

ウシ生体由来卵子から作出したドナー胚を用いた核移植

長谷川清寿 岡崎尚之 山田彰司 安部茂樹

要 約 特定個体由来の新鮮ドナー胚の安定的かつ継続的な確保、ならびにそれらを用いた核移植胚の作出および産子生産を目的に、経膈採卵で得られた生体卵巢由来卵子の体外受精で作出した新鮮 *in vitro* ドナー胚を用いた核移植について検討すると同時に、レシピエント卵子の由来が初期胚核移植成績に及ぼす影響を調査した。その結果、生体卵巢由来卵子の体外受精後 5 日目に核移植可能と判定した桑実期胚への発生率は 40.8% (178/436) であった。また、OPU1 回当たりに得られるドナー胚は個体別には 1.7 から 10.3 個の範囲であり平均 5.9 個であった。さらに、これらの体外受精胚のうち 25 個をドナー胚として、また、レシピエント卵子は摘出卵巢由来卵子 307 個および生体卵巢由来卵子 83 個を用いた。その結果、融合率は、それぞれ 89.6% (275/307) および 63.9% (53/83) であり、レシピエント卵子の由来が生体卵巢の場合は摘出卵巢の場合に比べ有意に ($P < 0.01$) 低率であった。移植可能胚への発生率 (発生数融合数) は、22.9% (63/275) および 17.0% (9/53) であった。発生した再構築胚を受胎牛 1 頭当たり 1 ~ 2 胚を新鮮移植し、それぞれ受胎例が得られた。受胎率 (受胎頭数移植頭数) は、53.8% (7/13) および 100% (3/3) であった。また、胎齢 40 日時点での生存胎子率 (生存胎子数 / 移植胚数) は、38.1% (8/21) および 60.0% (3/5) であった。以上のことから、経膈採卵によって採取される生体由来卵子は、安定的かつ継続的な新鮮ドナー胚の確保に利用可能であること、ならびにレシピエント卵子としても利用できることが明らかとなった。

島根県立畜産試験場研究報告第 35 号, 1-4, 2002

ウシの受精卵 (初期胚) 核移植は、経済的価値の高い個体の量産および種畜検定の効率化による優良個体の早期選抜に有用な技術として、実用化へ向けた研究開発が進められてきている^{31,34)}。

一般に、初期胚核移植に用いるドナー胚には、16 ~ 32 細胞の桑実期の体内由来 (*in vivo*) または体外由来 (*in vitro*) 胚が用いられている^{9,10)}。しかし、過剰排卵処理人工授精 (SOV-AI) による *in vivo* 胚の採取成績は、供胚牛の年齢²⁰⁾、卵胞刺激ホルモン製剤に対する卵巢反応の個体差¹⁸⁾ などによって影響を受け、さらに、短期間の連続的な SOV は卵巢の反応性を低下させること⁶⁾ が知られており、特定個体由来のドナー胚は必ずしも継続的に確保できない。さらに、摘出卵巢から卵子を採取し、その直後に *in vitro* 胚の作出を試みることは可能である²⁾ が、この方法では特定個体由来のドナー胚を継続的に確保することは困難である。

これらの問題点は、核移植後の胚発生能を損なわないような初期胚の長期保存法の確立、あるいは新鮮ドナー胚の安定的かつ継続的な確保によって克服可能であると考えられる。このうち前者について、我々は既に、1.4M グリセリンを耐凍剤とした緩慢凍結法で *in vivo* ドナー胚を凍結融解後に核移植に供試することに

よって受精卵クローン産子の生産が可能であることを報告した¹²⁾。

本報では、特定個体由来の新鮮ドナー胚の安定的かつ継続的な確保、ならびにそれらを用いた核移植胚の作出および産子生産を目的に、経膈採卵-体外受精 (OPU-IVF) によって作出した新鮮 *in vitro* ドナー胚を用いた核移植について検討すると同時に、レシピエント卵子の由来が初期胚核移植成績に及ぼす影響を調査した。

材料および方法

1) ドナー胚

in vitro ドナー胚は、当場内繋養の黒毛和種経産牛 5 頭を供試して、OPU で採取した生体内卵子の IVF により作出した。OPU は既報^{13,16)} に準拠して行った。すなわち、吸引操作は、超音波画像診断装置 (SSD-1200 ; Aloka) に装着した 7.5MHz コンパックス型プローブ (UST-9106P-7.5 ; Aloka) にダブルルーメンニードル (K-OPSD-1760 ; Cook) をセットして、卵胞吸引システム (K-MAR-4000 ; Cook) に接続後、断続的に吸引圧 (100mmHg) を付与することで行った。フラッシング液は、3mg/ml ウシ血清アルブミン (BSA Fr.V ; Bayer) および

