



Title	育種効率化を目指したウシ体外受精卵生産技術に関する研究
Author(s)	加川, 真二郎
Citation	北海道大学. 博士(農学) 甲第15226号
Issue Date	2022-12-26
DOI	10.14943/doctoral.k15226
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/91688">http://hdl.handle.net/2115/91688</a>
Type	theses (doctoral)
File Information	Kagawa_Shinjiro.pdf



[Instructions for use](#)

育種効率化を目指したウシ体外受精卵生産技術に関する研究

北海道大学 大学院農学院

農学専攻生命フロンティアコース 博士後期課程

加川 真二郎

## 目次

第一章	序論 .....	1
第二章	ガラス化保存した未受精卵子を利用した子ウシ生産系の開発	
	緒言 .....	7
	材料および方法 .....	9
	結果 .....	15
	考察 .....	17
	表および図 .....	20
第三章	妊娠認識を補助する栄養膜小胞の凍結融解後の生存性改善および子宮への移植後の動態	
	緒言 .....	25
	材料および方法 .....	28
	結果 .....	34
	考察 .....	37
	表および図 .....	41
第四章	遺伝的能力の判定精度を高める一卵性双子生産技術の開発	
	緒言 .....	53
	材料および方法 .....	56
	結果 .....	61
	考察 .....	63
	表および図 .....	68
第五章	総括 .....	77
	要旨 .....	80
	謝辞 .....	84
	参考文献 .....	85
	付表 .....	97

## 第一章 序論

### 我が国の肉用牛の改良増殖について

我が国には和牛と呼ばれる固有の食肉専用品種が存在し、黒毛和種、褐毛和種、日本短角種、無角和種の4品種が存在するが、特に黒毛和種は、国内における代表的な和牛として最も多く飼養され、国内で飼養されている和牛の95%以上を占める。本品種の特徴として、赤身に脂肪が網目状に入り込む脂肪交雑、いわゆる"霜降り"状態の食肉生産に特に優れており、特有の香気や柔らかさを有する高品質な食材として認知され国内において高級食材として流通しているのみならず、海外においても"Wagyu"として高く評価されている。このことから、和牛肉は我が国の重要な食資源として、今後も輸出の伸びが期待される重点品目として位置づけられている [1]。

黒毛和種の育種改良体制は、世界的規模で育種改良されている代表的乳用種であるホルスタイン種とは全く異なる。黒毛和種の種雄牛は、一部は民間事業者や家畜改良センター等により造成されているが、大部分は都道府県単位で育種改良が進められている。優れた種雄牛の開発は、和牛肉のブランド化といった地域経済効果と密接に結びついていることから、産地間競争へとつながり各県が競い合って優れた種雄牛開発に取り組んでいる。肉用牛に求められる能力としては、枝肉重量や歩留まりといった産肉形質があるなかで、特に黒毛和種の場合では、脂肪交雑が最も重要視される。脂肪交雑はその多寡によって枝肉の市場価値が大きく左右されることから脂肪交雑を軸とした改良が重点的に進められ、その結果、黒毛和種は世界的に見ても類を見ないほど脂肪交雑を生み出す能力が高いウシ品種として確立された。

### ウシの繁殖技術、特に受精卵移植技術について

家畜の育種改良は、経済形質の有用性を高めるべく選抜と淘汰によって進められるが、その基盤となる技術が繁殖技術といえる。歴史的にも、育種改良を効率的に進めるため、繁殖技術は重要な手段として貢献してきた。具体的な例としては、精液の凍結保存技術と人工授精技術である。凍結保存技術の確立は、精液の広域的な流通を可能にし、人工授精によって多数の雌ウシへの交配を可能とさせた。これにより、種雄牛の選抜圧を格段に高めることが可能となり、種雄牛選抜による育種改良の効率が飛躍的に向上した。

さらに、ウシの受精卵移植技術の発展は、従来の凍結精液を用いた雄側からの改良だけではなく、雌側からの改良も可能にした。すなわち、優れた遺伝的能力を有する雌ウシに対して過剰排卵処置を施すことで効率的な受精卵生産が実現し、他の雌ウシを受胎牛（レシピエント）とする受精卵移植により遺伝的能力の高い後代を効率よく作出することが可能となった。特に、ウシは単胎かつ妊娠期間が長期であることから、通常の交配手段であれば生涯の産子数は10頭前後が限界となるが、受精卵移植技術を用いれば排卵数に応じて大幅に増やすことが可能となることから、近年は受精卵移植頭数が増加している [2]。

ウシの受精卵移植技術は、1951年に Willett らが外科的手法を用いて体内受精卵を移植することで子ウシを得たことにより幕を開けた [3]。さらに、1964年には Mutter らが、1965年には杉江が非外科的手法による受精卵移植によって子ウシの生産に成功し [4,5]、本技術の実用化への道筋がつけられていった。その後、1973年に Wilmut と Rowson により受精卵の凍結保存技術が開発されたことにより [6,7]、急速に実用化が進んでいった。

一方で、体内 (*in vivo*) ではなく体外 (*in vitro*) で受精させる体外受精技術も進展した [8]。1982年に Brackett らが体外受精によって得られた受精卵からの子ウシの生産に初めて成功し [9]、その後、卵巣の未成熟卵子を成熟させる体外成熟 (*in*

*vitro* maturation: IVM)、体外受精 (*in vitro* fertilization: IVF)、受精卵の体外培養 (*in vitro* culture: IVC) のそれぞれにおいて技術が開発されていき、1987年には成熟・受精・発生のすべての行程が体外で可能となった [10]。現在では、特定の雌ウシ生体から卵子を吸引採取する経膈採卵 (Ovum pick-up: OPU) の技術も確立され [11]、体外受精による受精卵生産は多様になった。OPUは繰り返し卵子を採取することができることから優秀な雌ウシから効率よく受精卵生産することが可能となり [11]、種雄牛造成の場面においても活用されている。

### 種雄牛の遺伝的能力評価と一卵性双子について

育種改良を進めるためには遺伝的能力の高い雄ウシを能力検定し、種雄牛として選抜する必要があるが、その能力評価方法と評価の正確度は、遺伝的改良を推進する上での重要な要素となる。現状の肉用種雄牛としての産肉能力を効率的に検定する方法は、直接検定法と現場後代検定法の2段階の検定方法から構成される [12]。直接検定法では、一定の検定条件を満たし環境要因を揃えた検定場において、種雄牛候補となる雄子ウシ自身の発育能力や飼料利用性について調査が行われる。次いで、現場後代検定法では、候補種雄牛の後代を15頭以上肥育し、それらの枝肉情報から評価が行われる。多頭数の後代の成績が活用されるため高い精度で評価結果が得られる反面、後代の肥育期間は30か月程度であり、また検定種雄牛の精液採取、および後代生産の期間も含むことから、検定終了までに6年以上という長い期間を要する。このように種雄牛開発には長い時間とコストがかかることから、効率的な能力評価方法の開発が模索されてきた。その方法の一つとして、一卵性双子を活用した双子検定が知られている [13]。これは、一卵性双子のうち、1頭を種雄候補牛として待機させておき、もう1頭を去勢および肥育して産肉能力の評価に供し、これに基づいて候補牛を選抜する方法である。一卵性双子と同様に、同

一の遺伝子を保有する個体を利用するクローン検定では、理論的には遺伝率が 0.4 の形質では、1 頭のクローン牛の成績は、6 頭の後代検定の正確度に相当する [14]。ただし、クローン技術は家畜登録制度上の制約があり、またクローン胚における遺伝子発現調節を制御するエピジェネティック修飾状態の異常が払拭できていないなど多数の問題があることから [15-17]、現状では受精卵の分割等による一卵性多子生産が能力評価への利用に向けた現実的な手段と考えられる。

さらに近年、遺伝的能力の評価方法として、ゲノム DNA 中の一塩基多型 (Single nucleotide polymorphism: SNP) の情報を利用したゲノム育種価評価に基づいたゲノム育種が普及し、遺伝的改良の効率が飛躍的に向上している [18]。これにより、個体をと畜しなければ評価できない「と体形質」についても、候補牛のゲノム評価によってと畜することなく直接評価値を推定することが可能となった。しかし、ゲノム評価値の信頼度は形質によって異なっており、信頼度が低い形質もある [18]。このため、現状では全ての形質について信頼度の高いゲノム評価を実施することは不可能である。そこで、肉用牛の種雄牛造成においてゲノム育種価による評価と、ゲノム評価値の信頼度が低い形質については一卵性双子による候補牛と同一の遺伝子を保有する個体の計測値に基づいた評価を組み合わせることで、総合的により信頼性の高い遺伝的評価が下せる可能性がある。具体的には、現時点でゲノム評価値の信頼度の低い脂肪交雑などの形質では [18]、環境による影響を排した状況で候補牛の一卵性双子の表型値に基づいて遺伝的能力を評価し、ゲノム評価値の信頼度が高い形質 (枝肉重量など) の評価と総合的に判断することで、需要の高い経済形質を網羅した正確な候補牛の遺伝的評価が下せるかもしれない。

また、一卵性双子生産は、マウスの近交系のように遺伝的背景を揃えた各種試験を行うことにも利用できるかもしれない。また、同性 2 胚の移植は、異性 2 胚の受胎によって雌が不妊となるフリーマーチンの発生も回避することができ、子ウシの

増産にも繋がることが期待される。これらのことから、ウシの一卵性同性双子を効率的に生産する意義は大きい。

### ウシの一卵性双子生産についての研究と課題

ウシは単胎動物であり分娩あたり1頭の子ウシを産むが、稀に1個の受精卵が2個の受精卵に分かれることによって一卵性双子が誕生する。通常では一卵性双子の発生頻度は和牛では0.1%程度といわれており [19]、非常に低い発生頻度となる。そのため、受精卵移植や体外受精技術の進歩に伴い、人為的に双子を含む一卵性多子を生産する研究が多く行われてきた [20,21]。当初、ウシにおいての一卵性双子の生産は、体外受精技術が確立されていなかったことから、発生初期の割球を分離後、寒天に封入して卵管に戻すという煩雑で手間のかかる手段がとられた [21]。その後、子宮内で発育した胚盤胞期の受精卵を子宮灌流により回収した後、切断ブレードで2等分に切断する方法が成功し [22]、主流となった。しかし、本手法の煩雑さ故に普及には至らなかった。さらに、細胞を物理的に切断するという手法は、切断自体が細胞への傷害を引き起こして発生能を低下させてしまうという問題もあった。体外受精の技術体系が確立されるようになってからは、外科的に卵管から採取するしか方法がなかった発生初期の受精卵を培養できるようになり、発生初期胚を分割する方法が考案された。すなわち、体外受精後、2細胞期の受精卵の割球を1個ずつ分離し、それぞれを移植可能な胚盤胞まで培養する方法である [13,23]。本方法は切断法による物理的な損傷を抑えることができることから、切断法よりも安定的な手法とされているものの、双子生産効率自体は高いものではなかった。一般的におよそ50%の確率とされる受精卵移植による受胎を、2つの胚が同時に達成しなければならないという前提条件に加え、性判別と組み合わせる技術については検討されておらず、雌雄の選択が不可能だったことが普及を妨げてきた要



因だと推測される。

## 本研究の目的

本研究は、ウシの多様な改良増殖戦略を実現するため、OPU と IVF による体外受精卵生産技術を基盤としたウシ受精卵移植関連技術の改良を目指した。OPU により優秀な雌ウシから卵子を効率的に採取することができるが、卵子の凍結保存はその利用性をさらに高めることができ、育種改良の観点からも有用である。ウシ卵子の凍結方法として、高濃度の耐凍剤を使用して急速に凍結するガラス化凍結法が現状では最適であると考えられているが、融解後の受精卵発生率は、新鮮卵子と比べて未だ低い。そこで第二章では、ガラス化凍結した OPU 卵子に対して顕微授精を行うことで確実に受精卵を得る方法の開発を試みた。第三章では、ウシ受精卵移植における受胎性を向上させる目的で妊娠補助効果が期待されている栄養膜小胞 (Trophoblastic vesicles: TVs) を研究対象とした。TVs の効率的な作製条件の検討および最適な凍結保存条件の決定に加えて、TVs の子宮内での動態を解析した。第四章では、効率的な肉用種雄牛造成に活用することを目的として、雌雄判定を伴った一卵性双子の生産技術の開発に取り組んだ。

## 第二章 ガラス化保存した未受精卵子を利用した子ウシ生産系の開発

### 緒言

経膈採卵 (Ovum pick-up: OPU) 技術は、雌ウシの生体卵巢を超音波診断装置により映し出し、膈壁から採卵針を貫通させて卵胞を穿刺し、卵子を吸引回収する技術である [11]。ウシでの OPU は 1988 年に Pieterse らにより、ヒトの卵子吸引採取技術を応用する形で開発された [24]。優れた能力を持つ雌ウシから繰り返し卵子を採取でき、体外受精により受精卵を継続的に生産することができることから、従来の過剰排卵処理法による体内受精卵の生産と共に近年普及が進んできている技術となっている [11,25]。OPU 卵子の利用は、と畜場由来の卵巢から採取した卵子よりも雌ウシの遺伝資源を効率化することができる。これに加えて OPU 未受精卵子を凍結保存しておくことが可能となれば、優れた雌ウシの卵子を最大限に活用できるため、育種改良に絶大な効果を与えることが期待される。これまでにウシ卵子の低温保存方法として種々の方法が考案されている中で、"ガラス化保存法"が現在のところ最も汎用性が高い方法と考えられている [26]。ガラス化保存法は、液体が氷晶を形成せずに固化するガラス化という物理現象を利用したもので、細胞を液体窒素に直接投入する方法である。ガラス化保存法は、1985 年にマウス胚で成功が報告されて以来、多くの動物種で胚の低温保存法として広く応用されてきている [27]。他の凍結保存法は温度を下げる際に、プログラムフリーザーを使用する。そのため凍結操作が煩雑であり処理時間も長く、プログラムフリーザーの機器自体が必要となる。それに対しガラス化保存法は、液体窒素があれば特殊な冷却装置を必要とせず、短時間で簡易的に処理できることが最大の利点といえる。また、OPU により採取した未受精卵子のガラス化保存の有用性については、子ウシ生産の実績によって確認がなされているが [28]、現状ではガラス化保存した未受精卵子は、

新鮮卵子に比べて受精率や受精後の発生率が劣ることが知られている [26,29,30]。

これは、ガラス化保存の過程で未受精卵子の透明帯が変性し、多精子受精が発生することが原因であると考えられている [31–34]。つまり、OPU 卵子が採取できて低温保存することができたとしても、受精しなければ動物生産には十分に貢献することはできない。

顕微授精 (Intracytoplasmic sperm injection: ICSI) は、微細なガラス針を用いて精子を直接卵細胞質内に注入する技術であることから、未受精卵子の不受精を回避することが可能になる。実際に、*in vitro* での受精卵発生率において効果があることが報告されている [35–38]。しかしながら現在までに、ガラス化未受精卵子を用いて ICSI によって作製した受精卵から子ウシまでの発生を確認した報告がなく、動物生産に貢献できるかどうかは定かではない。その理由として、ウシにおける ICSI では精子注入後に、初期胚発生を促進させるために卵子の活性化処理を行うことが一般的であるが [39–41]、精子ゲノムを持たずに卵子のゲノムだけで発生を開始する、いわゆる単為発生胚が生じる可能性が否定できないからである [42]。そこで本章では、ガラス化によって低温保存した卵子の利用性を確かめることを目的に、ガラス化未受精卵子へ ICSI を行うことによって受精卵生産を試みた。また、受精卵は発生を進める過程で、受精から 7 日頃に胚盤胞期と呼ばれる発生ステージに到達する。胚盤胞期は、将来胎子を形成する細胞群である内部細胞塊 (Inner cell mass: ICM) と、胚の外側に位置し、将来胎盤を形成する栄養外胚葉 (Trophectoderm: TE) という 2 種類の細胞系統に分化するという、胚発生において極めて重要なステージである [43]。したがって、本手法によって胚盤胞期まで発生した受精卵について、ICM/TE の分化に関連する代表的な遺伝子の発現について調査することで細胞分化の正常性を評価した。さらに受精卵移植によって、個体発生能力を調べることにした。

## 材料および方法

### 1. 動物実験

本研究に供試する動物（ウシ）は、地方独立行政法人青森県産業技術センターにおける動物実験等の実施に関する規程（平成 22 年規程第 31 号）に従って管理し、全ての動物実験は同センター動物実験委員会の承認を得た上で実施した。

