Production of Monozygotic Twins by Splitting of 2-cell Stage Embryos in Mice

Mamoru TOGASHI, Hiroshi SUZUKI, Tatsuya MIYAI
and Michio T. OKAMOTO

*Research Laboratories, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.,
No. 41-8, 3-chome, Takada, Toshima-ku, Tokyo 171*

(Accepted for publication February 2, 1987)

Summary. The purpose of present study was to examine the ability of potential development of splitted mouse embryos at 2- (1/2) and 4-cell (2/4) stage.

Two and 4-cell embryos were collected from the superovulated F_1 (C57BL/6J $\times$ C3H/HeN) mice 48 hr after hCG injection. After removal of zona pellucida (Hank's solution + 0.5% pronase), the embryos were separated into two halves by pipetting in Ca^{2+} or Ca^{2+} , Mg^{2+} -free BMOC-3 medium containing 0.02% EDTA. Splitted embryos were cultured in BMOC-3 medium in Multiplate Terasaki for 48, 72 or 96 hr. Then the embryos developed into blastocysts were transferred to recipients on Day 2 or Day 3 of pseudopregnancy. These recipients were killed at Day 17 of gestation and the existence live fetuses, dead fetuses and swellings were examined. Furthermore, a monozygotic pair of 1/2 embryos developed into blastocysts after 48 hr culture were transferred to recipients on Day 2 of pseudopregnancy or pregnancy.

The results were as follows:

1) Success rate of splitting 2- and 4-cell embryos by pipetting were 93.5–100% and 88.2%, respectively.

2) Most of 1/2 and 2/4 embryos were developed into blastocysts after 72 hr culture (93.9–100%).

3) The propotion of live fetuses after transfer of 1/2 embryos were 14/56 (25.0%), 4/52 (7.7), 12/60 (20.0) and 3/74 (4.1), and those of 2/4 embryos were 14/49 (28.6), 12/57 (21.2), 11/57 (19.3) and 3/43 (7.0) in the case of 48 hr→Day 2, 72 hr→Day 2, 72 hr→Day 3 and 96 hr→Day 3 combinations, respectively.

4) One or six sets of monozygotic twins were obtained after transfer of a pair of splitted embryos into pseudopregnant or pregnant recipients.

These results indicate that the zona pellucida is not necessary for the development of embryos in vitro and it is possible to produce monozygotic twins from 2-cell stage embryos. **KEY WORDS:** MOUSE, MONOZYGOTIC TWIN, 2-CELL EMBRYO, SPLITTING.

Jpn J Anim Reprod 33, 51–57, 1987

マウスの2細胞期胚分離による一卵性双生仔の作出

富樫 守・鈴木 宏志・宮井 達也・岡本 道生

中外製薬株式会社開発研究所 171 東京都豊島区高田34-41-8

一卵性双生仔は全く同一の遺伝子組成を持つと考えられることから、動物実験において遺伝因子と環境因子の影響を解析可能とする極めて有用な動物である。また、

その人為的作出は単に子の数を倍增できるだけでなく遺伝的統御が困難な動物種においては、短期間に同一の遺伝子組成を持つ複数の個体が得られるために質の高い動

物実験を可能とし、その利用価値は非常に高いと考えられる。

このようなことから近年、初期胚の分離ならびに切断によって一卵性双生仔や多生仔を作出する試みが盛んに行なわれるようになり、胚分離法によってマウス (Tsunoda and McLaren, 1983)、ヒツジ (Willadsen, 1979, 1980)、ヤギ (角田ら, 1984)、ウシ (Willadsen *et al.*, 1981) でそれぞれ一卵性双生仔が作出されている。さらにヒツジ (Willadsen, 1981) およびウシ (Willadsen and Polge, 1981) では4個に分離した割球から一卵性三つ仔の作出も報告されている。しかしながら、こうした一連の実験は胚を分離してそれぞれの割球を空の透明帯へ帰納、寒天による包埋、さらには同種あるいは異種動物の卵管内で一定期間培養後、受卵雌へ移植するなどの高度な技術と複雑な操作を必要とするものである。

そこで本実験では、簡便かつ効率的な一卵性双生仔の作出法を確立する目的で、マウスの2および4細胞期胚を対象に、操作が簡単なピペティング法による胚分離を試み、その後の体外での胚発生と産仔への発生能力について検討したので報告する。

