

黒毛和種種雄牛候補に一次選抜された子牛からの 体細胞クローン牛生産手法の検討

長谷川清寿 佐々木恵美 安部亜津子 高仁敏光

要約 体細胞クローン産子を種雄牛検定に活用することを目的に、核移植ドナーとしての耳真皮由来体細胞の継代回数が核移植成績に及ぼす影響を調べ、黒毛和種種雄牛候補の一次選抜を経た5か月齢の雄子牛から検定用クローン牛を生産する手法を検討した。体細胞の継代回数の影響調査には、特定成雄牛の耳から採取した真皮組織片の真皮部分を細切して、分離培養した体細胞を核移植に用いた。その結果、ドナー細胞継代回数別の移植可能胚の発生率は、1回が47.6%(10/21)、6回が36.2%(37/102)、11回が26.9%(14/52)であった。実際に、5か月齢の雄子牛2頭から耳刺器で採取した真皮組織片から分離培養した細胞を1回の継代培養後に核移植のドナーとして用いた結果、ドナーロット別の移植可能胚への発生率は、58.0%(29/54)および73.3%(22/3084)、受胎牛への移植での胎齢40日の生存胎子率が25.0%(3/12)および50.0%(4/8)であり、2頭のクローン産子の生産が可能であった。クローン産子の生時体重(52.8 および 44.4kg)は、ドナー雄子牛(35.8kg)と比べて大きい傾向であった。その後20週齢までの調査期間中は順調に発育し、体重、体高ともに黒毛和種の発育標準値の上限を上回って推移した。また、体重測定値については、クローン間で概ね相似して推移し、4から20週齢時までの期間中ではドナー雄子牛と比べて約30kg大きい値で推移した。20週齢時までの平均日増体量(kg/day)は、ドナー雄子牛が1.07であったのに対して、クローン産子が1.27および1.35であった。体高測定値は、クローン産子2頭のうちの1頭がドナー雄子牛と概ね相似して推移したが、別の1頭のクローン産子は約5cm高い値で推移した。以上のことから、5か月齢の雄子牛の耳から分離培養した継代回数1回のドナー細胞を体細胞核移植に用いた場合、作出した体細胞クローン胚から産子が生産可能であることが明らかとなった。そして、この手法が体細胞クローン検定牛の生産方法として利用できる可能性が示唆された。

キーワード： 牛 体細胞核移植 クローン検定 線維芽細胞 継代培養

島根県立畜産試験場研究報告第37号, 1-5, 2004

近年の生殖工学およびそれに関連する研究の進展はめざましく、核移植による動物のクローニングもその一つである。最近、家畜繁殖におけるクローン技術の開発についての報告は多い。そして特に、体細胞クローン羊“ドリー”の誕生¹⁾以来、牛²⁾をはじめ、マウス³⁾、山羊⁴⁾、豚⁵⁾など様々な動物種において体細胞クローン個体が作出されていることはよく知られている。そのなかで、生産効率の低さが指摘されており、解決を要する課題も多岐にわたっている^{6,7)}。また、それら繁殖技術としての不安定要素は、個体発生の過程あるいは産子の正常性および斉一性などの多角的調査⁸⁾から得られる情報をもとに、核移植プロトコルを詳細にチェックすることで、今後解決されなければならない。一方、現在の国内での牛体細胞クローン研究については、都道府県レベル⁹⁻¹⁵⁾ではコマーシャル集団の生産技術として、あるいは育種集団への応用の位置づけで研究開発が進められており、将来の実用化技術としての期待感もある。