### 2. 実験グループ

体外発生成績を比較するために、処理方法により 3 つのグループ分けを行った。Fresh-IVF グループは、OPU 卵子はガラス化保存処理を行わずに IVF に供した。Vitrified-IVF グループは、ガラス化した卵子を IVF に供した。Vitrified-ICSI グループは、ガラス化した卵子を ICSI に供した。

胚盤胞期胚における分化関連遺伝子の定量 PCR による解析は、Fresh-IVF グループと Vitrified-ICSI グループの 2 者で比較した。

Vitrified-ICSI グループで発生した受精卵の一部は、個体発生能力の確認のために受精卵移植に供した。

### 3. 未成熟卵母細胞の採取と体外成熟培養

受精卵構築に用いる未成熟卵母細胞は、地方独立行政法人青森県産業技術センター畜産研究所で飼養している黒毛和種経産牛（48 か月齢以上 3 頭）から延べ 20 回、OPU によって採取した。OPU は、超音波画像診断装置（HS-2200V; Honda Electronics, Aichi, Japan）による超音波画像下で、動物用採卵針（Misawa Medical Industry, Ibaraki, Japan）を用いて、卵巢から卵丘細胞・卵母細胞複合体（COCs）を含む卵胞液を吸引した。吸引圧は 100 mmHg とし、吸引した卵胞液は 5 mL の回収用 TCM199 (附表) を加えた 50 mL のチューブ中に回収した。回収した卵胞液は、

セルコレクター (Fujihira Industry, Tokyo, Japan) に移し、回収液で血液成分を洗い流した。実体顕微鏡下で残った内容物から COCs を検索し、流動パラフィン (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を重層した 100  $\mu$ L の回収用 TCM199 に回収した。その後、成熟用 TCM199 (付表) で洗浄した後、同培地に移し、CO<sub>2</sub> インキュベーター (CPD-170; Hirasawa Co. Ltd., Tokyo, Japan) により 5% CO<sub>2</sub>、38.5°C、飽和湿度条件下で 22 時間 IVM を行った。

#### 4. 成熟卵子のガラス化

成熟した卵子は、300 unit / mL ヒアルロニダーゼ (H3506; Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA) によって膨化している顆粒層細胞を除去し、酵素により分散しなかった一部の卵丘細胞を残した状態とした。その後、ガラス化前平衡液 (付表) に移して 5 分間、前平衡した。ガラス化は 5-8 個の卵子をまとめて VS14 ガラス化液 (付表) [44] に移し、30 秒以内に Cryotop (Kitazato Corp., Shizuoka, Japan) の先端に乗せて液体窒素中へ浸漬した。

ガラス化した卵子の加温は、38°C に加温した 0.5 M スクロースのガラス化融解液 (付表) に直接浸漬することにより行った。同培地中で 5 分間平衡後、卵子を 0.25 M スクロースのガラス化融解液に移してさらに 5 分間平衡し、最後に成熟用 TCM199 中に移した。ICSI に供する卵子はピペッティングにより卵丘細胞を除去した。Vitrified-IVF グループに供する卵子は卵丘細胞を付けた状態のままにした。それぞれ ICSI および IVF を実施するまでのおよそ 1 時間、成熟用 TCM199 中でインキュベートした。

#### 5. 顕微授精

ICSI に用いる精子は、黒毛和種の青森県基幹種雄牛 1 頭から採取した凍結精液

を用いた。凍結精液ストローを 37°C のウォーターバスに 40 秒間浸漬して融解し、その後 BO 液 (付表) によって 2 回洗浄を行った。上清を捨て、7% (v/v) ポリビニルピロリドン (分子量 360,000; Nacalai Tesque) に懸濁して精子懸濁液を調製した。ICSI はピエゾマイクロマニピュレータ (PMM-150; Prime Tech, Ibaraki, Japan) およびマニピュレーションシステム (Narishige, Tokyo, Japan) を搭載した倒立顕微鏡 (IX70; Olympus, Tokyo, Japan) によって実施した。運動している精子をインジェクションピペットにより精子尾部を培養ディッシュ (351006; Corning, NY, USA) の底面に押し付けることにより不動化し、精子尾部からインジェクションピペット内に吸引した。卵子をホールディングピペットによって極体が 12 時の位置になるように固定し、インジェクションピペットを 3 時方向から近づけ、数回のピエゾパルスにより透明帯を穿孔した。インジェクションピペット内の透明帯片を透明帯の外に排出し、再度ピペットを挿入して卵細胞質の反対側近くまで押し込み、ピエゾパルスにより卵細胞膜を穿刺した。注意深く精子を卵細胞質内に注入した後、インジェクションピペットを静かに抜き出した。精子を注入してから 4 時間後に 7% (v/v) エタノールを添加した成熟用 TCM199 中に移し、5 分間インキュベートすることで活性化処理を行った。洗浄後、精子を注入した卵子は体外発生培養に供した。

## 6. 体外受精

IVF は前項 5. 顕微授精と同一の黒毛和種雄牛の凍結精液を使用した。IVF の培地には、IVF110S (Research Institute for the Functional Peptides, Yamagata, Japan) を使用した。まず、10 mL 遠心チューブ (Ajiakizai, Tokyo, Japan) に 90%、45% の順に重層した Percoll (Cytiva, Tokyo, Japan) 液 (付表) を用意した。凍結精液ストローを 37°C の温水中に 40 秒間浸して融解し、内容物を Percoll 液の上に乗せ、1,500 × g で 10 分間遠心分離した。遠心分離後、上清を捨てて最下層に残った精子を回収

し、IVF110S 付属の精子洗浄液 700  $\mu\text{L}$  に加えて混合し、 $1,500 \times g$  で 40 秒間遠心分離した。上清を捨て、次に IVF110S の媒精液を 700  $\mu\text{L}$  加えて混合したのち再度遠心分離し、沈殿物を含む液を約 50  $\mu\text{L}$  残して上清を捨てた。残った精子懸濁液を細胞計数盤 (Bio medical science, Tokyo, Japan) で精子濃度を計測し、濃度が  $5 \times 10^6$  細胞 / mL となるように媒精液で希釈した。希釈後の精子懸濁液は 100  $\mu\text{L}$  の微小滴を作製して流動パラフィンを重層した。IVM 後およびガラス化から融解後の COCs は、精子を懸濁していない媒精液微小滴で洗浄した後、精子懸濁液に移した。これを 5%  $\text{CO}_2$ 、 $38.5^\circ\text{C}$  の条件下で 6 時間インキュベートした。

## 7. 体外発生培養

IVC のための培地は 10% RD+KSOM/aa 培地 (付表) [45] を用いた。IVF 後の COCs は、発生用培地に移して 5%  $\text{CO}_2$ 、 $38.5^\circ\text{C}$  の条件下で 22–24 時間インキュベートした後、ピペッティングにより卵丘細胞を取り除き、洗浄後体外発生培養を実施した。体外発生はマルチガスインキュベーター (APM-30DR; Astec Co. Ltd., Fukuoka, Japan) を用いて 5%  $\text{CO}_2$ 、5%  $\text{O}_2$ 、90%  $\text{N}_2$ 、 $38.5^\circ\text{C}$  の条件下で行い、ICSI および IVF を実施した日を 0 日として 2 日目に卵割率、7–8 日目に胚盤胞への発生率を調査した。

## 8. 受精卵の凍結と受精卵移植

ICSI によって受精させ胚盤胞まで発生した受精卵は、移植に供するまで凍結保存した。受精卵の凍結は、ダイレクト移植用凍結液 (付表) [46] を用いた。受精卵を凍結液に移した後、0.25 mL ストロー (IMV Technologies, L'Aigle, France) へ充填・封入した。凍結液に移した時点から 15 分後に、あらかじめ  $-7^\circ\text{C}$  に冷却しておいたプログラムフリーザー (ET-1; Fujihira Industry) に納め、各ストローに植氷し

た。冷却プログラムは、 $-7^{\circ}\text{C}$ で10分間保持した後、 $-0.3^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の速度で $-30^{\circ}\text{C}$ まで冷却し、その後液体窒素に浸すことで凍結した。

受精卵移植は、発情同期化処理したホルスタイン雌ウシ4頭に行った。発情同期化処理は、黄体期にプロゲステロン膈内挿入剤 (CIDR; InterAg, Hamilton, New Zealand) の挿入及び0.5 mg クロプロステノール (ゼノアジン C, 2 mL, 筋注; Nippon Zenyaku, Fukushima, Japan) を投与し、4–10日間留置した。CIDR 抜去後、2日後にエコーにより排卵を確認し、排卵から7日目に受精卵移植を実施した。

## 9. 定量 RT-PCR 分析

各グループの胚盤胞5個を1サンプルとした。総 RNA は ReliaPrep<sup>TM</sup> RNA Cell Miniprep System (Promega, Fitchburg, WI, USA) を使用し添付のプロトコルに従って抽出した。抽出した RNA をテンプレートとして ReverTra Ace<sup>®</sup> qPCR RT Master Mix (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いて逆転写し、cDNA を得た。得られた cDNA をテンプレートとして THUNDERBIRD<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> qPCR Mix (TOYOBO) を用いて PCR 反応液を調製し、LightCycler<sup>®</sup> 96 System (Roche, Basel, Switzerland) を用いて定量 PCR を行った。使用したプライマーおよびアニーリング温度については表 1 に示す。内部標準として H2A.Z variant histone 1 (*H2AFZ*) 遺伝子を用い、 $\Delta\Delta\text{Ct}$  法により各サンプル間で遺伝子の相対発現値を求めた。

## 10. 統計解析

*In vitro* での発生率については、アークサイン変換後、Bartlett 法による等分散性の検定および分散分析を行った。値の比較については、Tukey-Kramer 法による平均値の多重比較を行った。mRNA の相対発現値については、 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  値を用いて



Student の  $t$  検定によって分析した。  $P$  値が 0.05 未満の場合、統計的に有意であると判定した。

## 結果

### ガラス化卵子への ICSI 後の体外発生率について

Fresh-IVF、Vitrified-IVF、および Vitrified-ICSI のそれぞれの体外発生率を比較した (表 2)。卵割率については、Vitrified-ICSI グループでは  $30.9 \pm 4.5\%$  であり、Fresh-IVF グループの  $65.9 \pm 7.0\%$  と比べて有意に低かった ( $P < 0.05$ )。しかし、胚盤胞への発生率については、両者間で有意な差はみられなかった ( $16.5 \pm 3.5\%$  v.s.  $35.3 \pm 4.2\%$ ,  $P = 0.054$ )。Vitrified-IVF グループの胚盤胞発生率は  $12.8 \pm 4.5\%$  であり、これは Fresh-IVF グループの胚盤胞発生率より有意に低かった ( $P < 0.05$ )。しかし、卵割した数に対しての胚盤胞へ発生した受精卵の割合は、Vitrified-ICSI グループが  $55.9 \pm 10.8\%$  であり、Vitrified-IVF グループの  $23.2 \pm 9.3\%$  と比べて有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ )。

### 胚盤胞期の分化関連遺伝子の発現比較

Vitrified-ICSI グループで発生した受精卵の胚盤胞における ICM (*OCT4*, *SOX2*, *NANOG*) と TE (*CDX2*, *GATA3*, *IFNT*) の分化関連遺伝子の遺伝子発現レベルを、定量 PCR により解析した。相対発現値の比較を Fresh-IVF と Vitrified-ICSI の 2 グループ間で行ったところ、解析した 6 つの遺伝子すべてにおいて有意な差は認められなかった (図 1)。

### ガラス化卵子を用いた ICSI 受精卵からの子ウシ生産

4 頭のレシピエント牛にそれぞれ 1 胚ずつ Vitrified-ICSI 由来受精卵を移植したところ、3 頭が受胎し、そのうちの 2 頭が分娩まで至り 2 頭の正常な子ウシを得た (表 3 および図 2)。残りの 1 頭については、詳細な時期は不明であるが流産となり、少なくとも 44 日目における妊娠鑑定までは胎子が確認された。出生した子ウ

シの生時体重はそれぞれ 33.0 kg と 29.3 kg、妊娠期間は 278 日と 288 日であり、黒毛和種の一般的な発育の範囲内であった。

## 考察

本章の実験では最初に、ガラス化および ICSI の各処理が *in vitro* における胚盤胞までの受精卵発生率に及ぼす影響について調べた (表 2)。その結果、卵子のガラス化処理は IVF 後の胚盤胞への発生率を低下させ、また ICSI による受精は、卵割率を低下させることがわかった。一方、卵割した受精卵に対しての胚盤胞期までの発生で比較してみると、Fresh-IVF と Vitrified-ICSI グループで同等であった。これらのことから、卵子のガラス化保存処理によって IVF を行った場合には卵割後から胚盤胞期までの発生が損なわれるが、ICSI を行うことで卵割率は低下するものの初期胚発生については改善されたと考えられた。これらは、ガラス化卵子を用いて ICSI を行った過去の報告と一致していた [36,38]。卵子のガラス化処理による受精卵生産効率の低下の原因は、ガラス化処理の過程で透明帯が変性し、多精子受精が発生してしまうことで引き起こされると考えられている [33,34]。したがって、本実験で観察された ICSI での初期胚発生の改善は、ICSI によって多精子の侵入が回避された結果であると予測されるが、詳細については精子侵入率の観察を行うなどにより検討する必要がある。

胚盤胞期の受精卵は、将来胎子を形成する ICM と胎盤を形成する TE の 2 種類の細胞系統に分化する [43]。そこで、Vitrified-ICSI 由来の受精卵について ICM と TE の分化に重要な役割を果たす 6 つの遺伝子の相対発現値を比較し、正常な分化が起こっているか確認した。解析した遺伝子のうち、未分化細胞のマーカーとして広く知られる *OCT4* は、胚盤胞の形成に必須の役割を示す [47]。*NANOG* と *SOX2* も同様に未分化状態に関与する因子であり [48,49]、ICM に優先的に発現することが知られている [50]。一方で、*CDX2* と *GATA3* は TE 細胞系列の確立に必要である [51,52]。*IFNT* は ICM/TE の分化制御には関わっていないが、反芻動物に特徴的に受精卵から分泌される妊娠認識因子として知られている [53]。*IFNT* は TE 細胞

において *GATA3* 遺伝子の制御により発現することから、TE 細胞のマーカーとして用いられる [54]。これらの 6 つの遺伝子は胚盤胞期に重要な役割を果たしていることから、胚盤胞の適正な発生をしているかの品質の指標になると考えられる。定量 PCR の結果、これらの遺伝子は新鮮卵子由来 IVF 受精卵と遜色なく発現していることが示され (図 1)、ガラス化および ICSI の操作が胚盤胞期の ICM/TE の分化という重要な発生現象へ与える影響は低いと推察された。

Vitrified-ICSI によって得られた受精卵の移植により、2 頭の子ウシの生産例が得られた。どちらも妊娠期間・生時体重は黒毛和種の標準的なものであり、また出生後も標準的な発育を示した。ICSI を用いた受精卵生産では、受精卵への発生率を改善する目的でエタノール、イオノマイシン、6-ジメチルアミノプリンなどといった、各種の薬剤を用いて活性化処理を行うことが広く行われている [39,55]。一方で、活性化処理を行うことで受精は成立していない、すなわち精子ゲノムを持たない状態で卵子ゲノムのみから発生する単為発生胚が生じる可能性がある [56,57]。その因果関係については明らかとはなっていないが、活性化処理の違いによって受胎率が低下することも報告されている [36,41]。これらのことから、Vitrified-ICSI により作製された受精卵は移植による子ウシ生産例もなく、個体として生産できるかどうか不明であった。本研究は、ガラス化未受精卵と ICSI の両方を用いて子ウシを得た初めての例である。また、得られた受精卵についても 4 個の受精卵のうち 3 個が受胎し、2 個が個体まで発生したことから、一般的な体外受精卵と比較しても遜色ない受胎性を有していると推察された。

本手法を子ウシ生産技術として利用していく上で、今後は ICSI を行った後の卵割率の低さを改善することが必要であると考えられる。なぜなら、確実に受精卵を得るという目的自体は、卵割率が低下するという結果から達成されていないからである。ウシは他の動物種と比較して ICSI の成功率が低いとされている [58]。その

原因として、精子 DNA の脱凝縮が起きづらいことや [59]、精子注入刺激による活性化が起こらないこと [60] などが原因として考えられているが、抜本的な解決までに至っていない。還元剤による精子 DNA の脱凝縮の促進などの改善方法が報告されているため [39,61,62]、こうした技術を取り入れることによって高位安定的なウシ ICSI 技術を確立していくことが求められる。

