ウシ体外受精由来胚盤胞の切断 2 分離におけるサイトカラシン B, Ca^{2+} 不含 PBS またはショ糖を用いた切断前処理液および切断溶液の効果

橋谷田豊^{1,2}・金山佳奈子²・浅田正嗣^{1,a}・作田直之¹・小西一之^{1,a}・斉藤則夫²

¹ 家畜改良センター奥羽牧場, 青森県七戸町 039-2567

² 家畜改良センター本部, 福島県西郷村 961-8061

(2006. 7. 7 受付, 2006. 10. 2 受理)

要 約 切断の前処理溶液および切断溶液がウシ体外受精由来胚盤胞の切断 2 分離の成否および分離胚の生存性に及ぼす効果について検討した。サイトカラシン B (CB) 添加溶液で切断前に処理し, 同液 (CB-CB 区) または無添加溶液中で切断 (CB-PBS 区), Ca^{2+} 不含 PBS で前処理後に切断 (PBS (－) 区) または前処理せずにショ糖添加溶液中で切断 (SUC 区) を行った。切断はマイクロマニピュレーターに装着した金属刃によって胚に対し垂直に圧断し, 切断前の胚の収縮と切断時の透明帯の破損状況, 切断直後の分離胚の形態および 24 時間培養後の生存性を観察した。ペアで生存した分離胚の一部は, 細胞数およびペア間の細胞数の差を調べた。CB-PBS 区および SUC 区では胚の収縮により透明帯の破損が少なく, 形態の良好な分離胚が多かった。CB-CB 区および CB-PBS 区は細胞数が多く, CB は切断による胚への損傷を抑える効果があると示唆された。一方, PBS (－) 区は生存率が低く, 細胞数も少なかったことから, この時期の胚の切断 2 分離に対し効果的ではないと考えられた。また, ペア間の細胞数の差は各区間で差がなかった。

日本畜産学会報 78 (1), 29-36, 2007

現在, 効率的な肉用種雄牛生産を目的に一卵性双子を用いたクローン検定が実施されている (Hashiyada と Goto 2000 ; 小西ら 2005)。また, これらクローン牛は発育性および産肉性 (口田ら 2003 ; 山田ら 2004) や繁殖性 (小西ら 1997 ; Machado ら 2006) において相似性が報告され, 少頭数で精度の高い試験が行える (広岡 1991)。フィールドにおけるウシ一卵性双子の作出には, 簡易な機材と平易で安定的な技術および生産効率が明らかなこと (Williams ら 1984 ; Baker 1985 ; Seike ら 1989 ; Gray ら 1991 ; Kippax ら 1991 ; 高倉ら 1992 ; 小西ら 2005) などが求められるため, 技術構築が進み, 生産実績が多い胚の切断 2 分離による方法が一般的である。一方, 近年普及してきた超音波誘導による生体からの卵子吸引-体外受精技術は, 採胚が困難な供胚牛からも短期間で集約的な胚生産を行えることから (今井と田川 2006), 一卵性双子生産に活用することでクローン検定をさらに効率化できる可能性がある。

一卵性双子を高率に生産するには, 切断時の胚細胞の損傷や減少を極力抑え, 2 胚とも発育性, 受胎性および胎子への発生能に偏りの少ない一対の分離胚を作出することが重要であると考えられる。切断による胚細胞の損

失は, マウス胚盤胞 (Wang ら 1990) およびサル胚盤胞 (Mitalipov ら 2002) で分離胚の細胞数が intact 胚の約半数であり, 細胞の減少はほとんどないとする報告がある。一方, ブタ早期胚盤胞および胚盤胞で 26~33% (Tao ら 1995), ウシ 7 日目胚で 23% (清家 1992) の細胞が損失したとする報告もある。胚の切断 2 分離の成否に影響を及ぼす要因として, 切断用のマイクロツールおよび切断溶液が考えられる。マイクロツールは大別してガラス針 (Nagashima ら 1984 ; Willadsen と Godke 1984 ; Baker 1985 ; Gray ら 1991 ; Bredbacka ら 1992 ; 清家 1992) とガラス刃または金属刃 (Ozil 1983 ; Williams ら 1984 ; 松本ら 1987 ; Warfield ら 1987 ; Shelton と Szell 1988 ; Herr と Reed 1991 ; Lucas-Hahn と Niemann 1991 ; Shelton 1992 ; Saito と Niemann 1993 ; Tao ら 1995 ; Mitalipov ら 2002 ; Hashiyada ら 2005 ; Ushijima 2005) があるが, 針または刃で切断した分離胚移植後の双子受胎率に差はないとする報告がある (Kippax ら 1991)。一方, 切断溶液については, 報告の多くが 5~20% の血清を添加した DPBS を用いている (Williams ら 1984 ; Baker 1985 ; 松本ら 1987 ; Shelton と Szell 1988 ; Gray ら 1991 ; Suzuki ら 1991 ; 高倉ら 1992 ; Tao ら 1995 ; Hashiyada ら 2005)。ヒツジ胚

連絡者 : 橋谷田豊 (fax : 0176-62-3283, e-mail : y0hashiy@nlbc.go.jp)

現所属 : ^a 家畜改良センター鳥取牧場, 鳥取県琴浦町 689-2511

(Shelton 1992) およびウシ胚 (Herr と Reed 1991 ; Saito と Niemann 1993) ではショ糖添加溶液, マウス胚 (Nagashima ら 1984) およびウシ胚 (Bredbacka ら 1992) では Ca^{2+} 不含 PBS 溶液による前処理と切断 (Kippax ら 1991) の報告もみられるが, これらは *in vivo* 由来胚を材料としている. ウシ *in vitro* 由来胚は, *in vivo* 由来に比べてコンパクションの状態が長い, プラストレーションの開始が早い, 細胞数が少ないなどの違いが示されている (Soom ら 1997). ウシ *in vitro* 由来胚の切断分離は, 血清添加 Hams F-10 (Loskutoff ら 1993), BMOC-3 (Tomimaga ら 1996) および DPBS 溶液 (Rho ら 1998) で行われた報告があるが, 胚への物理的な損傷を軽減させる目的で前処理溶液および切断溶液を検討した報告はみられない.

