

割球分離法を用いた体外受精胚からの一卵性双子生産の検討

榎原正吾・安樂雄太*・瀬戸口浩二・鬼塚剛

要 約

候補種雄牛の早期産肉能力推定に活用するため、割球分離法による一卵性双子生産の検討として、体外受精胚作出における発生培養液の改良に取り組んだ。抗酸化作用等の多様な生理機能を有するラクトフェリン (Lf) を発生培養液に 0.5 % 添加することで、と畜場由来の体外受精胚において孵化率が有意に増加した。また、0.5 % Lf 添加発生培養液を用い、と畜場卵子および経膈採卵卵子由来の分離割球において、胚盤胞発生率が 56.7 % および 37.2 % であり、通常の体外受精胚作出培養と同等な発生成績であった。さらに、作出した割球分離胚を黒毛和種経産牛 30 頭に移植したところ 10 頭が受胎し、1 組の一卵性双子を得た。

キーワード：一卵性双子，割球分離，体外受精胚，ラクトフェリン

緒 言

近年、特定の種雄牛に交配が集中する傾向があり、近交係数の上昇が懸念されるとともに、遺伝的多様性の確保が重要な課題となっていることから、本県肉用牛改良方針に基づく主要系統の種雄牛作成は重要である。

候補種雄牛の産肉能力の推定方法としては、後代検定法が一般的であるが、検定終了までには生後約 5 年もの長い期間を要するため、能力推定期間を短縮する方法の一つとして一卵性双子検定の実用化が望まれる。

候補種雄牛と遺伝的に同一な一卵性双子 1 頭の産肉成績は、後代検定牛 7 頭分の成績に相当するとされている⁹⁾ ことから、生産した一卵性双子の片方の産子を候補種雄牛として育成し、一方の産子を肥育して産肉能力を検定することで、候補種雄牛の能力推定を約 30 か月間ほど、短縮することができる。

当所ではマイクロブレードを用いた切断 2 分離による一卵性双子生産を報告しているが¹⁵⁾、切断時の胚細胞の損傷等によると考えられる受胎性の低下が課題となっている。

そこで本研究では、体外受精胚において割球が全能性を持つ 2 細胞期での割球分離^{9)、10)}による一卵性双子作出について検討した。

試験 1 では、ヒトや牛の初乳中等に含まれる鉄結合性糖タンパク質であり、抗菌、抗炎症および抗酸化作用等の多様な生理機能を有する^{14)、16)} ラクトフェリン (Lf) を、体外受精胚作出における発生培養液に添加すること

で、胚発生における効果を調査した。

試験 2 では、と畜場および経膈採卵 (Ovum Pick Up ; OPU) 由来卵子から作出した分離割球について Lf 添加発生培養液での発生成績を調査した。また、OPU 卵子由来の割球分離胚を黒毛和種経産牛に移植し一卵性双子の生産を試みた。

試験材料および方法

1 試験 1 ; 体外受精胚作出における発生培養液の改良

(1) 供試卵子

県内のと畜場で採取した黒毛和種の卵巣から既報⁵⁾に準じ卵丘細胞卵子複合体 (COCs) を回収し、38.5 °C 飽和湿度の 5 % CO₂ 気相条件下で 21 ~ 23 時間成熟培養した。

(2) 体外受精 (IVF)

供試卵子と凍結融解精液 (黒毛和種) を、38.5 °C 飽和湿度の 5 % CO₂ 気相条件下で 6 時間、媒精液 (IVF100 ; 株式会社機能性ペプチド研究所, 山形) を用いて IVF を行った。IVF 後、卵子周囲の卵丘細胞はピペッティング操作により完全に除去した。

(3) 発生培養

体外発生培養液 (5 % FBS 添加 CR1aa) 150µl を基礎培養液とし、Lf (ラクトフェリン, 牛乳由来 ; 富士フィルム和光純薬株式会社, 東京) 0.5 % (W/V) 添加区および無添加区の 2 区に設定し、推定接合子を無作為に各区同数として振り分け 38.5 °C 飽和湿度の 5 % O₂, 5 % CO₂ および 90 % N₂ 気相下で培養し、IVF 開始後 24 ~ 30 時間で未受精卵を除き、残りは継続して培養液を途中交換することなく培養した。

(連絡先) 肉用牛改良研究所新技術開発研究室

*鹿屋食肉衛生検査所

(4) 調査項目

培養 7 日目の胚盤胞発生数および 10 日目までの孵化胚数について調査した。

(5) データの分析

統計処理は、胚盤胞発生率と孵化率については、 χ^2 検定で行った。

2 試験 2；割球分離法を用いた一卵性双子生産

(1) 供試胚

ア と畜場由来胚

試験 1 と同様の方法で、と畜場由来の COCs を IVF した後、0.5 % Lf 添加発生培養液で培養し、IVF 開始後 24 ~ 30 時間で均等に分割した 2 細胞期胚 60 個を割球分離に供試した。

