

胚細胞および体細胞を用いた クローン牛の作出に関する研究

学位論文内容の要旨

本研究では、核移植を用いた実用的な牛のクローン技術を確立するため、核体として胚細胞および体細胞 (とくに乳腺上皮細胞と線維芽細胞) を用いた核移植によるクローン子牛の作出効率について検討した。

第 1 章では、子宮灌流によって回収できる桑実期から胚盤胞期の胚の細胞 (割球) を核体として用いて、できるだけ多くのクローン子牛 (一卵性多子) を作出するために、核体のドナーとなる胚の発生ステージについて検討した。まず、体内受精由来の 32~63 細胞期の桑実胚と 64~127 細胞期の後期桑実胚~初期胚盤胞の割球を用いて核移植胚の作出効率 (融合率×胚盤胞への発生率) を比較した結果、前者 (45%) の方が後者 (12%) より高いことが分かった。また、作出した核移植胚 (胚盤胞) をレシピエント牛へ移植して子牛への発生率を調べた結果、両者の間に差異は見られなかった (28 および 23%)。ついで、核体として体外受精由来の 32~63 細胞期の桑実胚の割球と胚盤胞の内細胞塊細胞を用いた核移植胚の作出効率 (融合率×胚盤胞への発生率) を比較した。その結果、前者 (34%) の方が後者 (7%) より高いことが分かった。また、内細胞塊細胞を用いて作出した核移植胚 (胚盤胞) をレシピエント牛へ移植した結果、子牛への発生が確認された。これらの結果より、子宮灌流によって回収される桑実胚 (32~63 細胞期)、後期桑実胚~初期胚盤胞 (64~127 細胞期) および胚盤胞 (内細胞塊) を用いてクローン子牛の得られることが実証された。また、これらの発生ステージの胚の中では、32~63 細胞期の桑実胚を核体のドナーとして使用すると最も多くの核移植胚 (胚盤胞) およびクローン子牛 (一卵性多子) が作出できることが明らかになった。

第 2 章では、初乳由来の乳腺上皮細胞と耳介皮膚由来の線維芽細胞を核体として用いて、核移植胚の胚盤胞およびクローン子牛への発生率について比較検討した。その結果、乳腺上皮細胞のレシピエント卵子との融合率 (56%) は線維芽細胞 (75%) に比べて低かった。しかし、両細胞を用いて作出した核移植胚の胚盤胞への発生率に差異は認められなかった (いずれも 35%)。次に、両細胞由来の胚盤胞をレシピエント牛へ移植

した結果、クローン子牛への発生率 (4 および 5%) は両者の間に差異は見られなかった。これらの結果より、初乳由来乳腺上皮細胞と耳介皮膚由来線維芽細胞を核体として用いた核移植によって子牛の得られることが実証された。また、レシピエント卵子との融合率は乳腺上皮細胞の方が線維芽細胞より低いものの、両細胞由来の核移植胚の胚盤胞およびクローン子牛への発生率に差異のないことが明らかになった。

第 3 章では、核体となる乳腺上皮細胞の継代数が核移植胚の胚盤胞への発生に及ぼす影響について調べた。また、乳腺上皮細胞に対するジメチルスルホキシドを添加したポリエチレングリコール溶液 (PEG/DMSO 溶液) による処理がレシピエント卵子との融合および作出された核移植胚の発生に及ぼす影響についても検討した。その結果、核体となる乳腺上皮細胞の継代数が 3~7 継代から 10~30 継代に増えると核移植胚 (胚盤胞) の作出効率が低下することが明らかになった。また、乳腺上皮細胞は pH 8.0 の PEG/DMSO 溶液で 5 分間処理すると融合率が向上することが分かった。さらに、PEG/DMSO 処理を施した乳腺上皮細胞に由来する産子も得られ、乳腺上皮細胞に対する PEG/DMSO 処理は作出した核移植胚の胚盤胞および子牛への発生に悪影響がなく、核体の PEG/DMSO 処理は核移植胚の作出効率を改善することが示唆された。

以上の研究結果より、胚細胞、すなわち子宮灌流によって回収される桑実期から胚盤胞期の胚の細胞 (割球) を用いた核移植では、32~63 細胞期の桑実胚を核体のドナーとして使用すると最も多くのクローン子牛 (一卵性多子) が作出できることが明らかになった。また、体細胞である初乳由来乳腺上皮細胞と耳介皮膚由来線維芽細胞を核体として用いた核移植によってクローン子牛が得られることが実証された。さらに、乳腺上皮細胞については、継代を重ねる (10 継代以降) と発生能が低下するため、3~7 継代の細胞が核体として適しており、適切な PEG/DMSO 処理を加えるとレシピエント卵子との融合率が改善され、クローン子牛への作出効率が向上することも示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 高 橋 芳 幸
副 査 教 授 藤 永 徹
副 査 教 授 安 居 院 高 志
副 査 助 教 授 片 桐 成 二

学 位 論 文 題 名

胚細胞および体細胞を用いた クローン牛の作出に関する研究

学位論文提出者は、実用的な牛の核移植クローン技術を確立するため、細胞質体として体外成熟除核卵子を使用し、核体として胚細胞と体細胞を用いたクローン牛の作出法について研究を行った。

胚細胞を用いたクローン牛の作出に関する研究では、子宮灌流によって回収できる桑実期から胚盤胞期の胚の細胞を核体として用い、できるだけ多くのクローン牛（一卵性多子）を作出するために、核体のドナーとなる胚の発生ステージについて検討した。その結果、桑実胚（32～63細胞期）、後期桑実胚～初期胚盤胞（64～127細胞期）および胚盤胞（内細胞塊）の中では、32～63細胞期の桑実胚を核体のドナーとして使用すると最も多くの核移植胚（胚盤胞）およびクローン牛が作出できることを明らかにした。

体細胞を用いたクローン牛の作出に関する研究では、核体として初乳由来乳腺上皮細胞と耳介由来線維芽細胞を用いて、核移植胚の作出効率、胚盤胞およびクローン牛への発生率について比較検討した。その結果、乳腺上皮細胞は除核卵子との融合率が低いために核移植胚作出効率が低くなることと、両細胞から作出された核移植胚の胚盤胞および子牛への発生率は差異のないことを明らかにした。乳腺上皮細胞については、融合率を改善するためにジメチルスルホキシドを添加したポリエチレングリコール溶液による処理法を検討した結果、融合率を向上させ、核移植胚およびクローン牛の作出効率を改善できる処理条件を見いだした。また、乳腺上皮細胞は10継代以上培養したものを核体として使用すると核移植胚の発生能が低下するため、3～7継代の細胞が核体として適していることも明らかにした。

本研究により、牛の核移植クローン技術の実用化に必要な多数の新知見が得られた。よって、審査員一同は、上記学位論文提出者 岸 昌生 氏が博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有するものと認めた。