へパリン(10unit/ml)を添加した m-PBS(Dulbecco's modified PBS)を用いた。OPU に供試するウシの発情周期は任意の時期とし、採取頻度は1週間に1回とした。生体内卵子の IVF は、常法²⁴⁾により成熟培養および媒精処理を行い、5%CO₂、95%空気の気相条件下の5%子牛血清添加 CR1aa 培地²⁵⁾で媒精日から5日目まで発生培養した。

2)核移植

ドナー細胞は、顕微鏡下の形態観察で核移植可能と判定した桑実期胚(新鮮胚)から分離した。細胞分離は、透明帯をマイクロニードルで穿孔後、0.125% Trypsin (Gibco BRL)処理およびピペッティングによって行った。レシピエント卵子は、摘出卵巣または生体卵巣から吸引採取後、20 ~ 22 時間成熟培養した卵子を除核および活性化処理して用いた。活性化処理³⁾は、5 μ M Ionophore A 23187(Calbiochem)で5分間および10 μ g/ml Cycloheximide(Sigma)で6時間行い、Cycloheximide 処理中にレシピエント卵子の囲卵腔内へドナー細胞を挿入した。核移植卵は、Zimmerman's cell fusion medium³³⁾内で50 μ 秒間直流電気(12V/150 μ m)を2回印加し、融合卵のみを発生培養した。核移植卵の発生培地は、5%CO₂、5%O₂、90%N₂の気相条件下の血清無添加の改変 TCM-199 培地(IVD-101 ; 機能性ペプチド研究所)⁴⁾を用いた。得られたデータの統計処理は、²⁾検定で行った。

3)受胎牛への移植

再構築胚の受胎性の確認は、核移植後5 ~ 8日目の顕微鏡下での形態観察で移植可能と判定された胚を、発情後6 ~ 7日の機能黄体を有する交雑種受胎牛^{1,11,17,23)}へ直接移植し、その後の経過を観察することで行った。胎子の生存性は、胎齢30および40日目の超音波画像診断での胎子とその付属物の確認および胎子心拍の有無によって判定した。

成 績

in vitro 由来ドナー胚の作出に用いる生体内卵子の採取を目的とした OPU は延べ30回行い、1回当たり平均19.2個の生体内卵子を採取した。これらの卵子は変性卵子を除いて IVF に供試し、媒精後5日目の顕微鏡下の形態検査で核移植可能と判定できた桑実期胚への発生率は40.8%(178/436)であった。また、OPU1回当たりで得られるドナー胚は個体別には1.7から10.3個とばらつき、全供試牛の平均値は5.9個であった(表1)。

供試ドナー胚は桑実期胚25個であり、レシピエント卵子は摘出卵巣由来卵子(307個)および生体卵巣由来卵子(83個)を用いた。核移植後の融合率(融合数/核移植数)は、それぞれ89.6%(275/307)および63.9%(53/83)であり、レシピエント卵子の由来が生体卵巣の場合は摘出卵巣の場合に比べ有意に(P<0.01)低率であった。卵割率(卵割数/融合数)は、それぞれ57.8%(159/275)および45.3%(24/53)であった。同様に、移植

表1 in vitroドナー胚作出のための個体別卵子採取および体外受精成績

個体(年齢)	卵 子 採 取		体 外 受 精		
	OPU回数	採取卵子数(/OPU)	供試卵数	卵割数(%)	発生数(%, /OPU)
A(10)	7	183(26.1)	139	98(70.5)	50(36.0, 7.1)
B(11)	8	142(17.8)	106	81(76.4)	38(35.9, 4.8)
C(5)	6	50(8.3)	29	21(72.4)	10(34.5, 1.7)
D(5)	2	26(13.0)	18	12(66.7)	8(44.4, 4.0)
E(6)	7	174(24.9)	144	106(73.6)	72(50.0, 10.3)
計	30	575(19.2)	436	318(72.9)	178(40.8, 5.9)

*発生培養5日目(媒精日を起点)に発生した核移植可能な胚(桑実期胚)

表2 核移植成績

試験区分	供試ドナー胚数	供試卵数	融合数(%)	卵割数(%)	発生数(%, /ドナー胚)
摘出卵巣	20	307	275(89.6)	159(57.8)	63(22.9, 3.2)
生体卵巣	5	83	53(63.9)	24(45.3)	9(17.0, 1.8)

