

体細胞由来クローン編

体細胞由来クローン編

体細胞由来クローンは、胎子体細胞由来クローンおよび成体となった動物から採取した体細胞由来クローンであり、いわば分化細胞をドナー細胞（核）に用いたものである。

ドナー細胞として用いる体細胞は培養や増殖ならびに凍結保存が容易で、コンタミにさえ気を付ければ必要に応じて大量に確保できる。

1. タイムスケジュール

日程 (成熟培養開始後)	主 な 作 業 手 順	
0 日 目 (0時間)	卵巣採取 ↓ レビエント卵子採取 ↓ 成熟培養	生理食塩水 (25℃) で保存, 運搬 3%CS加m-PBS 5%CS加TCM-199 [Earle's] (38.5℃, 2%CO ₂ in air)
1 日 目 (18~22時間)	卵丘細胞除去 ↓ 透明帯切開 ↓ 除核	0.5%ヒアルロニターゼ [®] 加M2 5%CS加TCM-199 [Earle's or Hank's] 5μg/mlサイトカリンB+20%CS加m-PBS
(22~24時間)	(ドナー細胞の調整)	トリプシン (0.05%) で体細胞遊離
(24~25時間)	インジェクション	5%CS加TCM-199 [Earle's or Hank's]
(24~25時間)	電気融合 ↓ ↓	Zimmerman融合液 (DC 15~25V/150μm, 1回)
	活性化処理 (Caイノゾール) ↓	5μMイノゾール+0.1%PVA加m-PBS
	シクロヘキシミド [®] 処理 ↓	10μg/mlシクロヘキシミド [®] +5%CS加TCM-199 (38.5℃, 5%CO ₂ in air, 5h)
(30時間)	発生培養	5%CS加CR1aa (38.5℃, 5%CO ₂ in air, 7~9日間)
3 日 目	初期発生検査	初期発生検査
8 ~ 10 日 目	胚盤胞発生検査	胚盤胞発生検査 移植, 凍結

2. レシピエント卵子の採取と成熟培養

P15～17の受精卵由来クローン編「2. レシピエント卵子の採取と成熟培養」と同様（省略）

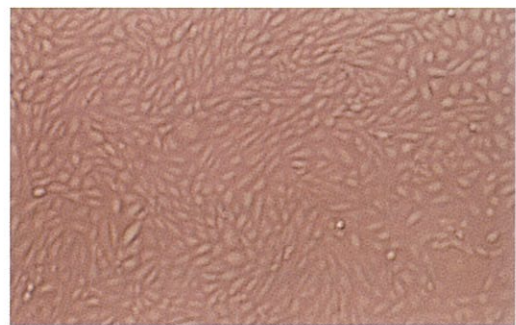
3. レシピエント卵子の調整

P18～21の受精卵由来クローン編「3. レシピエント卵子の調整」と同様（省略）

4. ドナー細胞の調整

準備：0.5%FCS加DMEM, PBS(-), 0.05%トリプシン液(0.05% Trypsin—0.53mM EDTA in PBS(-))

- ①培養細胞がシートした培養シャーレの培養液(10%FCS加DMEM)を、アスピレーターで吸引し浮遊細胞を取り除く。
- ②培養シャーレにPBS(-)を加えてアスピレーターで吸引し、2～3回程度シャーレ内をリンスする。
- ③PBS(-)を全てアスピレーターで吸引し、0.05%トリプシン液を加えて培養細胞のシャーレへの付着が弱くなるまで、ホットプレート上で約1～2分間保温する。
- ④培養細胞が培養シャーレの底面から剥離し始めていることを確かめる。剥離状況が少なければ攪拌棒を用いて培養細胞を剥離する。
- ⑤マイクロピペットで培養シャーレ内をピペッティングしながら培養細胞を単離し、0.05%トリプシン液を遠沈管に入れる。
- ⑥0.5%FCS加DMEMを0.05%トリプシンと同量以上加えてボルテックスし、1000rpm(約181G)で5分間遠心分離する。
- ⑦遠沈管の上清液をアスピレーターで除去し、新たに0.5%FCS加DMEMを加えてピペッティングし、ボルテックスにより良く混和した後、再び遠心分離する。
- ⑧再び遠沈管の上清液を除去した後、適当な濃度になるよう0.5%FCS加DMEMを加えてピペッティングにより良く混和する。