本研究では、OPU によって採取した卵子のガラス化保存および融解後の ICSI の操作は、胚盤胞期における遺伝子発現解析で発生分化に異常を及ぼさないことを確認し、受精卵移植によって受胎・子ウシ生産が可能であることを示した。したがって、今後 ICSI 胚の卵割率を向上させることができれば、OPU によって採取された卵子をガラス化保存し、ICSI によって成体まで発生する受精卵を効率よく生産できる可能性が示された。

表 1 定量 PCR に用いたプライマー

Gene	Accession number	Primer sequence (5'-3')	Annealing temperature	Product size (bp)
<i>OCT4</i>	NM_174580.3	F: ACATGTGTAAGCTGCGGCC R: CTTTCGGGCCTGCACAAGGG	58	107
<i>NANOG</i>	NM_001025344.1	F: CTCGCAGACCCAGCTGTGTG R: CCCTGAGGCATGCCATTGCT	58	198
<i>SOX2</i>	NM_001105463.2	F: GCAGACCTACATGAACGGCT R: ACATGTGAAGTCTGCTGGGG	58	245
<i>CDX2</i>	NM_001206299.1	F: GCCACCATGTACGTGAGCTAC R: ACATGGTATCCGCCGTAGTC	58	140
<i>GATA3</i>	NM_001076804.1	F: CTACCACAAGATGAACGGACAG R: AGGGTCTCCATTGGCATTTC	58	142
<i>IFNT</i>	NM_001031765.1	F: CTA CTGATGGCCTTGGTGCT R: GTCCTTCTGGAGCTGGTCAC	55	204
<i>H2AFZ</i>	NM_174809.2	F: AGAGCCGGTTTGCAGTTCCCG R: TACTCCAGGATGGCTGCGCTGT	58	116

表 2 ガラス化した OPU 卵子の ICSI 後の *in vitro* での発生率

Group	No. of replicates	No. of oocytes	No. (%) of cleaved <sup>†</sup>	No. (%) of blastocyst <sup>†</sup>	Blastocysts / cleaved embryos (%)
Fresh-IVF	6	98	68 (65.9 ± 7.0) <sup>a</sup>	34 (35.3 ± 4.2) <sup>a</sup>	55.3 ± 6.3 <sup>ab</sup>
Vitrified-IVF	8	132	69 (53.2 ± 9.0) <sup>ab</sup>	18 (12.8 ± 4.5) <sup>b</sup>	23.2 ± 9.3 <sup>a</sup>
Vitrified-ICSI	8	140	43 (30.9 ± 4.5) <sup>b</sup>	22 (16.5 ± 3.5) <sup>ab</sup>	55.9 ± 10.8 <sup>b</sup>

<sup>†</sup>発生率は供試した卵子数から算出。%値は平均値 ± SEM。

ab 間で有意差あり ( $P < 0.05$ )



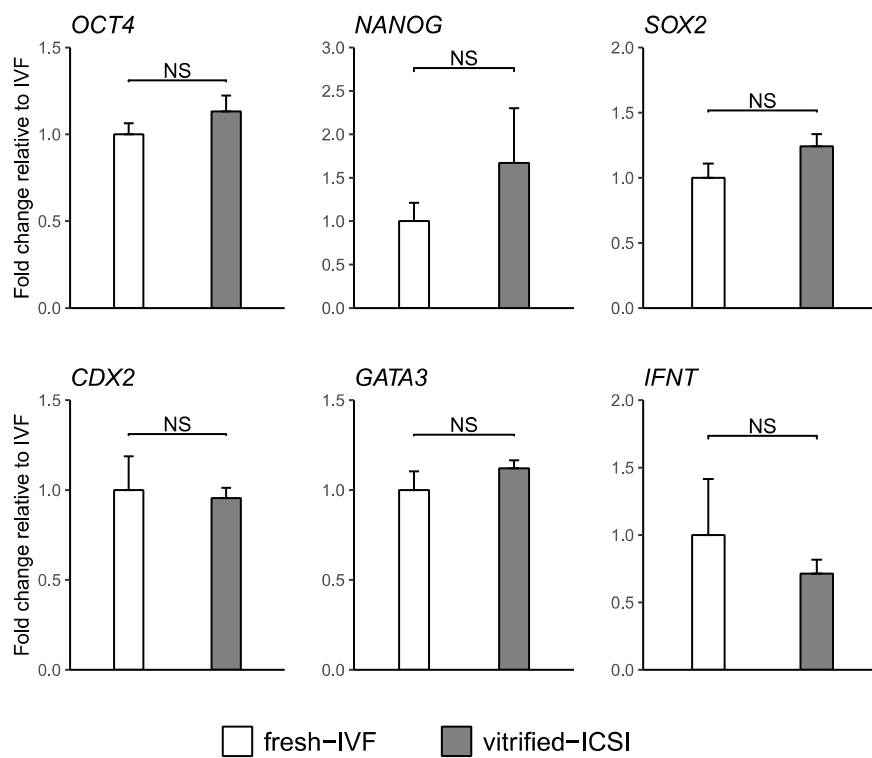


図1 胚盤胞における分化関連遺伝子の定量PCR

NS: 有意差なし

表 3 ガラス化-ICSI 受精卵の受胎成績

No. of transferred recipients	No. of pregnant cows (%)	No. of abortions	No. of calves to term
4	3 (75.0)	1	2

\*各牛に 1 卵ずつ移植



図2 ガラス化卵子を用いて ICSI により生産した受精卵から得られた子牛

(上) 生時体重 33.0kg、移植から 278 日後に誕生した雌子牛。4 か月齢撮影。

(下) 生時体重 29.3kg、移植から 288 日後に誕生した雄子牛。3 か月齢撮影。

### 第三章 妊娠認識を補助する栄養膜小胞の凍結融解後の生存性改善および子宮への移植後の動態

#### 緒言

体外受精技術の活用によって作製した受精卵を実際に活用するためには、レシピエント牛に移植して受胎させ、妊娠・分娩というプロセスを経て個体として生産していく必要がある。OPU-IVF 技術が開発されて以来、体外受精卵の生産個数、移植頭数も増加の一途を辿っている [2]。その一方、凍結した体外受精卵の移植による受胎率は体内胚のそれに比べて 10%程度低いため [2]、受胎率の向上が必要である。受精卵移植技術において受胎率を向上させるために様々な手法が考案されているが、その一つとして栄養膜小胞 (Trophoblastic vesicles: TVs) の利用が考えられてきた [63–65]。

哺乳類における着床のプロセスにおいて、受精卵が分泌する妊娠認識のシグナルが重要であることが明らかとなっている。反芻動物における妊娠認識シグナルとして広く知られているのが、胚の栄養膜細胞が生産するインターフェロンタウ (Interferon tau: IFNT) である [66]。IFNT は、子宮から分泌される黄体退行因子であるプロスタグランジン F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) の分泌を低下させ、黄体の退行を抑制することで妊娠を維持させる [67,68]。近年では、着床期の胚から分泌されるエクソソームも子宮内膜に影響を与えることが明らかとなっており [69]、IFNT 以外の因子も関与することが明らかとなりつつある。

TVs は、ウシの 14–17 日齢程度の伸長期胚の栄養膜部分を細切し、培養して小胞を形成したものである [70]。これをウシの子宮内に移植することにより、発情周期が延長することが確認されている [70]。また、受精卵と共移植することにより、受胎率が向上することも報告されている [64]。TVs は栄養膜細胞に由来する

ことから、IFNT を含む妊娠認識物質を分泌して黄体退行を抑制する働きを有している [70]。そのため、凍結保存処理やバイオプシーなどの傷害を伴った受精卵の受胎率低下を防ぐために、これらの受精卵と TVs とを共移植することにより、受精卵が分泌する妊娠認識物質を補強する方法が試みられてきた [63,64]。その一方で、TVs の移植では発情周期の延長がみられない [71]、あるいは TVs は妊娠初期の受胎率を向上させる効果があるものの、中期以降の妊娠期間を通してみると最終的な分娩まで至る受胎分娩率に差がないことも報告されており [65]、TVs 共移植の効果は不明瞭である。したがって、TVs そのものの子宮内での動態、すなわち体内環境における TVs が栄養膜細胞と相同の生理学的な役割を果たしているのかどうかを突き止める必要がある。TVs の子宮内での動態については、唯一、移植後 13 日および 15 日後に、と畜後の子宮組織の形態学的観察が報告されているのみで [70]、不明な部分が多い。妊娠認識を補助する役割を果たすとすれば、TVs として子宮内に移植した後も着床期の栄養膜細胞と同等の機能を有していることを確認する必要がある。

TVs を実際に利用する場合には、あらかじめ作製した TVs を凍結保存しておき、移植する場面で融解して用いることができれば利便性が高い。先行研究によると、1.8 M エチレングリコールを耐凍剤として用いた場合 TVs の凍結融解後の生存率が 82–92% であること、融解後に単一の球ではなく変性組織を含む複数の小球を形成する場合があること、凍結融解後の TVs は IFNT の産生能を有するがその分泌量は凍結前と比べて半分程度まで減少することが報告されている [72–74]。これらの報告における TVs の凍結保存処理のタイミングとして、栄養膜を細切して 24 時間培養し、球状の小胞を形成した状態、すなわち TVs を形成した状態で凍結保存処理をしている。しかし、表面の細胞層が閉じて小胞を形成した状態では、凍結保存液が内側の細胞へ十分に浸透せずに凍結傷害が生じる可能性がある。IFNT 分泌

量が減少していることから、凍結傷害によって変性組織が生じていることが予想される。そこで、腔が閉じていない細切直後のタイミングで凍結保存処理することにより、凍結融解後の生存性がさらに高まる可能性がある。

本章では、TVs の凍結保存条件を検討するため、小胞形成の前および後のタイミングで凍結し融解後の生存性について比較を行った。また、それに先立ち TVs をより多く得るための伸長胚の回収日についても検討した。さらに、TVs を子宮へ移植した後の動態について明らかにするため、凍結 TVs を融解後に子宮へ移植し、子宮内環境で7日間感作させた後に回収した。そして、その形態学的および免疫細胞学的な特徴について、受精を起点として同等の時間発生したとみなされる胚齢21日の伸長期胚の栄養膜と比較解析した。

## 材料および方法

### 1. 栄養膜小胞の作出

#### 1-1. 体内胚由来の伸長胚の回収

地方独立行政法人青森県産業技術センターで飼養されている黒毛和種経産牛（延べ6頭、98–125か月齢、3–4産次）を供試した。TVs作製に必要な体内胚由来の伸長胚の回収のため、過剰排卵処理を行った。過剰排卵処理の方法は、まず、黄体期にプロゲステロン膈内挿入剤（CIDR; Nippon Zenyaku Kogyo, Fukushima, Japan）を挿入し、同時にクロプロステノール注射薬（ゼノアジン C; Nippon Zenyaku Kogyo）を3 mL 頸部筋肉内に投与した。その7日後、酢酸フェルチレリン製剤（コンセラル注射液; MSD Animal Health; Tokyo, Japan）を1.25 mL 投与した。その3日後に、50 mL の生理食塩水に溶解したFSH製剤（アントリン R・10; Kyoritsu Seiyaku, Tokyo, Japan）20 A.U.を頸部皮下に投与した。その2日後にCIDRを抜去し、同時にクロプロステノール注射薬を3 mL 筋肉内投与した。その翌日、酢酸フェルチレリン製剤を2.5 mL 投与し、その24時間後に人工授精を実施した。人工授精には黒毛和種の青森県基幹種雄牛から採取した凍結精液を使用した。TVsをより多く得るための伸長胚の回収日を検討するために、人工授精から14、15および17日後に子宮灌流を実施し、伸長胚を回収した。子宮灌流は、伸長胚を回収できるように先端の穴を大きくした16 Fr 多孔式バルーンカテーテル（Fujihira Industry, Tokyo, Japan）を用いた（図3 a）。灌流液はmPBS（付表）を1 L使用した。回収した伸長胚については長径を計測した。

#### 1-2. 栄養膜の細切および培養

子宮灌流により回収した伸長胚（図3 b）は、mPBSで3回洗浄した。外科用メス（Feather Safety Razor, Osaka, Japan）を使用して胚盤部分を取り除き、残った栄養膜

部分を約 1 mm 四方の大きさになるように細切した (図 3 c および d)。なお、回収時に栄養膜が破損して全体が著しく収縮しているもの、および胚盤部分が不明瞭なものについては不適として TVs の作製には供試しなかった。

細切直後、あるいは凍結融解後の栄養膜断片は、Nunc 4 ウェルプレート (丸型; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) に入れた 600  $\mu$ L の TVs 培養液 (付表) 中で洗浄後、CO<sub>2</sub> インキュベーター (CPD-170; Hirasawa Co. Ltd., Tokyo, Japan) を用いて 5% CO<sub>2</sub>、38.5°C、飽和湿度条件下で 24 時間培養し、1 層の栄養膜細胞が球状となり小胞を形成しているものを TVs とした (図 3 e)。

### 1-3. 栄養膜断片および TVs の凍結保存

細切直後の栄養膜組織の断片、あるいはそれを 24 時間培養して小胞となった TVs の凍結保存は、ダイレクト移植用凍結液 (付表) を使用した。凍結液に移した後、0.25 mL ストロー (IMV Technologies, L'Aigle, France) へ充填した。凍結液に移した時点から 15 分後に、-7°C に冷却しておいたプログラムフリーザー (ET-1; Fujihira Industry) に 3-6 個の栄養膜断片あるいは TVs を納め、各ストローに植氷した。冷却プログラムは -7°C で 10 分間保持した後、-0.3°C/分の速度で -30°C まで冷却し、その後液体窒素中で保存した。

## 2. 栄養膜小胞の移植および回収

TVs の子宮への移植は、発情からの日数を明確にするためにレシピエント牛の発情同期化処理を行った。発情同期化処理の方法は、黄体期の雌ウシに CIDR を挿入し、同時にクロプロステノール注射薬を 3 mL、頸部筋肉内に投与した。発情予定日の 2 日前に CIDR を抜去し、発情の発現はスタンディングを目視することで確認した。発情から 12 日後に TVs の移植を実施した。移植に用いる TVs は、移植前日



に融解および TVs 培養液で培養し、移植当日に小胞を形成しているものを供した。TVs は 0.25 mL ストローに導入し、受精卵移植器 (モ 4 号もしくはモ 5 号 (Misawa Medical Industry, Ibaraki, Japan)) を用いて非外科的に子宮内深部へ移植した。

栄養膜小胞の回収は、移植から 7 日後に、本章、材料および方法の 1-1. 体内胚由来の伸長胚の回収の方法に準じ、先端孔を大きく加工したバルーンカテーテル (図 3 a) を使用して行った。

### 3. 21 日 齢胚の回収

黒毛和種経産牛 (延べ 4 頭、98–129 か月齢、3–5 産次) を供試した。黄体期に CIDR を挿入し、同時にクロプロステノール注射薬 (ゼノアジン C) を 3 mL 頸部筋肉内に投与した。その 7 日後に CIDR を抜去し、翌日、酢酸フェルチレリン製剤 (コンセラル注射液) を 2.5 mL 投与した。その 24 時間後に人工授精を実施した。21 日後、伸長胚を回収できるように先端の穴を大きくした 16 Fr 多孔式バルーンカテーテル (図 3 a) を用いて子宮灌流を行った。

## 4. 準超薄切片像観察

再伸長した TVs および 21 日 齢胚の栄養膜を、外科用メスを用いて 1 cm 程度の長さにトリミングし、2.5% (v/v) グルタルアルデヒド – 0.1 M リン酸バッファー (附表) 中で 2 時間、4°C で固定した。0.1 M リン酸バッファー (附表) で洗浄後、1% (w/v) 酸化オスミウム液中で 2 時間、4°C で後固定した。0.1 M リン酸バッファーで洗浄後、各濃度 (50、70、90、95、99%) のエタノールに順に浸漬することにより脱水した。その後、エタノールを酸化プロピレンで置換した後、Epon 液により包埋し、ミクロトームにより 1  $\mu\text{m}$  の厚さで切片を作製した。切片は 0.3% トルイ

