

# 桑実胚由来細胞をドナー細胞に用いた核移植胚を活用した 胚 DNA 型判定および種雄牛造成

日高健雅\*・福本豊・今井佳積\*\*・山田博道\*\*\*・尾形康弘

## 要 約

当センターで開発した「細胞剥離法」により桑実胚から採取した細胞をドナー細胞として核移植胚を生産する方法を確立した。核移植胚の DNA 型を判定することによる作出体外受精胚の DNA 型の判定成績と、この方法を活用した種雄牛検定法のクローン検定の効率を調査した。

細胞を採取、核移植した 27 個の桑実胚のうち、25 個(92.6%)で DNA 型判定用の核移植胚を確保した。その核移植胚を用いた DNA 型判定により、22 個(81.5%)の DNA 型判定済み胚を生産できた。DNA 型判定済み胚 22 個のうち 17 個を移植し、9 頭(52.9%)が受胎した。受胎した 9 頭のうち 6 頭が分娩し、産子の血液による DNA 型判定で全頭が胚診断結果と一致した。種雄牛候補牛生産効率の比較では、1 頭の種雄牛候補牛の生産に必要な処理胚は、2 分割区が 9.2 個、細胞剥離区は 4.4 個だった。また、生産した雄胚の受胎率は、2 分割区が 41.7%、細胞剥離区が 55.6%だった。処理胚の 80%以上が DNA 型判定済み胚として生産でき、受胎率も 50%を超えたことから、今回構築した方法により DNA 型判定済み胚の生産、普及が可能と考えられた。また、種雄牛造成において桑実胚から採取した剥離細胞を用いた核移植胚生産により、種雄牛候補牛生産の生産効率向上が可能と考えられた。

## I 緒言

広島県では、ウシ受精胚の着床前遺伝子診断のために必要な細胞採取方法として、体外受精後 5 日目の桑実胚から 1~2 個の細胞を剥がし取る「細胞剥離法」を開発している<sup>14) 15)</sup>。体外受精後 7 日目の胚盤胞の栄養膜をブレードにより切り取る従来法<sup>11) 22)</sup>は、採取細胞数が多いうえ、ブレードにより胚細胞を傷つけてしまうことから胚の品質が低下するのに対し、細胞剥離法は胚を傷つけず採取細胞数も少ないことから、胚の品質が向上するメリットがある<sup>15)</sup>。細胞剥離法は、泌乳の影響により受精卵生産効率が低い乳用牛からの雌胚生産に有効であり、酪農家が後継雌牛を確保するために活用している。

近年、黒毛和種のゲノム解析が全国的に進められ、産肉形質や遺伝子疾患の原因となる遺伝子が同定され、子牛生産への活用が可能になってきている<sup>3) 18) 20) 24)</sup>。Stearoyl-CoA Desaturase(SCD), Fatty Acid Synthase (FASN)および Sterol Regulatory Element Binding Protein-1 (SREBP-1)で検出された塩基配列(DNA 型)は、牛肉のおいしさを判断する指標の一つである不飽和脂肪酸含有割合と相関することが示されている<sup>1) 6) 21)</sup>。また、クローディン 16 (CL16)欠損症のように、黒毛和種産子で腎機能障害を伴う発育不良として特徴づけられる疾患の原因遺伝子も同定されている<sup>3) 10) 17)</sup>。

このように黒毛和種の生産性に影響を及ぼす遺伝子の DNA 型が多数同定され、これらの子牛生産に活用し育種改良速度を向上させることが期待されている。

これらの遺伝子の DNA 型を胚の段階で診断するためには、細胞剥離法により採取した細胞を用いた DNA 型判定が有効であるが、細胞剥離法で採取可能な細胞数は 2-3 個であることから、診断に必要な DNA 量が確保できないため複数の DNA 型判定が困難である。そこで細胞剥離法により桑実胚から採取した細胞をドナー細胞として核移植を行い、核移植胚を生産する方法を開発し、2-3 個の細胞を 100 個/胚に増やすことを可能とした。今回、我々が開発した方法を活用して少数の剥離細胞から生産した核移植胚を用いて DNA 型判定することによる、DNA 型判定済み胚の生産効率および診断精度を調査したので、その概要を報告する。

