞質を透明帯の切り口から押し出して行った。

### 4. 核移植・細胞融合・活性化処理

レシピエント卵の卵胞腔内にドナー細胞を挿入し、直流パルスで細胞融合を行った。融合条件は既報<sup>1)</sup>の成績をもとに120V/mm、25 μ秒×1回の条件で行った。融合後は直ちにサイトカラシンD(2.5 μg/ml)とシクロヘキシミド(10 μg/ml)で1時間、さらにシクロヘキシミド(10 μg/ml)で4時間活性化処理した。

なお、細胞融合にはZimmerman Cell Fusion Mediumを使用した。

### 5. 体外培養

活性化処理後、ウシ血清アルブミン(3 mg/ml)加CR1aaで36時間培養後、10%CS加CR1aaに移し、卵丘細胞との共培養を行い、胚盤胞への発生率を観察した。

### 6. クローン胚の移植

作出した胚盤胞を発情同期化した受胎牛(ホルスタイン種、交雑種、黒毛和種)に1胚ずつ移植し、受胎率を調査した。なお、妊娠鑑定は直腸検査により、最終発情日から30日前後に行った。

7. 死産及び生後死亡子牛の病理解剖

死産及び生後死亡した子牛は解剖後、動物衛生研究所疫学研究部病性鑑定室へホルマリン固定臓器(心、肝、腎、脾、肺、脳、脊髄、筋肉、胸腺、甲状腺、舌)を送付し、原因究明に供した。

結果及び考察

1. 体細胞クローン胚の体外発生

平成12、13年度に実施した体細胞クローン胚の発生成績を表1に示した。13年度は分割率74.7%、胚盤胞発生率23.1%で、有意差はみられないものの前年度より成績は向上した。また、受胎率も前年度より向上し34.8%であったが、通常の胚移植と比較するとあまり高い受胎率ではなかった。この原

因は発情同期化处理した受胚牛全頭に対し、移植を実施したためと思われる。つまり、核移植実施日にあわせて発情同期化处理したものの実際には移植予定の約3割の牛は発情日をコントロールすることができず、核移植実施日とは最高で±2日のズレがみられた。しかし、数少ない受胚牛を有効活用するために移植を実施したことから、低い受胎率となったものと推察された。

なお、12年度に移植・受胎した10頭のうち7頭に流産が発生したが、13年度に移植・受胎した8頭には流産の発生はみられなかった。この要因については、用いたドナー細胞の違いによるものかあるいは核移植手技の向上によるものか不明であるが、今後とも継続して調査を実施していきたい。

表1 体細胞クローン胚の体外発生と移植成績

年度	供試 個数	分割 数(%)	胚盤胞 発生数(%)	移植 頭数	受胎 頭数(%)	不明 頭数	流産 頭数	産子 数
12	951	693(72.9)	134(19.3)	36	10(27.8)	0	7	3
13	870	650(74.7)	150(23.1)	24	8(34.8)	1	0	5

2. 体細胞クローン牛の生産

平成12年度に移植・受胎した10頭のうち7頭に流産が発生したが、表2に示したとおり、3頭の体

細胞クローン牛が得られた。このうち、1頭は生後5日目に病死、1頭は生後直死したが、1頭の生存子牛が得られた。

表2 出生した体細胞クローン牛の概要(平成12年度移植分)

牛No.	1	2	3
出生年月日	H13. 7. 18	H13. 8. 9	H13. 12. 21
生時体重	41.3kg	40.0kg	39.2kg
出生後の状況	病死(5日目)	生後直死	生存
受胚牛胎齢	交雑種・未経産 273	交雑種・未経産 282	交雑種・経産 282
分娩の状況	誘起分娩、帝王切開	自然分娩、難産	誘起分娩、介助なし
主な組織所見	胸腺萎縮(退行性変化) 甲状腺低形成 大脳皮質に乏血性変化	腎臓に先天性の形成不全	

病死したNo1及び死産したNo2の母牛はいずれも交雑種未経産牛であり、破水から娩出まで長時間を要したことから、特に過大子の傾向がある体細胞クローン牛の受胚牛として未経産牛は適当でないと思われる。

次に、13年度についてはいずれも経産牛に移植したが、24頭中8頭が受胎し(受胎率34.8%、ただし1頭は妊否不明)、表3に示したとおり、これまでに5頭が分娩した。このうち2頭はそれぞれ生後24日目及び8日目に病死し、また3頭は死産で

あったが、No.6については特に異常はみられなかった。

表3 出生した体細胞クローン牛の概要（平成13年度移植分）

牛No.	4	5	6	7	8
出生年月日	H13. 12. 21	H14. 1. 15	H14. 1. 16	H14. 2. 8	H14. 2. 17
生時体重	73.4kg	41.0kg	26.7kg	46.6kg	47.8kg
出生後の状況	死産	病死(24日目)	死産	病死(8日目)	死産
受胎牛胎齢	ホル・経産 255	ホル・経産 279	黒毛和種・経産 280	交雑種・経産 276	交雑種・経産 257
分娩の状況	難産(尾位下胎向) 帝王切開	誘起分娩	誘起分娩	誘起分娩 難産	難産(尾位下胎向)
主な組織所見	水腫胎 骨格筋大小不同 甲状腺低形成	直接的な死因は 誤嚥性肺炎	著変なし	直接的な死因は 化膿性気管支肺炎	肝、脾、肺の結合 織增生(巨大胎子)

なお、分娩前に胎子の中手幅を超音波診断装置で測定することにより、胎子体重及び難産を予測することが可能で、過大子が予測される場合には誘起分娩等の処置をすることで、難産の予防処置が可能であるとの報告もあり、今後はこの点についても検討していきたい。

### 謝 辞

卵巣の採材に御協力いただいた佐世保食肉センター（株）及び佐世保市食肉衛生検査所並びに死産・生後死亡子牛の原因究明にご協力いただいた動物衛生研究所疫学研究部病性鑑定室の皆様には深謝いたします。

### 参考文献

- 1) 中里敏・井上哲郎・谷山敦・清松邦章：ウシ体細胞クローン胚の体外発生と移植成績，長崎県畜産試験場研究報告10，4-6（2001）
- 2) 小岩井農牧株式会社・社団法人家畜改良事業団：受精卵及び体細胞を用いたクローン牛生産のための核移植技術に関する研究—その2—，家畜受精卵移植技術研究組合報告書，25-47（2001）