

= ミニレビュー =

ピエゾマイクロマニピュレータを用いた発生工学技術について The technology for developmental engineering with piezo micromanipulator

岩元 正樹

Masaki IWAMOTO

プライムテック株式会社 先進技術開発チーム, 〒300-0841 茨城県土浦市

iwamoto@primetech-jp.com

要旨

発生工学とは、哺乳類に限らず様々な生物種の生殖細胞や胚に人為的な実験操作を加えた後、発生を進行させ成体を作成する技術開発と、作出した成体を用いて基礎および応用研究を行うことを目的としている。これにより、哺乳動物を中心に発生機構の解明が進むと同時に、生物学、医学、畜産学、実験動物学等への応用が進展してきている。発生工学研究は、発生学、細胞生物学および分子生物学の各種の技術や知識を基本として行われており、哺乳類胚において特に必要とされる基本的な技術として1)初期胚の作出・体外培養技術、2)生殖細胞や胚への顕微鏡下での操作(マイクロマニピュレーション)や遺伝子操作、3)操作した胚を、仮親へ移植し個体を作成するために関連する技術の3つの技術が挙げられる。その中でも、2)の顕微鏡下での操作や遺伝子操作については、マイクロマニピュレーション技術が基本技術となり、顕微授精、核移植、DNA注入およびES (embryonic stem)細胞注入に応用できる。

従来、このマニピュレーション技術は、その操作に職人技が必要となり、習得に時間がかかり、新たな発生工学技術の進展には、簡便な操作方法の開発が必要とされた。1990年代前半にプライムテック株式会社より開発・発売されたピエゾ駆動式マイクロマニピュレータ(piezo micro manipulator; PMM)は、セッティング方法を習得すれば、従来から必要とされたその職人技の習得が必要なく、容易に操作ができる。PMMは、ピエゾ(圧電素子; piezo electric elements)を伸縮させることによって得られる慣性力を動力としたステップ状の駆動原理に基づき、0.1 μm 以下の超微動域の動作が可能となる。そのため、卵子や胚の弾性のある透明帯や伸展性の高い卵細胞膜でも微細ピペットをスムーズに挿入可能となり、顕微操作による損傷を最小にすることで、操作者による差もほとんどない。また、従来からマニピュレーション操作に使用されていたガラスマイクロピペットは、卵子や胚への穿刺性を高めるために、先端を鋭利に研磨しスパイクと呼ばれる棘状に仕上げたものが用いられていたが、この先端の形状が卵子への穿刺性に大きく影響する。さらに、穿刺する際、卵子の変形や卵細胞質の流動等のストレスのため、崩壊および変性する割合が高くなる。一方、PMMを用いた場合、ガラスマイクロピペットの先端は、平らであり特殊な加工が必要ないため、先端形状による穿刺性への影響は、ほとんどない。また、卵子や胚への穿刺する際の変形や卵細胞質の流動もなく穿孔することが可能となり、穿刺後の崩壊や変性を軽減できる。

PMMの使用用途は、上記の基本的なマニピュレーション操作の顕微授精、核移植、ES細胞注入、バイオオプシー、アシストハッチング等に利用され、哺乳動物卵子のみならず魚介類卵子等への応用もされ幅広く使用されている。本稿では、PMMを用いた発生工学技術について、これまでの報告例をまとめたので紹介する。

キーワード: ピエゾマイクロマニピュレータ, PMM, ICSI, 顕微注入, 核移植

投稿日: 2013年11月29日

掲載決定日: 2013年12月16日

ウェブサイト事前公開日: 2013年12月17日

顕微授精(卵細胞質内精子注入法, intracytoplasmic sperm injection; ICSI)

顕微授精は、卵子に対して人為的に精子を授ける技術である。顕微授精には、機械的に卵子の透明帯に穴を開けて精子が侵入し易くする透明帯開孔法、卵子囲卵腔内に直接精子を注入する囲卵腔内精子注入法および卵細胞質内に精子を直接注入する卵細胞質内精子注入法(以下ICSI)等の技術があるが、現在ではICSIが、顕微授精と同じ意味として使われることが多くなっている。