また、広島県では、黒毛和種の種雄牛造成の効率化を目的として、平成 19 年度から受精卵クローン技術を活用した「クローン検定」を種雄牛造成方法として導入している。

クローン検定は、まず雌牛から経膈採卵(OPU:Ovum Pick Up)によって得られた卵子と精液により体外受精を実施する。2 細胞期の胚を 2 つに

(8)

分割し、片方はそのまま7日間の培養により胚盤胞まで発育させ、種雄牛候補用の胚とする。もう片方は、5日目の桑実胚まで発育させた後、核移植用のドナー細胞として核移植に用い生産した核移植胚から肥育検定用のクローン牛を生産する<sup>2)</sup>。これらの検定用クローン牛を27ヶ月齢まで肥育して得られた産肉成績から、候補種雄牛の能力を検定するのがクローン検定である。

この「クローン検定」において、従来の2細胞期に2分割する方法では、胚が半分になることにより発生率の低下や胚の品質の低下が認められることや、2分割した2つの胚のうち、片方しか桑実胚まで発育しない場合が認められるなど、生産効率が低い課題があった。そこで、検定用クローン牛生産に桑実胚からの剥離細胞を用いた核移植胚を使う方法を取り入れ、従来の2細胞期に2分割する方法と生産効率を比較したので、その概要を報告する。

## II 材料および方法

### 1 体外受精卵の作出

体外受精卵および核移植胚の作出における経膈採卵、発生培養、細胞剥離、核移植方法は全て尾形<sup>13)14)</sup>らの方法に従った。

供卵牛は、広島県立総合技術研究所畜産技術センターで飼養する黒毛和種経産牛8頭を用いた。

経膈採卵は、超音波画像診断装置(SSD-1200, アロカ, 東京)に経膈穿刺用コンベックス探触子(UHT-9106-7.5, アロカ, 東京)を装着し、ディスプレイ探卵針(ミサワ医科工業株式会社, 茨城)と卵子吸引システム(K-MAR-5115, Cook Medical, Australia)を用いて実施した。還流液には、0.3%ウシ胎児血清(FCS: Fetal Bovine Serum, Hyclone, Utah, U.S.A)および1.8IU/mlヘパリン添加乳酸加リンゲル液(ハルゼンV注射液: 日本全薬工業, 東京)を用いた。卵巣からの卵胞液吸引は卵巣表面から卵胞へ直接穿刺しながら吸引し、吸引圧100mmHgで吸引した。回収液を0.3%FCS添加乳酸加リンゲル液で洗浄しながらセルコレクター(富士平工業, 東京)でろ過し卵丘細胞卵子複合体(Cumulus-Oocyte Complex: COC)を回収した。回収したCOCは10%FCS添加リン酸緩衝液で3回以上洗浄した後、TCM-199(Medium199:12340-030, Gibco, Gaithersburg, MD, U.S.A)を基礎培地とし10%FCS, 0.12AU/ml卵胞刺激ホルモン(アントリン10, 共立製薬, 東京)及び50ng/ml上皮成長因子(Epidermal Growth Factor: E9644, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO,

U.S.A)を添加した体外成熟培地に移し、38.5°C, 5%CO<sub>2</sub>, 95%Airの気相条件下で22~24時間成熟培養を行った。

体外受精は、堀内ら<sup>7)</sup>に従い、凍結精液を用いて精子濃度を6~12×10<sup>6</sup>/mlに調整し、媒精を6時間行った。媒精後の体外発生培養は、媒精後72時間目まではmSOF(modified Synthetic Oviduct Fluid medium:修正合成卵管液)を基礎培地とし、3mg/ml牛血清アルブミン(Bovine Serum Albumin: A-4378, Sigma, St. Louis, MO, U.S.A), 0.25mg/mlリノール酸アルブミン(linoleic acid albumin: L-8384, Sigma, St. Louis, MO, U.S.A)を添加した発生培地で38.5°C, 5%CO<sub>2</sub>, 5%O<sub>2</sub>, 90%N<sub>2</sub>の低酸素条件下で培養した。72時間以降は、mSOFを基礎培地とし、10%FCSと10μg/mlインスリン(Insulin: I-6634, Sigma, St. Louis, MO, U.S.A)を添加した発生培地で、38.5°C, 5%CO<sub>2</sub>, 95%Airの気相条件下でVero細胞(動物衛生研究所, 茨城県)と共培養した。