イ OPU 由来胚

卵子の品質向上を目的として、性周期の任意時期に腔内留置型プロゲステロン (P) 製剤 (CIDR；サージミワキ株式会社、東京) の挿入と同時にエストロジェン製剤 (E2；エストラジオール、共立製薬株式会社、東京) を 1ml 投与 (Day0) した後、Day4 から 3 日間の FSH 製剤 (アントリン R；共立製薬株式会社、東京) 18AU の漸減投与を実施し、Day6 でプロスタグランジン F2 α 製剤 (PG；クロプロステノール C；フジタ製薬株式会社、東京) 2ml を投与、Day7 で CIDR を抜去して OPU に供試した^{3), 19)}。

所内で飼養されている黒毛和種経産牛延べ 64 頭から COCs492 個を採取し、IVF 開始後 24 ~ 30 時間で均等に分割した 2 細胞期胚のうち 176 個を割球分離に供試した。

(2) 割球分離

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、静岡) で除去後、0.5 % Lf 添加発生培養液にて 10 回洗浄後、同培養液内でパスツールピペットを用い、ピペッティング操作により割球を分離した。

(3) 分離割球の発生培養

分離割球を個別管理用ディッシュ (LinKID@micro；大日本印刷株式会社、東京) に移し、0.5 % Lf 添加発生

培養液を用い、20 個程度のグループで発生培養¹¹⁾を培養液を途中交換なく継続した。

(4) 調査項目

と畜場卵子由来分離割球は、4 細胞期胚、桑実胚および培養 7 日目の胚盤胞発生数を計測した。OPU 卵子由来分離割球は、培養 7 日目の胚盤胞発生数および胚の品質を評価した。胚の品質評価は、国際胚移植学会マニュアルに準じて行い、excellent と good を A ランク、fair を B ランク、poor を C ランクとした。

(5) 割球分離胚の移植

胚盤胞まで発育した OPU 卵子由来のペア割球分離胚 (A または B ランク：図 1) を 1 本の 0.25ml のプラスチックストロー (富士平工業株式会社、東京) に封入し、所内および県内で飼養されている黒毛和種経産牛 30 頭に発情から 6 ~ 8 日目の黄体が存在する卵巣側の子宮腔へ新鮮胚移植した (2 胚 1 頭移植)。

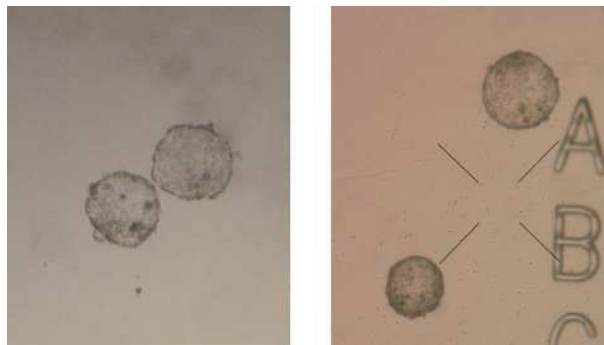


図 1 ペア割球分離胚

左：両方 A ランク胚，右：A (上) と B (下) ランク胚

結 果

1 試験 1；体外受精胚作出における発生培養液の改良
胚盤胞発生率は無添加区、Lf 添加区それぞれ 32.9 % (74/225)、30.6 % (66/216) で、うち拡張胚盤胞発生率ともに有意差は認められなかった。

孵化率は無添加区で 7.6 % (17/225)、Lf 添加区で 20.4 % (44/216) であり、添加区で有意に増加した (表 1)。

表 1 発生培養液への Lf 添加による胚の発生・孵化数 (試行回数：8 回)

区分	供試胚数	媒精後 7 日目		媒精後 10 日目
		胚盤胞発生数 (%)	うち拡張胚盤胞発生数 (%)	孵化数 (%)
無添加	225	74 (32.9)	14 (6.2)	17 (7.6) ^a
0.5%	216	66 (30.6)	16 (7.4)	44 (20.4) ^b

a - b) 同列異符号間で有意差あり (P < 0.05)

2 試験 2；割球分離による一卵性双子生産の検討

(1) と畜場卵子由来分離割球の発生成績

4 細胞期胚までの発生率は 98.3 % (118/120) で、桑実胚発生率は 90.0 % (108/120)、胚盤胞発生率は 56.7 % (68/120) であり、ペアでの胚盤胞発生率は 36.7 % (22/60) であった (表 2)。

