

## 黒毛和種牛の経膈採卵・体外受精由来胚を用いた核移植

濱田由佳子\* · 富永敬一郎\* · 有吉哲志\*

### 要 約

産肉能力に優れた雌牛から多くの胚を生産するために、経膈採卵-体外受精由来胚をドナー胚に用いて核移植を行った。また、ドナーとなる初期胚を保存することによって核移植作業を計画的、効率的に行えることから、経膈採卵-体外受精由来初期胚をガラス化保存後、融解し、ドナー胚に用いて核移植を行った。

- 1 延16頭の供試牛から76個の卵丘細胞-卵子複合体を採取し、体外受精後39個の8細胞期胚が得られた。
- 2 延14個の経膈採卵-体外受精由来胚の核移植により、34個の胚盤胞(胚盤胞率22.5%)を作製することができた。
- 3 経膈採卵-体外受精由来胚の核移植より得られた胚盤胞を3頭の受胎牛に移植し、1頭の子牛が得られた。
- 4 経膈採卵-体外受精由来胚をOpen Pulled Strawを用いてガラス化保存後、融解してドナー胚に用いた核移植により発生した胚盤胞を3頭の受胎牛に移植し、1頭の受胎例が得られた。

## Nuclear Transfer of Blastomeres from Fresh and Vitrified Donor Embryos Produced by OPU-IVF in Japanese Black Cattle.

Yukako HAMADA, Keiichiro TOMINAGA and Tetsushi ARIYOSHI

### Summary

To improve the efficiency of embryo production from Japanese Black cows with a high quality of genetic components, in vitro produced embryos have been used as nuclear donors for bovine embryo cloning. In this study, a trans vaginal ultrasound guided follicular aspiration technique was used for the collection of bovine oocytes. Following in vitro maturation and fertilization, developed to 16-stage embryos were used as donors. And Day 4 embryos were vitrified and warmed using the open pulled straw method and used as donors for nuclear transfer.

- (1) Sixteen trials of oocyte collection were attempted on 8 cows, and 76 cumulus-oocyte complexes were aspirated. Sixty-two oocytes were inseminated in vitro, and 39 (63%) oocytes developed to the 8-cell stage 3 days after in vitro fertilization.
- (2) Fourteen fresh donor embryos 4 days after fertilization, and 151 nuclear-transferred embryos were obtained. Seven to 8 days later, 34 oocytes (23%) developed to the blastocyst stage.
- (3) Two blastocysts derived from nuclear-transferred oocytes using blastomeres of fresh embryos at the morulae stage 5 days after fertilization, were transferred to 3 recipients, and one normal calf was delivered.
- (4) Embryos at the 16-cell stage were subjected to vitrification using the OPS method, they were warmed and fused with enucleated oocytes. Transfer of three cloned embryos to 3 recipients.

Pregnancy of one recipient was confirmed.

キーワード：経膈採卵・核移植・ガラス化保存・黒毛和種

1999年8月30日受理

\* 中央農業技術センター

## 緒言

受精卵(胚)核移植技術は、16～32細胞期の初期胚(ドナー胚)の割球を分離し、あらかじめ核をのぞいた別の卵子の細胞質と融合させることによって同じ遺伝子を持つ胚を増産する技術であり、一つのドナー胚から同一遺伝子をもつ1～10数個の移植可能胚が生産できる。

受精卵核移植では、ドナー胚として一般に体内受精胚を用いるが、この方法ではウシに過剰排卵処理や人工授精を行わなければならないうえに、採卵を行っても期待通りの初期胚が得られないことがある。

