

卵細胞質内に注入法を用いた牛核移植

牛島 仁・石田和昭・長嶋比呂志*¹

Bovine Nucleus Transplantation by Intra-Cytoplasmic Injection

Hitomi USHIJIMA, Kazuaki ISHIDA and Hiroshi NAGASHIMA *¹

目 的

核移植技術は、複雑な手法の組み合わせから構成されている。卵細胞質内注入法を牛に応用すれば除核操作、核の注入操作および融合操作など、核移植の効率化が図られるかもしれない。そこで、牛の核移植に卵細胞質内注入操作を導入する為に必要となる条件設定を行った。

方 法

体外成熟によって第2成熟分裂中期に達した卵を除核してレシピエント卵とした。ドナー細胞は体外成熟卵に付着した卵丘細胞をピペッティングによって単一細胞にした後、顕微鏡下で比較的小さな細胞のみを採取して使用した。ドナー細胞を操作用ピペットの先端に吸引し、パルスを加えることによってその細胞膜を破壊した。ついで、操作用ピペット先端部を透明帯裂断面から卵細胞質深部へと挿入した後、卵細胞質を1-2 pI吸引した。再度パルスを加えることで卵細胞膜を尖通後、卵細胞質内にドナー細胞を移植した。作出した再構築胚は、7%エタノール液中に7分間浸漬した後10 μg/mlシクロヘキシミド液中で5時間培養すること、もしくは5 μMイオノマイシンにて4分間処理後1.9mMジメチルアミノプリン液中で3.5時間培養することにより活性化した。作出した核移植胚は、体外培養に供試して胚盤胞への発達能を調べた。

結 果

実験1：卵細胞質内注入法による核移植胚の作出効率を調べた。その結果、一連の核移植操作によって、死滅する卵は5-10%であった。作出した胚の25-30%が胚盤胞へと発達し、従来の電気融合による核移植法の発生率(20-30%)と

同等の成績を得た。実験2：効率的な卵細胞質内注入核移植法を検討するため、核移植から活性化処置するまでの時間が胚発生に及ぼす影響について調べた。再構築した核は、活性化直後に核移植した区で19% (5/27)、活性化直前に核移植した区で48% (12/25)であった。胚盤胞への発生率は、活性化直後および直前の核移植において、それぞれ8% (4/49)および25% (14/56)であった。このことから、活性化に先んじて核を移植することにより、核の再構築が起こりやすくなり、胚盤胞への発生率も高くなることが明らかとなった。以上のことから、細胞質内注入法は体細胞核移植の生産性を向上させる方法、およびウシ体細胞核移植胚の発生能を決定する要因の解明手段として利用可能と考えられる。

謝 辞

ピエゾマイクロマニピュレーターによる核移植のご指導を賜った国立感染症研究所 小倉淳郎博士に感謝いたします。(第3回生殖工学会シンポジウム要旨集P5-6、2001)

*¹ 明治大学農学部

平成13年8月31日受付