

家畜改良センター 技術マニュアル 3

ウシ核移植技術マニュアル

農林水産省 家畜改良センター

はじめに

核移植技術は、同一遺伝子構成を有する優れた個体群(クローン動物)を多数複製、増殖することができる技術として期待されており、多くの研究機関でさまざまな技術改良が行われ、実用化へ向け積極的に取り組まれているところである。

農林水産省家畜改良センターにおいては、平成4年よりウシ核移植技術への取り組みを開始し、受精卵の割球を用いた核移植では、平成5年4月に第1号牛を誕生させ、これまでに1卵性4つ子1組、3つ子3組、双子9組を含む計54頭の子牛の生産に成功している。

また平成10年1月より体細胞を用いた核移植に取り組み、同年12月にジャージー種2頭の作出に成功した。その後の産子を含め、計5頭(平成11年3月末現在)の体細胞由来のクローン牛が生産されており、これらの細胞提供牛(乳用種)については能力(産乳)が明らかなこと、同一細胞由来のクローン牛が複数頭数いることから、種々の項目について比較し、それらの相似性について調査しているところである。

このウシ核移植技術は、高能力牛の増殖や肉用牛の能力検定等に活用することにより、育種改良の効率化に飛躍的な効果を持つと期待されている。このため、家畜改良センターでは重要な畜産技術として位置づけ、積極的な取り組みを行っている。

そこで今回、家畜改良センターで取り組んできたウシ核移植技術の一連の操作の詳細をマニュアルとして編集して広く利用できるようにした。

(農林水産省 家畜改良センター 技術部 技術第一課)

目 次

はじめに	1
核移植技術の概要	4
マイクロツールの作製方法	8
受精卵由来クローン編	
1. タイムスケジュール	14
2. レシピエント卵子の採取と成熟培養	15
3. レシピエント卵子の調整	18
4. 活性化処理 (Caイオノフォア処理)	22
5. " (電気処理)	23
6. ドナー胚の割球分離	24
7. インジェクション	25
8. 電気融合 (細胞融合)	26
9. 発生培養	27
体細胞由来クローン編	
1. タイムスケジュール	30
2. レシピエント卵子の採取と成熟培養	31
3. レシピエント卵子の調整	31
4. ドナー細胞の調整	31
5. インジェクション	32
6. 電気融合 (細胞融合)	33
7. 活性化処理 (Caイオノフォア処理)	34
8. 発生培養	34
各種溶液の調製と培地の準備	
1. ストック試薬の調製	36
2. 培養液の調製	38
3. 核移植用試薬の調製と培地の準備	40
器具・機材、試薬一覧	44
おわりに	47

核移植技術の概要

核移植技術の概要

ウシ核移植技術は、同一の遺伝子構成をもつ個体（クローン牛）を多数生産する技術である。

この技術を利用することにより、優良な遺伝形質を持つ同一個体を短期間に増殖、複製することが可能となり、牛の改良スピードを飛躍的に向上させることができる。

このマニュアルでは、ウシの受精卵ならびに体細胞を用いる核移植技術を紹介する。受精卵由来の場合は、16～32細胞期となった受精卵（初期胚）を一個一個の細胞（割球）に単離し、除核した成熟卵子（レシピエント卵子）の囲卵腔に微細なガラス管を用いて注入し、電氣的にそれら細胞同士を融合させて培養し、子宮に移植可能になるまで発育した胚を受卵牛に移植し、同一の遺伝子構成を有する個体を多数生産することができる。体細胞由来の場合は、注入する細胞が成体や胎子から採取した細胞となる。

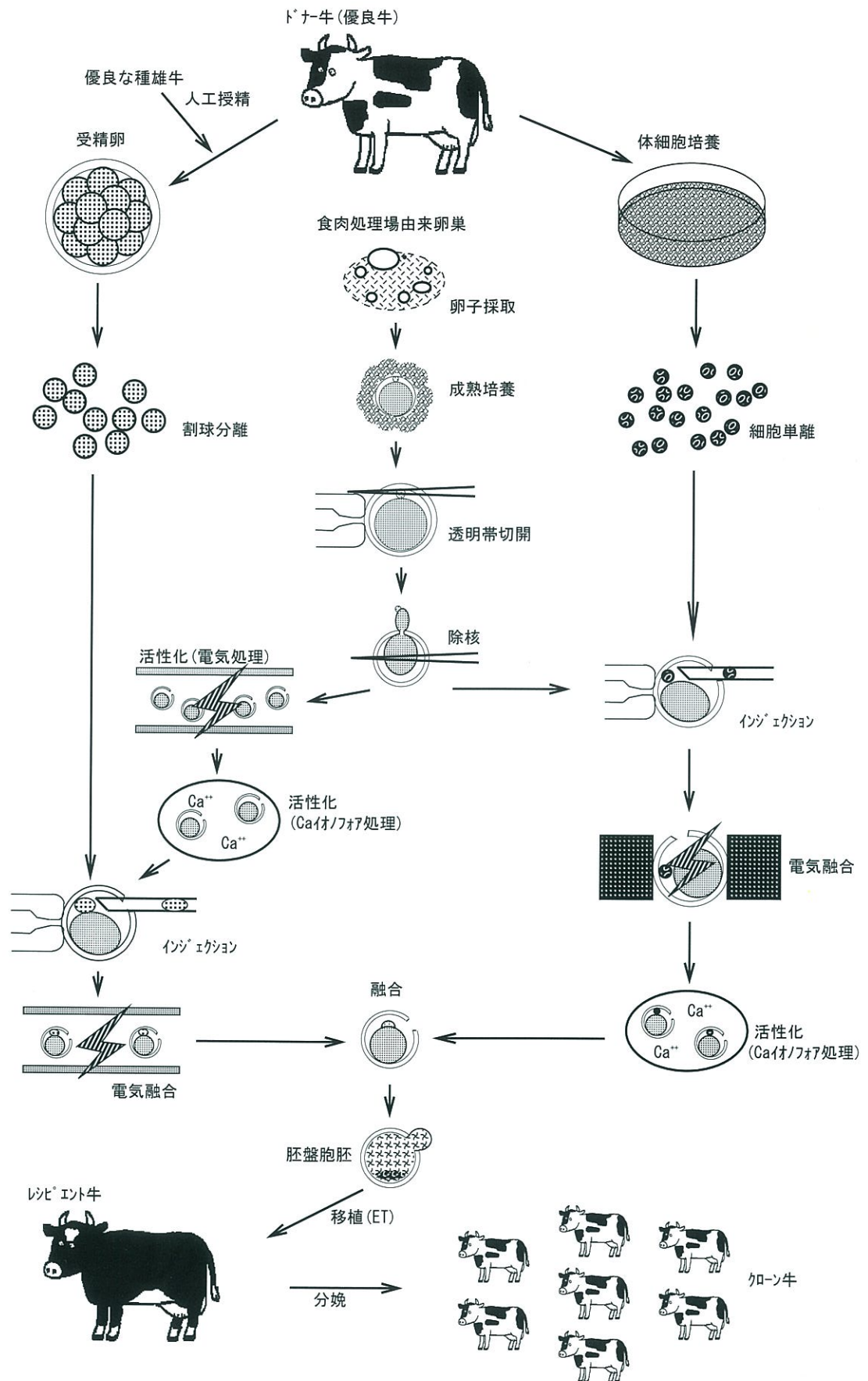


図 1. 牛核移植技術の概要

マイクロツールの作製方法

マイクロツールの作製方法

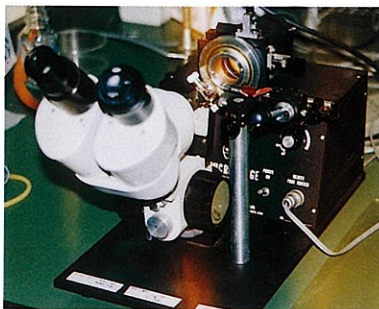
核移植の操作はマイクロマニピュレーターを用いて行われるので、各々の作業に用いるマイクロツールの出来具合によって、操作性の良し悪しが大きく左右される。このため、いかにして上手くマイクロツールを作製するかが重要なポイントとなる。

ここで紹介する方法は、家畜改良センターにおけるマイクロツールの作製方法である。

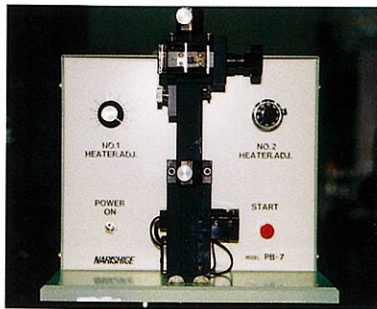
★作製するマイクロツール

- ホールディングピペット : 卵子(レビエント卵子)を吸引して保定するピペット。外径を卵子とほぼ同径(100~150 μ m)になるよう作製する。
- カッティングニードル : 卵子の透明帯を切開する。ガラスキャピラリーを針状に引き伸ばして作製する。
- インジェクションピペット : ドナー細胞(割球)を吸引して、レビエント卵子に注入するピペット。内径をドナー細胞(10~30 μ m)に合わせ、先端を斜めに削って(または垂直に割って)作製する。
- 除核用スティック : レビエント卵子の除核の際に用い、インジェクションピペットの先端を丸く閉じて作製する。

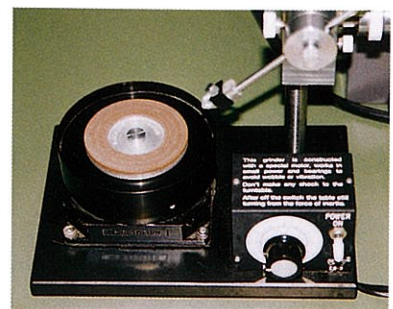
準備 : マイクロフォーger, マイクロプレーヤー, ピペット研磨機, ガラスキャピラリー, 25%フッ化水素, ガスパワー, 超純水, シリコンチューブ付シリッジ, ヤスリ, ヒンセット



マイクロフォーger (ナリク MF-79)



マイクロプレーヤー (ナリク PB-7)



ピペット研磨機 (ナリク EG-3)