超音波誘導経膈採卵技術は、成牛の卵巢から未成熟卵子を採取する技術である。膈壁を介して卵巢に針を刺すという簡単な採卵方法であり短時間でできるため、牛体に対する負担も少ない。また、過剰排卵処置が不要であるため、ホルモン剤投与の手間を省くことができる。1週間おきに採卵が可能であり、妊娠期のウシや卵管・子宮に障害のある牛からも卵子を採取できるため、卵子を有効利用することができる。採取した卵丘細胞-卵子複合体(以下COCと呼ぶ)は由来雌牛が分かっており、体外受精を行うことで短期間に複数の種雄牛と受精が可能であることから、遺伝的に優れた雌由来の胚を増産でき、新しい子牛の生産方法として注目されている<sup>12),15)</sup>。しかし経膈採卵で採取できるCOC数は個体毎にばらつきがあるという報告もある<sup>8)</sup>。

そこで、超音波誘導経膈採卵技術と核移植技術の両方を用い、経膈採卵-体外受精(以下OPU-IVFと呼ぶ)由来胚をドナー胚として計画的な核移植を行う試験を行った。

一方、一部のドナー胚については、さらに効率よく核移植を行うため、Open Pulled Straw (DEMTEK社、以下OPSと呼ぶ)を用いたガラス化保存を試み、ガラス化後に融解したドナー胚を用いた核移植法についても検討した。

## 材料及び方法

### 1 経膈採卵および体外受精

1998年8月から1999年4月の間に当センター繋養の黒毛和種経産牛8頭を供試牛として経膈採卵を行った。超音波画像診断装置(日立社:EUB-405)に6.5MHzコンベックス探触子(日立社:EUP-F331)を接続し、採卵アダプター(日立社:EZU-PA6)に2ウェイ方式のダブルルーメンニードル(COOK社)を吸引針として取り付けた、吸引ポンプの吸引圧を90～120mmHgとしてCOCの採取を行った(図1)。

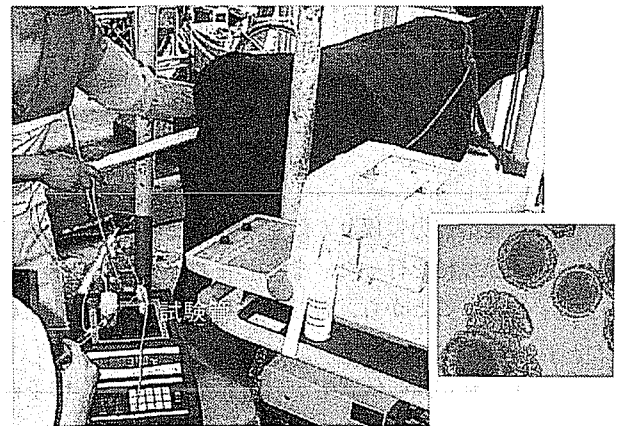


図1. 採卵風景と採取したCOC

0.02Armar Units/ml 卵胞刺激ホルモン(アントリン:デンカ製薬、以下FSHと呼ぶ)+1 $\mu$ g/ml エストラジオール(Sigma社)+5%ウシ新生子牛血清(中標津、以下NBCSと呼ぶ)添加TCM199液(GibcoBRL社)を体外成熟培地とし、採取したCOCのうち、卵丘細胞が付着しているものに一個当たり10 $\mu$ lの液量で20～22時間体外成熟を行った。体外受精法として、5mM テオフィリン(Sigma社)と10 $\mu$ g/ml ヘパリン(ノボヘパリン注:ノボノルデイスA/S デンマーク社)を加えたBO液<sup>3)</sup>で6～7時間媒精し、媒精後、0.025%ヒアルロニダーゼ(Sigma社)を含むリン酸緩衝液(-)(日水社、以下PBS(-)と呼ぶ)中でボルテックスを用いて卵丘細胞を除去し、5%O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>, 90%N<sub>2</sub>の気相条件下で、CR1aa液<sup>14)</sup>を用いて体外培養を行った。受精日を0日として、3日目までは3mg/ml 脂肪酸フリー牛血清アルブミン(Sigma社、以下Fatty acid free-BSAと呼ぶ)をCR1aaに添加し、3日目からはBSAの代わりに5%NBCSを添加し、5日目からは5%CO<sub>2</sub>, 95%空気の気相条件に変更して、5.56mM グルコース(Sigma社)を添加して卵丘細胞との共培養を行うか、または100 $\mu$ mol  $\beta$ -メルカプトエタノール(Sigma社)+20%NBCS添加TCM199液を用いて培養した。受精後4ないし5日目の新鮮胚あるいはガラス化後融解胚を核移植のドナー胚として用いた。

