

学 位 論 文 題 名

Multiplication of porcine and bovine embryonic cells using various micromanipulative procedures

（種々の顕微操作を施した豚および牛の胚性細胞の増殖性に関する研究）

学位論文内容の要旨

高泌乳能力を有する乳牛あるいは優れた肉質を誇る肉畜個体の産子を一度に多数生産させること（クローニング家畜生産）ができれば、畜産経営にもたらす経済的メリットは非常に大きい。また、一卵性の多子を栄養学、行動学および遺伝学などの研究に用いれば、遺伝的要因による差異を排除することができるため、少ない個体数で正確な実験結果を得られる有益性がある。しかしながら、家畜初期胚を体外で操作するための基礎的研究は未だ満足すべき水準に達しておらず、解決すべき多くの問題が山積している。そこで本研究では、効果的なクローン家畜生産技術を確立することを目的として、種々の顕微操作を施した豚および牛胚の割球の増殖性を体外培養ならびに生体内移植を通じて検討し、下記の知見を得た。

豚の初期胚盤胞と8細胞初期胚の切断2分離後の発生を体外培養で調べたところ、初期胚盤胞の細胞数が有意に多く、胚の直径も大きかった（ $p < 0.05$ ）。また、割球融合胚（ $2/4 + 2/4$ 、 $1/8 + 1/8$ 、 $2/8 + 2/8$ ）を体外培養することによって正常な細胞数を有する胚盤胞が得られた。豚の単離割球の各々が産子に発生できる能力を有していれば、一卵性の多子生産が可能となる。しかし、豚においては単離割球の移植による産子は生産されておらず、割球の増殖を促すための技術開発が必要である。そこで細胞外基質および細胞成長因子を培養液に添加することによって、割球増殖促進効果を検討した結果、 $1/4$ 、 $1/8$ 、および $1/16$ 割球を高率に胚盤胞にまで発生させることができた。つまり、細胞外基質フィブロネクチンをコートした培養皿上で、修正クレブスリンゲル液（mKRB）を培養液として用いた場合、 $1/8$ 割球の42%が胚盤胞にまで発生し、それらは約60の細胞核を有していた。また、細胞成長因子のインスリン（ $10,000 \mu\text{g/ml}$ ）をmKRBに添加すると非添加区の単離割球に比べて高い胚盤胞発生率を示した（ $p < 0.05$ ）。更に、割球の全能性を調べるため、全体で457個の豚 $1/8$ 単離割球をフィブロネクチンコートのmKRB中で培養後、16頭のレシピエント豚に移植したところ3頭が妊娠

し、2頭のレシピエントがそれぞれ4頭および2頭の子豚を分娩した。従って、8細胞期胚の割球の中には全能性を有している細胞の存在することが初めて明らかになった。

クローン家畜生産の効率を更に向上させることが可能かどうか、核移植の手法を用いて追求した。4～16細胞期までの豚単離割球をMⅡ期除核細胞質と電気的融合後、その発生能力を体外培養法によって調べた。4～7細胞期および8～16細胞期割球細胞をドナーとした場合、共に7%が桑実胚にまで発生した（卵管上皮細胞との共培養）。一方、生体内培養の核移植胚は6%が胚盤胞に達した（4～7細胞期ドナー割球）。以上の結果から、胚性ゲノム活性時期（4～8細胞期）を越えた豚細胞割球の中には全能性を有している細胞があり、単離割球の直接移植および割球細胞をドナー核として核移植を行うことにより、クローン豚作出の可能性が示唆された。

