2 分離・裸化牛胚の体外培養および移植後の生存性

高倉宏輔・高橋芳幸*・伊藤剛嗣・酒井 豊・
津田秋司・堂地 修

(農林水産省日高種畜牧場 *現所属: 北海道大学獣医学部)

近年、哺乳動物の胚に対して顕微操作を加え、1 卵性双仔或多仔を作成する試みが盛んに行なわれるようになった。牛胚に対する顕微操作も WILLADSEN & POIGE¹⁾ が 8 細胞期胚を 2 分離あるいは 4 分離した胚を移植して、1 卵性双仔および 3 仔を得ることに成功して以来、多くの研究報告がみられる²⁻⁹⁾。WILLADSEN ら^{1,2)}の初期の方法は、透明帯に還納した分離胚を寒天に包埋し、これを羊の卵管に移植して胚盤腔まで発育させてから受卵羊に移植するという煩雑なものであった。その後、手術用の刃^{3-5,7-9)}あるいはガラス微細針⁶⁾で切断・2 分離した胚を透明帯に還納後、直ちに移植する方法が広く使用されるようになった。

しかし、これらの方法も切断・2 分離した胚の一方は自己の透明帯に残置し、他方は卵胞内卵子^{5,6)}あるいは変性・未受精卵^{3,4,7,8)}の透明帯内に還納するものである。胚を切断・分離する技術は比較的容易にできるが、分離胚の一方を他の透明帯に還納するためには、透明帯を固定したり、切開口を拡げたり、分離胚を吸引・還納する顕微器具がいくつも必要となる。また、著者らは還納操作中に 2 分離胚を破壊してしまったり、損傷を与えてしまうなどの経験がある。

本実験では、煩雑な透明帯への還納操作を省略して、2 分離胚の一方あるいは両方を透明帯のない裸化胚の状態ですべて体外培養あるいは移植を行ない、生存性を検討した。その結果、裸化 2 分離胚でも仔牛に発育し、1 組ではあるが 1 卵性の双仔が得られたので、その概要を報告する。

Viability of naked bovine demi-embryos after culture and transfer.

TAKAKURA, Hirotsuke, Yoshiyuki TAKAHASHI*, Takesugu ITOH, Yutaka SAKAI, Akishi TSUDA & Osamu DOHCHI (National Hidaka Livestock Breeding Station, Urakawa, Hokkaido 057-01, *Present address: Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido, University, Sapporo, Hokkaido 060)

Japan. J. Anim. Reprod., 31 (3), 1985.

材料と方法

供試胚は、過剰排卵処置を施したホルスタイン種未経産牛 (11~14 カ月齢) から発情周期の 6 日目 (発情発見日を 0 日とする) に非手術的に回収した。過剰排卵処置は、既報^{10,11)}に準じて PMSG あるいは FSH と PGF_{2α} を用いて行なった。非手術的な胚回収は、EAGLE'S MEM (日水) を還流液として FOLEY catheter を使用して実施した。回収胚は、倒立顕微鏡 (200~300 倍) で形態を調べ、ほぼ正常と認められた桑実胚を供試胚として選択した。供試胚は、切断・分離操作を加えるまで 25% の割合で非働化仔牛血清を加え、結晶ペニシリン G カリウム (100 IU/ml) を添加した DULBECCO'S PBS (保存液) に入れ、室温にて約 3 時間保存した。

胚の切断・2 分離は、倒立顕微鏡下で 2 台のマイクロマニプレーターを用いて行なった。保存液とともにプラスチックシャーレ (60×15 mm) に入れた供試胚は、1 台のマニプレーター (成茂科学: MN-100) に取付けたガラス製マイクロピペットで吸引・固定した。もう 1 台のマニプレーター (成茂科学: MO-102) には、胚を切断するためにスライドガラスを破碎して得られた鋭利なガラス刃を取付けた。ガラス刃は、吸引・固定された胚のほぼ中央部に押し当てて透明帯を切開し、さらに胚細胞塊を切断・2 分離した。2 分離された胚は、一方を透明帯の中に残置して、他方を透明帯から外に出して裸化胚とする (A 群) か、あるいは 2 分離胚の両方を裸化胚とした。

2 分離胚のうち、ほぼ均等に分離された胚の組だけを本実験に供し、体外培養あるいは受卵羊に移植してその生存性を調べた。体外培養は、抗生物質 (結晶ペニシリン G カリウム, 100IU/ml) を添加した BMOC-3 液を用い、既報¹²⁾に準じて実施した。40~46 時間培養後、正常な胚盤腔に発育したもの、胚腔の形成はみられても内細胞塊が不明瞭で異常な胚および変性・未発育の 3 種類に区分し、正常な胚盤腔に発育したものを生存胚と判定した。2 分離胚の移植は、既報¹³⁾に準じてプラスチック

Table 1. Viability of demi-embryos after the *in vitro* culture in BMOC-3 for 40 to 46 h

Development during culture	No. of monozygotic pairs	
	Group A	Group B
No development (both halves)	2	2
False blastocyst+no development	1	5
Two false blastocysts	0	1
Normal blastocyst+no development	3*	0
Normal blastocyst+false blastocyst	1**	5
Two normal blastocysts	1	1
Total	8	14

In Group A, one half was encased in the own zona pellucida (ZP) and the other was ZP-free. In Group B, both halves were cultured without ZP.