そこで, 本実験では細胞のアクチンフィラメントに働き, 細胞骨格をゆるめる作用 (大島ら 1990) から, 核移植における卵子の除核 (入谷 1992 ; Goto ら 1999) や初期胚の割球分離 (Matsumoto ら 1989 ; Rexroad と Powell 1997 ; Mitalipov ら 2002) に用いられているサイトカラシン B 添加溶液による曝露処理を行った後に胚を同液中または DPBS 溶液中で切断する方法, 細胞外 Ca^{2+} に依存する細胞間接着および細胞結合 (Alberts ら 2004) を脱 Ca^{2+} 状態により阻害する Ca^{2+} 不含 PBS で前処理を行った後 DPBS 中で切断する方法および浸透圧差により胚を収縮させるショ糖添加溶液 (内海 1981) 中で切断する方法が, *in vitro* 由来胚の切断 2 分離成績および培養後の分離胚発育成績に及ぼす影響について検討を行った.

材料および方法

1. 供試胚

食肉処理場で採取した卵巣を 0.1% (v/v) カナマイシン (硫酸カナマイシン注射液 100 明治 ; 明治製菓, 東京) を添加した約 25°C の生理食塩水中で 2~3 時間保存した. 卵巣の表面上に観察された 2~6 mm の卵胞から非働化処理した 3% 子牛血清 (CS ; Gibco, Grand Island, NY, USA) 添加 DPBS (Gibco) を用いて卵胞液とともに吸引採取した卵子を 5% CS 添加 25 mM Hepes buffered tissue culture medium 199 with Earle's Salts (TCM-199 ; Gibco) 中で 20 時間成熟培養を行った. 媒精は, BO 液中の精子濃度を約 6×10^6 /mL に調整して 5 時間 (Imai ら 2002) 行った. 卵子の成熟および媒精は 2% CO_2 , 98% 空気, 38.5°C の加湿下で行った. 発生培養は 5% CS 添加 CR1aa (Rosenkrans と First 1994) を用いて 5% CO_2 , 95% 空気, 38.5°C の加湿下で行った. 媒精後 7 日目 (媒精日 = 0 日) に発生した胚を形態学的に観察し, Lindnor と Wright (1983) の分類基準により, 発育ステージが胚盤胞または拡張胚盤胞で品質が Good ランク以上のものを供試した.

2. 試験区分

供試胚を 20% CS 添加 DPBS で洗浄後, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ サイトカラシン B (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA) を含む 20% CS 添加 DPBS 溶液 500 μL 中に 15 分間曝して前処理した後, 直ちに同液中で切断 (CB-CB 区, $n=25$) または 20% CS 添加 DPBS 中で切断 2 分離した (CB-PBS 区, $n=42$). 同様に前処理として Ca^{2+} および Mg^{2+} を含まない PBS (Dulbecco's Formula, Modified without Magnesium and Calcium ; 宝酒造(株), 滋賀) 中で胚を 15 分間曝した後, 20% CS 添加 DPBS 中で切断した (以下 PBS (一) 区, $n=39$). 前処理なく 0.2 M (w/v) ショ糖 (Pfanstiehl Laboratories, Waukegan, IL, USA) および 3% CS 添加 DPBS 中で切断した (以下 SUC 区, $n=52$).

3. 胚の切断 2 分離

胚の切断 2 分離は, 室温下で倒立顕微鏡 (IMT-2 ; オリジナル(株), 東京) と 3 次元油圧式ジョイスティックマイクロマニピュレーター (ONO-121 ; ナリシゲ(株), 東京) 1 台を用いて胚を吸引保定することなく (松本ら 1987 ; Saito と Niemann 1993), 鏡検下で 1 名の術者がジョイスティックを操作して実施した. マイクロマニピュレーターに装着した金属刃 (マイクロフェザーブレード, K-715 ; フェザー安全剃刀, 大阪) は, 刃の先端が 9 時の方向に向き, かつ刃が切断に用いた 90 mm のプラスチック製ディッシュの底面に対して垂直になるように調整した. ディッシュには, 70 μL の各切断溶液のドロップをパラフィンオイルでおおうことなく 4~5 個作成した. 切断溶液には胚のディッシュへの接着を防ぐこと, またマイクロマニピュレーションによる胚のハンドリングを容易にする目的で CS を添加した (Herr と Reed 1991). SUC 区では高濃度の血清下で胚が浮上することを防ぐため血清濃度を 3% とした. 供試胚は切断用ドロップに入れる前に各切断溶液で数回洗浄し, 1 ドロップに 1 個ずつ入れた. 金属刃により内部細胞塊が 9 時の方向に向くように胚を位置させた後, 刃を胚の正中線上に移動させた. 切断は透明帯上部を刃で圧迫してディッシュ底面に圧着させるようにして胚を保定しながら, 刃を徐々に押し下げてゆき, 内部細胞塊と栄養膜細胞が各々等分になるように垂直に圧断した. 胚の一部が切断されずに残った場合は, 胚の間に位置する刃をディッシュ底面にあてた状態のまま 9 時または 3 時の水平方向にゆっくりとわずかに動かして切断を完了した. 透明帯が完全に半切されず, 透明帯内に 2 分離胚が存在する場合は, 培養中に分離胚同士が再度接着, 融合することがあるため (長嶋ら 1984 ; Baker 1985), 透明帯を開閉して分離胚を透明帯の外に出した. 各区とも 4 個前後の胚を 1 グループとして処理および切断した. 胚の切断溶液への投入, 切断および分離胚を培養液に投入するまでの時間は 1 グループにつき 10 分以内であった.

