

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4036356号
(P4036356)

(45) 発行日 平成20年1月23日(2008.1.23)

(24) 登録日 平成19年11月9日(2007.11.9)

(51) Int. Cl.

F I

A O 1 K 67/02 (2006.01)

A O 1 K 67/02

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/00

B

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00

A

請求項の数 6 (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願2000-236147 (P2000-236147)
 (22) 出願日 平成12年8月3日(2000.8.3)
 (65) 公開番号 特開2002-45085 (P2002-45085A)
 (43) 公開日 平成14年2月12日(2002.2.12)
 審査請求日 平成15年10月6日(2003.10.6)

(73) 特許権者 501203344
 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究
 機構
 茨城県つくば市観音台3-1-1
 (73) 特許権者 500362442
 プライムテック株式会社
 茨城県土浦市中向原635番地
 (74) 代理人 100107984
 弁理士 廣田 雅紀
 (72) 発明者 大西 彰
 茨城県つくば市松代4-11-2-424
 -201
 (72) 発明者 花田 博文
 茨城県つくば市松代5丁目713-1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 クローン豚の作出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

サイトカラシンB処理を施した豚の卵子からピエゾマイクロマニピュレーターに取り付けた除核用ピペットを用いて除核し、該除核された卵子に豚の体細胞核を、ピエゾマイクロマニピュレーターに取り付けた体細胞注入用ピペットを用いて注入し、該体細胞核が注入された卵子に活性化処理を施し、活性化処理後の核移植胚をアルギン酸で包埋し、妊娠豚の流産処理後の雌豚の卵管又は子宮に移植することを特徴とする体細胞核直接注入法によるクローン豚の作出方法。

【請求項2】

豚の卵子が豚の体内成熟卵子であることを特徴とする請求項1記載の体細胞核直接注入法によるクローン豚の作出方法。

【請求項3】

体細胞核が胎児線維芽細胞核であることを特徴とする請求項1又は2記載の体細胞核直接注入法によるクローン豚の作出方法。

【請求項4】

体細胞核が細胞周期G₀期に同調させた体細胞から得られる核であることを特徴とする請求項1～3のいずれか記載の体細胞核直接注入法によるクローン豚の作出方法。

【請求項5】

活性化処理が電気パルス活性化処理であることを特徴とする請求項1～4のいずれか記載の体細胞核直接注入法によるクローン豚の作出方法。

10

20

【請求項 6】

活性化処理後の核移植胚をアルギン酸で包埋することを特徴とする請求項 1 ～ 5 のいずれか記載の体細胞核直接注入法によるクローン豚の作出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、体細胞核直接注入法によるクローン豚の作出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

哺乳類の体細胞からのクローン動物の作出は困難と考えられていたが、1996年にCampbellらのグループは羊の胚由来の培養細胞（継代6～13代）を血清飢餓状態にして細胞周期をG₀期とし、この細胞の核を移植することにより産仔の獲得に成功し、ほぼ無限に増やせる培養細胞でもクローン個体を作出することができることを示した(Nature, 380, 64-66, 1996)。1997年、Wilmutらは同様な手法を用いて、培養した乳腺細胞及び線維芽細胞を血清飢餓状態にし、一例ではあるがクローン羊ドーリーの作出を報告した(Nature, 385, 810-813, 1997)。クローン羊ドーリーの作出法は、除核した羊の卵母細胞と雌羊由来の細胞を電氣的に融合することにより核移植するものであるが、かかる細胞融合による核移植では、ドナー細胞の核だけでなく、その細胞質までも卵子に導入されることが避けられないといわれている。その他、細胞融合による核移植に関しては、乳より分離した乳腺由来の細胞をG₀期に同調した後、電氣的融合効率を高めるため30～120分間トリプシン処理を行い、かかる細胞を用いて核移植するクローン牛の作出方法が知られている（特開平11-341935号公報）。