写真1. 家畜改良センターにおけるマイクロツール作製用機器

☆ホールディングピペット

- ① ガスパナーを用いて、ガラスキャピラリーを真っ直ぐに細く引き伸ばす。
- ② マイクロフォーシにセットし、卵子の直径とほぼ同径(約100~150 μ m)のところに印を付けて、ヤスリで切断面が水平かつフラットとなるよう切断する。
※切断面に凹凸があると卵子を上手く保定できない。
- ③ 再びマイクロフォーシに、ガラスキャピラリーを下向き(垂直)の状態でセットする。
- ④ マイクロフォーシの白金線の先端部が、ガラスキャピラリーの先端の中心部にくるようにセットする。
※白金線は熱膨張により伸長するので、それを考慮してセットする。
- ⑤ ガラスキャピラリーの先端部に熱をかけ、内径が外径の約1/5~1/10となるように口径を細める。
- ⑥ ガラスキャピラリーを右斜め上向きになるようにセットする。
- ⑦ 白金線をガラスキャピラリーの先端部から約5mmのところに位置し、熱をかけて約45度になるようにゆっくり曲げる。曲げる部位は、内径を極力細くしてオイルの流動性が小さくなるよう調整する。

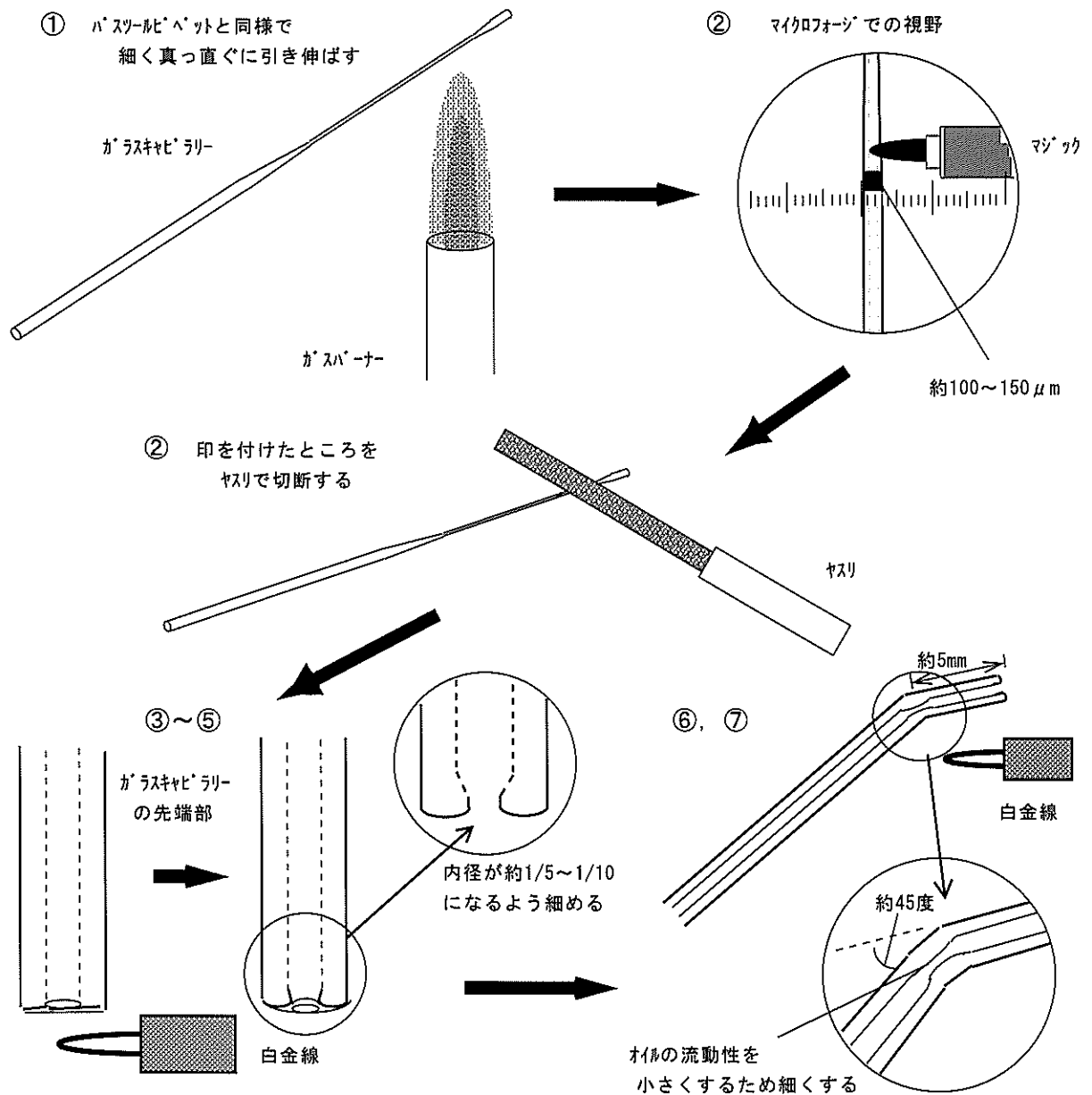
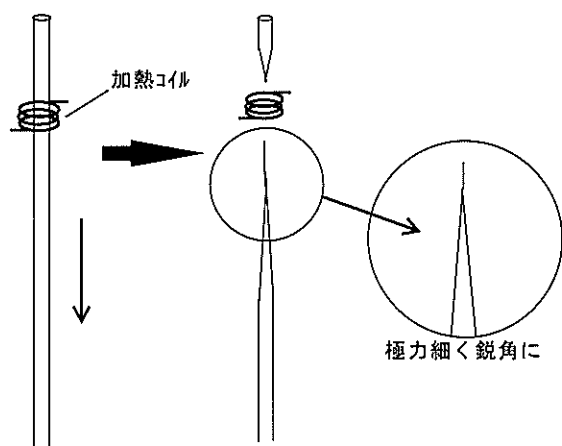


図2. ホールディングピペットの作製

☆カッティングニードル

- ①ガラスキャピラリーをマイクロフーラーにセットする。
※ここでは二段引き法を行う。（詳細についてはマイクロフーラーの取り扱い説明書参照）
- ②加熱コイルは最上部にセットし、一段目ヒーターの熱量と一段目ヒーター用ストップを設定して引き伸ばす。
- ③ガラスキャピラリーの一番細くなった部分に加熱コイルを移動し、一段目ヒーター用ストップを解除する。
- ④二段目ヒーターの熱量を設定して、先端が針状になるよう引き伸ばす。
- ⑤マイクロフォースで、先端部から約5mmの部分を約45度になるように曲げる。

①～④



フーラーで先端が針状になるように引く

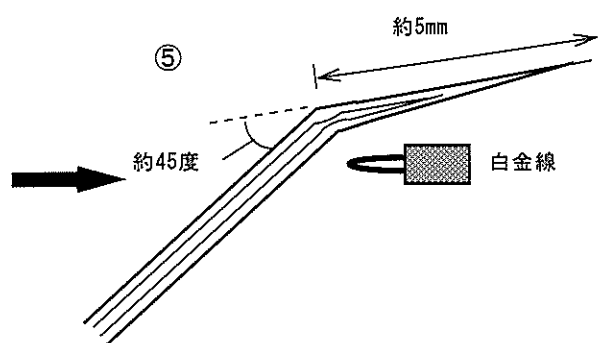


図 3. カッティングニードルの作製

☆インジェクションピペット

- ①ガラスキャピラリーをマイクロフーラーにセットして、細く引き伸ばす。
※ここでは一段引き法を行う。（詳細についてはマイクロフーラーの取り扱い説明書参照）
- ②マイクロフォーシにセットし、口径が約 $20\sim 30\mu\text{m}$ のところを印を付け、ヤスリまたはピンセットで切断する。 ※マイクロフォーシを用いた切断方法もある。
- ③ピペット研磨機にセットして、先端角が $40\sim 50$ 度になるように研磨する。（約15分）
- ④研磨後、ガラスキャピラリーをシリコンチューブ付シリジに接続し、先端部のみを25%フッ化水素に浸けて、内筒部を20回程度洗浄し、その後すぐ超純水で同様に30回程度洗浄する。
- ⑤ガラスキャピラリーの先端部の向きを考慮しながらマイクロフォーシにセットし、口径が（肉厚が）薄くなったのを確認してから、先端部から約10mmのところを約45度になるようにゆっくり曲げる。曲げる部分は、内径を小さくしオイルの流動性が小さくなるよう調整する。