4. 分離胚の培養

透明帯内への分離胚の帰納の有無は、その後の発育性および受胎性に影響を及ぼさないことが報告されていることから (Warfield ら 1987 ; Shelton と Szell 1988 ; Seike ら 1989 ; Kippax ら 1991 ; 清家 1992 ; Tao ら 1995), 各分離胚は裸化状態で培養した。また、分離胚の体外培養は、子宮上皮 (Voelkel ら 1985), 卵管上皮 (King ら 1992), 顆粒膜または Vero (小林 ら 1992) などの細胞との共培養により発育性が改善されることから, Eyestone と First (1989) の方法により調整した卵管上皮細胞との共培養で行った。卵管上皮細胞は非働化处理した 20% ウシ胎子血清 (FCS ; Sebak, Aidenbach, Germany) 添加 TCM 199 の 500 μ L とともに分離胚の培養 3 日前にディッシュ (Multidish 4-Wells ; Nunc, Roskilde, Denmark) のウエル中に投入し, ウエル底面に単層の細胞シートを形成させた。培養前日に培養液の半量を交換し, 1 ウエルに分離胚 1 組を入れ, 5% CO₂, 95% 空気, 38.5°C の加湿下で 24 時間の培養を行った。

5. 調査項目および統計処理

切断直前の胚の形態を観察し, 囲卵腔が確認されたものを収縮した胚 (収縮胚率) として記録した。切断時に金属刃が透明帯を圧迫してゆく過程で切断部以外の透明帯に亀裂が生じ, 透明帯が破裂する透明帯破裂の有無を透明帯破損率として記録した。形態学的観察により切断直後にペアの分離胚の各大きさを相対比で記録し, 各分離胚がほぼ 5 : 5 の大きさのものを均等分離胚とした。また, intact 胚の形態学的観察による品質分類基準を参考に (金川 1984), 切断直後の分離胚の品質について変性または突出した細胞が 10% 以内を A ランク, 10~20% 程度を B ランク, 20~50% 程度を C ランクおよび 50% 以下を D ランクとして分類した。これら 2 つの基準によ

り切断直後のペア分離胚の形態をランク付けした (例 ; 5 : 5 の大きさでともに A ランクのペア胚を A5A5 ランクとした)。切断から 24 時間培養後, 形態の観察により胞胚腔が再形成された分離胚を生存胚とした。A5A5 ランクのうちペアの双方とも生存した分離胚の一部を 10 m mol/L (w/v) の Hoechst33342 (Calbiochem, San Diego, CA, USA) 添加 DPBS 溶液で蛍光染色し, 細胞数を数えた。

統計処理は収縮胚率, 透明帯破損率, ペア分離胚のランク別出現率, 培養後の分離胚生存率およびペア胚生存率の比較に Fisher の直接確率法を用い, 細胞数およびペア胚間における細胞数の差の比較には Student-*t* 検定を用いた。

結 果

表 1 には切断・2 分離の際に観察された各試験区の胚収縮率, 透明帯破損率, 培養後の分離胚生存率およびペア分離胚生存率を示した。胚の収縮は, CB-PBS 区および SUC 区で各々 40.5% および 90.4% が観察され, CB-CB 区および PBS (−) 区との間に各々有意差が認められた ($P < 0.01$)。透明帯破損率は, CB-CB 区が 36.0% であり, ほかの区に比べて有意に高かった ($P < 0.01$ および $P < 0.05$)。分離胚生存率は, 全体で 82.1~96.0% であり, PBS (−) 区がほかのすべての区に対して有意に低かった ($P < 0.05$)。ペア生存率は 76.9~92.4% であり, PBS (−) 区が CB-PBS 区に比べて低い傾向が窺えた ($P < 0.10$)。

切断直後の形態観察により品質および相対的な大きさで分類したペア胚の供試胚数に対するランク別出現率を表 2 に示した。均等分離胚は, 各区で 87.2~95.2% と差はなく, 全体のほぼ 90% が均等に分離された。しかし,

Table 1 Effects of the media for pretreatment and bisection on the preparation and viability of the bovine demi embryos derived from *in vitro*

Test group		No. of embryos	Ratio of the embryos shrank (%)	(n)	Ratio of embryos zona pellucida exploded (%)	(n)	Ratio of survived demi embryos (%) ⁵	(n/n) ⁶	Ratio of survived demi embryos in pair (%) ⁵	(n)
Pretreatment media	Bisection media									
CB ¹	CB ¹	25	4.0 ^a	(1)	36.0 ^a	(9)	96.0 ^a	(48/ 50)	92.0	(23)
CB ¹	DPBS ²	42	40.5 ^b	(17)	4.8 ^b	(2)	95.2 ^a	(80/ 84)	92.4	(39)
DPBS (−) ³	DPBS ²	39	7.7 ^a	(3)	12.8 ^c	(5)	82.1 ^c	(64/ 78)	76.9	(30)
—	SUC ⁴	52	90.4 ^b	(47)	3.8 ^b	(2)	92.3 ^a	(96/104)	90.4	(47)

¹ CB : 5 μ g/mL cytochalacin B + DPBS + 20% calf serum.

² DPBS : DPBS + 20% calf serum.

³ DPBS (−) : DPBS without magnesium and calcium.

⁴ SUC : 0.2 M sucrose + DPBS + 3% calf serum.

⁵ After 24 hours of culture from bisection.

