

凍結保護剤を添加することなく-80 の冷凍庫で10年間凍結された臓器からのクローン技術による種雄牛の復活

誌名	岐阜県畜産研究所研究報告
ISSN	13469711
著者名	星野,洋一郎 林,登 谷口,俊仁 小林,直彦 酒井,謙司 大谷,健 入谷,明 佐伯,和弘
発行元	岐阜県畜産研究所
巻/号	9号
掲載ページ	p. 1-7
発行年月	2009年7月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



凍結保護剤を添加することなく -80 °C の冷凍庫で 10 年間凍結された臓器からのクローン技術による種雄牛の復活

星野 洋一郎、林 登、谷口 俊仁²⁾、小林 直彦、酒井 謙司、大谷 健、入谷 明^{1) 2)}、佐伯 和弘^{1) 2)}

1) 近畿大学生物理工学部

2) (財) わかやま産業振興財団

凍結保護剤を使用せずに凍結された動物組織の細胞は、体細胞核移植に用いる核ドナーとして不適當であると考
えられていた。我々は、死んだ雄牛から採取された精巣を、凍結保護剤を使用せずに -80 °C の冷凍庫で 10 年間凍結
した後に、生きた細胞を取り出しクローン動物を作出することに成功したのでここに報告する。我々は凍結精巣の
精索部分の組織片を解凍したところ、生きた細胞が回収できた。これらの細胞は、培養下で活発に増殖し、正常で
あると考えられた。我々はこれらの細胞で作製した 16 個の体細胞核移植胚を、16 頭の仮親に移植した。その結果、5
頭が受胎し、4 頭のクローンの子牛が誕生した。我々の成果は、凍結保護剤を使用せずに長期間凍結保存された哺乳
類臓器中の細胞に、完全なゲノムが保持されており、回収した細胞から生きたクローン個体を作成できることを
明らかにした。

キーワード (体細胞クローン、牛、凍結保存組織、動物遺伝資源)

*本稿は PLoS ONE に投稿した "Resurrection of a Bull by Cloning from Organs Frozen without Cryoprotectant in a -80 °C Freezer for a Decade" PLoS ONE vol.4 issue1 e4142 の日本語訳に若干の改訂を行い、論文掲載後のクローン個体の生育状況を追加したものである。

緒言

何種類かの哺乳類において、体細胞核移植技術によるクローン動物が作製されている [1-5]。クローン動物が個体にまで発生するためには、ドナー核のゲノムが完全であることが必須である。そのため、絶滅危惧種や貴重な動物の遺伝資源を保存するために、それらの体細胞を凍結保存することが行われている [6-8]。これらの哺乳類細胞は、長期間の保存の間その生存性を保つために、ふつう、適切な凍結保護剤を用いて凍結保存されている [9]。しかし、ドナーとなる個体がすでに死んでいたり、その種が絶滅している場合、必ずしも完全な核を持つ細胞が凍結保存されて残っているとは限らない。死んだ細胞や、凍結保護されていない試料から動物遺伝資源を救出しようとする試みが行なわれている。マウスでは凍結乾燥した精子を卵子に注入することによって子供が生まれている [10]。あるいは、凍結保護剤を用いずに冷凍されていたマウスの精巣から精子細胞を取り出し、その核を卵子に注入することによって、正常な子供が生まれている [11]。これらの

結果は、雄の配偶子は凍結されて死んだ状態にあっても、完全なゲノムを保持していることを示している。さらに、死んだ体細胞 [12] や、熱変性させた体細胞 [13] からクローン産子が誕生したことから、ドナー細胞の生存性は体細胞核移植に必要ではないことが示唆されている。最近、Li と Mombaerts はマウスにおいて、凍結保護剤を用いずに凍結して死んだ細胞からクローン胚を作り、核移植胚性幹細胞 (ntES 細胞) を樹立した [14]。さらに、凍結乾燥されたヒツジの体細胞を核移植したクローン胚が、胚盤胞期胚まで発生したことが報告されている [15]。しかし、通常このような凍結細胞は、氷晶形成や浸透圧ストレスによって大きなダメージを受けている [9]。ごく最近、Wakayama らは、凍結保護剤を用いずに冷凍されたマウスの死体の組織から細胞核を取り出し、核移植によってクローンマウスが誕生したことを報告した [16]。Wakayama らによると、凍結マウスの脳組織および尾部血液の細胞の核を用いた核移植胚がクローン個体まで発生したが、他の凍結組織を用いた場合の発生能力は非常に低かった [16]。し