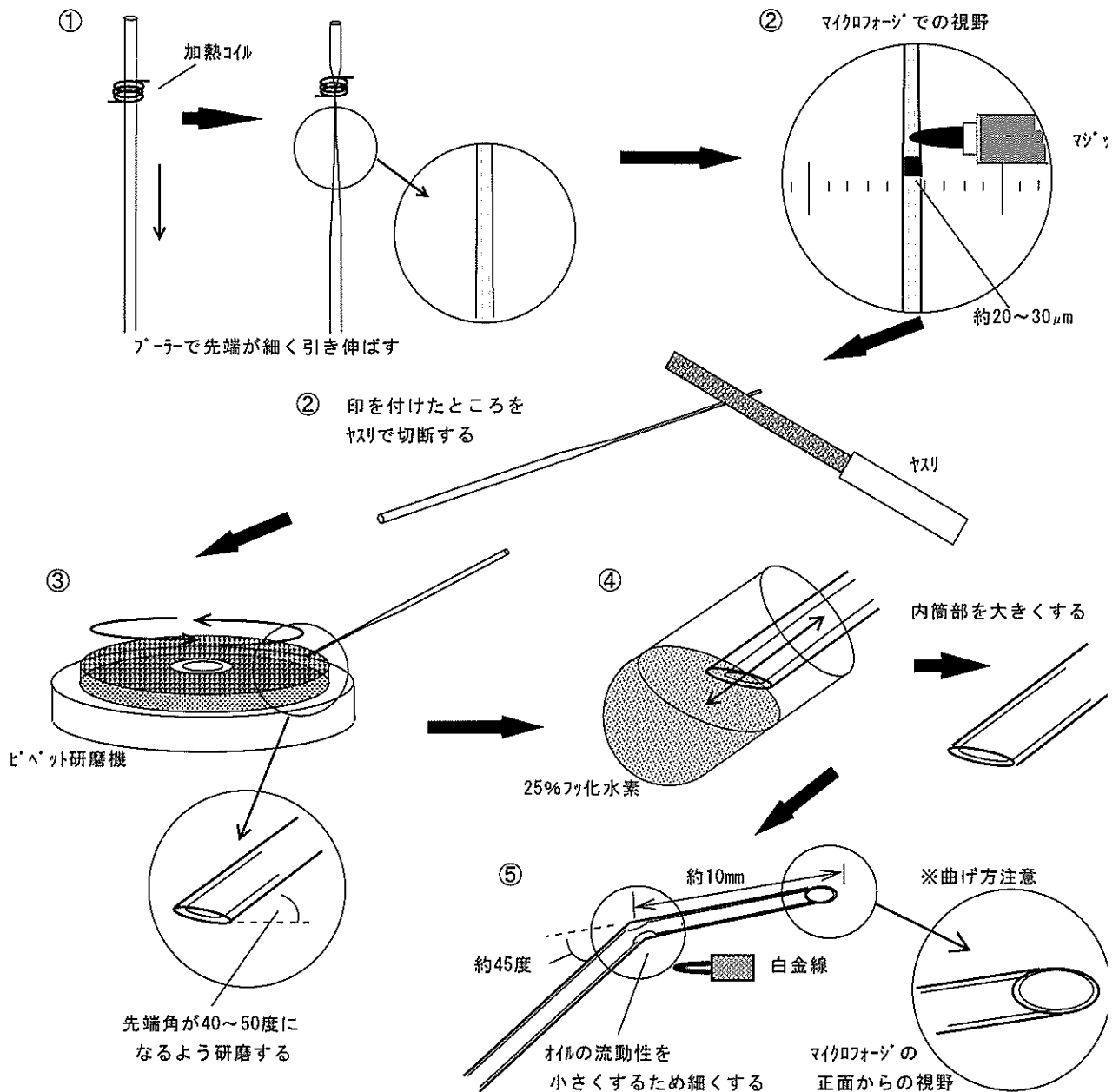


図4. インジェクションピペットの作製

☆除核用スティック

- ①～②は、前述の「☆インジエクションビペット」と同様。
(省略)
- ③マイクロフォーシにセットして先端部を丸く閉じ、先端部から約5mmのところ約45度になるようにゆっくり曲げる。

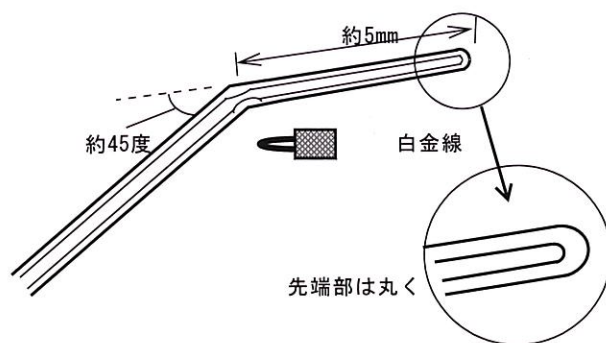


図5. 除核用スティックの作製

★マイクロツールのセッティング

マイクロツールのセッティングは、マイクロマニピュレーターのタイプ（平行型、L字型）により異なる。ここでは平行型について記述する。

- ①作製したマイクロツールは、ガスバーナーを用いて先端部と平行になるよう加工する。
- ②ビペットホルダーに装着する。
- ※ホルディングビペットとインジエクションビペットは、マイクロインjekターに連結されているため、吸引や注入がスムーズに行えるよう接続する。
- ③マイクロマニピュレーターに一直線になるよう取り付けける。

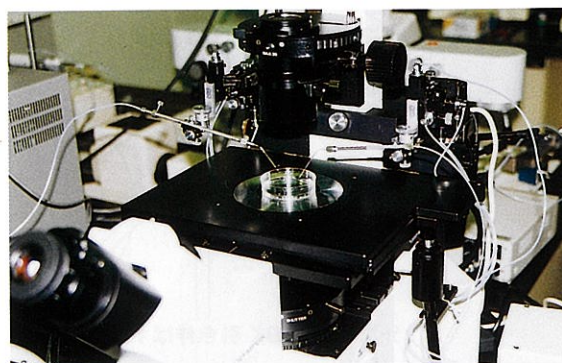


写真2. マイクロマニピュレーター

◎平行型のマイクロマニピュレーターの場合

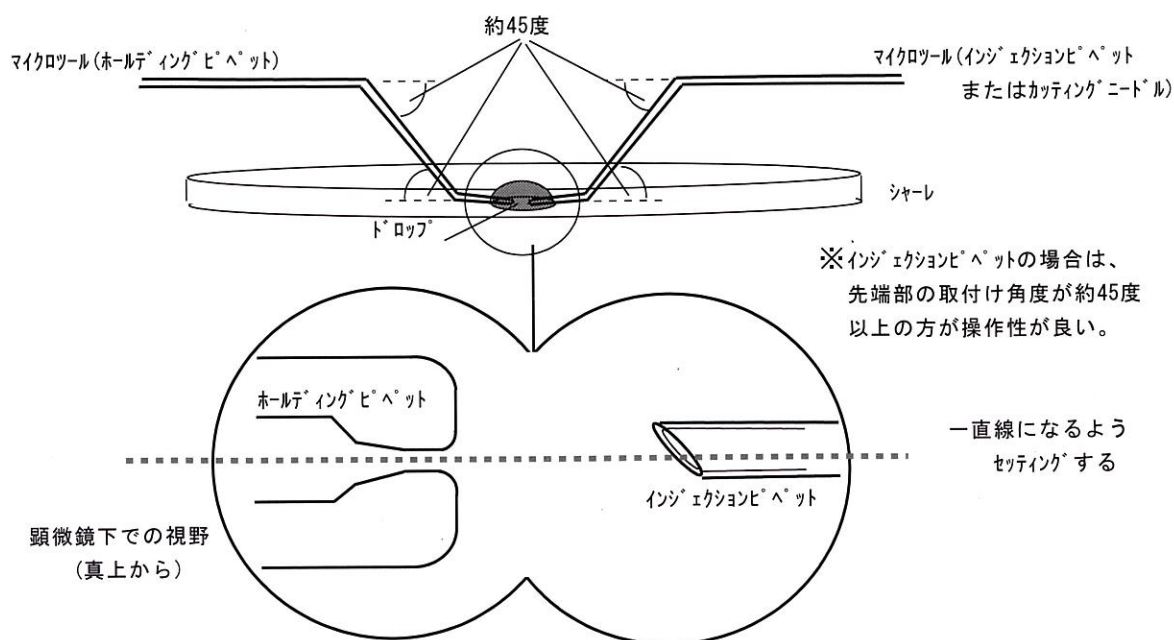


図6. マイクロツールのセッティング

受精卵由来クローン編

受精卵由来クローン編

受精卵由来クローンは、別名、初期胚クローンと呼ばれ、生体からの採卵ならびに体外受精で得られる5～6日齢（発育ステージとして16～32細胞期胚）の初期胚をドナー細胞（核）として用いる。

今までの技術改良により、家畜改良センターにおいてはほぼ確立された技術となっている。

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 サイトカラシンB + 20%CS加m-PBS
(24時間)	活性化処理 (Caイノゾール)	5μM イノゾール + 0.1% PVA 加m-PBS
(25時間)	活性化処理 (電気処理)	Zimmerman 融合液 (DC 45V/mm, 10min 間隔, 2回)
	↓ 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, 6h)
(28～30時間)	(ドナー胚の調整) インジェクション	16～32細胞の初期胚, 割球分離 10μg/ml シクロヘキシミド [®] + 5%CS 加TCM-199
(30時間)	電気融合 ↓ ↓ 発生培養	Zimmerman 融合液 (DC 68V/mm, 1回) 5%CS 加TCM-199 [Earle's] (38.5℃, 5%CO ₂ in air, 12h) 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

レシピエント卵子については、体外受精技術における成熟培養と同様に家畜の生体または屠体の卵巣から卵子（ここでは未成熟卵子ー卵丘細胞の複合体）を採取し、これを人工的環境下で卵成熟を行ったものをレシピエント卵子として用いる。

ここでは、家畜改良センターで慣行法となっている体外成熟培養法（家畜改良センター技術第一課編「ー受精卵移植技術マニュアルー ウシ体外受精技術」を参照）について記述する。

1) 卵巣採取（食肉処理場由来卵巣の場合）

準備：生理食塩水（0.9% NaCl＋抗生物質）、魔法瓶、滅菌済金属製ザル、滅菌ラテックスゴム手袋、その他に食肉処理場で必要と思われるもの（白衣、長靴、etc.）

- ①食肉処理場で卵巣を採取し、25℃の生理食塩水中に投入する。
- ②採取した卵巣を金属製ザルに移し、25℃生理食塩水で血液などを洗い流す。
- ③洗浄した卵巣を魔法瓶内の25℃生理食塩水に浸漬し、実験室（室温25℃）に持ち帰る。

2) 卵子の吸引採取

準備：3%CS加m-PBS、滅菌紙タオル、滅菌ラテックスゴム手袋、注射筒（5ml）、注射針（19G、針先鈍角）、滅菌済金属製ザル、φ90mmシャーレ（φ90mm、1cm角の格子線を予め底面外側に引いておく）、ビーカー、恒温槽、生理食塩水（上記と同様）、アルコール綿で清浄にした外科鉗とピンセット

- ①滅菌手袋を着用し、卵巣をザルに入れ25℃の生理食塩水で2～3回洗浄し、ビーカーに移し30℃の恒温槽で保温する。
- ②ピンセットで卵巣をビーカーから取り出し、外科鉗で余分な組織（卵管、脂肪など）を切り取り、滅菌紙タオルで卵巣を清拭する。
- ③予め19G針付き5ml注射筒に3%CS加m-PBSを約1ml吸引し、卵巣皮質から針を刺して直径2～6mmの小卵胞中の卵子を卵泡液と共に吸引する。この時、一度針を刺したら針を抜かず出来るだけ多くの卵子を吸引する。
- ④注射筒にある程度採取液がたまってきたら、φ90mmシャーレ内に採取液を静かに入れる。急激に入れると卵丘細胞が剥離する恐れがあるので注意する。