【0003】

他方、体細胞核を除核卵母細胞に直接注入するクローン動物の作出については、若山らがクローンマウスの作出方法について報告している(Nature, 394, 369-374, 1998)。このクローンマウスの作出方法は、未受精卵の透明体に穴を開けてピペットを差し込み、分裂中期の染色体を除去した除核卵母細胞に、過排卵を誘発したマウスから採取した卵丘細胞、セルトリ細胞、神経細胞由来の核を細胞膜を破って直接注入（インジェクション）し、ストロンチウムで活性化処理した後、サイトカラシンBで極体の放出を抑制しながら偽前核を形成させ、この胚を培養した後、偽妊娠雌マウスの子宮に移植する方法である。

【0004】

ところで、豚の心臓や脾臓等の臓器はその大きさからしてヒトの臓器と交換可能性がきわめて高く、クローン豚の作出は異種移植の問題を解決する手段として、また、良質な食肉生産点からも期待されていたが、少なくとも4匹の受精卵が子宮に存しないと妊娠に失敗することから、活力ある数個の胚を用いる必要があること、豚胚は極めて脆く核移植など取扱中に壊れやすいことなど、クローン豚作出上の特有の問題があり、多くの研究者がチャレンジしたがうまくいかなかった。しかし、スコットランドのPPL Therapeutics社のAlan Colmanらは2000年3月にクローン豚を作出したことを記者発表しているが、その詳細についての学術論文は未だ刊行されていない（Science, 288, 1724-1725, 2000）。

【0005】

その他、アルギン酸等による胚の包埋技術としては以下のものが知られている。CB6F1マウス及びゴールデンシリアンハムスターを用いて、インピトロにおける胚卵割率、着床率、生児出生率に関し、齧歯目胚のアルギン酸ナトリウムカプセル化の影響及びインピトロにおけるカプセルの分解速度を調べ、3.0%アルギン酸ナトリウムによる齧歯目動物胚のカプセル化は、胚の発達、着床率、又は生存率に対して悪影響を与えないことや、挿入後48時間以内に分解するので、インピトロにおけるヒトの受精及び胚着床に有用であることが報告されている（FERTILITY AND STERILITY, 59, 652-656, 1993）。ヤギ幼胚の二分割胚の凍結保存における寒天の影響を調べ、二分割胚を寒天で固定したもの又は固定しないものの両方を凍結保存し、解凍後、損傷のないもの及び一部損傷のあるものをレシピエントの子宮に移植したところ、前者では解凍後も損傷を受けていないものが50%の割

10

20

30

40

50

合で得られたが、後者では解凍後も損傷を受けていないものが5%であったことが報告されている (THERIOGENOLOGY, 28, 317-322)。ホルスタイン雌牛の二分割胚の凍結解凍時におけるポリリジン / アルギン酸膜の包埋効果について調べ、二分割胚をポリリジン / アルギン酸膜で包埋すると、対照に比べて高い形態学上のスコアを示すことが報告されている (THERIOGENOLOGY, 29, 262, 1988)。ウサギ胚の凍結解凍におけるアルギン酸カルシウムゲル封入効果について調べ、アルギン酸カルシウムゲル封入胚は対照に比べて、胚の非細胞性成分 (透明帯及びムチン被膜) の損傷の発生が減少し、また解凍後の生存率が向上することが報告されている (THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL ZOOLOGY, 254, 186-191, 1990)。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

