

ウシ受精卵クローン技術に関する試験

生物工学部

佐藤克彦、岡崎克美 1)、飛田府宣、川野辺章夫 2)、佐田竜一、岸善明

1) 現 栃木県北家畜保健衛生所

2) 現 栃木県農業大学校

要 約

ウシ受精卵をドナー核、と畜場由来レシピエント卵子として受精卵クローン胚及び受精卵クローン牛の作出を試みた。その結果、次の成果を得た。

(1) レシピエント卵子に用いる卵巣の保存温度の違いによるクローン胚の発生率は、10 区 1.2%(1/84)、20 区 4.1%(8/193)であった。

(2) 発生培地の違いによるクローン胚の発生率は、IVD101 区 4.8%(6/126)、CR1aa 区 3.0%(2/67)であった。

(3) ドナーの違いによるクローン胚の発生率は、体内受精卵新鮮区 29.1%(25/86)、体内受精卵保存区 5.0%(1/20)、体外受精卵新鮮区 2.7%(6/222)、体外受精卵保存区 0%(0/42)で体内受精卵新鮮区が有意に高かった ($P < 0.01$)。

(4) 作出したクローン胚の受胎率は、体内受精卵由来新鮮移植区 40.0%(2/5)で、体内受精卵由来ガラス化保存移植区、体外受精卵由来新鮮移植区、体外受精卵由来ガラス化保存移植区では受胎が認められなかった。その結果 1 卵性 3 つ子を作成することができた。

目 的

核移植による受精卵クローン技術は、初期胚から複数の遺伝的に同一な個体を作る技術であり、国内ですでに約 700 頭の受精卵クローン牛が生産されている 1)。このクローン技術を畜産分野で有効に利用できれば、1 個の受精卵から遺伝的に同一な個体を複数作出することが可能となるため、効率的な育種改良や試験研究精度の向上を図ることが期待される。

ウシクローン生産技術は Prather ら 2) が 1987 年に初めて産子の生産に成功して以来、我が国においても 1990 年に最初のクローン胚由来の子牛生産が報告され 3) ているが、複数の子牛を効率的に生産するには至っていない。その原因はクローン胚の生産効率及び受胎性の低さなどである。

受精卵クローン胚の生産効率及び受胎性を

向上させ、複数の子牛を効率的に生産することを目的として次の試験を実施した。

1. と畜場で採材したレシピエント卵子に用いる卵巣の適切な保存方法の検討
2. 核移植後の適切な発生培地の検討
3. ドナー受精卵に関する検討
4. 受精卵クローン胚の移植に関する検討

この結果、1 卵性 3 つ子の受精卵クローン牛の生産に成功したので、これらの概要について報告する。

材料と方法

試験 1 卵巣保存温度の検討

1. ドナー受精卵の作出

体外受精卵の作出方法は、既報 4) に従い次のとおり。

と畜場から採取した卵巣の表層に存在する直

径 2~5mm の卵胞から注射器を用いて吸引採取し、卵子を 5% 子牛血清 (CS) を添加した修正リン酸緩衝液 (m-PBS) で数回洗浄する。

5%CS 加 TCM-199 (SIGMA) の 750 μ l ドロップ当たり 50 個の卵子を入れ 5%CO₂、38.5 の条件下で 20 時間成熟培養する。

媒精用の 0.5ml 凍結精液は融解後 5mM テオフィリンとヘパリン 4IU/ml を添加した BRACKETT and OLIPHANT の液 (BO 液) 5)10ml に浮遊させ 1800 回転/分、5 分間の遠心洗浄を 2 回繰り返し、最終精子数が 5 ~ 10 $\times 10^6$ /ml となるように BSA20mg/ml を添加した BO 液で希釈して媒精用の精子浮遊液とする。

成熟培養を終了した卵子を調整した精子浮遊液の中に導入し 6 ~ 7 時間媒精する。

媒精後 TCM-199 で洗浄し、成熟培養ドロップに戻して卵丘細胞との共培養により発生培養する。

媒精後 48 時間に卵子の透明帯周囲に付着している卵丘細胞およびシャーレ底面に付着している卵丘細胞をピペットで出来るかぎり除去し、卵丘細胞が単層に発育するようにする。