### 2 胚の2分割および桑実胚からの細胞剥離

胚の2分割は経膈採卵・体外受精後2日目の2細胞期胚を、細胞剥離は体外受精後5日目の桑実胚を用いた。胚を0.25%アクチナーゼE(Actinase E, 科研製薬, 東京)に約60秒静置し、透明帯を除去した後、20%FCS添加M2(M2: M-5910, Sigma, St. Louis, MO, U.S.A)液に移し酵素反応を停止した。2分割または細胞剥離は、0.125%トリプシン(Trypsin: 27250-042, GIBCO, Gaithersburg, MD, U.S.A.)添加PBS(-)に移し、ガラス製毛細管(MICRODISPENSER: 3-000-210-G, Drummond, Birmingham, U.S.A.)をガスバーナーで炙って細くピペット状に加工したものを用い、数回ピペッティングすることにより実施し、2細胞期胚は2分割した時点、桑実胚は胚表層の3~5個の細胞が剥離した時点で胚を20%FCS添加M2液に移し、酵素反応を停止させた。2分割した胚は、片方は7日目まで培養を継続し、胚盤胞まで発育させ、残りの片方は、5日目の桑実胚まで培養を継続したのち、0.125%トリプシン液内でのピペッティングによりバラバラにし、ドナー細胞として核移植に供した。細胞剥離した桑実胚は発生培地(10%FCS, 10μg/ml Ins添加mSOF培地)で培養したのち胚盤胞まで発育させ、剥離した細胞は剥離後2時間以内にドナー細胞として核移植に供した。

### 3 核移植胚の作出

核移植に用いるレシピエント卵子は、細胞剥離を行う前日に経膈採卵により採取した。COC を成熟培養後、0.1% コラゲナーゼ (Collagenase :C-9722, Sigma, St. Louis, MO, U.S.A) および 0.1% ヒアルロニダーゼ (Hyaluronidase :H-3506 Sigma, St. Louis, MO, U.S.A) 添加 M2 液中でピペッティングし、卵丘細胞を除去し、圍卵腔内に第一極体の放出が認められた成熟卵子のみを除核しレシピエント卵子に用いた。除核はマイクロマニピュレーター (NT-88-V3, NARISHIGE, 東京) を用いて透明帯にスリットを形成し、極体を目印にした細胞質押し出し法により行った<sup>19)</sup>。

除核卵子はカルシウムイオノフォア (Calcium Ionophore A23187:C7522, Sigma, St. Louis, MO, U.S.A) 10  $\mu$ M とイノシトール 3 リン酸 (InsP3, 株式会社同仁化学研究所, 熊本) 25  $\mu$ g/ml で 5 分間処理した後、ピューロマイシン (Puromycin :P-7255, Sigma, St. Louis, MO, U.S.A) 100  $\mu$ g/ml と BSA3 mg/ml を添加した CR1aa 培地で 6 時間培養する複合活性化処理を施した。除核卵子に、ドナー細胞をマイクロマニピュレーターにて挿入後、チンマーマン氏液中にて交流 8.5 V/mm 5 sec, 直流 75 V/mm 50  $\mu$  sec  $\times$  2 回の電気パルスを加えることにより細胞融合を行った。

体外培養は、電気インパルス印加後 72 時間目までは 3 mg/ml BSA 添加 CR1aa 培地にて、5%O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>, 90%N<sub>2</sub>, 38.5°C の条件下で、72 時間目以降は 10%FCS 添加 CR1aa 培地にて Vero 細胞との共培養を行った。

