ヒツジの切断二分離胚移植による一卵性双仔の作出

吉羽宣明・大竹通男・塩谷康生*

(埼玉県畜産試験場 *農林水産省畜産試験場)

は乳動物の初期胚を顕微的に分離する技術は、マイクロマニピュレーターの発達、普及とともに進歩し、家畜においてもヒツジ^{1,2)}、ウシ^{3,4)}、ヤギ⁵⁾等で一卵性双仔の作出例が報告されている。この技術は優良個体の増産や種々の試験に貴重な研究材料となる一卵性多胎仔の生産を可能とし、また、染色体検査による胚の雌雄鑑別技術に応用できる。ヒツジ胚については既に 2~8 細胞胚を二分離または四分離して移植後に一卵性の双仔¹⁾や四生仔²⁾が生産されたことが報告されている。しかし、この手法は compaction 以前の胚を用いるので、複雑な技術を要するものである。最近、より簡便な方法によりヒツジの胚盤胞から一卵性双仔の作出例が報告されている⁶⁾。本試験では市販のカミソリの刃で作製したナイフを用い、ヒツジの hatched blastocyst を簡易な手法で切断二分離後、移植して一卵性双仔の作出に成功したので報告する。

材料と方法

過排卵処理と胚の回収：農水省畜産試験場で飼養しているヒツジ(雑種)に過排卵誘起のために FSH (アントリン、デンカ製薬 K.K.) を朝夕 2 回、3.5 日間にわたり、総量 17.5 AU を分割して筋肉内注射した。6 回目と 7 回目の FSH 注射時に PGF_{2α} アナログ (ONO-1052, 小野薬品工業 K.K.) 200 μg を筋肉内注射した。発情発見時および発情発現中 12 時間間隔で自然交配した。胚の回収は 7 日目(発情発現日: 0 日)に開腹し、子宮角を下向性に灌流して行なった。灌流液には Dulbecco's PBS に牛血清アルブミン 1 mg/ml、ペニシリン 200 単位/ml、ストレプトマイシン 200 μg/ml を添加したものをを用いた。採取した胚のうち hatched blastocyst をバ

Production of identical sheep twins using a razor blade for bisection of hatched blastocysts.

YOSHIBA, Nobuaki, Michio OHTAKE & Yasuo SHIOYA* (Saitama Prefectural Livestock Experiment Station, Ohsato-gun, Saitama 360-01, *National Institute of Animal Industry, Tsukuba Norin-danchi P.O. Box 5, Ibaraki 305)

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

ラフィンオイル下の 10% 牛胎児血清加 Ham-F 10 の小滴に入れ、切断に供した。

胚切断器具の作製：胚の切断に用いたナイフの概略を図 1 に示した。カミソリの刃 (フェザー S 両刃, フェザー安全剃刀 K.K.) を鉗子ではさみ、小さく折り、接着剤 (アロンアルファ, 東亜合成化学) でガラス毛細管の先端につけ、これを倒立顕微鏡 (TMD 10, 日本光学) に設置したマイクロマニピュレーター (成茂製作所) に装置した。

胚の切断法：まず内細胞塊をナイフの先端に位置させ、ナイフを下げ胚に近づけた。胚が二等分されるような胚の部位にナイフを軽く当て、数秒間圧定した後、さらにナイフを下げシャーレの底面に胚を押しつけて切断した。完全に切断できなかった場合は、ナイフを下げたまま水平に引いて切断した (図 2)。切断二分離した 4 組の胚のうち、3 組は切断したままで空の透明帯には注入せず、残る 1 組は牛の卵胞内卵子から得た空の透明帯に再注入した。注入は透明帯を保定用ピペットに吸引保定し、ガラス製の外径約 125 μm の注入針で切断胚をひとつずつ注入した。以上の操作は農水省畜産試験場で行なった。

胚の輸送と移植：切断二分離した胚は各組毎にそれぞれ 10% 牛胎児血清加 Ham-F 10 とともにネジロ試験管に入れ、試験管を輸送者の体に密着させた状態で、約 2 時間半を要して埼玉県畜産試験場に輸送し、受卵ヒツジ (コリデール種) に移植した。移植は受卵ヒツジを開腹し、切断胚 1 組ずつを卵管子宮角接合部に近い子宮角先端部内に同時に移植した。

当日に移植できなかった 2 組の胚は、BILTON⁷⁾の方法に準じて凍結保存し、融解後同様の方法で移植した。

結 果

4 個の hatched blastocyst を切断二分離し、4 組の切断二分離胚を作製した。これらの胚は輸送後鏡検したところ、すべて胚盤腔を再形成し、内細胞塊を有していた (図 3)。

移植結果を表 1 に示した。空の透明帯に入れた切断二

Table 1. Results of transfer experiment of pairs of bisected embryos in sheep

Number of ewes	Stage of recipient cycle (estrus=day 0)	Zona pellucida present (+) or absent (-) at transfer	Lambing		
			Number of lambs	Sex	Birth weight
90*	5	+	1	Male	4.5 kg
88*	7	-	2	Male	3.0, 4.6 kg
99**	7	-	—	—	—

* A pair of bisected embryos was transferred.

** A pair of frozen-thawed half embryos was transferred.

Explanation of Figures Bars in Figs. 2 and 3 indicate 100 μ m.**Fig. 1.** Preparation of micro-blade.

a) A piece of a razor was broken off using a hemostat.

b) The piece was glued to a glass capillary tube.

Fig. 2. A pair of half embryos immediately after bisection. The micro-blade was lowered down to the bottom of the dish and moved horizontally.

An arrow indicated the tip of the micro-blade.

