

切断二分離した牛受精卵の培養・移植試験

誌名	富山県畜産試験場研究報告 = Bulletin of the Toyama Livestock Experiment Station
ISSN	03866394
著者	久保, 博文 佐野, 正記 石川, 邦生
巻/号	10号
掲載ページ	p. 7-11
発行年月	1989年9月

切断二分離した牛受精卵の培養・移植試験

久保博文・佐野正記・石川邦生*

要 約

牛受精卵を90秒間プロナーゼ処理し、ガラス針で切断二分離したのち、透明帯に還納しない簡易な方法を用いて切断二分離受精卵を作出し、培養試験及び移植試験を行った。供試受精卵は新鮮な21個と凍結融解した18個である。

1 受精卵から対の切断二分離受精卵の作出成功率は69%で、新鮮卵で形態学的評価の良い受精卵ほどその作出成功率も高かった。

切断二分離受精卵29個を培養したところ4時間目で72%、24時間目では52%が生存していた。

切断二分離後1時間目に形態学的に生存していた受精卵を10頭14例に移植したところ7例で受胎し、そのうち3例が正常単子を分娩し、4例が妊娠継続中である。

緒 言

牛の受精卵移植（以下 ET と略す。）に関する技術は、実用化の時代に入っている。一方、発生学等の分野では受精卵（以下 Emb と略す。）を生きたまま切断、分離するマイクロマニピュレーションの研究がなされてきた。最近、畜産分野ではこの二つの技術を融合して、一卵性多子の作出等による受精卵の生産効率の向上や、性別別への利用の試みが盛んになってきている。

しかし、1つの Emb から切断二分離 Emb（以下 DE と略す。）を得て、ET 技術に組み入れていくためには、マイクロマニピュレーション技術の簡易化、確実化等解決しなければいけないことが多い。そこで、我々は Emb をプロナーゼで処理し、ガラス針で切断二分離したのち、透明帯（以下 ZP と略す。）に還納しない簡易な方法について検討した。

材料及び方法

1. 供試 Emb

供卵牛は経産の黒毛和種で、既報の過剰排卵処理方法⁴⁾により発情後7日目に採卵した Emb を用いた。採卵後4時間以内に供試した Emb（以下新鮮 Emb と略す。）は、形態学的に poor 及び fair 以上と判定⁵⁾した3卵と18卵である。また、凍結保存されていた Emb

（以下凍結 Emb と略す。）については、融解後3段階でグリセリンを除去し、poor の4卵と fair 以上の14卵を試験に供した。

なお、新鮮 Emb 及び凍結 Emb の発育ステージは、いずれも compact morula～early blastocyst である。

2. 供試 Emb の前処理

0.5%プロナーゼ加 PBS で、Emb を90秒間浸漬処理後ただちに30%非働化去勢牛血清加 PBS（以下培養液と略す。）で3回洗浄し、プロナーゼを除去した。

3. マイクロルーツの作成

保定用ピペットは、ガラス管（ナリング；G-1）をマイクロピペット製作器（ナリング；PW-4）で引き伸ばし、マイクロフォージ（ナリング；MF-79）で先端を加工した。

切断用ガラス針は、直径1～1.5mmのガラス棒を、マイクロピペット製作器で、先端から200 μ mの位置で10～20 μ mの径に加工した。

保定用ピペットは、マイクロインジェクター（ナリング；M-4B）に接続後、左手用マイクロマニピュレーター（ナリング；MO-103）に接続した。切断用ガラス針は、右手用マイクロマニピュレーター（ナリング；MO-102）に接続した。

4. Emb の切断二分離

径18cmのプラスチックシャーレの中央部に培養液のドロップを作り、流動パラフィンで被覆後、Emb をドロップ内に挿入した。保定用ピペットで Emb を吸引保定後、ガラス針を Emb の中央上部に押し当て、