### 4 核移植胚の DNA 抽出と DNA 型判定

胚からの DNA 抽出は、Hirayama ら<sup>4) 5)</sup> の報告に基づくアルカリ処理法で実施した。胚サンプルは、1 mg /ml ポリビニルピロリドン (Polyvinylpyrrolidone :P-0930, Sigma, St. Louis, MO, U.S.A) 含有 PBS (-) 液 (30  $\mu$ l) で 6 回洗浄後、滅菌水に移し、サンプル細胞を含む 2  $\mu$ l を採取し、0.05N-NaOH 液 2  $\mu$ l が入ったサンプルチューブに移して混和後、室温で 15 分放置した。その後 95°C で 15 分加熱し、1M-Tris-HCl (pH8.0) を 1  $\mu$ l 加えて中和したものを胚 DNA 抽出液とした。

DNA 型判定に用いた対象遺伝子は、SREBP-1 および CL-16 とした。SREBP-1, CL-16 とも、PCR 反応の酵素には増幅効率が高い KOD-FX (KFX, 東洋紡, 大阪) を

用いた。PCR 反応液の組成は、DNA 抽出液 1~4  $\mu$ l, KOD-FX (1.0U/  $\mu$ l) 0.2  $\mu$ l, 2 $\times$ PCR Buffer for KOD-FX 7.5  $\mu$ l, 2mM dNTPs 3  $\mu$ l, Primer (10pmol/  $\mu$ l) 0.5  $\mu$ l とし、滅菌水で 15  $\mu$ l に調整した。SREBP-1 DNA 型判定用プライマーは、Forward: 5`-CCACAACGCCATCGAGAAACGATAC-3` と Reverse: 5`-GGCCTCCCTGACCACCAACTTAG-3` を用いた<sup>6)</sup>。CL-16 タイプ 1 欠損 DNA 型判定用プライマーは、Forward: 5`-ATTGTATTTTAGGAGTGACTC-3` と Reverse: 5`-CCCCCCCCACTCTATAC-3` を、正常アレル検出用は、Forward: 5`-TATGCTGTGATGTTTATGTAG-3` と Reverse: 5`-CCCCCCCCGCTTTTTC-3` を用いた<sup>3)</sup>。

PCR サイクルは、94°C で 2 分加熱後、SREBP-1 では 98°C 10 秒, 60°C 30 秒, 68°C 30 秒を 35 サイクル、CL-16 タイプ 1 では、98°C 10 秒, 55°C 30 秒, 68°C 1 分を 40 サイクルとした。PCR 反応液を、3% アガロースゲル (Agarose S, ニッポンジーン, 東京) で電気泳動し、出現バンドから DNA 型を判定した。

### 5 核移植胚を用いた DNA 型判定済み胚の生産効率調査

細胞剥離した桑実期胚の DNA 型判定用核移植胚の生産率、DNA 型判定率、診断済み胚の受胎率、出生産子と胚の DNA 型判定結果の一致性を調査した。

### 6 クローン検定における 2 分割法と細胞剥離法の比較

クローン検定における種雄牛候補牛生産効率を、2 細胞期に分離し片方を核移植に用いる方法 (2 分割区) と桑実期に剥離した細胞を核移植に用いる方法 (細胞剥離区) の両区で比較した。2 分割区では、体外受精翌日に 2 細胞期胚を 2 分割した後、5 日目まで培養し両方とも発育した胚のうち、片方を種雄牛候補胚、片方を核移植用ドナー胚とし核移植に供した。細胞剥離区では、1 胚から 5 個前後の細胞を剥離し、核移植用ドナー胚とし核移植に供した。両区とも、核移植 2 日後に発育が停止している核移植胚から DNA を抽出し性別判定に用い、雄と判定された種雄牛候補胚を移植に供した。

胚の性別判定は、市販の性別判定キット (Loopamp 牛胚性別判定キット, 栄研化学株式会社, 東京) を用い、キットのマニュアルに従って実施した。

(10)

### Ⅲ 成績

#### 1 核移植胚を用いた DNA 型判定

経膈採卵，体外受精し 5 日目に正常に発育した桑実胚のうち，SREBP-1 の DNA 型判定用に 15 個，CL-16 の DNA 型判定用に 12 個，計 27 個の桑実胚を細胞剥離に供した。桑実胚から剥離した各胚の細胞数は，1～12 個平均 3.78 個/胚であり，このうち各胚 1～6 個平均 3.26 個/胚を核移植に供し，各胚 0～4 個平均 1.4 個の DNA 型判定用の核移植胚を作出