媒精日から 6 日目に発生した桑実期の受精卵をドナーに供する。

2. レシピエント卵子の作出

レシピエント卵子の作出方法は次のとおり。

と畜場から採取したホルスタイン種卵巣を 10 あるいは 20 の PBS で 24 時間保存する。

保存後、卵巣の表層に存在する直径 2~5mm の卵胞から注射器を用いて吸引採取し、卵子を 5%CS を添加した m-PBS で数回洗浄する。

IVMD101 (機能性ペプチド研究所) で 300 μ l ドロップ当たり 30 個の卵子を入れ 5%CO₂、38.5 の条件下で 20 時間成熟培養する。

成熟培養後、0.05% ヒアルロンダーゼ加 TCM-199 液中で卵丘細胞を除去し裸化する。

裸化後、第一極体を放出した卵子を選別する。

選別後、5%CS 加 TCM-199 中で第一極体付近をマイクロマニピレーターにセットしたガラス微細針で切開し、第一極体と第一極体付近の細胞質約 1/5 を透明体切開部より押し出して除核処理を行った。

3. レシピエント卵子の活性化処理

レシピエント卵子の活性化処理方法は次のとおり。

成熟培養開始 24 時間目に 5 μ M/ml Ca イオノフォア添加 0.1% ポリビニールアルコール加 PBS で 5 分間処理する。

Ca イオノフォア処理後、10 μ g/ml シクロヘキシミド添加 5%CS 加 TCM-199 で 6 時間培養した。

4. 核移植

(1) ドナー受精卵の調整

ドナー受精卵の調整方法は次のとおり。

ドナー受精卵の透明体をマイクロマニピレーターにセットしたガラス微細針で切開し、細胞塊を取り出す。

PBS(-) 中でピペッティングにより割球を単離する。

単離後、5%CS 加 TCM-199 中に移す。

(2) ドナー割球の注入 (核移植)

核移植方法は次のとおり。

マイクロマニピレーターにセットしたガラス微細管を用いドナー割球を吸引する。

吸引したドナー割球を、レシピエント卵子の切開部位から卵腔内に挿入する。このとき核移植は、レシピエント卵子の成熟培養開始 28 時間目から、10 μ g/ml シクロヘキシミド添加 5%CS 加 TCM-199 中で行った。

5. 電氣的細胞融合

電氣的細胞融合方法は次のとおり。

核移植を行ったレシピエント卵子は、Zimmermann cell fusion medium に移し平衡する。

平衡後、100 μ m のニードル電極を用いドナー割球とレシピエント卵子が一直線になるように挟み込み、50V/mm、25 μ sec の直流パルスを1回通電する。

通電後、10 μ g/ml シクロヘキシミド添加 5%CS 加 TCM-199 中に移し細胞融合を確認する。

核移植方法は家畜改良センター核移植マニュアル 6) に準じた。

6. 統計処理

試験区間における生存率の有意差は 2 検定法により実施した。危険率 5% 未満の差を有意とした。

試験2 発生培養法の検討

1. 発生培養

発生培養方法は次のとおり。

電氣的細胞融合後、融合が認められた卵子を 5%CS 加 TCM-199 中で 5%CO₂、38.5 の条件下で 12 時間培養する。

培養後 IVD101 (機能性ペプチド研究所) あるいは 5%CS 加 CR1aa で 5%CO₂、5%O₂、90%N₂、38.5 の条件下で 9 日間発生培養する。

核移植方法は試験1に準じ、レシピエント卵子に用いる卵巣の保存は 20 とした。

2. 統計処理

試験区間における生存率の有意差は 2 検定法により実施した。危険率 5% 未満の差を有意とした。

試験3 ドナー受精卵の検討

1. ドナー受精卵の作出

(1) 体外受精卵の作出

試験1のとおり。

(2) 体内受精卵の作出

体内受精卵の作出方法は、既報 7) に従い次のとおり。

黒毛和種に過剰排卵処置を施し、発情後 6 日目に非外科的に受精卵を回収する。

FSH の総量を 20AU 減量投与 (5・4・4・3・2・2) と PGF2 (クロプロステノールとして 0.75ml)、GnRH (酢酸フェルチレリン 100 μ g) 投与による発情誘起を行い、PGF2 投与 48 時間後にスタンディング発情を示したものに人工授精を行った。

実態顕微鏡下で細胞の変性を観察し正常な桑実期の割球をドナーに用いた。

2. ドナー受精卵の保存

発生培養後 7~9 日目に胚盤胞に発生した胚を石森ら 8)9)10) が報告した VSED (Vitrification Solution of Ethylene glycol DMSO: 25%エチレングリコール + 25%ジメチルスルホキシド / 4mg/ml 牛血清アルブミン(BSA)加ダルベッコ氏リン酸緩衝液 (D-PBS)) 溶液を用いガラス化保存した。