たがって、他の凍結組織の中の核が完全であるかどうかは明らかになっていない。

種雄牛「安福」号は、和牛肉の主な特徴である脂肪交雑の品質改良に貢献したことにより、和牛育種の歴史において名高い重要な種雄牛のひとつであった。安福は1993年9月に13.5歳で老衰により死亡した。死後12時間後に精巣が取り出され、アルミホイルで包まれ、 -80°C の冷凍庫で10年間冷凍保存された。その後、冷凍精巣は液体窒素の中に移され、さらに3年間、凍結保護剤を用いずに凍結された。我々は、この精巣から培養可能な生きた細胞を回収できるかどうかを調べた。そして、それらの細胞を除核卵子に核移植することによって、生きたクローン個体まで発生できるかどうかを調べた。その結果、凍結臓器の細胞から4頭のクローンの子牛を誕生させることに成功した。1頭は生後2日で死亡したがこれらの子牛は健康であり、異常は見られなかった。我々の知る限り、この研究は死亡した優良家畜を、凍結保護せずに凍結された臓器からクローン技術で再生することに成功した世界初の報告である。

材料と方法

精巣の凍結

精巣は、去勢後直ちにアルミホイルに包み、凍結保護剤を用いずに -80°C の冷凍庫で凍結した。精巣は1ヶ月から4ヶ月の間、冷凍庫の中に保管された。安福の精巣は死後12時間後に陰囊から取り出され、アルミホイルで包まれ、凍結保護剤を用いずに -80°C の冷凍庫で凍結された。10年後、安福の精巣は液体窒素中に移され、さらに3年間保管された(図1)。

細胞培養

凍結組織からの細胞の初代培養は、前例に従って行なった[22]。凍結組織は 42°C の生理食塩水に投入することにより、素早く解凍した。解凍された組織を細切れ(5mm角以下)、0.1%のコラゲナーゼ(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)と0.2%のディスパーゼ(Invitrogen)を含むダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)内で、 39°C で2時間培養した。250 μm のナイロンメッシュで消化液を濾過し、濾液を250Gで5分間遠心沈降した。そして沈殿をMF-start培地(Toyobo, Osaka, Japan)で懸濁し、 38.5°C 、5%の CO_2 と空気の気相、高湿度の培養器で培養した。5日の培養後、細胞の素早い増殖

を促すため、培地をAmnioMAXTMII完全培地(Invitrogen)に交換した。培養10日後、細胞増殖が形成されてきたら、培地をMF-medium[®](Toyobo)に交換した。

核移植

体細胞と除核卵子の電気融合による体細胞核移植は、前例に従って行なった[17]。体細胞核移植胚は、5 μM のイオノマイシンで5分間培養し、その後10 $\mu\text{g/ml}$ のシクロヘキシミドを添加した、 KH_2PO_4 を含まない改変合成卵管培地(mSOFM)で融合から6時間培養することによって活性化を行った。培養環境は 39°C 、5%の CO_2 、5%の O_2 、90%の N_2 の気相の高湿度環境で行った。活性化処理後、体細胞核移植胚をmSOFMに移し、融合後168時間培養した。