※ φ90mmシャーレは37℃の加温盤*または発泡スチロール板に乗せ、直に実験台に置かないこと。

但し、長時間加温盤上に放置するのは厳禁



写真3. 卵子の吸引採取

3) 卵子の検索

準備: 洗浄用シャーレ(φ35mm), 3%CS加m-PBS,
ハ[°]スツルビ[°]ペ[°]ット, マウスピ[°]ース

- ①採取液の入ったφ90mmシャーレを顕微鏡下に静置後、ハ[°]スツルビ[°]ペ[°]ットで気泡や上澄み液を除去する。
(液量が多いと卵子がよく見えない)
- ②予め卵子採取用に加工したハ[°]スツルビ[°]ペ[°]ットを用いて、全ての卵子を拾い上げ、3%CS加m-PBSの入った洗浄用シャーレに回収する。
- ③回収した卵子の選別(鑑別)を行い、以下のようにA~Dランクに分類する。
通常はA及びBランクのものを成熟培養に供する。

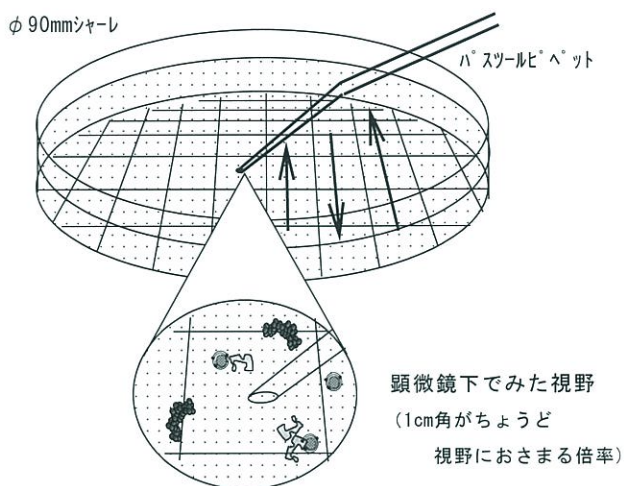
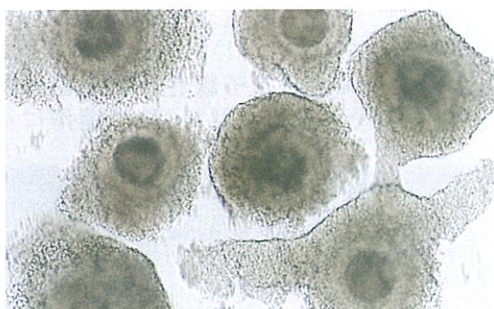
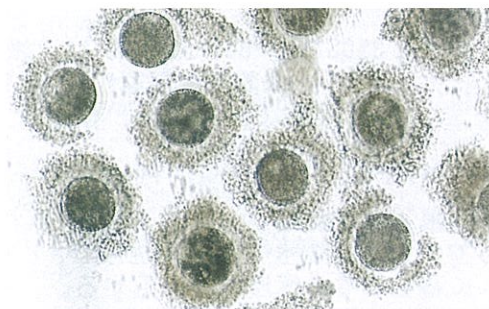


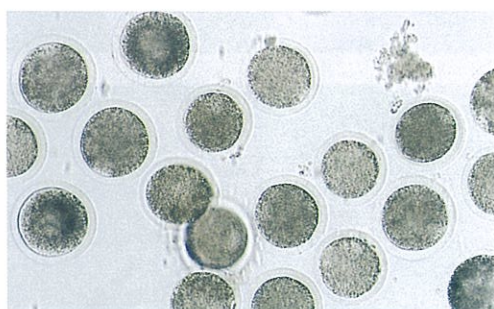
図7. 卵子の検索



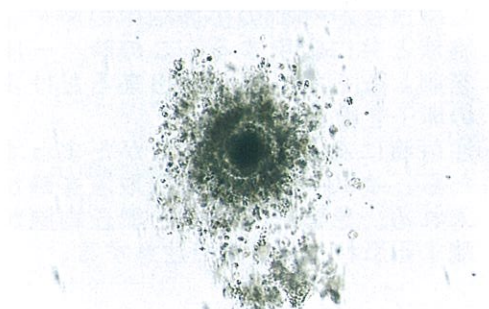
Aランク
卵丘細胞が3層以上で透明帯周囲に緊密に付着しているもの。



Bランク
卵丘細胞が2層以下または透明帯周囲に1/3以上付着しているもの。



Cランク
完全な裸化卵子またはBより卵丘細胞の付着が少ないもの。



Dランク
卵丘細胞が膨化してるか蜘蛛の巣状に変性しているもの。

写真4. 卵丘細胞付着状態による採取卵子の分類(ランク別)

4) 成熟培養

準備：3%CS加m-PBS, 5%CS加TCM-199, 洗浄用シャーレ(φ35mm), 培養用シャーレ(φ35mm)

- ①選別した卵子を3%CS加m-PBSの入ったφ35mmのシャーレで1回洗浄する。
- ②5%CS加TCM-199の入った洗浄用シャーレ(φ35mm)で2回洗浄する。
- ③洗浄後、培養用シャーレ(φ35mm)の5%CS加TCM-199のドロッツに卵子を移す。
- ④インキュベーター内(38.5°C、2%CO₂ in air)で約18~20時間成熟培養する。

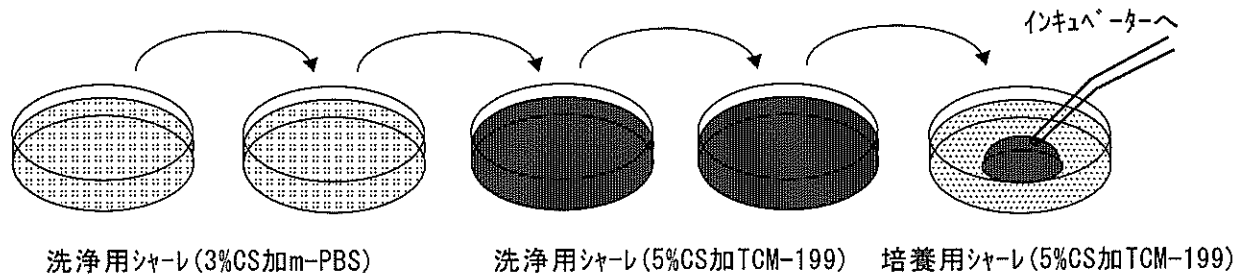


図8. 卵子の洗浄と成熟培地への導入

※成熟培養用ドロッツは、600μl×1もしくは100μl×4を作り流動パラフィンで覆う。
ドロッツに入れる卵子数は600μlが80個、100μlで10~20個を目安とする。

☆卵子の洗浄

体外培養における卵子(胚)の洗浄とは、異なる培養液に移す際、卵子の周囲環境を次の環境下に持ち込まないように、それまでの培養液を完全に取り除くことである。

例：成熟培養までの培地交換(3%CS加m-PBS → 5%CS加TCM-199)

- ①3%CS加m-PBS中に卵子がある。
- ②次の培養液である5%CS加TCM-199をハースツルビペットに吸引する。
- ③3%CS加m-PBS中の卵子に5%CS加TCM-199を吹きかける。
- ④卵子を吸引する。液量を少なくしてできるだけ卵子のみを移し、余分な培養液を持ち込まない。
- ⑤卵子を5%CS加TCM-199(洗浄用シャーレ)中に移す。
- ⑥洗浄用シャーレ内で4ヶ所の移動を行って卵子を洗浄する。

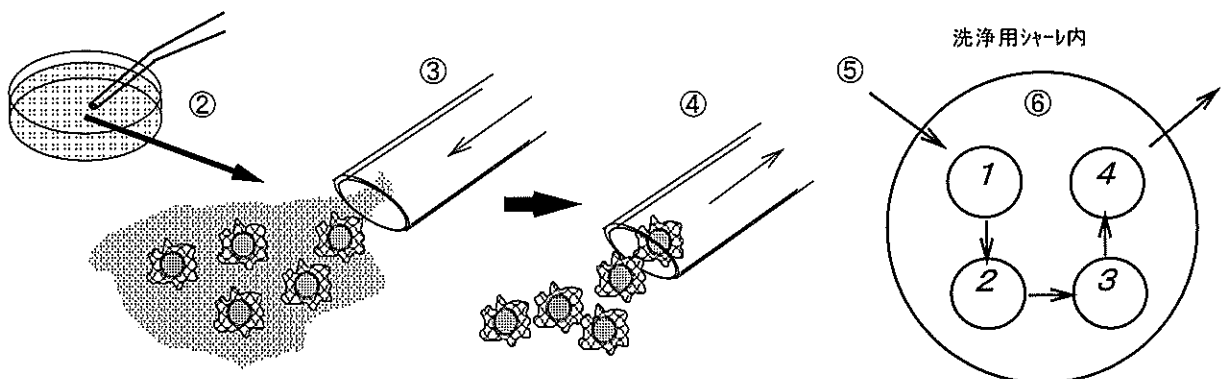


図9. 卵子の洗浄とシャーレ内での洗浄

3. レシピエント卵子の調整

1) 卵丘細胞の除去

準備：0.5%ヒアルロニターゼ液(0.5%ヒアルロニターゼ加M2)，
洗浄用シャーレ(φ35mm)，5%CS加TCM-199

- ①18～20時間成熟培養を行ったレシピエント卵子を、37℃に保温していた0.5%ヒアルロニターゼ液に移し、5分間程度浸漬する。
- ②卵子を洗浄用シャーレに入っている5%CS加TCM-199中に移し、細めの口径のパスツールピペットを用いて大ざっぱに卵丘細胞を除去する。
- ③卵子とほぼ同径のパスツールピペットを用いて、卵子を擦り合わせるようにピペッティングし、卵子の周りの卵丘細胞を除去して完全に裸化状態にする。
- ④卵丘細胞を除去した卵子は、5%CS加TCM-199中(成熟培養した際の培養シャーレ)に移し、インキュベーター内(38.5℃, 5%CO₂ in air)で培養する。

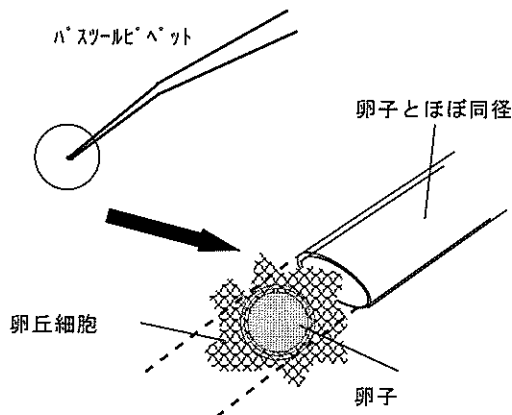


図10. パスツールピペットによる卵丘細胞除去

※卵丘細胞の除去としては、パスツールピペットのみで剥離する方法の他に、試験管ミキサーを用いて簡易に剥離する方法もある。(下記参照)