### 2 ガラス化保存方法

OPU-IVF4日目の初期胚をVajtaらの方法<sup>19)</sup>に準じてガラス化保存した。10%エチレングリコール(ナカライ社、以下EGと呼ぶ)+10%ジメチルスルフォキシド(関東化学社、以下DMSOと呼ぶ)を含む20%NBCS添加TCM199液に胚を入れて2分間平衡し、0.6M シュクロース+20%EG+20%DMSOを含む20%NBCS添加TCM199液(ガラス化液)へ胚を移して1～2 $\mu$ lの液と共にOPSに吸引し、30秒後に液体窒素に浸漬した。

ガラス化胚の融解方法として、0.25M シュクロースを含む33%NBCS添加TCM199液を用い、37°Cに加熱した液にOPSの先端を浸漬して融解した。1分後に0.13M スクロースを含む20%NBCS添加TCM199液に胚を移して5分間保持し、最後に20%NBCS添加TCM199液で5分間保持後、培養液に移し換え、核移植まで培養した。

### 3 核移植方法

1998年8月から1999年2月の間に延15回の核移植を行った。

食肉センター由来の卵巣から採取したCOCを20～22時間体外成熟後、ボルテックスまたはピペッティングを用いて0.025%ヒアルロニダーゼを含むダルベッコリン酸緩衝液(GibcoBRL社、以下DPBSと呼ぶ)中で卵子に付着している卵丘細胞を裸化し、極体を放出した卵子を選別し、2.5 μg/ml サイトカラシンD (Sigma社)を含む20%NBCS添加TCM199液中で押し出し法で除核した。除核後の卵子を0.1%ヘキスト33258 (Calbiochem社)で染色し、蛍光顕微鏡で核の有無を確認した。

除核した卵子を10 μmol/ml イオノマイシン (Calbiochem社)を含むDPBSで活性化処理後、10 μg/ml シクロヘキシミド (Sigma社)を含むCR1aa液で6時間処理し、レシピエント卵子とした。成熟培養開始28時

間目からドナー割球を分離し、2.5 μg/ml サイトカラシンDを含む20%NBCS添加TCM199液中でドナー割球を除核卵子の囲卵腔に挿入した。30時間目に電気融合装置(BTX200)を用いて、交流8.5V/mm 5 μsec、直流70V/mm 50 μsec × 2回の電気刺激により割球を融合させ、核移植を行った。融合後の再構築胚は、CR1aa液で上述した体外培養方法を用いて、7～8日間発生培養を行った。再構築胚の正常性を調査するため、発生した胚のうち、12例について、Iwasakiらの方法<sup>7)</sup>を一部修正し、染色体標本を作成した。

### 結 果

表1に経膈採卵と体外受精後の発生成績を示した。8頭の供試牛から延16回の経膈採卵を行い、合計で76個のCOCを採取した。うち、62個(81.6%)に体外受精を行い、39個(62.9%)の8細胞期胚が得られた。これらのうち14個を新鮮胚で、1個を受精後4日目にOPSでガラス化後融解して一日培養し、核移植のドナー胚として用いた。

表2に核移植成績を示した。延216個の割球を核移植した結果、融合率は69.9%であり、融合胚の22.5%である34個が胚盤胞まで発生した。

表1 経膈採卵-体外受精成績

供試牛	採卵回数	平均採卵 間隔(日)	採取 総COC数	体外受精 個数	分割胚数	分割率 (%)	8細胞期 胚数	8細胞期 率(%)	
A	1	—	1	1	1	100.0	1	100.0	
B	1	—	3	3	3	100.0	2	66.7	
C	1	—	9	4	4	100.0	4	100.0	
D	1	—	2	2	2	100.0	2	100.0	
E	5	19.2	44(8.8) <sup>1)</sup>	29(5.8)	19(3.8)	65.5	16(3.2)	55.2	
F	2	58.5	8(4.0)	7(3.5)	5(2.5)	71.4	4(2.0)	57.1	
G	3	16	10(3.3)	9(3.0)	6(2.0)	66.7	6(2.0)	66.7	
H	2	19	9(4.5)	4(3.5)	4(2.0)	100.0	4(2.0)	100.0	
合計	8	16	28.1	76(4.8)	62(3.9)	44(2.8)	70.9	39*(2.4)	62.9