* One developed from the naked demi-embryo and the other two from the encased ones.

** A normal blastocyst developed from the naked demi-embryo.

Table 2. Viability of demi-embryos after transfer to recipient heifers

	Group A	Group B
No. of demi-embryos transferred	28 (14)	16 (8)
No. of calves born	4* (1)	3 (0)

Values in brackets show the number of monozygotic pair. Group A & B: See Table 1.

* Including two male calves derived from the same embryo (monozygotic twin).

の外筒を付けた牛凍結精液注入器 (Cassou gun) を用いて非手術的に実施した。2 分離胚は 1 頭の受卵牛に 1 個ずつ、黄体の存在する側の子宮角に移植した。受卵牛は、供卵牛との発情日差が前後 1 日以内に同調したホルスタイン種未経産牛 (16~17 カ月齢) を供試した。移植した 2 分離胚は、健康な産仔への発育をもって生存と判定した。

結 果

2 分離胚の体外培養成績は表 1 に示した。2 分離胚の一方を自己の透明帯中に残し、他方を透明帯のない裸化胚とした A 群では、8 組 16 個の 2 分離胚を培養した。その結果、6 個が正常な胚盤胞に発育した。この 6 個のうち 3 個は、裸化胚から発育したものであった。一方、2 分離胚の両方を裸化胚とした B 群では、14 組 28 個の 2 分離胚を培養し、7 個が正常な胚盤胞に発育した。しかし、2 分離した胚の両方が正常な胚盤胞へ発育したものは、A、B 両群とも 1 組ずつであった。

2 分離胚の移植結果は表 2 に示した。A 群では 14 組 28 個の 2 分離胚を移植し、4 頭の産仔 (雄 2 頭、雌 2 頭) が得られた。4 頭の産仔のうち 2 頭は裸化胚に由来する仔牛であり、2 分離胚の両方が仔牛に発育した 1 卵性

双仔は 1 組であった。この 1 組の 1 卵性双仔については、血液型の検査でも 1 卵性双仔であることが確認された。B 群では 8 組 16 個の 2 分離胚を移植して 3 頭の産仔 (雄 2 頭、雌 1 頭) が得られたが、いずれも別々の胚に由来する仔牛であり、1 卵性双仔は得られなかった。

考 察

切断・分離胚は自己の透明帯とそれ以外の透明帯 (卵内卵子や変性あるいは未受精卵の透明帯) に還納してから移植するのが一般的であり、裸化胚のまま移植したという報告は見当たらないようである。MASSEY *et al.*¹⁴⁾ は、酵素処理によって透明帯を除去した牛胚を用いて透明帯の必要性を検討している。彼らの実験では、胚盤胞であれば裸化胚として移植しても受胎するが、桑実胚以前の若い裸化胚では受胎例が得られなかった。このことから桑実胚およびそれ以前の若い発育段階の胚にとっては、透明帯が不可欠なものであろうと推論している。BAKER & SHEA⁸⁾ も発情周期の 7 日目に回収した胚を 2 分離した場合、裸化胚では体外培養後の発育率が低いことを報告している。

一方、HOPPE & BAVISTER¹⁵⁾ は、透明帯を機械的あるいは酵素処理によって除去した牛胚 (桑実胚および胚盤

胞)を無処置の胚の生存性と比較検討したが、透明帯の有無は移植後の受胎率に影響しなかったと報告している。本実験では、A, B 群とも体外培養および移植後の2分離胚の生存性は低かった。しかし、裸化胚からも仔牛に发育した。このことは、桑実胚にとって透明帯が絶対的に必要なものではないことを示す成績と考えられる。

1 頭の受卵牛に1個の2分離胚を移植した場合の受胎率は約 30%^{6,8,9)}あるいは約 50%^{5,7)}と報告されている。今回の実験では、A, B 両群の合計成績でても体外培養で 31.0% (13/42)、移植で 15.9% (7/44) という低い生存率であった。この低い生存率の原因には、透明帯のない裸化胚を培養あるいは移植したことが関係しているかも知れない。裸化胚では胚の取扱いや移植時に細胞の脱落や切断・分離部分の損傷の拡大が予想される。また、本実験に供した桑実胚では、内細胞塊と栄養芽層への分化が開始されつつあり、内細胞塊の均等2分離が成されなかったり、2分離後の細胞配列に異常をきたしたためとも考えられる。

