

牛体細胞核移植胚の培養液の検討

佐伯和弘^{1,2}、藤原裕輔²、谷口俊仁^{1,3}、細井美彦^{1,2}、
松本和也^{1,2}、三谷 匡¹、加藤博己¹、笠松 礼⁴、
印藤頼子⁴、川澄みゆり⁴、入谷 明^{1,2}

要 約

ウシの体細胞による再構築胚の体外培養による発生率は未だ低い。本研究では、血清飢餓培養したウシ耳介由来繊維芽細胞を除核したウシ未受精卵に融合して作製した再構築胚を用いて融合後 168 時間体外で培養し、効果的な培養方法を確立するために行った。実験 I では、修正合成卵管液 (mSOF)、アミノ酸を添加した Charles Rosenkrans 液 (CR1aa) および 5% 新生子ウシ血清を添加した CR1aa (CR1aa+NBCS) で再構築胚を培養した。無血清培養液である CR1aa 液では、胚盤胞期胚は得られなかったが、血清を添加した CR1aa+NBCS では、培養した再構築胚の 13% が胚盤胞期胚に発生した。一方、mSOF 液では、無血清培養液であるにもかかわらず 17% の胚盤胞への発生率が得られ、CR1aa+NBCS と同様だった ($p < 0.05$)。実験 II では、体細胞再構築胚を融合後 120 時間まで mSOF あるいは CR1aa+NBCS で培養し、その後細胞培養液である 5% NBCS を添加したダルベッコイーグル培養液 (DMEM-NBCS) で 168 時間まで培養した。その結果、2 区の培養方法とともに 21-25% の再構築胚が胚盤胞期へ発生し、ウシ再構築胚を培養後半期に DMEM-NBCS で培養すると発生率が向上することが示された。

緒 論

ウシ体細胞核移植技術の効率化は、家畜改良の促進のみならずクローン技術を利用した遺伝子改変ウシ作製の効率を改善させるものである [1-4]。体細胞核移植産子の生産効率の向上には移植前の胚の培養法の改善が重要であると考えられる。しかしながら、胚盤胞期胚までの発生率は一部の報告 [5] を除き低率 [6, 7] であることから、再構築胚の培養方法の改善が望まれている。

ウシ胚の培養には、卵管上皮細胞と共培養 [8] や低濃度酸素下での培養 [9, 10] など種々の培養方法が利用されているが、体細胞核移植胚の培養方法は十分には検討されていない。本報告では、ウシ体細胞核移植胚の胚盤胞への発生率を向上させるため、培養液の種類や培養条件を検討することで発生率の高い体外培養系の開発を試みた。

材料と方法

除核卵子の調整

近隣の屠場で採取したウシ卵巣の直径 2 ~ 8mm の卵胞より卵丘細胞卵子複合体 (COCs) を採取した。COCs を 10 個ずつ、ミネラルオイル下の 50 μ l の 5% 新生子ウシ血清 (new-born calf serum, NBCS, Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA)、0.02 AU/ml 卵胞刺激ホルモン (FSH、アントリン、デンカ製薬) および 1 μ g/ml エストラジオール 17- β (Sigma, St. Louis, MI, USA) を添加した TCM-199 with Earl's salts (199 (E), Gibco) に導入し、炭酸ガスインキュベーター (39 $^{\circ}$ C、5% CO₂ in air、飽和湿度) 内で 22 ~ 24 時間成熟培養を行った。成熟培養後、COCs を 0.1% ヒアルロニダーゼ (Sigma) を含む 5% NBCS 添

加 TCM-199 with Hank's salts (199 (H)-NBCS) に移し、5 分間 VORTEX ミキサーで攪拌し、卵丘細胞を除去した。裸化した卵子は、倒立顕微鏡下で第一極体を放出した成熟卵子のみを選別し、極体付近の透明帯の一部をマイクロマニピュレーターにより切開した。卵子を、 $5 \mu\text{g/ml}$ サイトカラシン B を含む 199 (H)-NBCS に移し、卵子細胞質の一部を切開部位より押し出すことで除核した。押し出した細胞質は、 $20 \mu\text{g/ml}$ Hoechst33342 (Sigma) で染色し、蛍光顕微鏡下で核質の有無を調べることで除核を確認した。除核卵子は核移植を行うまで、199 (H)-NBCS に置いた。