古川^{16,17)}は、肉用種雄牛の造成を目的としたクロー

ン技術の活用方向について、改良効率の点から言及している。すなわち、種雄牛造成においては選抜の正確度が重要であり従来の後代牛を用いた産肉能力検定に加えて、種雄牛候補のクローン牛の産肉検定(模擬本牛検定)を追加することによって検定効率が向上するとしている。また、遺伝率0.4程度とされる経済形質(例：脂肪交雑)において、クローン検定2頭分の選抜の正確度を算出した場合、その正確度は後代検定10頭分に相当するという。黒毛和種種雄牛候補の一次選抜における本県の現状は、(1)血統、表現形質などのフィールド情報に育種価情報を加味して農家繋養牛を選抜する、あるいは、(2)優良遺伝形質を有することが判明した雌牛由来の胚の受胎牛への移植によって生産した複数の雄子牛を比較選抜することで行っているが、体細胞クローン牛による産肉検定を追補すれば、さらなる検定精度の向上が期待できる。

そこで今回、体細胞クローン産子を種雄牛検定に活用することを目的に、まず、核移植ドナーとしての耳真

皮膚由来体細胞の継代回数が核移植成績に及ぼす影響を調べた(実験 1)。そして、黒毛和種雄牛候補の一次選抜を経た 5 か月齢の雄子牛から体細胞を採取するとともに、最小限の継代培養で核移植に供試して、検定用クローン牛を生産する手法を検討した(実験 2)。

材料および方法

実験1

体細胞の分離は、と殺成雄牛(年齢:5 歳)の耳から採取した皮膚組織片の真皮部分を細切して、10%牛胎子血清(FBS)を添加したダルベッコ変法イーグル培地(D-MEM;Sigma)内で培養した。組織片から分離した細胞(図 1)は、未継代または 5 あるいは 10 回継代後に凍結保存した。融解した保存細胞は、10%FBS 加 D-MEM 内で 3 日間、さらに 0.5%FBS 加 D-MEM 内で 5 日間培養し、核移植前に 0.5%FBS 加 PBS(-)中に浮遊させてドナー細胞(継代 1 回:p1、6 回:p6、11 回:p11)とした。レシピエント卵子は、摘出卵巣から採取後 19 ~ 20 時間成熟培養を行い、第 1 極体およびその周辺細胞質を透明体外に押出処理した卵子とした。核移植卵は、Zimmerman's Cell Fusion Medium¹⁸⁾中で直流パルス(30V/150 μ m、10 μ sec × 1 回)を通电後、2.5 μ g/ml Cytochalasin D(Sigma)および 10 μ g/ml Cycloheximide(Sigma)で 1時間、さらに Cycloheximide

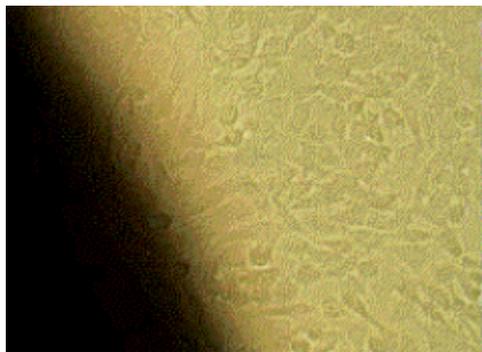


図 1 雄子牛の耳真皮組織からの体細胞の分離培養

で 4 時間の処理を行い、融合 活性化¹⁹⁾した。融合を確認した核移植卵は CR1aa を基礎培地とした牛卵丘細胞との共培養系²⁰⁻²¹⁾で発生培養した。

実験 2

直接検定候補に指定された雄子牛 2 頭(5 か月齢)から耳刻器で採取した組織片は、実験 1 と同様な方法で培養し、ドナー細胞(p1)を調製した。レシピエント卵子は特定個体の卵巣から採取、核移植後の発生培養液は、5 % O₂、5 % CO₂、90 % N₂ の気相条件下の改変 TCM-199(IVD-101 ;Institute of Functional Peptide)²²⁾を用い、移植可能胚は Day7(発情日:Day0)の機能性黄体を有する交雑種受胎雌牛²³⁾に 1 または 2 胚を移植した。胎子の生存性は、胎齢 40 日目に超音波画像診断装置(Aloka SSD-900)を用い、胎子およびその付属物の確認ならびに胎子心拍の有無によって判定した。娩出子の DNA 型は、末梢血から調製した DNA を用いて、マイクロサテライト DNA (MS-DNA)多型領域²⁴⁾を解析した。また、表現型は、生時から 2 週ごとに発育値(体重および体高)を測定して、それらの経時的推移を比較した。受胎牛および娩出子の飼養管理は、既報²⁵⁾に基づいて行った。