* 富山県畜産課

Emb が移動しないことを確認のうえ、保定用ピペットを取り除いた。さらに、ゆっくりとガラス針を押し下げ切断二分離した。これらの操作は、倒立顕微鏡下で行った。

5. DE の培養試験

作出 DE で、形態学的に生存していた29個を供試した。

96穴マイクロプレートに DE を入れ、形態学的に死滅するまでを経時的に観察した。培養は37℃のCO₂インキュベータで行い、途中で培養液は取り替えなかった。

6. DE の移植試験

DE 作出後約1時間培養し、形態が良好な DE を移植に供した。実頭数10頭の受卵牛に対し、延べ14回の移植を実施したが、その時の黄体形状は、良好な13例とやや不良な1例であった。移植時間は、受卵牛の発情後6ないし7日目に行い、発情日差は-1~0日であった。

DE を pair で13例移植したが、そのうち2例は外科的方法で、11例は頸管経由法で行った。また、1例は作出した DE の片方のみを頸管経由法で行った。

なお、移植に際して DE は ZP に還納しなかった。

妊娠鑑定は移植直前の発情から40~60日目に、直腸検査及び超音波診断装置 (Aloka ; 210型) で行った。

成 績

1. DE の作出

切断による DE の作出成績を表1に示した。39個の Emb から60個の DE を得たが、切断1時間後に両方とも生存していた DE (以下 Mtwin と略す。) は27組 (54個) で、片方のみ生存していた DE は6個であった。

新鮮 Emb と凍結 Emb について Mtwin 作出率をみると、前者が81.0% (17/21) で、後者は55.6% (10/18) であった。

Emb のランク別に Mtwin 作出率をみると、good で 88.9% (8/9), fair で 69.6% (16/23), poor で 42.9% (3/7) で、形態学的評価が悪いと Mtwin の作出結果も悪くなる傾向がみられた。

2. DE の培養試験

作出した DE 29個を培養し、経時的に観察した成績を表2に示した。4時間目では72.4% (21/29) が形態学的に生存していたが、24時間目では48.3%が退行性変化を示し、48時間以上生存していた DE は17.2% (5/29) であった。また、blastulation した DE は24時間目から認められ、36時間以降はすべてが blastocyst と判定された。

表1. 切断二分離による demi-embryos の作出成績

区 分	形態学的 ¹⁾ 評価	供 試 受精卵数	D e m i - e m b r y o s ²⁾		
			monozygotic twin	single	non
新 鮮 卵	G o o d	8	7	0	1
	F a i r	10	9	1	0
	P o o r	3	1	1	1
	計	21	17	2	2
凍結融解卵	G o o d	1	1	0	0
	F a i r	13	7	4	2
	P o o r	4	2	0	2
	計	18	10	4	4
計		39	27	6	6

注) 1) Linder ら(1983)の評価法に基づき、切断二分離直前の評価である。

2) 切断二分離後1時間培養した時に、両方の demi-embryo が生存していた時を mono-zygotic twin、片方のみ生存した時を single、両方とも死滅していた時を non で表示した。

表2. demi-embryo の培養成績

	培 養 時 間 (hr)						
	1	2	4	12	24	36	48
生存demi-embryos	29	24	21	19	15	12	5
(%)		(82.8)	(72.4)	(65.5)	(51.7)	(41.4)	(17.2)
blastulationした demi-embryo 数					3	12	5

注) 37℃, 5% CO₂ 下で培養。培養液は30%去勢牛血清加PBS。

表3. demi-embryos の移植成績

牛No.	demi-embryosの移植回数と移植条件			妊否	産子
	1回目	2回目	3回目		
32	Fr, pair, nS	Fr, pair, nS	Fr, pair, nS	—	
33	Fr, pair, S	Fr, pair, nS		—	
36	Fr, pair, S	Fr, pair, nS		+	1
35	F, pair, nS			+	1
37	F, pair, nS			+	1
40	F, one, nS			+	.
45	F, pair, nS			+	.
51	F, pair, nS			+	.
53	F, pair, nS			+	.
55	Fr, pair, nS			—	