材料と方法

供試動物および飼育条件 実験には当研究所で維持繁殖している F1 (C57BL/6J×C3H/HeN) および IV CS 系マウスの成熟未経産雌ならびに同系統の成熟雄を用いた。供試動物は温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 50—60%、換気回数 12—15回/hr、照明時間14時間 (5:00—19:00) の動物室内で飼育され、固型飼料 (CA-1, 日本クレア) と水を自由摂取させた。

胚の回収 F1 雌マウスに性周期とは無関係に48時間間隔で PMSG (セロトロピン, 帝国臓器) および hCG (プベローゲン, 三共ゾーキ) を各 5 IU 皮下投与して過排卵誘起を行なった。hCG 投与後直ちに F1 成熟雄と一晚同居させ、翌朝膣栓の確認された個体を妊娠成立とみなし、この日を妊娠 0 日 (Day 0) とした。hCG 投与後約48時間にと殺開腹して卵管を取り出し、直ちに流動パラフィンで覆われたペトリ皿内の BMOC-3 培地 (Brinster, 1971) に移し、卵管灌流法により2および4細胞期胚を回収した。

胚の分離および培養 回収された胚は 0.5% プロナゼ (アクチナーゼ, 科研製薬) を含む Hank's 液内で透明帯を除去した。その後、胚は流動パラフィンで覆われたテラサキマルチプレート (住友ベークライト) 内の 0.02% EDTA を含む Ca^{2+} または $\text{Ca}^{2+}\cdot\text{Mg}^{2+}$ -free

BMOC-3 培地 (Fiser and Macpherson, 1976) 内に移し、10分以内または10—30分間インキュベートした。胚の分離はマイクロインジェクターあるいはマウスピースに接続したガラス毛细管ピペットを用いて、吸引・排出を繰り返すことにより行なった。2分離された胚 (2細胞期胚: 1/2 胚, 4細胞期胚: 2/4 胚) はテラサキマルチプレートの同一 well 内に一対ずつ入れ、BMOC-3 培地内で72時間まで培養 (5% CO_2 , 95% air) し、胚盤胞への発生を観察した。

分離胚の移植 移植には 0.02% EDTA を含む $\text{Ca}^{2+}\cdot\text{Mg}^{2+}$ -free BMOC-3 培地内で10—30分間インキュベート後2分離した 1/2 および 2/4 胚を用いた。胚は48, 72 および96時間培養で胚盤胞へ発生したものを、精管結紮雄 (IV CS 系) との交尾により偽妊娠を誘起した IV CS 系受容雌の Day 2 または Day 3 に子宮角一側当り4—7個ずつ移植した (以下、例えば48時間培養した胚を Day 2 の受容雌に移植した場合は48時間→Day 2 と略す)。受容雌は Day 17 にと殺開腹して着床数、生存胎仔数および死亡胎仔数を調べた。

さらに一卵性双生仔の作出にあたっては、上述と同一条件で分離した 1/2 胚を48時間培養した後、双方の胚が胚盤胞へ発生したものを Day 2 の偽妊娠あるいは妊娠受容雌の子宮角に一対のみ移植し分娩させた。

結 果

胚の分離および培養成績 透明帯除去2および4細胞期胚のピペティングによる2分離成功率を Table 1 に示した。2細胞期胚の分離操作では、分離用培地あるいは処理時間にかかわらず 93.5—100% の成功率でほとんどの胚を分離することができた。一方、4細胞期胚では $\text{Ca}^{2+}\cdot\text{Mg}^{2+}$ -free BMOC-3 培地内で10—30分間インキュベートすることにより 88.2% の胚を2割球ずつに分離することができた。

次に、分離胚を48および72時間培養した時の胚盤胞への発生率を Table 2 に示した。1/2 胚では培養48時間で 67.6—86.8%、72時間では 95.5—100% の胚が胚盤胞へと発生した (Fig. 1)。一方、2/4 胚では培養48時間で分離胚すべてが胚盤胞へと発生した。また、72時間培養で分離胚が双方とも胚盤胞へ発生した割合は、1/2 胚で 93.9—100%、2/4 胚で 100% であり、胚盤胞への発生が分離胚の一方のみであった例はほとんどみられなかった。

分離胚の移植成績 48, 72および96時間の培養で胚盤胞へ発生した 1/2 および 2/4 胚を Day 2 あるいは Day

Fig. 1. In vitro development of the monozygotic pair splitted from 2-cell stage mouse embryo, after 24 (a), 48 (b) and 72 hr (c) in culture.