★試験管ミキサーによる卵丘細胞の除去

準備：試験管ミキサー，試験管，φ60mmシャーレ(φ60mm, 1cm角格子線を予め底面外側に引いておく)，20%CS加m-PBS，m-PBS，洗浄用シャーレ(φ35mm)，5%CS加TCM-199

- ①試験管にm-PBSを約4ml分注し、37℃に保温する。
- ②0.5%ヒアルロニターゼ液で処理した卵子を、真っ直ぐに加工したパスツールピペットで吸引し、m-PBSの入った試験管に移す。
- ③試験管ミキサーで2分間ボルテックス(強すぎない)する。
- ④攪拌後、試験管内のm-PBSを卵子ごとφ60mmシャーレに流し入れる。
- ⑤20%CS加m-PBSで試験管に付着した卵子を洗い落とし、φ60mmシャーレに流し入れる。この時、顕微鏡下で試験管に卵子が付着していないか確認する。
- ⑥φ60mmシャーレより卵子を採取して、5%CS加TCM-199の入った洗浄用シャーレに移す。
- ⑦卵丘細胞が付着している卵子は、卵子とほぼ同径のパスツールピペットを用いて完全に裸化状態になるまでピペッティングする。

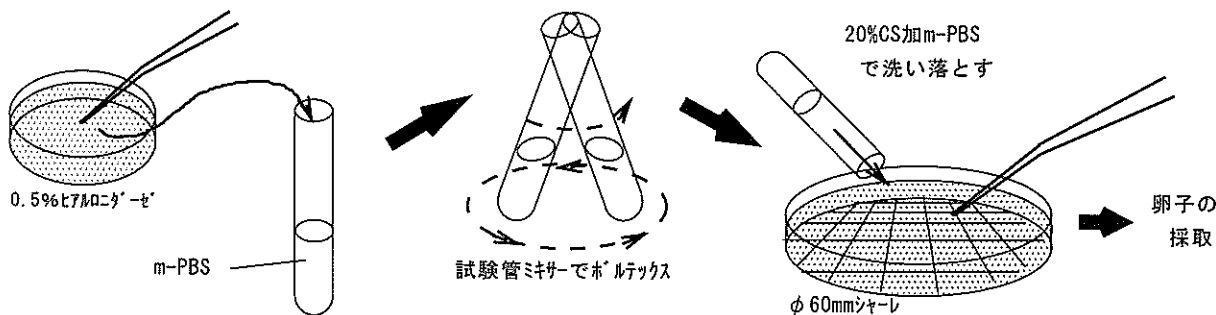


図11. 試験管ミキサーによる卵丘細胞の除去

2) 透明帯の切開

準備：透明帯切開用シャーレ(φ60mm, 5%CS加TCM-199液2~3μl×9個), 洗浄用シャーレ(φ35mm), 5%CS加TCM-199

- ①卵丘細胞を除去した卵子(以下、レシビエント卵子と記述)を透明帯切開用シャーレのドロップ(1ドロップあたり15~20個程度)に移す。
- ②透明帯切開用シャーレをマイクロマンニピュレーターにセットする。
- ③レシビエント卵子には、第一極体が放出され細胞質が均一な卵子だけを供する。
- ④レシビエント卵子の第一極体が12時の方向に位置するように誘導し、ホルディングピペットで保定する。
- ⑤保定したレシビエント卵子の2時の方向からカッティングニードルの先端を穿刺し、そのまま卵腔内を縫いつけるように通して、11時の方向(ホルディングピペットの上縁近く)に突き出す。この時、細胞質を突き刺して傷つけないよう注意する。
- ⑥ホルディングピペットからレシビエント卵子を離し、カッティングニードルに縫いつけられた状態の透明帯を、ホルディングピペットの下縁に押しつけて擦り合わせることで、透明帯を切開する。
- ⑦透明帯を切開したレシビエント卵子を、5%CS加TCM-199入った洗浄用シャーレ中に移し、インキュベートする。

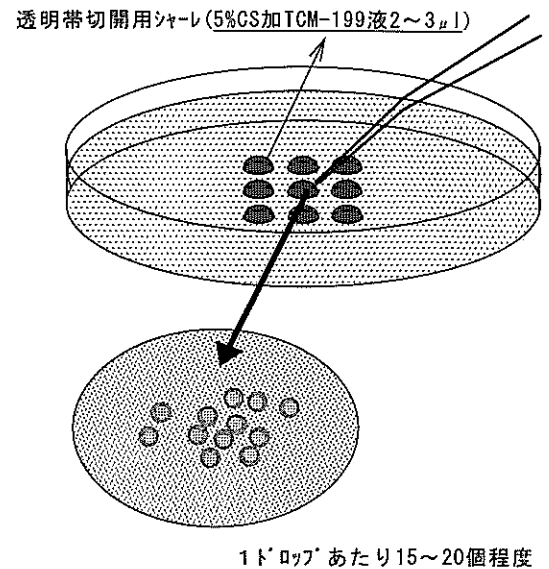


図12. 透明帯切開用シャーレへの導入

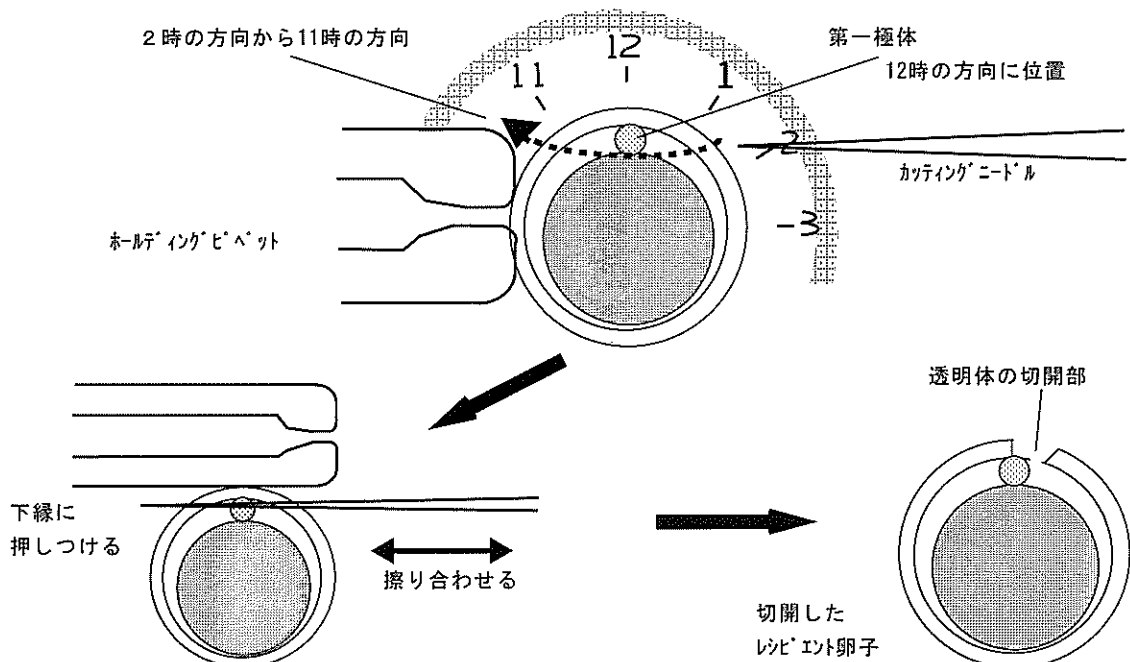


図13. マイクロマンニピュレーションによる透明帯の切開

※透明帯切開用シャーレのドロップ内の培養液は、5%CS加TCM-199[Earle's]で液量が約2~3μlのため作業が長時間になると培養液のpHの変化が予想される。このため一時間以上かかる場合は、多くのレシビエント卵子を一度に作業することを避け、自分の作業ペースにあったレシビエント卵子数を入れて行うようにする。

3) 除核

準備：除核用シャーレ(φ60mm, 5μg/mlサイトカリンB in 20%CS加m-PBS, 2~3μl×9個), 5%CS加TCM-199, 除核用洗浄シャーレ(φ35mm, 5μg/mlサイトカリンB in 20%CS加m-PBS), 洗浄用シャーレ(φ35mm)

- ①透明帯を切開したレシトイント卵子を、除核用洗浄シャーレに移して1~2分間平衡する。
- ②平衡したレシトイント卵子を除核用シャーレのドロップ(1ドロップあたり15~20個程度)に移す。
- ③除核用シャーレをマイクロマンピュレーターにセットする。
- ④レシトイント卵子の透明帯切開部分を縦(垂直)方向で、12時または6時の方向になるように誘導し、除核用スティック(またはカッティングニードル)でレシトイント卵子の真上から押さえる様に圧迫して、第一極体と第一極体周辺の細胞質を全体の約1/3~1/4量となるように透明帯切開部より押し出し除核する。

※成熟培養18~20時間後のレシトイント卵子は、第二減数分裂中期(M II)にあたり、その核はほとんどの場合第一極体直下の細胞質に存在する。

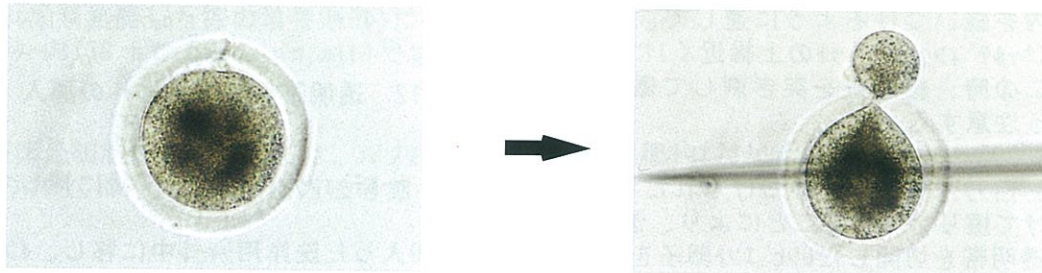


写真5. レシトイント卵子の除核

- ⑤第一極体が押し出されているものを選別して、除核用シャーレのドロップ内でパステルピペットを用いてピペッティングにより、第一極体と第一極体周辺の細胞質をレシトイント卵子から分離する。
- ⑥除核したレシトイント卵子は、5%CS加TCM-199のシャーレ中に移し、インキュベートする。