⁶ (Survived demi embryos/Cultured demi embryos)

Values with different superscripts (a-b) and (a-c) within each column differ significantly ($P < 0.01$) and ($P < 0.05$), respectively.

A5A5 ランクのペアは CB-CB 区が 56.0%, PBS (－) 区が 59.0% であり, 両区とも SUC 区の 86.5% と比較して有意に低かった ($P<0.01$). そのほかの均等分離胚は A5B5, B5B5, C5C5 ランクであったが, 各区間の出現率に差はなかった. また, 不均等に切断されたペアは A6A4 および B6B4 ランクであったが, 各区間の出現率に差はなかった.

各区の A5A5 ランクの出現率を透明帯の破損の有無別に表 3 に示した. 透明帯が破損した胚の A5A5 ランクの出現率は, 各区で 0~50.0% であった. 一方, 透明帯が破損せずに A5A5 ランクであったものは, 全体で 61.8~88.0% であり, PBS (－) 区が SUC 区に比べて有意に低

かった ($P<0.01$). 透明帯が破損したものとしないものの全体の A5A5 ランクの出現率は, SUC 区が 86.5% と最も高く, 56.0% の CB-CB 区および 59.0% の PBS (－) 区との間に有意差が認められた ($P<0.01$).

A5A5 ランクのペア生存胚について培養後の 1 分離胚あたりの平均細胞数および細胞数の多いものから少ないものを減じて算出したペア胚間の細胞数の差を切断前の発育ステージ別に表 4 に示した. 胚盤胞から作出した分離胚の平均細胞数 (mean±SD) は, PBS (－) 区が 55.1±13.4 個で CB-CB 区の 68.4±23.4 個および CB-PBS 区の 62.9±12.9 個よりも少ない傾向が窺えた ($P<0.10$). 拡張胚盤胞では, PBS (－) 区が 56.9±14.6 個で CB-CB

Table 2 Effects of the media for pretreatment and bisection on the ratio (%) of the grade of bovine demi embryos in a pair derived from *in vitro*

Test group		No. of embryos	Grade ⁵ of demi embryos bisected an equal (5 : 5) portion								Grade ⁵ of bisected unequal portion			
Pretreatment media	Bisection media		A5A5 (n)	A5B5 (n)	B5B5 (n)	C5C5 (n)	Total (n)				A6A4 (n)	B6B4 (n)	Total (n)	
CB ¹	CB ¹	25	56.0 ^a (14)	12.0 (3)	16.0 (4)	4.0 (1)	88.0 (22)				12.0 (3)	0 (0)	12.0 (3)	
CB ¹	DPBS ²	42	73.8 (31)	0 (0)	21.4 (9)	0 (0)	95.2 (40)				4.8 (2)	0 (0)	4.8 (2)	
DPBS (－) ³	DPBS ²	39	59.0 ^a (23)	2.6 (1)	25.6 ^a (10)	0 (0)	87.2 (34)				12.8 (5)	0 (0)	12.8 (5)	
—	SUC ⁴	52	86.5 ^b (45)	3.8 (2)	0 ^b (0)	0 (0)	90.4 (47)				7.7 (4)	1.9 (1)	9.6 (5)	

¹ CB : 5μg/mL cytochalacin B+DPBS+20% calf serum.

² DPBS : DPBS+20% calf serum.

³ DPBS (－) : DPBS without magnesium and calcium.

⁴ SUC : 0.2 M sucrose+DPBS+3% calf serum.

⁵ The grades of a pair of demi embryos were evaluated based on the relative ratio (5 : 5~9 : 1) in volume and quality (A~D) just after bisection.

Values with different superscripts (a-b) within each column differ significantly ($P<0.01$).

Table 3 Effects of the media for pretreatment and bisection on bovine demi embryos derived from *in vitro* splitted by in an equal portion and good quality (A5A5 grade) with or without zona pellucida explosion

Test group		No. of embryos	Ratio of the demi embryos splitted by in an equal portion and good quality (A5A5 grade)					
Pretreatment media	Bisection media		With zona pellucida explosion (%)	(n/n) ⁵	Without zona pellucida explosion (%)	(n/n) ⁶	Total (%)	(n/n)
CB ¹	CB ¹	25	11.1	(1/9)	81.3	(13/16)	56.0 ^a	(14/25)
CB ¹	DPBS ²	42	0	(0/2)	77.5	(31/40)	73.8	(31/42)
DPBS (－) ³	DPBS ²	39	40.0	(2/5)	61.8 ^a	(21/34)	59.0 ^a	(23/39)
—	SUC ⁴	52	50.0	(1/2)	88.0 ^b	(44/50)	86.5 ^b	(45/52)

¹ CB : 5μg/mL cytochalacin B+DPBS+20% calf serum.

² DPBS : DPBS+20% calf serum.

³ DPBS (－) : DPBS without magnesium and calcium.

⁴ SUC : 0.2 M sucrose+DPBS+3% calf serum.

⁵ (No. of the pairs of demi embryos splitted equal portion and good quality/No. of the embryos zona pellucida exploded by splitting)

⁶ (No. of the pairs of demi embryos splitted equal portion and good quality/No. of the embryo zona pellucida did not explode by splitting)

Values with different superscripts (a-b) within each column differ significantly ($P<0.01$).

