

黒毛和種牛由来ドナー胚の凍結保存方法が核移植成績に及ぼす影響および凍結再構築胚の受胎性の検討

長谷川清寿・岡崎尚之・安田康明・安部茂樹

要 約 牛の初期胚核移植における黒毛和種牛由来ドナー胚の凍結保存方法が核移植成績に及ぼす影響および再構築胚の凍結融解後の受胎性について検討した。

核移植のドナー割球は、場内繋養の黒毛和種供胚牛 5 頭に過排卵処理後人工授精し、その 5 ~ 7 日目に採取した体内由来の初期胚を割球分離して用いた。レシピエント卵子は、摘出卵巣から吸引採取後 20~22 時間成熟培養した卵子を除核および複合活性化処理して用いた。ドナー胚の凍結試験区は、耐凍剤の種類により 1.5M-エチレングリコール(EG)区および 1.4M-グリセリン(Gly)区とし、対照区には新鮮胚を用いた(実験 1)。その結果、融合率は、対照区が 69%(34/49)、EG 区が 68%(21/31)および Gly 区が 83%(80/97)であった。卵割率は、対照区が 68%(23/34)、EG 区が 57%(12/21)および Gly 区が 80%(64/80)であり、Gly 区は EG 区に比べ有意に ($P<0.05$)高い値であった。また、移植可能胚への発生率は、対照区が 12%(4/34)、EG 区が 5%(1/21)、Gly 区が 21%(17/80)であった。

再構築胚の移植試験は 1.4M-Gly で凍結したドナー胚から作出した移植可能な再構築胚(8 個)を 0.2M-トレハロースを添加した 1.5M-EG で凍結融解して、発情後 7 日目の機能黄体を有する交雑種受胎牛延べ 7 頭に、1 頭当たり 1 または 2 個を移植し、経過を観察した(実験 2)。これらの受胎牛のうち 1 頭で 2 胚(25%)が着床し、雄双子が娩出された。産子の娩出時体重は 45.6kg および 32.8kg であった。これらの産子の個体識別は、マイクロサテライトマーカーを用いた DNA 多型領域の解析によって行い、交配種雄牛(ドナー胚の父牛)および供胚牛(母牛)由来の産子であること、ならびに互いに同一の DNA 型を有するクローン個体であることを確認した。

以上のことから、体内由来ドナー胚の凍結保存に用いる耐凍剤としては、1.4M-Gly が 1.5M-EG に比べて有効であることが推察された。また、凍結初期胚由来のドナー割球を用いて作出した再構築胚を再度凍結融解後、受胎牛に移植することによって、受胎牛の受胎および受精卵クローン産子(同腹双子)の娩出を確認できたことにより、ドナー胚の採取・凍結保存、核移植による再構築胚の作出・凍結保存、再構築胚の受胎牛への移植および複数産子の生産を行うことが、技術的に可能であることが示された。

島根県立畜産試験場研究報告第 34 号 : 6-10, 2001

牛の核移植は、経済的価値の高い個体の量産および優良個体の効率的な選抜を目的に、最先端の繁殖複合技術として技術開発が進められてきている。このうち、核移植のドナー細胞に受精卵(初期胚)割球を用いた受精卵クローン牛の作出は、Ushijima ら³⁵⁾が国内で初めて成功して以来、多くの報告^{6,7,12,21,24,27,29)}があり、本県においても、既に 1 例の受精卵クローン産子が得られている²⁾。それらの中で、受精卵クローン牛作出のためのドナー胚の凍結保存方法、再構築胚の体外培養系およびその受胎性、さらに産子の損耗など実用化に向けた問題点が種々指摘されて

いる^{2,5,6,9,12,18,23,29-33,37,39,42)}。これらの課題のうち、核移植のドナーとなる初期胚および核移植後に発生した再構築胚の凍結保存技術を安定化させることは、移植可能な再構築胚の効率的な作出および稀少価値のある優良遺伝資源の有効利用を図るために重要と考えられる。

そこで我々は、核移植のドナーとしての初期胚の凍結保存方法が核移植成績に及ぼす影響を検討した(実験 1)。そして、黒毛和種牛由来の凍結初期胚から作出した移植可能な再構築胚を、凍結融解後に受胎牛へ移植し、移植後の経過を調べた(実験 2)。