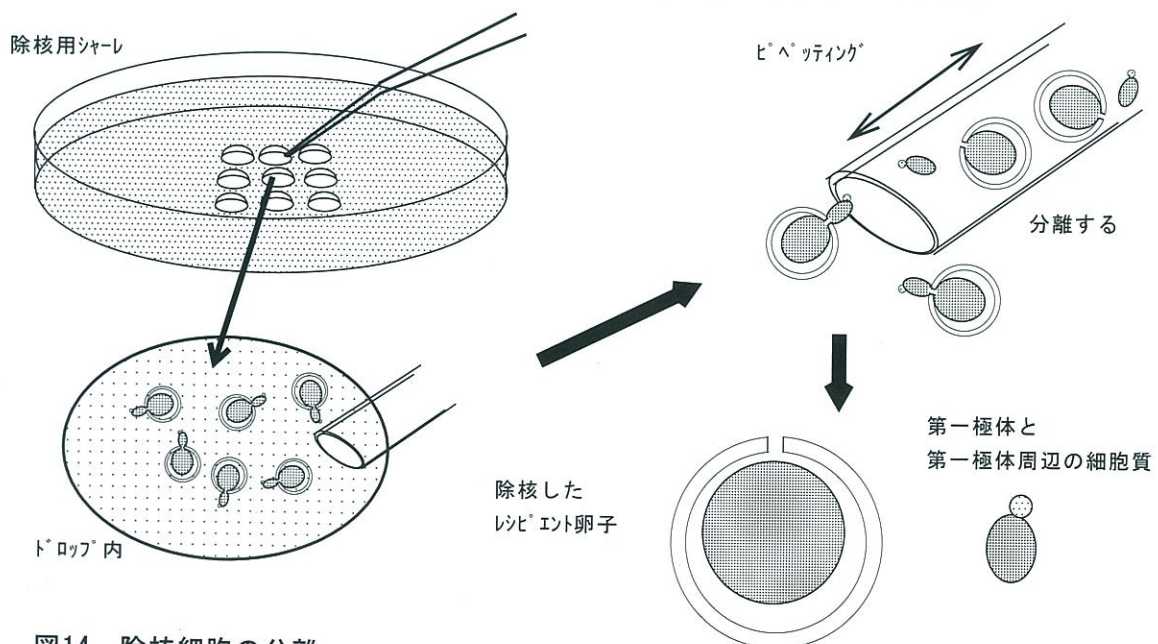


図14. 除核細胞の分離

4) 除核の確認 (ヘキスト染色)

準備: UV用シャーレ(ヘキスト H33342, 0.01mg/ml in m-PBS)

- ①レシトイント卵子の除核の際に押し出した細胞をUV (紫外線)用シャーレに入れ、20~30分程度浸漬する。
- ②UV用シャーレを蛍光顕微鏡にセットする。
- ③UV下で、押し出した細胞質に核が含まれていることが確認できる。

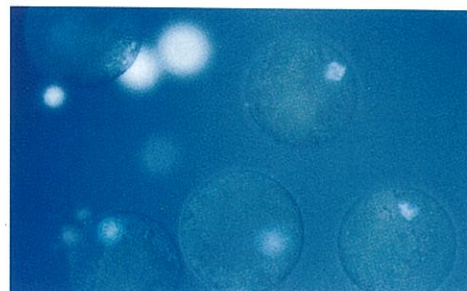


写真6. 押し出した細胞のヘキスト染色

※染色する細胞質は、第一極体と一緒に押し出されている。このため、細胞質内の核と第一極体の核とを見間違えないこと。

★レシトイント卵子の個別による除核の確認

準備: ϕ 60mmシャーレ(培養用), 5%CS加TCM-199, UV用シャーレ(ヘキスト H33342 in m-PBS)

- ①個別用に加工した ϕ 60mmシャーレに5%CS加TCM-199で約5 μ lのドロップを作製する。
(シャーレ1枚で約40~60ドロップが作製できる)
- ②レシトイント卵子と押し出した細胞の一对を個別用の ϕ 60mmシャーレに各々入れる。
※除核の際は、レシトイント卵子と押し出した細胞が一对で取り扱えるようにする。例えば、除核時のドロップをレシトイント卵子に対して個々となるようにするか、除核時の培養液を5%CS加TCM-199にして、レシトイント卵子と押し出した細胞を外れにくくする。
- ③個別用の ϕ 60mmシャーレのドロップ内でレシトイント卵子と押し出した細胞を分離する。
- ④押し出して分離した細胞をUV用シャーレに入れる。ここでのUV用シャーレにおいても個別となるようにする。
- ⑤上記「4) 除核の確認 (ヘキスト染色)」の①~③と同様に除核を確認する。

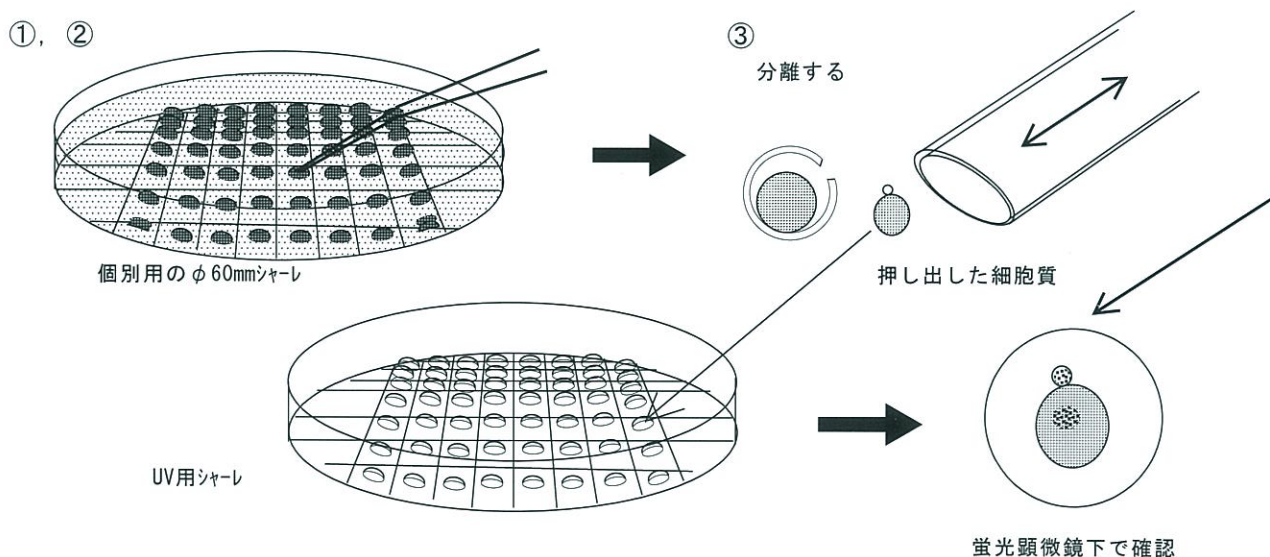


図15. レシトイント卵子の個別による除核確認

4. 活性化処理 (Caイオノフォア処理)

準備: Caイオノフォア用シャーレ(φ35mm, 5μM/ml Caイオノフォア in 0.1%PVA加m-PBS, 100μl×4個), 反応停止液(1%BSA加m-PBS), 洗浄用シャーレ(φ35mm), 5%CS加TCM-199シクロヘキシミド洗浄用シャーレ(φ35mm, 10μg/mlシクロヘキシミド in 5%CS加TCM-199), シクロヘキシミド培養用シャーレ(φ35mm, 10μg/mlシクロヘキシミド in 5%CS加TCM-199, 100μl×4個)

- ①作業に必要なものを身近に準備し、室内の灯りを消して極力暗くする。
※Caイオノフォアは、光により分解または不活性化するので、遮光するなどの注意が必要である。また、タンパク質の存在下では不活性化するので、血清の代わりにPVAを用いる。
- ②レシトイント卵子を、Caイオノフォア用シャーレの1つ目のドロップに移す。
- ③培養液(血清)の混入を極力防ぐため、新たなパースツルビペットに交換する。
- ④レシトイント卵子をCaイオノフォア用シャーレの2つ目と3つ目のドロップで洗浄し、最後の4つ目のドロップ内で5分間浸漬する。
- ⑤5分後、反応停止液を4つ目のドロップに同量程度(約100μl)注入し、Caイオノフォアの反応を停止させる。

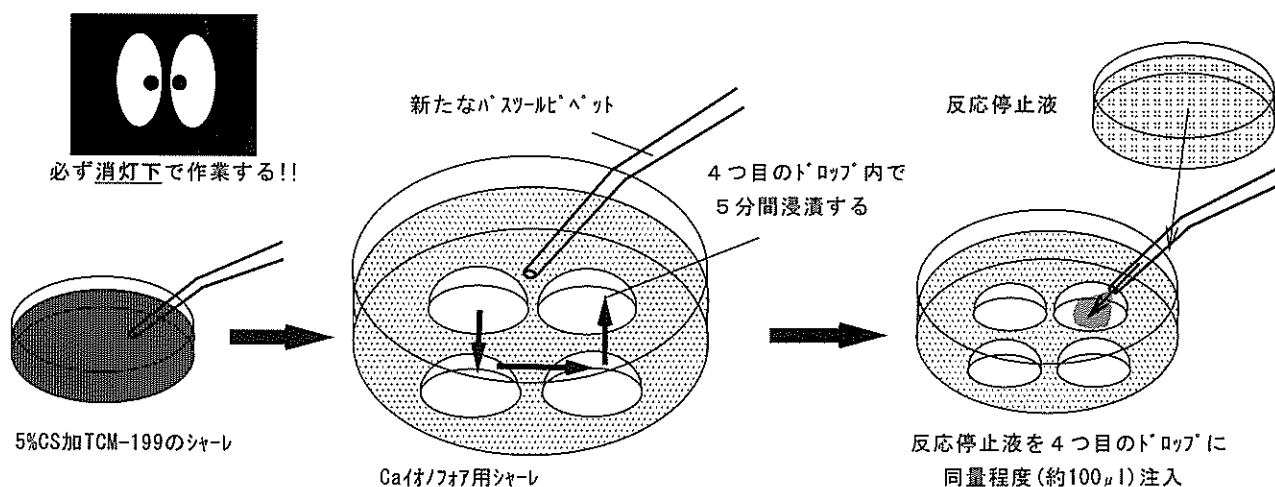


図16. レシトイント卵子のCaイオノフォア処理

- ⑥室内の灯りを点ける。
- ⑦Caイオノフォア処理したレシトイント卵子は、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、1時間インキュベートする。