成績

実験 1

各継代回数別(p1、p6、p11)の細胞融合率は 87.5%(21/24)、79.7%(102/128)および 70.3%(52/74)、卵割率は 81.0%(17/21)、77.5%(79/102)および 75.0%(39/52)、移植可能胚への発生率は 47.6%(10/21)、36.2%(37/102)および 26.9%(14/52)であった。融合率、卵割率および発生率において、継代回数間で有意差は認められなかったが、発生率はドナー細胞の継代回数が多くなるに伴い低率となる傾向であった(表 1)。

実験 2

2頭の直接検定候補雄子牛から採取した細胞を核移植のドナーとして用いた結果、ドナーロット別の移植可能胚への発生率は、58.0%(29/54) および 73.3%(22/3084)であった。発生した核移植胚を受胎牛へ移植

表 1 耳真皮由来体細胞の継代回数別の核移植成績

区分	実験回数	供試数	融合数(%)	卵割数(%)	発生数(%)
p1	2	24	21 (87.5)	17 (81.0)	10 (47.6)
p6	5	128	102 (79.7)	79 (77.5)	37 (36.2)
p11	3	74	52 (70.3)	39 (75.0)	14 (26.9)

区分: ドナー細胞の継代回数による (p1 = 継代 1 回で核移植に供試)

発生数 核移植後 7 日目までに発生した胚(CM ~ BL)

表 2 直接検定候補雄子牛由来の体細胞を用いた核移植および受胎牛への移植成績

直接検定 候補雄牛	体細胞核移植				受胎牛への移植		
	供試数	融合数(%)	卵割数(%)	発生数(%)	移植胚数	胎子数(%)	生産数(%)
富藤	66	54 (81.8)	50 (92.6)	29 (58.0)	12	3 (25.0)	0 (0)
平尋勝5	30	30 (100)	28 (93.3)	22 (73.3)	8	4 (50.0)	2 (50.0)
計	96	84 (87.5)	78 (92.8)	51 (60.7)	20	7 (35.0)	2 (28.5)

発生数 核移植後7日目までに発生した胚(CM~BL)発生培養はIVD-101(改変TCM199)を使用
 移植胚数:受胎牛1頭あたり1~2胚移植
 胎子数 胎齢40日時点での超音波画像によって心拍確認等によって生存を診断



図 2 5か月齢(種雄牛直接検定候補に一次選抜)時に耳から体細胞を採取した黒毛和種雄牛「平尋勝5号」(左)と2頭の体細胞クローン子牛(右)

した結果、胎齢 40 日時点での生存胎子率が 25.0% (3/12)および 50.0%(4/8)であった。2つのドナーロットで胎子の 71.4%(5/7)が胎齢 40 日以上経過した後に死滅したが、2 頭の受胎牛が子牛を自然分娩した(表 2)。娩出時の胎齢は 281 および 289 日であり、ドナー細胞を採取した雄子牛「平尋勝 5」の 279 日と比べて在胎期間

が延長した。2 頭の娩出子の MS-DNA 型は、それぞれドナー雄子牛と同一であり、クローン個体であることを確認した。クローン産子(No.1 および No.2 :図 2)の生時体重(52.8 および 44.4kg)は、ドナー雄子牛(35.8kg)と比べて大きい傾向であった。その後 20 週齢まで、体重、体高ともに黒毛和種牛の標準値²⁶⁾の上限を上回って推移した。また、体重測定値については、クローン産子間で概ね相似して推移し、それらの測定値は 4 から 20 週齢時までの期間中ではドナー雄子牛と比べて約 30kg 大きい値で推移した。20 週齢時での平均日増体量(kg/day)は、ドナー雄子牛が 1.07 であったのに対し、クローン産子 No.1 が 1.27、No.2 が 1.35 であった。体高測定値は、クローン No.2 がドナー雄子牛と概ね相似して推移したが、クローン No.1 の 2 週齢以後の測定値はドナー雄子牛と比較して約 5cm 高い値で推移した(図 3)。