前記のように、クローン豚の作出は異種移植の問題を解決する手段として、また、良質な食肉生産点からも重要である。すなわち、クローン豚作出技術と遺伝子組換え技術とを組み合わせることにより、ヒトへの異種移植のためのドナーの供給が可能となり、選択された表現型をもつ豚をクローン技術により増産することは、食肉生産が可能となる。本発明の課題は、効率のよいクローン豚の作出方法を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、分化した細胞から豚のクローンを作成するための方法について種々調査・検討し、除核した卵子に豚の胎児線維芽細胞核を顕微注入し、電気活性化処理により発生を誘発し、かかる活性化処理クローン胚を雌豚の卵管に移植したところ、外見的に正常な雌の仔豚が得られ、毛色による判定とDNAマイクロサテライト分析によって前記仔豚がクローン豚であることを確認し、本発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち、本発明は、サイトカラシンB処理を施した豚の卵子からピエゾマイクロマニピュレーターに取り付けた除核用ピペットを用いて除核し、該除核された卵子に豚の体細胞核を、ピエゾマイクロマニピュレーターに取り付けた体細胞注入用ピペットを用いて注入し、該体細胞核が注入された卵子に活性化処理を施し、活性化処理後の核移植胚をアルギン酸で包埋し、妊娠豚の流産処理後の雌豚の卵管又は子宮に移植することを特徴とする体細胞核直接注入法によるクローン豚の作出方法 (請求項1) や、豚の卵子が豚の体内成熟卵子であることを特徴とする請求項1記載の体細胞核直接注入法によるクローン豚の作出方法 (請求項2) や、体細胞核が胎児線維芽細胞核であることを特徴とする請求項1又は2記載の体細胞核直接注入法によるクローン豚の作出方法 (請求項3) や、体細胞核が細胞周期G₀期に同調させた体細胞から得られる核であることを特徴とする請求項1～3のいずれか記載の体細胞核直接注入法によるクローン豚の作出方法 (請求項4) や、活性化処理が電気パルス活性化処理であることを特徴とする請求項1～4のいずれか記載の体細胞核直接注入法によるクローン豚の作出方法 (請求項5) や、活性化処理後の核移植胚をアルギン酸で包埋することを特徴とする請求項1～5のいずれか記載の体細胞核直接注入法によるクローン豚の作出方法 (請求項6) に関する。

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明における体細胞核直接注入法によるクローン豚の作出方法としては、採取した豚の卵子から除核し、該除核された卵子に豚の体細胞核を注入し、該体細胞核が注入された卵子に活性化処理を施し、活性化処理後の核移植胚を雌豚の卵管又は子宮に移植する方法であれば特に制限されるものではなく、ここで、体細胞核直接注入法とは、体細胞の核を除核細胞に直接注入 (インジェクション) する方法をいい、かかる体細胞核直接注入法には、例えば、プライムテック株式会社製のPMM三次元マイクロマニピュレーションシステム「EMM-7150UD」を用いることができる。

【0010】

上記豚の卵子としては、豚の成熟卵子であれば特に制限されるものではなく、プロスタグランジンF₂、クロプロステノール、絨毛ゴナドトロピン等のホルモン投与による過排

10

20

30

40

50

卵処理により得られる体内成熟卵子の他、屠場由来の卵巢から採取した卵子を体外成熟させたものも使用できるが、着床率の点からして体内成熟卵子、特に性成熟（6ヶ月齢以上）した雌豚から採取した体内成熟卵子が好ましい。かかる体内成熟卵子は、過排卵処理により得られる雌豚の子宮及び卵巢をPBS溶液等を用いて卵管灌流を行うことにより採取することができるが、卵丘細胞が付着している卵子はヒアルロニダーゼ処理を行って、卵丘細胞を除去することが好ましい。

【0011】

上記豚のレシピエント卵子から除核は、細胞骨格形成阻害剤であるサイトカラシンB処理を施した豚の卵子から除核することが好ましく、より具体的にはサイトカラシンBを含有するNC SU 23等の培地で体外成熟卵子等のレシピエント卵子を処理した後、除核操作

10

【0012】

上記体細胞核としては、豚体細胞に由来する核であれば特に制限されるものではないが、例えば胎児線維芽細胞核を好適に例示することができる。特にレシピエントや仮親と毛色の異なる品種の豚をドナーとすることが、毛色からクローン豚であるかどうかを簡便に判定する上で好ましい。また、核移植に用いるドナー細胞の細胞周期は特に制限されるもの

20

【0013】

上記体細胞核の除核されたレシピエント卵母細胞への直接注入は、体細胞の細胞膜を崩壊させて実質的に体細胞核からなる画分を注入することがドナー細胞質の影響を排除して核移植胚の発生を良好にする点で好ましい。これに対して融合法による核の注入は細胞質を

30

【0014】

上記活性化処理としては、従来公知の核移植胚の活性化処理方法であれば特に制限されるものではないが、クローン豚の作出においては電気パルス活性化処理を好適に例示することができる。電気パルス活性化処理としては、電荷の大きい1回の電気パルス、例えば1