コンフルエント状態



培養細胞を単離

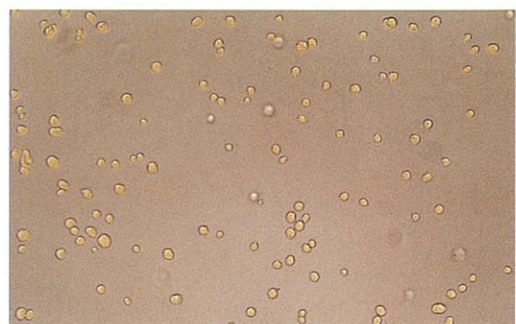


写真10. 培養細胞(卵管上皮)

※培養細胞(主に上皮細胞や繊維芽細胞)を用いる場合、細胞同調(G0期)のため血清飢餓培養が必要とされてきたが、細胞の付着状況によって(例えばコンフルエント状態)は必ずしも必要であるとは限らない。

5. インジェクション

準備：インジェクション用シャーレ（φ60mm, 5%CS加TCM-199, 2～3μl×9個）、洗浄用シャーレ（φ35mm, 5%CS加TCM-199,

- ①インジェクション用マイクロツールをマイクロマニピュレーターにセットする。
- ②インジェクション用シャーレに、除核したレシトント卵子を（1ドロップあたり15～20個程度）移す。
- ③同様に、単離済みのドナー細胞を別のドロップに入れる。
- ④インジェクション用シャーレをマイクロマニピュレーターにセットする。
- ⑤インジェクションピペットにドナー細胞（約10個）を吸引する。
- ⑥レシトント卵子の切開部位を、2時の方向になるよう誘導し、ホルディングピペットで保定する。
- ⑦ドナー細胞を吸引したインジェクションピペットを、レシトント卵子の切開部からさし入れ、3時の方向から12時の方向に挿入する。
- ⑧1個のドナー細胞を卵胞腔内に入れ、インジェクションピペットを抜く。このとき、レシトント卵子とドナー細胞の細胞膜同士が密着するようにする。
- ⑨インジェクションを終えたレシトント卵子は、5%CS加TCM-199の入った洗浄用シャーレで1回洗浄後、5%CS加TCM-199中に移し、インキュベーター内（38.5℃、5%CO₂ in air）で一時保存する。

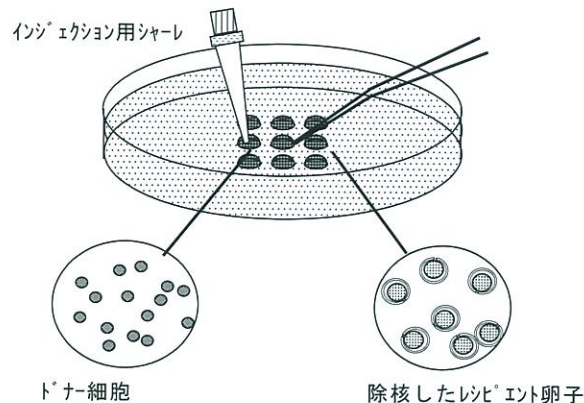


図25. インジェクション用シャーレへのレシトント卵子ならびにドナー細胞の導入

※体細胞をドナー細胞に用いた場合、初期胚ドナーの割球に比べて小さく、シャーレやインジェクションピペットに付着しやすいなど取扱いづらいことが多い。インジェクションに用いる体細胞は、単離後の形状が球形で小さく、且つ細胞膜が明瞭なものを選別するようにする。

6. 電気融合

準備：融合液 (Zimmerman), 融合用シャーレ (φ90mm), 4 穴シャーレ, 洗浄用シャーレ (φ35mm), ホール型電極, 5%CS加TCM199