材料および方法

実験 1

ドナー割球は、場内繋養の黒毛和種供胚牛 5 頭に過排卵処理³⁾後人工授精し、その 5 ~ 7 日目に採取した体内由来の初期胚(桑実期胚)を割球分離して供試した。初期胚の割球分離は、0.5 % -Protease(Wako)またはマイクロニードルで透明帯を除去した後に 0.05 % -EDTA・2Na 添加 0.125 % -Trypsin (Gibco)処理およびピペッティングによって行った。

レシピエント卵子は、食肉処理場由来の摘出卵巣から吸引採取後 20~22 時間成熟培養した卵子を除核および活性化処理して用いた。活性化処理は、5 μM-Ionophore A-23187(Calbiochem)で 5 分間および 10 μg/ml-Cycloheximide(Sigma) で 6 時間行い、Cycloheximide 処理中にレシピエント卵子の囲卵腔内へドナー割球を挿入した。

核移植卵は Zimmerman's Cell Fusion Medium³⁸⁾ 中で電氣的に融合処理(70V/mm、50 μsec × 2 回)し、融合を確認した核移植卵は CR1aa²³⁾を基礎培地として、既報³⁾に従い発生培養を行った。

試験区は、初期胚の凍結に用いる耐凍剤の種類により 0.1M-トレハロース (Tre:Sigma)を添加した 1.5M-エチレングリコール(EG)区および 1.4M-グリセリン(Gly)区とし、対照区には新鮮胚を用いた。凍結媒液の基礎培地は、20%子牛血清添加修正 Dulbecco's PBS を用い、凍結プログラムは安部ら²⁾の方法に準じた。

得られたデータの統計処理は、²⁾ 検定および Fisher の直接確率計算法で行った。

実験 2

ドナー割球は、場内繋養の県内産黒毛和種供胚牛 1 頭に過排卵処理³⁾後、県内産黒毛和種牛の凍結精液を人工授精し、その 7 日目に採取した桑実期胚 5 個を 1.4M-Gly で凍結融解および割球分離して用いた。レシピエント卵子の前処理、核移植および融合処理は、実験 1 と同様な方法で行った。発生培養は CR1aa を基礎培地として、Mytomycin-C で前処理した牛卵丘細胞を用いた共培養系⁴⁾で行った。核移植後 7 日目に発生した移植可能な胚盤胞期胚は、0.2M-Tre を添加した 1.5M-EG を耐凍剤として凍結保存した。凍結媒液の基礎培地および凍結プログラムは実験 1 の EG 区と同様な方法で行った。

再構築胚の移植は、発情後 7 日目の機能黄体を有する交雑種(F1)受胚牛^{1,11,15,19)}に、1 頭当たり 1 または 2 個の移植可能胚を移植することで行い、その後

の受胚牛の経過を観察した。妊娠診断は、超音波画像診断装置(AlokaSSD-500)を用いて行った。

成 績

実験 1

核移植後の融合率(融合卵数/供試卵数)は、対照区が 69% (34/49)、EG 区が 68% (21/31)および Gly 区が 83% (80/97)であった。卵割率(卵割卵数/融合卵数)は、対照区が 68% (23/34)、EG 区が 57% (12/21)および Gly 区が 80% (64/80)であり、Gly 区は EG 区に比べ有意に(P<0.05)高い値であった。また、移植可能胚への発生率(発生胚数/融合卵数)は、対照区が 12% (4/34)、EG 区が 5% (1/21)、Gly 区が 21% (17/80)であった(図 1)。

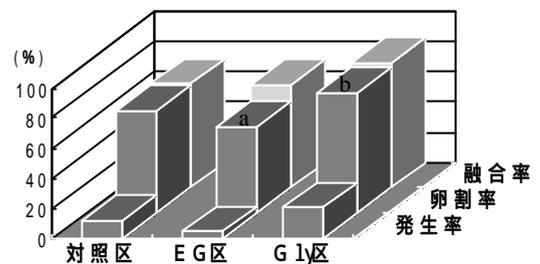


図 1 耐凍剤の区別核移植成績

注)卵割率 EG区とGly区間に有意差(p<0.05)