ドナー体細胞の調整

育成牛の耳介の一部を採取し、細切した。これら組織を 10% ウシ胎子血清 (FCS, Gibco) を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM、日水製薬株式会社, Tokyo, Japan、DMEM +10% FCS) で、 39°C 、5% CO_2 、飽和湿度下で培養し、コンフルエントな単層の繊維芽細胞を得た。四代以上継代培養し、コンフルエントな細胞を約一週間、FCS 濃度を 0.5% に減じた DMEM 内で培養 (血清飢餓培養) した。培養後、細胞を 199 (H)-NBCS で洗浄した後、 0.2mg/ml EDTA (Sigma) および 0.25% トリプシン (Difco, Sparks, MD, USA) を含む修正リン酸緩衝液 (m-PBS、Gibco) に移し、 39°C で 2 分間インキュベートし、細胞を単離した。これら単離した細胞をドナー体細胞として用いた。

体細胞核移植胚の作製

単離した体細胞をパラフィンオイル下の $2 \mu\text{l}$ の 10% ポリビニールピロリドン (PVP, Nacalai tesque, Kyoto, Japan) 添加 199 (H) に導入した。除核した卵子は、別の $2 \mu\text{l}$ の 199 (H)+5%NBCS に導入し、マイクロマニピュレーターを用いて体細胞を 1 個ずつ除核卵子の囲卵腔内に注入した。これら核移植胚を細胞融合液細胞融合液 (Zimmerman Cell Fusion Medium, [7]) に導入し、微小電極 (Nepa gene, Chiba, Japan) で核移植胚を挟み、細胞融合装置 (ECM200、BTX) を用いて、直流 2.7kV/cm 、 $11 \mu\text{sec}$ を 2 回印加することでレシピエント卵子と細胞導入したドナー細胞とを融合して再構築胚を作製した。

融合した再構築胚は、 Ca^{2+} イオノマイシンによる活性化処理をした。電気融合で作製した再構築胚を $100 \mu\text{l}$ の $5 \mu\text{M}$ Ca^{2+} イオノマイシン (Sigma) および $1 \mu\text{g/ml}$ ポリビニルアルコール (PVA, Sigma) を添加した修正ダルベッコリン酸緩衝液 (mD-PBS Gibco) 内に移し、5 分間静置した。 Ca^{2+} イオノマイシン処理後、再構築胚を直ちに $10 \mu\text{g/ml}$ シクロヘキシミド (Sigma, USA) を含む修正合成卵管液 (modified Synthetic Oviduct Fluid; mSOF, [11]) 内に移し、 39°C 、5% CO_2 、5% O_2 、90% N_2 、飽和湿度のインキュベーター内で 6 時間処理し、再構築胚の活性化を行った。活性化処理を行った再構築胚を培養液に移し、2 回洗浄した。

胚の培養と発生の検査

活性化処理した再構築胚をミネラルオイル下の培養液 $50 \mu\text{l}$ のドロップ内に 20 ~ 30 個ずつ移し、 39°C 、5% CO_2 、5% O_2 、90% N_2 、飽和湿度のインキュベーター内で体外培養した。培養後、クローン胚を実体顕微鏡下 (x 60) で検査し、卵割率、桑実期および胚盤胞期胚への発育率を調べた。胚盤胞は、 $20 \mu\text{g/ml}$ Hoechst33342 で染色し、蛍光顕微鏡下で核数を計測することで細胞数を調べた。

実験デザイン

実験 I

ウシ胚培養で用いられる mSOF および CR1aa [12] の 2 種類の無血清培養液および 5% NBCS を添加した CR1aa (NBCS-CR1aa) を用いて再構築胚を細胞融合後 168 時間培養した。

実験 II

実験 I で、胚盤胞への発生率が 13 ~ 17% と低かったので、さらに発生率を向上させるために、次に胚培養後半時期において培養液の交換が発生率に及ぼす影響を検討した。桑実胚期である細胞融合後 120 時間までは mSOF あるいは NBCS-CR1aa で培養しその後 5% NBCS を添加した DMEM で 168 時間まで培養した。

統計処理

実験は 3 回反復した。卵割率および胚盤胞への発生率は、 χ^2 検定により比較した。胚盤胞の細胞数は、ANOVA および Fisher の PLSD テストにより比較した。