- ①～⑤は、P23の受精卵由来クローン編「5. 活性化処理 (電気処理)」の①～⑤と同様。(但し 1 穴あたり 15 個程度とする)
- ⑥融合用シャーレに、融合液で約 40 μ l のドロップを作る。
- ⑦融合用シャーレのドロップに、平衡済みのレビメント卵子 15 個程度 (1 穴分) を移す。
- ⑧ドナー細胞とレビメント卵子細胞質の細胞膜が、確実に接触するよう且つ一直線に並ぶようにホール型電極で左右から挟み込み、交流電流 (10 $\sim$ 12V $\times$ 1sec), 直流電流 (15 $\sim$ 25V, 20 $\sim$ 50 μ sec $\times$ 1回) を流す。
- ⑨電気融合処理後、融合用シャーレのドロップに融合液と同量程度の 5%CS加TCM-199 を下方からゆっくりと吹きかけ、約 1 分間平衡する。
- ⑩5%CS加TCM-199 の入った洗浄用シャーレで 1 回洗浄して、5%CS加TCM-199 中で約 30 分間インキュベートする。

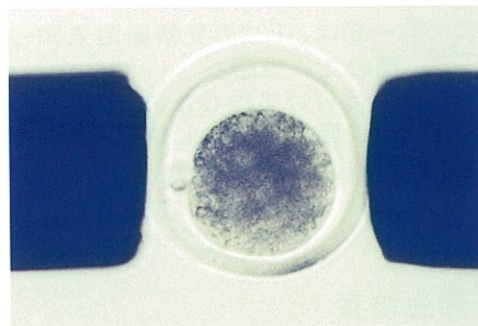


写真11. ホール型電極

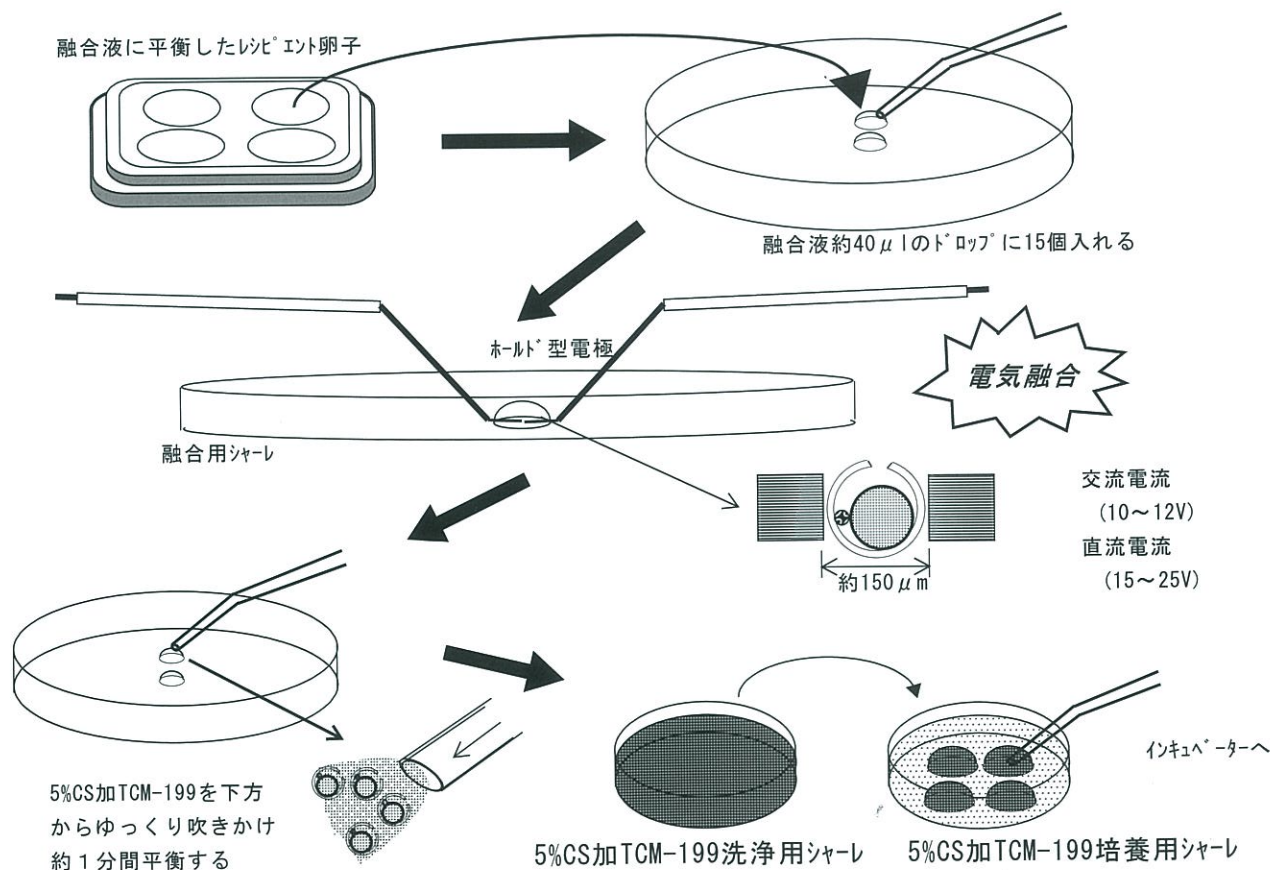


図26. ホール型電極による電気融合

7. 活性化処理 (Caイオノフォア処理)

準備：P22の受精卵由来クローン編「4. 活性化処理 (Caイオノフォア処理)」と同様のため省略

①～⑥は、P22の受精卵由来クローン編「4. 活性化処理 (Caイオノフォア処理)」の①～⑥と同様のため省略。

⑦Caイオノフォア処理したレシピエント卵子は、シクロヘキシミド洗浄用シャーレで2回洗浄して、シクロヘキシミド培養用シャーレのドロップに移し、インキュベーター内 (38.5℃、5%CO₂ in air) で5時間培養する。

8. 発生培養

準備：CR1aa洗浄用シャーレ (φ 35mm, 5%CS加CR1aa), CR1aa培養用シャーレ (φ 35mm, 5%CS加CR1aa)

