

# 牛核移植におけるドナー胚の最適利用ステージの検討

笠井 裕明・刈谷 亮介・後藤 充宏

## 要 約

高能力乳牛の胚 1 個から効率的に移植可能なクローン胚を作成することを目的とし、体外受精胚を材料にドナー胚の最適利用ステージについて検討するとともに、過剰排卵処理牛に対する核移植用の体内受精胚の回収時期を検討し得られた胚を核移植に供試、クローン胚の発生状況を観察し、発生した一部の胚を移植、その受胎性について検討を行った。その結果、体外受精胚をドナー胚とした最適利用ステージの検討では媒精後 96 時間日の胚が最も高い移植可能なクローン胚の発生率を示し、同様のステージの胚を過剰排卵処理牛から回収する場合発情後 5 日目の採胚が適していることが判った。また、回収した体内受精胚で核移植を行った結果、5 日目の桑実期胚 1 個あたり平均 8 個のクローン胚の作出が可能であった。作出したクローン胚を移植した結果、受胎率 37.5%(3/8)で 2 組の双子を得た。以上のことから、核移植に供試する目的で体内胚の採胚を行うには発情後 5 日目の採胚で桑実期胚の回収が可能であり、採胚した胚 1 個から平均 8 個のクローン胚が作出可能であり、移植により産仔を得られることが判った。

## 目 的

家畜での核移植は、Willadsen によってヒツジで 8~16 細胞期の割球をあらかじめ除核しておいた未受精卵細胞質にセンダイウイルスや電気融合によって融合させ、産仔を得たのが始まりである<sup>1)</sup>。その後、この分野における研究は急速に進み最近では、牛においてリクローン技術<sup>2,3)</sup>との組み合わせによる 1 卵性 6 仔の誕生が国内でも報告されたが一般には 1 卵性 4 仔以上の多仔の生産率は低いのが現状である。胚の細胞をドナー細胞に用いる場合、体細胞をドナー細胞に用いる場合とは異なり細胞数が限られていることから、1 卵性の複数産仔を得るためには、1 回のクローニングによってより多くの移植可能な胚を作成する必要があり、ドナー胚の最適利用ステージについて検討する必要があった。効率的に高能力乳牛の産仔を核移植技術により増産させることを目的とし、体外受精胚を材料にドナー胚の最適利用ステージについて検討を行った。また、この成績をもとにして過剰排卵処理後の採胚日と回収胚のステージを検討するとともに得られた体内受精胚の一部を核移植に用い、移植可能な胚盤胞期胚の発生状況を観察し発生した胚の一部について移植を行いその受胎性について検討した。

## 材料及び方法

### 1 ドナー胚のステージ別最適利用ステージの検討

#### (1) ドナー胚の作出

最適利用ステージの検討には、体外受精胚をドナー胚に用いた。体外受精<sup>4)</sup>は食肉センターより持ち帰った卵巣の表面に存在する直径 5mm 以下の卵胞から卵子を吸引採取し 10%牛胎児血清 (FCS)添加 TCM199 で 20~22 時間成熟培養後、凍結精液を用い、BO 液で  $5 \times 10^6/ml$  の濃度に調節した  $100 \mu l$  精子ドロップ中に卵子 10 個程度加え媒精を行い、その 6 時間後にピペティングにより卵丘細胞を裸化処理し 3mg/mlBSA 添加 CR1aa 培地  $750 \mu l$  に 50 個の割合で加え、5%CO<sub>2</sub> - air, 38.5 で 48 時間培養した。その後、5%FCS - CR1aa 培地に移し 5%CO<sub>2</sub> - 5%O<sub>2</sub> - 90%N<sub>2</sub>, 38.5 で培養を行った。融合には媒精後 72, 96, 120 時間目に胚を取り出し、細胞数をカウントするとともに核移植のドナー細胞に用い発生率を比較検討した。