様々な生物種でICSIを用いた研究が行われているが、哺乳動物で初めて報告したのはハムスター卵子にハムスター精子を注入し前核形成を観察したUehara & Yanagimachi (1976)[1]である。その後、ウサギ(1988)[2]、ウシ(1990)[3]およびヒト(1992)[4]では産子の作出も報告されている。マウスにおいては、卵子の特性から、ハムスターやヒトと同様の手法では、精子を卵細胞質内に顕微注入した後の生存率が著しく低下し、受精率および胚盤胞形成率も低下するため、長年難しい技術とされてきた。しかし、1995年にKimura & Yanagimachiが報告したマウスのICSIでは、ピエゾマイクロマニピュレータ(piezo micro manipulator; PMM, プライムテック社製)を用いることで、生存率が大幅に改善され多くのマウス産子が得られた[5]。その理由は、マウス卵子の卵細胞質膜の伸展性が高いため、従来法で用いるピペットの先端の鋭利な形状では卵子への穿刺の際、変形や損傷等の悪影響が生じるのに対し(図1A)、PMMを用いた場合は、取り付けたピペットの先端が平坦な形状のため、そのような悪影響が少ないうえに、安定した穿刺性が得られるためであった(図1B、図2)[5]。その後、マウスICSIは、PMMによるマウス精子の不動化を行うと同時に頭部と尾部を切断し、頭部のみを注入する一般的な手法となった[6]。

Kimura & Yanagimachiの報告により、PMMを用いた顕微授精は、国内外の多くの研究者によって、その応用は一気に広がり、ヒト(1998)[7]、ラット(2002)[8]、ウシ(2002)[9]、ハムスター(2002)[10]、ブタ(2003)[11]、メダカ(2009)[12]等で報告されている(表1)。Hirabayashi *et al.* [8]は、ラットでPMMを用いたICSI成功例を報告している中で、ピペットの先端外径を従来使用されていた7-10 μm から 2-4 μm に最小にすることで生存率および受胎率を改善していた。ピペット外径を最小にすることで、精子注入時の培養液注入量を最小限にしたことが生存率および受胎率改善の要因であると報告している。上述のようにPMMの穿刺性は、ピペットの先端形状の影響を受け難いため、先端外径を小さくしても卵子への安定した穿刺性が得られたことも成功要因の一つとして

考えられる。Yamauchi *et al.* [10]は、ハムスターにおいてPMMを用いたICSIでの産子作出に成功している。ハムスター卵子は、実験室の電灯等の短波長の光により胚発生等に悪影響が及ぼされることが報告されており、体外およびインキュベーターの外での操作を迅速に行うことが必要となる。そこでYamauchi *et al.*は、マニピュレーションを行う実験室の電灯や顕微鏡の光源からの短波長の光を卵子や胚に長時間照射しないことで生存率と受精率を改善した。Nakai *et al.* [11]は、ブタにおいて初めて体外成熟卵子を用いたICSIの産子作出の成功例を報告している。ブタの体外受精において多精子受精が問題とされており、Nakai *et al.*のPMMを用いたICSIは、その問題を解決する1つの手段となった。

ICSIはヒトでの不妊治療でも、Palermoの報告[4]以来、一気に臨床応用され、同時に技術革新も進んできている。Yanagida *et al.* [7]は、PMMを用いたヒトのICSIを従来法と比較し、PMMを用いた手法が卵子生存率および受精率が有意に改善されることを報告している。現在では技術革新も進み、従来法でのヒトICSIでも高い生存率と受精率が得られるようになっているが、PMMとピペット外径を最小にした極薄肉管ピペットの組み合わせにより、卵子への注入時の負担を軽減させることが可能となり、さらに生存率を高めることができたとの報告もされている[13]。

Kimura & Yanagimachiが報告したこの技術は、上述のような他の動物種への応用以外にも、フリーズドライ精子によるICSI [14]、精子ベクターによる遺伝子組換え動物の作製[15]およびクローンマウスの作出[16]での基盤となった。

ES細胞注入

発生工学において、胚への遺伝子操作は重要な技術の一つである。1980年にマウスにおいては、直接受精卵の前核にDNAを注入する方法で遺伝子改変個体を作成する技術が開発されたが、特定の遺伝子配列に対する操作が不可能であった。一方、マウスにおいて胚性幹(embryonic stem; ES)細胞が樹立され(1987)[17]、このES細胞をマウス胚に移植することでキメラ個体を介してES細胞の形質をその子孫に伝達する技術が1980年代に確立された[18]。さらにES細胞に対してジーンターゲットングと呼ばれる染色体の特定の遺伝子配列を自由に変換する遺伝子組み換え操作が行えるようになり、遺伝子組換えマウスの作出が可能となった[19,20]。このキメラマウスを用いたジーンターゲットング(ノックアウト)法により、胎児や成体における形態形成、免疫、器官形成、脳神経機能等の分子メカニズムの解析が進み、基礎的な研究が進展している。