現在、一番簡便で実用的な牛の一卵性多子生産は、胚を切断2分離したり割球を分離することによる双子および4子の生産である。また、1頭のレシピエントに1個の胚に由来する2個の分離胚を移植して双子を生産させることもフリーマーチンの障害が生じないために有効な一卵性多子生産手段となっている。そこで牛胚を用いた研究では、初めに分離胚の生存性の検討を行った。0.3M濃度のショ糖を胚分離用溶液に添加すると、その後の発生に有効であることが認められた。一対の2分離胚のレシピエント牛への両側子宮角移植は、1個の2分離胚の一侧子宮角への移植よりも妊娠数が多くなる傾向が認められた。2分離胚移植の実験結果を総括すると、分離胚の両方とも受胎する確率は29%、一方だけが受胎する確率は42%でどちらも受胎しない確率は29%であった。

豚と同様に、更に、効率的なクローン牛生産を目標に、桑実期胚の細胞核をドナーとした核移植による胚生産を検討した結果、卵丘細胞との共培養によって体外で10%の割合で核移植胚は桑実胚にまで発生した。もし、体外で継代培養が可能な胚性幹細胞（ES細胞）を核移植のドナー細胞核として使用することがあれば、無限に近いクローン牛の作出が現実のものとなる。そこで本研究ではまずES細胞を確立し、その後それらの細胞を用いて核移植を行い、発生能力を調べる実験を行った。2分離した牛初期胚盤胞由来のES様細胞株を作出し、染色体分析を行った結果、18個の中期核板像のうち16個で1個のX染色体と58個の常染色体を有する正常な雌牛の染色体像が認められた。G-バンド染色によってもこれら牛ES様細胞の染色体は正常な2倍体であることが明らかであった。このES様細胞の発生能力を調べるため核移植実験を行ったところ、核移植胚は16細胞期を越えて発生を続けるものは観察されず、牛ES様細胞の発生能力は今後の検討課題として残った。

本研究によって、豚の8細胞期胚の割球の中には、全能性を有する細胞の存在が初めて明

らかにされた。また、割球の体外培養には、細胞外基質のフィブロネクチンおよび細胞成長因子インスリンが有効であることを明らかにできた。更に、牛でES様細胞株を初めて獲得することができ、核移植の手法を用いることで、クローン家畜生産の効率化を図ることの可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 金 川 弘 司
副 査 教 授 波 岡 茂 郎
副 査 教 授 清 水 弘
副 査 助教授 高 橋 芳 幸

高泌乳能力を有する乳牛あるいは優れた肉質を誇る肉畜個体の産子を一度に多数生産させること（クローニング家畜生産）ができれば、畜産経営にもたらす経済的メリットは非常に大きい。また、一卵性の多子を栄養学、行動学および遺伝学などの研究に用いれば、遺伝的要因による差異を排除することができるため、少ない個体数で正確な実験結果を得られる有益性がある。しかしながら、家畜初期胚を体外で操作するための基礎的研究は未だ満足すべき水準に達しておらず、解決すべき多くの問題が山積している。そこで本研究では、効果的なクローン家畜生産技術を確立することを目的として、種々の顕微操作を施した豚および牛胚の割球の増殖性を体外培養ならびに生体内移植を通じて検討し、下記の知見を得た。

豚の初期胚盤胞と8細胞初期胚の切断2分離後の発生を体外培養で調べたところ、初期胚盤胞の細胞数が有意に多く、胚の直径も大きかった（ $p < 0.05$ ）。また、割球融合胚（ $2/4 + 2/4$ 、 $1/8 + 1/8$ 、 $2/8 + 2/8$ ）を体外培養することによって正常な細胞数を有する胚盤胞が得られた。豚の単離割球の各々が産子に発生できる能力を有していれば、一卵性の多子生産が可能となる。しかし、豚においては単離割球の移植による産子は生産されておらず、割球の増殖を促すための技術開発が必要である。そこで細胞外基質および細胞成長因子を培養液に添加することによって、割球増殖促進効果を検討した結果、 $1/4$ 、 $1/8$ 、および $1/16$ 割球を高率に胚盤胞にまで発生させることができた。つまり、細胞外基質フィブロネクチンをコートした培養皿上で、修正クレブスリンゲル液（mKRB）を培養液として用いた場合、 $1/8$ 割球の42%