#### (2) 核移植方法

クローン胚の作出は成熟培養後 22 時間日に、0.1%ヒアルロニダーゼ添加 PBS(+)で裸化処理した後  $2.5 \mu g/ml$  サイトカラシン D 添加 TCM199HEPES のドロップ中で押し出し方<sup>5)</sup>により除核した卵子を  $10 \mu M/ml$  カルシウムイオノフォア添加 PBS と  $10 \mu g/ml$  シクロヘキシミドと 3mg/ml 牛血清アルブミン(BSA)を添加した CR1aa により活性化処理し、レシピエント卵子として用いた。胚の再構築は活性化処理開始後 6 時間日に、各ステージに達した胚から細胞を分離し囲卵腔内に注入されたレシピエント卵子(写真 1)を ZFM を融合メEDIUM に用い、白金 1mm 間隔の 65V/mm - 50  $\mu sec \times 2$  回の電気融合条件で融合させた(融合機：BTX 社 ECM2001)。

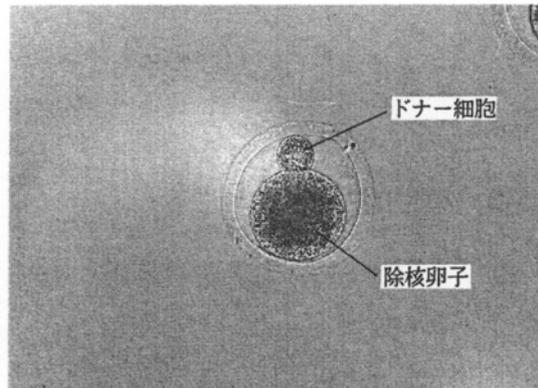


写真 1

#### (3) クローン胚の培養

融合したクローン胚の培養は、体外受精胚と同様の条件で行い、融合後およそ 144 時間日に胚盤胞期胚以降のステージに達した胚をカウントした。

#### (4) 体内受精胚をドナーに用いた核移植

過剰排卵処理は既報<sup>6)</sup>に基づいて実施した。採胚は発情日を 0 日目とし 4~5.5 日目に実施し、回収したドナー細胞は  $2.5 \mu g/ml$  サイトカラシン D 添加 TCM199HEPES のドロップ中でマイクロ

マニピレーターを用い透明体を切開，胚細胞を取り出し，0.1%Trypsin と 0.05MEDTA を添加した PBS(-)ドロップ中でピペティングにより分散させ，2.5  $\mu$ g/ml サイトカラシン D 添加 TCM199HEPES のドロップ中で融合時まで室温保存した。胚の再構築及びクローン胚の培養は体外受精胚をドナー細胞に用いた場合と同様の方法で行った。

#### (5) 移 植

クローン胚の移植は融合後 144 時間目前後に胚盤胞期胚以降に発育した胚をカスー社製移植器を用い 2 胚移植では受胎牛の両側子宮角に 1 個ずつ，1 胚移植では黄体側子宮角に移植した。

## 結 果

### (1) 体外受精胚の細胞数

ドナー胚として作出した体外受精胚の細胞数は 72 時間目に  $16.9 \pm 2.9$ (桑実期胚：mor)，96 時間目  $37.3 \pm 8.5$ (後期桑実期胚：CM)，120 時間目は  $72.0 \pm 16.0$  個(初期胚盤胞期胚：eBla)， $122 \pm 14.3$  個(胚盤胞期胚：Bla)であった(表 1)。

表 1 体外受精胚 1 個当たりの細胞数

培養時間	72	96	120	
ステージ	mor	CM	eBla	Bla
細胞数	16.9	37.3	72.0	122
±SD	±2.9	±8.5	±16.0	±14.0
(n)	(15)	(8)	(13)	(5)

### (2) 体外受精胚をドナー細胞とした核移植

これらの胚をドナ細胞に利用した結果，72，96，120 時間培養胚における融合率は各 71.0，62.7，54.1%，胚盤胞期胚発生率は 9.3，38.6，14.9%であり培養 96 時間目の胚を用いたときに，高い発生率が得られた(表 2)。

### (3) 採胚成績

ホルスタイン種経産牛を供胚牛とした採胚成績では，発情後 4 日目で 3 頭から採胚した結果，回収総胚数 13 個中 8 細胞期以下 2 個，8～16 細胞期 11 個であつ丸 5 日目採胚した 5 頭では回収総胚数 42 個中 8 細胞期以下 1，8～16 細胞期 6，桑実期 29，後期桑実期 1 個，5.5 日目で採胚した 1 頭は回収総胚数 2，後期桑実期 2 個であった(表 3)。