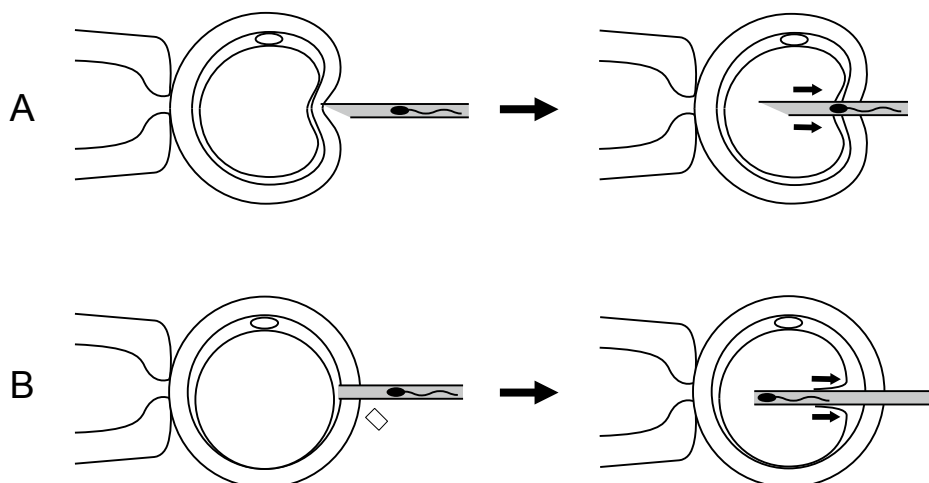


図1. 穿刺方法

A: 従来法の鋭利なピペットによる卵細胞質への穿刺状況

B: PMMを用いた先端が平らなピペットによる卵細胞質への穿刺状況

Kawase *et al.*は、マウス胚盤胞に組換えES細胞を注入する際に、PMMを用いる手法を報告している(2001)[21](図3)。Kawase *et al.*の報告では、通常法とPMMを用いた場合において、キメラ産子率では差はないものの、ES細胞注入後の生存率においてPMMを用いた方が有意に高くなることが示されていた。また、1時間当たりの操作数もPMMを用いた場合は、通常法の約3倍の数の胚に操作が可能となり、効率良くキメラマウスを作出できるようになっていた。Kawase *et al.*は、通常法では胞胚腔が極力大きい拡張胚盤胞を選別して穿刺するのに対して、PMM法は胞胚腔の大きさに関係なく安定して穿刺できることも利点として挙げている。

体細胞核移植

1997年に世界で初めての体細胞クローン動物の作出が、Wilmot *et al.*によってヒツジで報告されて以来[22]、現在までに、ウシ[23]、マウス[16]、ヤギ[24]、ネコ[25]、ウサギ[26]、ラバ[27]、ウマ[28]、ラット[29]、シカ、イヌ[30]、オオカミ[31]、フェレット[32]、ラクダ[33]においてクローンの作出成功例が報告されている。また、筆者らのグループは、2000年にブタの体細胞クローンの作出成功例を世界で初めて論文報告している[34]。体細胞クローン技術の利用としては、畜産分野において優秀な形質を持つ家畜の大量生産や家畜育種改良の効率化が上げられる。また、通常の畜産上の応用以外にも希少(野生)動物の保護、遺伝子組み換え技術を利用した有用物質生産のため動物工場化、移植用臓器の生産等の幅広い応用が期待されている。

体細胞クローンの作出における一般的な核移植方法は、第二減数分裂中期の未受精卵子の染色体を除去し(除核)、その除核卵子細胞質に細胞周期をG1/G0期

に同期化した体細胞核を導入する。その後、発生を開始させるための受精の疑似刺激としての薬剤や電気刺激による活性化処理を行う。体細胞核移植において核の導入法は、電気融合法と顕微注入法の2つが挙げられる。電気融合法は未受精卵子の除核後、体細胞核を電気刺激により卵細胞質内に融合・導入する方法である。最初の体細胞クローン作出成功例のヒツジやウシにおいて、この電気融合法を用いて核の導入を行い、体細胞クローンの作出に成功している。その後、マウス[35]やブタ[36]においても電気融合法による体細胞クローン作出成功例が報告されている。電気融合を行った後、再度電気刺激もしくは薬剤処理により活性化を促すが、ウシにおいてはその処理のみでは活性化が困難であるため、タンパク質合成阻害剤を併用している。一方、マウスにおいては、卵子の活性化が容易に誘発されるため、電気融合法では融合液のCa²⁺濃度等の条件を厳密に設定しない限り、核の導入と同時に活性化を受け易くなる。Wakayama *et al.* [16]により開発された顕微注入法は、Kimura & Yanagimachiが報告したPMMを用いたICSIを応用した体細胞核を直接、除核卵子の細胞質内に核を導入する方法である(図4)。この手法は、体細胞核導入時に卵子の活性化を誘発しない。そのため、体細胞核が未受精卵子の細胞質内に存在する卵成熟促進因子(maturation promoting factor; MPF)の影響を受けることになり、染色体凝縮 (premature chromosome condensation; PCC)を起こす。このPCCが体細胞クローンマウスの作出効率に関連することも報告されている。ラットに関しては、プロテアーゼ阻害剤であるMG132で卵子を処理することでMPF活性の低下を抑制し、PMMを用いた核移植により体細胞クローンの作出に成功している[29]。