ジンプルーで1分間染色し、カバーガラスにより封入した後、生物顕微鏡 (BX60; Olympus) で観察した。

## 5. 蛍光免疫染色

再伸長した TVs および 21 日齢胚の栄養膜を 1 cm 程度の長さにとりミングし、4%パラホルムアルデヒド添加リン酸緩衝液 (09154-14; Nacalai Tesque) 中で1時間、室温で固定処理した。その後、0.1% (w/v) PVP in PBS (-) (付表) で3回洗浄した後、各濃度 (70、80、90、95、99%) のエタノールに順に浸漬することにより脱水し、酢酸イソアミルで置換した。キシレン処理後、パラフィン包埋し、ミクロトームにより 7  $\mu$ m の厚さで切片を作製した。切片を張り付けたスライドガラスをキシレンに浸漬し、脱パラフィン処理した後、各濃度 (100、70%) のエタノールおよび PBS (-) に移して加水を行った。その後、0.05% Tween20 を含む 0.01 M クエン酸溶液 (pH 6.0) 中で電子レンジ (500W) により沸騰しない程度に 10 分間加熱し、抗原の賦活化処理を行った。TTBS (付表) で洗浄後、室温で1時間ブロッキング処理した。各タンパク質のブロッキング液の組成および一次抗体反応に用いた抗体の由来と希釈倍率は以下のとおりである。CDX2 のブロッキング液は 1% (v/v) FBS 添加 PBS (-)、一次抗体は Anti-CDX2 抗体 (Abcam; ab76541, Cambridge, UK) をブロッキング液により 400 倍希釈して使用した。SOX2 と GATA6 のブロッキング液は TTBS で 5 倍希釈した Blocking One (Nacalai Tesque) を用いた。また、一次抗体は Anti-SOX2 抗体 (Abcam; ab92494) および Anti-GATA6 抗体 (Cell Signaling Technology; #5851) を、TTBS で 20 倍希釈した Blocking One 溶液により、それぞれ 500 倍、1,000 倍希釈して使用した。一次抗体は 4°C で一晩反応させた。次に TTBS で 5 分間 3 回洗浄し、1% (v/v) FBS を加えた PBS(-) で 400 倍希釈した Anti-Rabbit 抗体 Alexa Flour 555 (ThermoFisher; A21428) を用いて室温で 3 時間、二次抗体反応

を行った。反応終了後、10 µg/mL Hoechst 33342 を添加した TTBS で 10 分間核染色した後、TTBS で 3 回洗浄し、VECTASHIELD Mounting Medium (Vector Laboratories, Newark, NJ, USA) とカバーガラスにより封入した。蛍光観察には LEICA TCS SP5 共焦点レーザー顕微鏡 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を使用した。

## 6. 定量 RT-PCR

再伸長した TVs および 21 日齢胚の栄養膜を 5 mm 長に切り取り、1 サンプルとした。その後の RNA 抽出、逆転写による cDNA 調製、RT-PCR 反応については、第二章の材料と方法、7. 定量 RT-PCR 分析の方法に準じて実施した。

## 7. ウェスタンブロッティング

再伸長した TVs および 21 日齢胚の栄養膜を 5 mm 長に切り取り、0.1% PVP in PBS (-) で洗浄した。チューブ に 2x サンプルバッファー (附表) を 80 µL 加えておき、そこに 0.1% PVP in PBS (-) 中の栄養膜断片を液体 80 µL と共にマイクロピペットで吸引し、サンプルバッファーに加えてよくピペッティングした。これを 70°C、15 分間加熱し、氷冷した後に使用まで -20°C で保存した。

サンプルは 10% SDS-PAGE により分離を行った。各サンプル濃度は分光光度計 NanoDrop (ThermoFisher Scientific) で計測し、レーンあたり約 50 µg になるように電気泳動に供した。分離後、iBlot Gel Transfer Device system (ThermoFisher Scientific) を用いて PVDF 膜に転写した。PVDF 膜は CanGetSignal (Toyobo, Osaka, Japan) でブロッキング後、5,000 倍希釈した抗 IFNT 抗体 (PAB862Bo01; Cloud-Clone Corp., Katy, TX, USA) 、または内部標準として 5,000 倍希釈した抗 β アクチン抗体 (66009-1-Ig; Proteintech, Rosemont, IL, USA) を用いて室温で一晩反応させ

た。その後、25,000 倍希釈した HRP 標識抗体 (Amersham ECL Anti-Rabbit IgG, HRP-Linked Species-Specific Whole Antibody (from Donkey) または Amersham ECL Anti-Mouse IgG, HRP-Linked Species-Specific Whole Antibody (from Sheep), GE Healthcare UK Ltd., Amersham Place England) を用いて室温で 1 時間、二次抗体反応させ、EzWestLumi plus (Atto Corp., Tokyo, Japan) を用いて検出した。ウェスタンブロットティング画像からの濃度定量は画像解析ソフトウェア ImageJ (<http://rebweb.nih.gov/ij/>) を用いて行った。

## 8. 統計処理

栄養膜小胞の作出効率について、1 頭当たりの栄養膜切断片数、栄養膜小胞数の平均値の差の検定は、F 検定による等分散性の検定後、Student の  $t$  検定によって分析した。凍結融解後の生存率については、 $\chi^2$  検定を行った。mRNA の相対発現値については、 $2^{-\Delta\Delta C_t}$  値を用いて Student の  $t$  検定によって分析した。 $P$  値が 0.05 未満の場合に、統計的に有意であると判定した。

## 結果

### 栄養膜小胞作出のための伸長胚の回収日の検討

最初に、TVsが多く得られる伸長胚の最適な回収時期についての検討を行った。過剰排卵処理後の人工授精からの伸長胚回収日数を14、15、および17日とし、それぞれの伸長胚の大きさを計測し、その後のTVsの作出効率を比較した。その結果、回収された伸長胚の長さは、破断している断片も含め、14、15、および17日の順にそれぞれ $1.9 \pm 0.2$ 、 $5.1 \pm 0.6$ 、および $7.4 \pm 1.1$  mmとなり、人工授精後の日数に伴って胚の長さが大きくなった(図4 a および b)。その一方で、破損した状態で回収される胚が増加した(図4 b および c)。人工授精後14日目に回収したときの個体あたりのTVs生産個数、および栄養膜切断片数に対するTVs形成割合は、それぞれ $25.0 \pm 5.0$  個および92.6%となり、統計的な有意差はなかったものの他の日に回収した場合に比べて多かった(表4)。

### TVsの凍結時期の比較

TVsの凍結保存を行う時期について、異なる2点のタイミングで実施し融解後の生存率を比較した(表5)。培養後に小胞形成した時点で凍結した場合は、60.6%の生存率であった。その一方で、培養前の細切直後に凍結した場合は100.0%の生存率であり、統計的に有意に高い値を示した( $P < 0.01$ )。

### 凍結TVsの移植後の回収

発情から12日目のレシピエント牛の黄体側子宮角深部にTVsを移植し、その7日後に回収を試みた(図5)。その結果、再伸長したTVsが回収された(図6)。再伸長TVsの長さは最長で70.0 mmであった。しかし、この最長のTVは破損していたため実際はそれ以上だったと推測された。最小のTVは3.5 mmであり、全体

平均は  $34.4 \pm 8.9$  mm ( $n = 7$ ) であった。移植前の TVs の平均長が  $0.87 \pm 0.1$  mm であったことから、40 倍近くの長さまで雌の子宮内環境で発育することが確かめられた。

### 再伸長 TVs の組織形態

回収された再伸長 TVs の組織切片について、対照として 21 日齢の伸長胚の栄養膜と比較して組織学的特徴を調べた (図 7)。両者ともに外側のトロホブラスト層と、その内側にハイポブラスト層を有する二層構造を有していた。

### 再伸長 TVs の免疫染色

再伸長した TVs の栄養膜細胞において、ICM と TE の分化に関連する遺伝子である CDX2、SOX2 および GATA6 の免疫染色を行い、21 日齢伸長胚の栄養膜細胞のものと比較した。その結果、どちらの試料においても CDX2 はトロホブラスト層に、GATA6 はハイポブラスト層にシグナルが観察され、一方で SOX2 についてはシグナルが観察されなかった (図 8)。

### 再伸長 TVs の定量 PCR

再伸長した TVs の栄養膜細胞における *IFNT*、*CDX2*、*SOX2* および *GATA6* の mRNA 相対発現値について、定量 PCR 法により、21 日齢伸長胚の栄養膜と比較を行った (図 9)。その結果、再伸長した TVs で *IFNT* および *SOX2* の発現レベルが有意に低下していた ( $P < 0.05$  および  $P < 0.01$ )。一方、*CDX2* および *GATA6* の発現レベルについては有意な差は認められなかった。

### 再伸長 TVs の IFNT ウェスタンブロッティング

再伸長した TVs の栄養膜細胞における IFNT タンパク質をウェスタンブロッティングにより解析し 21 日齢伸長胚の栄養膜と比較した (図 10)。その結果、どちらも IFNT タンパク質の発現が確認され、21 日齢伸長胚を 1.0 としたときの発現レベルを調べたところ TVs では  $0.94 \pm 0.26$  となり、統計学的に有意な差はみられなかった。

## 考察

本章における実験では最初に、TVsを多く生産するための伸長胚の回収時期の検討を行った。伸長胚の長さについては、人工授精後の日数に伴って大きくなる傾向がみられた(図4)。しかしながら、伸長が進むにつれて回収操作における物理的な衝撃に起因すると考えられる断裂や、複数の胚同士が相互に絡まり合うことで損傷している状態の伸長胚の頻度が増え、TVsの作製に供せない状態の胚が増加した(図4bおよびc)。その後、培養し小胞を形成したTVsの割合については、受精から14日目の胚を用いる場合に最も高いことが明らかとなった(表4)。この結果は、本試験と同様に過剰排卵処理による体内胚由来の伸長胚を用いて人工授精後14日と17日に回収してTVsの作出効率を比較し、17日目のTVs形成率が低いとする結果と一致していた[75]。体内胚由来の伸長胚は17日では発育が進み、TVs作製には適していない状態になっている可能性が考えられた。ただし、胚日齢15-16日目の伸長期胚は、同じ日齢内でも胚個々によって長さに幅があることが知られているため[76-78]、雌ウシの子宮環境あるいは個々の受精卵の性質により、成績にばらつきが生じる可能性が考えられる。より効率的に伸長胚を回収するためには、胚の損傷をより減らせるようにバルーンカテーテルに改良を加える、あるいは粘度を高めた回収液を子宮灌流に使用するなど、回収時の損傷が低減するような方法についても検討を行うことで、長い伸長胚を良好な状態で回収できるようになり多くのTVsが作製できる可能性がある。

TVsの凍結保存のタイミングについては、既報[73,79]に従って24時間培養後に小胞形成した状態で凍結した場合よりも、細切した時点で凍結処理することで、融解後に高い生存性が得られた(表5)( $P < 0.01$ )。これは、予想した通り耐凍剤の細胞への浸透度が改善されたことによると考えられた。小胞を形成した後に凍結処理を行った場合は内腔が完全に閉じた状態となっていることから、耐凍剤の腔内部



への浸透が十分に行われぬ恐れがある。耐凍剤の浸透が十分でない場合、凍結による細胞障害が増大する。しかし、切断直後に凍結処理を行う場合は閉鎖が不完全であるために内部を含む栄養膜断片の全体が耐凍剤と平衡できることから、融解後の生存性が高まったと推察された。これらのことから、以後の TVs の移植に関する試験については人工授精から 14 日目の伸長胚を用い、栄養膜は細切直後に凍結して融解後に TVs 形成したものを供した。

発情から 12 日目のレシピエント牛の子宮内に TVs を移植し、7 日間子宮環境に感作させた後に子宮灌流した結果、伸長 TVs を回収することができた (図 6)。この再伸長した TVs の長さは 3.5 mm から 70.0 mm とばらつきが大きかったものの、移植前の約 1 mm の TVs に比べると 3 から 70 倍、平均して 40 倍程度に成長することが確かめられた。伸長 TVs のサイズのばらつきは、同日齢の伸長期胚も個々に長さに幅があることも考えると [76-78]、通常の子宮内でのウシ胚の成長度合いから逸脱したものではないと考えられた。

再伸長 TVs の組織学的な特徴について組織切片による微細構造および組織分化マーカータンパク質発現の解析を行った。対照として、受精を起点として同等の時間発生したとみなされる胚齢 21 日の伸長期胚の栄養膜を用いた。その結果、両者とも外側にトロホブラスト層と、それを裏打ちするハイポブラスト層を有しており (図 7)、どちらもこの時期の栄養膜構造として報告されているとおりの形態的特徴を有していた [78]。また、トロホブラスト、エピブラストおよびハイポブラストのそれぞれの細胞分化のマーカーである CDX2、SOX2 および GATA6 の免疫蛍光染色についても、21 日齢胚の栄養膜と同様の発現パターンを示していた (図 8)。これらのことから、少なくとも子宮内に移植して 7 日目の時点の再伸長した TVs は、形態学的および組織分化の観点から、伸長期胚の栄養膜の性質を維持していると考えられた。

定量 PCR では、*IFNT* の発現レベルは 21 日齢胚の栄養膜と比べて半分程度に低下していた (図 9)。これについては、*IFNT* 発現が時期特異的であり、子宮への接着開始時期である 19 日前後をピークとして急激に低下することから [80,81]、細胞の時期の僅かな違いによって差が出た可能性が考えられる。*SOX2* の発現レベルも低下していたことから、再伸長 TVs では 21 日齢胚の栄養膜細胞に比べて分化が進んだことによって *IFNT* の遺伝子発現量を低下させた可能性が考えられた。その一方で、ウェスタンブロッティングによる *IFNT* のタンパク質発現を調べたところ、両者とも同等の発現レベルを示していたことから (図 10)、子宮内に移植した後の *IFNT* タンパク質は、少なくとも 7 日後までは伸長胚と同等の発現レベルを有していることが確認された。mRNA とタンパク質の両者の発現レベルの差異については、タンパク質の発現ピークが mRNA の発現より少し遅れることに起因していると考えられるため、結果は矛盾しないと考えられる。着床期のウシ胚の *IFNT* 遺伝子は、網羅的遺伝子発現解析から *IFNT1* (NM\_001015511.4) と *IFNTc1* (NM\_001031765.1) の 2 種類のパラログが発現していることが明らかとなっている [82]。この 2 種類の *IFNT* の機能や発現バランス (発現時期や発現量) も妊娠プロセスにおいて重要と考えられているため [83]、凍結 TVs がこれらをどのように発現しているのか、今後より詳細に調査する必要がある。その一方で、TVs は胎子となる胚盤部分を失いながらも栄養膜細胞としての性質を保持しているという特徴を持つことから、胚の着床メカニズムを解明する上での解析ツールとなる可能性が考えられる。

本実験の結果から、TVs の作製においては、人工授精から 14 日の伸長胚を用いるのが効率的であることを確認し、また、栄養膜を細切直後に凍結処理を行うことで、TVs を形成後に凍結する場合に比べて生存性が高まることを明らかにした。このように作製した凍結 TVs は、子宮内に移植した後に栄養膜としての性質を保つ

たまま少なくとも7日間は伸長しながら発育し、伸長胚と同等レベルのIFNTタンパク質を分泌することが明らかとなった。これにより、適した凍結TVsの作製方法が明らかとなり、受精卵との共移植に用いる場合に有効であると示唆された。