表2 ドナー胚ステージ別のクローン胚発生成績

ドナー胚 培養時間	ドナー胚 ステージ	ドナー 胚数	供試 卵数	融合 卵数 (%)	分割 卵数 (%)	胚盤胞 期胚数 (%)
72	mor	8	107	76 (71.0)	54 (50.5)	10 (9.3)
96	CM	4	83	52 (62.7)	50 (60.2)	32 (38.6)
120	eBla	3	74	40 (54.1)	23 (31.1)	11 (14.9)

表3 ホルスタイン種経産牛の採胚成績及び胚のステージ

No.	採胚牛 産歴	胚日齢	胚数	8cell<	16cell<	mor	CM
1	20	2	4	4	4		
2	117	2	4	2	2		
3	138	初	4	7	2	5	
4	123	初	5	5			3
5	28	3	5	5		2	1
6	119	4	5	11	1	6	4
7	146	初	5	9			9
8	143	初	5	12			11
9	146	初	5.5	2			2

(4) 体内受精胚をドナー細胞とした核移植

ドナー細胞には採胚した体内受精胚の一部(体内)と体内受精胚をドナー細胞としたクローン胚(NT)の細胞を用い(表4),合計9個,153細胞を核移植し,融合を確認した131(85.6%)個を低酸素培養した。融合後144時間目前後に胚盤胞期以降へ発生したのは53(34.6%)個であった。

(5) クローン胚の移植

融合後144時間目前後に胚盤胞期(写真2)以降のステージへ発育した19胚を1胚移植7頭,2胚移植6頭の計13頭に移植した結果,1胚移植で2頭,2胚移植で1頭が受胎し(表5),2組の双子(写真3)を生産した。

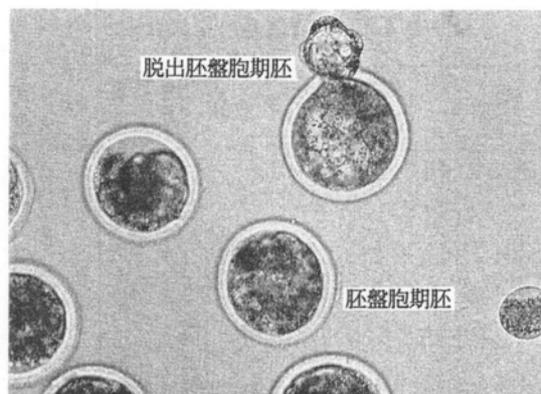


写真 2

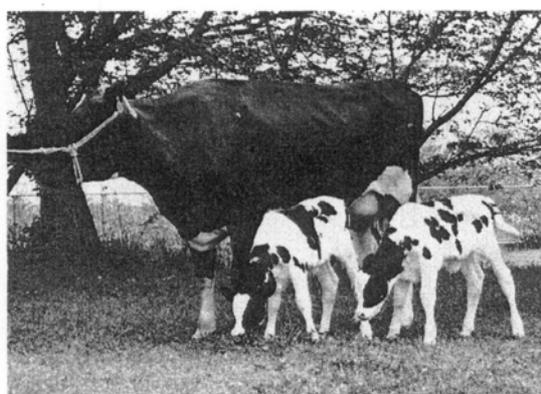


写真 3

表 4 体内受精胚及びクローン胚の核移植成績

No.	由来	供胚牛×♂	ステージ	供試卵数	融合卵数 (%)	胚盤胞期胚数 (%)
I	体内	20×P542	16細胞期	14	12(85.7)	3(21.4)
II	体内	28×P5689	桑実期	27	24(88.9)	9(33.3)
III	NT	28×P5689	8細胞期	8	8(100)	3(37.5)
IV	体内	119×P5672	16細胞期	8	7(87.5)	5(62.5)
V	体内	117×H3180	桑実期	27	24(88.9)	9(33.3)
VI	体内	146×P5761	CM	18	16(88.9)	6(33.3)
VII	体内	146×P5761	CM	29	20(69.0)	9(31.0)
VIII	体内	146×P5672	16細胞期	8	7(87.5)	6(75.0)
IX	体内	117×H3180	16細胞期	14	13(92.9)	3(21.4)
計				153	131(85.6)	53(34.6)

