ウシ受精卵切断 2 分離による 1 卵性双児の作出

佐伯和弘・佐藤正邦・森 一樹・榊原賢次

西根俊政・清家 昇*・田端経夫*

(雪印乳業株式会社受精卵移植別海研究室 *雪印乳業株式会社受精卵移植研究所)

ウシ 1 卵性双児の発生頻度は、全産子数の約 0.1%¹⁾とされている。このように、自然界では非常に低率でしか発生しない 1 卵性双児を、顕微手術による受精卵の切断 2 分離で、人為的に作出しうることが報告²⁻⁹⁾されている。とくに最近では、非外科的に採取した受精卵を切断 2 分離して直ちに受卵牛に移植して産子を得る方法が、通常の受精卵移植に組み入れて実用化されている¹⁰⁾。多くの対の 1 卵性双児を作出することによって、実験動物として栄養学や発生学の研究にきわめて有効に利用することができ、また受精卵を切断 2 分離することで、2 倍の受精卵数が得られるため、通常の受精卵移植にくらべて、より多くのすぐれた産子を得ることができ^{4,9,10)}。1 対の 1 卵性 2 分離受精卵を 1 頭の受卵牛に移植すれば、フリーマーチンの心配もなく、受卵牛数が少なくても、多くの産子の生産が可能となる。

本実験では、非外科的に採取した後期桑実胚～胚盤胞のウシ受精卵を 3 種類の方法で切断 2 分離し、培養あるいは受卵牛への移植により 2 分離受精卵の発育能を検討したので報告する。

材料と方法

供卵牛の多排卵処置と受精卵の採取

供卵牛は、一般酪農家に飼養されている 3～11 才のホルスタイン種経産牛 13 頭で、多排卵処置後、受精卵を採取した。

多排卵処置は、性周期の 9～13 日目に、妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG) (セロトロピン: 帝国臓器)

Production of monozygotic twins by bisection of bovine embryos.

SAEKI, Kazuhiro, Masakuni SATO, Kazuki MORI, Kenji SAKAKIHARA, Toshimasa NISHINE, Noboru SEIKE* & Tsuneo TABATA* (Betsukai Division of Laboratory of Embryo Transfer, Snow Brand Milk Products Co. Ltd., Betsukai, Hokkaido, 086-02; *Laboratory of Embryo Transfer, Snow Brand Milk Products Co. Ltd., Uenae, Tomakomai, Hokkaido, 059-13) *Japan. J. Anim. Reprod.*, 31 (4), 1985.

3,000 IU を筋肉内投与し、72 時間後にプロスタグランジン F_{2α} (プロナルゴン F: 日本アップジョン) 35 mg, あるいは、その類縁製剤 (エストラメイト: 住友製薬) 625～875 μg を筋肉内投与した。発情が発現した日の午後ならびに翌日の午前に凍結精液を人工授精した。

受精卵の採取は、灌流液にイーグル MEM の組織培養液 (日水製薬) を用い、2 Way バルーンカテーテルで、発情日より 6～6.5 日目及び 7.5 日目に実施した。

採取した受精卵は、10% 非働化子牛血清 (GIBCO; CS) を含む Whittingham's modified Dulbecco's PBS (GIBCO) (m-PBS+10% CS) で、3～4 回洗浄後、発育ステージが後期桑実胚～胚盤胞で、品質は Lindner らの基準¹¹⁾に従って分類し、Good～Excellent の 53 個の受精卵を切断 2 分離に供した。

受精卵の切断 2 分離

プラスチックシャーレーに 0.3～0.5 ml の m-PBS+10% CS の小滴を作り、施術する受精卵と透明帯採取用卵子 (変性卵、未受精卵あるいは卵胞卵) を 1 個ずつ浮遊させ、滅菌したパラフィンオイルを重層し、室温 (20～25°C) で、倒立顕微鏡と組み合わせたマイクロマニピュレーター (ナリング) を用いて切断 2 分離手術を実施した。

