

割球分離による分離胚作成技術の検討

水木 剛・有安則夫

Development of the blastomere bisection from bovine early embryo

Takeshi MIZUKI and Norio ARIYASU

要 約

核移植を伴う受精卵及び体細胞クローン牛は、国内で数多く作出されているが、肝心の食品としての流通は難しい状況にある。

そこで、核移植を伴うことなく遺伝的に同一な個体を複数作成する技術として、初期胚の割球分離による一卵性複数胚の作成技術について検討した。

- 1 食肉処理場由来卵子と経膈採卵由来卵子を用いて割球分離胚を作成したところ、それぞれ体外受精胚と遜色のない胚盤胞率及び脱出胚盤胞率を示した。
- 2 割球分離胚の培養系について検討したが、血清添加培地と無血清培地の組み合わせによる発生率への影響は認められなかった。

キーワード： 牛、クローン、割球分離胚、切断二分胚

緒 言

核移植を伴う受精卵及び体細胞クローン牛は、岡山県総合畜産センター（以下、当センター）をはじめとする国内の研究機関で数多く作出されている¹⁾。その生産物については、平成15年5月2日には厚生労働省から「クローン牛の食品としての安全性」が公表され、現状では安全性を疑う科学的な根拠のないことが示された²⁾。

しかしながら、依然として体細胞クローン牛の生産物については出荷自粛が求められ、受精卵クローン牛についても任意の表示販売を求められるなど、生産段階においてもクローン牛を受け入れられる状況にないのが実情である。

一方、核移植によらず同一の遺伝情報を持つ複数子を得る方法としては、胚盤胞期胚を切断分離して一卵性双子を作成する技術が知られている。しかしながら、胚盤胞期胚を等分する従来の切断二分胚は、得られる最大頭数が2頭に限られること、及び切断によるダメージが大きいため確実に双子を得られる率が高くないことがデメリットとして指摘されており²⁾、これにかわる技術として初期胚の割球分離による一卵性複数胚作成技術が検討されている。

そこで、本試験では、食肉処理場由来卵子と超音波誘導経膈採卵（以下、経膈採卵）由来卵子から得た2細胞期胚の割球を分離し、卵子の由来の違いが割球分離胚の発生率に及ぼす影響について検討した。

また、割球分離胚に適した培養系を確立するため、培地への牛胎児血清（以下、FCS）添加の有無が、割球分離胚の発生率に及ぼす影響について検討した。

材料及び方法

1 試験1：由来の異なる卵子から作成された割球分離胚の発生率の比較

(1) 未受精卵子の採取及び成熟培養

ア 食肉処理場由来卵子

食肉処理場での卵巣の採材は、平成15年6月16日から7月23日まで週2回のペースで11回、及び同年10月15日から12月17日まで週1回のペースで7回の計18回行った。

採材した卵巣は、1.5リットル容の真空ポット内で、20万単位の抗生物質を含むPBS(-)溶液あるいは生理食塩水で浸漬保存した。なお、真空ポット内外の温度は、「おんどとりJr.」（株式会社ティアンドディ）で10分ごとにモニタリングし、常時20℃前後に収まっていることを確認した。

卵巣は、BSE検査終了後に当センターに持ち帰り、20℃に設定した恒温槽内で保管した。卵

子の吸引採取は翌日の昼頃に行い、直径2～5mmの小卵胞から採取した卵子のうち、ランクA～Cの正常卵を成熟培養に供した。成熟培地にはIVMD-101〔(株)機能性ペプチド研究所〕を用い、38.5℃、5%CO₂、95%Air、湿度飽和状態で22時間培養した。

イ 経膈採卵由来卵子

経膈採卵は、黒毛和種経産牛2頭及びホルスタイン種経産牛2頭を用い、平成15年7月から1週間間隔で計8回実施した。割球分離胚の作成には、そのうちの延べ12頭分を用いた。採卵後直ちに正常卵を選別し、食肉処理場由来のものと同様の方法で成熟培養に供した。

