

# クローン牛生産技術の確立

## (3) ボルテックスによる裸化操作後の除核率の改善

比嘉直志 山城存 千葉好夫

### I 要 約

効率的にクローン胚を作出するため、除核率の向上を目的としたピペッティングとボルテックスの裸化操作を比較するとともに、ボルテックス処理液の浸透圧の違いが第一極体の移動に及ぼす影響、極体放出前裸化による極体移動の抑制効果を検討した結果は下記のとおりである。

1. ピペッティングおよびボルテックスによる裸化操作後の除核率は、それぞれ、74.3%および60.4%でボルテックスで有意に低下した。
2. ボルテックス処理液の浸透圧が260mOsm/lの低張および300mOsm/lの等張では、極体と卵細胞核の位置関係は同様な配置割合を示したが、350mOsm/lの高張では、極体と卵細胞核が離れる割合が増加する傾向にあった。
3. 成熟培養14時間目と18時間目の卵子のボルテックスによる裸化操作後の除核率は、それぞれ、92.1%および65.6%と有意な差が認められ、14時間目裸化で著しく高くなった。
4. 成熟培養14時間目と18時間目の卵子のボルテックスによる裸化操作では、その後の成熟率、融合率および胚発生率に有意な差は認められなかった。
5. 最終的な胚生産率は、成熟培養14時間目裸化で17.4%、18時間目裸化で13.3%であった。

以上のことから、成熟培養14時間目の卵子のボルテックスによる裸化は、18時間目の裸化に比較して、除核率の向上をもたらすことでクローン胚の作製効率が高まる傾向にある。

### II 結 言

クローン牛を生産する核移植技術は、除核を施した第2減数分裂中期の卵母細胞をレシピエント細胞として、ドナー細胞と電気的に融合させることでクローン胚を作出している<sup>1~3)</sup>。レシピエントとして用いる除核卵子の作製は、未成熟卵子を18~22時間体外で成熟させた後、卵子を取り巻く卵丘細胞を除去する操作（裸化操作）を行なう。その後、放出されている第一極体付近の卵細胞質を顕微外科的に除去することでレシピエントを作製している。そのため、除核の成功には、第一極体と卵細胞核が接していることが必要である。牛での除核の成功率（除核率）は、50~80%<sup>4~7)</sup>であり、その効率を高めることは、クローン胚の作出効率の向上につながるものと期待できる。Edwinら<sup>7)</sup>の試験では、裸化操作法の違いで除核率に差があり、ピペッティング裸化の88.2%に対してボルテックス裸化では60.4%と有意な差が認められている。また、核の蛍光染色の観察では、ボルテックスによって極体の移動が生じ、除核率の低下を招くことを示している。そのため、除核前の裸化操作は、ピペッティング裸化が優れているものと考えられる。しかし、一度に多数の卵子を処理できるボルテックス裸化は、数個の卵子をピペッティングする手法に比べ裸化操作が効率的で、完全裸化するまでの操作時間が格段に短く、操作卵子数が増えるほど有効になると考えられる。

そこで本研究では、ボルテックス裸化での除核率を改善するための試験を実施した。まず、ピペッティング裸化とボルテックス裸化の除核率にどれくらいの差があるのか調べた。次に、ボルテックス裸化時の浸透圧の違いが極体移動に与える影響を調べるため、各浸透圧でボルテックス裸化した後、卵子の極体と卵細胞核の位置関係を調べた。次に、第一極体の移動を完全に抑止するため、極体放出以前に裸化操作を行い、その後の除核率の改善や早期の裸化操作が胚発生に与える影響を検討した。

### Ⅲ 材料および方法

#### 1. 試験期間および場所

試験期間は2003年7月から2004年1月、沖縄県畜産試験場で実施した。

#### 2. 供試卵子の準備

食肉処理場屠畜牛由来の卵巣より採取した卵子の中から、卵丘細胞が2層以上付着した卵子を選別して成熟培養に供した。成熟培養は、5%子牛血清加Tissue Culture Medium199培地 (TCM199培地) にFSHを0.02AU/ml, エストラジオールを1 $\mu$ g/ml, ピルビン酸を1mMおよびシステアミンを100 $\mu$ M添加して38.5 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub>, 95%空気の気相下で培養し、以下の試験に供試した。