した(表 1)。細胞剥離した 27 個の桑実期胚のうち，25 個(92.6%)で DNA 型判定用の核移植胚を作出できた。この核移植胚を用いた DNA 型判定により，SREBP-1 で 11 個，CL-16 で 11 個，計 22 個(81.5%)の DNA 型判定済み胚を生産できた(表 2)。DNA 型判定済み胚 22 個のうち 17 個を移植し，9 頭(52.9%)が受胎した(表 3)。受胎した 9 頭のうち 6 頭が分娩し，産子の血液による DNA 型判定で全頭が胚における DNA 判定結果と一致した(表 4)。

表1 . DNA型判定用核移植胚生産状況及び細胞剥離した元の胚の移植状況

胚番号	採取細胞数	核移植細胞数	核移植胚生産数	DNA型判定可非	受精卵移植	受胎	分娩
SR-1	3	3	1	○	○		
SR-2	4	4	1	○	○		
SR-3	3	3	2	○	○	○	○
SR-4	6	6	3	○	○	○	
SR-5	6	4	4	○	○	○	
SR-6	1	1	1		○		
SR-7	3	3	1	○	○	○	○
SR-8	12	5	1	○	○	○	○
SR-9	4	3	2	○	○		
SR-10	4	3	1		○	○	○※
SR-11	4	3	2	○	○	○	○
SR-12	3	3	0	ND			
SR-13	3	3	2	○	○		
SR-14	3	3	1	○			
SR-15	5	5	0	ND			
CL-1	3	3	1	○	○	○	○
CL-2	3	1	1	○			
CL-3	2	2	1	○	○	○	○
CL-4	3	3	1	○			
CL-5	3	3	1				
CL-6	3	3	1	○			
CL-7	3	3	1	○	○		
CL-8	3	3	2	○			
CL-9	3	3	3	○	○		
CL-10	4	4	2	○			
CL-11	4	4	1	○	○		
CL-12	4	4	1	○			
average	3.78	3.26	1.41				

※After Et, recipient cow transported other farm

表2 . DNA型判定用核移植胚を用いたDNA型判定成績

	細胞採取胚数	DNA型判定 実施胚数	DNA型 判定済胚数	判定率
SREBP	15	13	11	73.3%
CL-16	12	12	11	91.7%
計	27	25	22	81.5%

表3. DNA型判定済み胚の移植成績

移植可能胚数	移植数	受胎	受胎率
22	17	9	52.9%

表4 . 胚診断と出生子牛の血液からのDNA型検査結果

	産仔番号	胚診断結果	出生子牛 血液検査
SREBP	①	SS	SS
	②	LS	LS
	③	LS	LS
	④	SS	SS
CL-16	⑤	正常	正常
	⑥	正常	正常

## 2 クローン検定における2分割と細胞剥離の比較

種雄牛候補牛生産効率の比較では、2分割区46個、細胞剥離区22個の胚を種雄牛造成のための操作に供した。2分割した46組の操作胚中21組が両方の胚が桑実胚まで発育したため、片方を核移植できた。21組中18組で核移植胚の一部を用いて性別判定を実施し、13組が雄判定を得た。移植可能な種雄牛候補胚と核移植胚の両方が正常に発育した胚は11組だった(表5)。

一方、細胞剥離区では、22個の操作胚のうち16個で剥離した細胞をドナー細胞として核移植した。操作した胚16個で核移植胚の一部を用いた性別判定を行い、10個が雄判定を得た。生産した雄胚のうち、2分割区で11個、細胞剥離区で9個の胚を移植し、各5頭ずつ受胎し、受胎率は、2分割区が41.7%、細胞剥離区が55.6%だった(表6)。1頭の種雄牛候補牛の生産に必要な操作胚数は、2分割区が9.2個、細胞剥離区は4.4個だっ

た(表7)。

また、受胎した胚から作出した核移植胚を用いた肥育検定用のクローン牛生産を、2分割区では受胎5頭中3頭、細胞剥離区では受胎5頭中2頭で取組んだ結果、いずれも1頭以上のクローン牛を生産できた。