(2) 体外受精

体外受精は、当センターの定法により次のとおり行った。

凍結融解精液をIVF-100〔(株)機能性ペプチド研究所〕で、1,200rpm、5分間の2回遠心洗浄後、精子濃度を 1×10^8 sperm/mlに調整した。この精子浮遊液50 μ lをあらかじめ未受精卵子10個を移しておいた50 μ lの同培地に注入し、媒精を行った。媒精6時間後に0.025%ヒアルロニダーゼ溶液中で卵丘細胞を除去後、5%FCS加CR1aaまたはIVD-101〔(株)機能性ペプチド研究所〕に移して、38.5℃、5%CO₂、5%O₂、95%Air、湿度飽和状態で培養した。

(3) 割球分離胚の作成

割球分離胚の作成は、今井ら³⁾の方法に準じて次のとおり行った。

分離した割球を封入する透明帯は、マイクロマニピュレータを用いて未受精卵子の透明帯を切開し、細胞質を除去して作成した。

割球分離には、媒精後24～28時間に2分割した胚の中から、割球の細胞膜が明瞭なものを選んで用いた。これらの透明帯を0.25%アクチナーゼ〔「アクチナーゼE」(科研製薬株式会社)〕加m-PBS溶液中で除去後、20%FCS加TCM199A内でピペッティングにより緩やかに割球を分離し、あらかじめ用意しておいた空の透明帯に挿入した。

割球分離胚の培養は、当センターにおける体外受精胚の培養方法に準じて、5%FCS加CR1aaまたはIVD-101中で、38.5℃、5%CO₂、5%O₂、95%Air、湿度飽和状態で培養した。さらに、割球分離後48時間(=媒精後72時間)でIVD-101への培地交換を行い、同様の条件で培養を継続して発生評価を実施した。

(4) 割球分離胚の発生評価

割球分離胚は、通常の体外受精胚と比べて半分程度の大きさしかない。そのため、発生ステージの評価については、図1に示すとおりとした。

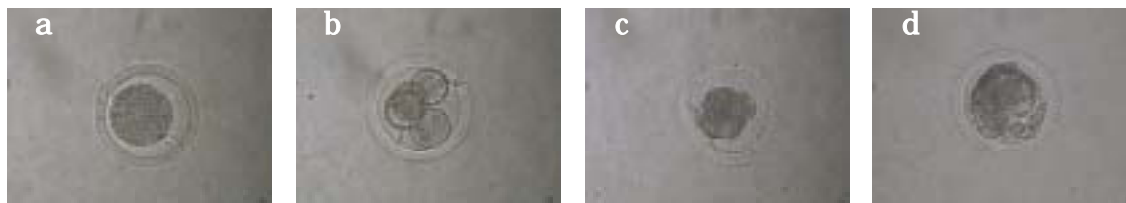


図1 割球分離胚の発生評価

写真aは分離直後の胚、bは再分割胚(分離後1日目)。以下、cを後期桑実胚(分離後4日目)、dを胚盤胞(分離後6日目)とした。なお、胚盤胞まで発生した後に透明帯から脱出したものを脱出胚盤胞とした。

2 試験2：割球分離胚の培養系の検討

(1) 未受精卵子の採取ならびに成熟培養及び体外受精

本試験では、食肉処理場由来卵子のみを割球分離に供した。

食肉処理場での卵巣の採材は、平成16年1月14日から3月10日まで週1回のペースで計8回行った。

採材した卵巣の処理、未成熟卵子の成熟培養、体外受精、割球分離胚の作成及び発生評価については、すべて試験1と同様に行った。ただし、試験区ごとに培地が異なることから、媒精終了後に胚を無作為に振り分けて18～22時間培養し、割球分離後に再び元の培地に戻した。

なお、割球分離に供する2細胞期胚の選択にあたっては、割球の細胞膜が明瞭という条件に加え、割球の大きさが均等であること及び割球の細胞質が均質であることを条件として付け加えた。