#### 3. 試験方法

##### 1) 試験1: 裸化操作法の違いと除核率

ピペティングまたはボルテックスによる裸化操作後の除核率を比較するため、成熟培養18時間目の卵子を用いて試験を実施した。ピペティングによる裸化では、卵子を0.5%ヒアルロニダーゼ加ダルベッコリン酸緩衝液 (0.5%HYA加PBS) に5分間静置し、その後5%子牛血清加TCM199培地に移して完全裸化するまでピペティングを行なった。ボルテックスによる裸化では、0.5%HYA加PBSを入れたチューブに卵子を1分間静置し、その後7分間ボルテックスでミキシングすることで卵丘細胞を除去した。除核操作は、成熟培養開始から19時間目で行なった。除核の方法は、カッティングニードルで第一極体付近の透明帯を切開した。次に、カッティングニードルで卵子を上から押さえ込み、透明帯の切開部より細胞質の20%程度を第一極体とともに押し出して除核を行なった。除去された細胞質を10 $\mu$ g/mlヘキスト33342加PBSで染色 (ヘキスト染色) し、蛍光顕微鏡で核の有無を確認することで除核率を調査した。

##### 2) 試験2: 浸透圧の違いがボルテックス裸化時の極体移動に及ぼす影響

浸透圧が300mOsm/lの0.5%HYA加PBSを等張液として、クエン酸ナトリウムおよび超純水を用いて、260mOsm/lの低張および350mOsm/lの高張の0.5%HYA加PBSを作製した。そして、各浸透圧で成熟培養18時間目の卵子をボルテックス裸化し、その後ヘキスト染色を行なって第一極体と卵細胞核の位置関係を調査した。また、核の位置関係は、除核成功の可能性が高い順に分類した。すなわち、極体を12時の方向として卵細胞核が図1に示すP1~P4のどの位置にあるかで分類した。

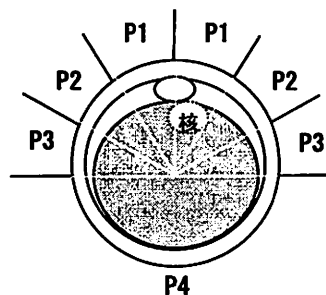


図1 極体と卵細胞核の位置関係

##### 3) 試験3: 極体放出以前の裸化操作がその後の成熟, 除核, 融合および胚発生に及ぼす影響

極体放出以前の卵子として、成熟培養14時間目の卵子を用いてボルテックス裸化し、培養を継続した。成熟培養19時間目に極体を放出した卵子数を調査して成熟率をもとめ、除核を行なった。裸化時点で一部の卵子が極体を放出していたため、裸化時点の成熟率も併せて調査した。除核および除核確認操作は試験1に準じた。対照として、成熟培養18時間目の卵子を用いて同様の操作を施した。除核が確認された卵子には、核移植の操作法<sup>1)</sup>にしたがって核移植を施した。ドナー細胞は、2代目で凍結保存された雄牛の耳由来線維芽細胞を継代培養し、3~6代目で供試した。細胞融合操作は、成熟培養開始23~25時間目で実施し、融合卵子は5 $\mu$ Mカルシウムイオノフォア処理後、10 $\mu$ g/mlシクロヘキシミド処理で5時間の卵子活性化を行なった。発生培養は、IVD101培地 (機能性ペプチド研究所) を用いて、38.5 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub>, 95%N<sub>2</sub>の気相下で発生培養を行なった。胚の発生は、融合2日目に

分割率，7日目に後期桑実胚以降に胚発生した胚の発生率を調査した。また，胚の生産率として，総供試卵子数当たりの後期桑実胚以降の卵子数を調査した。なお，有意差検定は $\chi^2$ 検定を用いた。