表1. ピエゾマイクロマニピュレータを用いたICSIの報告例

動物種	発表者	内容	発表年	文献番号
マウス	Kimura & Yanagimachi	世界初のPMMを用いたマウスICSI成功例	1995	5
ヒト	Yanagida et al.	ヒトのICSI	1998	7
マウス	Wakayama et al.	マウスフリーズドライ精子によるICSI成功例	1998	14
マウス	Perry et al.	マウス精子ベクターによるICSIでの組換え個体作出成功例	1999	15
ラット	Hirabayashi et al.	ラットのICSI	2002	8
ウシ	Horiuchi et al.	ウシのICSI	2002	9
ハムスター	Yamauchi et al.	ハムスターのICSI	2002	10
ブタ	Nakai et al.	ブタのICSI	2003	11
メダカ	Otani et al.	メダカのICSI	2009	12

表2. ピエゾマイクロマニピュレータを用いた体細胞核移植の報告例

動物種	発表者	内容	発表年	文献番号
マウス	Wakayama et al.	体細胞クローン作出	1998	16
ブタ	Onishi & Iwamoto et al.	体細胞クローン作出	2000	34
マウス	Wakayama et al.	体細胞核移植胚からES細胞樹立	2001	41
ウシ	Ushijima et al.	核移植胚作出	2002	37
ウシ	Galli et al.	体細胞クローン作出	2002	38
ラット	Zhou et al.	体細胞クローン作出	2003	29
マウス	Kishigami et al.	体細胞クローン作出、HDACi使用	2006	47
マウス	Rybouchkin et al.	体細胞クローン作出、HDACi使用	2006	48
マウス	Inoue et al.	体細胞クローン作出、Xist-KO細胞	2010	49
マウス	Matoba et al.	体細胞クローン作出、Xist-siRNA使用	2011	50

HDACi: Histone deacetylase inhibitor, Xist-KO: Xist遺伝子ノックアウト, Xist-siRNA: RNA干渉によりXist遺伝子の発現抑制



図1. PMMを用いたマウスICSI
矢頭: マウス精子頭部

筆者らは、ブタの体細胞核移植において以下の2つの理由からPMMを用いた顕微注入法を選択した。1つ目の理由としてブタ卵子も、マウス同様に電気刺激により容易に活性化を受けるため、核の導入と活性化を分け、体細胞核が卵子細胞質内のMPFによりPCCを生じることが重要と考えた。2つ目の理由としてブタは多胎のため、妊娠率を高めるために多数の胚移植用クローン胚が必要であると考えられた。多数のクローン胚を迅速かつ簡便に作出することが必要と考えられ、PMMを用いた顕微注入法は最適であった。筆者らは、これらの理由から顕微注入法による体細胞クローンブタの作出を試み、国内初のクローンブタ作出に成功した。この結果から、顕微注入法によりブタでも体細胞クローンの作出が可能であることが確認できた。

ウシの核移植では、電気融合法が多く用いられているが、ドナー細胞の直径が小さい場合において融合率が低下する場合がある。そこでUshijima *et al.* [37]は、ドナー細胞の直径が小さい場合に、融合率への影響を受けないPMMを用いた顕微注入法がウシ体細胞核移植でも使用できるか検討を行った。その結果、ウシの核移植において顕微注入法を用いた場合でも、胚盤胞を作出できることを報告している。さらに、体細胞核を注入する際に、細胞内カルシウム導入剤であるinositol 1,4,5 triphosphate (IP3)を同時に注入することで胚盤胞発生率が向上する結果を示している。また、Galli *et al.* [38]は、PMMによる顕微注入法と電気融合法によるウシ核移植胚の産子への発生率を比較し、差がないことを報告している。