40

【0015】

電気パルス活性化処理後のクローン胚を卵管及び子宮に移植する際に、卵管及び子宮の膜運動による損耗を防ぐと同時に、白血球の攻撃からの防御するために、活性化処理後の核

50

移植胚をアルギン酸、寒天等で包埋することが好ましい。かかるアルギン酸等による包埋は、複数被膜、好ましくは3重被膜とし、外層膜ほど高濃度のアルギン酸や寒天とすることが特に好ましく、かかる3重包埋胚を用いると、高い胚盤胞の発生が見られる。アルギン酸被膜で包埋する方法としては所定濃度（例えば0.5%、1.5%、2.0%）のアルギン酸ナトリウム液に核移植胚を馴染ませた後、塩化カルシウム液等のカルシウムイオン含有液と接触させる操作を繰り返すことにより行う方法を挙げることができる。

【0016】

活性化処理後の核移植胚を卵管又は子宮に移植する雌豚としては特に制限されるものではないが、人工授精させた後の妊娠21～40日目にプロスタグランジンF₂等を用いて人工流産させ、同期化を行った雌豚を用いることが好ましい。また、核移植胚を雌豚の卵管又は子宮に移植するに際し、複数個の受精卵を核移植胚に混合して雌豚の卵管又は子宮に移植する追い移植法を用いることが好ましい。

10

【0017】

また産仔した豚ドナー体細胞核由来のクローンであることの確認は、産仔の毛色の他、クローン豚、クローン豚の仮親の耳から採取したDNA並びにクローン豚を作出するために用いた線維芽細胞等の体細胞のDNAを採取し、豚のための特異的なマーカーでマイクロサテライト分析を行い、クローン豚が体細胞と同一の遺伝子を持ち、仮親と異なる遺伝子をもつことを確認することにより同定することができる。

【0018】

【実施例】

20

以下、本発明を実施例等により詳細に説明するが、本発明の技術的範囲は以下の実施例等によって限定されるものではない。

実施例1（クローン豚の作出）

実施例1-1〔体内成熟卵子の採取〕

卵子はランドレース（白色）の雌、又はランドレース×大ヨークシャー×デュロックの三元交雑種（黒斑を有する白色）の雌から採取した。成熟卵子は性成熟（6ヶ月齢以上）又は未成熟の雌豚から採取した。性成熟豚の排卵処理は以下のようにして行った。人工授精から21～40日後の性成熟豚に、まずプロスタグランジンF₂のアナログである(+)-クロプロステノール（住友化学社製「Planate」）0.2mgを筋肉内に注射して流産させた。筋肉内注射の24時間後に、クロプロステノール0.2mgとウマ絨毛ゴナドトロピン（eCG）1500単位を共に筋肉内に注射した。eCGを注射してから72時間後にヒト絨毛ゴナドトロピン（hCG）500単位を筋肉内に注射することにより過排卵処理を行った。一方、未性成熟雌豚の排卵処理は以下のようにして行った。1500単位のeCGのみを筋肉内に注射し、その72時間後に500単位のhCGを筋肉内に注射することにより過排卵処理を行った。これら過排卵処理を行った雌豚は、hCGを投与してから45時間後に屠殺し、子宮及び卵巣を採取した。0.1%BSAを加えたカルシウム、マグネシウムを含まないダルベッコのPBS溶液を用いて卵管灌流を行って体内成熟卵子を採取した。卵丘細胞が付着している卵子はヒアルロニダーゼ処理を行って、卵丘細胞を除去した。採取した体内成熟卵子は培養液（NC SU 23）で38.5、5%CO₂インキュベーターで核移植操作まで培養した。

30

40

【0019】

実施例1-2〔除核操作〕

上記実施例1-1で得られたレシピエント卵子（体外成熟卵子）を、5μgサイトカラシンB/1ml培養液（NC SU 23）に入れて15分以上処理した後、核移植（除核操作）用シャーレのサイトカラシン入りドロップに卵子を移し、第一極体の位置が12時、3時、6時のいずれかにくるようにホールディングピペットで保定し、ピエゾマイクロマニピュレーター（プライムテック株式会社製）に取り付けた除核用ピペット（外径25～30μm）を用いて透明帯を迅速に貫通することにより、M（metaphase）II期の染色体を含む第一極体の付近を極体ごと細胞質の1/4～1/3程吸引した。除核処理は、室温下でサイトカラシンBが5μg/ml入りNC SU 23培養液中で10～15個ずつの卵子