3. 核移植方法

試験1に準じ、レシピエント卵子に用いる卵巣の保存は 20 とし、発生培養液は IVD101 を用いた。

4. 統計処理

試験区間における生存率の有意差は 2 検定法により実施した。危険率 5% 未満の差を有意とした。

試験4 受精卵クローン胚の移植

場内で繋養する、産歴の異なるホルスタイン種を受胎牛に用い、発情確認日から7日後に黄体の発育状況を確認し、子宮頸管経由法により黄体側子宮角に1胚及び2胚を新鮮あるいはガラス化保存・加温後移植した。

調査1 受胎の確認と胎子の観察

発情が回帰しなかった受胎牛を、発情後60日前後に超音波診断装置(Aloka)およびコンベックス探触子(5.0MHz)を用い観察した。

クローン胎子の体長、胎動、心拍動を記録した。

調査2 受精卵クローン牛の出生調査

受精卵クローン牛の出生は、受胎牛の分娩予定日を合わせ分娩誘起を行った。分娩誘起法は、受胎牛の分娩予定日2日前にデキサメタゾン20mgを皮下投与し、分娩予定日1日前にPGF2 1mgとエストリオール20mgを筋肉内投与した。出生後、体重の測定および哺乳状況、起立状況を記録した。

結果

レシピエント卵子に用いる卵巣の保存温度10区と20区の核移植成績を比較した試験1の結果は表1に示したとおりで、区間の有意差は分割率で20区が10区より高いことが確認された。発生率には有意な差は認められなかったが10区1.2%、20区4.1%で、20区が10区に比べ高い傾向であった。

核移植後の発生培養液 IVD101 区と CR1aa 区の培養成績を比較した試験2の結果は表2に示したとおりで、区間の有意差は認められなかったが、発生率は IVD101 区 4.8%、CR1aa 区 3.0%で、

IVD101 区が CR1区に比べ高い傾向であった。

新鮮あるいはガラス化保存した体内受精卵及び体外受精卵をドナーに用いた核移植成績を比較した試験3の結果は表3に示したとおりで、区間の有意差は分割率で体内受精卵新鮮区と体内受精卵保存区が体外受精卵新鮮区と体外受精卵保存区に比べ高く、体外受精卵新鮮区は体外受精卵保存区に比べ高いことが確認された。また、発生率は体内受精卵新鮮区 29.1%、体内受精卵保存区 5.0%、体外受精卵新鮮区 2.7%、体外受精卵保存区は発生が認められず、体内受精卵新鮮区が体内受精卵保存区と体外受精卵新鮮区、体外受精卵保存区に比べ高いことが確認された。

作出したクローン胚の受胎率について比較した試験5の結果は表5に示したとおりで、区間に有意差は認められなかったが体内受精卵由来新鮮胚区が40.0%、体内受精卵由来保存胚区と体外受精卵由来新鮮胚区、体外受精卵由来保存胚区では受胎が認められなかった。受胎率は体内受精卵由来新鮮胚区が、体内受精卵由来保存胚区と体外受精卵由来新鮮胚区、体外受精卵由来保存胚区に比べ高い傾向であった。

受精卵クローン胎子の超音波診断した調査1の結果は表6に示したとおりで、胎齢60日で体長は胎子A、Bともに約6.5cmであった。また、胎動および心拍動も確認された。

受精卵クローン牛の出生状況を確認した調査2の結果は表7に示したとおりで、クローン牛A、B、Cともに生時体重は31kgであった。クローン牛は出生数時間後に起立し哺乳状況も良好であった。

表1 卵巣保存温度が発生に及ぼす影響

卵巣保存温度	注入数	融合数 (%)	分割数 (%)	発生数 (%)
10	115	84 (73.0)	33 (39.3 a)	1 (1.2)
20	243	193 (79.4)	129 (66.8 b)	8 (4.1)

異符号間に有意差

表2 発生培地が発生に及ぼす影響

発生培養液	培養数	分割数 (%)	発生率 (%)
IVD101	126	83 (65.9)	6 (4.8)
CR1aa	67	46 (68.7)	2 (3.0)

表3 ドナーの違いが発生に及ぼす影響

ドナー	注入数	融合数 (%)	分割数 (%)	発生数 (%)	
体内受精卵	新鮮	100	86 (86.0)	74 (86.0 a)	25 (29.1)
	保存	30	20 (66.7)	19 (95.0 a)	1 (5.0)
体外受精卵	新鮮	256	222 (86.0)	138 (62.2 b)	6 (2.7)
	保存	65	42 (64.6)	13 (31.0 c)	0 (0)