注) 移植条件

Fr, pair, nS; 凍結融解卵由来のdemi-embryosをpairで非手術的に移植。

Fr, pair, S; 凍結融解卵由来のdemi-embryosをpairで手術的に移植。

F, pair, nS; 新鮮卵由来のdemi-embryosをpairで非手術的に移植。

F, one, nS; 新鮮卵由来のdemi-embryosの片方のみを非手術的に移植。

3. 移植成績

14例の移植成績を表3に示した。

新鮮 Emb を切断二分離した DE を移植した7例のうち6例が受胎し、受胎率は85.7%であった。そのうち、2例が単子を分娩し、4例は妊娠継続中である。

凍結 Emb を切断二分離した DE を移植した7例では1例が受胎し、受胎率は14.3%であった。その1例からは単子が誕生した。

また、3回移植を試みた32号牛は、正常な性周期を繰り返し、移植時の黄体も良好であったが、いずれも受胎には至らなかった。また、33号牛も2回試みたが受胎しなかった。

考 察

牛 Emb を機械的に切断するには、ガラス針・白金イリジウム針・金属刃・ガラス微細刃等を用いる方法が報告されている。各方法には、それぞれ一長一短はあるが、牛島ら¹⁶⁾は、ガラス針を用いる方法が熟練を必要としないと述べている。また、MERTES et al.⁶⁾は、眼科用メスとガラス針の比較をし、両者に差がないと報告している。

プロナーゼ処理については、処理した方が DE 作出率、DE 生存率で良い結果が出たという報告¹⁶⁾、処理の有無と培養あるいは移植成績に差がないという報告¹⁾がある。また、豚の Emb を用いた NIEMANN et al.⁹⁾は、短時間の処理が、in vitro での発育を刺激しているようだという。

これらの知見から、プロナーゼ処理後ガラス針で切

断二分離する方法は実用的方法と思われ、試みたところ熟練も必要とせず、容易に DE が得られた。

Emb の形態学的評価が、培養あるいは移植成績と関係があることは良く知られている。また、牛島ら¹⁶⁾は作出した DE の生存性が、供試 Emb の評価と関係していることを示唆している。今回の試験でも、供試 Emb の評価が良いほど Mtwin の得られる率は高く、一卵性双子を得るためには、供試 Emb の厳選が必要と思われた。

新鮮 Emb では Mtwin の作出率が81%なのに対し、凍結 Emb では56%と低かった。この理由は不明であるが、切断に際し、凍結 Emb が新鮮 Emb に比較し細胞間結合が弱いような感触を受けており、このことが Mtwin の作出率低下と関連していることも考えられる。このため、凍結 Emb の切断二分離については、融解後培養等により新鮮 Emb に活力を回復させてから切断作業に入る必要があるのかもしれない。

DE の評価や培養条件についての報告は見あたらず、Emb の形態学的評価や培養条件に準じて、DE も評価・培養されている現状である。一方、DE 作出後わずか3～4時間で約2割が形態学的に死滅するという報告^{4, 10)}、24時間後の生存率が42%¹⁰⁾、40～46時間後での生存率は30%に過ぎなかった¹⁵⁾など、DE の培養成績は Emb に比べ全体的に悪い成績が多い。今回の DE 培養試験でも、4時間で72%、24時間で52%の生存率と、時間の経過に伴い死滅する DE は多いが、当场で同一培養液で実施した Emb の培養結果では、試供した Emb すべてが26時間目で blastocys に

なっている³⁾。この理由について、高倉らは¹⁵⁾、切断二分離部分の損傷の拡大を考え、清家らは¹²⁾、培養液についての検討の必要性を示唆している。また、長嶋ら⁸⁾はDEの評価は形態学的だけでなく正常個体への発生の有無も知り得るものでないといけないう。今後は、切断面の損傷や正常発育能も含めたDEの評価や、最適なDEの培養条件についての検討が必要と思われる。

DEの移植に際しては、一般的にZPに還納して実施されている。しかし、ZPに還納するには手数と時間が必要なだけでなく、還納時のピペット操作等によりDEの細胞に損傷を与えたりあるいは死滅させることが考えられる。一方、牛島ら¹⁶⁾や高倉ら¹⁵⁾はZPに還納しなくても受胎したと報告し、長嶋ら⁸⁾や高倉らはZPが絶対的に必要なものではないと述べている。また、移植に際してのDEをZPに還納する利点はないという報告¹⁷⁾、ZPの有無によって受胎率に差がないという報告¹³⁾もある。そこで、ZPに還納しないDEを用いて14回の移植を試みたところ、50%が受胎し、当場の他試験の移植成績と変わらない受胎率が得られた。これらのことから、DEの移植に際しては、ZPに還納しない方法でも良いと思われる。