表 5 移植成績及び分娩状況

No.	受卵牛	移植 胚数	ドナー 胚	妊 否	ET後 情回帰 期間	妊 娠 期 間	性	生時 体重
1	ホルス(未)	1	I	-	14			
2	ホルス(未)	1	II	-	15			
3	ホルス(未)	1	II	+		280	♂	41 kg
4	ホルス(経)	1	III	+		286	♂	81 kg
5	ホルス(未)	1	IV	-	14			
6	ホルス(未)	2	V	+		278 278	♀ ♀	38 kg 35 kg
7	ホルス(未)	2	VI					
8	ホルス(未)	2	VI					
9	ホルス(経)	2	VII					
10	ホルス(経)	1	VII					
11	ホルス(経)	2	VII					
12	ホルス(未)	1	VII					
13	ホルス(未)	2	IX	-	13			

## 考 察

体外受精胚をドナー胚として用い核移植を行った試験では、媒精後 96 時間目の胚を用いたとき最も高い胚盤胞期胚の発生率を示し、このときの 1 胚あたりの細胞数は  $37.3 \pm 8.5$  個であり、平均 8 個の移植可能なクローン胚の作出が可能であった。72 時間培養した体外受精胚では融合率は最も高いものの胚盤胞期胚発生率は低かった。このことは、72 時間目において比較的分割の進んだ胚をドナー胚として選んだことに原因があるかもしれない。また、120 時間培養した胚は初期胚盤胞期胚になっていたため他の報告<sup>7)</sup>と同様に核移植後の胚盤胞期胚の発生率も低かった。このステージの胚をドナー胚として用いるためには免疫外科学的手法等による内部細胞塊の分離<sup>8)</sup>と、融合条件の改善<sup>9,10)</sup>が効率的なクローン胚の作出に必要であると思われる。

これらの結果から、体外受精胚における 96 時間培養胚に相当するステージの体内受精胚を回収する目的で、9 頭のホルスタイン種経産牛に過剰排卵処理を行い授精後の採胚時期を検討した結果、4 日目では 8~16 細胞期の胚が中心に回収され、5 日目以降に目的とする細胞数の胚が回収されることが判った。6 日目の回収では胚盤胞期胚が回収されることや<sup>7,11)</sup>、6 日目に回収される CM では胚を構成する細胞の大きさに違いがあり、細胞の大きさによってその後の胚盤胞期胚の発生率に差が認められるとの報告もあり<sup>12)</sup>、過剰排卵処理による胚の回収は細胞の大きさが比較的均等な授精後 5 日目が適当と思われる。

回収された生体内胚を用いた核移植では 16 細胞期以前の胚をドナーとしたときは融合率 90.4% (47/52) 胚盤胞期胚発生率 38.5% (20/52) それ以降のステージの胚を用いた場合は 83.2% (84/101) 32.7% (33/101) であり融合率及び胚盤胞期胚発生率はステージが進むにつれて若干低下する傾向にあったが、

1 胚あたりの移植可能なクローン胚の作出数は逆に増える傾向にあった。

作出されたクローン胚を 14 頭のホルスタイン種受胎牛に移植した結果、3 頭が妊娠・分娩し、2 組の双子を分娩し、6 頭については移植後の経過を観察中である。体外受精胚の培養における CR1aa の有効性については確認されており<sup>13,14)</sup>正常に受胎妊娠することが知られている<sup>15)</sup>。同様の培養条件でクローン胚を移植した結果では受胎率はやや低く、培養方法の変更も含めた改善が必要と思われた。

得られた産仔のうち 3 頭の生時体重は平均的な値であったが、分娩予定日を経過し帝王切開で取り出した 1 頭は 81kg と、過大仔であった。核移植産仔の生時体重については幾つかの報告<sup>16, 17)</sup>があるものの過大仔の発生機序については不明な点が多い<sup>18)</sup>が、今回の 1 頭はリクローン産仔であることから体外での長期培養が関係しているのかもしれない。

今回の結果により高能力牛の体内受精胚を核移植に用いるには過剰排卵処理牛では発情後 5 日目の採胚が適しており、回収した胚 1 個から平均 8 個のクローン胚を作出できることが判った。今後は例数を重ねるとともに、得られた産仔の泌乳能力試験を行いその正常性について検討して行きたい。