クローン胚のガラス化保存

いくつかのクローン胚は、仮親に移植されるまで、既報[23]に少し改変を加えた方法で凍結を行った。体細胞核移植胚は、tissue culture medium 199に20%のウシ胎児血清を加えた培地(TCM199)に、15%のエチレングリコール、15%のジメチルスルホキシド、0.6Mのスクロースを添加した培地を凍結培地として、凍結装置にクライオトップ(Kitazato BioPharma Co Ltd, Shizuoka, Japan)を用いて凍結した。クライオトップ1本につき、1個の胚をごく少量の凍結培地(1 μl 以下)と共に載せ、クライオトップを液体窒素に投入することによって凍結した。液体窒素での保管した胚は、0.25Mのスクロースを添加し、 37°C に加温したTCM199にクライオトップを1分間浸すことによって解凍した。胚は、解凍後3回洗浄した後に、仮親に移植された。

胚移植

クローンの胚盤胞期胚は、融合から7日目の胚を、発情開始から7~8日目に同期化した仮親に非外科的に移植した(1頭につき胚1個)。この研究における全ての動物の処置については、岐阜県畜産研究所実験動物委員会からの許可を得て行われた。

DNAマイクロサテライト解析

親子判定のためのマイクロサテライト解析は、既報にならって行なった[2, 24]。解析は家畜改良事業団(LIAJ)によって13のマイクロサテライトマーカー

を用いて行われた。我々は独自にも18のマイクロサテライトマーカー[25]を加えて分析し、結果を補強した。さらに、LIAJでは11の補完マーカーによる解析も行われ、結果が補強された。(データ省略)

結果

凍結保護剤を用いずに1~4ヶ月間凍結したウシ精巣からの細胞採取。我々は安福の組織で実験する前に、新鮮なウシ凍結精巣を用いて予備実験を行った。12~15ヶ月齢の3頭の雄牛から精巣を採取し、なんら特別な処置を行わずに-80℃の冷凍庫で1~4ヶ月間凍結した。我々は凍結精巣を、精巣上部頭部、精巣上部尾部、精索組織、精巣組織の4つの異なる組織片に分割し、解凍した後、それぞれの組織を細切し、コラゲナーゼとディスパーゼによって消化培養を行い、回収された沈殿を培養した。この予備実験の前の実験において、我々は凍結精巣から初代培養細胞を得るためにダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)と α 最小必須培地(α -MEM)を用いたが、解凍した組織からは細胞が増殖しなかった。解凍した組織の中の細胞は、たとえ生きていたとしても増殖能力が極めて低い可能性が考えられた。そこで我々は、増殖能力の低い細胞から増殖を得るために開発された初代培養用培地 MF-start™ (東洋紡ライフサイエンス)を用いた。その結果、我々は精巣上部頭部および精索組織から、生きた細胞を培養することに成功した。一方、精巣上部尾部と精巣組織からは細胞は得られなかった。これらの細胞の大部分は活発に分裂し、細胞数が増殖したので、細胞の状態は正常であると考えた。我々はこれらの細胞を除核卵子と電気融合することにより、核移植胚を作製して発生能力を検討した。牛の耳組織から採取された線維芽細胞を対照区のドナー細胞として用いた。体細胞核移植胚は168時間培養された[17]。実験は3回行われた。凍結精巣由来の細胞を用いて作製された核移植胚の発生能力を、対照区と比較したところ、胚盤胞期胚への発生率(22.1%と20.2%)、胚盤胞期胚における内部細胞塊の細胞数の割合(21.1%と22.6%)において有意な差は見られなかった。以上の結果から、凍結保護剤を用いずに凍結されたウシの臓器から培養可能な体細胞を回収することができ、それらを核移植に利用できることが示された。