i) 6～6.5 日齢受精卵の切断 2 分離

供試受精卵は、後期桑実胚と極初期胚盤胞 (胞胚腔の形成が始まった直後の受精卵)^{4,5)}であった。

OzIL ら⁵⁾の方法に準じて 2 分離受精卵を作出した。すなわち、受精卵を吸引保持し、反対側より 2 本の微細ガラス針で透明帯のみを切開し、微細ガラスビペットで透明帯より受精卵を排出した。裸化した受精卵を、微細ガラス針で垂直に切断 2 分離した。2 分離受精卵は、もとの受精卵の透明帯と内容を空にした別の透明帯にそれぞれ挿入した。

ii) 7.5 日齢受精卵の切断 2 分離

供試受精卵は、胚盤胞であった。いずれも次ののべる 3 方法によって内部細胞塊と胞胚腔が 2 等分になるように切断した。方法 a) 微細ガラス針による方法: 6～6.5

日齡受精卵で行った方法と同様であるが、透明帯を切開する前に微細ガラス針で胞胚腔を刺し、内容液を一部排出させて、受精卵を収縮させ、胚卵腔を拡大させて、透明帯切開時に受精卵に損傷を与えないようにした。方法 b) 外科刀による方法: Ozu⁷⁾の方法に準じて、次のように行った。受精卵の内部細胞塊の存在側を吸引保持し、反対側より微細ガラス針で胞胚腔を刺し受精卵を収縮させ 2 本の微細ガラス針で透明帯を切開した。微細ガラスピペットで受精卵を排出し、裸化した受精卵を、加工して刃の部分だけにした外科手術用のメス (替刃メス No. 22: フェザー) の先端部 (厚さが 10~30 μm) で垂直に切断 2 分離した。2 分離受精卵は、透明帯にそれぞれ挿入した。方法 c) 金属刃と微細ガラス針による方法: 透明帯の切断に金属製の刃^{4,9,10)}を用いた。受精卵の内部細胞塊の存在側を吸引保持し、反対側より、金属刃を受精卵の中央部に押し当てた。透明帯を切開し、受精卵の中央部に陥凹ができると金属刃を引き抜き、微細ガラスピペットで透明帯より受精卵を排出した。裸化した受精卵の陥凹部にガラス針を誘導し、中央部で垂直に切断 2 分離した。2 分離受精卵は、透明帯にそれぞれ挿入した。

2 分離受精卵の培養

培養液は、10% の非働化子牛血清を含む HEPES (25 mm) 緩衝 Ham's F12 (日水製薬) を用いた。2 分離受精卵は、3~4 回洗浄して、滅菌パラフィオンイル下の 0.05 ml の培養液の微小滴に浮遊させ、培養した。培養の条件は、37°C、気相は CO₂ 5%、空気 95% で、飽和湿度とした。

発育能をしらべた実験では、桑実胚~極初期胚盤胞より作出した 2 分離受精卵は、24~36 時間培養して初期胚盤胞~胚盤胞に発育したものを、胚盤胞より作出した 2 分離受精卵は、2~12 時間培養して胞胚腔を再形成して内部細胞塊が確認できたものを、生存しているものと判定した。

2 分離受精卵の移植

供卵牛の発情から、 ± 1 日以内に自然発情を示した、一般酪農家に飼養されているホルスタイン種未経産牛 4 頭と経産牛 10 頭を受卵牛として用いた。m-PBS+10% CS で 3~4 回洗浄して、0.25 ml 精液ストローに保存液と共に吸引した、12 対の 2 分離受精卵を、シース管受精卵注入器で、12 頭を受卵牛の黄体存在側子宮角内に各々 1 対ずつ注入した (未経産牛 2 頭、経産牛 10 頭)。一方、1 対の 2 分離受精卵については、2 頭を受卵牛 (未経産牛) の黄体存在側子宮角内に、各々 1 個ずつ、臍部切開法で移植した。このように移植操作は、保存及び輸送を含めて受精卵の分離後少なくとも 3 時間以内に行った。

結 果

2 分離受精卵の作出

6~6.5 日齡受精卵では、29 個の受精卵を切断 2 分離して、25 対 (対作出率=86%) の 2 分離受精卵を作出した。切断 2 分離の際、あるいは透明帯に受精卵を挿入する際に、大きな損傷を受けたり破損した受精卵のうち、対にはならなかったが、片方のみ残ったものも含め合計 52 個の 2 分離受精卵を作出した (表 1)。また、7.5 日齡受精卵では、方法 a) で 8 個、方法 b) で 3 個及び方法 c) で 13 個の受精卵を切断 2 分離して、それぞれ、6 対 (75%) 合計 12 個、2 対 (67%) 合計 4 個及び 12 対 (92%) 合計 25 個の 2 分離受精卵を作出した (表 1)。

