

## ガラス化保存したウシ初期胚をドナー胚として用いた核移植

濱田由佳子\*・富永敬一郎\*・有吉哲志\*

### 要 約

ウシ体外受精胚を用いる核移植において、ドナーとなる初期胚を保存できれば、随時融解して核移植作業が行えるため、計画的で効率的な核移植が可能となる。そこで、体外受精4および5日目の胚を超急速ガラス化保存した。融解後、4日目胚は1日間、5日目胚は核移植まで数時間培養し、いずれも体外受精5日目に相当する胚細胞をドナー細胞として核移植を行った。対照として、体外受精5日目の新鮮胚をドナー細胞に用い、初期胚のガラス化日齢がその後の核移植胚の発生に及ぼす影響を調べた。

- 1 体外受精4日目および5日目のガラス化融解後の胚盤胞への発生率 (65.0% vs 65.5%) は新鮮胚 (69.4%) と差がなく、ガラス化を行った日齢間にも差は見られなかった。
- 2 体外受精5日目の新鮮胚、体外受精4日目および5日目胚をガラス化し、融解後5日目まで培養した胚をドナー細胞とした核移植において、融合率 (81.1, 76.1%, 74.5%) および分割率 (74.0, 74.5%, 67.6%) には差がなかったが、胚盤胞への発生率 (37.8, 38.9%, 25.4%) は5日目にガラス化した胚で有意に ( $P < 0.05$ ) 低かった。
- 3 体外受精4日目胚をガラス化融解後、1日間培養して核移植を行い、発生した胚盤胞3個を3頭の受胎牛に移植したところ、1頭の雄子牛が得られた。

### Utilization of Blastomeres from *in vitro*-produced and Vitrified Embryos as Donor Cells in Bovine Nuclear Transfer Cloning.

Yukako HAMADA, Keiichiro TOMINAGA and Tetsushi ARIYOSHI

### Summary

The present study was undertaken to improve the efficiency of nuclear transfer by utilizing *in vitro*-produced and vitrified bovine embryos. Embryos were vitrified and warmed using the open pulled-straw method of Vajta (1998), with minor modification. We examined the effects of the age of vitrified embryos as donor cells on the development to the blastocyst stage after nuclear transfer.

- (1) There were no significant differences in the developmental rate to the blastocyst stage between embryos vitrified at Day 4, Day 5 and unvitrified control embryos (65.0%, 65.5% and 69.4%, respectively).
- (2) The rates of fusion and cleavage after nuclear transfer as donor cells between embryos vitrified at Day 4, embryos vitrified at Day 5 and unvitrified control embryos were not significantly different. However, the rate of developmental to the blastocyst stage after nuclear transfer was significantly lower in the group vitrified at Day 5 than in the group vitrified at Day 4 and control ( $P < 0.05$ ).
- (3) Three embryos, which were developed to the blastocyst stage after nuclear transfer using embryos vitrified at Day 4, stored in LN<sub>2</sub> for 6 days, warmed and cultured for a day were transferred to recipient cows. As a result, we obtained one male calf.

キーワード：核移植・ガラス化保存・ウシ胚

## 緒 言

初期胚をドナーとする核移植において、生体から卵子を採取できる経腔採卵技術と体外受精-体外培養技術の進歩により、体外受精由来初期胚が体内胚由来の初期胚と同様に用いられるようになった<sup>1)</sup>。

初期胚を保存できれば、核移植に用いるドナー胚が随時用意できることになり、計画的な核移植が行えるため、核移植作業や受胎牛の準備などが計画的に行え、効率的となる。近年、凍結が困難とされていた初期胚や、体外受精胚の保存に超急速ガラス化法が開発され、高い生存性が注目されている<sup>2)</sup>。通常、ドナー割球として体外受精由来胚では、受精5日目の32細胞期胚が用いられているが、融解直後の核移植では凍結による細胞傷害の影響が考えられるため、培養後核移植へ利用することにより、再構築胚の発生成績を改善する可能性がある。

