

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 ↓ レビメント卵子採取 ↓ 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
(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）

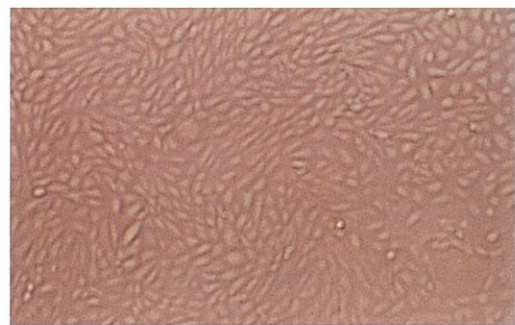
3. レシピエント卵子の調整

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

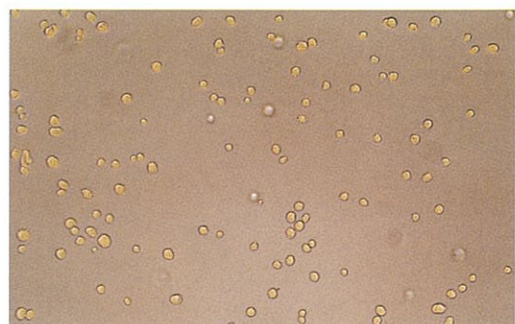


写真10. 培養細胞(卵管上皮)

※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（φ 60mm, 5%CS加TCM-199, 2～3μl×9個），洗浄用シャーレ（φ 35mm, 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。

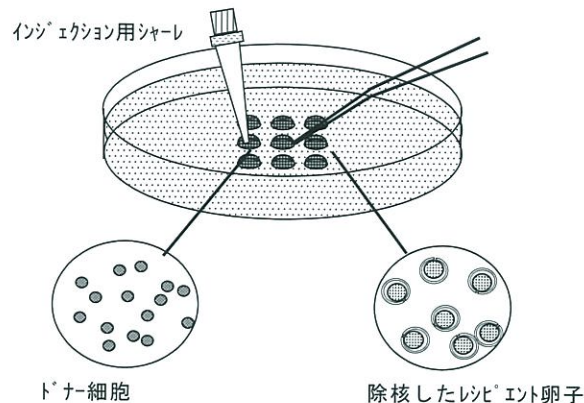


図25. インジェクション用シャーレへのレシトント卵子ならびにドナー細胞の導入

※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。

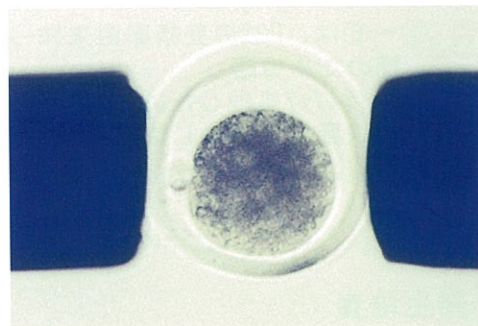


写真11. ホール型電極

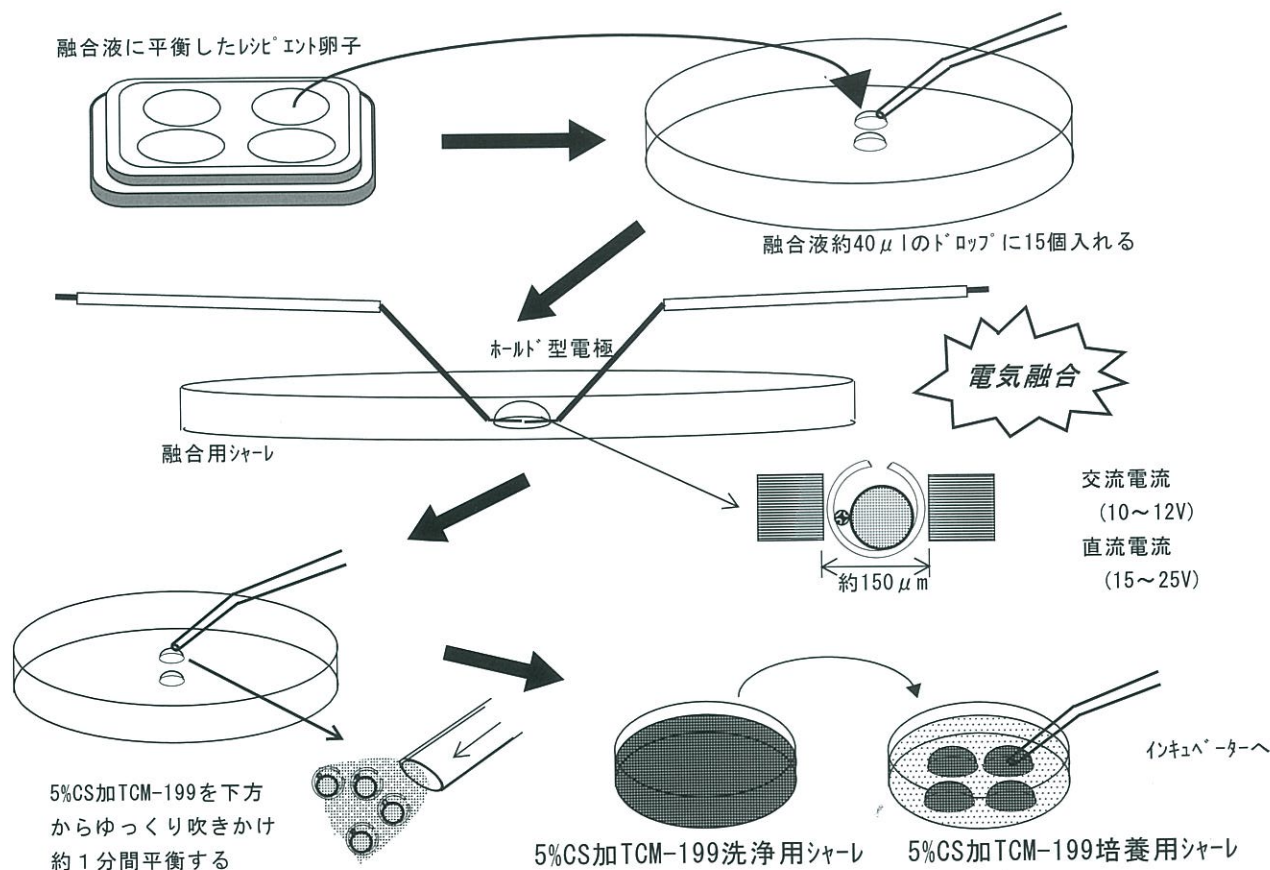


図26. ホール型電極による電気融合

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。

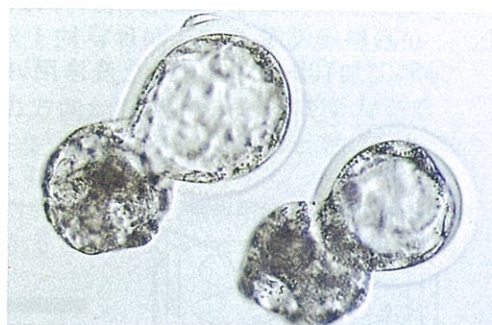


写真12. 体細胞由来核移植の胚盤胞期胚



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)