1) ( )内は1回当たりの平均値

\*うち14個を新鮮胚で、1個を凍結胚で核移植ドナー胚に用いた

表2 OPU-IVF由来新鮮胚を用いた核移植成績

ドナー 胚数	核移植 個数	融合数	融合率 (%)	分割 胚数	分割率 (%)	8細胞期 胚数	8細胞期 率(%)	胚盤胞 数	胚盤胞 率(%)
	A	B	B/A	C	C/B	D	D/B	E	E/B
14	216	151	69.9	73	48.3	71	47.0	34	22.5

表4 OPU-IVF新鮮胚を用いた核移植胚の移植成績

ドナー 胚日齢	核移植 個数	融合数	融合率 (%)	分割 胚数	分割率 (%)	胚盤胞 数	胚盤胞 率 (%)	移植頭数	受胎頭数	受胎率 (%)
5日目	13	10	76.9	4	40.0	2	20.0	3*	1†	33.3

\* 胚盤胞1個を切断2分割し、1個ずつ2頭に移植した

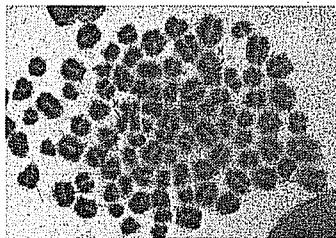
† 1999年8月30日分娩

表5 OPSでガラス化保存したOPU-IVF胚を用いた核移植胚の移植成績

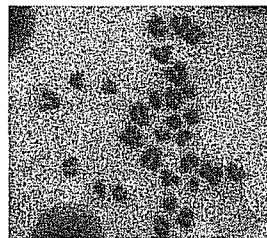
ドナー胚 ガラス化 日齢	核移植 個数	融合数	融合率 (%)	分割 胚数	分割率 (%)	胚盤胞 数	胚盤胞 率 (%)	移植頭数	受胎頭数	受胎率 (%)
4日目	17	15	88.2	12	80.0	3	20.0	3	1	33.3

表3 染色体標本例数

区分	染色体数		
	60 (正常)	30 (半数体)	90 (3倍体)
雌 XX	6	2	1
雄 XY	1	—	2



3倍体 (90XXY)



半数体 (30X)

図2. 染色体数の異常例

表3に染色体検査標本の検査成績を示した。12個の標本のうち、染色体数が正常である60本が7個あったが、半数体の30本が2個、3倍体の90本が3個観察された(図2)。

表4に移植成績を示した。1998年11月17日に行った13個のドナー割球の核移植で作出した胚盤胞2個を一つを分断して3個にし、3頭に移植したところ、1頭が受胎し、1999年8月30日(妊娠期間285日)に正常分娩により生時体重26.1kgの雄子牛が得られた(図3)。

また1999年2月16日にガラス化保存したドナー胚を用いて行った核移植胚の移植成績を表5に示した。17個のドナー割球の核移植で得られた胚盤胞を3頭に移植したところ、1頭が受胎した。



図3. 核移植胚由来子牛

### 考 察

OPUは1988年 Pieterse らの報告<sup>1)</sup>から、改良が加えられ<sup>2)</sup>、体外受精技術や体外培養技術の向上に伴って、新たな子牛生産技術となっている。しかし、OPUは採取COC数に個体差<sup>3)</sup>があり、同一個体からの採卵については週1回よりも週2回の採取が採卵効率がよい<sup>5)</sup>という報告がある。本実験では、1回採卵の個体が多く、個体間に有意差は見られなかった。1頭当たりの採卵回数が少なく、採卵間隔も長かったが、OPU-IVFにより1頭から平均2.4個の8細胞期胚を得たことから、雌の卵子を有効利用でき、雌側からの改良を促進できると思われる。今後採卵効率を向上させるには、供試牛を選定し、計画的な採卵を行う必要がある。