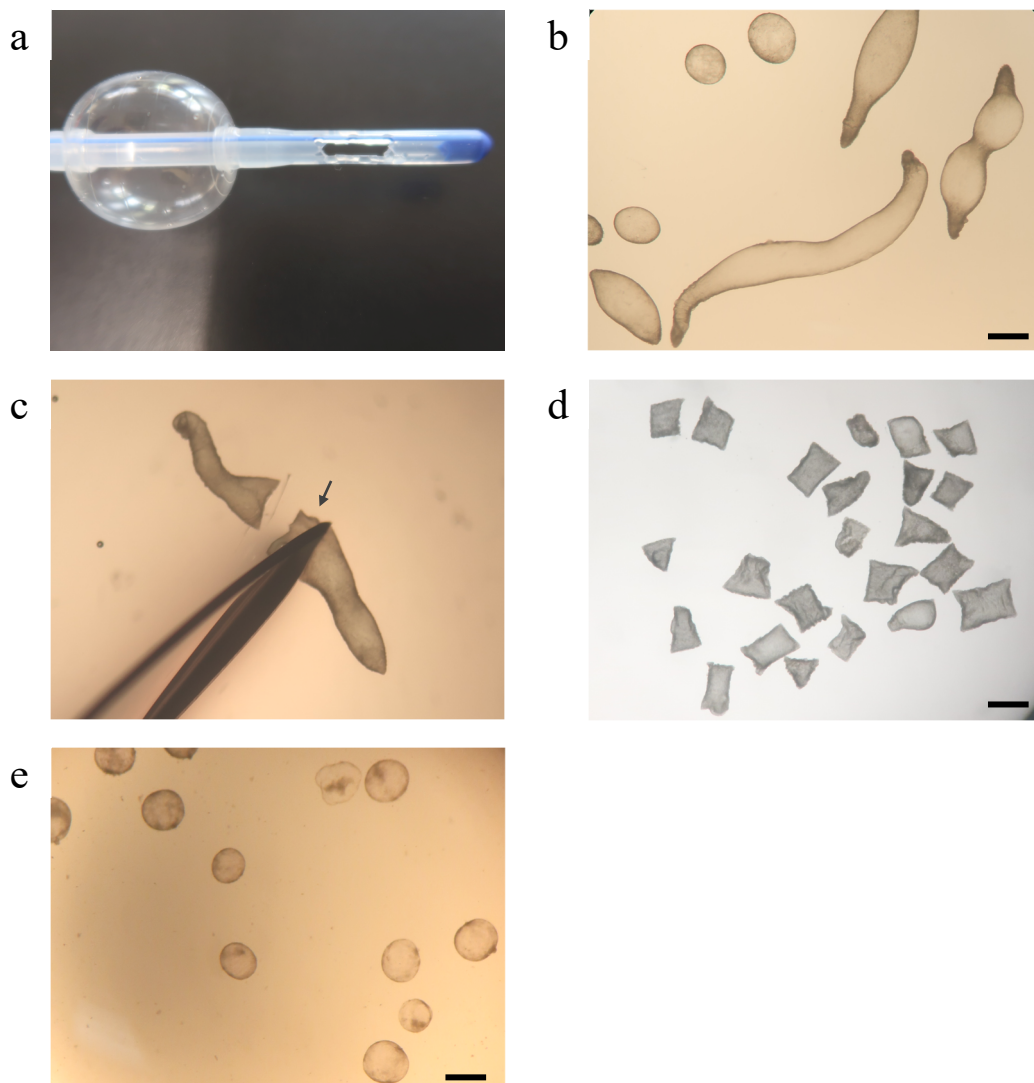
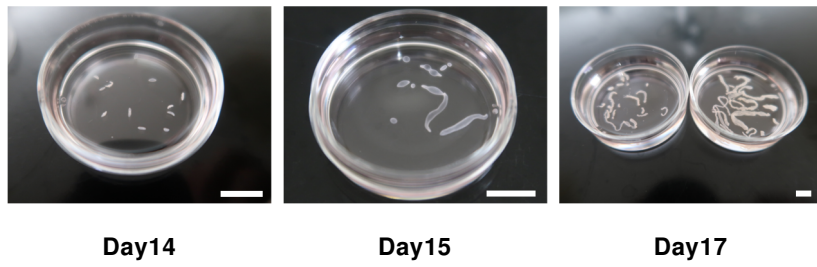


図3 TVs 作出の流れ

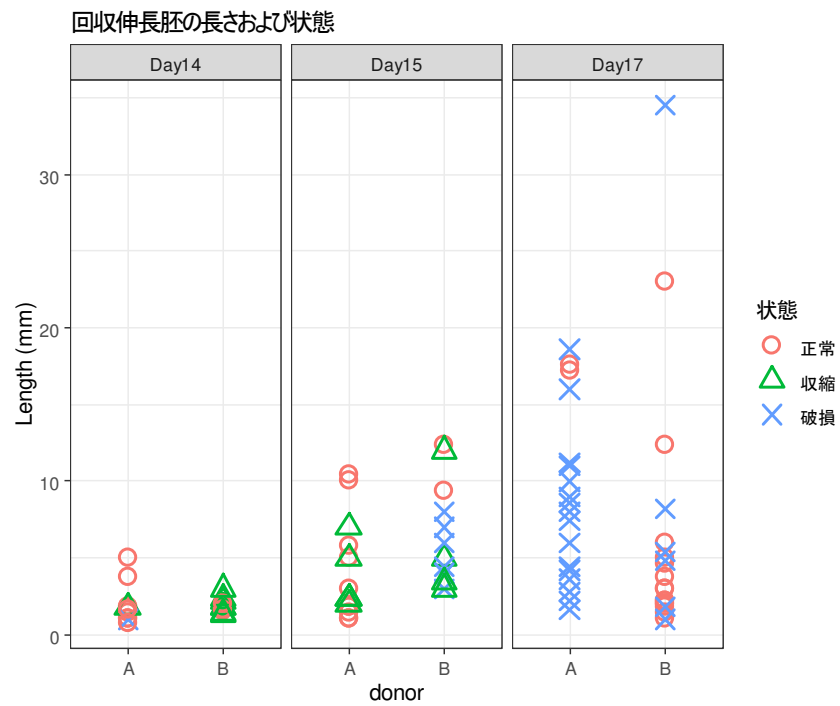
- a: 伸長胚の物理的障害を低減するため、先端の孔を大きく加工したバルーンカテーテルを使用
- b: 回収された伸長胚
- c: メスにより、将来胎子となる部位の embryonic disc (矢印) を切除
- d: 栄養膜部分を 1 mm 程度に細切
- e: 24 時間培養することで形成された TVs (平均長  $0.87 \pm 0.1$  mm)

Scale bar = 1 mm

a



b



c

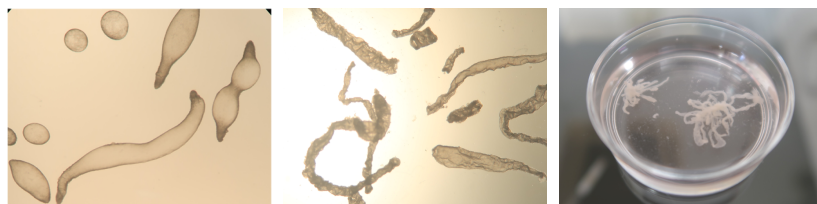


図4 人工授精からの回収日別の伸長胚の長さや状態

a: Scale bar = 1cm

b: 回収された伸長胚の長さおよび状態

c: (左) Day 15 で回収した損傷のない伸長胚、(中、右) Day 17 で回収した伸長胚にみられた損傷や胚同士のからまり

表 4 伸長胚の回収日の違いによる栄養膜小胞の作出効率

回収日	供試牛	1 頭あたりの切断片数 (平均 ± SEM)	1 頭あたりの栄養膜小胞数 (平均 ± SEM)	栄養膜小胞 形成率 (%)
14 日目	2	27.0 ± 7.0	25.0 ± 5.0	92.6 (50/54)
15 日目	2	32.0 ± 8.0	17.5 ± 5.5	54.7 (35/64)
17 日目	2	26	5	19.2 (10/52)

表 5 凍結方法の別による融解後の TVs 形成率

凍結方法	n	融解後 TVs 形成率% (n)
24 時間培養後 (従来法)	33	60.6 <sup>a</sup> (20)
細切直後	34	100 <sup>b</sup> (34)

ab 間で有意差あり ( $P < 0.01$ )

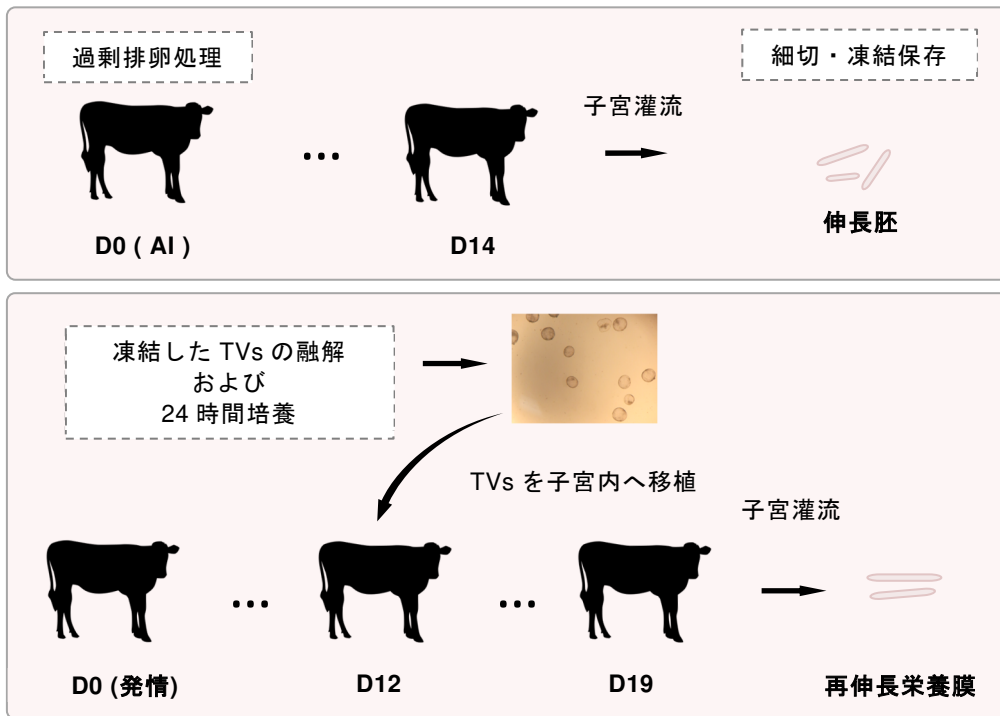
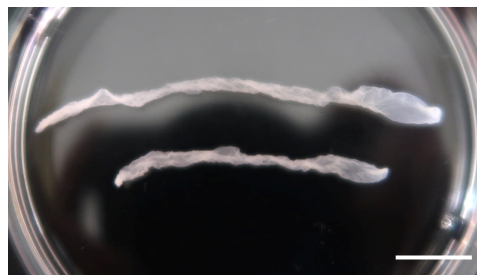


図5 再伸長栄養膜の採取方法概略図

ドナー牛を過剰排卵処理後、人工授精から14日目に採取した伸長胚から、栄養膜を切り出し、凍結保存を行った。凍結保存した栄養膜は、移植の24時間前に融解し、培養し、TVsを作出した。レシピエント牛は発情から12日目に、TVsを移植した。その7日後（発情から19日目）に、子宮灌流を行い、再伸長したTVsを回収した。



**D7 TVs**



**D21  
conceptus**

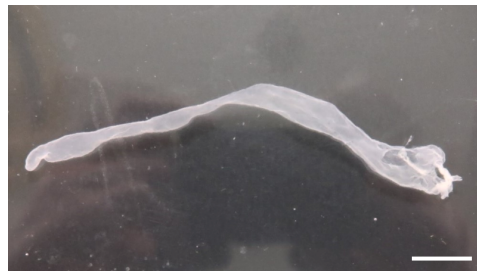


図 6 回収された再伸長栄養膜 (上) と、受精後の日数が同等の 21 日齢胚 (下)

Scale bar = 1 cm

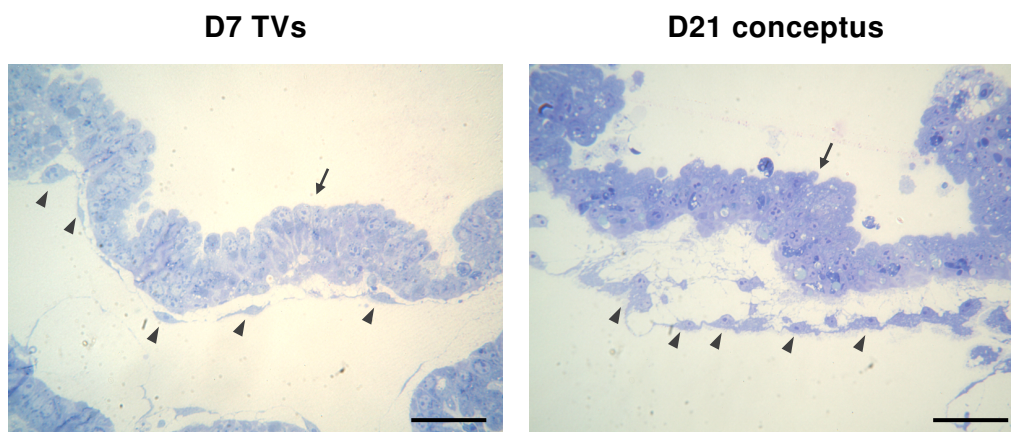


図7 再伸長 TVs (左) 、21 日胚 (右) の栄養膜の準超薄切片像

どちらも、トロホブラスト層 (矢印) がハイポブラスト層 (矢尻) に裏打ちされた形態を示した。Scale bar = 50  $\mu$ m

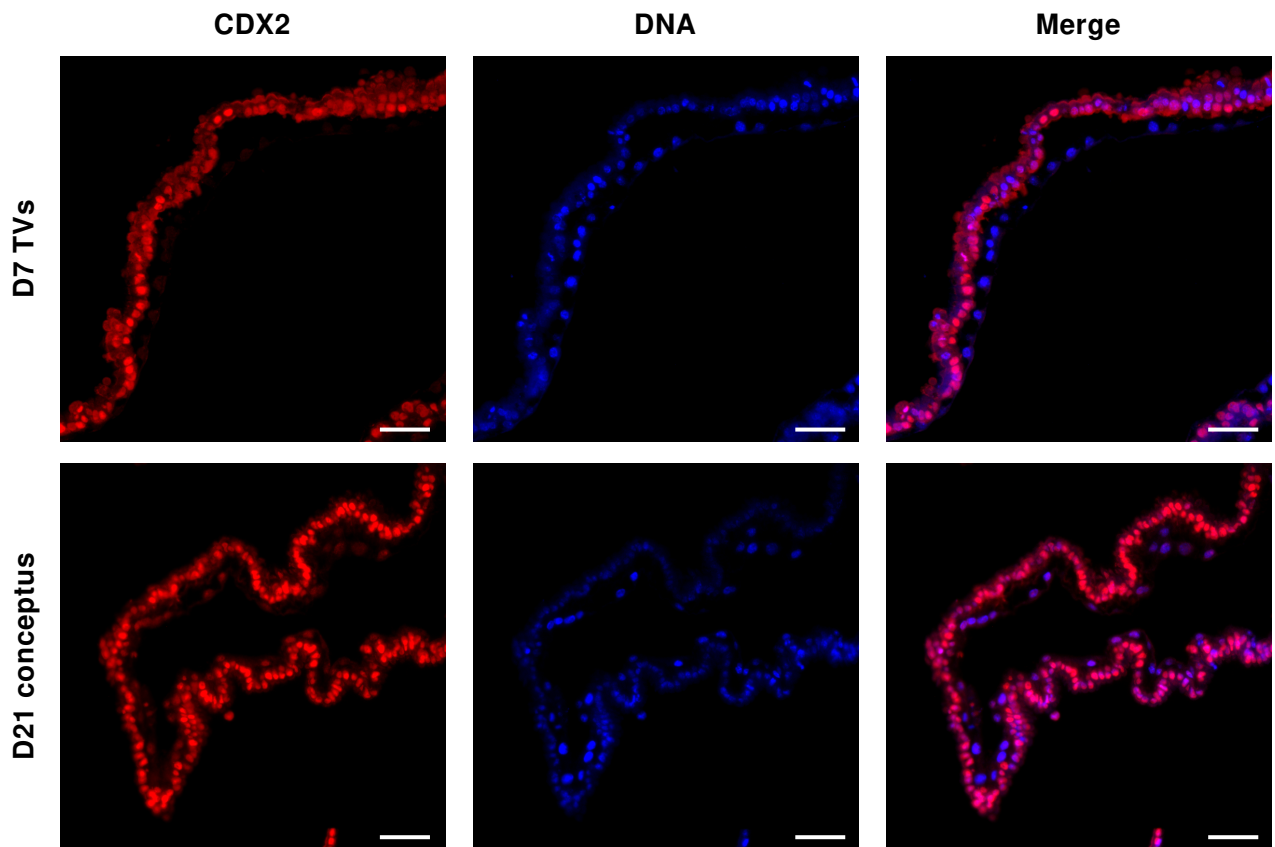


図 8 再伸長栄養膜の CDX2、SOX2、GATA6 の免疫蛍光染色

(CDX2)