Table 1. Success rate of splitting 2- and 4-cell stage mouse embryos by pipetting

Stage of embryos	Medium for separation*	Duration of treatment**	No. of embryos	No. of embryos splitted (%)
2-cell	Ca ²⁺ -free	-10	31	29 (93.5)
		10-30	33	33 (100)
4-cell	Ca ²⁺ .Mg ²⁺ -free	-10	19	19 (100)
		10-30	140	132 (94.3)
4-cell	Ca ²⁺ .Mg ²⁺ -free	10-30	119	119 (88.2)

* Embryos were separated in Ca²⁺ or Ca²⁺.Mg²⁺-free BMOC-3 medium containing 0.02% EDTA.

** Minutes.

Table 2. In vitro development of the mouse embryos splitted by pipetting at 2- and 4-cell stage

Type of embryo splitted	Medium for separation*	Duration of treatment**	No. of pairs/ No. of embryos cultured	No. of embryos developed to blastocyst (%)		No. of pairs developed to blastocyst for 72hr***
				48hr***	72hr***	
1/2	Ca ²⁺ -free	-10	29/58	48 (82.8)	57 (98.3)	28 (96.6)
		10-30	33/66	54 (81.8)	63 (95.5)	31 (93.9)
2/4	Ca ²⁺ .Mg ²⁺ -free	-10	19/38	33 (86.8)	38 (100)	19 (100)
		10-30	34/68	46 (67.6)	66 (97.1)	32 (94.1)
2/4	Ca ²⁺ .Mg ²⁺ -free	10-30	12/24	24 (100)	24 (100)	12 (100)

* Embryos were separated in Ca²⁺ or Ca²⁺.Mg²⁺-free BMOC-3 medium containing 0.02% EDTA.

** Minutes. *** Cultivation time.

Table 3. Results of transfer of the mouse embryos splitted at 2- and 4-cell stage

Type of embryo splitted	Cultivation time*	Day of pseudo-pregnancy**	No. of pregnant/ No. of recipients	No. of embryos transferred	No. of implantation sites (%)	No. of dead fetuses (%)	No. of live fetuses (%)
1/2	48	2	3/5	56	17 (30.4)	0	14 (25.0)
	72	2	3/5	52	15 (28.8)	4 (7.7)	4 (7.7)
	72	3	4/5	60	22 (36.7)	0	12 (20.0)
	96	3	2/7	74	11 (14.9)	2 (2.7)	3 (4.1)
2/4	48	2	5/5	49	30 (61.2)	4 (8.2)	14 (28.6)
	72	2	4/5	57	22 (38.6)	1 (1.8)	12 (21.2)
	72	3	3/5	57	16 (28.1)	0	11 (19.3)
	96	3	3/4	43	8 (18.6)	0	3 (7.0)

* Hours. ** Recipient were autopsied on Day 17 of pregnancy.

Table 4. Results of transfer of the monozygotic mouse embryos splitted at 2-cell stage

Recipients*	No. of recipients	No. of pairs/ No. of embryos transferred**	No. of recipients delivered (%)	No. of pups (%)	No. of pairs of monozygotic twins (%)
Pseudopregnancy	26	26/52	7 (26.9)	5 (9.6)	1 (3.8)
Pregnancy	27	27/54	16 (59.3)	22 (40.7)	6 (22.2)

* Embryos were transferred to the recipients on Day 2 of pseudopregnancy or pregnancy.

** Embryos were cultured for 48hr after split.

3 の偽妊娠雌の子宮角に移植した結果を Table 3 に示した。すなわち48時間→Day 2, 72時間→Day 2, 72時間→Day 3 および96時間→Day 3 の組み合わせにおける着床率（着床胚数/移植胚数）は、1/2 胚でそれぞれ 30.4, 28.8, 36.7 および 14.9%, 2/4 胚で 61.2, 38.6, 28.1 および 18.6% であった。また、胎仔生存率（生存胎仔数/移植胚数）は、1/2 胚でそれぞれ 25.0, 7.7, 20.0 および 4.1%, 2/4 胚で 28.6, 21.2, 19.3 および 7.0 % で、1/2 胚および 2/4 胚とも胎仔生存率では、48時間→Day 2 の組み合わせが最も良好であった。なお、一部の組み合わせにおいて低率ではあるが死亡胎仔が観察された。

一対の分離胚の移植成績 上述の成績から胎仔生存率の最も高かった48時間→Day 2 の組み合わせで、1/2 胚を対象に一卵性双生仔の作出を試みた。その結果は Table 4 に示す通りであった。すなわち偽妊娠雌への移植では、受容雌26例に52個（26組）の胚を移植した結果、7例（26.9%）が分娩に至り、計5匹（9.6%）の産仔が得られた。このうち1組（3.8%）が一卵性双生仔であった。一方、妊娠雌への移植では、受容雌27例に54個（27組）の胚を移植した結果、分離胚由来の産仔を分娩した雌は16例（59.3%）で、計22匹（40.7%）の産仔が得られた。このうち一卵性双生仔は6組（22.2%）であった。