安福の精巣からの細胞の回収

安福の凍結精巣から精巣上部頭部と精索組織を分離し、それらをいくつかに切り分けて凍結組織片とした(図1)。これらの組織片を前述のように解凍、細切、消化し、沈殿を培養した。その結果、2つの組織片から、4系統の生きた細胞が得られた。図2に見られるように、線維芽細胞様細胞(細胞株AとC)と上皮細胞様細胞(細胞株BとD)が得られた。細胞株AとBの細胞は初代培養で体細胞核移植に用い、細胞株CとDの細胞は細胞凍結溶液(Cellbanker; Mitsubishi Kagaku-Iatron, Tokyo, Japan)を用いて凍結保存し、5代目まで継代培養した。C株の細胞は凍結融解後、細胞が肥大化し平らになり、増殖能力が低下した。しかし、D株の細胞は凍結融解後も外見は正常であり、増殖能力も維持していた。TUNEL法(In situ cell death detection kit; Roche, Basel, Switzerland)によって細胞のアポトーシスを調べたところ、C株の細胞の多く(71.4%から75.0%)はアポトーシスを起こしていることがわかった。一方D株の細胞のアポトーシス率はわずかであり(1.3%と5.4%)、この割合は血清飢餓培養を行った対照区の細胞のアポトーシス率と変わらなかった(4.1%)。さらに、D株の細胞の多くの(55%, 38/69)細胞の染色体数は正常(60本)であった。

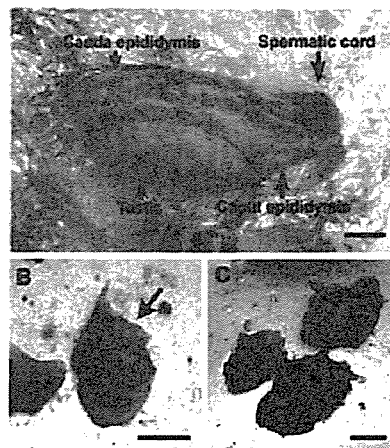


図1 13年間凍結されていた安福の精巣の一つ。精巣は-80℃の冷凍庫で10年間保存され、その後液体窒素中で3年間保存された。(A)凍結された安福の精巣。(B)精巣上部頭部の一部(矢印)。(C)3つに分割された精索組織。スケールバーは2cmを示す。

安福のクローニング

我々は3つの細胞株(A, B, D)の細胞をウシ除核卵子と電気融合させて体細胞核移植胚を作製した。その結果、それぞれの核移植胚から胚盤胞期胚が得られた

(Table1)。A 株の細胞から作製されたクローン胚を仮親に移植したところ、3 頭の仮親が受胎した。1 頭の胎児は 6 ヶ月後にミイラ化して流産したが、2 頭は最後まで発生し、雄の子牛が誕生した。最初の子牛は 2007 年 11 月 30 日に生まれ、現在も生存している (図 3A)。2 番目の子牛は凍結された核移植胚を用い、2008 年 3 月 5 日に生まれた (図 3B)。しかし 2 日後に死亡した。D

株の細胞から作製された 6 個の胚盤胞を 6 頭の仮親に移植したところ、2 頭の仮親が受胎し、それぞれ 2008 年 7 月 22 日と 31 日に健康な雄の子牛が誕生した (図 3C)。DNA マイクロサテライト分析によって、これらのクローンの子牛およびミイラ化した胎児は、安福の精巢から得られたドナー細胞に由来するクローンであることが確認された (データ省略)。

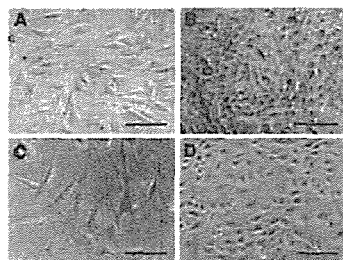


図2 安福の凍結精巢から樹立された細胞群の位相差顕微鏡像。A と B の細胞株は初代培養で体細胞核移植に用いられた。C と D の細胞株は凍結保存され、5 代目まで継代培養された。(A) 細胞株 A、線維芽細胞様細胞。(B) 細胞株 B、上皮細胞様細胞。(C) 細胞株 C、線維芽細胞様細胞。(D) 細胞株 D、上皮細胞様細胞。妊娠例は、細胞株 A(A)と D(D)の細胞をクローニングして作製した SCNT 胚から得られた。スケールバーは 100 μm を示す。