2 分離受精卵の培養

6~6.5 日齡受精卵では、29 個 (13 対) の 2 分離受精卵を培養し、97% (28 個/29 個) [対の発育率=92% (12 対/13 対)] の発育率を示した (表 2)。また、7.5 日齡受精卵では、方法 a) で 12 個 (6 対)、方法 b) で 4 個 (2 対) 及び方法 c) で 19 個 (9 対) の 2 分離受精卵を培養し、それぞれ、25% (3 個/12 個) [0% (0 対/6 対)], 100% (4 個/4 個) [100% (2 対/2 対)] 及び 24% (4 個/19 個) [11% (1 対/9 対)] の発育率 [対の

Table 1. Results of bisection of bovine embryos

Day of embryo recovery	Day 6-6.5		Day 7.5	
	Glass needle	(Method a) Glass needle	(Method b) Machined surgical blade	(Method c) Metal blade and glass needle
No. of embryos used	29	8	3	13
No. of half-embryos produced	52	12	4	25
No. of monozygotic pairs (%)	25 (86)	6 (75)	2 (67)	12 (92)

Table 2. *In vitro* development of bisected bovine embryos

Day of embryo recovery	Day 6-6.5		Day 7.5	
Microinstruments used for bisection	Glass needle	(Method a) Glass needle	(Method b) Machined surgical blade	(Method c) Metal blade and glass needle
No. of half-embryos* cultured	29	12	4	19
No. of half-embryos** developed (%)	28 (97)†	3 (25)	4 (100)	4 (24)
No. of monozygotic pairs cultured	13	6	2	9
No. of monozygotic pairs developed (%)	12 (92)	0 (0)	2 (100)	1 (11)

* Day 6-6.5 or 7.5 half-embryos were cultured for 24 to 36 h or 2 to 12 h, respectively.

** Viability of half-embryos was assessed by development into blastocysts.

† Four half-embryos abnormally developed into trophoctodermal vesicles.

Table 3. Results after transfer of bovine half-embryos

Day of embryo recovery	Day 6-6.5	Day 7.5
Microinstruments used for bisection	Glass needle	Metal blade and glass needle
No. of recipients non-surgically transferred*	10	2
No. of recipients surgically transferred**	0	2
No. of recipients pregnant at day 60†	2	1
No. of live calves born	1	2 (monozygotic twins)

* Pairs of half-embryos were transferred non-surgically with an artificial insemination gun into the uterine horn ipsilateral to the corpus luteum of recipients.

** Each of a pair of half-embryos was transferred surgically via a flank incision into the uterine horn ipsilateral to the corpus luteum of a recipient.

† Only non-surgically transferred recipients were pregnant.

発育率]を示した(表2)。

2 分離受精卵の移植

6~6.5 日齢受精卵では、2頭の未經産牛と8頭の経産牛に、非外科的に移植して、2頭の経産牛の受胎を60

日目の直腸検査で確認した(表3)。120日目に再検査を行ったところ、1頭は空胎であった。60~120日の間に流産したと思われるが、放牧期間中だったので、胎児の確認ができず、双胎妊娠か否かは不明であった。他の1

Fig. 1. A female calf from a morula bisected with a fine glass needle.

Fig. 2. A set of male monozygotic twin calves from a blastocyst bisected with a razor blade and a fine glass needle.