結果および考察

実験 I では、m-SOF、CR1aa+5%NBCS および CR1aa（無血清）でウシ体細胞再構築胚を培養したところ、その卵割率は、いずれの培養液でも 54 ~ 60% と同様 ($p>0.05$) だったが、胚盤胞への発生率は、それぞれ 17%, 13% および 0% で、CR1aa（無血清）では胚盤胞へ発生しなかった（表 -1）。また、胚盤胞期胚の細胞数では、培養液による差は見られなかった ($p>0.05$)。Choi et al. [13] は、ウシ再構築胚の培養に、mSOF および CR2aa [12] を用いて培養したところ、我々の結果と同様に、mSOF では胚盤胞期胚が得られるものの CR2aa ではほとんど胚盤胞へ発生しないことを報告している。これら培養液の組成には大きな差異が無く、なぜウシ胚の発育を支持する Charles Rosenkrans 培養液がウシ再構築胚の発生を支持しないのかは明らかではない。CR1aa+5%NBCS では胚盤胞が得られたことから、CR1aa を用いた場合、ウシ体細胞再構築胚を胚盤胞へと発生させるためには、血清の添加が必要であると考えられた。m-SOF では、無血清培養液ではあるが、胚盤胞へ発生し、CR1aa+5%NBCS と同等の発生率が得られた ($p>0.05$)。しかしながら、胚盤胞への発生率は、13 ~ 17% と比較的 low 率だったので、さらなる発生率の向上を目指し、胚培養後半時期での培養液の交換が発生率に及ぼす影響を検討した。

表 1. m-SOF, CR1aa（無血清）および CR1aa+5%NBCS で培養したウシ体細胞再構築胚の卵割率と胚盤胞期への発生率

培養液	培養した再構築胚数	卵割した胚数 (%)	胚盤胞期胚数 (%)	胚盤胞の細胞数 (mean±SEM)
m-SOF	63	39 (60)	6 (17) ^a	66.8±7.3
CR1aa	42	23 (55)	0 (0) ^b	-
CR1aa+5%NBCS	93	51 (54)	7 (13) ^a	64.0±3.1

3 回反復実験。

a, b、有意差あり ($p<0.05$)。

実験 I で、再構築胚の胚盤胞への発生を支持した m-SOF および CR1aa+5%NBCS を用いて融合後 120 時間まで再構築胚を培養し、その後 168 時間まで 5%NBCS 添加 DMEM で培養した。これは、哺乳動物の胚は、発生の初期に解糖系がないため、エネルギー生産にはピルビン酸を利用した TCA 回路が利用されるが、受精後 5 日目以降の桑実胚期以降は、グルコース代謝が開始されるなどのエネルギー代謝が体細胞と同様になるため [14-17] である。表 2 に示すように、細胞融合後 120 時間まで m-SOF あるいは CR1aa+5%NBCS で培養したウシ再構築胚は、血清を添加した組織培養液である 5% NBCS+DMEM で 168

時間まで培養したところ、胚盤胞への発生率は、25 および 21% と向上した。Choi et al. [13] も培養の後半（融合後 72 時間以降）に血清を添加すると胚盤胞期への発生率が向上することを報告しており、本研究でも彼らと同様の結果が得られた。しかしながら、血清には多くの未知の因子が含まれておりロットによる差異も無視できない。今後、安定した培養方法を確立するため、無血清培養液での培養系の開発を行っていききたい。

表 2. ウシ体細胞クローン胚の培養期間における培養液交換が胚発生に及ぼす影響

培養液	培養したクローン胚数	卵割した胚数 (%)	胚盤胞期胚へ発育した胚数 (%)	胚盤胞期胚の細胞数 (mean±SEM)
SOF → DMEM	102	61 (60)	15 (25)	75.8±8.1
CR1aa+5%NBCS → DMEM	65	33 (51)	7 (21)	79.4±8.8

謝 辞

本研究の一部は、科学技術振興事業団・和歌山県地域結集型共同研究事業・アグリバイオインフォマティクスの高度活用技術の開発の研究助成および近畿大学生物理工学部戦略的研究 No.03-IV-14, 2004 の助成により行われた。