表5. 種雄牛候補の胚とそのクローン胚の生産成績

	操作胚数	生産胚数	核移植胚	性判別胚	移植可雄胚	雄胚とクローン胚の セット確保数	セット確保率
2分割	46	21 <sup>*</sup>	21	18 <sup>**</sup>	13	11	23.9%
細胞剥離	22	22	16	16	10	10	45.5%

※2分割した胚の両方が正常に発育したものを生産胚数とした。

※※核移植した胚のうち、片方の胚が正常に発育したものを性判別に供した。

表6. 種雄牛候補胚の移植成績

	移植可雄胚	移植頭数	受胎頭数	受胎率
2分割	13	12	5	41.7%
細胞剥離	10	9	5	55.6%

表7. 種雄牛候補牛の生産効率の比較

	操作胚数	受胎頭数	種雄牛候補牛生産に 必要な操作胚数
2分割	46	5	9.2
細胞剥離	22	5	4.4

#### IV 考察

近年、黒毛和種の全国的なゲノム解析研究の結果、遺伝性疾患については、CL-16 タイプ 1 欠損症<sup>3)</sup>、ウシバンド3欠損症(band3)<sup>9)</sup>、第XIII因子欠損症(F13)<sup>16)</sup>、チェディアックヒガン症候群(CHS)<sup>24)</sup>、などが原因遺伝子の同定と診断法が確立されている。また、産肉性などの経済形質については、SCD, FASN 等の脂肪構成に関わる経済的遺伝子の診断法が確立されている<sup>1) 21)</sup>のにくわえ、父方半きょうだい家系を用いた QTL 解析で、枝肉重量や脂肪交雑形質に関する QTL が検出されて<sup>8)</sup> おり、優良牛選抜への活用が可能となってきた。

また、移植前胚を用いて、性判定、DNA 多型診断や経済形質に関する遺伝子の判定が行われており、ウシの育種において、胚の DNA 診断は重要な技術に位置づけられる。しかし、胚を用いた DNA 診断では、胚の細胞を一部採取して診断用 DNA サンプルに用いるが、元の胚の生存性や高い受胎性を維持するためには、出来るだけ採取する細胞を少なくすることが必要であるため、十分な DNA 量が確保できず胚の DNA 診断は困難な現状がある。

そのため、少数細胞から全ゲノム増幅方法を用いて

ウシ胚の複数の遺伝子について DNA 診断する研究が進められているが、少数細胞からの全ゲノム増幅では、全胚の診断結果との不一致やアレルの消失が認められるなどの報告<sup>5)</sup>があり課題が残されている。そのため、全ゲノム増幅方法の場合、十分な DNA 量を確保するために、10~15 細胞が必要であることが示唆されている。

我々が実施した核移植胚を用いた DNA 型判定の試験では、元の胚から剥離した細胞から核移植胚の作出および核移植胚による DNA 型判定が可能であり、細胞採取操作を実施した胚のうち、81.5%が DNA 型判定済み胚として生産できた。さらに、DNA 型判定済み胚の移植受胎率が 52.9%、誕生牛における移植前の胚判定結果と生後判定結果と一致していた。

このことから、剥離採取した細胞をドナー細胞として作出した核移植胚を用いて DNA 型判定する方法は、元の胚の DNA 型を判定するためには有効であると考えられた。また、元の胚からの細胞の採取方法に剥離法を用いることにより、元の胚の損傷が少なく生存性および受胎性が高い胚が生産できたため、この方法による DNA 型判定済み胚の生産、普及が可能と考えられた。

さらに今回我々は、桑実胚から剥離した細胞を用いて核移植胚を生産する方法を、種雄牛造成法であるクローン検定にも活用し、剥離細胞を用いる細胞剥離区

と、従来法の 2 分割区における種雄牛の生産効率を比較した。

通常の種雄牛造成は、種雄牛候補牛が成牛になった後、10 頭以上の子牛を生産しその肥育成績から種雄牛候補牛の能力を検定するため、7-8 年という多くの年月と労力が必要である。そこで、胚盤胞を 2 分割し 1 卵生双子を生産し、片方の肥育成績から種雄牛候補牛の能力を検定する方法が取り組まれている。この方法は種雄牛候補牛と肥育牛がほぼ同時に生まれてくることから、検定期間を 3.5 年と短縮できる利点がある。一方で、分割した胚の受胎率が高くないことから双子生産は容易ではなく、他県の取り組みでは、173 頭に 1 胚または 2 胚ずつ移植し 12 ペア (13.8%) の生産という報告<sup>23)</sup>もあり、生産効率が低い課題がある。