核移植によって作製された胚盤胞の染色体検査では、半数体や3倍体が見られたが、染色体本数の異常な胚は正常胚と形態的に区別できなかった。このような異常な胚の移植が、受胎率を低下させているばかりでなく、胚の早期死滅の原因になっていると考えられる。異常な染色体数の胚が生じた原因として、レシピエント卵子を確実に除核できていないか、除核の確認が行えていないと考えられる。倍数体は電気刺激やサイトカラシンのよう

な薬剤でも誘起される<sup>15)</sup>。Mohamedら<sup>10)</sup>は、レシピエント卵子の除核時にヒアルロニダーゼを用い、ボルテックスで卵丘細胞を裸化後、核の位置を観察したところ、第一極体のそばに核があったのは40.7%であったと報告している。正常な再構築胚を作製するためには、レシピエント卵子の裸化方法をボルテックスではなく、ピペティングを用いる等、極体移動の少ない方法を用い、除核確認を厳重にすることが重要である。

本実験では体外受精胚のみをドナー割球に用いたが、体外受精由来ドナー胚の核移植については、体内受精由来ドナー胚と差がないという報告も多く<sup>1)</sup>、<sup>20)</sup>、体外受精技術や体外培養技術が向上したことを裏付けていると思われる。核移植後の再構築胚の培養についても高い発生率を得るために、安定した良好な体外受精系、体外培養系を確保する必要がある。

本実験の核移植成績について、胚盤胞の作出効率率は22.5%となり、今井らの報告<sup>6)</sup>と比べやや低い値であった。本実験の分割率が融合率に比べて低いことから、レシピエント卵子の活性化や融合の判定方法などが不十分であるか、または、核移植の技術そのものの熟練度が低いことが原因の一つであると考えられた。人工授精に比べ、核移植は子牛の生産効率が低い<sup>17)</sup>、<sup>18)</sup>ことを考えると、子牛を多数得るためには、胚の作出効率を向上させ、同一胚からの胚盤胞をできるだけ多く作製する必要がある。

子牛は正常分娩であり、妊娠期間および生時体重は黒毛和種牛の平均値と変わらず、異常は見られなかった。体外培養を行うことで、過大子が産まれることが問題となっており<sup>4)</sup>、<sup>9)</sup>、今回の一例のみでは判断できないが、本実験で用いた体外培養系は子牛に影響を与えないと思われる。

OPU-IVF 由来胚を OPS 法を用いてガラス化保存後融解したドナー胚から受胎例を得ることができた。ウシ体外受精由来初期胚の凍結保存は極めて困難であったが、超急速ガラス化法である OPS 法によって、受精後3日目以降の胚盤胞への発生率は新鮮胚と変わらないことが報告された<sup>19)</sup>。さらに Peura ら<sup>13)</sup>は、体外受精新鮮胚と OPS 法を用いた4日目ガラス化胚の核移植成績は差がないと報告している。核移植ではドナー胚として、高品質のドナー割球を用いる必要があり、OPS 法による保存法によって、新鮮胚と同品質のドナー割球が利用できる。本実験でもガラス化後のドナー胚を用いた核移植の発生率は新鮮ドナー胚と同様であったため、計画的でより効率的な核移植を実施できると思われる。