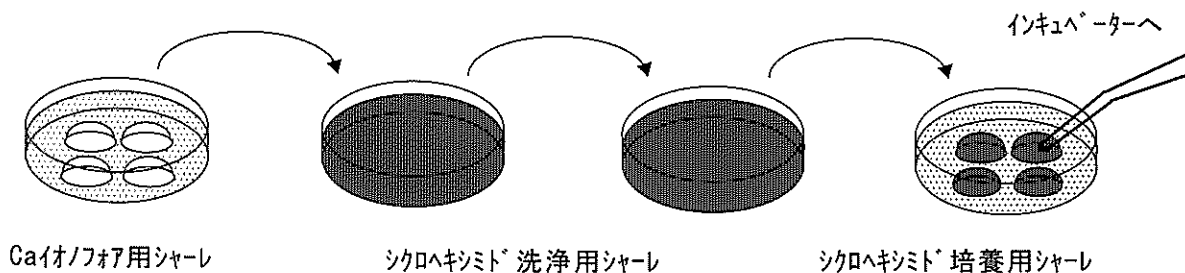


図17. シクロヘキシミド処理への導入

5. 活性化処理（電気処理）

準備：融合液，4穴シャーレ，洗浄用シャーレ（φ35mm），融合チャンバー，5%CS加TCM-199，シクロヘキシミド洗浄用シャーレ（φ35mm，10μg/mlシクロヘキシミド in 5%CS加TCM-199，オイルカバー），シクロヘキシミド培養用シャーレ（φ35mm，10μg/mlシクロヘキシミド in 5%CS加TCM-199，100μl × 4個）

- ①Caイオン処理開始1時間後、レビ[®]ント卵子をオイルカバーなしの5%CS加TCM-199中に移す。
- ②洗浄用シャーレと4穴シャーレに融合液を満たす。4穴シャーレは、1穴あたり約1mlの融合液を入れ、中央部にも約4mlの融合液を入れてパ[®]スツール[®]ベットの洗浄用として用いる。
- ③オイルの持ち込みを防ぐため、新しいパ[®]スツール[®]ベットに交換する。
- ④5%CS加TCM-199中のレビ[®]ント卵子に融合液をまんべんなく吹きかけ、そのレビ[®]ント卵子を吸い上げる。
- ⑤レビ[®]ント卵子を4穴シャーレの融合液の表面に浮かせるように移す。
（レビ[®]ント卵子の処理数は、一回あたり50個程度とし、1穴に入れて平衡する）

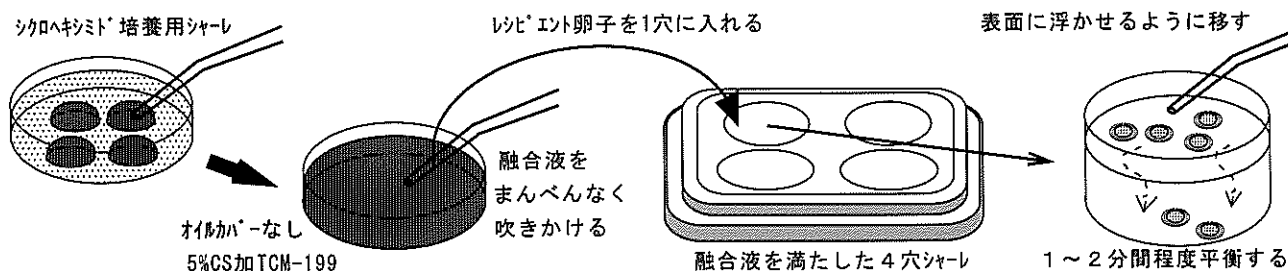


図18. レビ[®]ント卵子の融合液への導入

- ⑥融合液中で1～2分間程度（その間にレビ[®]ント卵子が底面に沈む）平衡する。
- ⑦平衡している間、電気処理用の融合チャンバー内を洗浄用シャーレの融合液で数回洗浄する。洗浄には、融合チャンバーを充たす量（センターでは約40μl）に設定したマイクロベットを用いる。
- ⑧洗浄後の融合チャンバーに融合液を充たして、交流電流を流す。
- ⑨融合チャンバーの中にレビ[®]ント卵子を移し、底面に沈んだのを確認したら直流電流（45V，50μsec × 1回）を流す。
- ⑩電気処理したレビ[®]ント卵子を再び4穴シャーレ（別の穴）へ戻し、10分間静置する。
- ⑪10分後、再び同様の操作を行い、2回目の電気処理を行う。
- ⑫計2回の電気処理をしたレビ[®]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、インキュベートする。

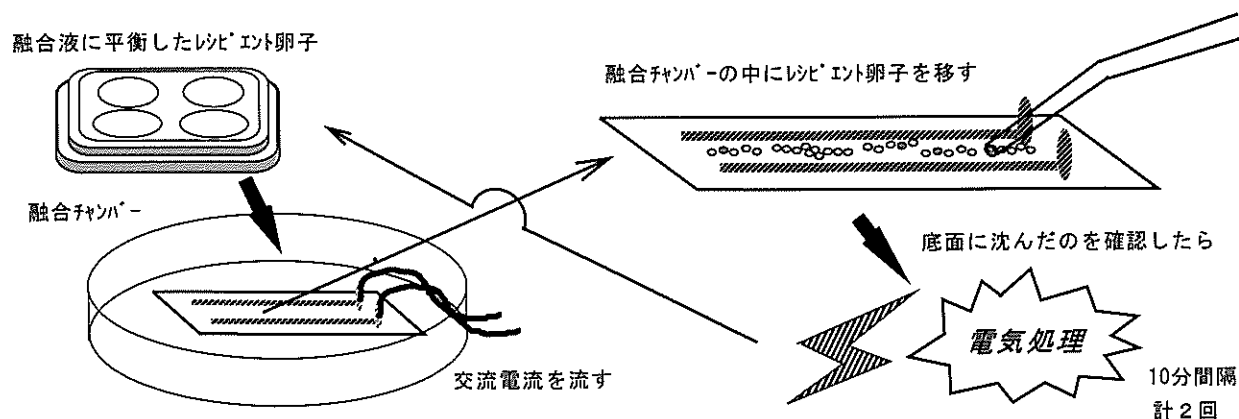


図19. レビ[®]ント卵子の電気処理

6. ドナー胚の割球分離

1) 体外受精胚

16～32細胞期胚（媒精後5～6日目）の透明帯を0.5%アクチナーゼで溶解した後、5%CS加TCM-199のドロップに移し、口径の細いパステルピペットを用いてピペッティングにより割球を単離する。

2) 生体由来胚

ホルディングピペットとカッピングニードルを用いて、5～6日齢胚の透明帯の2/3程度を切開した後、5%CS加TCM-199のドロップに移し、口径の細いパステルピペットを用いてピペッティングにより割球を単離する。

※割球単離が困難な場合は、0.05%トリプシンまたはPBS（－）で割球の結合を弱めてからピペッティングで割球の単離を行う。

※生体由来胚は、体外受精胚と違い0.5%アクチナーゼを用いて透明帯を溶解するには時間がかかることから胚への悪影響が懸念される。このため、透明帯を切開する方法が望ましい。

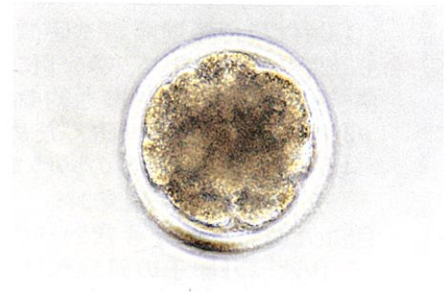


写真7. 16～32細胞期のドナー胚

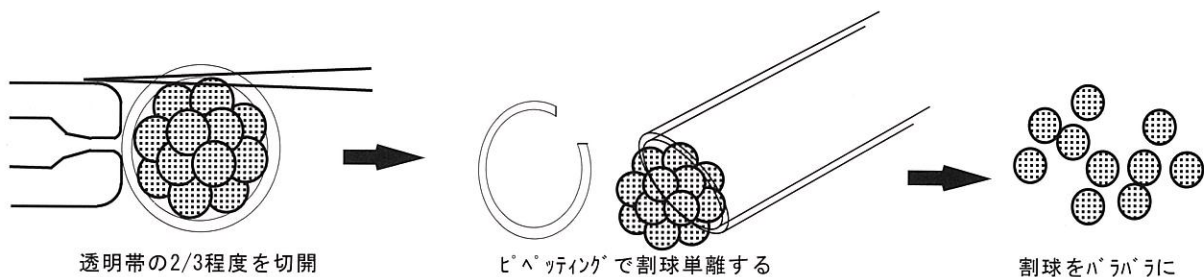


図20. ドナー胚の割球分離

7. インジェクション

準備：シクロヘキシミド インジェクション用シャーレ(φ 60mm, 10μg/mlシクロヘキシミド in 5%CS加TCM-199, 2~3 μl × 9個), シクロヘキシミド 洗浄用シャーレ(φ 35mm, 10μg/mlシクロヘキシミド in 5%CS加TCM-199, オイルカバー), シクロヘキシミド 培養用シャーレ(φ 35mm, 10μg/mlシクロヘキシミド in 5%CS加TCM-199, 100μl × 4個), 5%CS加TCM199, 洗浄用シャーレ(φ 35mm)

- 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シクロヘキシミド インジェクション用シャーレに、レシビエント卵子を(1ドロップあたり15~20個程度)移す。
- ③同様に、ドナー割球を別のドロップに移す。