この課題を解決するために、尾形ら<sup>13)</sup>は、2 細胞期に 2 分割し片方を種雄牛候補牛とし、もう片方を核移植に用い肥育用クローン牛を生産するシステムを開発した。このシステムは、先に種雄牛候補の胚を移植し、受胎確認後に 10 数個の核移植胚を作出・移植するため、肥育検定用クローン牛の確保効率の大幅な向上を可能とした。しかし、この方法では肥育用検定牛の生産効率は改善できたが、2 分割した種雄牛候補胚の受胎率が低い課題は残されたままであった。

そこで、細胞剥離法を種雄牛候補とクローン牛候補生産に活用した結果、移植可能な雄胚の生産効率および雄胚の移植受胎率はいずれも細胞剥離区で高くなり、1 頭の種雄牛候補牛を生産するのに必要な胚数は、細胞剥離区 (4.4 個) は 2 分割区 (9.2 個) の約半数と生産効率が向上した。

以上から、桑実期胚から採取した剥離細胞を用いた核移植胚生産をクローン検定に活用することにより、種雄牛候補牛と肥育検定用クローン牛生産のペア生産効率向上が可能と考えられた。

## 引用文献

- 1) Abe T, Saburi J, Hasebe H, Nakagawa T, Misumi S, Nade T, Nakajima H, Shoji N, Kobayashi M, and Kobayashi E. : Novel mutations of the FASN gene and their effect on fatty acid composition in Japanese Black beef. *Biochemical genetics* 47, 397-411 P, 2009.
- 2) 古川力 : クローン技術を用いた肉用牛育種法の検討, *日畜会報* 81, 53-64 P, 2010.
- 3) Hirano T, Kobayashi N, Itoh T, Takasuga A, Nakamaru T, Hirotsune S, and Sugimoto Y. : Null Mutation of RCLN-1/Claudin-16 Results in Bovine Chronic Interstitial Nephritis. *Genome Research* 10, 659-663 P, 2000.
- 4) Hirayama H, Kageyama S, Moriyasu S, Hirano T, Sugimoto Y, Kobayashi N, Inaba M, Sawai K, Onoe S, Minamihashi A. : Genetic Diagnosis of Claudin-16 Deficiency and Sex Determination in Bovine Preimplantation Embryos. *Journal of Reproduction and Development* 50, 613-618 P, 2004.
- 5) Hirayama H, Fujiwara A, Kageyama S, Moriyasu S, Sawai K, Onoe S, Minamihashi A. : Multiple genotyping in bovine pre-implantation embryos with whole genome amplification. *Animal Science Journal* 79, 554-560 P, 2008.
- 6) Hoashi S, Ashida N, Ohsaki H, Utsugi T, Sasazaki S, Taniguchi M, Oyama K, Mukai F, Mannen H. : Genotype of bovine sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1) is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle. *Mammalian genome* 18, 880-886 P, 2007.
- 7) 堀内俊孝 : 牛の体外受精マニュアル, *広島農業の研究* 26, 31-40 P, 1999.
- 8) 今井佳積, 井原紗弥香, 松重忠美, 平野貴, 渡邊敏夫, 杉本喜憲 : 遺伝子型を活用した「広島牛」育種手法の確立に関する研究, *広島県立総技研畜技セ研報* 16, 37-44 P, 2012.
- 9) Inaba M, Yawata A, Koshino I, Sato K, Takeuchi M, Takakuwa Y, Manno S, Yawata Y, Kanzai A, Sakai J, Ban A, Ono K, Maeda Y. : Defective anion transport and marked spherocytosis with membrane instability caused by hereditary total deficiency of red cell band 3 in cattle due to a nonsense mutation. *The Journal of Clinical Investigation*, 91: 1804-1817 P, 1996.

