

高能力乳用牛受精卵の大量生産技術の開発

紀川将之・後藤充宏*・岸本雅人*

要 約

高能力乳用牛受精卵の大量生産を目的に、発育初期卵の4分離技術について、体外受精卵および体内受精卵を用いて検討した。

試験1：と畜場由来卵子から作出した4-16細胞期の体外受精卵を用い、割球分離時の透明帯除去法について検討した結果、酵素融解法がガラス針切開法より大幅に省力的で、発育率も同等(46.9%, 45.0%)であった。また、4分離割球の発育率は、透明帯へ再封入しない場合、ピンホール培養法(22.9%)がドロップ培養法(6.3%)より有意に高かった。

試験2：4分離に適した4-16細胞期の体内受精卵が回収できる割合は、発情後4.5日目採卵(100%)が5.0日目採卵(37.5%)より高かった。また、4分離卵の作出手法について、マニピュレーター区と簡易区で移植可能卵への発育率を比較検討した結果、両区(19.4%, 24.1%)に有意差はなく、移植試験では正常産子を1頭生産した。

以上の結果から、4分離卵の作出および産子生産は可能であり、マニピュレーター操作が不要な簡易技術の可能性も示唆された。

目 的

当所では、県内乳用牛群の改良促進と確実な後継牛確保を目的に、高能力な血統からなる乳用牛群を繫養し、それらから採取した雌判別受精卵を県内酪農家へ供給・販売している。しかし、限られた採卵頭数における供給可能な雌判別受精卵数には限度があり、年々高まる需要に十分対応できない状況にあることから、一つ一つの受精卵を有効かつ効率的に活用するための技術開発が必要である。

そこで、一つの受精卵を4分離し、同じ遺伝形質を持つ一卵性産子を4頭(4倍)生産する技術について、発育初期の体外受精卵および体内受精卵を用い、それぞれ検討を行った。

試験1. 体外受精卵を用いた検討

と畜場由来卵子から作出した発育初期(4~16細胞期)の体外受精卵を用い、割球分離時の透明帯除去方法について、マニピュレーター操作を伴う「ガラス針切開法」とマニピュレーター操作が不要な「酵素融解法」とで、操作時間および分離

割球の発育率を比較検討した。また、4分離割球の体外培養法について、透明帯へ再封入した場合としない場合に分けて、「ドロップ培養法(従来法)」と「ピンホール培養法(改良法)」とで、操作時間および発育率を比較検討した。

<材料及び方法>

1. 割球分離する発育初期卵の準備

当所の慣行に従い、食肉センターから持ち帰った卵巣に存在する2-5mmの小卵胞より卵胞卵子を吸引採取後、10%FCS加TCM199溶液中で22-24時間体外成熟培養した。体外受精はIVF100(機能性ペプチド研)で処理した精子浮遊液中で6時間行い、5%FCS添加CR1aaで裸化処理後、低酸素条件(気相:38.5℃, 5%CO₂, 5%O₂, 90%N₂)で体外培養し、経時的に卵子の分割状況を観察した。

2. 割球分離時の透明帯除去

割球分離には、媒精後40時間目までに4細胞期、48時間目までに8細胞期に発育した4~16細胞期の発育初期卵を用いた。

(1) ガラス針切開法

倒立顕微鏡下で、2台のマイクロマニピュレーター (MO-102, Narisige) に装着したホールディングピペットとガラス針を用い、透明帯を約1/3切開した。顕微操作は、10%FCS添加PBS溶液ドロップ中で行った。

(2) 酵素融解法

37°C に加温した1%アクチナーゼE(科研製薬株式会社)を含むPBS溶液中で2-3分処理し、透明帯を除去した。

3. 発育初期卵の割球分離および再構成

透明帯を除去した発育初期卵を、10%FCS添加PBS溶液へ移し、軽くピペッティングすることで割球を分離し、4等分に再構成した。即ち、4細胞期卵は1個(1/4割球卵)ずつ、8細胞期は2個(2/8割球卵)ずつ、16細胞期は4個(4/16割球卵)ずつ再構成した。

4. 透明帯の準備

再構成後の割球卵を挿入する透明帯は、体外受精処理後の未受精卵子を用いて作成した。即ち、マイクロマニピュレーターを用いて未受精卵子の透明帯を切開し、内径約30 μ mのマイクロピペットで卵細胞質を吸引除去した。作成した透明帯は、使用するまで凍結保存した。