①CR1aa洗浄用シャーレで2回洗浄する。この操作は、成熟培養開始約30時間後 (シクロヘキシミド処理開始5時間後) にあたる。

②洗浄後、5%CS加CR1aa培養用ドロップに移し、インキュベーター内 (38.5℃、5%CO₂ in air) で7～9日間発生培養する。

1)～3)は、P27の受精卵由来クローン編「9. 発生培養」と同様のため省略。

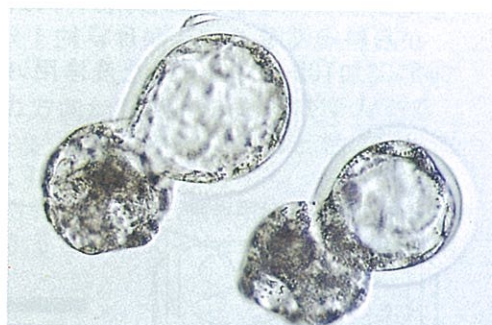


写真12. 体細胞由来核移植の胚盤胞期胚



写真13. 体細胞由来クローン産子 (ジャージー種とホルスタイン種)

各種溶液の調製と培地の準備

各種溶液の調製と培地の準備

1. ストック試薬の調製

1) M2液 [調製量 100ml]

塩化ナトリウム	NaCl	0.568	g
塩化カリウム	KCl	0.0356	g
リン酸二水素カリウム（無水）	KH_2PO_4	0.0162	g
硫酸マグネシウム（7水和物）	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0293	g
重炭酸ナトリウム	NaHCO_3	0.0349	g
Hepes		0.4969	g
乳酸ナトリウム		0.261	g
(60%溶液の場合：0.4349g)			
ピルビン酸ナトリウム		0.0036	g
ブドウ糖 (Glucose)	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	0.1	g
B S A (Crystallized, Sigma A-4378)		0.4	g
フェノールレッド		0.001	g
(0.5%溶液の場合：0.2ml)			

以上を1/10N水酸化ナトリウム(NaOH)溶液でPH調整(PH7.2~7.4)の後、超純水で100mlにメスアップして0.22 μm フィルターで濾過滅菌し、スピッツ管に分注して冷凍保存する。