異符号間に有意差

表4 クローン胚移植成績

由来ドナー	胚移植区分	移植頭数	受胎数	受胎率 (%)	
体内受精卵	新鮮胚移植	1 胚	4	1	25
		2 胚	1	1	100
			5	2	40
	保存胚移植	1 胚	5	0	0
		2 胚	1	0	0
			6	0	0
体外受精卵	新鮮胚移植	1 胚	1	0	0
		2 胚	4	0	0
			5	0	0
	保存胚移植	1 胚	6	0	0
		2 胚	2	0	0
			8	0	0

表5 受精卵クローン胎子の超音波診断

クローン胎子	胎齢	体長	胎動	心拍動
a	60日	6.5cm	あり	あり
b	60日	6.5cm	あり	あり

表6 受精卵クローン牛の出生状況

クローン	受胎牛	生時体重	妊娠期間
A	ホルスタイン種	31kg	284日
B	ホルスタイン種	31kg	284日
C	ホルスタイン種	31kg	284日

同一受胎牛

考 察

試験場は平成5年度から、県内の乳用牛改良の促進を目的とし、高い遺伝的能力を持つ乳用牛の胚を酪農家に配付する事業を行っている。この事業で用いるドナー牛は、平成5～6年度と平成13～14年度に北米から輸入した牛とその娘牛であり、これらの牛を「スーパーカウ」と呼んでいる。この事業の目的を果たすためには、より多くの胚を、長期間に渡って安定的に生産することが求められ、胚移植によるドナー牛の効率的な増殖は重要な鍵を握っている。

平成13～14年度にカナダから輸入した9頭の牛はすべて未経産牛であり、できるだけ早く、より多くの後継牛を生産するためにバージンフラッシュを実施した。乳用牛の未経産牛からの採胚は、北米では商業的に実施されており、採胚1回あたり平均4～5個の正常胚を採取している機関もある⁴⁾。今回、バージンフラッシュにより、採胚1回あたり平均5.6個の正常胚が得られた。これは、採胚1回あたり3.9個の正常胚が得られたとする伊藤らの報告⁵⁾に劣らない成績であった。また、当試験場が平成6～14年度に実施した「スーパーカウ」の採胚のうち、経産牛をドナーとした成績は、採胚1回あたりの平均正常胚数は4.1個(採胚のべ頭数276頭、総正常胚数1,142個)であった(未発表)。今回、バージンフラッシュの実施にあたっては、ドナー牛の生殖器等の発育が十分であることを確認後に採胚を行ったため、経産牛と同等の採胚成績が得られたと考えられる。ただ、未経産牛の月齢が進むほど後継牛の生産が遅れることになるため、今後はどの程度の発育でバージンフラッシュを実施するのが最も効率が良いか検討する必要がある。

今回、採取された50個の正常胚を性判別したところ、24個が雄と判定された。これらの雄胚はドナー牛の後継牛生産には不要であるため、ガラス

化保存・融解後に培養し、生存性の確認(ロットチェック)に用いた。雄胚の移植が不要となったことにより、性判別を実施しなかった場合と比較して、移植に必要なレシピエント牛の数をのべ50頭からのべ26頭に減らすことが可能となった。胚移植で高い受胎率を得るためには、状態の良いレシピエント牛を用意することが不可欠であり⁶⁾、必要なレシピエント頭数を半減させたことは時間と労力の節減に大きな効果があった。一方、性判別した50個のうち、4個の胚について雌雄の判定が不能であり、判定率は92.0%となった。この判定率は既報⁷⁾と同等であった。判定不能の原因としては、サンプリングエラーあるいは細胞変性部分をPCR反应用サンプルとして用いたため等が考えられる。サンプリングエラーは、技術の習熟により減らすことが可能である。また、低ランク胚等、細胞変性部分を多く含む胚のサンプリングについては、正常細胞をあわせて採取する等、今後検討が必要である。

ガラス化保存法は、緩慢凍結法で認められる凍結・融解時における胚の細胞内の氷晶形成を抑えるため、保存後の生存性は緩慢凍結法に比較して高いとされている⁸⁾。今回、2種類のガラス化保存法により保存したバイオプシー胚の受胎率は69.2%(9/13)であった。これは、既報⁷⁾の1.8M EG+0.1M Sucまたは1.8M EG+0.1Mトレハロースを用いた緩慢凍結法(ダイレクト法)による受胎率(35.3%)のおよそ2倍であり、性判別胚に対するガラス化保存法の有効性が確認された。また、ガラス化保存法のうち、VSED法により保存したバイオプシー胚の受胎率は77.8%(7/9)であり、GL-Tip法により保存したバイオプシー胚の受胎率は50.0%(2/4)であった。バイオプシー胚をVSED法とGL-Tip法により保存・融解後に培養・移植した試験では、培養成績は両者に差はなく⁹⁾、受胎率はGL-Tip法が高かったとする報告¹⁰⁾があ