考 察

透明帯を除去したマウス 2 細胞期からの分離胚を体外で培養した後、移植によって産仔を得ることは極めて困難とされており（Fiser and Macherson, 1976; 長嶋ら, 1982; 角田・杉江, 1984）、これまで Mullen ら（1970）が1組の一卵性双生仔を得たという報告があるにすぎない。しかしながら、本実験の成績から 1/2 および 2/4 胚とも体外培養により高率に胚盤胞へ発生し、さらにそれらの胚は、胎仔への発生能力を十分に保持していることが示された。したがって一卵性双生仔作出にあたっては、胚の分離操作、体外培養および移植条件などが適切であれば、分離胚そのものの発生能力については特に問題にすることはないと思われる。

胚の分離操作に関して、今回は処理条件の違いによって分離成功率や培養成績に大きな差は認められなかったが、4 細胞期ではすべての胚を 2 割球ずつ均等に分離することができず、一部の胚は 1 個と 3 個あるいは 4 個の割球に分かれる場合があった。しかしながら、ピペッティングによって分離された胚は、マイクロマニピュレーターによって切断分離された胚に比較してその後の発生

率が高く（長嶋ら, 1982）、割球への損傷は極めて少ないと思われた。また、本方法はマイクロマニピュレーターのような特別な装置を用いない上に熟練を必要とせず、しかも分離に要する時間が短時間で済むために、一度に多数の胚を処理することができるといった種々の利点がある。したがって 2 および 4 細胞期胚のように割球数の少ない胚を対象とした場合には、胚の分離法として有効な方法と考えられる。

次に、透明帯を除去したマウス 2 細胞期の分離胚が体外培養を経た後、正常個体へ発生しにくい理由として、長嶋ら（1984）は初期胚の発生・分化といった観点から桑実期に異常な割球配置をとることが、結果的に内部細胞塊の形成不全を引き起こすためと推察している。また、角田・杉江（1984）は 2 細胞期胚を分離後、空の透明帯に帰納した場合、帰納しなかった場合に比べて胚盤胞への発生率が有意に高くなることをみている。これらのことを考え合わせると、確かに透明帯の有無が胚発生に重要であると思われるが、本実験の成績から判断した限りでは、分離胚が体外で正常に発生するために必ずしも透明帯が不可欠であるとは考え難い。いずれにしても体外培養における透明帯の必要性については、今後より詳細な検討が必要であらう。

一方、2 細胞期胚のような発生初期の胚を体外で培養した場合、胚盤胞期での細胞数が生体内で発生した胚に比べて減少することが知られている。（Wiley *et al.*, 1986; Roblero and Riffo, 1986）。Rands（1985）は 2 細胞期胚を分離後、体外で培養した場合、胚盤胞期での細胞数は同一条件で培養された正常胚の約半数となり、全細胞数に対して内部細胞塊の占める割合も少なくなることを指摘している。したがって分離胚から高率に正常個体を得るためには、今後生体環境により近い条件での新しい培養法の検討も必要と思われる。また、内部細胞塊の数と個体への発生能力との関係を明らかにすることは、一卵性多生仔の作出限界を知る上でも非常に興味深い問題である。

体外での培養時間と受卵雌の日齢との関係については、Fisher and Smithberg（1973）が 4 細胞期胚を 2 日間培養後、偽妊娠 1—4 日子宮に移植した結果、2 日子宮への移植が最も良好であったと報告している。本実験においても 1/2 および 2/4 胚ともに 48 時間培養後、2 日子宮へ移植した場合に最も高い胎仔生存率が得られ、彼らの報告と同様の傾向を示すものであった。しかしながら、同一の子宮日齢では培養時間が長い胚を移植した場合の方が胎仔生存率が低下する傾向にあったこと

から、体外での培養時間はできる限り短かい方が好ましいと思われる。また、実際に一卵性双生仔作出にあたっては偽妊娠雌に比較して妊娠雌への移植成績が明らかに良好であったが、Table 3 に示した同一条件 (48時間→Day 2) での偽妊娠雌への移植では成績の向上が認められた。このことから移植には偽妊娠と妊娠の違いよりも子宮内に適当数の胚が存在することが重要と思われた。したがって偽妊娠雌への移植の場合には、毛色などマーカーの異なった系統の胚を同時に移植するなどの工夫が必要と思われるが、実験の効率を考えると妊娠雌への移植が有効と考えられる。