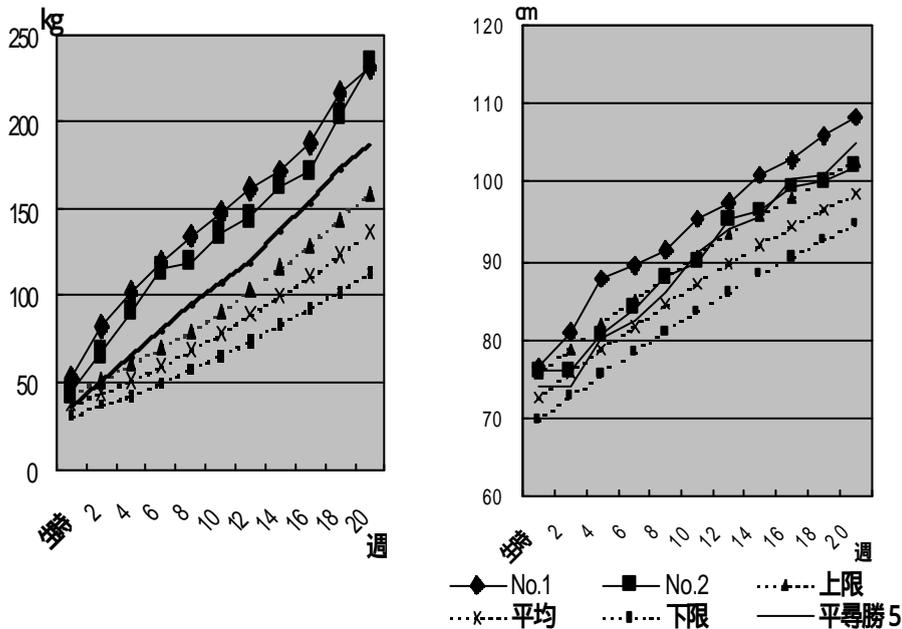


図 3 種雄牛候補に一次選抜された雄子牛およびその体細胞クローン牛の発育値の推移

同一飼養管理下で、生後から 2 週間間隔で体重(左図)および体高(右図)を測定。ただし哺育方法は自然哺乳。図中、点線は黒毛和種正常発育曲線(全国和牛登録協会,1989)。

考 察

牛群の経済的能力(肉質、肉量など)を改良して、畜産経営の安定化を図るために、最も即効性が高いと思われる方法は、優れた能力を持つ種雄牛を効率よく比較的短期間に連続して選抜し、そして早い段階で農家の信頼を得て、利用してもらうことである。そのなかで、体細胞クローン技術を種雄牛造成に応用できる可能性もでてきた。その利用目的として、(1)能力検定済みの種雄牛の複製、(2)検定精度向上のためのクローン検定などが想定され^{16,17)}、最近では実際に黒毛和種種雄牛造成にクローン検定を取り入れてシステム化した例(<http://www.agri.pref.hokkaido.jp/sintoku/beef/sigoto/kadai.html>)もみられる。

本県においては、育種情報等から選定した黒毛和種雌牛に過排卵処理を行うとともに特定種雄牛を交配して胚を採取し、産子からの種雄牛造成を継続的に試みている。その後の直接検定は、5 か月齢の雄子牛を発育、体型等の表現型で選抜して行われる。しかし、多くの雄子牛の表現型が一定の基準・条件に満たず、直接検定牛として選定されないのが現状である。そこで、我々は、種雄牛候補として一次選抜評価を受けた雄子牛の耳から体細胞を採取してクローン牛を生産し、それらを肥育検定(模擬本牛検定)するモデル¹⁶⁾をアレンジして実証することで、種雄牛検定自体の精度向上を目指した。