図3 安福の凍結精巢からクローニングされた子牛。(A) 2007 年 11 月 30 日に誕生した、安福精巢由来の雄の子牛。妊娠 287 日目に仮親にプロスタグランジン F2 α を投与し、分娩を誘起した。仮親は誘起から 2 日後に出産した。子牛の生時体重は 18.5kg であり、論文を執筆している現時点で健康である。(B) 凍結した体細胞核移植胚から生まれた雄の子牛。妊娠 286 日の 2008 年 3 月 5 日に帝王切開によって誕生した。生時体重は 47.5kg であった。この子牛は出生から 2 日後に死亡した。(C) 凍結した体細胞核移植胚から生まれた 2 頭の子牛。"c95"の耳標の子牛は妊娠 287 日の 2008 年 7 月 22 日に生まれ、生時体重は 32kg であった。"c66"の耳標の子牛は妊娠 288 日の 2008 年 7 月 31 日に生まれ、生時体重は 30kg であった。

Table 1. Development of embryos cloned from cells of three different Yasufuku cell lines.

Cell line	No. of experiments	No. of SCNT embryos	No. (%) of embryos fused*	No. of embryos cultured	No. (%) of blastocysts ^a	No. of embryos transferred ^b	No. (%) of pregnancies ^c	No. of live offspring
A	1	64	32 (50)	21	9 (43)	6	3 (50) ^d	2
B	1	62	21 (34)	21	7 (33)	4	0 (0)	-
D	6	289	242 (84)	162	27 (17)	6	2 (33) ^e	2
Subtotal	-	415	295 (71)	204	43 (21)	16	5 (31)	4
Control	6	289	226 (78)	106	41 (39)	-	-	-

*Fusion was examined one hour after electrofusion of couplets of cells and enucleated oocytes. Percentage of the number of the couplets.

^aBlastocyst development was examined 168 h after nuclear transfer. Percentage of the number of cultured embryos.

^bSingle blastocysts were transferred into single synchronized recipients. Several blastocysts were stored in liquid nitrogen by a vitrification technique. Ten vitrified and warmed embryos were transferred to recipients.

^cPregnancy was examined by ultrasonography at 33 days after embryo transfer. Percentage of the number of transferred recipients.

^dOne recipient delivered a healthy male calf on 30 November 2007. One delivered a mummified fetus on 27 August 2007. One recipient that received a vitrified embryo delivered a healthy male calf on 5 March 2008 but the calf died two days after birth.

^eTwo recipients, which received vitrified embryos delivered two healthy male calves on 22 and 31 July 2008.