Scale bar = 50  $\mu$ m

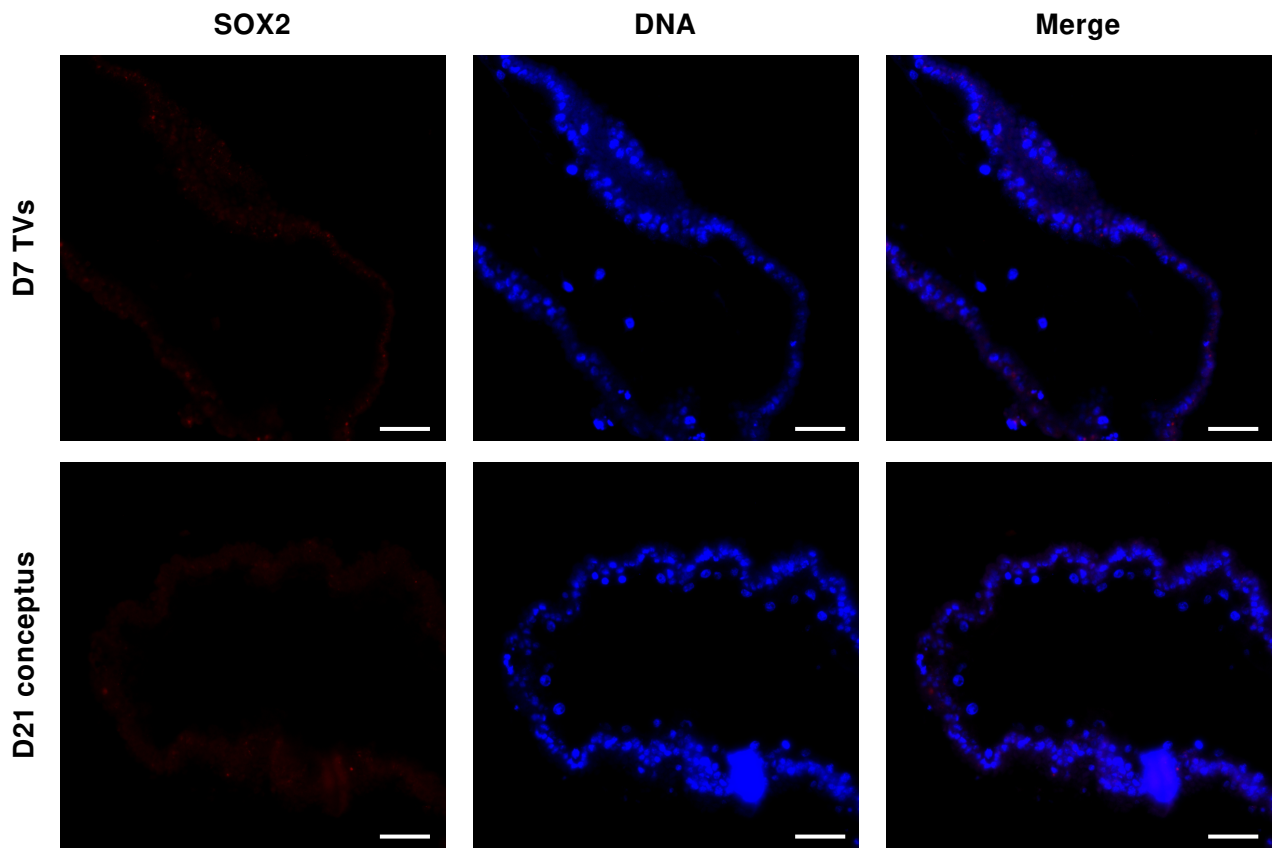


図 8 の続き (SOX2)

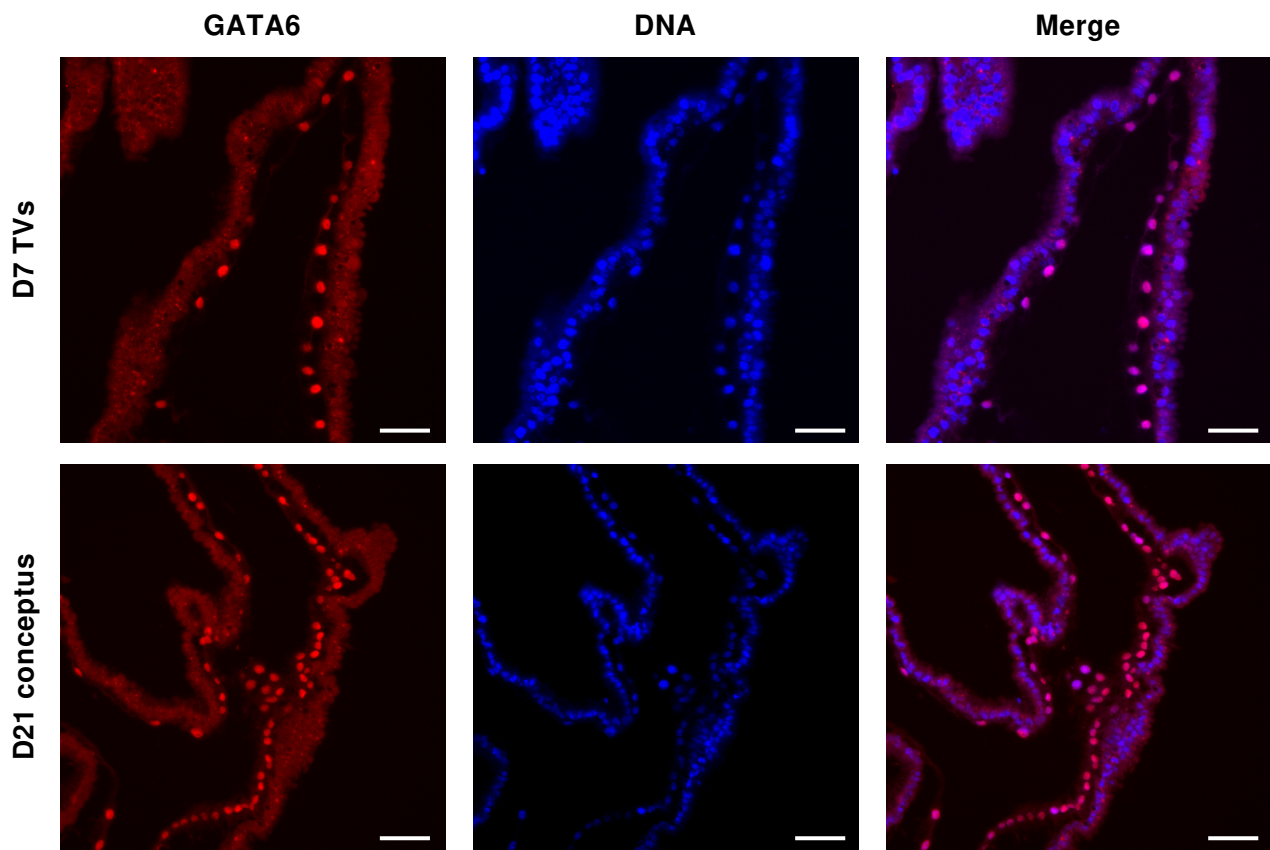


図 8 の続き (GATA6)

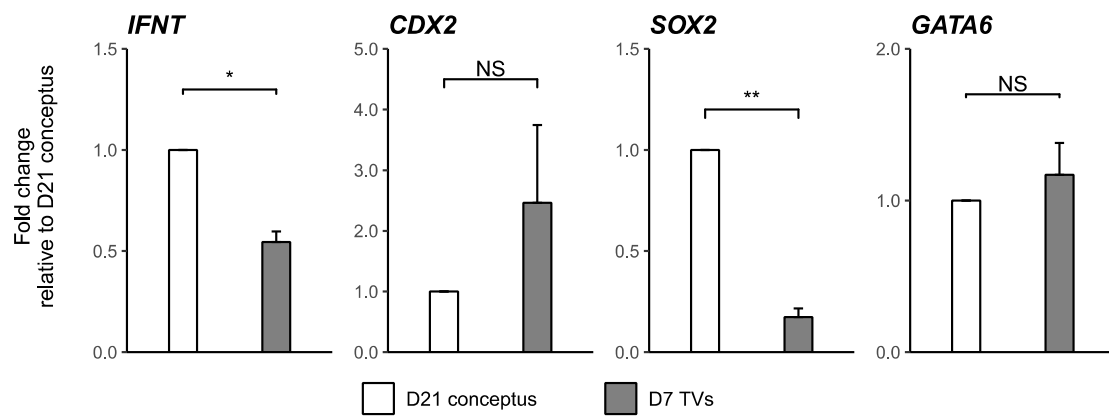


図9 再伸長 TVs および 21 日胚の栄養膜の分化関連遺伝子の定量 PCR

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

NS: 有意差なし

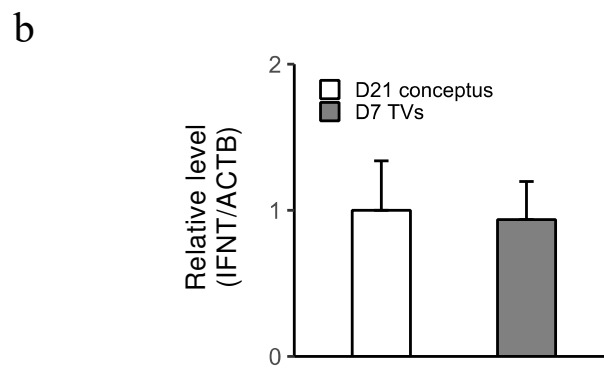
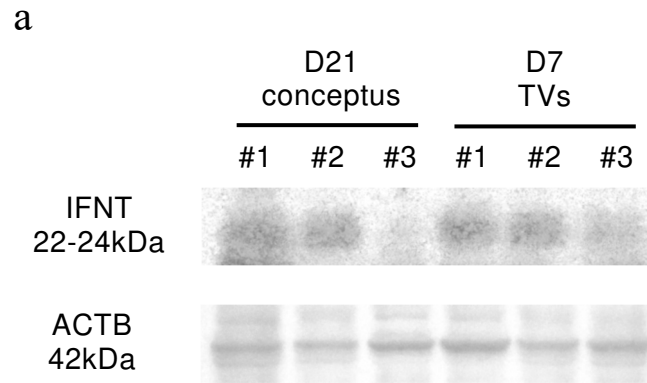


図 10 再伸長 TVs および 21 日胚の IFNT タンパク質のウェスタンブロッティング

a: ウェスタンブロッティング画像

b: ACTB により定量 (D21 胚を 1 とした)

## 第四章 遺伝的能力の判定精度を高める一卵性双子生産技術の開発

### 緒言

序論において、肉用牛の改良増殖に向けて一卵性双子の利用が有効であることを述べた。OPU と IVF による受精卵生産技術の発達により、発生初期段階の受精卵を人為的に操作することが可能になり、人為的に一卵性双子を生産する技術へ応用することができるようになった [23]。その結果、一卵性双子を用いた双子検定の実用化への可能性が高まった [13]。

哺乳動物において双子を含む一卵性多子を人為的に作製しようとする研究は古くから行われてきており、家畜では、1979 年にヒツジの 2 細胞期受精卵の割球を分離することによって一卵性双子の生産例が報告されている [20]。当時は受精卵の体外生産技術が確立されていなかったため、透明帯に戻した割球を寒天で包埋した後、卵管に戻すことで胚盤胞まで発生させ、さらに回収後にレシピエントのヒツジへ移植を行うという非常に複雑で労力を要する手段で作製された。ウシにおいては 1981 年に Willadsen が同様の手法を用い、8 細胞期胚を 2 割球ずつ 4 つに分離することで 4 つ子の生産に取り組み、3 つ子を含む一卵性多子が生産されている [21]。その後、体外培養系が確立されるようになると、2 細胞期胚を用いてより簡略的な一卵性双子となる胚の生産が可能となり [84]、最終的には OPU 技術と組み合わせることで生産できるようになった [13,23]。

さらに近年、個体のゲノム DNA 情報から能力を推定するゲノム評価が発展し、個体をと畜しなければ評価できない「と体形質」についても評価値が出せるようになった。しかしながら、その評価値の推定精度、つまり信頼度は形質によって異なり、現段階では実用に適しないほど低い形質もある [18]。例えば、肉用牛の枝肉形質のうち代表的な形質の一つに枝肉重量が挙げられるが、この形質のゲノム育種



価の信頼度は 0.8–0.9 である。一方、同じく黒毛和種において代表的かつ最も重要な経済形質である脂肪交雑では信頼度が 0.6 程度に留まる [18,85]。能力評価の信頼度に大きく関わる遺伝率を考慮した上で評価方法による信頼度の違いを比較すると、脂肪交雑に対するゲノム評価値は 4 頭分の後代検定による推定精度にしか及ばない [14,86]。このことからゲノム育種は、信頼度が異なる複数形質の効率的改良という観点からは万能とはいえない。一方で一卵性双子は候補牛自身と同一のゲノムを保持することから、その表型値は候補牛自身の計測値として評価することができる。この場合、脂肪交雑の信頼度は 8–10 頭の後代検定による推定精度と同等になると見積もられる。また、後代を作出する期間が不要になるため、後代検定よりも早期に評価を行うことができるという利点もある。したがって、ゲノム評価値の信頼度が低い形質では一卵性双子個体の計測値に基づいた評価を、信頼度が高い形質についてはゲノム評価値に基づいた評価を用い、両者の組み合わせで複数形質を評価することで、後代検定よりも早期に信頼性の高い遺伝的評価が可能になると考えられる。

ウシの遺伝的改良に最も重要な種雄牛造成を目的として候補牛を生産する場合には、前提として受精卵の性別が雄でなければならない。そこで、性判別をした上で一卵性双子生産に取り組まなければならない。通常、受精卵の雌雄判別のためには、受精卵の細胞を少量採取する必要がある [87]。さらに一卵性双子生産のために 1 つの受精卵を 2 つに分離することが求められる。それゆえ、細胞の採取と分離を同一受精卵で達成し、移植可能な受精卵へと発生させる必要があるが、受精卵の細胞の数には限りがあるため、全てを満たして効率的に個体作出させることは困難であった。性判別のために細胞を採取する手段としては、割球を採取する方法と、刃物を用いて物理的に切断する方法の 2 通りの方法が挙げられるが、切断する方法では切断面の細胞への傷害は避けられない。そのため本研究では、細胞への傷害を

可能な限り減らすという考え方から、割球分離を基盤として性判別の検査および一卵性双子胚の生産系を構築することを試みた。性判別の精度を確保するため、2つの割球を遺伝子検査用に採取し、残りの割球を2分離して個体発生能力を確かめることとした。

また、双子生産のために割球を二分する時期として、ウシの受精卵の初期発生の形態的特徴および細胞分化決定のタイミングを考慮しなければならない。受精後の1細胞期から32細胞期までは、個々の割球は球形を保ったまま卵割を進めるが、32-64細胞期の間割球同士が緊密に接着する現象である「コンパクション」を起こし、細胞同士の集合度が強化され分離が困難になる桑実期胚となる。この桑実期胚においては細胞の分化は明確には観察されないが、その後の胚盤胞期において胚の内部に液体が貯留して胞胚腔と呼ばれる腔を形成し、将来胚本体へと発生するICMと胎盤などの胚外組織を形成するTEの2つの細胞系列に分化が起こっている。そのため、分離時にはICMとTEの細胞のバランスを考慮する必要があるため、分離の容易さという観点から最適なタイミングとはいえない。そこで本研究では、16-32細胞期程度に発生した胚を割球分離に供することとした。

## 材料および方法

### 1. 体外受精卵の作出

OPU、IVM および IVF については、第二章の材料および方法、3. 未成熟卵母細胞の採取と体外成熟培養、および 6. 体外受精に準じて実施した。

#### 1-2. 体外発生培養 (IVC)

第二章材料および方法の 7. 体外発生培養に準じた。IVF の後、ピペッティングにより COCs に付着している精子を取り除き、洗浄後、10% RD+KSOM/aa 培地 (付表) で 5% CO<sub>2</sub>、38.5°C の条件下 (CO<sub>2</sub> インキュベーター (CPD-170; Hirasawa Co. Ltd., Tokyo, Japan)) でインキュベートした。その 22 から 24 時間後にピペッティングにより卵丘細胞を除去し、洗浄後、再度 10% RD+KSOM/aa 培地に移して 5% CO<sub>2</sub>、5% O<sub>2</sub>、90% N<sub>2</sub>、38.5°C の条件下 (マルチガスインキュベーター (APM-30DR; Astec Co. Ltd., Fukuoka, Japan)) で割球分離を実施するまで培養を行った。

### 2. 割球分離

IVF を実施した日を Day 0 として体外培養後 Day 4 または Day 5 において、一般的な卵割速度に対して遅滞がなく、それぞれの発生ステージ (16 細胞期および 32 細胞期) に相応して発生が進み、なおかつ変性細胞がみられない受精卵を選別して割球分離に供試した。

#### 2-1. Day 4 における 16 細胞期胚の割球分離

受精卵を 0.5% (v/v) プロナーゼ (P8811; Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA) に移して透明帯を溶解させて除去した。その後、10% RD+KSOM/aa 培地に移し、ピペッティングにより割球を分散させ、細胞数を計測した。そのうち 2 割球を性判別用