2) 抗生物質（PC-SM混合液） [調製量 1ml] 《調製後約1週間使用可能》

ペニシリン（結晶ペニシリンGカリウム明治、10万単位）	1	本
ストレプトマイシン（硫酸ストレプトマイシン明治、1g力価入）	0.1	g
m-PBS	1	ml

- ①ストレプトマイシン(SM)を0.1g秤量し、ペニシリン(PC)10万単位が入っている小瓶に入れる。
 - ②蓋をしてパラフィルムで覆い、冷蔵保存する。
 - ③使用時に、m-PBS 1mlを加えて混和溶解し、冷蔵保存する。
- ※各種培養液への添加量は、PC-SM混合液が1000倍希釈されるようにする。

3) ヒアルロニダーゼストック [調製量 50ml]

ヒアルロニダーゼ (HYALURONIDAZE)	0.25	g
M2液	50	ml

以上を溶解して0.22 μm フィルターで濾過滅菌し、4~5mlずつ滅菌チューブに分注して冷凍保存する。

4) サイトカラシンBストック [調製量 2ml]

サイトカラシンB (CYTOCHALACIN B)	10 mg
DMSO	2 ml

以上を溶解し、15 μ lずつマイクロチューブに分注して冷凍保存する。

5) シクロヘキシミドストック [調製量 10ml]

シクロヘキシミド (CYCLOHEXIMIDE)	10 mg
TCM-199	10 ml

以上を溶解し、250 μ lずつマイクロチューブに分注して冷凍保存する。

6) Caイオノフォアストック [調製量 1.91ml]

Caイオノフォア (CALCIUM IONOPHORE)	10 mg
DMSO	1.91 ml

以上を暗所で溶解し、10 μ lずつマイクロチューブに分注して冷凍保存する。

※Caイオノフォアは遮光の必要があるため、分注したマイクロチューブを各々アルミホイルで包む。

7) ヘキスト染色液

ヘキスト (H33342, 1mg/ml in PBS(-))	10 μ l
m-PBS	1 ml

以上を使用時に混和し、遮光する。

2. 培養液の調製

1) 修正ダルベッコPBS (D-PBS+ピルビン酸ナトリウム+グルコース)

[調製量 1,000ml]

《調製後約1週間使用可能》

a) 塩化ナトリウム	NaCl	8.0	g
b) 塩化カリウム	KCl	0.2	g
c) リン酸一水素ナトリウム (無水)	Na ₂ HPO ₄	1.15	g
d) リン酸二水素ナトリウム (無水)	KH ₂ PO ₄	0.2	g
e) 塩化カルシウム (無水)	CaCl ₂	0.1	g
f) 塩化マグネシウム (六水和物)	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.1	g
g) ブドウ糖 (Glucose)	C ₆ H ₁₂ O ₆	1.0	g
h) ピルビン酸ナトリウム		0.036	g

※ a)～d) : PBS(－) 予め調製済みの粉末あるいは錠剤(宝酒造 T900)が市販されている。

a)～f) : PBS(＋) 予め調製済みの培養液が市販されている。

a)～h) : m-PBS 予め調製済みの培養液(GIBCO 12350-021)が市販されている。

- ①超純水約700mlに、PBS(－)(上記 a)～d))を添加し、マグネティックスターラーを用いて溶解する(A液)。
- ②超純水約100mlに、e)及び f)を溶解し、良く攪拌する(B液)。
- ③A液を攪拌しながら、B液を少量ずつ4～5回に分けて添加し、PBS(＋)とする。
- ④約800mlのPBS(＋)に g)及び h)を加え、完全に溶解して超純水で1,000mlにメスアップする。
- ⑤0.22μmのフィルターで濾過滅菌し、500mlの滅菌ボトルに入れ冷蔵保存する。

2) 3%CS加m-PBS [調製量 100ml]

m-PBS	97	ml
CS (Calf Serum)	3	ml
抗生物質 (PC-SM混合液)	100	μl

- ①メスシリンダーにm-PBS 97mlを入れ、CS 3ml、抗生物質 100μlを添加して、パラフィルムで蓋をして覆い、転倒混和する。
- ②0.22μmのフィルターで濾過滅菌し、100mlの滅菌ボトルに入れてインキュベーター内で密栓して保温する。