doi:10.1371/journal.pone.0004142.t001

考 察

本研究において、我々は凍結保護剤を用いずに 10 年以上凍結保存されていた哺乳類の臓器から、活発に増

殖する正常な細胞を取り出すことが可能であり、これらの細胞を用いて核移植技術によって正常なクローン個体を作出できることを示した。我々の知る限り、こ

れは凍結保護されずに凍結されていた死んだ家畜個体の組織から、家畜個体をクローン再生した世界初の報告である。体細胞クローン個体は死んだ細胞[12]や熱変成した細胞[13]からも誕生していることから、ドナー細胞の生存性は体細胞核移植には必要ないと考えられている。したがって、クローン個体が発生するために必須であるのは、ドナー細胞のゲノムが完全であることである。凍結保護剤を用いて凍結乾燥した精子は、運動性は失われるが、ゲノムの完全性は保たれている[10]。最近、凍結乾燥したヒツジの細胞を用いた核移植胚が、胚盤胞期胚へ発生したことが報告されている[15]。この知見は、体細胞のゲノムは凍結乾燥した後もその完全性が保たれていることを示唆している。しかし、この報告においては、凍結保護剤（トレハロース）を用いて凍結乾燥した場合にのみ、胚盤胞期への発生が観察された[15]。一般に、凍結保護剤を用いずに凍結された臓器や組織の中の細胞は、著しく破壊されていると考えられていた。Ogonukiらの報告によると、冷凍されたマウス精巣内のほとんど全ての精子細胞が、核の周りの細胞質が著しく破壊されているか、細胞質が失われている状態であった。しかし、いくつかの精細胞を卵子に注入したところ、正常な産子が生まれた。このことは精細胞の核のゲノムが完全であったことを示している[11]。最近、凍結保護剤を用いずに凍結したマウスの体細胞の核からクローン胚を作製し、ntES細胞が樹立されたことが報告された。さらにこれらのntES細胞を4倍体の胚盤胞期胚に注入することにより、キメラマウスが誕生した[14]。ごく最近、Wakayamaらは凍結保護剤を用いずに16年間凍結されていたマウスの死体から、細胞核を取り出してntES細胞を作り、さらにntES細胞をドナー細胞としてクローンマウスが誕生したことを報告した[16]。これらの結果は、凍結保護剤を用いずに凍結されたマウスの体細胞の核であっても、体細胞核移植によってリプログラミングされES細胞になりうることを示した。体細胞核移植技術とntES細胞技術を組み合わせて用いることにより、細胞が著しく破壊された凍結組織や臓器からクローン動物を得る効率が高められると考えられる。本報告では、これらの報告とは対照的に、死んだ動物から取り出された後、-80℃の冷凍庫で10年間冷凍されていた臓器から、活発に増殖する生きた正常な細胞を採取することに成功した。これらの細胞を用いることにより、我々は一般的な1段階の核移植法を用いてクローン胚を作製し、5頭の受胎例から、4頭の生きた

クローンの子牛を誕生させることに成功した。我々の成果は、凍結保護せずに凍結された臓器であっても、それらの臓器を解凍した後に、少数の細胞は氷晶形成や浸透圧ストレスによる凍結障害に耐えて、あるいは凍結障害をすり抜けて生存し、それらの細胞の核は完全であることを明らかにした。我々の発見は、ヒトの移植用凍結骨細片の中に生きた細胞が発見されたという報告とも一致している[18]。特定の組織の中の細胞は、たとえ凍結保護剤を用いずに凍結された場合でも、凍結障害に耐えることができると考えられる。精索組織は脂肪組織、血管、神経組織、筋肉組織、結合組織などからなる。本研究では、これらの組織のどれが凍結後に生きた細胞を保持していたのかは明らかになっていない。生きた細胞を効率的に得られる臓器や組織が何であるかを特定するためには、さらに研究が必要である。

優秀な家畜や絶滅危惧動物から得られる配偶子、受精卵、胚や培養細胞は、「遺伝子銀行」にしばしば凍結保存される[7,8]。我々の結果は、哺乳類の臓器や組織を、特別な処理を行うことなく-80℃の冷凍庫で凍結するだけで、完全な生きた細胞を保存できることを示唆している。また、死んだ動物や絶滅動物の組織や臓器が凍結されて残っていれば、生きた細胞を救出できる可能性がある。最近、いくつかの絶滅危惧種において、異種間核移植によるクローン個体の作出が成功している[12, 19, 20]。これらの研究成果を、我々の結果と組み合わせることにより、絶滅動物を復活できる可能性がある。冷凍庫の中、あるいはシベリアの永久凍土等の自然環境で凍結されている、動物の臓器や死体から生きた細胞を採取することができれば、例えばマンモスのような動物であってもクローン技術により復活させることができるかもしれない。

体細胞クローンウシの生育

種雄牛「安福」号の体細胞クローンウシは「望安福」と名付けられ、誕生順に1号から4号と呼称している。3号は当初は健康に生育していたが、感染性腹膜炎によって2009年1月7日に5ヶ月齢で死亡した。1号と4号は2009年11月30日現在も健康に生育している。

「望安福」1号は17ヶ月齢で精液の採取に成功した。精液の性状、精子の活力は正常であり、凍結融解後の精子生存率も通常の種雄牛と変わらなかった。体外受精によって「望安福」1号の凍結精液の受精能力を、

ドナーである「安福」号の凍結精液と比較したところ、体外成熟卵子の受精率、および受精卵の胚盤胞期胚への体外発生率は同等であった。

謝 辞

我々は本論文に重要かつ有益な助言をいただいた D.