Fig. 3. A pair of bisected embryos before transfer.**Fig. 4.** A pair of identical twins and their foster mother.

分離胚 1 組と、透明帯のない切断二分離胚 1 組を 2 頭の受精卵ヒツジに移植した結果、2 頭とも受胎した。透明帯のない切断二分離胚を移植された 1 頭が移植後 142 日

目に雄の一卵性双仔を、透明帯に注入した胚を移植された 1 頭が同じく 142 日目に雄の単仔を出産した (図 4)。これらの子ヒツジの生時体重は双仔がそれぞれ 3.0 kg

と 4.6 kg で、単仔は 4.5 kg で、いずれも正常であった。

凍結保存した 2 組の二分離胚のうち 1 組を融解後培養し、正常な形態に回復したことを確認後、移植したが不受胎であった。

考 察

発育ステージが進み compaction を起した後の胚は、切断後直ちに移植できる反面、細胞間の結合が強く分離するのが困難になる。著者らは胚盤胞をガラス針で切断しようと試みたが、いわゆる cellular bridge ができてしまうことが多く、これを切断しようとして胚の損傷を大きくしてしまうことを経験した。また、hatched blastocyst は必ずしも球形でなくガラス針で圧断しようとする時に胚が動き、二等分することが困難であった。そこで本試験ではカミソリの刃を用い胚を切断二分離したが、cellular bridge ができることなく簡単に切断二分離することができた。この方法は胚を保定する必要がなく WILLADSEN & GODKE⁶⁾ のガラス針で胚盤胞を切断する方法や、OZIL⁸⁾ の方法よりも簡易であった。

切断二分離に hatched blastocyst を用いた場合、切断後 2~3 時間後には内部細胞塊と胚盤胞腔が再形成され、切断の良否が簡単に判定できた。また、切断二分離前に透明帯を除去する必要がないことや、二分離後に透明帯に再注入しなかった例で双仔が得られたことから、この時期の胚は切断二分離操作に適していると考えられる。従って、本試験のような切断用ナイフを用いて hatched blastocyst を切断するだけならば、比較的簡単な装置でも可能なので、実用性が高いと考えられる。

今回の移植結果では良好な受胎率が得られたことから、例数が少ないために断定はできないが、切断二分離胚でも通常の胚移植の成績と大きな差がないものと推察された。

凍結保存した切断二分離胚を移植しても受胎しなかったが、融解後の培養では正常な形態に戻ったことから、正常な胚と同様に凍結融解ができるものと考えられる。しかしこの点に関して更に追究が必要であろう。

なお今回の試験では胚の回収から移植まで約 8 時間を

要したが受胎性は損なわれなかった。このことにより胚の輸送は比較的容易であり、試験場間の協力などが可能であることが示された。

要 約

ヒツジの hatched blastocyst を切断二分離し、受卵ヒツジへの移植により生存性を検討した。過排卵誘起したヒツジから、発情発現日を 0 日として、7 日目に手術的に胚を回収した。回収胚のうち hatched blastocyst をカミソリの刃から作製した切断用ナイフで切断二分離した。その結果 4 個の胚で内細胞塊を含めて、ほぼ二等分でき、4 組の切断二分離胚を得た。

これらの切断二分離胚を農水省畜産試験場から埼玉県畜産試験場に輸送し、受卵ヒツジ 2 頭に切断二分離胚を 1 組ずつ移植した。その結果、2 頭とも受胎し、1 頭は一卵性双仔を、他の 1 頭は単仔を出産した。残りの 2 組の二分離胚を凍結保存し、そのうち 1 組を融解後移植したが、不受胎であった。

過排卵のために FSH を提供いただいたデンカ製薬 K.K. と PGF_{2α} アナログを提供いただいた小野薬品工業 K.K. に対して御礼申し上げます。また、御校閲いただいた農水省畜産試験場中原達夫博士および花田章博士に対して感謝いたします。(1985. 6. 22 受付)

文 献

- 1) WILLADSEN SM: *Nature*, **227**, 298, 1979.
- 2) WILLADSEN SM: *J. Embryol. Exp. Morph.*, **65**, 165, 1981.
- 3) WILLADSEN SM, H LEHN-JENSEN: CB FEHILLY & R NEWCOMB: *Theriogenology*, **15**, 23, 1981.
- 4) OZIL J-P, Y HEYMAN & J-P RENARD: *Vet. Rec.*, **110**, 126, 1982.
- 5) 角田(幸)・安井(司)・杉江(信): 日畜会報, **55**, 643, 1984.
- 6) WILLADSEN SM & RA GODKE: *Vet. Rec.*, **114**, 240, 1984.
- 7) BILTON RJ: *9th Int. Cong. Anim. Reprod. A.I.* Madrid, **2**, 245, 1980.
- 8) OZIL J-P: *J. Reprod. Fert.*, **69**, 463, 1983.

Summary

The viabilities of bisected hatched blastocysts in the sheep were examined by transferring them to recipients. Embryos were collected surgically on day 7 (onset of estrus: day 0) from a superovulated ewe. Hatched blastocysts were bisected using a micro-blade made from a razor. Four embryos were successfully bisected into 4 pairs of identical half embryos.

These embryos were then transported from National Institute of Animal Industry to Saitama Prefectural Livestock Experiment Station and transferred to recipient ewes immediately after arrival or after frozen-storage.

Two pairs of fresh half embryos were transferred to 2 recipients. Both of the recipients were pregnant. One of them delivered a pair of identical twins and the other did a single lamb. A pair of frozen-thawed half embryos was transferred to a recipient but none developed into lambs.