Table 4 Effects of the media for pretreatment and bisection on the cell number of bisected bovine demi embryos derived from *in vitro* after 24 hours of culture from bisection

Development stage of embryos before bisection	Grade ¹ of demi embryos in a pair	Test Group		No. of demi embryos ²	Cell number of demi embryos after culture (mean±SD)	No. of a pair of demi embryos ²	Difference of cell number in a pair ³ (mean±SD)
		Pretreatment media	Bisection media				
Blastocyst	A5A5	CB ⁴	CB ⁴	8	68.4±23.4	4	12.3± 9.5
		CB ⁴	DPBS ⁵	20	62.9±12.9	10	15.6±15.2
		PBS (－) ⁶	DPBS ⁵	22	55.1±13.4	11	13.3± 9.0
		—	SUC ⁷	40	55.6±22.9	20	13.1±11.1
Expanded blastocyst	A5A5	CB ⁴	CB ⁴	18	79.9±26.8 ^a	9	22.2±19.9
		CB ⁴	DPBS ⁵	16	72.4±19.0 ^c	8	15.8± 4.8
		PBS (－) ⁶	DPBS ⁵	14	56.9±14.6 ^{bd}	7	15.9±10.1
		—	SUC ⁷	34	67.9±21.7	17	21.1±14.8

¹A relative ratio in volume, and quality in a pair of demi embryos, by morphological observation just after bisection. A5A5 ; demi embryos in a pair that showed an equal (5 : 5) portion, and good quality (grade A) with less than 10% of degenerating part.

²Demi embryos for a count of cell number were extracted in a pair from pairs of survived demi embryos at random.

³A numerical difference of cell number between larger number and smaller number in a pair of demi embryos.

⁴CB : 5μg/mL cytochalasin B+DPBS+20% calf serum.

⁵DPBS : DPBS+20% calf serum.

⁶DPBS (－) : DPBS without magnesium and calcium.

⁷SUC : 0.2 M sucrose+DPBS+3% calf serum.

Values with different superscripts (a-b) and (c-d) within each column differ significantly ($P<0.01$) and ($P<0.05$), respectively.

区の 79.9±26.8 個および CB-PBS 区の 72.4±19.0 個と比較して有意に少なく (各 $P<0.01$ および $P<0.05$), SUC 区の 67.9±21.7 個よりも少ない傾向が窺えた ($P<0.10$). また, CB-CB 区は SUC 区よりも多い傾向にあった ($P<0.10$). 一方, 各試験区におけるペア生存胚における分離胚間の細胞数の差 (mean±SD) は, 胚盤胞では 12.3±9.5~15.6±15.2 個, 拡張胚盤胞では 15.8±4.8~22.2±19.9 個であり, 双方の発育ステージ内の試験区間に有意差は認められなかった。

考 察

前処理および切断ともサイトカラシン B 添加溶液で行った CB-CB 区は, 切断時に観察された透明帯破損率がほかの区と比較して高く ($P<0.05$, $P<0.01$), また A5A5 ランクの出現率も全体のなかで低い傾向にあったことから, 分離胚の作出効率は低いように思われた。しかし, 培養後の分離胚生存率およびペア胚生存率はほかの区と同程度であり, 逆に分離胚の細胞数は全体的に多い傾向にあった。とくに拡張胚盤胞を切断した場合, PBS (－) 区との比較では 40% ほど細胞数が多かった ($P<0.01$)。この原因は, サイトカラシン B の作用により細胞の骨格構造の規則性が阻害され, 柔軟性が高くなった胚では鋭利な切断が困難になったため, 刃の圧迫により透明帯内の内圧が上昇した結果, 透明帯の破裂が増加した

ものと考えられた。一方, 胚細胞に対しては切断時の細胞の損傷や離脱などによる細胞数の減少が抑えられたことから, 培養後の細胞数が多く確保されたのではないかと推察された。また, この区で A5A5 ランクのパアの出現率が低かった原因については, 切断直後の形態観察をサイトカラシン B の作用により細胞骨格が不規則な状態で行ったことから, 正常な形態を評価することができなかったことによるものと思われた。

本実験では, 透明帯の破損が比較的多かった CB-CB 区と PBS (－) 区で均等分離胚および A5A5 ランクがともに低く, 逆に透明帯の破損が少なかった CB-PBS 区と SUC 区で均等分離胚と A5A5 ランクがともに高い傾向がみられた。このことから, 胚を吸引保定せずに垂直圧断する今回の切断方法では, 透明帯が破損した場合, 胚を均等分離するために必要な適正な胚の位置が刃から外れてしまうため, 切断 2 分離の成功率は低下するものと思われた。In vitro 由来のマウス胚は, 桑実期以降でタンパク質分解酵素に対する透明帯の抵抗性 (Zona hardening) が強く, 透明帯の硬化が示されている (Demeestreら 1997)。また, ヒト胚においても長時間の in vitro 培養による透明帯の硬化が移植後の受胎性低下の原因とされ, ドリル, レーザーや酵素処理によるアシストハッチングの有効性が示唆されている (De Vos と Van Steirteghem 2000)。我々が過去に行った CS 添加 DPBS 中での切断 2

分離においても、本実験で観察したような刃の圧迫による透明帯の破損は、*in vivo* 由来（未発表データ，20% CS 添加 DPBS，1.3%，1/72 個；1%，CS 添加 DPBS，5.7%，2/35 個）に比べて *in vitro* 由来（未発表データ，20% CS 添加 DPBS，18.3%，42/229 個）において多く、*in vitro* と *in vivo* 由来で透明帯の性質が異なる可能性が示唆されていた。また、その際に透明帯の比較的強固な *in vivo* 由来胚で報告されているように（長嶋ら 1984；松本ら 1987），透明帯の裂け目から胚細胞が噴出および離散して細胞を損失する場合もあった。このような現象は、*in vitro* 由来胚は透明帯の硬化に加え、細胞間結合が弱く（Iwasaki ら 1990），切断による損傷を受けやすい（Rho ら 1998）ことなどが影響していると考えられた。Nagashima ら（1984，1989）および Ushijima（2005）は、プロナーゼへの曝露により透明帯を軟化させることで、切断中の胚に加わる内圧を抑制できることを報告している。透明帯軟化処理を行った胚をサイトカラシン B 添加溶液で切断することにより、透明帯の硬い胚や *in vitro* 由来胚の損傷がさらに低減できる可能性が考えられた。