3) 5%CS加TCM-199 [調製量 50ml]

TCM-199 (25mM Hepes緩衝)	47.5	ml
CS (Calf Serum)	2.5	ml
抗生物質 (PC-SM混合液)	50	μl

- ①メスシリンダーに25mM Hepes緩衝TCM-199液を47.5ml入れ、CSを2.5ml、抗生物質を50μl添加し、パラフィルムで蓋をして覆い転倒混和する。
- ②0.22μmのフィルターで濾過滅菌し、50mlのカルチャーフラスコに入れて38.5℃、5%CO₂ in airのインキュベーター内で蓋をあけて保温する。

4) C R 1 a a

予めA液, B液の2種のストック液を作製しておく。

☆A液 [調製量 760ml] 《調製後1ヶ月間冷蔵保存可能》

塩化ナトリウム	NaCl	6.7031	g
塩化カリウム	KCl	0.2311	g
ピルビン酸ナトリウム		0.0440	g
重炭酸ナトリウム	NaHCO ₃	2.2011	g
フェノールレッド (0.5%溶液)		2.0	ml

以上を超純水に順次溶解し、760mlまでメスアップした後、0.22 μ mのフィルターで濾過滅菌する。

☆B液 [調製量 200ml] 《調製後1ヶ月間冷蔵保存可能》

L(+)-Lactic Acid Hemicalcium Salt	0.5996	g
-----------------------------------	--------	---

超純水に溶解し、200mlまでメスアップした後、0.22 μ mのフィルターで濾過滅菌する。

★C R 1 a aの調製 [調製量 100ml] 《調製後1週間冷蔵保存可能》

A液	76	ml
B液	20	ml
BME Essential Amino Acids (x50)	2	ml
MEM Nonessential Amino Acids (x100)	1	ml
L-Glutamic Acid (17mg/ml20mgを超純水10mlで溶解)	1	ml
BSA (Fatty acid free, SIGMA A-7030)	0.3	g
抗生物質 (PC-SM混合液)	100	μ l

以上を転倒混和 (BSA添加時は静置融解) し、0.22 μ mのフィルターで濾過滅菌する。

5) 5%CS加C R 1 a a [調製量 100ml]

C R 1 a a	97.5	ml
CS (Calf Serum)	2.5	ml

以上を転倒混和し、0.22 μ mのフィルターで濾過滅菌する。

6) 20%CS加m-PBS [調製量 50ml]

m-PBS	40	ml
CS (Calf Serum)	10	ml
抗生物質 (PC-SM混合液)	50	μ l

以上を転倒混和し、0.22 μ mのフィルターで濾過滅菌する。

3. 核移植用試薬の調製と培地の準備（当日に準備する）

1) 融合液 (Zimmerman cell fusion medium) [調製量 100ml]

ショ糖 (Sucrose)		9.5840	g
酢酸マグネシウム (4水和物)	$\text{Mg}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.0107	g
酢酸カルシウム	$\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$	0.0016	g
Potassium Phosphate	K_2HPO_4	0.0174	g
Glutathione		0.0031	g
B S A (Fatty acid free, SIGMA A-7030)		0.0010	g

- ① 以上を超純水で100mlにメスアップし、マグネティックスターを用いて溶解する。
- ② 0.22 μm のフィルターを用いて濾過滅菌し、100mlの滅菌ボトルに入れて室温(25℃)下に置く。

2) 5%CS加TCM-199 [調製量 50ml]

- ① 培養液の作製はP. 38の「2. 培養液の作製の3)5%CS加TCM-199」と同様。
- ② 洗浄用シャーレ、透明帯切開用シャーレおよびインジェクション用シャーレ(体細胞由来の場合)を作製する。
- ③ それぞれのシャーレをインキュベートする。