雄牛由来ドナー核として用いた体細胞は、今回、子牛では比較的簡単に採取できる耳組織片由来とした。耳の真皮組織はその殆どが膠原線維²⁷⁾であるため、組織片から分離した細胞は線維芽(または線維芽様)細胞と考えられる。Kubota ら²⁸⁾は、ドナー核として用いる線維芽細胞は継代回数を重ねるほど核移植後の発生成績が良好となり、胚移植後の流産率は低下すると報告している。我々の成績では、むしろ継代回数を重ねるに従い発生成績は低下する傾向であった。胚移植については、今回は継代回数 1 回のドナー細胞由来の核移植胚のみの移植成績しか得られていないため、継代回数別の比較はできないが、胎齢 60 日までの流産率は約 60% であり、Galli らの体外受精胚との比較での指摘²⁹⁾と同様に高率であった。さらに、Lucus ら³⁰⁾ および Kato ら⁷⁾は、ドナー細胞のロットによって生産率が変動することを示しているが、本実験でも例数が少ないながら、2 つのロット間で生産率に差異(0% vs 50%)が生じた。組織片採取後早期にクローン産子を生産して検定結果を早く得るためには、細胞の継代回数は可能な限り少なくする必要があると考えられるが、ドナー細胞の

処理方法の改善³¹⁾を含め、体細胞クローン産子の生産性の観点から再検討する余地が残されている。

今回生産したクローン産子は、それらの生時体重がドナー雄子牛のそれと比べて 20 ~ 50 %大きく、過大子症候群(Large Offspring Syndrome : LOS)^{32,33)}が疑われた。ただし、クローン産子 2 頭は、出生直後から順調に発育したこと、我々がドナー雄子牛と同時期に生産した全兄弟 2 頭の生時体重が 46.2 および 44.6kg であったことなどから、「過大子」とするより、むしろ「正常子」の範疇に入るとも考えられた。体細胞核移植によって生産された産子について、過大子の発生に関する報告は多く、様々な原因が指摘されているが、確定的な要因は詳細にされていない。我々が生産したクローン産子が LOS か否かについては断定できないが、黒毛和種雄子牛²⁶⁾としては比較的大きいと判断されるため、ドナー細胞の処理法、発育培養法などの核移植プロトコルを改善する必要があるかもしれない。一方、クローン産子の初期発育を生時から 20 週齢時まで調べた結果、クローン間では体重および体高発育値は概ね相似して推移した。ドナーと比較した場合、体重では相似性が認められず、4 週齢以後では約 30kg 大きい値で推移した。同様に、体高では、クローン No.1 ではドナーとの相似性が認められず、No.2 では相似性が認められた。一般に、哺乳子牛の体重については生後の環境要因、体高については産子の遺伝的素因の影響が大きいとされている³⁴⁾。したがって、初期発育に関しては、クローン No.2 はドナーとの相似性が高いと考えられるが、No.1 は少なくとも相似しているとはいえない。産肉検定への利用を目的とした体細胞クローンでは、坂下ら¹¹⁾の報告でも明らかのように、正常性とともに相似性を有することが極めて重要なポイントである。この点については、今後さらに、他のドナー牛由来の体細胞からもクローン産子を生産していくとともに、実際の産肉検定に関わる発育値、枝肉成績などの表現形質にターゲットを絞った調査を継続し、生産手法を段階的に見直していく必要がある。

本試験によって、5 か月齢の雄子牛の耳から分離培養した継代回数 1 回のドナー細胞を体細胞核移植に用いた場合、作出した体細胞クローン胚から産子が生産可能であることが明らかとなった。このことによって、今回我々が検討した手法が、クローン検定牛の生産方法として利用できる可能性が示された。しかしながら、体細胞核移植胚からの子牛生産性、産子の正常性および斉一性が課題として残されており、今後は、移植後の胚損耗、LOS の発生などの非遺伝的要因の除去が重