そこで、体外受精5日目の初期胚を用いる核移植において、ドナーとなる初期胚のガラス化時期を核移植前日である受精4日目と核移植当日である受精5日目とで比較した。

## 材料及び方法

### 1 体外受精および体外培養

超音波画像診断装置(日立社)を用いて成牛の卵巢から採取した卵子または、食肉センター由来卵巢から採取した卵子を用い、0.02AU/ml FSH(卵胞刺激ホルモン:アントリン:デンカ製薬)、1 $\mu$ g/ml エストラジオール(Sigma社)と5%ウシ胎子血清(中標津、以下FBSと呼ぶ)添加TCM 199液(GibcoBRL社)を成熟培地として、20~22時間体外成熟を行った。体外受精法として、パーコールで分離した精子を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:ノボノルディスA/Sデンマーク社)を加えたBO液<sup>1)</sup>で5~6時間媒精し、媒精後、5%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub>、90%N<sub>2</sub>の気相条件下で、CR1aa液<sup>2)</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 Fatty acid free BSA(Sigma社)をCR1aa液に添加し、3日目からはBSAの代わりに5%FBS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、100 $\mu$ M $\beta$ メルカプトエタノール(Sigma社)ならびに20%FBS添加TCM 199液を用いて培養した。受精後4ないし5日目の初期胚をガラス化保存した。

### 2 ガラス化保存方法

ガラス化保存方法としてはVajtaらの方法<sup>3)</sup>に準じ、既報の方法<sup>3)</sup>で行った。10%エチレングリコール(ナカライ社、以下EGと呼ぶ)+10%DMSO(関東化学社)

を含む20%FBS添加TCM 199液に胚を入れて2分間平衡し、0.6Mスクロース+20%EG+20%DMSOを含む20%FBS添加TCM 199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スクロースを含む33%FBS添加TCM 199液を用い、37 $^{\circ}$ Cに加温した液に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%FBS添加TCM 199液に胚を移して5分間保持し、最後に20%FBS添加TCM 199液で5分間保持後、培養液に移し変えた。融解後、核移植まで胚を培養し、ドナー細胞に供した。

### 3 核移植方法

既報に準じた<sup>3)</sup>。食肉センター由来の卵巢から採取した卵子を20~22時間体外成熟後、卵子に付着している卵丘細胞をピペッティングにより裸化し、極体を放出した卵子を選別し、押し出し法にて除核した。除核後の卵子を5 $\mu$ Mイオノマイシン(Calbiochem社)で活性化処理後、除核の有無を確認し、10 $\mu$ g/mlシクロヘキシミド(Sigma社)で6時間処理して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の分離と核移植を行い、30時間目に融合装置(BTX 200)を用いて、交流8.5V/mm 5 $\mu$ sec、直流70V/mm 50 $\mu$ sec $\times$ 2回の電気刺激により割球を融合させた。融合後の再構築胚は、CR1aa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。

### 4 実験構成

実験1では、体外受精4日目胚および5日目胚をガラス化し、胚盤胞への発生率を新鮮胚と比較した。実験2では、体外受精4日目胚および5日目胚をガラス化した。融解後4日目ガラス化胚は1日間、5日目ガラス化胚は核移植まで数時間培養し、対照として体外受精5日目の新鮮胚をドナー細胞として核移植を行った。

### 5 調査項目

実験1では7~8日目の胚盤胞率(胚盤胞数/ガラス化胚数)、実験2では核移植後の融合率(融合胚数/割球挿入個数)、分割率(分割胚数/融合胚数)および胚盤胞率(胚盤胞数/融合胚数)を調べた。また、子牛への発生能を見るために、発生胚の一部を受胎牛へ移植した。