また、割球分離胚を挿入する透明帯の数を確保するため、未受精卵に加え、1週間前に体外受精した変性胚も使用した。

(2) 試験区

近年、初期胚用培地に血清添加培地を用いると、桑実期から初期胚盤胞期にかけて起こるミト

コンドリアの発達抑制され、結果として胚の発生に悪影響を及ぼすことが報告されている⁴⁾。そこで、本試験では、血清添加培地（5%FCS加CR1aa）と無血清培地（IVD-101）の組み合わせにより、試験1と同様の培養方法であるFCS(+/-)区、無血清培地のみで培養を行うFCS(-/-)区、及び割球分離後48時間に血清添加培地に培地交換するFCS(-/+)区の3試験区を設定した（表1）。なお、対照区となるFCS(+/-)区は、当センターにおける体外受精胚の培養系である。

表1 試験区の設定

	媒精終了～割球分離後48時間	割球分離後48時間～	備考
FCS(+/-)区	5%FCS加CR1aa	IVD-101	対照区
FCS(-/-)区	IVD-101	IVD-101	
FCS(-/+)区	IVD-101	5%FCS加CR1aa	

結 果

1 試験1：由来の異なる卵子から作成された割球分離胚の発生率の比較

割球分離後の再分割率については、供試胚の由来による差は認められなかった。後期桑実胚率、胚盤胞率及び脱出胚盤胞率についても、経膈採卵由来が食肉処理場由来よりも高い傾向を示しているものの、いずれも有意差は認められなかった。

また、割球分離胚の発生率を体外受精胚と比較したところ、それぞれ遜色のない値を示した（表2）。

なお、割球分離胚の一卵性ペア胚盤胞発生率は、食肉処理場由来で11.8%（6/51組）、経膈採卵由来で21.4%（3/14組）であった。

表2 由来の異なる卵子から作成された割球分離胚の発生率

	供試胚数	分離胚数	(再)分割胚	後期桑実胚	胚盤胞	脱出胚盤胞
食肉処理場由来割球分離胚	64	110	104 (94.5%)	65 (59.1%)	19 (17.3%)	11 (10.0%)
経膈採卵由来割球分離胚	20	36	34 (94.4%)	26 (72.2%)	12 (33.3%)	9 (25.0%)
(参考)食肉処理場由来 体外受精胚	1,929	-	866 (44.9%)	-	300 (16.1%)	135 (7.4%)
経膈採卵由来 体外受精胚	73	-	63 (86.3%)	-	19 (35.8%)	12 (24.5%)

2 試験2：割球分離胚の培養系の検討

いずれの試験区においても、発生率に有意差は認められず、同様の条件で培養した体外受精胚についても試験区間で有意差は認められなかった（表3）。

また、割球分離胚の一卵性ペア胚盤胞発生率は、30.0%（12/40組）であった。

しかしながら、FCS(-/+)区において、割球分離胚の胚盤胞発生のピークが他の2区と比べて早い傾向が観察された（図2）。体外受精胚においては、FCS(-/+)区と他の2区の間有意差が認められた（図3）。

表3 異なる培養系による割球分離胚の発生率

	供試胚数	分離胚数	(再)分割胚	後期桑実胚	胚盤胞	脱出胚盤胞
FCS(+/-)区	16	29	28 (96.6%)	21 (72.4%)	13 (44.8%)	7 (24.1%)
FCS(-/-)区	16	27	27 (100.0%)	20 (74.1%)	11 (40.7%)	4 (14.8%)
FCS(-/+)区	16	29	28 (96.6%)	22 (75.9%)	14 (48.3%)	1 (3.4%)
(参考)体外受精胚の発生成績						
FCS(+/-)区	222	-	183 (82.4%)	-	73 (32.9%)	49 (22.1%)
FCS(-/-)区	222	-	183 (82.4%)	-	74 (33.3%)	51 (23.0%)
FCS(-/+)区	223	-	180 (80.7%)	-	73 (32.7%)	42 (18.8%)