とし、それ以外の割球を半数ずつ等分し、個別培養ディッシュ (LinKID<sup>®</sup> micro25; Dai Nippon Printing Co. Ltd., Tokyo, Japan) の各ウェルに移して割球を導入して受精卵を再構成した (図 11)。操作は 38.5°C に加温した加温プレート (Kitazato Corp., Shizuoka, Japan) 上で実施した。分離した受精卵は 10% RD+KSOM/aa 培地中で 5% CO<sub>2</sub>、5% O<sub>2</sub>、90% N<sub>2</sub>、38.5°C の条件下で Day 7 まで培養を行った。性判別用の 2 割球は滅菌した超純水で洗浄後、2.5 μL の超純水と共にチューブへ移し、そこへ Loopamp<sup>®</sup> 牛性判別試薬キット (Eiken Chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan) に添付の DNA 抽出液 (Extraction Solution) を等量添加して DNA 抽出を行い、性判別用サンプルとして供した。

## 2-2. Day 5 における 32 細胞期胚の割球分離

割球分離を行う前に、顕微操作により再構成胚を保護するための透明帯の準備を行った。この透明帯は、別に体外受精を実施したときに生じた未受精卵の卵細胞質を除去することで用意した。顕微操作は、倒立顕微鏡 (IX70; Olympus, Tokyo, Japan) に搭載したマイクロマニピュレーター (Narishige, Tokyo, Japan) を用いて実施した。操作に用いるピペット類は、ガラスピペット作製のプーラー (PC-10; Narishige) およびマイクロフォージ (MF-900; Narishige) を用いて作製した。流動パラフィンで重層した 10% RD+KSOM/aa 培地の微小滴中に移した未受精卵を、ホールディングピペット (外径 150 μm) で固定し、囲卵腔にガラス針を貫通させた後、シャーレ底面に擦り付けることで透明帯を切開した。切開部より細胞質吸引用ピペット (外径 50 μm) を挿入し、卵細胞質を吸引除去した。その後、透明帯は 0.1% (w/v) PVP in PBS (-) (附表) で洗浄し、割球分離実施まで 0.1% PVP in PBS (-) 液中で保存した。

割球分離は以下のように行った。受精卵を 0.5% (v/v) プロナーゼ (P8811; Sigma

Aldrich) に移して透明帯を溶解させて除去した。その後、0.05% (v/v) Trypsin-EDTA (25300054; ThermoFisher Scientific) に移し、5 分間培養後、その中でピペッティングを行い、割球を分散させた。ここまでの操作は 38.5°C に加温した加温プレート上で実施した。その後、成熟用 TCM199 (付表) で作製した微小滴に分離した割球を移し、同微小滴に 2 個の透明帯も移した。顕微鏡下で細胞数を計測し、そのうち 2 割球を性判別用として残し、それ以外の割球を半数ずつ、インジェクションピペット (外径 50  $\mu\text{m}$ ) を用いて空の透明帯へ導入した (図 12)。分離した受精卵は洗浄後、10% RD+KSOM/aa 培地中で 5%  $\text{CO}_2$ 、5%  $\text{O}_2$ 、90%  $\text{N}_2$ 、38.5°C の条件下で Day 7 まで培養を行った。性判別用の 2 割球は、Day 4 の割球分離と同様に DNA 抽出して性判別用サンプルとして供した。

### 3. 受精卵の性判別

受精卵の性判別は LAMP 法 (Loop-Mediated Isothermal Amplification) [88] によって行い、検査には Loopamp<sup>®</sup> 牛性判別試薬キット (Eiken Chemical, Tokyo, Japan) を使用した。雄特異反应用ミックス (Reaction Mix. I) 20  $\mu\text{L}$  にキット付属の *Bst* DNA ポリメラーゼ 1  $\mu\text{L}$  とサンプル DNA 5  $\mu\text{L}$  を混合した後、Loopamp エンドポイント濁度測定装置 (Teramecs, Kyoto, Japan) により DNA 増幅反応を行った。反応後、同装置で増幅副産物であるピロリン酸マグネシウムの白濁の検出を行い、白濁があるものを雄、白濁がないものを雌と判定した。なお、試薬キット添付マニュアルには、サンプル DNA が適切に抽出・添加されていることを確認するため雌雄共通領域の増幅反応も行うことが必要とされているが、2 割球を用いた性判別においてはサンプルに供する DNA 量が極めて少ないことから、雄特異的反応のみ実施した。胚自体を性判別する場合は、雌雄共通反応も実施した。2 割球の判定と胚自体の判定が一致していない場合に誤判定とした。

#### 4. 細胞数の計測

Day 5 で分離した後に胚盤胞まで発生した受精卵の一部は、25 mg/mL Hoechst33342 (Sigma Aldrich) を用いて核染色を行い、蛍光顕微鏡下 (BX60; Olympus) で観察することにより細胞数を計測した。比較対象として、分離していない通常の胚盤胞期胚を用いた。

#### 5. 免疫染色

Day 5 で割球分離し胚盤胞となった受精卵を 4% (w/v) パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 (Nacalai Tesque) で 1 時間固定した後、0.1% PVP in PBS(-) で洗浄し、CDX2 タンパク質および SOX2 タンパク質の免疫染色に供した。まず、0.2% (v/v) Triton X-100 溶液 (付表) で 1 時間透過処理を行った後、0.05% (v/v) Tween 20 in PBS(-) で 5 倍希釈したブロッキング液 (Blocking One; Nacalai Tesque) で 45 分間ブロッキング処理をした。その後、ブロッキング液で 200 倍希釈した抗 CDX2 モノクローナル抗体 (ab76541; Abcam) および 1,500 倍希釈した抗 SOX2 モノクローナル抗体 (ab92494; Abcam) に移して 8 時間、20–22°C でインキュベートした。反応後、0.1% (v/v) Triton X-100 と 0.3% (w/v) ウシ血清アルブミン (Sigma Aldrich) を添加した PBS(-) で 10 分間 5 回洗浄し、0.01% (v/v) Tween 20 in PBS(-) で 400 倍希釈した二次抗体 (Alexa Flour 555 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体, A21428; ThermoFisher Scientific) に移して 30 分間、室温で静置した。その後、25 mg/mL Hoechst 33342 を添加した 0.2% (w/v) polyvinyl alcohol in PBS (-) で核染色を行い、洗浄後、スライドガラスに封入した。蛍光観察には LEICA TCS SP5 共焦点レーザー顕微鏡 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を使用した。

#### 6. 受精卵移植

雌雄判別済みの再構成胚を移植するため、レシピエント牛に発情同期化処理を行った。レシピエント牛は黒毛和種未経産牛 5 頭、経産牛 7 頭、および交雑種未経産牛 7 頭の合計 19 頭を供試し、延べ頭数として 27 頭に移植を行った。発情同期化処理は、黄体期の雌ウシに CIDR を挿入し、同時にクロプロステノール注射薬 (ゼノアジン C; Nippon Zenyaku Kogyo) を 3 mL、頸部筋肉内に投与した。発情予定日の 2 日前に CIDR を抜去し、発情前後に卵巣をエコー検査し排卵を確認した。発情から 7 日後に受精卵移植を実施した。再構成胚の移植に当たっては、レシピエント牛の産歴を考慮して 1 胚 (未経産および経産) あるいは 2 胚 (経産) を、受精卵移植器 (モ 1 号 (未経産) およびモ 4 号 (経産) (Misawa Medical Industry, Ibaraki, Japan)) を用いて非外科的に黄体側子宮内深部へ移植した。一部の移植においては、第三章で作製した凍結 TVs を前日に融解して 24 時間培養し、形態的に変性細胞がなく一層の小胞を形成していたものを 1-4 個、再構成胚と共にストローに導入して共移植した。

なお、移植により生産された双子については、家畜改良事業団が実施する遺伝子型検査を行い、卵性の判定 (一卵性または二卵性) の推定を行った。

## 7. 統計処理

分離前の割球数、および再構成後の胚盤胞の細胞数の平均値の差の検定は、 $F$  検定による等分散性の検定後、Student の  $t$  検定によって分析した。mRNA の相対発現値については、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$  値を用いて Student の  $t$  検定によって分析した。有意水準を 5% として  $P$  値が 0.05 未満の場合、統計的に有意であると判定した。

## 結果

### 分離後の受精卵の発生率

Day 4 および Day 5 で分離した受精卵について Day 7 まで培養したところ、共に、形態的に ICM と TE に細胞分化している胚盤胞に発生した (図 11、図 12、および表 6)。分離後に培養した個々の受精卵の胚盤胞発生率、および同一受精卵に由来する一卵性双子としての組での胚盤胞生産率は、Day 5 で分離した場合にはそれぞれ 66.2%、58.8%であり、Day 4 で分離した場合の 50.0%、40.0%と比較して若干高い成績が得られたが、どちらも統計的な有意差はなかった (それぞれ  $P = 0.13$ 、 $P = 0.22$ )。同一受精卵に由来し、分離後に片方のみが胚盤胞に発生した組の割合は Day 4 と Day 5 でそれぞれ 20.0%、14.7%であった。

### 性別別の精度

再構成胚を作る過程で採取した 2 割球の DNA を試料とした LAMP 法による性別判定結果を、その後残りの割球から発生した再構成胚との判定結果と比較して、性別判定の一致率を確かめた。Day 4 で分離した場合は実験した全部の受精卵で判定結果が一致していた (100%、 $n = 6/6$ )。一方、Day 5 で分離した受精卵では、2 割球では雌判定とした受精卵のうちの一部が胚自体は雄であるという誤判定があったため、その精度は 71.4% ( $n = 5/7$ ) となった。しかし、雄判定とした受精卵では、精度が 100% ( $n = 5/5$ ) であった (表 7)。

### Day 5 分離胚の細胞数

Day 5 で分離した再構成胚盤胞の細胞数は平均で  $72.9 \pm 5.9$  個であった (表 8)。これは、分離していない通常の胚盤胞の  $133.5 \pm 10.7$  個に比べて有意に少ない値であり ( $P < 0.01$ )、その比 (再構成胚/通常胚) はおよそ 0.54 であった。



### Day 5 分離胚の免疫染色

Day 5 で分離した再構成胚盤胞の CDX2 と SOX2 の免疫染色を行った。その結果、CDX2 は一部 TE 細胞でシグナルが観察されない細胞がみられたが、大部分では TE 細胞に CDX2 シグナルが観察された (CDX2 (-) / TE-total cells: 10.2%)。ICM 細胞中には CDX2 シグナルは検出されなかった。一方、SOX2 は ICM 細胞に優先的にシグナルが観察され、TE 細胞では SOX2 シグナルは全く観察されなかった (図 13)。

### Day 5 分離胚の受精卵移植

Day 5 で分離して得られた受精卵について、延べ 27 頭のレシピエント牛に移植し、個体までの発生能力を検証した。移植は、レシピエント牛 2 頭に対して 1 胚ずつ移植、またはレシピエント牛 1 頭に対して 2 胚移植し、さらに再構成胚のみ移植する場合、あるいは TVs を共移植する場合の受胎率について比較を行った (表 9)。その結果、各方法におけるレシピエント牛の受胎率はいずれも 25%前後であり、いずれの方法を用いた場合でも再構成胚の受胎は確認された。しかし、移植胚数あるいは TVs との共移植の有無による移植方法の違いによって受胎率に統計的に有意な差はみられなかった。

移植の成績としては、延べ 27 頭のレシピエント牛のうち受胎した頭数は 7 頭 (25.9%) であった。胎子数としては、18 組 (36 個) の分離胚を移植して 3 組 (6 頭) の双子を含む 9 頭の子牛が受胎したことから、双子の生産率としては 16.7% (3/18) となった。そのうち 2 組の双子が誕生しており、妊娠期間は 287–290 日、生時体重は 30.0–42.7 kg といずれも黒毛和種の正常範囲内であった (表 10 および図 14)。2 組の双子の遺伝子型検査による卵性の判定結果から、どちらも一卵性双子であると推定された。

## 考察

本章では、性判別用の割球の採取と受精卵の分離を同時に行う手段について検討した。緒言でも述べた通り、マイクロブレードを用いた切断による割球の採取では、技術的な普及を考えた場合には不適當な方法だと考えられる。そのため本研究では、IVF 後 Day 4 および Day 5 の 16 から 32 細胞期にある受精卵を用い、透明帯を除去した後に割球を一度分離させ、2 割球を性判別用として採取し、残りを等分して 2 つの受精卵に再構成する手法を試みた (図 11、12)。Day 3 より以前の胚では細胞数が少ないことから、性判別用の割球の採取により胚の生存性が損なわれることが自明であるため試験は行わなかった。また、Day 6 以降の胚ではすでに ICM と TE の分化確立が始まっており、再構成時に ICM/TE の細胞比をコントロールすることが困難であるため、Day 3 と同様に試験は行わなかった。Day 4 で分離した場合の受精卵発生率については、分離後の個々の胚盤胞発生率が 50.0%、同一胚を由来とする一対の双子胚としての胚盤胞発生率が 40.0%であった (表 6)。Day 7 まで生存していたにも関わらず形態的に移植に適さないと判断した胚盤胞については、一部の割球が胚を形成する集団から逸脱しているのが散見された (図 11)。Day 4 での再構成の手法は、個別培養ディッシュのウェル中に割球を寄せ集める形で行い、積極的に凝集をさせるような処置を行わなかった。このため、コンパクションに参加できない割球が発生する可能性が高まったと考えられた。したがって、Day 5 の分離と同様に透明帯導入などの処置、もしくはフィットヘマグルチニンといった細胞凝集剤などを用いて割球同士の凝集を促す処置をすることにより [89]、発生率が改善する余地が残されていると考えられた。

一方、Day 5 における分離では、再構成には卵細胞質を除去した透明帯へ導入し、発生率の向上を試みた (図 12)。透明帯に割球を導入する操作にはマイクロマニピュレーションを使用するが、割球を操作するインジェクションピペットの口径

は透明帯に挿入するための切れ込みの大きさととの兼ね合いから外径 50  $\mu\text{m}$  程度が適当であると考えられた。Day 4 胚の割球で同様の処理を実施するためにはピペット径をより大きくする必要があるが、一般にピペット径を大きくするとマニピュレーションが格段に難しくなる。そのため、技術の普及を考慮すれば、より卵割が進み割球も小さくなった Day 5 胚が透明帯に再導入する時期としては望ましいと考えられた。Day 5 胚では再構成後の発生率は、個々の胚盤胞発生率が 66.2%、一対での一卵性双子胚盤胞の発生率は 58.8%であり (表 6)、統計的に有意な差はみられなかったものの Day 4 の分離・再構成手法より高い発生成績が得られた。ただし、Day 4 と Day 5 の再構成胚は作製法自体が異なるため、厳密な比較はできない。そのため今後、作製方法を揃えて発生率を比較することが必要である。その一方で、Day 5 での再構成は透明帯により物理的に割球を囲うという手法により、Day 4 再構成胚で見られたような割球の逸脱が低減された上、分離時の割球数が増加することにより性判別用の割球の割合が相対的に低下し、発生率の向上に繋がったと考えられた。この手法に残された課題の一つとして、割球を再度注入するための透明帯は体外受精卵生産での余剰の卵母細胞を用い、卵細胞質を除去することで別に準備する必要があることから作業的な手間を要するという点があげられる。そこで、マウスの透明帯除去胚の保護効果が報告されているアガロースカプセルを [90]、今回のようなウシの再構成胚作製に適用することによって、本技術の簡易化が図られると考えられる。

性判別の精度については、分離した 2 割球とその他割球から成る胚自体の性別とを比較してその精度を求めた (表 7)。Day 5 再構成胚で、胚自体は雄でありながら割球では雌と判定したものが一部検出され、雌雄合わせると判定精度は 83.3%となった。本試験で用いた雌雄判別方法である LAMP 法は、目的とする DNA 配列を LAMP 用プライマーおよび DNA ポリメラーゼにより増幅させ、その増幅の有無で

判定することを原理としている。使用した性判別用キットはウシの Y 染色体に特異的な配列を認識して増幅させるが [88]、鋳型となる DNA サンプルがうまく添加できなかったことなどによって増幅反応がうまく起こらなかったことが誤判定の原因となったと考えられる。今回、検査には 2 割球を用いたが、100%の判定精度を得るには細胞 3 つ以上が必要であるという報告もあることから [88]、鋳型となる DNA 量が不足していた可能性も考えられる。判定精度の向上には、採取する細胞を 3 つに増やす、あるいは採取後に培養して細胞を増殖させるなどの検討が必要であると考えられた。ただし、割球において雄と判定した場合の判定精度は 100%であったことから、種雄牛造成の目的で雄の双子を生産する場合においては十分に活用できるものと考えられた。