Sipp 氏 (理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター、神戸) に謝意を表す。この研究の一部は、科学技術振興機構・和歌山県地域結集型共同研究事業のプロジェクトによって行われた。

文 献

1. Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J. and Campbell, K.H. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810-813. (1997)
2. Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J., Doguchi, H., Yasue, H. and Tsunoda, Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 282: 2095-2098. (1998)
3. Wakayama, T., Perry, A.C., Zuccotti, M., Johnson, K.R. and Yanagimachi, R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394: 369-374. (1998)
4. Onishi, A., Iwamoto, M., Akita, T., Mikawa, S., Takeda, K., Awata, T., Hanada, H. and Perry, A.C.F. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* 289: 1188-1190. (2000)
5. Wilmut, I., Beaujean, N., de Sousa, P.A., Dinnyes, A., King, T.J. et al. Somatic cell nuclear transfer. *Nature* 419: 583-586. (2002)
6. Ryder, O.A. and Benirschke, K. The potential use of "cloning" in the conservation effort. *Zoo Biol* 16: 295 - 371. (1997)
7. Corley-Smith, G.E. and Brandhorst, B.P. Preservation of endangered species and populations: a role for genome banking, somatic cell cloning, and androgenesis? *Mol Reprod Dev* 53: 363-367. (1999)
8. Ryder, O.A., McLaren, A., Brenner, S., Zhang, Y.P. and Benirschke, K. DNA banks for endangered animal species. *Science* 288: 275-277. (2000)
9. Pegg, D.E. Principles of Cryopreservation. In: Day, J.G., Stacey, G.N., editors. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols: Second Edition*. Totowa, NJ USA: Humana. pp. 39-58. (2007)
10. Wakayama, T. and Yanagimachi, R. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nat Biotechnol* 16: 639-641. (1998)
11. Ogonuki, N., Mochida, K., Miki, H., Inoue, K., Fray, M., Iwaki, T., Moriwaki, K., Obata, Y., Morozumi, K., Yanagimachi, R. and Ogura, A. Spermatozoa and spermatids retrieved from frozen reproductive organs or frozen whole bodies of male mice can produce normal offspring. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 13098-13103. (2006)
12. Loi, P., Ptak, G., Barboni, B., Fulka, J.Jr., Cappai, P. and Clinton, M. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nat Biotechnol* 19: 962-964. (2001)
13. Loi, P., Clinton, M., Barboni, B., Fulka, J. Jr., Cappai, P., Feil, R., Moor, R.M. and Ptak, G. Nuclei of nonviable ovine somatic cells develop into lambs after nuclear transplantation. *Biol Reprod* 67: 126-132. (2002)
14. Li, J. and Mombaerts, P. Nuclear transfer-mediated rescue of the nuclear genome of nonviable mouse cells frozen without cryoprotectant. *Biol Reprod*: DOI:10.1095/biolreprod.1108.069583. (2008)
15. Loi, P., Matsukawa, K., Ptak, G., Clinton, M., Fulka, J.Jr. Nathan, Y. and Arav, A. Freeze-dried somatic cells direct embryonic development after nuclear transfer. *PLoS ONE* 3: e2978. (2008)
16. Wakayama, S., Ohta, H., Hikichi, T., Mizutani, E., Iwaki, T., Kanagawa, O. and Wakayama, T. Production of healthy cloned mice from bodies frozen at -20 °C for 16 years. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 17318-17322. (2008)
17. Kasamatsu, A., Saeki, K., Tamari, T., Iwamoto, D., Tatemizo, A., Matsumoto, K., Hosoi, Y. and Iritani, A. Timing and uniformity of embryonic gene activation affect subsequent pre-implantation development of cloned bovine embryos. *J Reprod Dev* 53: 623-629. (2007)
18. Heyligers, I.C. and Klein-Nulend, J. Detection of living cells in non-processed but deep-frozen bone allografts. *Cell Tissue*