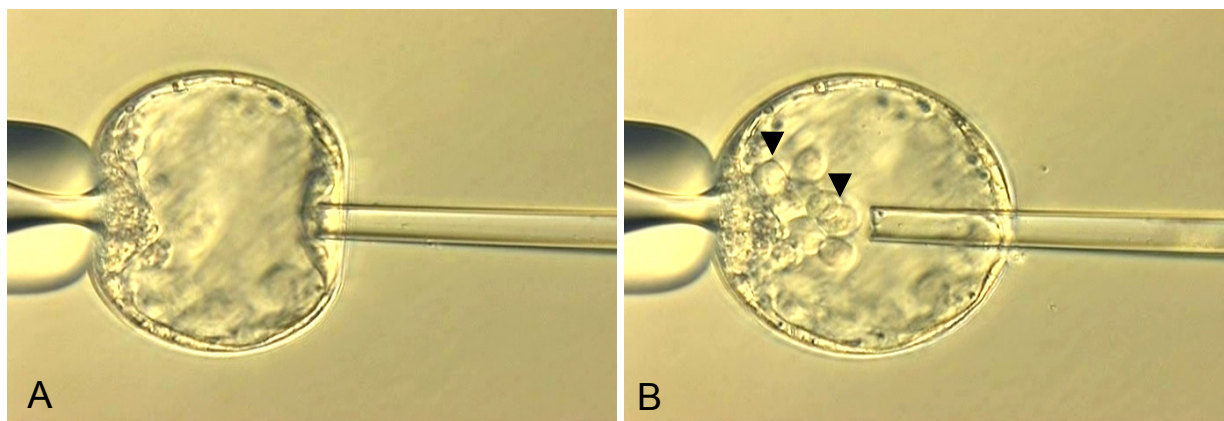


図3. ピエゾマイクロマニピュレータを用いたマウス胚盤胞へのES細胞注入操作
AからBの手順で操作を行う。A:マウス胚盤胞の透明帯を穿孔した直後の写真。B: マウス胚盤胞の栄養膜外胚葉を穿孔した後、ES細胞を注入した直後の写真。矢頭: 注入されたマウスES細胞。

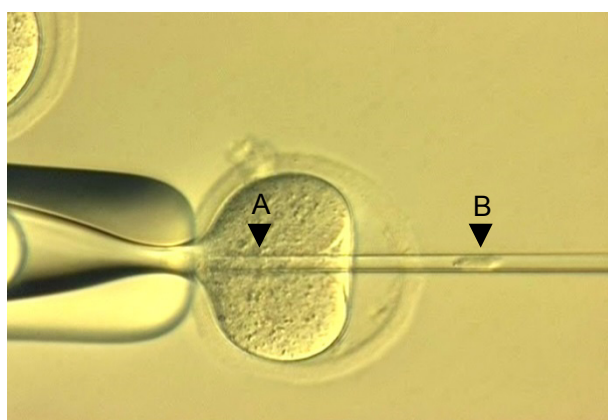


図4. ピエゾマイクロマニピュレータを用いたマウス核移植操作(体細胞核注入)
矢頭A: 保持した除核卵子に注入するマウス体細胞核。矢頭B: 次の卵子に注入するためにピペット内に吸引されているマウス体細胞核。

Wakayama *et al.*が開発したPMMを用いた核移植技術は、マウスを中心に一般的に確立された手法[39, 40]となっており、胚発生の基礎研究や遺伝子組換え動物の作出等に幅広く利用されている(表2)。さらに、Wakayama *et al.* [41]は、核移植胚からES細胞を樹立することに成功し、ntES (embryonic stem cell via nuclear transfer)細胞分離技術も確立した。この技術はヒトにおいても応用されており、再生医療への利用が期待されている[42]。また、筆者らは、顕微注入法による体細胞クローンブタの作出技術を遺伝子組換えブタの作出に利用した。遺伝子組換えブタは、医療用モデルブタとして、臓器移植モデル[43,44]、再生医療用モデル[45]およびヒト疾患モデル[46]が作出されている。

体細胞クローン技術は、発生工学技術が結集された複合技術である。胚操作、培養および胚移植技術等が必要とされ、どれか一つでも不完全であると個体の作出は困難となる。PMMは、その中の胚操作(核移植)において安定した穿刺性と操作性を与え、技術としては安定したレベルまで達しているものと思われる。しかし、これ

らの発生工学技術がある程度のレベルまで確立されている動物種においても体細胞クローンの作出成功率は、現在においてもきわめて低いという問題点を抱えている。この問題点は、どの動物種においても多少の差はあるものの、同様である。体細胞クローンの作出効率が低い主たる原因としては、体細胞核のリプログラミングがその後の胚発生に大きく影響する可能性が挙げられ、その制御が重要とされている。近年、脱アセチル化酵素阻害剤(histone deacetylase inhibitor; HDACi)であるトリコスタチンA等を核移植胚の発生初期に添加することで胚発生の改善やクローンの作出効率が向上するとの報告が数多くなされている[47,48]。また、核移植初期胚ではX染色体の不活化で重要な働きのある*Xist*遺伝子が過剰に発現する問題が報告され、その過剰な発現を*Xist*遺伝子ノックアウト[49]もしくはRNA干渉により*Xist*遺伝子の発現を抑制し、体細胞クローンの作出効率を改善したとの報告もある[50]。しかし、現状では大幅な改善までには至っていないことから、リプログラミングの制御には、さらなる手法の改善が必要と考えられる。近年、