新鮮Embを切断二分離したDEの移植では85.7%が受胎したが、凍結EmbからのDEでは14.3%の受胎しか得られなかった。この差は、新鮮EmbからのDE作出の成功率が凍結Embからのものより高いこと、新鮮Embの方が凍結Embより高い受胎率であること等Embの活力及び着床能力に差があることが考えられる。しかし、受卵牛側の条件等もあり、即断はできない。

鈴木ら¹³⁾は、2Emb移植あるいは2DE移植した結果43%の双子生産率を得ているが、国内の一卵性双子の生産率は約20%と低い¹⁴⁾。今回、対のDEを移植した3例で産子が得られたが、いずれも単子であった。今後、効率的に一卵性双子を得るためには、前述の

DE評価・培養液等の検討に加え、双子を得るための移植方法並びに受卵牛の飼養管理等についても検討を加える必要がある。また、ETでは通常の人工授精より高率に早期Embの死滅や流死産が起きることが知られており、今後は居在家²⁾のように超音波診断装置を利用し、胎児の発育状況と死滅の時期等を経時的に追跡調査し、基礎的なデータの蓄積による原因究明が必要であろう。

謝 辞

本試験に際し、御協力いただいた当場の穴田光夫、清水唯史両氏をはじめ関係諸氏に深謝します。

引用文献

- 1) HOPPE R. W., BAVISTER B. D. (1983) *Theriogenology*, 19, 391.
- 2) 居在家義昭ら (1987) 第79日畜学会大会講演要旨, 21.
- 3) 久保博文ら (1986) 富山畜試研報, 9, 85.
- 4) 久保博文ら (1986) 富山畜試研報, 9, 87.
- 5) LINDER G. M., WRIGHT R. W. (1983) *Theriogenology*, 20, 407.
- 6) MERTES P. C., BONDIOLI K. R. (1985) *Theriogenology*, 23, 209.
- 7) NAGASHIMA H., et al. (1984) *J. Reprod. Fert.*, 70, 357.
- 8) 長嶋比呂志ら (1984) 家畜繁殖誌, 30 (別輯23), 10.
- 9) NIEMANN H., et al. (1983) *Theriogenology*, 19, 142.
- 10) PICARD L., et al. (1984) *Theriogenology*, 21, 252.
- 11) RORIE R. W., et al. (1986) *Theriogenology*, 25, 192.
- 12) 清家昇ら (1984) 家畜繁殖誌, 30 (別輯23), 31.
- 13) 鈴木達行ら (1986) 家畜繁殖誌, 32, 44.
- 14) 鈴木達行ら (1986) 家畜人工授精, 118, 8.
- 15) 高倉宏輔ら (1985) 家畜繁殖誌, 31, 122.
- 16) 牛島仁ら (1986) 千葉畜セ研報, 10, 7.
- 17) WARFIELD S. J., et al. (1986) *Theriogenology*, 25, 212.

(1989年3月13日受理)

SUMMARY

In vitro Culture and Transfer with bisected Bovine Embryos

Hirofumi KUBO, Masaki SANO and Kunio ISHIKAWA

Each bovine embryo, which has been treated with pronase for 90 seconds, was bisected using a glass needle and made into demi-embryos by a simple method which does not yield zona pellucida. A total of 21 fresh and 18 frozen-thawed embryos were used in the culture and transplantation experiments.

The rate of success in bisecting embryos was 69%, and the rate was higher in fresh embryos and morphologically better embryos.

When 29 demi-embryos were cultured for 4 and 24 hours, 72% and 52% of them were alive, respectively.

When morphologically alive one-hour-old demi-embryos were transferred into 10 cows (14 cases), 7 cases were pregnant. Among them, three have delivered normal calves and four are now in course of pregnancy.