実験 2

核移植により作出した移植可能な再構築胚は 11 個であり、このうち 8 個の凍結胚を F1 受胚牛延べ 7 頭(2 胚移植 1 頭を含む)に移植した。その結果、F1 受胚牛 1 頭(14.3 %)の双子妊娠を確認した(表 1)。

妊娠した F1 受胚牛は、移植の起点となった発情日から 284 日目に双子を自然分娩した(図 2)。第 1 子は、正常分娩で、生後 6 日目まで自力哺乳が認められたため健常と判断して経過観察を行っていたが、7 日目に体温低下、虚脱、強度脱水等を伴う昏睡状態で発見され、投薬等の治療を行ったが 9 日目に死亡を確認した。第 2 子は、分娩時に異常胎位(縦腹位)と診断して整復を試みたが、無呼吸状態で娩出し、直後に死亡を確認した。なお、娩出時体重は、第 1 子が 45.6kg、第 2 子が 32.8kg であった。

双子産子の病性鑑定(表 2)は、死亡確認後速やかに行った。その結果、直接の死因は第 1 子が肝および腎不全、第 2 子が難産による窒息死と診断された。また、これらの産子には奇形等の先天的な身体異常

表 1 再構築胚の発生および移植成績

項 目	試 験 成 績	
	総 計	ドナー胚 1 個当たり平均
核移植による再構築胚の発生		
供試ドナー胚数	5	
ドナー胚細胞数	262	52.4
供試ドナー割球数	125	25.0
融合卵数(融合率)	70(56.0%)	14.0
卵割卵数(卵割率)	36(51.4%)	7.2
発生胚数(発生率)	11(15.7%)	2.2
受胚牛への再構築胚の移植		
凍 結 胚 数	8	
移 植 胚 数	8	
受 胎 胚 数 (率)	2(25.0%)	
受 胎 牛 延 べ 頭 数	7	
受 胎 頭 数 (率)	1(14.3%)	双胎妊娠 双子分娩



【第 1 子】



【第 2 子】

図 2 娩出した受精卵クローン産子(同腹双子)

は認められなかった。

産子の個体識別は、臍帯血(第 1 子)および心臓血(第 2 子)からそれぞれのゲノム DNA を抽出し、黒毛和種牛で報告されている 23 種類の個体識別マーカー¹³⁾を用いてマイクロサテライト DNA 多型領域⁴⁰⁾を解析した。その結果、第 1 子および第 2 子は交

配種雄牛(ドナー胚の父牛)および供胚牛(母牛)由来の産子であること、ならびに互いに同一の DNA 型を有するクローン個体であることが判明した(表 3)。

考 察

受精卵クローン牛の作出を目的とした核移植においては、ドナー胚およびレシピエント卵子の同時確保が必要であるが、技術的にも物理的にも困難な場合がある。ドナー胚の生存性を低下させることなく凍結保存することができれば、このような問題の軽減につながると考えられる。また、事前に採取したドナー胚を凍結保存後に利用すれば、優良な遺伝資源の効率

表 2 病性鑑定成績

第 1 子	
剖 検 所 見	軽度の腹膜炎、肝および腎の黄色化
病理組織学的検査	肝の出血と細胞変性、腎および肺の鬱血と水腫
微生物学的検査	各臓器からの細菌およびウイルス検出(-)
推 定 死 因	肝および腎不全
第 2 子	
剖 検 所 見	無気肺、気管内羊水貯留、左側円靭帯断裂
病理組織学的検査	著変なし
微生物学的検査	各臓器からの細菌およびウイルス検出(-)
推 定 死 因	異常胎位による難産に起因する窒息死

表3 マイクロサテライトマーカーを用いた個体識別成績

Marker	BTA mapped	AlleleType*			
		Sire	Dam	Clone1	Clone2
IAG283	11	AC	AB	AB	AB
IAG301	3	AA	?	AB	AB
IAG278	24	AC	BC	AB	AB
IAG284	1	AB	BB	BB	BB
IAG308	4	AB	AB	BB	BB
IAG315	15	BB	AB	AB	AB
IAG313	12	BC	AC	AB	AB
IAG281	10	AB	BB	AB	AB
IAG317	8	AC	AB	BC	BC
IAG300	28	BB	AA	AB	AB
IAG288	19	AA	BB	AB	AB
IAG312	9	AB	AB	BB	BB
IAG035	5	AB	BB	AB	AB
IAG119	7	AC	BB	AB	AB
IAG053	7	BC	AB	AC	AC
IAG223	2	AB	AB	BB	BB
IAG133	20	AB	AC	BC	BC
IAG147	23	AA	?	AB	AB
IAG160	26	null	AB	A	A
IAG273	22	AC	BC	CC	CC
IAG140	21	BC	AB	BC	BC
IAG283	6	AB	BB	BB	BB
IAG310	13	BB	AB	AB	AB