頭は、分娩まで妊娠を継続し、正常な雌の単児を分娩した(表3)。分娩時の胎児体重は、50.0 kgであった(図1)。7.5 日齢受精卵では、方法 c) で作出した2分離受精卵のうち、1対を外科的に2頭の未經産牛に、また2対を非外科的に2頭の経産牛に移植して、そのうち1頭の経産牛の受胎を60日目の直腸検査で確認した(表3)。分娩まで妊娠を継続し、正常な雄の1卵性双児を分娩した。分娩時の胎児体重は、34.5 kgと32.5 kgであった(図2)。

考 察

胞胚腔が形成される前後のウシ受精卵を、顕微手術で切断2分離した。表1に示すように受精卵の日齢及び切断2分離の方法による対の作出率に差はみられなかった。しかし作出の難易性には大きな差があり、6~6.5 日齢受精卵は、微細ガラス針で容易に切断2分離できたが、7.5 日齢受精卵では、Ozil⁷⁾が報告しているように、微細ガラス針だけでは容易に切断できなかった。6~6.5 日齢の後期桑実胚~極初期胚盤胞は割球が比較的大きく、受精卵の表面が凹凸になっているため、微細ガラス針がその表面に捕捉されやすい。胞胚腔の形成が進み初期胚盤胞~胚盤胞に発育すると、割球が小さくなり受精卵の表面の凹凸が小さくなるため、微細ガラス針では、その表面で滑り易くなる。また、胞胚腔の形成に伴って栄養芽細胞間の結合が強固になることが¹²⁾、7.5 日齢の胚盤胞の切断を困難にした一因とも思われる。さらに、切断の際、受精卵の捕捉に時間を要したものの内には、胞胚腔が完全に収縮し、内部細胞塊との区別ができなくなって、正確な2分離が確認できなかったものもあった。加工した外科刀を用いると、受精卵の捕捉に時間を要するというような問題もなく容易に切断できたが、切断刃側部に切断後の2分離受精卵がしばしば付着した。これは、切断時に破壊された細胞からの漏出した内容物が付着し易くなるためと思われる。金属刃と微細ガラス針を組み合わせた方法では、金属刃で透明帯を切開すると受精卵の中央部に陥凹が形成され、ガラス針で容易に受精卵を捕捉できる。陥凹形成時に受精卵の一部が切断されるらしく、捕捉後、微細ガラス針で比較的容易に切断しうる。また、切断後の2分離受精卵がガラス針に付着しても、ガラス針との付着面積が小さいので、加工した外科刀を用いた場合に比して取り外しが容易であった。このようなことから、7.5 日齢の胚盤胞の切断は金属刃と微細ガラス針を組み合わせた方法が最も適しているものと思われた。

6~6.5 日齢受精卵は、24~36 時間後、97% (28 個/29 個) が初期胚盤胞~胚盤胞に発育し、7.5 日齢受精卵は、2~12 時間後、合計 31% (11 個/35 個) が胞胚腔を再形成した。しかし、6~6.5 日齢受精卵は良好な胞胚形成を示したが、内部細胞塊が見られないもの(図5, 6)や、非常に小さいものが14% (4/28 個)(表2)含まれていた。これは、形態的に後期桑実胚と判断した受精卵が、すでに内部細胞塊と栄養芽細胞に分化を始めており、切断2分離の際に、内部細胞塊となる細胞群を不均等に2分離したため一方の内部細胞塊が欠損したか、その細胞数が少なくなったためと思われる。このような内部細胞塊の少ない受精卵は、マウスで観察されているように¹³⁾、発育しても正常な産子にならないと考えられる。7.5 日齢受精卵の発育率(31%)は、6~6.5 日齢受精卵の発育率(97%)に比して低かった($P < 0.01$)。7.5 日齢受精卵は、胞胚腔の再形成でその発育能を観察しているが、切断時に栄養芽細胞に多くの損傷を与え、栄養芽細胞の切断端の癒合⁷⁾が起こらなかったため、胞胚腔を再形成できなかったものと思われる。一方、Ozil⁷⁾は培養しても胞胚腔が再形成しなかった2分離胚盤胞からも正常な胎児を得ていることから、胞胚腔が再形成しなくても生存している可能性がある。従って、単に胞胚腔の再形成能を2分離受精卵の発育能の判定基準とするには客観性に乏しいことから、必ずしも6~6.5 日齢受精卵より、7.5 日齢受精卵の方が切断に不適当とは思えない。むしろ内部細胞塊の均等な2分離法という観点から考えれば、7.5 日齢受精卵の方が切断に適した発育ステージと考えられる。