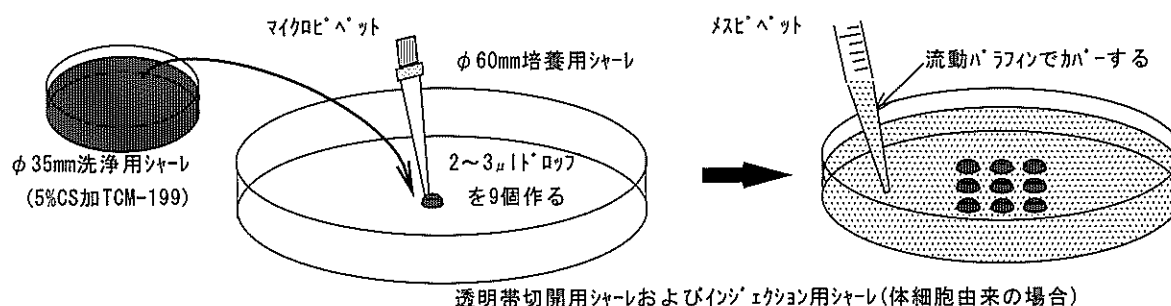


図27. 透明帯切開用シャーレおよびインジェクション用シャーレ(体細胞由来)の作製

3) $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ サイトカラシンB in 20%CS加m-PBS [調製量 10ml]

m-PBS	8 ml
CS	2 ml
抗生物質 (PC-SM)	10 μl
サイトカラシンBストック	10 μl

- ①以上を転倒混和後、 $0.22\ \mu\text{m}$ のフィルターで濾過滅菌する。
- ②除核用洗浄シャーレと除核用シャーレを作製し、それぞれのシャーレを室温(25℃)下に置く。

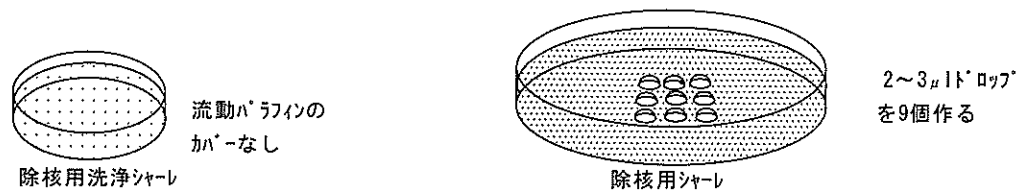


図28. 除核用洗浄シャーレおよび除核用シャーレの作製

器具・機材、試薬一覧

家畜改良センターにおける培養液および試薬一覧

	品名	規格	製造元	カタログNo.
培養液	D-PBS	500ml	GIBCO	14287-080
	TCM-199 (Earle's Salts)	500ml	GIBCO	12340-030
	TCM-199 (Hank's Salts)	500ml	GIBCO	12350-021
	D-MEM	10g × 1L	GIBCO	31600-034
	CS (Calf Serum)	500ml	GIBCO	16170-078
	FCS (Fetal Calf Serum)	500ml	Bio	14-501F
試薬	D-PBS(-)	錠剤, 200錠	宝酒造	T900
	ブドウ糖 (Glucose)	500g	Wako	041-00595
	ヒアルビン酸ナトリウム	25g	Wako	199-03062
	ショ糖 (Sucrose)	1kg	フナコシ	PF181241
	Magnesium Acetate ($\text{Mg}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	100g	SIGMA	M0631
	Potassium Phosphate (K_2HPO_4)	100g	SIGMA	P8281
	Calcium Acetate ($\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$)	100g	SIGMA	C-1000
	Glutathione	5g	SIGMA	G-4251
	HEPES	100g	Dojindo	346-01373
	乳酸ナトリウム	60%溶液, 100ml	SIGMA	L7900
	L(+)-Lactic Acid Hemicalcium Salt	50g	SIGMA	L-4388
	BME Essential Amino Acids (×50)	100ml	SIGMA	B-6766
	MEM Nonessential Amino Acids (×100)	100ml	GIBCO	11140-C50
	L-Glutamic Acid	10ml	GIBCO	12419-016
	HYALURONIDAZE	25g	SIGMA	H3506
	CYTOCHALACIN B	10mg	SIGMA	C-6762
	〃	10mg	ALDRICH	85, 777-7
	CYCLOHEXIMIDE	5g	SIGMA	C-6255
	DMSO (Dimethyl Sulfoxide)	500ml	Wako	045-07215
	Caイノゾール A23187	1mg	SIGMA	C-7522
	ヘキスト H33342	250mg	CALBIOCHEM	382065
	フェノールレッド	25g	Wako	163-01122
	〃 溶液	0.50%溶液, 100ml	SIGMA	P-0290
	BSA (Crystallized)	25g	SIGMA	A-4378
	BSA (Fatty acid free)	10g or 50g	SIGMA	A-7030
	BSA (Fraction V)	25g	SIGMA	A-8022
	Trypsin-EDTA	0.05%溶液, 100ml	GIBCO	25300-054
	〃 (×10)	0.5%溶液, 100ml	GIBCO	15400-054
	ベニシリン (結晶ベニシリンカリウム)	10万単位	明治	GLD163
	ストレプトマイシン (硫酸ストレプトマイシン)	1gカラム入	明治	
	流動パラフィン	500ml	ナカライテスク	261-14