SUC 区および CB-PBS 区は透明帯破損率が低かった。ショ糖は、浸透圧差により細胞内自由水を脱水する細胞外凍害防止剤として広く利用され、脱水によりショ糖溶液中の胚は原形質膜が収縮する（内海 1981）。一方、CB-PBS 区でも切断時に胚の収縮が観察されたものが 40% 程度あった。本実験のなかでは明らかではないが、胚がサイトカラシン B 添加溶液から無添加溶液に移動した際の浸透圧差で胚が収縮したのではないかと考えられた。切断 2 分離または性判別を目的に行う胚細胞のバイオプシーへの 0.2~0.3 M ショ糖溶液の利用は、脱水による困卵腔の拡大や刃の圧迫に対する細胞の耐性が向上するため、切断に対して有効であるとされている（Herr と Reed 1991；Saito と Niemann 1993）。SUC 区および CB-PBS 区では、胚の収縮により生じた困卵腔の存在や細胞間隙の縮小による細胞間接着性の亢進などが切断時の透明帯の破損を抑制した可能性が推察された。SUC 区は、A5A5 ランクが全体のなかで最も高く、透明帯の硬い桑実期のマウス胚を軟化処理および脱コンパクション処理後にガラスニードルで切断し、約 80% の胚が損傷なく 2 分離できたとする Nagashima ら（1984）の報告と同程度の成功率であった。しかし、分離胚の培養成績の比較では SUC 区は CB-CB および CB-PBS 区と差はなく、細胞数の比較においてもほかの区と差はなかった。0.1 M ショ糖溶液を用いたヒツジ胚の切断 2 分離では、無添加と比べて生存性に差がなかったとする報告もあることから（Shelton 1992），ショ糖添加溶液については今回の実験のなかでとくに優れた切断溶液であるとは考えられなかった。

Kippax ら（1991）は、*in vivo* 由来胚盤胞の切断 2 分離に Ca^{2+} 不含の PBS を用いたが、その効果については明

らかにしていない。一方、桑実胚までの早い発育段階の胚への前処理は細胞間結合を解離し、切断時の刃による物理的な損傷を低減させることが示されている（長嶋ら 1984；Bredbacka ら 1992）。しかし、本実験では PBS（-）区の分離胚の培養成績および細胞数はほかの区と比較して低かった。これは、この区の A5A5 ランクの出現率が低かったことから、不均等な分離や切断時の細胞の損傷、離脱による影響と考えられた。胚盤胞および拡張胚盤胞に対する脱 Ca^{2+} の前処理は、細胞間結合様式が桑実胚と異なるため（鈴木ら 1984），効果がなかったと推察されるが、明らかな原因は不明である。

A5A5 ランクにおけるペア間の細胞数の差は試験区間で差がなかったことから、細胞数からみた培養後のペア間の相同性は、切断の前処理および切断溶液よりも切断 2 分離の成否に直接影響を受けることが示唆された。

以上の結果から、*in vitro* 由来胚盤胞の切断において、切断時に生じる透明帯の破損は、均等な大きさで質の高い分離胚の作出に悪影響を及ぼすが、胚を収縮させることで透明帯の破損および胚への損傷を抑制できることが示された。また、前処理や切断にサイトカラシン B 添加溶液を用いた場合、分離胚の細胞数は多くなる傾向がみられ、切断時の細胞の損失を抑える効果があると示唆された。一方、 Ca^{2+} を含まない PBS 溶液中の前処理は、切断 2 分離の成功率および分離胚の生存性が低く、細胞数も少なかったことから、この時期の胚への利用は効果的ではないと考えられた。

謝 辞

本論文を御校閲賜った独立行政法人家畜改良センター本部の今井 敬博士に深謝いたします。

文 献

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2004. 細胞の分子生物学. 第 4 版. (中村桂子, 松原謙一 監訳). pp. 1065-1126. ニュートンプレス, 東京.
- Baker RD. 1985. Commercial splitting of bovine embryos. *Theriogenology* **23**, 3-12.
- Bredbacka P, Huhtinen M, Aalto J, Rainio V. 1992. Viability of bovine demi- and quarter-embryos after transfer. *Theriogenology* **38**, 107-113.
- Demeestre I, Barlow P, Leroy F. 1997. Hardening of zona pellucida of mouse. *Women's Medicine* **42**, 219-222.
- De Vos A, Van Steirteghem A. 2000. Zona hardening, zona drilling and assisted hatching : new achievements in assisted reproduction. *Cells Tissues Organs* **166**, 220-227.
- Eyestone WH, First NL. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *Journal of Reproduction and Fertility* **85**, 715-720.
- Goto Y, Kaneyama K, Kobayashi S, Imai K, Shin-Noh M, Tsujino T, Nakano T, Matstda S, Nakane S, Kojima T. 1999. Birth of cloned calves derived from cultured oviductal epithelial cells of a dairy cow. *Animal Science Journal* **70**, 243-245.