本実験では、2分離した胚の両方を透明帯に還納して培養あるいは移植する実験区を欠いたため、2分離胚の生存性に対する透明帯の影響を明らかにすることができなかった。しかし、透明帯のない裸化2分離胚でも受胎して仔牛に发育することが判った。また、自己の透明帯を有する2分離胚と裸化2分離胚から1組ではあるが、わが国では初めての1卵性双仔を得ることができた。裸化2分離胚から移植産仔が得られたことは、牛胚の切断・分離およびその後の移植操作の簡便化に期待が持たれるので、今後、切断2分離を行う胚の发育段階あるいは切断・分離法に検討を加え、より高い生存性が得られるように実験を重ねる必要がある。

要 約

過剰排卵処置を施した未經産牛から発情周期の6日目に回収した桑実胚をガラス刃を用いて切断・2分離した。2分離胚は、一方を自己の透明帯内に残置し、他方を裸化胚とするか (A 群) あるいは両方を裸化胚として (B 群) 体外培養および移植を行い生存性を検討した。体外培養 40~46 時間後に正常な胚盤胞に发育した2分離

胚は、A 群では16個 (8組) 中6、B 群で28個 (14組) 中7個であった。しかし、2分離胚の両方が正常な胚盤胞に发育したものは、A, B 群ともにわずか1組ずつであった。移植は非手術的に1頭の受卵牛に1個ずつ行なった。A 群では14組28個の2分離胚を移植し、1組の1卵性双仔と2頭の仔牛が得られた。B 群では8組16個の胚を移植したが、3頭の仔牛が分娩されたものの、1卵性双仔は得られなかった。本実験の2分離胚の生存性は低かったが、桑実胚を2分離した場合、裸化胚でも正常に发育することから、透明帯は絶対的に不可欠なものではないと考えられた。(1985. 5. 9 受付)

文 献

- 1) WILLADSEN SM & C POLGE: *Vet. Rec.*, **108**, 211, 1981.
- 2) WILLADSEN SM, H LEHN-JENSEN, CB FEHILLY & R NEWCOMB: *Theriogenology*, **15**, 23, 1981.
- 3) WILLIAMS TJ, RP ELSDEN & GE SEIDEL JR: *Theriogenology*, **17**, 114 (Abstr), 1982.
- 4) OZIL JP, Y NEYMAN & JP RENARD: *Vet. Rec.*, **110**, 126, 1982.
- 5) OZIL JP: *J. Reprod. Fert.*, **69**, 463, 1983.
- 6) LAMBETH VA, CR LOONY, SA VOEKEL, DA JACKSON, KG HILL & RA GODKE: *Theriogenology*, **20**, 85, 1983.
- 7) WILLIAMS TJ, RP ELSDEN & GE SEIDEL JR: *Theriogenology*, **22**, 521, 1984.
- 8) BAKER RE & BF SHEA: *Theriogenology*, **23**, 3, 1985.
- 9) MERTES PC & KR BONDIOLI: *Theriogenology*, **23**, 209 (Abstr) 1985.
- 10) TAKAHASHI Y & H KANAGAWA: *Jpn. J. Vet. Res.*, **32**, 183, 1984.
- 11) TAKAHASHI Y & H KANAGAWA: *Jpn. J. Vet. Res.*, **33**, 45, 1985.
- 12) 高橋(芳): 本誌, **27**, 40, 1981.
- 13) 高橋(芳)・高倉(宏)・堀田(仁)・斉藤(則)・熊田(善): 北獣会誌, **27**, 244, 1983.
- 14) MASSEY JM, JG ANDERSON, WC ELLIS, AM SORESEN JR & DC KRAEMER: *Theriogenology*, **17**, 99 (Abstr) 1982.
- 15) HOPPE RW & BD BAVISTER: *Theriogenology*, **19**, 391, 1983.

Summary

Bovine morulae, collected from the superovulated heifers 6 days after the estrus, were bisected with a fine glass blade. After the bisection, the monozygotic pairs were either cultured or transferred nonsurgically to recipient heifers. In Group A, one half of the demi-embryos was encased in its own zona pellucida while the other half was left naked. In Group B, both halves were cultured or transferred without zona-pellucida. Six out of 16 demi-embryos (8 monozygotic pairs) in Group A and 7 out of 28 (14 pairs) in Group B developed into normal blastocysts after culture in BMOC-3 for 40 to 46 h. However, there was only one monozygotic pair of normal blastocysts in each of the groups. Twenty-eight demi-embryos (14 pairs) were transferred to 28 recipient animals in Group A, and 4 normal calves, including one pair of monozygotic twin were obtained. In Group B, 3 normal calves were born after the transfer of 16 demi-embryos (8 pairs), but there was no monozygotic twin. These data indicate that the zona pellucida is not absolutely necessary for the normal development of demi-embryo produced from the morula.