要なポイントになる³⁵⁾と思われる。将来にわたって効率的な育種システムの構築を図るためには、核移植技術の高位安定化とクローン検定の実証が必須であり、さらには、種雄牛検定の精度向上に係るコスト¹⁵⁾も提示していく必要がある。

謝 辞

本試験の実施にあたり、終始ご助言、ご指導いただいた独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構畜産草地研究所生殖細胞研究室の高橋清也、赤木悟史の両氏に感謝の意を表します。

参考文献

- 1)Wilmot I.,etal. *Nature*,385:810-813.1997.
- 2)Kato Y.,etal. *Science*,282:2095-2098.1998.
- 3)Wakayama T.,et al. *Nature*,394:369-374.1998.
- 4)Baguishi A.,et al. *Nature Biotechnology*,17:456-461.1999.
- 5)Ohnishi A.et al. *Science*,289:1188-1190.2000.
- 6)角田幸雄実験医学,19:2102-2106.2001.
- 7)Kato Y.,etal. *Journal of ReproductionandFertility*,120:231-237,2000.
- 8)広岡博之日本畜産学会報,71:19-25.2000.
- 9)Shiga K.,etal.*Theriogenoligy*,52:527-535,1999.
- 10)上村佳代ら奈良県畜産試験場研究報告,27:16-19.2000.
- 11)坂下邦仁ら鹿児島県畜産試験場研究報告,36:29-33.2002.
- 12)森浩一郎ら鹿児島県畜産試験場研究報告,36:34-40.2002.
- 13)浜田由佳子ら国際シンポジウム「クローン家畜とその安全性」ポスター成果選,15-26.クローン国際シンポジウム企画委員会つくば.2003.
- 14)長谷川清寿ら国際シンポジウム「クローン家畜とその安全性」ポスター成果選,35-42.クローン国際シンポジウム企画委員会つくば.2003.
- 15)野口龍生ら国際シンポジウム「クローン家畜とその安全性」ポスター成果選,43-48.クローン国際シンポジウム企画委員会つくば.2003.
- 16)古川力東日本受精卵移植技術研究会報,15 :29-44.1999.
- 17)古川力.日本胚移植学雑誌,23:88-94.2001.
- 18)WolfeB.A., KraemerD.C. *Theriogenology*,31:5-15.1992.
- 19)Takahashi S.,et al. *Cloned Animal and Placentation*.30-35.Yokendo.Tokyo.2000.
- 20)Akagi S.,etal. *AnimalScienceJournal*,73:465-469.2002.
- 21)長谷川清寿ら.日本胚移植学雑誌,23:61-66.2001.
- 22)Hoshi H. *Theriogenology*,59:675-685.2003.
- 23)安部茂樹ら島根県立畜産試験場研究報告,27:10-14.1992.
- 24)Yazawa S.,et al. *AnimalScience andTechnology*,68:1166-1169.1997.
- 25)長谷川清寿ら.島根県立畜産試験場研究報告,28:6-10.1993.
- 26)全国和牛登録協会黒毛和種正常発育曲線.1-12.全国和牛登録協会京都.1989.
- 27)伊藤隆組織学.206-213.南山堂東京.1984.
- 28)Kubota C.,et al. *Proceedings of the National Academy ofSciencesoftheUSA*,97:990-995.2000.
- 29)GalliC.,et al. *Cloning*,1:161-170.1999.
- 30)Lucus-HahnA.,et al.*Theriogenoligy*,57:433,2000.
- 31)Gibbons J.,et al.*Biology of Reproduction*,66:895-900,2002.
- 32)Young L.E.Y.,et al.*Review of Reproduction*,3:155-163,1998.
- 33)YoungL.E., FairburnH.R. *Theriogenoligy*,53:627-648,2000.
- 34)農林水産技術会議事務局.日本飼養標準・肉用牛.50-51.中央畜産会東京.1987.
- 35)GalliC.,et al. *Theriogenoligy*,59:599-616,2003.