2分離受精卵の移植は、主に非外科的に、黄体存在側子宮角内に1対ずつ移植した。Rowson ら¹⁴⁾及び Newcomb ら¹⁵⁾は、2個の受精卵を受卵牛の黄体存在側子宮内に移植して73~80%の受胎率及び50~56.3%の双胎率を得ており、受卵牛を双胎妊娠させることで少ない受卵牛から多くの産子が得られることを報告している。Ozil ら⁵⁾、Lambeth ら⁶⁾及び Ozil⁷⁾は、1対の2分離受精卵を非外科的に黄体存在側子宮角内に移植して、62.5~72.7%の受胎率及び50~80%の双胎率を得ているし、2分離受精卵による1卵性双胎とすれば、異性双胎が避けられる。本実験では、非外科的に移植した12頭の受卵牛から3例の受胎が得られた(表3)。このように、受胎数が少なかったのは、受卵牛が肥育中で発情が微弱なものが多かったためと思われる。

生まれた1卵性双児の斑紋は、ヒツジ¹⁶⁾、ウシ⁷⁾及びウマ¹⁷⁾で観察されているのと同様に、1部異なっていた

(図 2)。Ozil⁷⁾ は、生まれた双児の血液型検査で 1 卵性であることを証明していることから、毛色の分布は遺伝的に完全には支配されていないものと考えられる。

極短時間に巧みに切断された受精卵はその後の発育が良好であったことから、本実験では普通、顕微手術に 10~20 分を要したが、熟練によりさらに短縮することが必要である。また、ウシ胚盤胞は、透明帯の有無にかかわらず同様に受胎する¹⁸⁾ことから、2 分離した受精卵を透明帯に挿入する操作を省略できれば、術式が簡素化でき、顕微手術時間がさらに短縮できるものと思われる。

要 約

多排卵処置を施したホルスタイン種経産牛より採取した 6~7.5 日齢受精卵を、顕微手術で切断 2 分離し、2 分離受精卵の発育能を調べた。

6~6.5 日齢受精卵については、29 個の受精卵を、微細ガラス針で切断 2 分離し、52 個 (25 対と 2 個) の 2 分離受精卵を作出した。そのうち 29 個 (13 対と 3 個) を 24~36 時間培養し、28 個 (12 対と 4 個) が発育した。しかし、その内 4 個は擬胚盤胞であった。また、10 対は培養しないで、10 頭の受卵牛に各々 1 対ずつ非外科的に移植し、2 頭の受卵牛が受胎したが、分娩まで至ったのは 1 頭のみで、1 頭の雌子牛を分娩した。1 頭は、60~120 日で流産した。

7.5 日齢受精卵については、3 種類の方法で切断 2 分離した。方法 a) では、8 個の受精卵を、微細ガラス針で切断 2 分離し、12 個 (6 対) の 2 分離受精卵を作出した。12 個 (6 対) を 2~12 時間培養し、3 個 (0 対) が発育したが、移植は行わなかった。方法 b) では、3 個の受精卵を、加工した外科刃で切断 2 分離し、4 個 (2 対) の 2 分分離受精卵を作出した。4 個 (2 対) を 2~12 時間培養し、4 個 (2 対) が発育したが、移植は行わなかった。方法 c) では、13 個の受精卵を、金属刃と微細ガラス針を組み合わせで切断 2 分離し、25 個 (12 対と 1 個) の 2 分離受精卵を作出した。そのうち 19 個 (9 対と 1 個) を 2~12 時間培養し、4 個 (1 対と 2 個) が発育した。また、2 対は培養しないで、2 頭の受卵牛に各々 1 対ずつ非外科的に移植し、1 頭の受卵牛が受胎し

た。この受卵牛は分娩まで至り、正常な 1 組の雄の 1 卵性双児を分娩した。1 対は培養しないで、2 頭の受卵牛に各々 1 個ずつ外科的に移植したが、受胎しなかった。

終わりに、御校閲いただきました京都大学農学部入谷明教授に深謝致します。 (1975. 10. 3 受付)