50

を処理した。吸引した極体と細胞質を別の5 μ gヘキスト33342 / 1ml培養液(NCSU23)のドロップに移し、15分後にUVによる蛍光顕微鏡観察を行い、除核できていることを確認した。除核ができた卵子は、直ちにサイトカラシンBの含まれていない培養液NCSU23で丁寧に洗浄し、サイトカラシンを除核卵子から除去し、38.5、CO₂インキュベーターに戻して培養した。

【0020】

実施例1-3 [胎児線維芽細胞の分離]

梅山豚雌の発情周期を把握した上で人工授精し、妊娠24日目の梅山豚×梅山豚(黒色)を屠殺して子宮より一匹の胎児を採取し、頭部と内臓を除去した後、細切し、トリプシン処理で細胞を分散させた後、3時間4℃で0.25%トリプシンと1mMのEDTAを含むPBS溶液で培養した後、10%FCSを含むDMEMで洗浄して初代培養細胞を得た。細胞培養は10%FCS入りのDMEMで行い、細胞が飽和状態になる度に2~6回の植え継ぎを行い、高密度に細胞をまくことにより安定をはかった(参考写真1参照)。核移植に用いたドナー細胞としては、飽和状態で培養液の交換なしに16日間培養し続けることによってG₀期になったものをを用いた。培養細胞は、3日後ではPCNAで陽性反応を示すが、10日後には免疫反応がなくなるので16日目にはG₀期になったことが証明された。かかる培養細胞が線維芽細胞であることは、培養細胞がサイトケラチンとSSEA-1で陰性反応を示し、ビメンチンで強い陽性反応を示すことにより確認し、胎児の雌雄判別は線維芽細胞の特異的ZFY/SRYプライマーによるPCR分析によって行った。また、それぞれの培養細胞の核型が正常であることはG染色で確認した。

【0021】

実施例1-4 [胎児線維芽細胞の準備]

核移植予定日(16日前)に合わせて、新しい培養液(10%FCS入りDMEM)に植え継ぎ、37℃、5%CO₂で培養し、放置した。核移植直前に、ドナー体細胞である休止状態の胎児線維芽細胞をPBSで洗浄し、次いで0.25%トリプシンを用いて細胞を浮遊させた(参考写真2参照)後、トリプシンを10%FCS入りDMEMで不活化し、遠心後(1000rpm, 5min)、上清を除き核移植に用いる培養液(NCSU23)に再浮遊させ、核移植(体細胞核注入)用シャーレのドロップに適量体細胞を浮遊させておいた。

【0022】

実施例1-5 [体細胞核の注入]

実施例1-2の除核処理を行った卵子を、胎児線維芽細胞が浮遊したシャーレの1つのドロップに10~15個ずつ入れて体細胞核注入操作を行った。ピエゾマイクロマニピュレーター(プライムテック株式会社製)に取り付けた体細胞注入用ピペット(外径7~10 μ m)により、浮遊している体細胞を丁寧に数回ピペッティングすることにより細胞膜を崩壊させて実質的に体細胞核からなる画分を、除核操作による卵子の透明帯の穴に注意しながらホールディングピペットにより保定された除核卵子の細胞質内に注入した。ピエゾマイクロマニピュレーターは、透明帯の貫通が簡単にでき、細胞質膜へのダメージを最小にすることができた。また、マニピュレーションの間、インジェクションピペットは、15%PVPを含むNCSU23培養液のドロップでまめに洗浄した。注入後、予め準備しておいた培養用ドロップ(NCSU23)に移し、次の活性化処理までの3~4時間、インキュベーター(38.5℃、5%CO₂)で培養しておいた。

【0023】

実施例1-6 [電気パルス活性化処理]