### 6 統計処理

百分率を角変換後、分散分析を行いダンカンの多重検定を行った。

## 結 果

実験1:図1にガラス化した胚の日齢別に胚盤胞への

発生率を示した。ガラス化日齢による胚盤胞への発生率には差がなく、新鮮胚とも差は見られなかった。

実験2：新鮮胚ならびにガラス化後の初期胚をドナーに用いた核移植成績を図2に示した。新鮮胚、4日目ガラス化胚と、5日目ガラス化胚の融合率および分割率に有意な差はなかった。胚盤胞率は5日目ガラス化胚をドナーとして用いた時に他の2区よりも有意 ( $P < 0.05$ )

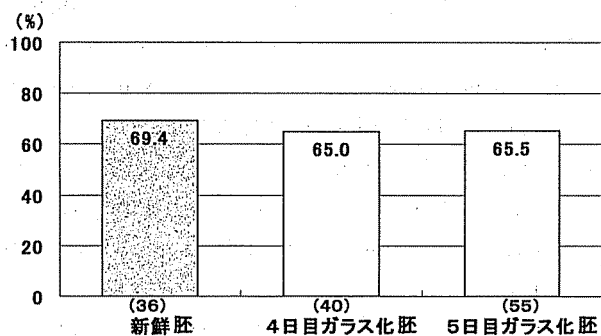


図1 体外受精胚のガラス化後の胚盤胞への発生率  
( )内は供試胚数

に低かった。

表1に4日目ガラス化胚を1日間培養してドナー細胞としたときの核移植胚の移植成績を示した。1999年2月23日に行った核移植で作出した胚盤胞を3頭に移植したところ、1頭が受胎し、1999年12月6日(妊娠期間295日)に帝王切開により生時体重32kgの雄子牛が得られた(図3)。

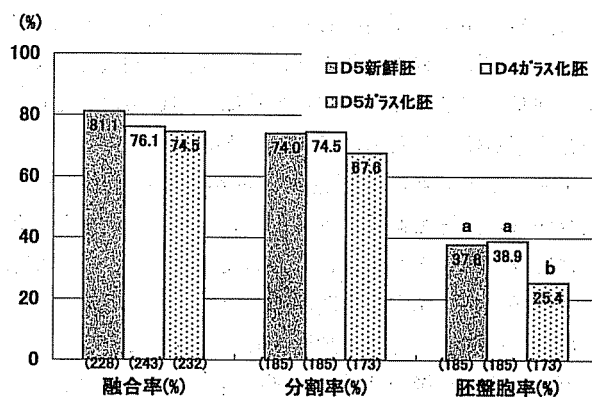


図2 体外受精胚由来初期胚のガラス化日齢別の核移植後の発生率  
( )内は供試胚数ならびに培養胚数 異符号間に有意差あり ( $P < 0.05$ )

表1 ガラス化初期胚を用いた核移植胚の移植成績

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 <sup>†</sup>	33.3

<sup>†</sup>1999年12月6日分娩

### 考 察

体外受精4ならびに5日目にガラス化した胚の融解後の胚盤胞への発生率は新鮮胚と差がなく、日齢による差もみられなかった。Vajtaら<sup>9)</sup>は体外受精胚を受精1日目から7日目までの各日齢にガラス化を行い、3日目からは新鮮胚と有意差のない生存性を得ており、本実験でも同様であった。この結果より超急速ガラス化は初期胚の保存に有効である。

ガラス化融解後の5日目胚をドナーとして行った核移植では、新鮮5日目胚と4日目ガラス化胚の間には融合率、分割率および胚盤胞への発生率に有意な差は見られなかった。しかし、5日目ガラス化胚では、胚盤胞率が他の2区と比較して低い結果となり、Peuraら<sup>6)</sup>の報告と一致した。凍結保存した胚をドナーとして核移植に利用するためには、ドナーとなる割球の核が損傷を受けていないことが必要である。ガラス化では、損傷は細胞小器官であるミトコンドリアや細胞骨格系に与える影響が大きい。さらに、Sathananthanら<sup>8)</sup>の報告によると、