## 文 献

- 1) Willadsen.S.M Nuclear transplantation in sheep embryo. Nature. 320 : 63-65.
- 2) Seven L.Stice.Carol L.Keefer ; Multiple Gene rational Bovine Embryo Cloning : Biology of Reproduction 1993. 48:715-719
- 3) S.L.Stice, C.K.Keefer, M.Maki-Laurila, P.E.Philius; Producing Multiple Generations of BovineNuclear Transplant. Theriogenology 1990. 35 : 273
- 4) 立川進, 今川智久, 小賀野義一 牛受精卵移植実用化試験(第 4 報), 徳島県畜産試験場研究報告 1988.29 : 2-5
- 5) 笠井裕明, 刈谷亮介, 後藤充宏 培養ガス分圧の違いと共培養細胞の有無が牛初期胚の発生率の及ぼす影響, 徳島県畜産試験場研究報告 1997.38 : 1-3
- 6) 小賀野一義, 雲林徹, 吉田建設, 山西清  
牛受精卵移植実用化試験, 徳島県畜産試験場研究報告 1982.23 : 1-9
- 7) 窪田力, 溝下和則, 轟木純一, 山口浩, 猪八悟, ウシ核移植の検討(第 1 報), 鹿児島県肉用牛改良研究報告 1995.第 1 号 : 26-31
- 8) 岩崎説雄, 吉田豊, 渡辺誠喜, 中原達夫, 重蛍光染色法による体外受精由来牛胚盤胞期胚の栄養外胚葉と内部細胞塊の分別染色と細胞数の計測, 家畜繁殖学雑誌 1990.36 : 60-65
- 9) 高橋精也, 窪田力, 尾形康弘, 中里敏, 徳永智之, 今井裕.牛胚盤胞内部細胞塊細胞の核移植, 第 90 回日本畜産学会講演要旨 1995.106
- 10) C.L.Keefer, S.L.Stice, and D.L.Matthews.  
Bovine Inner Cell Mass Cells as Donor Nuclei in the Production of Nuclear Transfer Embryo and Calves. BIOLOGY OF REPRODUCTION 1994. 50 : 935-939

- 11) 山本裕介, 南橋昭, 陰山聡一, 森安悟, 芦野正城, 北野則泰, 伊藤季春, 発情後 5~6 日目の胚回収における牛胚の発育ステージ, 第 90 回日本畜産学会講演要旨 1995.195
- 12) V.Zakhartchenko, E.Wolf, G.A.Palma, and G. Brem. Effect of Donor Embryo Cell Number and Cell Size on the Efficiency of Bovine Embryo Cloning. MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT 1995. 42 : 53-57
- 13) 小西正人, 板倉はつえ, 青柳敬人, ウシ体外受精卵の胚盤胞への発生に及ぼす卵丘細胞との共培養における合成培地へのグルコース添加の影響, Journal of Reproduction and Development. 1994. 40 : 59-63
- 14) 小西正人, 青柳敬人, ウシ体外受精由来胚の胚盤胞への発育に関する合成培地の検討, Journal of Reproduction and Development. 1994. 40 : 1-4
- 15) 窪田力, 溝下和則, 轟木純一, 山口浩, 猪八重悟, 後藤和文, 茶之木高志, CR1aa 培地で発生した体外受精由来胚の品質と受胎能, 鹿児島県肉用牛改良研究報告 1997.第 2 号 : 28-31
- 16) 後藤太一, 高橋正弘, 植木淳史, 川畑享子, 土屋秀樹, 浜野晴三, 牛核移植胚の移植胚日齢と凍結の有無による受胎成績及び分娩例について, 第 90 回日本繁殖生物学会講演要旨 1997
- 17) S.Yazawa, Y.Aoyagi, M.Konishi, T.Takedomi. Characterization and Cytogenetic is of Japanese Black Calves Produced by Nuclear Transfer ; Theriogenology 1997. 48 : 641- 650
- 18) Jeremy G.Thompson, David K.Gardner, P.Anne Pugh, William H.McMillan, and H.Robin Tervit.Lamb Birth Weight Is Affected by Culture System Utilized during In Vitro Pre - Elon gation Development of Ovine Embryos BIOLOGY OF REPRODUCTION 1995. 53, 1385-1391