*核移植に供試したレシピエント卵子の由来

**核移植後8日目までに発生した移植可能胚(後期桑実期 ~ 胚盤胞期胚)

異符号(a,b)間に有意差あり(P<0.01)

表 3 再構築胚の移植成績

試験区分	受胚牛頭数	受胎頭数(%)	移植胚数	生存胎子数 ¹⁾ (%)
摘出卵巣	13	7(53.8)	21	8(38.1)
生体卵巣	3	3(100)	5	3(60.0)

*核移植に供試したレシピエント卵子の由来

**胎齢30および40日目に超音波画像によって生存性を確認

可能胚への発生率(発生数融合数)は、22.9%(63/275)および17.0%(9/53)であった。卵割率および発生率は、両区間に有意差は認められなかった(表2)。

移植可能な再構築胚は受胚牛1頭当たり1~2胚を新鮮移植し、受胎率(受胎頭数移植頭数)は、53.8%(7/13)および100%(3/3)であった。また、胎齢40日時点での生存胎子率(生存胎子数移植胚数)は、38.1%(8/21)および60.0%(3/5)であった(表3)。

考 察

初期胚核移植は、有用な遺伝的能力を有する個体の大量生産のほか、畜産分野においてはクローン検定への応用により従来の検定精度を向上できる⁷⁾との観点で、その技術的進展が期待されている。しかし、現状では、本技術によってクローン産子を安定的かつ継続的に生産するために解明しなければならない課題が少なからず存在している^{3,4,8,14,15,19,26,28,29,31,32,35,36)}。特に、本技術の実用化に向けて1卵(胚)性多子を確保するためには、(1)優良遺伝形質を有すると判定されたウシからドナー胚が安定的かつ継続的に確保できること、(2)1個のドナー胚から再構築胚が高位安定的に作出できること、そして(3)受胚牛への移植によって同一ドナー胚由来の再構築胚が受胎し、(4)正常な複数子が得られるとともにそれらが相似性を示すことが極めて重要なポイントである。

本実験では、OPU-IVFによるin vitroドナー胚の確保とそれらを用いた核移植について検討した。OPU技術は人医領域で開発された技術を基に、ウシ生体内卵子の採取を目的に改良された技術である⁵⁾。本技術はまた、発情周期の任意の時期に卵子を採取可能で、過排卵処理での反応不良からの卵子採取も可能であることから、最近ではウシにおいてもルーチン化された技術として位置づけられている¹⁶⁾。我々も既にOPU-IVFによって作出した胚盤胞期胚の移植で産子を得ており(未発表,1999)、継続的な卵子の確保および移植可能胚の作出に利用可能であることを確認した。このOPU-IVF技術は核移植に利用できれば、ドナー胚の安定的かつ継続的な確保の点から有用である。今回のOPU-IVF

での核移植可能な桑実期胚への発生率は40.8%であり、尾形ら²³⁾(41.7%)と同等の成績であり、OPU1回当たり平均約6個(5.9個)のドナー胚を作出できたこと、初期胚核移植による受胎例が得られたことなどから、OPU-IVFはドナー胚の継続的な確保に十分利用可能であると考えられた。

核移植による1卵性多子生産に向けた再構築胚の作出段階における課題は、ドナー胚の複製、つまりドナー胚1個当たり作出できる移植可能な再構築胚数の高位安定化であり、少なくとも、切断分離による分割胚の作出効率(2個)以上の胚生産が必要である。今回、in vitroドナー胚1個当たりの移植可能な再構築胚数は平均2.9個(摘出卵巣由来レシピエント卵子:3.2個、生体卵巣由来卵子:1.8個)で、既報²³⁾に比べて低値であったが、1胚を2ないし3個程度の胚に複製することが可能であった。一方、初期胚核移植におけるドナー胚の由来と核移植成績(融合率、卵割率、発生率)との関連について、後藤⁹⁾はin vitro胚を発育速度によって選別した場合(2細胞期での分別)ではin vivo胚およびin vitro胚での違いは認められないとしている。今回は、発育速度による選別は行わず、5日目での形態観察のみで選別を行った。in vitro胚では、体外での胚の発育観察・分別および発生培養条件がコントロールできることから、最適条件を設定すれば核移植成績の高位安定化につながる可能性もあり、今後より一層の検討を加えたい。

新鮮移植による初期胚核移植由来再構築胚の受胎性について、浜野ら¹⁰⁾が受胚牛131頭に1胚移植を行って58頭(44.3%)が受胎したと報告している。今回は、受胚牛1頭当たり1~2胚移植であったため、受胎率(62.5%:10/16)を直接的に比較することは困難であったが、生存胎子率(42.3%:11/26)で比較した場合はほぼ同等と考えられた。このことから、核移植日程に併せて受胚牛の同期化処理と新鮮移植を行えば、受胎率の高位安定化が期待できることが示唆された。