(2) OPU 卵子由来分離割球の胚盤胞発生率と品質評価
胚盤胞発生率は 37.2 % (131/352) で、品質別では A

ランク 11.6 % (41/352)、B ランク 20.2 % (71/352)、C ランク 5.4 % (19/352) であり、ペアでの胚盤胞発生率は 29.5 % (52/176) であった (表 3)。

(3) 割球分離胚の移植

黒毛和種経産牛 30 頭への移植成績は、10 頭が受胎し (受胎率 33.3 %)、1 頭が双子を分娩 (雌, 32.8kg, 31.2kg)、7 頭が単子を分娩し、2 頭が流産した (表 4)。

表 2 と畜場卵子由来分離割球の発生数 (試行回数：6 回)

割球数	発生数 (%)			ペア発生数 (%)
	4細胞期胚	桑実胚	胚盤胞	
120	118 (98.3)	108 (90.0)	68 (56.7)	22 (36.7)

表 3 OPU 卵子由来分離割球の胚盤胞発生数および品質別割合 (試行回数：42 回)

割球数	品質 (%)				ペア発生数 (%)
	総数 (%)	A	B	C	
352	131 (37.2)	41 (11.6)	71 (20.2)	19 (5.4)	52 (29.5)

表 4 OPU-IVF 由来割球分離胚の移植成績

移植頭数	受胎頭数 (%)	産子		
		双子	単子	流産
30	10 (33.3)	1	7	2

考 察

試験 1；体外受精胚作出における発生培養液の改良

Lf の持つ抗菌、抗ウイルス効果は、Lf の鉄を結合する性質と強い関係があるとされ^{16), 17), 18)}、抗酸化作用についても、Lf が鉄をキレートすることで、ヒドロキシラジカルを消去する働きによると考えられている¹³⁾。胚発生において活性酸素、特に細胞損傷の原因となるヒドロキシラジカルが多量に発生することが報告されており²⁾、体外培養では生体内と比較してヒドロキシラジカルが解毒されず蓄積しやすい環境と推測される。

本試験では、前試験として 0.1 ~ 1 % 濃度の Lf を発生培養液に添加したところ 0.5 % が最適濃度であった。その 0.5 % Lf の添加発生培養液では、孵化率が有意に増加し、Lf が孵化率に有益に働くことが示唆されたが、胚盤胞発生率に改善は認められなかった。今後、既報で培養液にグルコース⁷⁾ 添加や個別培養におけるヒト・マウス白血病抑制因子⁸⁾ 添加が孵化率向上に寄与しているが、Lf が孵化率にどのように関わるのか、品質改善効

果の有無等については更なる詳細な検証が必要と考えられた。

試験 2；割球分離法を用いた一卵性双子生産

当所ではこれまで、一卵性双子の生産法として、体内および体外受精胚の桑実胚～胚盤胞期でのマイクロブレードを用いた切断 2 分離を実施してきた^{12), 15)}。この方法は切断時の胚細胞損傷等によると考えられる胚の発育性や受胎性の低下が課題となっている。そこで本試験では、体外受精胚において割球が全能性を持つ 2 細胞期にピペッティング操作により割球を分離する割球分離法^{9), 10)} による一卵性双子生産を試みた。

と畜場卵子由来分離割球を 0.5 % Lf 添加発生培養液にて培養することで、試験 1 と同等・それ以上の胚盤胞発生率が得られた。また同液を用いて作出した OPU 卵子由来割球分離胚の移植成績から、既報の体外受精胚⁴⁾ や体内分割胚¹⁵⁾ の移植試験受胎率と比較して同等な受胎成績が得られた。

産子としては、一卵性双子が 1 組生産されたが、単子

の分娩が多かった。本試験では2胚1頭移植を実施したが、胚移植による双子妊娠では単子と比較して片胚または両胚の早期胚死滅の発生率が高く、また双子産子の生時体重は標準体重の80～90%とも報告されており¹²⁾、候補種雄牛は良好な発育が求められることから、ペアの割球分離胚をそれぞれ別の個体に移植する1胚1頭移植の検討が必要と考えられた。

今後は、種雄牛の能力推定期間を短縮する一卵性双子検定の実用化のため、栄養膜小胞の共移植による受胎率向上¹⁾等更なる技術改善による一卵性双子の安定的生産が求められる。