5. 割球分離後の体外培養法

培養液には、5%FCS添加CR1aaを用い、低酸素条件(気相:38.5°C, 5%CO₂, 5%O₂, 90%N₂)で媒精後9日目まで培養した。

(1) ドロップ培養法

4分離割球を、培養用シャーレ底面に作成した100 μ lの培養液ドロップへ移し、静置培養した。

(2) ピンホール培養法

渡邊ら¹⁾の手法に基づき、100 μ lの培養液ドロップをのせたシャーレ底面に、アイスピックを用いてV字型の穴を作製し、その中に4分離割球を個別に入れて静置培養した。

<結果>

1. 透明帯除去法による検討

透明帯の除去法による4分離成績を表1に示した。4分離成功率は、ガラス針切開法、酵素融解法ともに100%であり、分離操作時間は、ガラス針切開法が約15分/個、酵素融解法が約3分/個であった。4分離割球が、媒精後9日目までに移植可能ステージ(桑実期~胚盤胞期)まで発育した割合は、ガラス針切開法で45.0%(18/40)、酵素融解法で46.9%(15/32)であった。

表1 透明帯除去法別の操作性及び発育成績

	分離成功率	分離操作時間	発育率
ガラス針切開法	100%	約15分/個	45.0%(18/40)
酵素融解法	100%	約3分/個	46.9%(15/32)

2. 体外培養法による検討

体外培養法別の操作性および発育成績について表2に示した。4分離割球を透明帯へ再封入した場合の操作時間は、一組当たり約30分であり、移植可能ステージへの発育率は、ドロップ培養法で40.6%(13/32)、ピンホール培養法で46.9%(15/32)であった。透明帯へ再封入しない場合の操作時間は、一組当たり約5分であり、移植可能ステージへの発育率は、ピンホール培養法の22.9%(11/48)がドロップ培養法の6.3%(2/32)より有意に高かった。

表2 培養法別の操作性及び発育成績

	操作時間	発育率	
		ドロップ培養法	ピンホール培養法
透明帯再封入	約30分/組	40.6%(13/32)	46.9%(15/32)
透明帯非封入	約5分/組	6.3%(2/32) ^a	22.9%(11/48) ^b

※異符号間に有意差あり (p<0.05)

試験2. 体内受精卵を用いた検討

4分離に適した発育初期卵(4~16細胞期)を体内から回収する時期について検討した。また、体内受精卵を用いた4分離卵作出手法について、

マニピュレーター操作を用いた「マニピュレーター区」と、マニピュレーター操作が不要な「簡易区」とで、移植可能卵への発育率を比較検討した。また、一部の4分離卵については、移植試験を実施した。

＜材料及び方法＞

1. 発育初期卵回収時期の検討

供卵牛には、当所の慣行により過剰排卵処理したホルスタイン種6頭と黒毛和種1頭を用いた。FSH（アントリンR10：川崎三鷹製薬）投与総量は、ホルスタイン種36A.U.、黒毛和種20A.U.であった。

発情後4.5日目に採卵した5頭（ホルスタイン種4頭、黒毛和種1頭）と発情後5日目に採卵した2頭（ホルスタイン種）で、回収受精卵の発育ステージを比較した。

2. 4分離卵作出手法の検討

【ガラス針切開法＋透明帯再封入＋ドロップ培養法】の組合せからなる「マニピュレーター区」と、【酵素融解法＋透明帯非封入＋ピンホール培養法】の組合せからなる「簡易区」とで作出した4分離割球を、前述の体外受精卵と同じ培養条件で、発情後9日目まで体外培養した。

3. 移植実証試験

胚盤胞期まで発育した4分離卵を、受卵牛の黄体側子宮角に移植した。

＜結果＞

1. 発育初期卵回収時期の検討

採取時期による発育初期卵回収成績について、表3に示した。4分離に適した4～16細胞期の発育初期卵が回収できた割合は、発情後4.5日目採卵の100%（21/21）が、発情後5日目採卵の37.5%（3/8）より高かった。

表3 採取時期別の受精卵発育ステージ

採卵日	正常卵数	<4細胞	4-16細胞	16細胞<
発情後4.5日目	21	0	21(100%)	0
発情後5.0日目	8	0	3(37.5%)	5(62.5%)

2. 4分離卵作出手法の検討

4分離卵作出手法による発育成績を表4に示した。4分離割球が体外培養により移植可能なステージ（桑実期～胚盤胞期）まで発育した割合は、マニピュレーター区で19.4%（7/36）、簡易区で24.1%（13/53）となり、両区に有意な差は認められなかった。