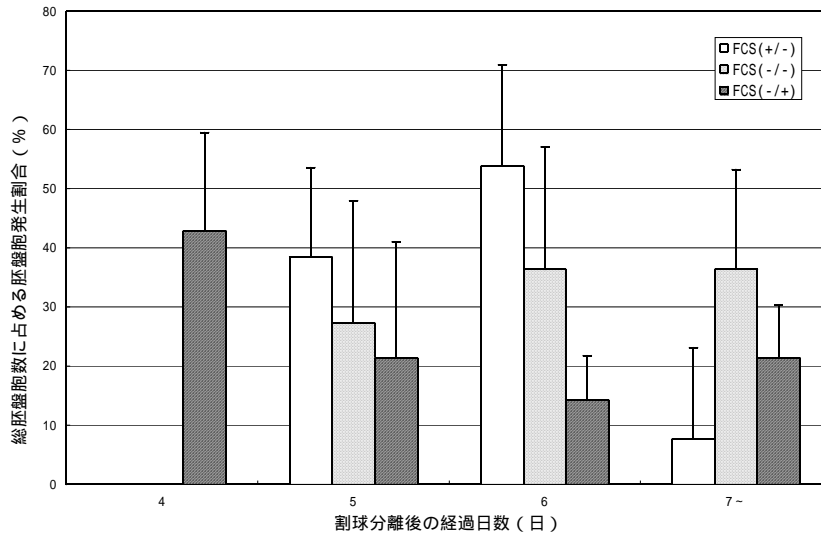


図2 異なる培養系下での割球分離胚の胚盤胞発生時期の推移

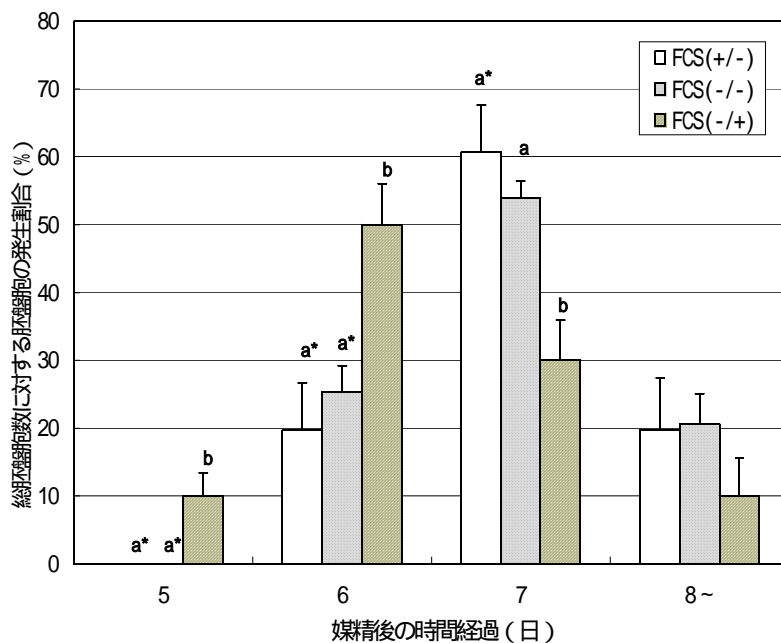


図3 異なる培養系下での体外受精胚の胚盤胞発生時期の推移

異符号間に統計的有意差あり (a*-b: $p < 0.01$, a-b: $p < 0.05$, a-a*: Non Significant)。

考 察

試験1における割球分離胚の胚盤胞発生率及び脱出胚盤胞率は、体外受精胚と遜色のない結果であった。これに対し、供試胚の選択基準を強化した試験2では、すべての試験区において体外受精胚を大きく上回る胚盤胞率を示し、培養系の違いによる発生率の差も認められなかった。そういう意味では、割球分離に供する胚の選択が、割球分離胚の発生にとって最も大きな要因であると考えられる。