再生医療の分野では、Yamanaka *et al.*により開発されたiPS (induced pluripotent stem)細胞が注目されている[51]。iPS細胞は、分化多能性に関連する4遺伝子を線維芽細胞に導入し、ES細胞様に誘導することで作出される。4遺伝子が線維芽細胞をリプログラムすることで多能性幹細胞に誘導しているものと考えられている。このiPS細胞研究におけるリプログラミングは、体細胞クローン技術に共通する課題として参考にする必要がある。

今後の展望と課題

これまで解説してきたようにPMMは、近年の発生工学・生殖工学の著しい伸展に大きく貢献している。特にマウスにおけるICSIおよび核移植による基礎的な発生機構の解明やヒトの不妊治療でのICSIで多く利用されている。PMMを用いた発生工学技術は、安定した穿刺性と操作性から、マウスやブタ等の多胎動物では多数の卵子に対して短時間で簡便な操作が可能となり、ヒトの不妊治療では、1個の卵子に対して優しい操作を行うことが可能となる。一方、従来から行われているマニピュレーション技術は、先に述べたように操作者の癖や経験に基づく感覚が重要な職人技が必要とされる。そのため、基礎研究分野では、安定したデータの取得までの時間が必要となる上に、データの精度にも影響が生じる可能性がある。また、不妊治療施設では、近年の晩婚化に伴う高齢出産の影響で治療件数が増大し、マニピュレーション操作等についての新人教育を行う余裕のない状況が出てくるのが予想される。そのような中で、PMMの安定した操作技術法をさらに発生工学・生殖工学分野で共有することにより、発生生物学の基礎研究分野でのデータの信頼性を向上させ、不妊治療分野では新人のマニピュレーション教育に最適な技術となるものと考えられる。筆者らは、PMMによる発生工学技術のさらなる進展を目指した研究開発を継続すると同時に本誌日本生殖工学会を含む各関係学会と連携を取り、PMMを用いた発生工学技術についての研修事業などを手掛けて、若手研究者や不妊治療施設の培養士等の育成や技術支援を行い、研究および不妊治療分野のさらなる技術発展に貢献したい。

謝辞

本レビューを作成するに当たり、ご助言頂いた独立行政法人 農業生物資源研究所菊地和弘博士、ご協力頂いたプライムテック株式会社代表取締役 三松淳社長、安田正樹氏、大石貴嗣氏、高山径子氏、土方彩子氏、矢崎智子氏に感謝いたします。

参考文献

1. Uehara T, Yanagimachi R. Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. *Biol. Reprod.* 1976; 15: 467-470.
2. Hosoi Y, Miyake M, Utsumi K, Iritani A. Development of rabbit oocytes after microinjection of spermatozoon. *Proc. 11th Int. Congr. Anima. Reprod. Artificial Insem.* 1988; 3: 331-333.
3. Goto K, Kinoshita A, Takuma Y, Ogawa K. Fertilisation of bovine oocytes by the injection of immobilised, killed spermatozoa. *Vet. Rec.* 1990; 127: 517-520.
4. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet.* 1992; 340: 17-18.
5. Kimura Y, Yanagimachi R. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol. Reprod.* 1995; 52: 709-720.
6. Yoshida N, Perry ACF. Piezo-actuated mouse intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Nature Protocol.* 2007; 2: 296-307.
7. Yanagida K, Katayose H, Yazawa H, Kimura Y, Konnai K, Sato A. The usefulness of a piezo-micromanipulator in intracytoplasmic sperm injection in humans. *Hum. Reprod.* 1999; 14: 448-453.
8. Hirabayash M, Kato M, Aoto T, Sekimoto A, Ueda M, Miyoshi I, Kasai N, Hochi S. Offspring derived from intracytoplasmic injection of transgenic rat sperm. *Transgenic. Res.* 2002; 11: 221-228.
9. Horiuchi T, Emuta C, Yamauchi Y, Oikawa T, Numabe T, Yanagimachi R. Birth of normal calves after intracytoplasmic sperm injection of bovine oocytes: a methodological approach. *Theriogenology.* 2002; 57: 1013-1024.
10. Yamauchi Y, Yanagimachi R, Horiuchi T. Full-term development of golden hamster oocytes following intracytoplasmic sperm head injection. *Biol. Reprod.* 2002; 67: 534-539.
11. Nakai M, Kashiwazaki N, Takizawa A, Hayashi Y, Nakatsukasa E, Fuchimoto D, Noguchi J, Kaneko H, Shino M, Kikuchi K. Viable piglets generated from porcine oocytes matured in vitro and fertilized by intracytoplasmic sperm head injection. *Biol. Reprod.* 2003; 68: 1003-1008.
12. Otani S, Iwai T, Nakahata S, Sakai C, Yamashita M. Artificial fertilization by intracytoplasmic sperm injection in a teleost fish, the medaka (*Oryzias latipes*). *Biol. Reprod.* 2009; 80: 175-183.
13. Hiraoka K, Hiraoka K, Tamaki T, Nada Y, Kiriake C, Yoshie M, Uto H, Yoshida H, Kitamura S, Kuwayama M. Clinical efficiency of an improved Piezo-ICSI method using an ultra-thin micropipette. *J. Mamm. Ova. Res.* 2013; 30: 53-58.
14. Wakayama T, Yanagimachi R. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nature. Biotechnol.* 1998; 16: 639.
15. Perry ACF, Wakayama T, Kishikawa H, Kasai T, Okabe M, Toyoda Y, Yanagimachi R. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science.* 1999; 284: 1180-1183.
16. Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R. Full-term development of mice from

- enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*. 1998; 394: 369–374.
17. **Evans MJ, Kaufman MH.** Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981; 292: 154–156.
 18. **Bradley A, Evans MJ, Kaufman MH, Robertson E.** Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*. 1984; 255–256.
 19. **Doetschman T, Gregg RG, Maeda N, Hooper ML, Melton DW, Thompson S, Smithies O.** Targeted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature*. 1987; 330: 576–578.
 20. **Thomas KR, Capecchi MR.** Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*. 1987; 51: 503–512.
 21. **Kawase Y, Iwata T, Watanabe M, Kamada N, Ueda O, Suzuki H.** Application of the piezo-micromanipulator for injection of embryonic stem cells into mouse blastocysts. *American Association for Laboratory Anim. Sci.* 2001; 40: 31–34.
 22. **Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH.** Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 1997; 385: 810–813.
 23. **Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y.** Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*. 1998; 282: 2095–2098.
 24. **Baguisi AE, Behboodi DT, Melican J, Pollock S, Destremes MM, Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porter CA, Midura P, Palacios MJ, Ayres SL, Denniston RS, Hayes ML, Ziomek CA, Meade HM, Godke RA, Gavin WG, Overstrom EW, Echelard Y.** Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat. Biotechnol.* 1999; 17: 456–461.
 25. **Shin T, Kraemer D, Pryor J, Liu L, Rugila J, Howe L, Buck S, Murphy K, Lyons L, Westhusin M.** A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature*. 2002; 415: 859.
 26. **Chesne P, Adenot PG, Viglietta C, Baratte M, Boulanger L, Renard JP.** Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat. Biotechnol.* 2002; 20: 366–369.
 27. **Woods GL, White K L, Vanderwall DK, Li GP, Aston KI, Bunch TD, Meerdo LN, Pate BJ.** A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science*. 2003; 301: 1063.
 28. **Galli C, Lagutina I, Crotti G, Colleoni S, Turini P, Ponderato N, Duchi R, Lazzari G.** Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. *Nature*. 2003; 424: 635.
 29. **Zhou Q, Renard JP, Le Fric G, Brochard V, Beaujean N, Cherifi Y, Fraichard A, Cozzi J.** Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science*. 2003; 302: 1179.
 30. **Lee BC, Kim MK, Jang G, Oh HJ, Yuda F, Kim HJ, Hossein MS, Kim JJ, Kang SK, Schatten G, Hwang WS.** Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature*. 2005; 436: 641.
 31. **Kim MK, Jang G, Oh HJ, Yuda F, Kim HJ, Hwang WS, Hossein MH, Kim JJ, Shin NS, Kang SK, Lee BC.** Endangered wolves cloned from adult somatic cells. *Cloning. Stem. Cells*. 2007; 9: 130–137.
 32. **Li Z, Sun X, Chen J, Liu X, Wisely MS, Zhou Q, Renard JP, Lenoa GH, Engelhardt JF.** Cloned ferrets produced by somatic cell nuclear transfer. *Dev. Biol.* 2007; 293: 439–448.
 33. **Wani NA, Wernery U, Hassan FAH, Wernery R, Skidmore JA.** Production of the first cloned camel by somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 2010; 82: 373–379.
 34. **Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, Hanada H, Perry ACF.** Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science*. 2000; 289: 1188–1190.
 35. **Ogura A, Inoue K, Takano K, Wakayama T, Yanagimachi R.** Birth of mice after nuclear transfer by electrofusion using tail tip cells. *Mol. Reprod. Dev.* 2000; 57: 55–59.
 36. **Bethhauser J, Forsberg E, Augenstein M, Childs L, Eilertsen K, Enos J, Forsythe T, Golueke P, Jurgella G, Koppang R, Lesmeister T, Mallon K, Mell G, Misica P, Pace M, Pfister-Genskow M, Strelchenko N, Voelker G, Watt S, Thompson S, Bishop M.** Production of cloned pigs from in vitro systems. *Nat. Biotech.* 2000; 18: 155–159.
 37. **Ushijima H, Ishida K, Nagashima H.** Bovine nucleus transplantation by intracytoplasmic injection. *J. Reprod. Dev.* 2002; 48: 619–626.
 38. **Galli C, Lagutina I, Vassiliev I, Duchi R, Lazzari G.** Comparison of microinjection (piezo-electric) and cell fusion for nuclear transfer success with different cell types in cattle. *Cloning. Stem. Cells*. 2002; 4: 189–196.
 39. **Kishigami S, Wakayama S, Thuan NV, Ohta H, Mizutani E, Hikichi T, Bui HT, Balbach S, Ogura A, Boiani M, Wakayama T.** Production of cloned mice by somatic cell nuclear transfer. *Nat. Protoc.* 2006; 1: 125–138.
 40. **Mizutani E, Ogura A, Wakayama T.** Nuclear transfer in the mouse oocyte. *Methods. Mol. Biol.* 2013; 957:285-300.
 41. **Wakayama T, Tabar V, Rodriguez I, Perry ACF, Studer L, Mombaerts P.** Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science*. 2001; 292: 740–743.
 42. **Tachibana M, Amato P, Sparman M, Gutierrez N M, Tippner-Hedges R, Ma H, Kang E, Fulati A, Lee HS, Sritanandomchai H, Masterson K, Larson J, Eaton D, Sadler-Fredd K, Battaglia D, Lee D, Wu D, Jensen J, Patton P, Gokhale S, Stouffer RL, Wolf D, Mitalipov S.** Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell*. 2013; 153: 1228–1238.
 43. **Yazaki S, Iwamoto M, Onishi A, Miwa Y, Suzuki S, Fuchimoto D, Sembon S, Furusawa T, Hashimoto M, Oishi T, Liu D, Nagasaka T, Kuzuya T, Maruyama S, Ogawa H, Kadomatsu K, Uchida K, Nakao A, Kobayashi T.** Successful cross-breeding of cloned pigs expressing endo- β -galactosidase C and human decay accelerating factor. *Xenotransplantation*. 2009; 16: 511–521.
 44. **Yazaki S, Iwamoto M, Onishi A, Miwa Y, Hashimoto M, Oishi T, Suzuki S, Fuchimoto D-I, Sembon S, Furusawa T, Liu DG, Nagasaka T, Kuzuya T, Ogawa H, Yamamoto K, Iwasaki K, Haneda M, Maruyama S, Kobayashi T.** Production of cloned pigs expressing human thrombomodulin in endothelial cells. *Xenotransplantation*. 2012; 19: 82–91.
 45. **Suzuki S, Iwamoto M, Saito Y, Fuchimoto D, Sembon S, Suzuki M, Mikawa S, Hashimoto M, Aoki Y, Najima Y,**