#### IV 結果および考察

##### 1. 試験1

裸化操作法の違いによる除核率を表1に示した。ピペッティングによる裸化後の除核率は，74.3%でボルテックスによる裸化後の除核率は，60.4%と有意な差が認められた。

裸化操作法	供試卵子数	除核成功数	除核率
ピペッティング	101	75	74.3*
ボルテックス	96	58	60.4

注) \*: P<0.05

##### 2. 試験2

各浸透圧で裸化した卵子の極体と卵細胞核の位置関係を表2に示した。P1に位置する割合は，260，300および350mOsm/lでそれぞれ63.8，65.5および54.2%となり，350mOsm/l液で低くなる傾向を示した。逆にP3およびP4に位置する割合は，350mOsm/l液で高くなる傾向を示した。

浸透圧 (mOsm/l)	P1	P2	P3	P4	合計
260	63.8(37)	20.7(12)	10.3(6)	5.2(3)	100(58)
300	65.5(40)	23.0(14)	8.2(5)	3.3(2)	100(61)
350	54.2(26)	20.8(10)	12.5(6)	12.5(6)	100(48)

注) ( )内は，卵子数。

##### 3. 試験3

成熟培養14時間目および18時間目に裸化した時間の違いが成熟率および除核率に及ぼす影響を表3に，融合率，胚発生率および生産率に及ぼす影響を表4に示した。成熟培養14時間目での裸化直後の成熟率は9.8%であったが，その後，69.1%となって18時間目裸化の73.2%と有意な差は認められなかった。また，除核率は，92.1%と65.6%となって14時間目裸化で有意に高くなった。融合率および胚発生率には，有意な差は認められなかったが，後期桑実胚以降の生産率は14時間目または18時間目裸化でそれぞれ17.4%および13.3%と14時間目裸化で高まる傾向にあった。

裸化時間	成熟率①	成熟率②	除核率
14時間	9.8(28/285)	69.1(197/285)	92.1(174/189)**
18時間	—	73.2(218/298)	65.6(137/209)

注1) \*\*: P<0.01

2) 成熟率①は14時間目裸化直後の成熟率，成熟率②は除核直前の成熟率。

3) ( )内は，供試卵子数当たりの成熟数，除核数。

表4 裸化時間の違いが融合および胚発生に及ぼす影響

(%、個)

裸化時間	融合率	分割率	後期桑実胚～胚盤胞率	胚盤胞率	生産率
14時間	75.9(123/162)	76.2(93/122)	37.7(46/122)	13.1(16/122)	17.4(46/264)
18時間	76.3(100/131)	76.8(73/95)	38.9(37/95)	15.8(15/95)	13.3(37/278)