上記体細胞核が注入された卵子をNCSU23で培養し、hCG投与54~55時間後に電気パルス活性化処理をSSH-2融合装置(shimadzu社製)を用いて行った。まず、室温放置した電解質溶液(0.01%のBSA、0.05mMのCaCl₂、0.1mMのMgSO₄添加0.28Mマニトール溶液)の入ったシャーレを2枚と2mm幅ステンレスワイヤー電極のチャンパーを用意し、1枚目のシャーレの電解質溶液に卵子を浸して馴染ませ、さらに2枚目の電解質溶液入りのシャーレに移して馴染ませた。卵子が電解質

10

20

30

40

50

溶液に馴染んだ後、2 mm幅ステンレスワイヤー電極のチャンバーに卵子を並べ、電気パルスによる活性化処理を表1記載の条件で実施した。電気パルスによる活性化処理後、極体の放出防止のため活性化した胚を細胞骨格形成阻害剤であるサイトカラシンBに浸した。すなわち、5 μ g/ml サイトカラシンBを含むNC SU 23で2時間培養を行い、第二極体放出の抑制処理を行った。次に、サイトカラシンBを含まないNC SU 23で丁寧に洗浄し、発生培養用ドロップ (NC SU 23) で活性化後40時間培養した。電気パルスによる活性化処理後、NC SU 23培地に代えて、BECM3培地 (Biol.Reprod., 55, 1069, 1996) 及びmWM培地 (J.Anim.Sci., 71, 1561, 1993) を用いてそれぞれ同様に活性化した胚を培養した。電気パルス活性化処理後の卵母細胞の生存率の結果を表1に示す。

【0024】

【表1】

培地	電気パルス活性化処理 強度×時間×回数	供試 卵子数	分割した卵子数 (%)	胚盤胞形成数 (%)
BECM3	1.5kV/cm×100 μ sec×1	105	73(69.5)	16(15.2)
	1.3kV/cm×60 μ sec×3	101	78(77.2)	11(10.9)
mWM	1.5kV/cm×100 μ sec×1	101	61(60.4)	4(4.0)
	1.3kV/cm×60 μ sec×3	96	60(62.5)	1(1.0)
NC SU 23	1.5kV/cm×100 μ sec×1	109	99(90.8)	34(31.2)
	1.3kV/cm×60 μ sec×3	103	89(86.4)	22(21.4)

【0025】

表1からわかるように、電荷の大きい1回の電気パルスを印可した場合、それより小さい電荷の電気パルスを2回印可した場合よりも良好な胚活性を示し、さらに、培養液の違いによる発生の影響では、NC SU 23を用いた場合に最も高い胚盤胞形成率が得られた。これらの結果から、クローン作出には、1.5kV/cm、100 μ sec、1回の電気パルスを活性化条件とし、NC SU 23で培養することにした。またこれと同条件で、体内成熟卵子と体外成熟卵子の発生能を比較した。167個の体外成熟卵子を活性化した結果、48時間までに116個が分割したが、胚盤胞にまで至ったのはわずかに4個(2.4%)だけであった。この値2.4%は、表1に示される対応する体内成熟卵子の値(31.2%)より有意に低かった。以上の実験結果から、体内成熟卵子をクローン作出に用

【0026】

実施例1-7 [仮親への胚移植]

豚胚はたとえ体外培養で胚盤胞まで発生しても仮親の子宮角に移植した後の発生能は乏しい (Biol.Reprod., 59, 451, 1998)。さらに豚の着床には4個以上の胚が必要であると言われ、通常の受精卵の存在がクローン胚の発生を助けると考えられたので、子宮内でのクローン胚の発生を助ける受精卵の能力を調べるために2つの試験区を組んだ。クローン胚を仮親に移植する前の体外培養を20時間(試験区A、1-細胞期胚)又は40時間(試験区B、2-4細胞期胚)行い(参考写真3参照)、その後仮親に移植した。仮親は以下のように予め調整した。ランドレース×大ヨークシャー×デュロックの三元交雑種の雌豚6頭に、ランドレース精液で人工授精し、その妊娠21~40日目に0.2mgのクロプロステノールを注射することにより流産させ、その注射の24時間後に0.2mgのクロプロステノールと1000単位のeCGを筋肉内に注射した。eCG注射後72時間後にhCG500単位を注射した。hCG投与後24時間でランドレース精液による人工授精を行い、クローン胚を卵管移植する際に、片方の卵管を洗い流した。クローン胚のインピトロにおける発生及びその後の仮親での結果を表2に示す。表2からもわかるように、96個のクローン胚と仮親3頭を用いた試験区Aからの産仔9頭、及び63個のクローン胚と仮親3頭を用いた試験区Bからの産仔24頭は、いずれも毛色は白色で、クローン豚ではなかった。