文 献

- 1) McLAREN A: The embryo. In: Reproduction in mammals (AUSTIN CR & RV SHORT ed.), Book 2, p. 1, Cambridge Univ. Press, 1972.
- 2) WILLADSEN SM & C POLGE: *Vet. Rec.*, **108**, 211, 1981.
- 3) WILLADSEN SM, H LEHN-JENSEN, CB FEHILLY & R NEWCOMB: *Theriogenology*, **15**, 23, 1981.
- 4) WILLIAMS TJ, RP ELSDEN & GE SEIDEL JR: *Theriogenology*, **17**, 114 (Abstr.), 1982.
- 5) OZIL JP, Y HEYMAN & JP RENARD: *Vet. Rec.*, **110**, 126, 1982.
- 6) LAMBETH VA, CR LOONEY, SA VOELKEL, DA JACSON, KG HILL & RA GODKE: *Theriogenology*, **20**, 85, 1983.
- 7) OZIL JP: *J. Reprod. Fert.*, **69**, 463, 1983.
- 8) BREM B, B KRUFF, B SZILVASSY & H TENHUMBERG: *Theriogenology*, **21**, 225 (Abstr.), 1984.
- 9) WILLIAMS TJ, RP ELSDEN & GE SEIDEL JR: *Theriogenology*, **22**, 521, 1984.
- 10) BAKER RD & BF SHEA: *Theriogenology*, **23**, 3, 1985.
- 11) LINDNER GM & RW WRIGHT JR: *Theriogenology*, **20**, 407, 1983.
- 12) MOHR LR & AO TROUNSON: *Biol. Reprod.*, **25**, 1009, 1981.
- 13) NAGASHIMA H, K MATSUI, T SAWASAKI & Y KANO: *J. Reprod. Fert.*, **70**, 357, 1984.
- 14) ROWSON LEA, RAS LAWSON & RM MOOR: *J. Reprod. Fert.*, **25**, 261, 1971.
- 15) NEWCOMB R, WB CHRISTIE & LEA ROWSON: *J. Reprod. Fert.*, **59**, 31, 1980.
- 16) WILLADSEN SM: *Nature (Lond.)*, **227**, 298, 1979.
- 17) ALLEN WR & RL PASHEN: *J. Reprod. Fert.*, **71**, 607, 1984.
- 18) HOPPE RW & BD BAVISTER: *Theriogenology*, **19**, 391, 1983.

Explanation of Figures

(Scales indicate 100 μm)

Fig. 3. A monozygotic pair of half blastocysts with reformed blastocoeles developed from a bisected blastocyst after 3 h in culture.

Fig. 4. A monozygotic pair of half early blastocysts developed from a bisected morula after 24 h in culture.

Fig. 5. A monozygotic pair comprising a trophoctodermal vesicle (left) and a half blastocyst (right), which was developed from a bisected morula and cultured for 36 h.

Fig. 6. Higher magnification of the trophoctodermal vesicle in Fig. 5. Note apparent absence of inner cell mass.

Summary

Embryos were collected non-surgically from superovulated Holstein cows on day 6 to 7.5 post-estrus. Fifty-three embryos classified as good-to-excellent were bisected microsurgically. Viability of the half-embryos was assessed by blastulation *in vitro* or development into calves.

Twenty-nine day 6-6.5 embryos were bisected with a fine glass needle, and 52 half-embryos (25 pairs) were produced. Twenty-nine (13 pairs) of these half-embryos were cultured for 24 to 36 hours, and 28 (12 pairs) of which were developed, including 4 trophoctodermal vesicles. Ten pairs of half-embryos were transferred non-surgically to 10 recipients, and two recipients were pregnant at day 60. One of them calved only one female, but another aborted on day 60 to 120.

Day 7.5 embryos were bisected by three different methods. In method a), eight embryos were bisected with a fine glass needle, and 12 half-embryos (6 pairs) were produced. These half-embryos were cultured for 2 to 12 hours, and three (no pairs) of which were developed. Transfer was not carried out. In method b), three embryos were bisected with a machined surgical blade, and four half-embryos (2 pairs) were produced. These were cultured for 2 to 12 hours, and all of which were developed. Transfer was not carried out. In method c), thirteen embryos were bisected with a razor blade and a fine glass needle, and 25 half-embryos (12 pairs) were produced. Nineteen (9 pairs) of these half-embryos were cultured for 2 to 12 hours, and four (1 pair) of which were developed. Two pairs of half-embryos were transferred non-surgically to two recipients, and one recipient calved a set of normal male monozygotic twins. Two half-embryos of a monozygotic pair were transferred surgically to two recipients, but no pregnancy was obtained.