特定個体由来のレシピエント卵子を核移植に用いる意義は、統計的手法によって報告されている卵子細胞質内のmt-DNAの表現形質に及ぼす影響^{21,27)}を、核移

植等の直接的手法によって証明することである³⁰⁾。そのためには、特定個体由来のドナー細胞およびレシピエント卵子を用いて核移植を行って得られた産子について調査する必要がある。今回 *in vitro* ドナー胚でレシピエント卵子の由来別に核移植成績を比較し、生体由来卵子の融合率が摘出卵巣のそれに比べて有意に低率であったが、卵割率および発生率には有意な差が認められなかった。融合率に差が生じた原因は、レシピエント卵子の由来と核移植成績の関連についての詳細な報告が見あたらず、特定できなかった。しかしながら、発生した再構築胚の移植で受胎例(3例)が得られたことから、mt-DNA等の核外遺伝子の影響を調べるための核移植産子の生産体系はOPUを基軸にして構築できると考えられた。

以上のことから、生体由来卵子は、OPU-IVFによる安定的かつ継続的な新鮮ドナー胚の確保に利用可能であること、ならびにレシピエント卵子としても利用できることが明らかとなった。

参 考 文 献

- 1)安部茂樹ら、島根畜試研報、27:10-14,1992.
- 2)安部茂樹ら、島根畜試研報、29:1-4,1999.
- 3)Aono F., et al., J.Reprod.Dev.,40:j35-j40,1994.
- 4)Aoyagi K., et al., J.Reprod.Dev.,45:129-134,1999.
- 5)Callesen H., et al., Theriogenology,27:217,1987.
- 6)Donaldson L.E., et al., Theriogenology,20:163-168, 1996.
- 7)古川 力、東日本 ET 研報、15:29-44,1999.
- 8)Garry, F.B., et al., Theriogenology,45:141-152,1996.
- 9)後藤裕司、日本胚移植学誌、20:37-41,1998.
- 10)浜野晴三ら、日本胚移植学誌、20:46-49,1998.
- 11)長谷川清寿ら、島根畜試研報、28:6-10,1993.
- 12)長谷川清寿ら、島根畜試研報、34:6-10,2001.
- 13)長谷川清寿ら、日本胚移植学誌、23:61-66,2001.
- 14)Heyman, Y. and Renard, J.P., Anim.Reprod.Sci.,42:427-436,1996.
- 15)広岡博之、肉用牛高度肥育技術確立推進事業テキスト10-1、畜産技術協会:1-15,1999.
- 16)今井 敬、高度畜産新技術実用化促進事業報告書、家畜受精卵移植技術研究組合:1-9,1998.
- 17)川平 実ら、島根畜試研報、27:6-9,1992.
- 18)小西一之 鈴木一男、畜産の研究、45:812-814, 1991.
- 19)Lavoit, M.C., et al, Biol.Reprod.,57:204-213,1997.
- 20)前原 智ら、島根畜試研報、32:1-5,1999.
- 21)Mannen H., et al., J.Anim.Sci.,76:36-41,1998.
- 22)尾形康弘ら、広島県獣学誌、14:28-31,1999.
- 23)岡崎尚之ら、島根畜試研報、29:5-10,1994.
- 24)岡崎尚之ら、島根畜試研報、33:5-9,2000.
- 25)Rosenkraus, F. and First, N.L., Theriogenology,35:266 (abst.),1991.
- 26)澤井 健、北畜会報、41:23-29,1999.
- 27)Schutz M.M., et al., Livest.Proc.Sci.,37:283-295,1994.
- 28)Takano, H., et al., 家畜繁殖誌,42:61-65,1996.
- 29)Tatham, B.G., et al, Theriogenology,43:335,1995.
- 30)Takeda, K., et al, J.Reprod.Fert.,116:253-259,1999.
- 31)Tsunoda, Y. and Kato, Y., Amim.Sci.Technol.,68:596-602,1997.
- 32)Willadsen, S.M., Genome,31:956-962,1989.
- 33)Wolfe, B.A. and Kraemer, D.C., Theriogenology,31 :5-15,1992.
- 34)Wolf, E., et al, J.Biotech.,65:99-110,1998.
- 35)Young, L.E., et al, Rev.Reprod.,3:155-163,1998.
- 36)Zakhartchenko, V., et al, Mol.Reprod.Dev.,42:53-57, 1995.