一方、試験2において、FCS(-/-)区及びFCS(-/+)区の割球分離胚の脱出胚盤胞率が体外受精胚を下回る結果となった。また、すべての試験区で拡張胚盤胞に相当すると考えられる段階になっても透明帯から脱出できず、そのまま死滅するケースが目立った。これは、媒精後8日目(=割球分離後7日目)前後での移植を前提としている現在の培養系では、体外受精胚の半分ほどの大きさしかない割球分離胚は透明帯を脱出するために必要な大きさに達することができなかったものと考えられた。

また、試験区間の脱出胚盤胞率の違いについては、透明帯の切れ目にばらつきがあり、脱出しやすいものとそうでないものがあつたためと推察された。そのため、実際に割球分離胚を移植する場合には、割球分離胚の作成の際に透明帯に大きな切れ目を入れることや、移植前にピペッティング操作等により透明帯を除去しておくことが必要となるかもしれない。

割球分離操作の中で、胚に最もダメージを与えるのは、透明帯の除去時及び割球を分離するピペッティング時であると考えられる。試験1の過程で、割球の大きさが不均等な胚を割球分離に供した場合に、大きい方の割球の細胞膜が裂けてしまうことが何度かあつた。このことから、ピペッティングの際に無理な力がかかることで、割球の細胞膜に致命的なダメージを及ぼすことは想像に難くない。今後は、本試験での経験を元に、割球間の細胞接着機構に関する情報も詳細に検討し、使用するピペットの構造や酵素の種類等について再度検討を進めていきたい。

今回、試験2に関連して、体外受精胚において媒精後72時間での血清添加培地への培地交換が胚盤胞発生を1日程度早めることが確認された。割球分離胚でも同様の傾向が観察されたことから、今後例数を増やして詳しく検証する必要がある。また、このことが、超低温保存処理時、胚移植時あるいは産子の分娩時にどのような影響を及ぼすのかについても、注意深く検討する必要がある。

また、割球分離胚は体外受精胚の半分程度の大きさで胞胚腔を形成し、この時点での細胞数は体外受精胚の半分程度であることが報告されている³⁾。そのため、インターフェロン⁵⁾・⁶⁾等の胚から母体への妊娠維持シグナルの産生能が低いことが推察されることから、移植試験の際には何らかの検討が必要と考えられる。

さらに、割球分離胚の最大のメリットは切断二分離胚の一卵性双子を超える複数子の生産が可能とされる点であることから、今後は、より発生の進んだ4～16細胞期胚からの2胚以上の割球分離胚の作成について検討していきたい。

謝 辞

本試験の実施にあたり、割球分離胚の作成手法について御指導・御助言をいただきました広島県立畜産技術センター生物工学部の皆様に深謝いたします。

引用文献

- 1) 農林水産省 農林水産技術会議事務局(2003): 家畜クローン研究の現状について, プレスリリース (参照URL; <http://www.s.affrc.go.jp/>).
- 2) 熊谷 進(2003): クローン牛の食品としての安全性, 厚生労働科学研究補助金(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)「バイオテクノロジー応用食品の安全性確保及び高機能食品の開発に関する研究」分担研究報告書.
- 3) 今井昭・尾形康弘・名越吉文・松重忠美・堀内俊孝(2002): 経膈採卵・体外受精由来ウシ2細胞期胚の割球分離による一卵性双子生産. 広島県獣医学会雑誌, 第17号, 9-13.
- 4) 阿部宏之・珠玖 仁・星 宏良(2002): ウシ胚におけるミトコンドリアの形態変化と胚の品質評価. 日本胚移植学雑誌, 第24巻, 1号, 19-27.
- 5) Imakawa K., Anthony R.V., Kazemi M., Marotti K.R., Polites H.G., and Roberts R.M.(1987): Interferon-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophectoderm. *Nature*, 330, 377-379.
- 6) 大谷直人・渡邊貴之・山形重喜・三谷和則・伊藤義文・小野寺健一(2003): ウシ栄養膜小胞の共移植が切断二分離胚の受胎成績に及ぼす影響. 第10回日本胚移植研究会大会講演要旨集, 演題番号31.