- Gray KR, Bondioli KR, Betts CL. 1991. The commercial application of embryo splitting in beef cattle. *Theriogenology* **35**, 37-44.
- Hashiyada Y, Goto Y. 2000. The outlook of a clone test for beef cattle and technology for stable clone production, and their issues. In : *Livestock Technology*. Vol. 3, pp. 49-53. Japan livestock technology association, Tokyo.
- Hashiyada Y, Okada M, Imai K. 2005. Transition of the pregnancy rate of bisected bovine embryos after co-transfer with trophoblastic vesicles prepared from *in vivo*-cultured *in vitro*-fertilized embryos. *Journal of Reproduction and Development* **51**, 749-756.
- Herr CM, Reed KC. 1991. Micromanipulation of bovine embryos for sex determination. *Theriogenology* **35**, 45-54.
- 広岡博之. 1991. クローン牛を用いた実験計画の評価. 日本畜産学会報 **62**, 1104-1106.
- Imai K, Kobayashi S, Kaneyama K, Kojima T. 2002. Effects of Butyrolactone-1 on GVBD in bovine oocytes and subsequent maturation, fertilization and development *in vitro*. *Journal of Reproduction and Development* **48**, 249-255.
- 今井 敬, 田川真人. 2006. OPU-IVF によるウシ胚の作出, その効率と汎用性. 日本胚移植学雑誌 **28**, 29-35.
- 入谷 明. 1992. 新繁殖学辞典. 第1版. (家畜繁殖学会 監修). p. 153. 文永堂出版, 東京.
- Iwasaki S, Yoshida N, Ushijima H, Watanabe S, Nakahara T. 1990. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Reproduction and Fertility* **90**, 279-284.
- 金川弘司. 1984. 牛の受精卵移植. pp. 62-65. 近代出版, 東京.
- King WA, Picard L, Bousquet D, Goff AK. 1992. Sex-dependent loss of bisected bovine morulae after culture and freezing. *Journal of Reproduction and Fertility* **96**, 453-459.
- Kippax IS, Christie WB, Rowan TG. 1991. Effects of method of splitting, stage of development and presence or absence of zona pellucida on foetal survival in commercial bovine embryo transfer of bisected embryos. *Theriogenology* **35**, 25-35.
- 口田圭吾, 小笠原匡教, 日高 智, 酒井稔史, 南橋 昭, 山本裕介. 2003. 受精卵クローン牛枝肉横断面の画像解析による類似性の評価. 日本畜産学会報 **74**, 1-7.
- 小西一之, 前田正志, 橋谷田豊, 内山美智子, 堂地 修, 高倉宏輔. 1997. 黒毛和種一卵性双子における過剰排卵処理成績の相似性. 日本畜産学会報 **68**, 185-188.
- 小西一之, 橋谷田豊, 浅田正嗣, 岡田真人, 斎藤邦彦, 熊谷周一郎. 2005. 肉用牛における一卵性双子の生産. 日本胚移植学雑誌 **27**, 108-117.
- 小林修一, 前田淳一, 笹木教隆. 1992. ウシ切断 2 分離胚と卵丘細胞との共培養の効果. 繁殖技術研究会誌 **14**, 171-176.
- Lindnor GM, Wright RW. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* **20**, 407-416.
- Loskutoff NM, Johnson WH, Betteridge KJ. 1993. The developmental competence of bovine embryos with reduced cell numbers. *Theriogenology* **39**, 95-107.
- Lucas-Hahn A, Niemann H. 1991. *In vitro* survival of fresh and frozen/thawed bovine demi-embryos. *Theriogenology* **36**, 619-627.
- Machado SA, Reichenbach HD, Weppert M, Wolf E, Goncalves PB. 2006. The viability of ovum pick-up response and *in vitro* embryo production from monozygotic twin cows. *Theriogenology* **65**, 573-583.
- Matsumoto K, Miyake M, Utsumi K, Iritani A. 1989. Production of identical twins by separating two-cell rat embryos. *Gamete research* **22**, 257-263.
- 松本和也, 三宅正史, 内海恭三, 入谷 明. 1987. 金属刃を使ったラット, ヤギ及びウシ胚盤胞期胚の切断 2 分離. 家畜繁殖学会誌 **33**, 1-5.
- Mitalipov SM, Yeoman RR, Kuo H-C, Wolf DP. 2002. Monozygotic twinning in rhesus monkeys by manipulation of *in vitro* derived embryos. *Biology of Reproduction* **66**, 1449-1455.
- 長嶋比呂志, 加納康彦, 尾川昭三. 1984. 哺乳類の発生工学. (大沢仲昭, 江藤一洋, 舘 鄰, 御子柴克彦 編集). 第1版. pp. 111-124. ソフトサイエンス社, 東京.
- Nagashima H, Kato Y, Ogawa S. 1989. Microsurgical bisection of porcine morulae and blastocysts to produce monozygotic twin pregnancy. *Gamete Research* **23**, 1-9.
- Nagashima H, Matsui K, Sawasaki T, Kano Y. 1984. Production of monozygotic mouse twins from microsurgically bisected morulae. *Journal of Reproduction and Fertility* **70**, 357-362.
- 大島泰郎編集. 1990. 生化学辞典. 第2版. (今堀和友, 山川民夫 監修). pp. 531-534. 東京化学同人, 東京.
- Ozil JP. 1983. Production of identical twins by bisection of blastocysts in the cow. *Journal of Reproduction and Fertility* **69**, 463-468.
- Rexroad CE, Powell AM. 1997. Culture of blastomeres from *in vitro*-matured, fertilized, and cultured bovine embryos. *Molecular reproduction and development* **48**, 238-245.
- Rho G-J, Johnson WH, Betteridge KJ. 1998. Cellular composition and viability of demi- and quarter-embryos made from bisected morulae and blastocysts produced *in vitro*. *Theriogenology* **50**, 885-895.
- Rosenkrans CF, First NL. 1994. Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes *in vitro*. *Journal of Animal Science* **72**, 434-437.
- Saito S, Niemann H. 1993. *In vitro* and *in vivo* survival of bovine demi-embryos following simplified bisection and transfer of one or two halves per recipient. *The Journal of Reproduction and Development* **39**, 251-258.
- Seike N, Teranishi M, Yamada S, Takakura R, Nagao Y, Kanagawa H. 1989. Increase in calf production by the transfer of bisected bovine embryos. *Nippon Juigaku Zasshi* **51**, 1193-1199.
- 清家 昇. 1992. 牛胚移植技術の普及. *The Journal of Reproduction and Development* **38**, 21-27.
- Shelton JN. 1992. Factors affecting viability of fresh and frozen-thawed sheep demi-embryos. *Theriogenology* **37**, 713-721.
- Shelton JN, Szell A. 1988. Survival of sheep demi-embryos *in vivo* and *in vitro*. *Theriogenology* **30**, 855-863.
- Soom AV, Boerjan ML, Bols PEJ, Vanroose G, Lein A, Coryn M, Kruif AD. 1997. Timing of compaction and inner cell allocation in bovine embryos produced *in vivo* after superovulation. *Biology of Reproduction* **57**, 1041-1049.
- 鈴木秋悦, 北井啓勝, 三浦麗子. 1984. 哺乳類の発生工学. 第1版. (大沢仲昭, 江藤一洋, 舘 鄰, 御子柴克彦 編集). pp. 226-234. ソフトサイエンス社, 東京.
- Suzuki T, Sakai Y, Ishida T, Kanouchi T. 1991. Production of identical twins from bovine embryos split Pre- or post-freezing. *Japan Journal of Animal Reproduction* **37**, 237-242.
- 高倉宏輔, 高橋博人, 堂地 修. 1992. ウシ切断 2 分離胚の移植後の生存性. 家畜繁殖技術研究会誌 **14**, 123-127.
- Tao T, Reichelt B, Niemann H. 1995. Ratio of inner cell mass and