Bank 6: 25-31. (2005)

19. Lanza, R.P., Cibelli, J.B., Diaz, F., Moraes, C.T., Farin, P.W., Farin, C.E., Hammer, C.J., West, M.D. and Damiani, P. Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning* 2: 79-90. (2000)
20. Sansinena, M.J., Hylan, D., Hebert, K., Denniston, R.S. and Godke, R.A. Banteng (*Bos javanicus*) embryos and pregnancies produced by interspecies nuclear transfer. *Theriogenology* 63: 1081-1091. (2005)
21. Miller, W., Drautz, D.I., Ratan, A., Pusey, B., Qi, J., Lesk, A.M., Tomsho, L.P., Packard, M.D., Zhao, F., Sher, A., Tikhonov, A., Raney, B., Patterson, N., Lindblad-Toh, K., Lander, E.S., Knight, J.R., Irzyk, G.P., Fredrikson, K.M., Harkins, T.T., Sheridan, S., Pringle, T. and Schuster, S.C. Sequencing the nuclear genome of the extinct woolly mammoth. *Nature* 456: 387-390. (2008)
22. Pollard, J.W. Basic Cell Culture Protocols. In: Pollard JW, Walker JM, editors. *Basic Cell Culture Protocols: Second Edition*. Totowa, NJ USA: Humana Press. pp. 1-12. (1997)
23. Laowtammathron, C., Lorthongpanich, C., Ketudat-Cairns, M., Hochi, S. and Parnpai, R. Factors affecting cryosurvival of nuclear-transferred bovine and swamp buffalo blastocysts: effects of hatching stage, linoleic acid-albumin in IVC medium and Ficoll supplementation to vitrification solution. *Theriogenology* 64: 1185-1196. (2005)
24. Ashworth, D., Bishop, M., Campbell, K., Colman, A., Kind, A., Schnieke, A., Blott, S., Griffin, H., Haley, C., McWhir, J. and Wilmut, I. DNA microsatellite analysis of Dolly. *Nature* 394: 329. (1998)
25. Inoue-Murayama, M., Hirano, T., Watanabe, T., Mizoshita, K., Yamakuchi, H., Nakane, S. and Sugimoto, Y. Individual identification and paternity control of Japanese Black cattle based on microsatellite polymorphism. *Anim Sci Technol* 68: 443-449. (1997)

Resurrection of a Bull by Cloning from Organs Frozen without Cryoprotectant in a -80 °C Freezer for a Decade

yoichiro HOSHINO, noboru HAYASHI, shunji TANIGUCHI^{1,2}, naohiko KOBAYASHI,
kenji SAKAI, tsuyoshi OTANI, akira IRITANI^{1,2}, kazuhiro SAEKI^{1,2*}

1 Department of Genetic Engineering, Kinki University, Kinokawa Wakayama, Japan.

2 Wakayama Industry Promotion Foundation, Wakayama, Japan.

Abstract

Frozen animal tissues without cryoprotectant have been thought to be inappropriate for use as a nuclear donor for somatic cell nuclear transfer (SCNT). We report the cloning of a bull using cells retrieved from testicles that had been taken from a dead animal and frozen without cryoprotectant in a -80 °C freezer for 10 years. We obtained live cells from defrosted pieces of the spermatid cords of frozen testicles. The cells proliferated actively in culture and were apparently normal. We transferred 16 SCNT embryos from these cells into 16 synchronized recipient animals. We obtained five pregnancies and four cloned calves developed to term. Our results indicate that complete genome sets are maintained in mammalian organs even after long-term frozen-storage without cryoprotectant, and that live clones can be produced from the recovered cells.