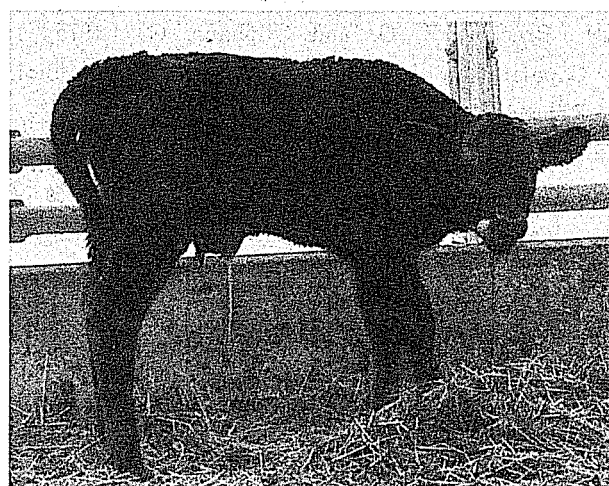


図3 ガラス化後の核移植での生産子牛

卵子のガラス化において、微小管の消失や紡錘糸の破壊によって染色体が散逸し、発生異常を引き起こすとされ、超急速ガラス化でも核の損傷を受けている可能性がある。一方、Vajtaら<sup>10)</sup>の胚盤胞のガラス化において、ガラス

化融解後4時間では細胞内に損傷が見られる割球があるが、24時間の培養では正常に回復する割球と、変性した割球が見られると述べている。

本実験では4日目ガラス化胚は融解後核移植まで1日間培養されたため、損傷を受けた割球が回復するか、反対に死滅するかのどちらかに決まる時間があり、核移植時に正常な割球を選別して使用できたと考えられる。

一方、核移植まで短時間しか培養されなかった5日目ガラス化胚では、ガラス化の損傷から完全に回復しておらず、異常な核を持った割球が核移植に用いられ、その後の発生率が低下したのではないかと思われた。

生産子牛の分娩は、正常であるが生時体重が32kgと大きかった。妊娠期間が延長したことが、生時体重の増加に影響したことも原因として考えられるが、体外培養や核移植による過大子も問題となっているため<sup>2) 4)</sup>、体外培養系の改善も今後の課題として残されている。

ガラス化保存後の体外受精胚を用いた核移植により、新鮮胚を用いた核移植成績と差のない発生率が得られ、分娩例を得ることができたことから、計画的な核移植により、同一遺伝子を持つ多子生産を効率的に行える可能性が示された。

#### 謝 辞

卵巣採取にご協力頂いた、加古川食肉衛生検査センターの皆様には感謝いたします。

#### 引用文献

- (1) Bracket, B. G. and Oliphant, G. (1975) : Capatitation of rabbit spermatozoa in vitro. : Biol. Reprod. 12, 260-274
- (2) 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
- (3) 濱田由佳子・富永敬一郎・有吉哲志 (2000) : 黒毛和種牛の経腔採卵・体外受精由来胚を用いた核移植. 兵庫中央農技研報. 36, 1-6
- (4) Kruip, T. 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
- (5) 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
- (6) Peura, T. T., M. W. Lane, G. Vajta and A. O. Trounson (1999) : Cloning of bovine embryos from vitrified donor brastomeres : J. Reprod. Fertil. 116, 95-101
- (7) 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
- (8) Santhanathan, A. H., N, S. C., Trounson, A. O., Bongso, A., Ratnam, S. S., Ho, J., Mok, H. and Lee, M. N. (1988) : The effects or ultrarapid freezing on meitotic and mitotic spindles of mouse oocytes and embryos. : Gamete Research. 21, 385-401
- (9) 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. Dev. 51, 53-58
- (10) Vajta, G., Hyttel, P. and Callesen, H. (1997) : Morphological changes of in-vitro-produced bovine blastocysts after vitrification ; In-straw directrehydration, and culture. : Mol. Reprod. Dev. 48, 9-17