*A,B and C:PCR products(A<B<C)

的な確保および保存が可能になる。しかし、現状では、ドナー胚の凍結方法の選択は研究者によって様々である^{2,10,14,16,20,26}。

今回我々は、核移植のドナー胚の凍結に用いる耐凍剤について、既に体内由来の後期桑実期から胚盤胞期の初期胚でその有効性が確認されている1.5M-EG^{8,25}と1.4M-Gly²⁸を選択して、核移植成績を比較検討した。その結果、Gly区の融合率、卵割率および移植可能胚への発生率がEG区および対照区に比べて数値的に高く、特に卵割率はEG区に比べて有意に高率であった。このことから、ドナー胚の凍結保存に用いる耐凍剤としては、1.4M-Glyが1.5M-EGに比べて有効であることが推察された。しかしながら、ドナー胚の凍結に用いる耐凍剤については、1.4M-Glyよりも1.5M-EGを用いた場合に胚盤胞期胚への発生率が高いとする報告¹⁰もみられ、我々の成績とは異なる。供試したドナー胚の細胞数、発育ステージ、割球のロット差の影響などが実験成

績に影響した可能性もあり、これらの耐凍剤を用いる場合の2次冷却速度および凍結媒液への血清添加を含めて、今後例数を重ねて詳細に検討しなければならない。

移植試験では、凍結初期胚由来のドナー割球を用いて作出した再構築胚を再度凍結融解後、受胎牛に移植することによって、受胎牛の受胎および受精卵クローン産子(同腹双子)の娩出を確認できた。ドナー胚の採取・凍結保存、核移植による再構築胚の作出・凍結保存および再構築胚の受胎牛への移植による産子生産が技術的に可能であることは、安部ら²⁾が既に報告しているが、今回の移植試験でも同腹双子として再現された。また、再構築胚からの子牛出生率は25%(2/8)であり、20～25%とする既報^{27,36)}とほぼ同等の成績であった。

一方、1.5M-EGを耐凍剤として凍結融解した再構築胚の受胎性について、Takanoら³⁰⁾が40%(2/5)と報告している。今回の移植試験での受胎成績は25%(2/8)であり、Takanoら³⁰⁾の成績に比べて低率であったが、凍結融解した再構築胚の品質、移植時の受胎牛のコンディション等が影響したと推察された。核移植によって作出した再構築胚は、体外受精胚に比べて総細胞数が少なく凍結融解後の生存性が低い^{10,30)}とされていることから、今後も凍結融解後の生存性を高める再構築胚の発生培養法および凍結法の最適化²⁰⁾を図る必要がある。

今回確認したクローン双子の娩出時体重は第1子と第2子の間で10kg以上の差が認められ、第1子は黒毛和種雄の平均生時体重(30.0kg)³⁴⁾の1.5倍であった。近年、核移植によって作出したクローン産子における過大子症候群が問題となっている^{17,41)}が、過大子の判定基準が未確定であり⁴¹⁾、第1子が過大子と判定できるかどうかについては不明であった。受精卵クローン双子の体重差については、国内でも既に報告されているが³²⁾、その原因を特定するまでには至っていない。さらに、黒毛和種牛由来の受精卵クローン産子の生時体が体内胚由来産子に比べて有意に重いこと⁴⁰⁾および受精卵クローン双子の

体重差³³⁾はすでに国内で報告されているが、その原因は特定されていないのが現状であり、今後、受精卵クローン産子に関するデータを蓄積することによって詳細に検討すべき課題と思われる。