【0027】

10

20

30

40

50

【表 2】

試験区	生存 卵子数	活性化後 生存数	発生した胚数				移植胚の数 (仮親数)	産仔数 (毛色)
			1細胞期	2細胞期	4細胞期	8細胞期		
A	108	102	99	3	0	0	96(3)	9(white)
B	120	107	44	24	20	19	63(3)	24(white)
C	210	188	78	50	58	2	110(4)	1(black)

【0028】

そこで、試験区Cとして、2～6回植え継いだ線維芽細胞から得た110個の2 - 8細胞期クローン胚を4頭の仮親に、通常の受精卵を存在させずに移植した。すなわち、ランドレース×大ヨークシャー×デュロックの三元交雑種の雌豚6頭に、ランドレース精液で人工授精し、その妊娠21～40日目に0.2mgのクロプロステノールを注射することにより流産させ、その注射の24時間後に0.2mgのクロプロステノールと1000単位のeCGを筋肉内に注射した。eCG注射後72時間後にhCG500単位を注射した。hCGを投与してから、48又は68時間後に卵管移植を行った。4頭の仮親のうち3頭は、移植後27, 35, 61日目に発情が帰って来た。遅くなった発情回帰は、豚の発情サイクルが21日周期であることから、それぞれの仮親が妊娠していたことを示している。胚の子宮着床は豚のE13 - 14で起こり、妊娠していたはずの2頭は胎盤形成後に発生が終わっていた。妊娠を維持していた試験区Cでの4番目の仮親の卵管移植したクローン胚は植え継ぎ2回目の線維芽細胞から得られたものであり、これらの胚の1つから黒色の毛色をもつ子豚が自然分娩で産まれた。生誕時の子豚の体重は1.2kg、胎盤重量は0.3kgであり、両値とも通常の子豚の正常な値の範囲内であった。また、いくつかのクローン牛の例では胎盤異常が現れ、顕微注入法によるクローンマウスでは通常マウスより胎盤が大きくなるという報告があったが、この子豚に付いていた胎盤は、外見上ばかりでなく解剖学的にも正常であった。このクローン豚をXenaと名付けた(参考写真4参照)。

【0029】

Xenaは梅山豚×梅山豚の核遺伝子由来のクローンであると予測できる黒色の毛色をもつ健康な雌の子豚であり、この由来を確認するため、Xena及びXenaの仮親であるランドレースの耳から採取したDNA並びにXenaを作出するために用いた線維芽細胞のDNAを採取し、豚のための特異的な23のマーカーでマイクロサテライト分析を行った。サンプルは、Geno Typer Softwareによる373A オートシーケンサーで調べた。マーカーは SW286、SW840、SW957、SW133、SW274、SW373、SW491、SW741、SW839、SW742、SW1327、SW1311、SW122、SW435、SW540、SW942、SWR1021、SW1399、SW249、SWR426、SWR524、SWR414、SW717を用いた。3つのマーカーのセットSW133、SW274、SWR1021からのデータは判定できなかったが、結果が判定できたマーカーの全てで、クローン子豚Xenaと線維芽細胞が同一の遺伝子を持ち、ランドレースである仮親と異なる遺伝子をもつと同定することができた。

【0030】

実施例2(クローン豚の作出)

実施例2-1[アルギン酸3重包埋法]

上記実施例1-6で得られた電気パルス活性化処理後のクローン胚を卵管及び子宮に移植する際に、卵管及び子宮の膜運動による損耗を防ぐと同時に、白血球の攻撃からの防御を目的として、以下のようにアルギン酸3重包埋法をクローン胚に適用した。まず、アルギン酸ナトリウムを所定濃度(0.5%、1.5%、2.0%)となるようにリンゲル液に溶かしてオートクレーブ滅菌し、包埋液を調製した。電気パルス活性化処理後40時間の核移植胚をリンゲル液(37℃)に移し、ピペッティング等を行いよく馴染ませた後、0.5%アルギン酸ナトリウムを含む包埋液に移し、よく馴染ませてからなるべく胚を密集