表4 4分離卵作出手法別の発育成績

採卵日	分離割球数	発育卵数	発育率
マニピュレーター区	36	7	19.4%
簡易区	54	13	24.1%

3. 移植実証試験

移植可能なステージまで発育した4分離卵のうち、3個（マニピュレーター区1個、簡易区2個）について移植試験を実施した結果、マニピュレーター区由来の1個が受胎し、正常な産子を分娩した（表5、写真1）。

表5 4分離卵移植成績

移植頭数	受胎頭数	受胎率
3	1	33.3%

※マニピュレーター区1頭、簡易区2頭



写真1 正常に分娩した4分離卵由来産子（ホルスタイン種、♀）

考 察

当所では、優良遺伝資源を効率的に増産するための技術開発として、受精卵クローン牛および体

細胞クローン牛の作出に関する研究に取り組み、一定の成果を上げてきた²⁻⁵⁾。しかしながら、消費者や流通業界には、従来のクローン技術に対する抵抗感が強いことや、核移植技術を伴う煩雑さから、実用化技術として普及するには、さらに時間がかかるものと考えられる。

そこで、核移植を伴うことなく、同じ遺伝形質を持った一卵性産子を多数生産する技術の開発を目的に、発育初期の受精卵を割球分離により4分離し、一卵性4つ子の作出について検討した。

分離割球を移植可能なステージまで発育させるには、通常、マイクロマニピュレーションにより割球を空の透明帯に再封入し、立体的な割球配列を導く必要があると考えられている。しかしながら、近年、シャーレ底面にV字型ホールを作製し、個別に培養する手法が考案され^{1,6)}、透明帯への再封入を必要とせず分離割球を培養できる可能性が示唆されている。

このことから、本研究においては、マニピュレーター操作を必要とせず4分離卵を作出する簡易技術についても併せて検討を行った。

また、体内受精卵を用いた本技術の可能性についても検証した。

体外受精卵を用いた試験1では、割球分離時の透明帯除去法と、4分離割球の体外培養法について検討を行った。その結果、割球分離時の透明帯除去法は、酵素融解法の3分/個が、ガラス針切開法の15分/個より大幅に省力的で発育率も同等であったこと、透明帯へ再封入しない場合の4分離卵の発育率が、ドロップ培養法よりピンホール培養法で有意に高い結果となったことから、マニピュレーター操作が不要で、簡易な4分離卵作出技術の可能性が示唆された。

体内受精卵を用いた試験2では、4分離に適した4～16細胞期の発育初期卵を体内から回収できる割合について、発情後4.5日目採卵と発情後5.0日目採卵で比較した結果、発情後4.5日目(100%)が発情後5.0日目(37.5%)より高く、また、採取し

た発育初期卵について、マニピュレーター操作が必要なマニピュレーター区と、マニピュレーター操作が不要な簡易区に分けて、4分離卵の発育率を検討した結果、両区に有意差はなかった。

さらに、移植試験では、マニピュレーター区で作出した体内受精卵由来の4分離卵1個が受胎し、正常な産子を生産することが出来た。

以上のことから、発育初期卵を用いた割球の4分離技術は、体内受精卵にも応用でき、技術の簡易化も可能であることが示唆された。

今後は、4分離割球の発育率向上を目指した、培地組成、ピンホール培養法におけるV字型ホールの大きさ・深さ・形状等、体外培養条件の改良が必要と考えられる。

また、移植例数の積み重ねによる、受胎性のさらなる検証も必要である。

参考文献

- 1) 渡邊貴之ら；黒毛和種におけるピンホール培養法を用いた生体卵子吸引—体外受精由来一卵性双子の生産. 第12回日本胚移植研究会大会講演要旨集 p47(2005)
- 2) 笠井裕明ら；乳牛における体細胞をドナー核に用いた核移植産子の生産. 徳島県畜試研報 No.40, 1-4(1999)
- 3) 笠井裕明ら；ホルスタイン種乳用牛における体細胞クローン牛の双子生産. 徳島畜研報 No.1, 6-11(2001)
- 4) 笠井裕明ら；ホルスタイン種受精卵クローン牛2頭(一卵性双子)の発育・泌乳状況調査. 徳島畜研報 No.3, 8-13(2003)
- 5) 笠井裕明ら；ホルスタイン種体細胞クローン育成雌牛の過排卵処理成績及び後代牛の生産. 徳島畜研報 No.3, 14-19(2003)
- 6) 田川真人ら；Needle Depressionによる培養がウシ体外受精由来2細胞期胚並びに分離割球の発育に及ぼす影響. 第11回日本胚移植研究会大会講演要旨集 p43(2004)