以上のことから、凍結初期胚由来の再構築胚を凍結融解後に受胎牛に移植することによって1個のドナー胚から複数の受精卵クローン産子を作出できることが明らかとなったが、核移植技術を利用した優良種畜の大量生産を目標とした一卵性多子の効率的な作出に向けて、より一層の核移植技術の高位安定化を図る必要があると考えられた。

謝 辞

クローン産子の病性鑑定にご協力いただいた、久保正法農林水産省家畜衛生試験場病理診断研究室長および県家畜衛生研究所の皆様方に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) 安部茂樹ら、島根畜試研報、27:10-14,1992.
- 2) 安部茂樹ら、近畿中国農研、93:100-104,1997.
- 3) 安部茂樹ら、島根畜試研報、32:13-17,1999.
- 4) Akagi,S.,et al,InternationalWorkshop on EmbryogenesisandImplantation(abst.),83,1999.
- 5) Aono,F.,et al,J.Reprod.Dev.,40:j35-j40,1994.
- 6) Aoyagi,K.,et al,J.Reprod.Dev.,45:129-134,1999.
- 7) Bondioli,K.R.,et al,Theriogenology,33:165-174,1990.
- 8) 堂地 修、畜産技術、438:11-16,1991.
- 9) Garry,F.B.,et al,Theriogenology,45:141-152,1996.
- 10) 後藤裕司、日本胚移植学雑誌、20:37-41,1998.
- 11) 長谷川清寿ら、島根畜試研報、28:6-10,1993.
- 12) Heyman,Y. and Renard,J.P.,Anim.Reprod.Sci.,42:427-436,1996.
- 13) Inoue-Murayama,M.,et al, Anim.Sci.Technol.,63:443-449,1997.
- 14) 石井俊昭ら、山口畜試研報、15:9-15,1999.
- 15) 川平 実ら、島根畜試研報、27:6-9,1992.
- 16) 小財千明ら、奈良畜試研報、25:7-10,1998.
- 17) Kruij, Th.A.M.,et al,Theriogenology,47:43-52,1997.
- 18) Lavoit,M.C.,et al,Biol.Reprod.,57:204-213,1997.
- 19) 岡崎尚之ら、島根畜試研報、29:5-10,1994.
- 20) Peura,T.T.,et al,J.Reprod.Fert.,116:95-101,1999.
- 21) Prather,R.S.,et al,Biol.Reprod.,37:859-866,1987.
- 22) Rosenkraus,F. and First,N.L.,Theriogenology,35:266 (abst.),1991.
- 23) 澤井 健、北畜会報、41:23-29,1999.
- 24) Sekizawa,F.,et al,J.Reprod.Dev.,40:j31-j34,1994.
- 25) Smorg,Z.,et al,Theriogenology,33:741-747,1990.
- 26) Stice,S.,et al, Mol.Reprod.Dev.,38:61-68,1994.
- 27) 須崎哲也ら、宮崎畜試研報、11:5- ,1998.
- 28) 鈴木達行・下平乙夫、家畜繁殖誌、31:28-29,1985.
- 29) Takano,H.,et al,J.Reprod.Dev.,42:61-65,1996.
- 30) Takano,H.,et al,Theriogenology,47:1365-1373,1997.
- 31) Tatham,B.G.,et al,Theriogenology,43:335,1995.
- 32) 広岡博之、肉用牛高度肥育技術確立推進事業テキスト 10-1、畜産技術協会:1-15,1999.
- 33) Tsunoda,Y. and Kato,Y.,Anim.Sci.Technol.,68:596-602,1997.
- 34) 農林水産技術会議事務局、日本飼養標準・肉用牛、中央畜産会:129,1987.
- 35) Ushijima,H.,et al,Theriogenology,35:287,1990.
- 36) Westhusin,M.E.etal,Mol.Reprod.Dev.,28:119-123,1991.
- 37) Willadsen,S.M.,Genome,31:956-962,1989.
- 38) Wolefe,B.A. and Kraemer,D.C.,Theriogenology,37:5-15,1992.
- 39) Yazawa,S.,etal,Theriogenology,48:641-650,1997.
- 40) Yazawa,S.,etal,Anim.Sci.Technol.,68:1166-1169,1997.
- 41) Young,L.E.,et al,Rev.Reprod.,3:155-163,1998.
- 42) Zakhartchenko,V.,et al,Mol.Reprod.Dev.,42:53-57,1995.