家畜改良センターにおける器具機材一覧

器具	規格	製造元	カタログNo.
シャーレ	培養用シャーレ	φ 35mm	Falcon 3001
	"	"	Nunc 153066
	洗浄用シャーレ	"	Greiner 627102
	マニピュレーション用シャーレ	φ 60mm	CORNING 25010
	"	"	Greiner 628161
	電気融合用シャーレ	φ 90mm	Nunc 150350
	卵子検索用シャーレ	"	Nipro
	4 穴シャーレ (4 well multidish)		Nunc 176740
ディスポシリンジ	培養液調整用シリンジ	50ml	ALDRICH Z11840-0
	"	20ml	ALDRICH Z11688-2
	"	10ml	ALDRICH Z11687-4
	卵子吸引採取用シリンジ	5ml	Nipro
濾過フィルター	フィルターユニット(血清用)	500ml, 0.2μm	NALGENE 162-0020
	" (培養液用)	150ml, 0.22μm	CORNING 25932-200
	濾過器用フィルター(～100ml用)	0.22μm	MILLIPORE SVGV01015
	" (～50ml用)	0.22μm	MILLIPORE SLGV025LS
	" (～10ml用)	0.22μm	MILLIPORE SVGV013SL
ガラスキャピラリー	マイクロツル作製用	10μl	Drummond #510G-310G-210G
	"	5μl	Drummond #3-000-105-G
パスツールピペット		150mm	ヒンゲル 3150101
注射針	卵子吸引採取用	19G×1*1/2 S.B	Nipro
カルチャーフラスコ	培養液保存用	75cm ²	
	"	25cm ²	
遠沈管		15ml	
		50ml	
メスピペット		2ml	
		5ml	
		10ml	
		25ml	

機材	規格	製造元
マイクロフォージ	MF-79 MPF-1	ナリシゲ 島津
マイクロプーラー	PB-7	ナリシゲ
グラインダー	EG-3	ナリシゲ
細胞融合装置	BTX200	BM機器
細胞融合用チャンバー(平行ワイヤー)	電極間1mm	ユニオン・イカル・イマダ
細胞融合用ホルド型電極	先端径150 μ m	ユニオン・イカル・イマダ

おわりに

現在のところ、ウシ核移植技術はほぼ確立したとはいえ、新知見が得られるにつれまだまだ技術開発の余地がある技術です。今回、家畜改良センターにおいてこれまでに取り組んできた方法をマニュアルにしましたが、今後の技術発展に伴って当マニュアルも改訂が必要になってくると考えられます。

これからウシ核移植に取り組もうとされる方は、当マニュアルを参考にして頂ければ望外の喜びです。

最後に、今回のマニュアル作成にあたってセンターでの技術確立のためのデータ蓄積にご協力いただきました技術第一課で核移植技術を研修された方々に感謝するとともに、これまで家畜改良センターにおいて、核移植によるクローン牛の生産にご協力いただいた企画調整室業務管理課と技術部技術第一課の各位に深く感謝いたします。

(家畜改良センター技術部技術第一課

金山佳奈子・小林修司)



家畜改良センター 技術マニュアル 3

ウシ核移植マニュアル

著 者／家畜改良センター技術部技術第一課

金 山 佳奈子・小 林 修 司

発 行／農林水産省 家畜改良センター

企画調整室 企画調整課

発行日／平成11年3月

印刷所／不二印刷株式会社