10

20

30

40

50

させた状態で吸引し、滅菌済みの110 mM塩化カルシウム液にゆっくりと吐出し、固まった胚入りのアルギン酸ナトリウムを吸引し、次に1.5%アルギン酸ナトリウムを含む包埋液に移し、よく馴染ませてからなるべく胚を密集させた状態で吸引し、滅菌済みの110 mM塩化カルシウム液にゆっくりと吐出し、固まった胚入りのアルギン酸ナトリウムを吸引し、続いて2.0%アルギン酸ナトリウムを含む包埋液に移し、よく馴染ませてからなるべく胚を密集させた状態で吸引し、滅菌済みの110 mM塩化カルシウム液にゆっくりと吐出し固化させた。

【0031】

上記包埋処理は37℃の温度条件下で行われ、アルギン酸で3重包埋された核移植胚は移植まで培養液に移しておいた。活性化処理2日後の卵管移植の際、子宮卵管接合部を皮膚縫合用ナイロン糸で結びアルギン酸包埋胚が子宮に落ちないようにし、3日後にアルギン酸包埋胚を回収し、その発生状況を確認し、発生が良好なものを子宮角上端に最終移植した。その結果、包埋なしで子宮から回収した胚は、明らかに白血球に攻撃されており、また、卵管、子宮内の膜の運動により胚に負担がかかり胚の細胞質が飛び出て、透明帯だけ回収というものも多数見られた。一方、3重包埋した胚は、回収率も100%に近い値を示し、また発生率(Blast, Morula)も良好な値(約20%)を示した。

10

【0032】

実施例2-2 [仮親への胚移植]

実施例2-1で得られたアルギン酸3重包埋胚を仮親への胚移植に用いた。外科的胚移植7日前に妊娠豚2頭に対して、クロプロステノール2 mlを臀部に注射して流産させた。外科的胚移植6日前に妊娠雌豚に対して、クロプロステノール2 mlとPMSG1500 IUを臀部に注射し、注射の72時間後、hCG500 IUを臀部に注射した。2頭のうち1頭はhCG投与してから24時間後に人工授精し、外科的胚移植を行う前に受精卵を回収し、この回収した受精卵4~5個をアルギン酸3重包埋核移植胚に混合して、2頭のうちの他の雌豚の卵管に移植した。

20

【0033】

【発明の効果】

本発明によると、異種移植の問題を解決する手段として、また、良質な食肉生産点からも重要であるクローン豚を作出することができる。そして、本発明のクローン豚の作出技術と遺伝子組換え技術とを組み合わせることにより、ヒトへの異種移植のためのドナーの供給が可能となり、また、選択された表現型をもつ豚をクローン技術により増産することにより食肉生産が可能となる。

30

フロントページの続き

- (72)発明者 岩元 正樹
茨城県土浦市荒川沖 2 3 5 - 1 エクセル武井 2 0 3
- (72)発明者 三松 淳
茨城県土浦市霞ヶ丘 1 0 - 3 0

審査官 柴原 直司

- (56)参考文献 特開平 1 1 - 3 4 1 9 3 5 (J P , A)
国際公開第 9 5 / 0 3 4 6 3 6 (W O , A 1)
国際公開第 9 9 / 0 4 6 9 8 2 (W O , A 1)
特表 2 0 0 0 - 5 0 6 7 2 2 (J P , A)
特開平 0 6 - 0 1 4 9 4 5 (J P , A)
特表平 0 9 - 5 0 8 2 7 7 (J P , A)
特開平 0 2 - 2 6 9 5 8 3 (J P , A)
特開平 0 4 - 2 0 7 9 8 2 (J P , A)
特開平 0 4 - 0 4 1 1 8 7 (J P , A)
特開平 1 1 - 2 8 9 9 1 6 (J P , A)
阿蘇シンポジウム記録, (2000), 23rd, p.67-79

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A01K 67/02
C12N 15/00-15/90
C12N 5/10
PubMed
JSTPlus(JDream2)