(14)

- 10) Kobayashi N, Hirano T, Murayama S, Matsuno H, Mukoujima K, Morimoto H, Noike H, Tomimatsu H, Hara K, Itoh T, Imakawa K, Nakayama H, Nakamaru T, Sugimoto Y. : Genetic mapping of a locus associated with bovine chronic interstitial nephritis to chromosome 1. *Animal Genetics* 31, 91-95 P, 2000.
- 11) Leoni G, Ledda S, Bogliolo L, Naitana S. Novel approach to cell sampling from preimplantation bovine embryos and its potential use in embryonic genome analysis. *J Reprod Fert.* 119:309-14 P, 2000.
- 12) 小浜菜美子, 秋山敬孝, 岩城史之, 福島護之: ウシ体外受精胚における複数遺伝子診断のためのDNA抽出法と遺伝子増幅法, 兵庫県農技総合セ研報 48, 5-10 P, 2012.
- 13) 尾形康弘, 谷本陽子, 松重忠美, 栗原順三, 今井昭, 堀内俊孝: クローン技術を活用した種雄牛造成の効率化, 広島県獣医学会雑誌 20, 11-15 P, 2005.
- 14) 尾形康弘, 日高健雅, 松重忠美, 堀内俊孝: ウシ胚からの性判別用細胞採取法の開発, 広島県獣医学会雑誌 22, 16-19P, 2007.
- 15) Ogata Y, Hidaka T, Matzushige T, Maeda T. : Comparison of Two Biopsy Methods in Bovine Embryos. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*, 2394-1081 P, Vol 2, Issue1 2015.
- 16) 小川博之: 和牛の第XIII因子欠乏症, *JVM 獣医畜産新報*, 49: 411-412 P. 1996.
- 17) Ohba Y, Kitagawa H, Kitoh K, Asahina S, Nishimori K, Yoneda K, Kunieda T, Sasaki Y. : Homozygosity mapping of the locus responsible for renal tubular dysplasia of cattle on bovine Chromosome 1. *Mammalian Genome* 11, 316-319 P, 2000.
- 18) Setoguchi K, Furuta M, Hirano T, Nagao T, Watanabe T, Sugimoto Y, Takasuga A. : Cross-breed comparisons identified a critical 591-kb region for bovine carcass weight QTL(CW-2) on chromosome 6 and thelle-442-Met substitution in NCAPG as a positional candidate. *BMC Genetics* 10, 43-49 P, 2009.
- 19) 高野博, 新田良平, 加藤容子: 核移植実験系における電気刺激時の温度条件の検討, 繁殖技術会誌 13, 15-19 P, 1991.
- 20) Takasuga A, Watanabe T, Mizoguchi Y, Hirano T, Ihara N, Takano A, Yokouchi K, Fujikawa A, Chiba K, Kobayashi N, Tatsuda K, Oe T, Furukawa-Kuroiwa M, Ogino A, Sugimoto Y. : Identification of bovine QTL for growth and carcass traits in Japanese Black cattle by replication and identical-by-descent mapping. *Mammalian Genome* 18, 125-136 P, 2007.
- 21) Taniguchi M, Utsugi T, Oyama K, Mannen H, Kobayashi M, Tanabe Y, Ogino A, Tsuji S. : Genotype of stearyl-CoA desaturase is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle. *Mammalian Genome* 15, 142-148 P, 2004.
- 22) Thibier M, Nibart M. The sexing of bovine embryos in the field. *Theriogenology* 43, 71-80 P, 1995.
- 23) 堤知子, 窪田力, 加治佐修, 横山喜代志, 川畑憲次: 分割胚双子牛の相似性に関する研究, 鹿児島県畜試研報 28, 7-19 P, 1995.
- 24) Yamakuchi H, Agaba M, Hirano T, Hara K, Todoroki J, Mizoshita K, Kubota C, Tabara N, Sugimoto Y. : Chediak-Higashi syndrome mutation and genetic testing in Japanese black cattle(Wagyu). *Animal Genetica* 31, 13-19 P, 2000.