- trophoblastic cells in demi- and intact pig embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* **104**, 251–258.
- Tominaga K, Yoneda K, Utsumi K. 1996. Influence of “Solcoseryl” during culture on the sex-dependent repair of bovine demi-embryos. *Molecular reproduction and development* **43**, 331–335.
- Ushijima H. 2005. Application study of developmental engineering for livestock production. *The Journal of Reproduction and Development* **51**, 15–22.
- 内海恭三. 1981. 哺乳動物の初期発生—基礎理論と実験法. 第1版. (姉尾左知丸, 加藤淑裕, 入谷 明, 鈴木秋悦, 館 鄰 編集). pp. 229–256. 理工学社, 東京.
- Voelkel SA, Amborski GF, Hill KG, Godke RA. 1985. Use of a uterine-cell monolayer culture system for micromanipulated bovine embryos. *Theriogenology* **24**, 271–281.
- Wang ZJ, Trounson A, Dziadek M. 1990. Developmental capacity of mechanically bisected mouse morulae and blastocysts. *Reproduction, Fertility and Development* **2**, 683–691.
- Warfield SJ, Seidel GE, Elsden RP. 1987. Transfer of bovine demi-embryos with and without the zona pellucida. *Journal of Animal Science* **65**, 756–761.
- Willadsen SM, Godke RA. 1984. A simple procedure for the production of identical sheep twins. *The Veterinary record* **114**, 240–243.
- Williams TJ, Elsden RP, Seidel GE. 1984. Pregnancy rate with bisected bovine embryos. *Theriogenology* **22**, 521–531.
- 山田信一, 西山厚志, 河村 正, 後藤祐司, 撫 年浩, 奥村寿章, 山内健治. 2004. 体細胞クローン肥育牛の発育および枝肉成績に関する相似性の検討. 日本畜産学会報 **75**, 165–177.

Effect of Pretreatment and/or the Splitting Media Containing Cytochalasin B, Ca^{2+} Free PBS or Sucrose on the Bisection of Bovine Blastocysts Derived from *In vitro*

Yutaka HASHIYADA^{1,2}, Kanako KANEYAMA², Masatugu ASADA¹, Naoyuki SAKUTA¹, Kazuyuki KONISHI¹ and Norio SAITO²

¹ Ohu station of National livestock breeding center, Shichinohe, Aomori 039–2567, Japan

² National livestock breeding center headquarters, Nishigo, Fukushima 961–8511, Japan

Corresponding : Yutaka HASHIYADA (fax : +81 (0) 176–62–3283, e-mail : y0hashiy@nlbc.go.jp)

The effects of the pretreatment and/or the media during splitting of bovine blastocysts derived from *in vitro*-fertilization on the success of bisection and the viability of demi embryos were examined. Test groups were as below ; exposed in cytochalasin B (CB) solution before bisection then split in the solution with CB (CB-CB) or without CB (CB-PBS), exposed in Ca^{2+} free PBS then split in DPBS (PBS (—)), or split in sucrose solution without pretreatment (SUC). Bisections were performed vertically by metal blade equipped to the micromanipulator without holding pipette. The shrinkage of embryos in splitting solution before bisection, the explosion of zona pellucida at the time of bisection, and the volume and quality of demi embryos just after bisection, were recorded. The viability of demi embryos was evaluated by morphological observation after 24h of culture. The cell numbers of demi embryos were counted, and the differences of cell number between each demi-pair were calculated. In CB-PBS and SUC groups, explosion of zona pellucida and damage to embryos were reduced because of the shrinkage of an embryo. CB-CB and CB-PBS groups had many cell numbers of demi embryos, so that an effect of CB to restrain a loss of cells was suggested. On the other hand, in PBS (—) group, it was suggested that there were few effects to reduce the damage of embryos at the time of bisection, because there were low survival rate and few cell numbers of the demi embryos. In addition, the difference of cell number between each demi-pair did not show a significantly difference among the groups.

Nihon Chikusan Gakkaiho **78** (1), 29–36, 2007

Key words : bisection, bovine, demi-embryo, *in vitro*-fertilization.