OPU-IVF 由来新鮮胚を用いた核移植により14個のドナー胚から34個の胚盤胞を作製でき、正常な分娩例も得

られたが、同一遺伝子をもつ胚を増産するためには、さらに胚盤胞の作出効率を高める必要がある。

#### 謝 辞

卵巣採取に御協力頂いた、加古川食肉衛生検査センターの皆様へ感謝致します。

#### 引用文献

- (1) 青柳敬人・小西正人・武富敏郎・板倉はつえ (1996) : ドナー細胞の由来の違いがウシ核移植による再構築胚の発育率ならびに受胎率に及ぼす影響について : 第91回日本畜産学会講演要旨, 270
- (2) Bols, P. E. J., Vandenheede, J. M. M., Soom, A. V. and Kruif, A. (1995): Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow: a new disposable needle guidance system: *Theriogenology* **43**, 677-687
- (3) Brackett, b. g. and Oliphant, G. (1975): Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro: *Biol. Reprod.* **12**, 260-274
- (4) Garry, F. B., Adams, R., McCann, J.P. and Odde, K. G. (1996): Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning: *Theriogenology* **45**, 141-152
- (5) Gibbons, J. R., Beal, W. E., Krisher, R. L., Faber, E. G., Pearson, R. E. and Gwazdauskas, F. C. (1994): Effects of once-versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocytes recovery and embryo development: *Theriogenology* **42**, 405-419
- (6) 今井裕・高橋清也 (1997) : 家畜における核移植技術 : 畜産の研究 **51**, 11
- (7) Iwasaki, S. and T. Nakahara (1990): Incidence of embryos with chromosomal anomalies in the inner cell mass among bovine blastocysts fertilized in vitro: *Theriogenology* **34**, 683-690
- (8) Kruif, Th. A. M., Boni, R., Wurth, Y. A., Roelofsen, M. W. M. and Pieterse, M. C. (1994): Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle: *Theriogenology* **42**, 675-684
- (9) Kruif, Th. A. M. and den Daas, J. H. G. (1997): In vitro produced and cloned embryos: effects in pregnancy, parturition and offspring: *Theriogenology* **47**, 42-52
- (10) Mohamed Nour M. S. and Takahashi Y. (1999): Preparation of young preactivated oocytes with high enucleation efficiency for bovine nuclear transfer: *Theriogenology* **51**, 661-666
- (11) Pieterse, M. C., K. A. Kappen, Th. A. M. Kruif and M. A. M. Travene (1988): Aspiration of bovine oocytes during

- transvaginal ultrasound scanning of the ovaries: *Theriogenology* **30**, 751-762
- (12) Pieterse, M. C., P. L. A. M. Vos, Th. A. M. Kruip, Y. A. Wurth, Th. H. van Beneden, A. H. Willemse and M. A. M. Taveune(1991): Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes: *Theriogenology* **35**, 857-862
- (13) Peura, T. T., M. W. Lane, G. Vajta and A. O. Trounson (1999): Cloning of bovine embryos from vitrified donor blastomeres: *J. Reprod. Fertil.* **116**, 95-101
- (14) Resenkrans, C. F. Jr. and First, N. L. (1993): Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes in vitro: *J. Anim. Sci.* **72**, 434-437
- (15) 菅原七郎著(1992): 発生工学概論(川島書店)147-157
- (16) 高橋博人(1997): 生体からの卵胞卵子の吸引と体外受精卵の生産: ET ニュースレター **20**, 29-32
- (17) 高橋清也(1998): 胚細胞及び体細胞核移植によるクローン個体作出技術: 研究ジャーナル **21** (9), 31-36
- (18) 角田幸雄・加藤容子(1997): クローン家畜作製とはどういう技術か: 科学 **67-5**, 344-347
- (19) Vajta, G., Holm, P., Kuwayama, M., Booth, P. J., Jacobsen, H., Greve, T. and Callesen, H. (1998): Open Pulled Straw(OPS) Vitrification: A new way to reduce cryoinjuries or bovine ova and embryos: *Mol. Reprod. Develop.* **51**, 53-58
- (20) Zakhartchenko, V., Reichenbach, H. D., Riedl, J., Palma, G. A., Wolf, E. and Brem, G. (1996): Nuclear transfer in cattle using in vivo-derived vs. in vitro-produced donor embryos: effect of developmental stage: *Mol. Reprod. Dev.* **44**, 493-498