が胚盤胞にまで発生し、それらは約60個の細胞核を有していた。また、細胞成長因子のインスリン ($10,000 \mu\text{g/ml}$) を mKRB に添加すると非添加区の単離割球に比べて高い胚盤胞発生率を示した ($p < 0.05$)。更に、割球の全能性を調べるため、全体で457個の豚 1 / 8 単離割球をフィブロネクチンコートした mKRB 中で培養後、16頭のレシピエント豚に移植したところ3頭が妊娠し、2頭のレシピエントがそれぞれ4頭および2頭の子豚を分娩した。従って、8細胞期胚の割球の中には全能性を有している細胞の存在することが初めて明らかになった。

クローン家畜生産の効率を更に向上させることが可能かどうか、核移植の手法を用いて追求した。4～16細胞期までの豚単離割球をM II 期除核細胞質と電気的融合後、その発生能力を体外培養法によって調べた。4～7細胞期および8～16細胞期割球細胞をドナーとした場合、共に7%が桑実胚にまで発生した(卵管上皮細胞との共培養)。一方、生体内培養の核移植胚は6%が胚盤胞に達した(4～7細胞期ドナー割球)。以上の結果から、胚性ゲノム活性時期(4～8細胞期)を越えた豚細胞割球の中には全能性を有している細胞があり、単離割球の直接移植および割球細胞をドナー核として核移植を行うことにより、クローン豚作出の可能性が示唆された。

現在、一番簡便で実用的な牛の一卵性多子生産は、胚を切断2分離したり割球を分離することによる双子および4子の生産である。また、1頭のレシピエントに1個の胚に由来する2個の分離胚を移植して双子を生産させることもフリーマーチンの障害が生じないために有効な一卵性多子生産手段となっている。そこで牛胚を用いた研究では、初めに分離胚の生存性の検討を行った。0.3M濃度のショ糖を胚分離用溶液に添加すると、その後の発生に有効であることが認められた。一对の2分離胚のレシピエント牛への両側子宮角移植は、1個の2分離胚の一侧子宮角への移植よりも妊娠数が多くなる傾向が認められた。2分離胚移植の実験結果を総括すると、分離胚の両方とも受胎する確率は29%、一方だけが受胎する確率は42%でどちらも受胎しない確率は29%であった。

豚と同様に、更に、効率的なクローン牛生産を目標に、桑実期胚の細胞核をドナーとした核移植による胚生産を検討した結果、卵丘細胞との共培養によって体外で10%の割合で核移植胚は桑実胚にまで発生した。もし、体外で継代培養が可能な胚性幹細胞(ES細胞)を核移植のドナー細胞核として使用することがあれば、無限に近いクローン牛の作出が現実のものとなる。そこで本研究ではまずES細胞を確立し、その後それらの細胞を用いて核移植を行い、発生能力を調べる実験を行った。2分離した牛初期胚盤胞由来のES様細胞株を作出し、染色体分析を行った結果、18個の中期核板像のうち16個で2個のX染色体と58個の常染色体を有する正常な雌牛の染色体像が認められた。G-バンド染色によってもこれら牛ES様細胞の染色体は正常な2倍体であ

ることが明らかであった。この ES 様細胞の発生能力を調べるため核移植実験を行ったところ、核移植胚は16細胞期を越えて発生を続けるものは観察されず、牛 ES 様細胞の発生能力は今後の検討課題として残った。

本研究によって、豚の 8 細胞期胚の割球の中には、全能性を有する細胞のあることが初めて明らかにされた。また、割球の体外培養には、細胞外基質のフィブロネクチンおよび細胞成長因子インスリンが有効であることを明らかにできた。更に、牛で ES 様細胞株を初めて獲得することができ、核移植の手法を用いることで、クローン家畜生産の効率化を図ることの可能性が示唆された。

よって、審査員一同は、申請者 齋藤成夫氏が博士（獣医学）の学位を受ける資格を有するものと認める。