以上、比較的簡便なマウスの一卵性双生仔作出法を確立した。今後作出成功率をより高めるようさらに検討を加えていきたい。

References

- Brinster RL (1971) In vitro culture of the embryo. in *Pathway to Conception* (Sherman AI ed.) Charles C. Thomas Publishing Company, Springfield, Illinois. pp 245-277.
- Fiser PS, Macpherson JW (1976) Development of embryonic structures from isolated mouse blastomeres. *Can J Anim Sci* 56: 33-36.
- Fisher DL, Smithberg M (1973) Host-transplant relationship of cultured mouse embryos. *J Exp Zool* 183: 263-266.
- Mullen RJ, Whitten WK, Carter SC (1970) "Annual Report of the Jackson Laboratory" Bar Harbor, Maine. pp 67-68 (from Nagashima et al. 1984).
- Nagashima H, Fujikura A, Ogawa S (1982) Studies on the developmental ability and the viability after deep freezing of the blastomeres isolated from 2-cell stage embryos in mice and rabbits. *Jpn J Anim Reprod* 28: 20-23 (in Japanese).
- Nagashima H, Kano Y, Ogawa S (1984) Developmental Biotechnology in Mammals (Meeting of New Approach for Mammalian Embryology ed.) Softscience, INC. Tokyo. pp 111-124 (in Japanese).
- Rand GF (1985) Cell allocation in half- and quadrupled-sized preimplantation mouse embryos. *J Exp Zool* 236: 67-70.
- Roblero LS, Rizzo MD (1986) High potassium concentration improves preimplantation development of mouse embryos in vitro. *Fert Steril* 45: 412-416.
- Tsunoda Y, McLaren A (1983) Effect of various procedures on the viability of mouse embryos containing half the normal number of blastomeres. *J Reprod Fert* 69: 315-322.
- Tsunoda Y, Sugie T (1984) Production of monozygotic twin in mice and goats. *Jpn J Anim Reprod* 30: 18-23 (in Japanese).
- Tsunoda Y, Yasui T, Sugie T (1984) Production of monozygotic twins following transfer of separated half embryos in the goat. *Jpn J Zootech Sci* 55: 643-647 (in Japanese).
- Wiley LM, Yamami S, Muyden DV (1986) Effect of potassium concentration, type of protein supplement, and embryo density on mouse preimplantation development in vitro. *Fert Steril* 45: 111-119.
- Willadsen SM (1979) A method for culture of micro-manipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. *Nature* 277: 298-300.
- Willadsen SM (1980) The Viability of early cleavage stages containing half the normal number of blastomeres in the sheep. *J Reprod Fert* 59: 357-362.
- Willadsen SM (1981) The developmental capacity of blastomeres from 4- and 8-cell sheep embryos. *J Embryol exp Morph* 65: 165-172.
- Willadsen SM, Polge C (1981) Attempts to produce monozygotic quadruplets in cattle by blastomere separation. *Vet Rec* 108: 211-213.
- Willadsen SM, Lehn-Jensen H, Fehilly CB, Newcomb R (1981) The production of monozygotic twins of preselected parentage by micromanipulation of non-surgically cow embryos. *Theriogenology* 15: 23-29.

要 約

簡便でかつ効率良く一卵性双生仔を作出する目的で、マウスの2および4細胞期胚をビペッティングにより2分離し、それぞれの胚の胎仔への発生能について検討した。

その結果、ビペッティングによって分離された胚は、透明帯を除去された状態で体外培養した場合でも高率に胚盤胞へ発生した。また、胚分離後の培養時間と移植時期（子宮日齢）との関係においては、1/2 および 2/4 胚ともに48時間培養後、偽妊娠2日目の子宮角に移植した場合に最も高い胎仔生存率が得られた。

実際に一卵性双生仔作出にあたっては1/2胚を対象として偽妊娠あるいは妊娠雌の子宮角への移植を行なった。その結果、偽妊娠雌への移植では1組、妊娠雌への移植では6組、計7組の一卵性双生仔マウスを得ることができた。

以上のことから透明帯を除去したマウスの2および4細胞期からの分離胚は、体外培養を経た後でも胎仔への発生能力を十分保持していること、ならびに2細胞期胚からの一卵性双生仔の作出が可能であることが明らかとなった。