注1) ( )内は、供試卵子数当たりの融合数、分割数および後期桑実胚～胚盤胞数。

2) 生産率の供試卵子数は、成熟培養供試数から操作中に除去した供試卵子を除いた数。

今回、クローン胚の作出過程における作業性および生産効率を高めるため、ボルテックスでの除核率を改善する試みを行なった。ピペッティングおよびボルテックス後の除核率は、Edwinら<sup>7)</sup>の報告と同様に、ボルテックス後の除核率は低く、ボルテックスの操作で、極体の移動が生じていることを支持する結果となった。このことから、試験2では低浸透圧下で卵細胞質を膨張させ囲卵腔を狭くすることで極体の移動を抑止する試験を試みたが、等張の300mOsm/lと低張の260mOsm/lでは、除核の成功する可能性が高いP1に位置する卵子割合はほぼ同じであり、効果の差は認められなかった。このことは、低浸透圧下では十分な細胞質膨張が起らなかったか、または、起こったとしてもボルテックスが強く、極体の移動が生じたものと思われ、低浸透圧処理することで除核率を改善できる可能性はないと思われた。また、高浸透圧の350mOsm/lでは、P1に位置する割合がほかに比べ低い傾向を示し、また、除核成功の可能性がほとんどないP3～P4が高くなる傾向を示したことから、卵細胞質の収縮による囲卵腔の拡大で、極体が移動しやすくなったと考えられた。よって、裸化操作に用いるボルテックス処理液は、等張液もしくは低張液に調整することが望ましいと思われた。試験3では、極体放出前に裸化操作を行なうことで、極体の移動抑止を試みた。その結果、極体放出前とした14時間目裸化時で9.8%の卵子が極体を放出していたものの、その後の除核率は92.1%と、18時間目裸化の65.6%に比べ著しい改善効果があった。また、裸化時間の違いで成熟率、融合率およびその後の胚発生率に有意な差は認められなかった。これらのことから、最終的な胚生産率が著しく高くなると考えられたが、実際には14時間目裸化で17.4%、18時間目裸化で13.3%とわずかな改善の差しかみられなかった。これは、除核に引き続く融合率および初期分割率が76%前後であったことから、大きな改善効果は得られなかった。胚生産率を高めるためには、これらの効率も同時に向上させる必要がある。融合率の向上は、ドナー核の導入効率を高めることであるが、その有効な手法として、ドナー核を直接レシピエント卵子に注入する顕微注入法<sup>8)</sup>もあり、細胞融合法に比べ作業時間も大幅に短縮でき、核の導入効率も高いことから今後の検討課題の一つとしたい。また、体外成熟の間の卵丘細胞の付着は、卵子のエネルギー代謝や体外受精後の胚発生に有用であることが知られており<sup>9,10)</sup>、卵丘細胞の早期除去は、細胞質成熟に少なからず影響を与えているものと考えられる。今回対照とした裸化時間が18時間目では、発生率に有意な差は認められなかったが、今後は、さらに成熟培養を22時間目まで延長して裸化するなど、早期裸化操作の影響を検討する必要があると思われる。

## V 引 用 文 献

- 1) 社団法人畜産技術協会, 1999, 牛の核移植マニュアル, 15-30
- 2) 比嘉直志・山城存・千葉好夫, 2000, クローン牛生産技術の確立(1)体細胞クローン胚の作出における融合条件の検討, 沖縄畜試研報, 38, 7-9
- 3) 比嘉直志・山城存・千葉好夫, 2002, クローン牛生産技術の確立(2)体細胞クローン牛の生産, 沖縄畜試研報, 40, 5-10
- 4) Liu J.L., Wang M.K., Sun Q.Y., Xu Z. and Chen D.Y., 2000, Effect of telophase enucleation on bovine somatic nuclear transfer, *theriogenology*, 54, 989-998
- 5) Robl J.M. and Stice S.L., 1989, Prospects for the commercial cloning of animals by nuclear transplantation, *theriogenology*, 31, 75-84
- 6) Mohamed Nour.M.S. and Takahashi Y., 1999, Preparation of young preactivated oocytes with high enucleation efficiency for bovine nuclear transfer, *theriogenology*, 51, 661-666

- 
- 7) Edwin C. A., Mario A. M., Osamu D. and Takahashi Y., 2001, Factors affecting enucleation rates of bovine and porcine oocytes after removal of cumulus cells by vortexing, *J. Reprod. Dev.*, 47, 365-371
- 8) Akira O., Masaki I., Tomiji A., Satoshi M., Kumiko T., Takashi A., Hirohumi H. and Anthony C. F. Perry., 2000, Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei, *Science*, 289, 1188-1190
- 9) Chain R. C., Niwa K. and Sirad M. A., 1994, Effect of cumulus cells on male pronuclear formation and subsequent early development of bovine oocytes in vitro, *theriogenology*, 41, 1499-1508
- 10) D. Riegr. And N. M. Loskutoff., 1994, Changes in the metabolism of glucose, pyruvate, glutamine and glycine during maturation of cattle in vitro, *J. Reprod. fertil*, 100, 257- 262
- 

研究補助：宮城広明，下里安志