る。本試験では、GL-Tip 法により保存した4個の胚のうち1個はバイオプシー前の形態的品質がCランクと判定された胚であり、これが受胎率を低下させた可能性がある。GL-Tip 法は、VSED 法に比べ胚の保存操作が容易であり、今後の移植成績によっては野外応用が可能であると考えられる。また、今回は新鮮移植したバイオプシー胚の受胎例は得られなかった。新鮮移植した性判別胚の受胎率は50%前後の報告¹⁰⁾が多い。本試験は移植例数が少ないため、他の報告と比較することはできないが、新鮮移植は保存胚の移植と異なり、用意したレシピエント牛の状態が最良でなくても移植せざるを得ないケースもあり、受胎率の安定に影響を及ぼす危険性があると考えられた。いずれにしても、後継牛を安定的に生産するためには、性判別した胚の受胎率を高く保つことが不可欠な条件であり、今後もガラス化保存法の移植例数を増やし、受胎率を安定化させる方法について検討する必要がある。また、今回性判別胚から生産された子牛の性は判定結果とすべて一致していたが、雌と判定した胚の約10%に誤判定が生じた例¹¹⁾もあるため、慎重な判定を心がけることも重要な点である。

本試験により、バージンフラッシュは、生殖器等の発育が十分なドナー牛を用いれば、経産牛からの採胚と同等の正常胚数が得られること、ガラス化保存した性判別胚は高い受胎率が得られることが示された。以上のことから、バージンフラッシュと胚の性判別技術の活用が、優良乳用牛ドナーの迅速かつ効率的増殖に有効であると考えられた。

参考文献

- 1) Ishimori H. et al. (1993) Vitrification of bovine embryos in a mixture of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide : *Theriogenology* 40, 427-433
- 2) 佐藤克彦ら. (2003) ウシ胚のガラス化保存に関する試験 : 栃木酪試研報 126, 3-8
- 3) Tominaga K. et al. (2001) Gel-loading tip as container for vitrification of *in vitro*-produced bovine embryos : *J Reprod Dev* 47, 267-273
- 4) 下平乙夫. (2000) 最近の北米受精卵移植実施機関の取り組み状況について() : 家畜人工授精 198, 87-90
- 5) 伊藤博康ら. (1998) 未経産乳用牛の採胚(バージンフラッシュ) : 山形農研セ畜研報 45, 14
- 6) 橋谷田豊. (1996) 家畜人工授精講習会テキスト(家畜受精卵移植編) 214-231
日本家畜人工授精師協会, 東京
- 7) 飛田府宣ら. (2000) 牛胚の PCR 法による性判別試験(第3報) ダイレクト法により凍結保存したバイオプシー胚の移植試験 : 栃木酪試研報 124, 3-6
- 8) 葛西孫三郎. (1997) 受精卵の凍結保存 - 緩慢法とガラス化法 - : 家畜人工授精 183, 12-21
- 9) 大塚由佳子. (2004) ウシバイオプシー胚の超低温保存法と受胎性:VSED ガラス化法と GL-Tip 超急速ガラス化法の比較 : 畜産技術 591, 24-27
- 10) Tominaga K. (2004) Cryopreservation and sexing of *in vivo*- and *in vitro*-produced bovine embryos for their practical use : *J Reprod Dev.* 50, 29-38
- 11) 藤田達男. (2003) 牛性判別胚のダイレクト法とガラス化保存法の比較ならびに性判別精度 : 畜産技術 572, 26-29

Efficient production of excellent donor cows using the technique of virgin flash and sexing of embryos

Summary

The objective of this experiment is production of the dairy cows that have inherited excellent production capacity of lactation. We executed the production of the calves by the technique of virgin flash (collection of embryos from nulliparous heifers) and transfer of sexed embryos.

- 1 50 embryos were obtained by executing the virgin flash of nine times.
- 2 By transferring sexed embryos, the number of recipient cows for which 50 was necessary was able to be decreased to 26.
- 3 After the sexed embryos had been vitrified, the embryos were transferred to the recipient cows and the pregnancy rate of 69.2% (9/13) was obtained as a result.
- 4 The sexes of the calves derived from seven embryos judged female were all females.

In conclusion, the technique of virgin flash and the technology of sexing embryos were effective to the further production of the dairy cows having inherited excellent production capacity.