- Takagi S, Suzuki N, Suzuki E, Kubo M, Mimuro J, Kashiwakura Y, Madoiwa S, Sakata Y, Perry ACF, Ishikawa F, Onishi A.** Il2rg gene-targeted severe combined immunodeficiency pigs. *Cell. Stem. Cell.* 2012; 10: 753–758.
46. **Kashiwakura Y, Mimuro J, Onishi A, Iwamoto M, Madoiwa S, Fuchimoto D, Suzuki S, Suzuki M, Sembon S, Ishiwata A, Yasumoto A, Sakata A, Ohmori T, Hashimoto M, Yazaki S, Sakata Y.** Porcine model of hemophilia A. *PLOS. ONE.* 2012; 7: e49450.
47. **Kishigami S, Mizutani E, Ohta H, Hikichi T, Thuan NV, Wakayama S, Bui HT, Wakayama T.** Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006; 340: 183–189.
48. **Rybouchkin A, Kato Y, Tsunoda Y.** Role of histone acetylation in reprogramming of somatic nuclei following nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 2006; 74: 1083–1089.
49. **Inoue K, Kohda T, Sugimoto M, Sado T, Ogonuki N, Matoba S, Shiura H, Ikeda R, Mochida K, Fujii T, Sawai K, Otte AP, Tian XC, Yang X, Ishino F, Abe K, Ogura A.** Impeding *Xist* expression from the active X chromosome improves mouse somatic cell nuclear transfer. *Science.* 2010; 330: 496–499.
50. **Matoba S, Inoue K, Kohda K, Sugimoto M, Mizutani E, Ogonuki N, Nakamura T, Abe K, Nakano T, Ishino F, and Ogura A.** RNAi-mediated knockdown of *Xist* can rescue the impaired postimplantation development of cloned mouse embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 2011; 108: 20621–20626.
51. **Takahashi K, Yamanaka S.** Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006; 126: 663–676.



Japan Society for Reproduction Engineering