謝 辞

本稿を終了するにあたり各試験に多大なご協力を頂いた株式会社ナンチク、鹿児島県末吉食肉衛生検査所並びに県内肉用牛農家の皆様に深謝いたします。

引用文献

- 1) Hashida, Y. M. OKADA and K. IMAI. 2005. Transition of the Pregnancy Rate of Bisected Bovine Embryos after Co-transfer with Trophoblastic Vesicles Prepared from *In Vivo*-cultured *In Vitro*-fertilized Embryos. *Journal of Reproduction and Development*, Vol.51, No.6
- 2) 星宏良 1998. 哺乳動物胚の酸化ストレス障害とその制御, 化学と生物 Vol.36, No.2
- 3) 今井敬 2016. 経膈採卵による胚生産技術の概要, 臨床獣医 34 (9) :12-17
- 4) 磯部知弘 2009. 繁殖不適雌牛および妊娠牛へ経膈採卵 (OPU) 技術の現場応用, 鹿児島農総セ研報 3:79-83
- 5) 磯部知弘 2016. 絹タンパク質セリシンを用いたウシ胚の個別培養培地と無血清凍結保存液の開発, 鹿児島農総セ研報 10:171-188
- 6) 小西一之・橋谷田豊・浅田正嗣・岡田真人・斎藤邦彦・熊谷周一郎 2005. 肉用牛における一卵性双子の生産, 日本胚移植学雑誌 27 : 108-117
- 7) 小西正人 1994. ウシ体外受精卵の胚盤胞への発生に及ぼす卵丘細胞との共培養における合成培地へのグルコース添加の影響
- 8) Lee, E.S.Y.G.Jung, N.Araki and Y.Fukui. 1996. Effect of Human or Murine Leukemia Inhibitory Factor on *In Vitro* Development of Bovine Morulae Cultured Singly or in a Group. *J.Mamm.Ova Res.* Vol.13
- 9) 水木剛・有安則夫 2004. 割球分離による分離胚作成技術の検討, 岡山総畜セ研報 15:23-27
- 10) 農研機構 2017. 農研機構シンポジウム「家畜繁殖

現場の強化に向けた課題と求められる研究開発」資料 17-20

- 11) O'Doherty, E.M. Wada MG. Hill JL. and Boland MP. 1997. Effects of culturing bovine oocytes either singly or in groups on development to blastocysts. *Theriogenology* 48 (1), 161
- 12) 大田均・田崎道弘・猪八重悟・立山昌一・渡辺洋一郎・加治佐修・窪田力・川畑孟・田原孝二・山田一郎 1992. 牛の双子生産における産子の能力発現技術の開発に関する研究, 鹿児島畜試研報 24:1-19
- 13) Sandomirsky, B.P. 2003. Antioxidative properties of Lactoferrin from bovine colostrum before and after its lyophilization. *CryoLetters* 24, 275-280
- 14) Shinmoto, H.S. Dosako and I. Nakajima 1992. Antioxidant activity of bovine lactoferrin on iron/ascorbate induce lipid peroxidation. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 12, 2079 -2080.
- 15) 白井彰人・新原慎一・池畑義久・磯部知弘・川嶋啓介・溝下和則 2017. 二分胚による黒毛和種牛の一卵性双子作出技術の改善, 鹿児島農総セ研報 11:111-117
- 16) 上野宏 2012. 機能性食品素材としての鉄・ラクトフェリンの応用, *Milk Science* Vol.61 No.2:105-113
- 17) 上野宏 2013. 鉄・ラクトフェリンの形成における諸性質と鉄強化食品素材としての応用, *Milk Science* Vol.62 No.3:112-118
- 18) 山口英世 2000. 多機能タンパク質ラクトフェリンの抗真菌作用と医療への応用, 生物と化学 VOL.38. No.9
- 19) 吉野仁美 2018. 畜産試験場における経膈採卵一体外受精 (OPU-IVF) 技術の導入とその活用, 北獣会誌 62, 10:1-4

Examination of Monozygotic Twins Production Technology Using Blastomere-separated in Vitro Producton Embryos

Seigo Sakakihara, Yuuta Anraku, Kouji Setoguti and Takeshi Onituka

Summary

We investigated the production technology of monozygotic twins using blastomere-separated embryos in order to take advantage early ability estimation of the prospective bulls, worked on improving the developmental culture medium in in vitro production (IVP) embryo. Adding of 0.5% lactoferrin (Lf), an iron-binding glycoprotein, to the developmental culture medium significantly increased the hatched embryo rate for slaughterhouse-derived IVP embryos. Using the 0.5% Lf-added developmental culture medium, Blastocyst development rate of slaughterhouse-derived or Ovum Pick-Up derived isolated blastomeres were 56.7% and 37.2%, respectively. By transplanting isolated blastomere embryos into 30 recipients of Japanese Black cows, 10 recipients were conceived and produced a pair of monozygotic twins.

Keywords :blastomere separation, IVP embryo, lactoferrin, monozygotic twins