参 考 文 献

1. Wells DN, Misica PM, Tervit HR, Vivanco WH. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. *Reprod Fertil Dev* 1998; 10: 369-378.
2. Campbell KHS. Nuclear transfer in farm animal species. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 1999; 10: 245-252.
3. Corley-Smith GE, Brandhorst BP. Preservation of endangered species and populations: A role for genome banking, somatic cell cloning, and androgenesis? *Molecular Reproduction and Development* 1999; 53: 363-367.
4. Stice SL, Strelchenko NS, Keefer CL, Matthews L. Pluripotent bovine embryonic cell lines direct embryonic development following nuclear transfer. *Biol Reprod* 1996; 54: 100-110.
5. Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 1998; 282: 2095-2098.
6. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; 385: 810-813.
7. Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Leon FA, Robl JM. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 1998; 280: 1256-1258.
8. Eyestone WH, First NL. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviducal tissue or in conditioned medium. *J Reprod Fertil* 1989; 85: 715-720.
9. Hagemann LJ, Weilert LL, Beaumont SE, Tervit HR. Development of bovine embryos in single in vitro

-
- production (sIVP) systems. *Mol Reprod Dev* 1998; 51: 143-147.
10. Nagao Y, Saeki K, Hoshi M, Nagai M. Early development of bovine embryos. *J Reprod Dev* 1995; 41: 29-36.
 11. Takahashi Y, First NL. In vitro development of bovine one-cell embryos :influence of glucose,lactate,pyruvate,amino acids and vitamins. *Theriogenology* 1992; 37: 963-978.
 12. Rosenkrans CF, Jr., Zeng GQ, GT MC, Schoff PK, First NL. Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. *Biol Reprod* 1993; 49: 459-462.
 13. Choi YH, Lee BC, Lim JM, Kang SK, Hwang WS. Optimization of culture medium for cloned bovine embryos and its influence on pregnancy and delivery outcome. *Theriogenology* 2002; 58: 1187-1197.
 14. Brinster RL. Studies on the Development of Mouse Embryos in Vitro. 3. The Effect of Fixed-Nitrogen Source. *J Exp Zool* 1965; 158: 69-77.
 15. Brinster RL. Lactate dehydrogenase activity in the preimplanted mouse embryo. *Biochim Biophys Acta* 1965; 110: 439-441.
 16. Brinster RL. Studies on the development of mouse embryos in vitro. IV. Interaction of energy sources. *J Reprod Fertil* 1965; 10: 227-240.
 17. Brinster RL. Studies on the Development of Mouse Embryos in Vitro. Ii. The Effect of Energy Source. *J Exp Zool* 1965; 158: 59-68.

英文要旨

Optimization of culture medium for bovine embryos
reconstructed with bovine fibroblasts

Kazuhiro Saeki^{1,2}, Yusuke Fujiwara², Shunji Taniguchi³, Yoshihiko Hosoi^{1,2},
Kazuya Matsumoto^{1,2}, Tasuku Mitani¹, Hiromi Kato¹, Aya Kasamatsu⁴,
Yoriko Indo⁴, Miyuri Kawasumi⁴ and Akira Iritani^{1,2}

Developmental rates of bovine embryos reconstructed with somatic cells have been still low. In this study, we conducted to establish an effective culture system for supporting in vitro development of bovine reconstructed embryos by electrical fusion of bovine enucleated matured oocytes with bovine serum-starved fibroblasts derived from an ear of a calf. In Experiment I, reconstructed embryos were cultured in either modified synthetic oviductal fluid medium (mSOF), Charles Rosenkrans medium with amino acids (CR1aa) or CR1aa containing 5% new-born calf serum (NBCS, CR1aa-NBCS) for 168 hours post fusion (hpf). No blastocysts were obtained when the embryos were cultured in CR1aa. Blastocysts were obtained (13%), when serum was added into CR1aa. The reconstructed embryos developed to the blastocyst stage (17%) by culture of the embryos in mSOF that was a serum-free medium. The developmental rates either with mSOF and CR1aa-NBCS were the same ($p>0.05$). In Experiment II, the reconstructed embryos were cultured either with mSOF or CR1aa-NBCS until 120 hpf, then the embryos were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 5% NBCS (mSOF-DMEM and CR1aa-NBCS-DMEM) to 168 hpf. The rates of blastocyst development were 21 and 25% with mSOF-DMEM and CR1aa-NBCS-DMEM, respectively. The results indicated that DMEM containing 5% NBCS used for the later period of in vitro culture enhanced the development of bovine reconstructed embryos to the blastocyst stage.