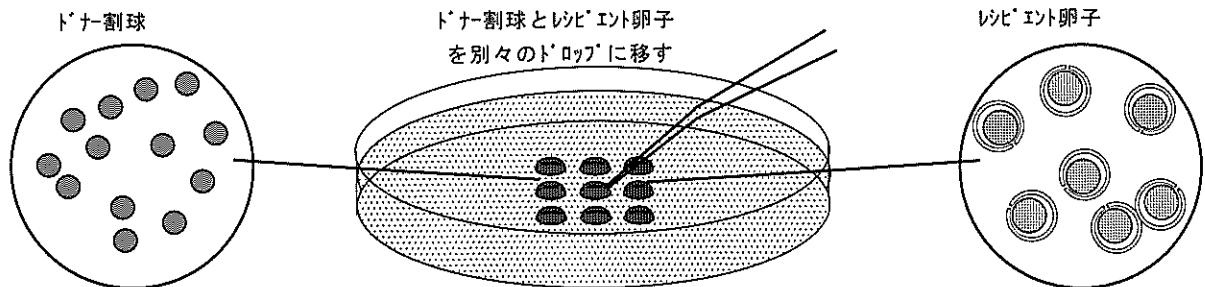


図21. シクロヘキシミド インジェクション用シャーレへのレシビエント卵子ならびにドナー割球の導入

- ④シクロヘキシミド 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割球を連銭状に吸引する(約10個)。
- ⑥レシビエ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ドナー割球を吸引したインジェクションピペットを、レシビエント卵子の切開部から差し入れる(3時の方向から12時の方向に挿入)。
- ⑧1個のドナー割球を卵胞腔内に入れ、インジェクションピペットを抜く。このとき、レシビエント卵子の細胞質とドナー割球の細胞膜同士が密着するよう深部に注入する。
- ⑨インジェクションを終えたレシビエント卵子はシクロヘキシミド 洗浄用シャーレで1回洗浄後、シクロヘキシミド 培養用シャーレに移し、インキュベーター内(38.5℃、5%CO₂ in air)で一時保存する。

インジェクションピペットに
ドナー割球を吸引

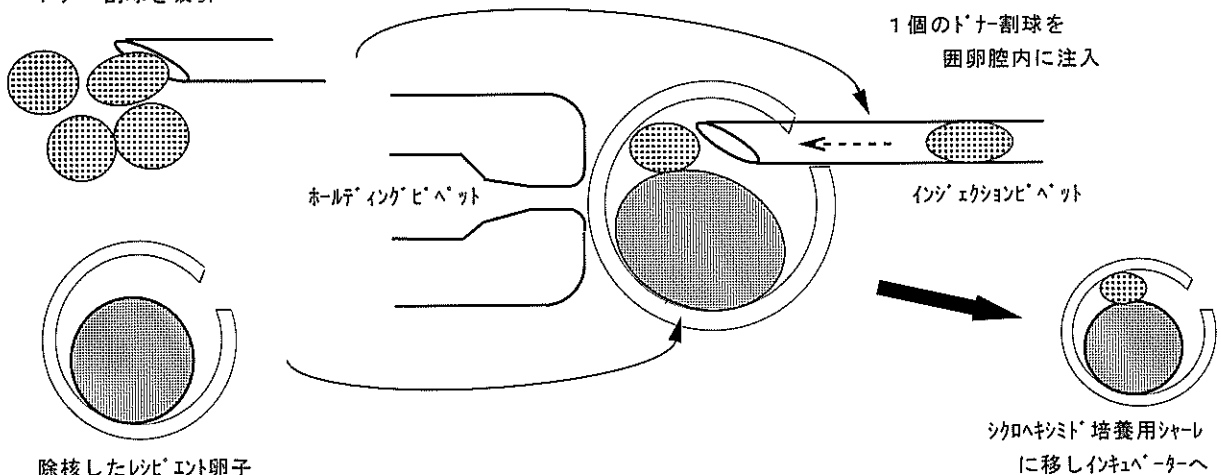


図22. ドナー割球のインジェクション

8. 電気融合（細胞融合）

準備：融合液、4穴シャーレ、洗浄用シャーレ（φ35mm）、融合チャンバー、5%CS加TCM-199

①～⑦は、P23の「5. 活性化処理（電気処理）」と同様。

但し、1穴あたり15～20個程度を平衡する。

⑧融合チャンバーに平衡済みの卵子を10個程度移し、交流電流を流す。

※交流を通電することで、ドナー割球とレビエント卵子細胞質の接触面が、融合チャンバーの電極に対して垂直となる。それ以外のものは、いったん融合チャンバーから取り出し、別の穴に移しておく。

⑨融合チャンバー内の卵子が、ドナー割球とレビエント卵子の細胞質との接触面が電極に対して垂直の状態になったら直流電流（68V, 50 μ sec $\times$ 1回）を流す。

⑩処理した卵子は4穴シャーレに戻す。残る未処理の卵子（別の穴に移したのものも含む）は、⑧～⑨を繰り返して処理する。

※交流を通電しても向きが垂直にならない（別の穴に移した）卵子は、パスツールピペットで向きを直したうえで、交流電流（1sec程度）と直流電流を流すか、直流電流のみを流して処理する。

⑪5%CS加TCM-199の入った洗浄用シャーレで2回洗浄して、5%CS加TCM-199の培養用シャーレのドロップへ移し、インキュベーター内（38.5 $^{\circ}$ C、5%CO₂ in air）で培養する。

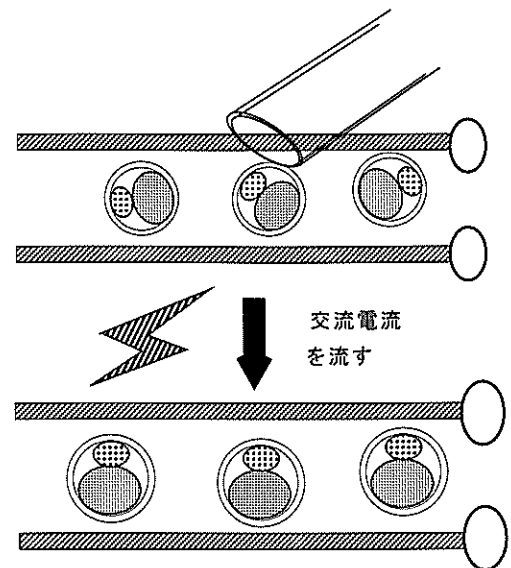


図23. 融合チャンバー内の卵子

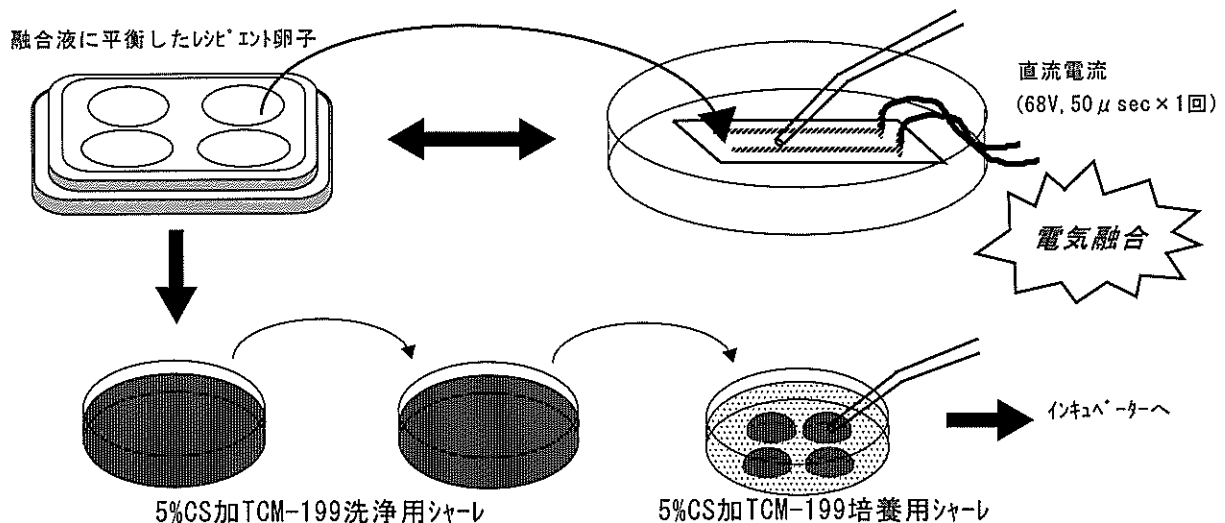


図24. 電気融合

※電気融合の原理は、交流電流によってドナー割球とレビエント卵子との細胞膜の接触面をできるだけ広く密着させ、直流電流によって接触した細胞膜を一時的に破壊することによる。ここで一番重要なことは、必ず細胞膜の接触面に対して直流電流が垂直に流れることである。

9. 発生培養

準備：5%CS加CR1aa洗浄用シャーレ(φ35mm, 5%CS加CR1aa),
5%CS加CR1aa培養用シャーレ(φ35mm, 5%CS加CR1aa)

- ①5%CS加CR1aa洗浄用シャーレで2回洗浄する。
- ②洗浄後、5%CS加CR1aa培養用シャーレに移し、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) 融合の確認

発生培養時の培地交換(電気融合約1時間後から可能)の際に、ドナー割球とレシピエント卵子細胞質の融合を確認する。

※細胞の融合は、電気融合約10～20分後からみられ1時間後には融合の有無が確認できる。

2) 初期発生検査

再構築胚の発育状態(分割数)により、「変性卵」、「1細胞期」、「2～4細胞期」および「5細胞以上」のステージに分類する。

3) 胚盤胞発生検査

核移植日を0日として7～9日目まで胚盤胞の発生を検査する。

※発生検査に要する時間は、できるだけ短時間(シャーレ1枚につき3～4分程度)とする。

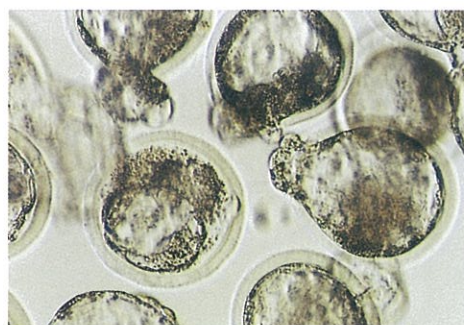


写真8. 受精卵由来核移植の胚盤胞胚



写真9. 受精卵由来クローン産子(一卵性由来二つ子)