Day 5 胚はすでにコンパクションが起り、ICM と TE の分化に向けて変化が起こっている時期と考えられ、再構成時に ICM および TE の各細胞がどのような割合で再構成胚に含まれるのかわからない。そのため、再構成後の初期胚発生への影響は未知である。また、再構成の過程で割球は細胞同士の結合が一旦分離してしまうが、ICM と TE の分化調節には細胞同士の接触度合いが重要な因子になることが分かっていることから [91]、再構成胚の ICM と TE への細胞分化については確かめなければならない。そこで、ICM と TE の分化に関連する分子マーカーである転写因子 CDX2 と SOX2 の両タンパク質の免疫染色を行い、胚盤胞期での ICM/TE 分化正常性について評価した。ウシの正常な胚盤胞期胚では CDX2 は TE 細胞に、SOX2 は ICM 細胞に、それぞれ優勢に発現している [49,51]。免疫染色の結果、Day 5 で再構成した胚においても同様に CDX2 は TE 細胞で、SOX2 は ICM 細胞で優先的に蛍光シグナルが観察された (図 13)。同じ哺乳類の初期胚でもマウスの場合においては、ICM と TE が形態的に明確に分化する以前の 32 細胞期の時点でそれぞれの細胞運命は不可逆的に決定づけられる [92]。一方で、ウシ胚ではマウス

胚ほど分化の確立が安定しておらず、胚盤胞形成後も ICM と TE の細胞は状況により他方の細胞に変化することが可能である [93,94]。したがって、ウシ Day 5 胚の割球を分離して半数ずつに細胞を再構築した場合でも、その後の胚発生において ICM と TE の 2 系列に正常に分化したと考えられた。

これらのことから本手法により作出した再構成胚は、細胞数が通常の受精卵の半数程度に減少するものの、ICM と TE の分化という観点では正常性を保っており、雌雄判別した上で一卵性双子ウシを生産することが可能であると推察された。そこで次に、Day 5 で分離した受精卵について、実際にレシピエント牛に移植して個体までの発生能を調べた。計 18 組の分離受精卵を移植したところ、3 組の一卵性双子を含む 9 頭が受胎し、現在のところ 7 頭が誕生した (2022 年 9 月)。出生した 7 頭のうちの 4 頭、すなわち 2 組が一卵性双子であった。残りの 1 組の一卵性双子は現時点 (2022 年 9 月) で妊娠中となっている。本研究により誕生した一卵性双子については妊娠期間、生時体重はどちらも黒毛和種の正常範囲内であったことから (表 10)、今回開発した技術が性判別を行った一卵性双子生産技術として利用できることを実証することができた。

双子の移植に際しては、レシピエント牛の産歴により 2 頭に 1 胚ずつ (未経産および経産)、あるいは 1 頭に 2 胚移植 (経産) の方法により実施した。2 胚移植は一般的に受胎率が高まるとされているが、本研究では両者に大きな受胎率の差はみられなかった (表 9)。一方で、双胎は流産や分娩事故のリスク増加、および生時体重が減少する傾向にあることから、種雄牛造成における双子生産という観点からは 1 胚移植による生産が望ましい。そこで、再構成胚 1 胚移植の双子生産成功率を向上させるために、TVs の共移植による受胎率向上効果についても検証した。しかし、今回実施した移植頭数では明確な効果は示されなかった (表 9)。共移植に供した TVs は、形態的に異常がないことを実体顕微鏡下で確認して個々に大きさを計測す

ることなく、共移植における 1 胚あたりの TVs 数は 1-4 個とした。しかし、TVs の大きさが IFNT 産生量に影響することや [95]、同時に移植する TVs の数により受胎成功率が変化することも報告されている [96]。また、TVs 作製の材料となる伸長胚の発育程度も受胎率に影響を及ぼすことも考えられるが、これまでに報告されている共移植の研究では供試されている伸長胚の日数は受精後 7-17 日と統一されていない [63-65,71,96]。このことも TVs 共移植の効果が報告によって異なっている一因である可能性が考えられた。今後は、移植前の TVs の性質と受胎率の関係を詳細に検討し、再構成胚を含む胚移植における TVs 活用法を調べることが重要であると考えられる。

本研究においては、全ての移植方法を通じての双子の産生率は 16.7%であった。橋谷田による一卵性双子生産の研究報告では、2 細胞期での割球分離による方法による双子の生産率は 20.0%であったが [13]、この先行研究では性判別は実施していないため雄双子として生産される確率は半分の 10%程度であると考えられる。このことを考慮すると、種雄牛造成として雄の一卵性双子を生産する場合には、今回の Day 5 で分離して雌雄判別まで行った手法を用いた方が、わずかであるが成功率が高い手法である可能性がある。

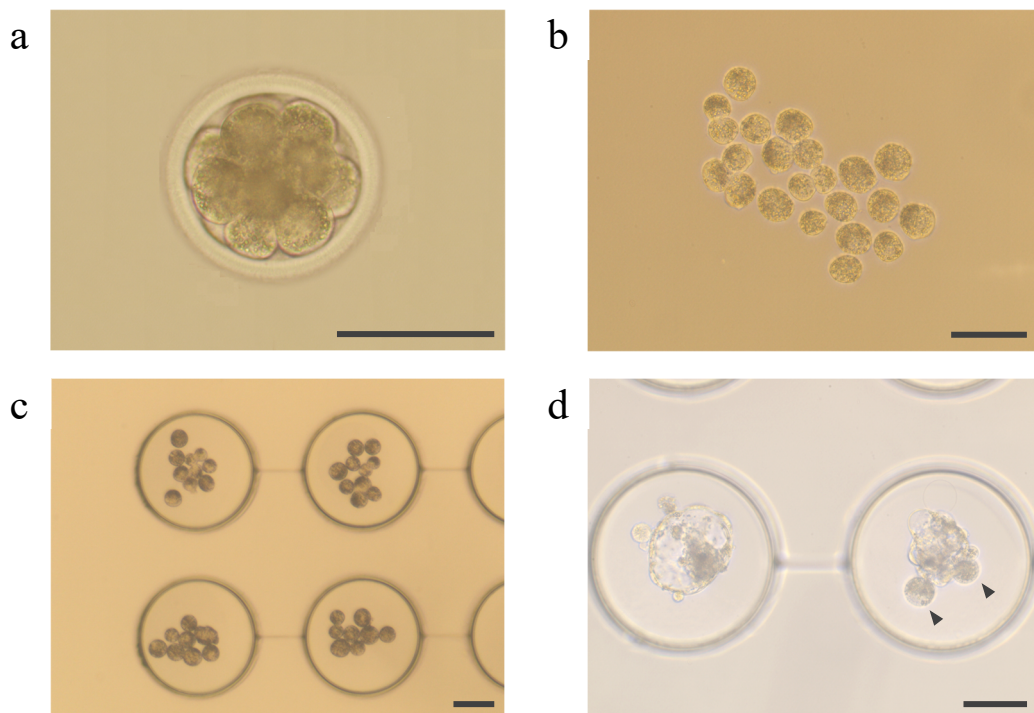


図 11 Day 4 受精卵の割球分離の概要

a: 分離前の受精卵

b: Trypsin による割球の分離

c: 個別培養ディッシュのウェルに半数ずつ導入

d: Day 7 に発生した受精卵。矢尻は逸脱した割球を示す

Scale bar = 100  $\mu$ m

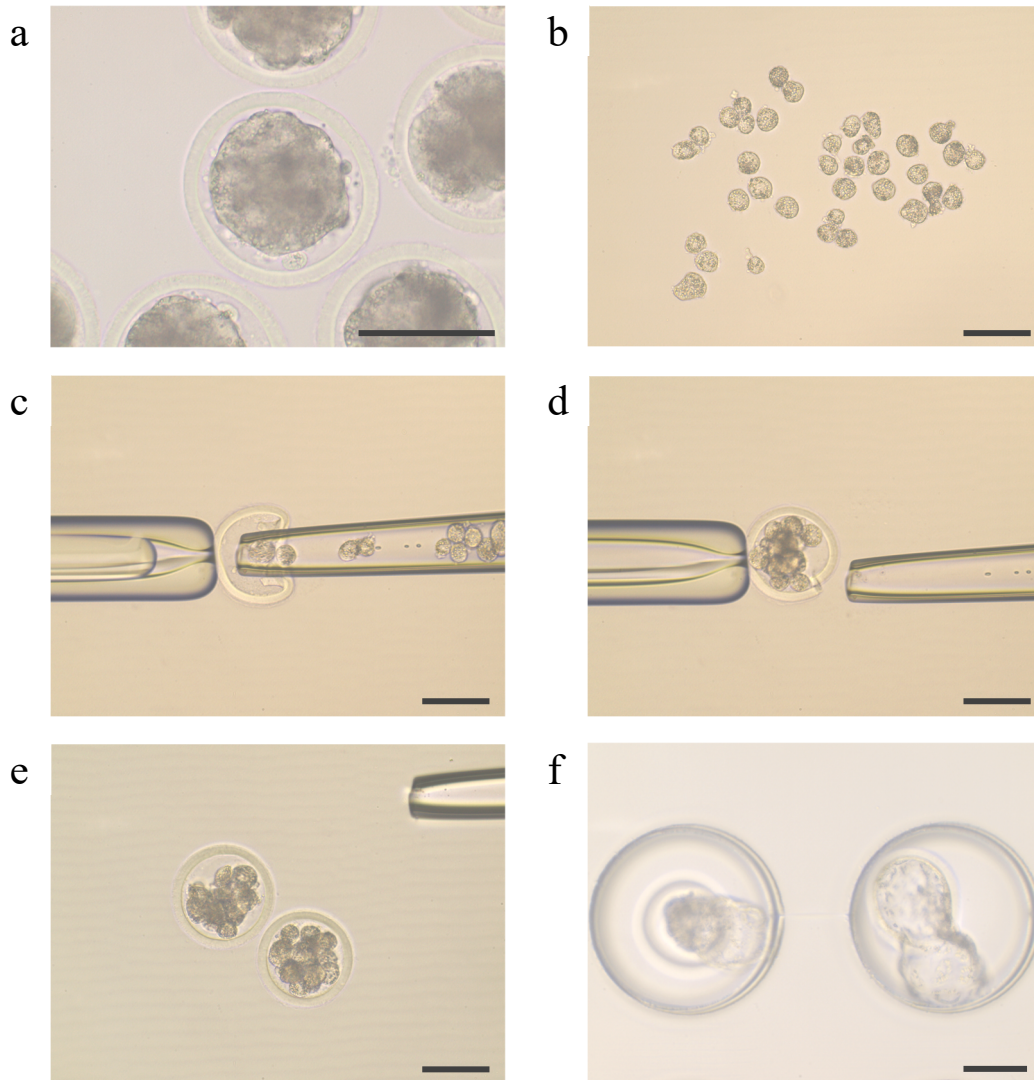


図 12 Day 5 受精卵の割球分離の概要

a: 分離前の受精卵

b: Trypsin による分離後

c-e: マイクロマニピュレーションによって透明帯に導入

f: Day 7 に胚盤胞に発育した受精卵

Scale bar = 100  $\mu$ m



表 6 分離時の割球数および移植可能胚発生率

分離・ 再構築	n	分離前の 割球数 (平均±SEM)	全体に 対する 2割球の 割合 (%)	再構成 胚数	胚盤胞 発生数 (%)	一对の 胚盤胞の 発生数 (%)	片方のみ 胚盤胞に 発生した数 (%)
Day 4 区	15	14.8 ± 0.93 <sup>a</sup>	13.5	30	15 (50.0)	6 組 (40.0)	3 (20.0)
Day 5 区	34	43.6 ± 13.5 <sup>b</sup>	4.6	68	45 (66.2)	20 組 (58.8)	5 (14.7)

ab 間で有意差あり ( $P < 0.01$ )

表 7 2割球を試料とした LAMP 法による性判別の精度

分離・再構築	性別	雌雄別精度% (n)	合計精度% (n)
Day 4 区	♂	100 (2 / 2)	100 (6/6)
	♀	100 (4 / 4)	
Day 5 区	♂	100 (5 / 5)	83.3 (10/12)
	♀	71.4 (5 / 7)	

表 8 分離後の胚盤胞の細胞数の比較

区分	n	細胞数 (平均 ± SEM)
Day 5 分離胚	11	72.9 ± 5.9 <sup>a</sup>
通常胚 (非分離)	11	133.5 ± 10.7 <sup>b</sup>

ab 間で有意差あり ( $P < 0.01$ )

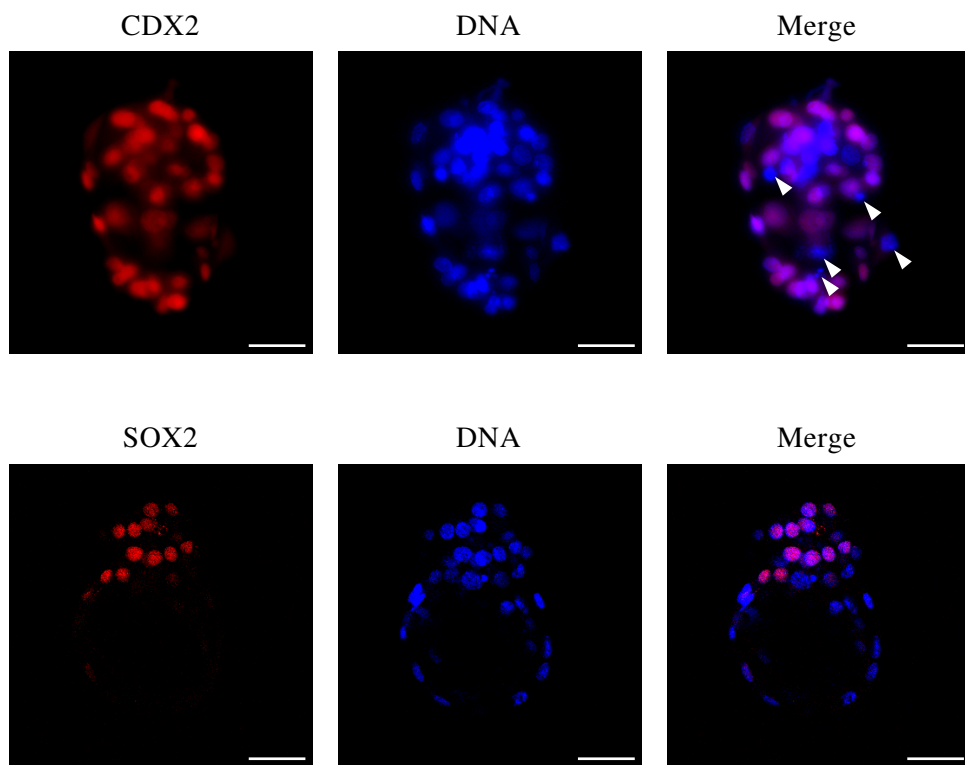


図 13 Day 5 再構築胚の CDX2 と SOX2 の免疫蛍光染色

矢尻: TE 中に、CDX2 シグナルが確認されない細胞が数個見られる (平均 10.2%; CDX2(-) / TE-total cells)。 Scale bar = 50  $\mu$ m

表 9 双子の移植成績

移植方法	TVs	移植頭数	移植受精卵	受胎数	胎子数	双子産生数
	共移植	(頭)	(組)	(頭 (%))	(頭)	(組 (%))
1 胚移植	+	14	7	4 (28.6)	4	1 (14.3)
	-	4	2	1 (25.0)	1	0 (0.0)
(小計)	(+/-)	18	9	5 (27.8)	5	1 (11.1)
2 胚移植	+	5	5	1 (20.0)	2	1 (20.0)
	-	4	4	1 (25.0)	2	1 (25.0)
(小計)	(+/-)	9	9	2 (22.2)	4	2 (22.2)
合計	(+/-)	27	18	7 (25.9)	9	3 (16.7)

表 10 誕生した双子の妊娠期間および生時体重

No.	移植方法	妊娠期間 (日)	生時体重 (kg)	性別
1	1 胚 × 2 頭	287, 288	42.0, 42.7	♂, ♂
2	1 頭に 2 胚移植	290	31.0, 30.0	♂, ♂



図 14 本研究によって誕生した、性判別済み (雄) の一卵性双子  
(上段) 1 組目、(下段) 2 組目。直接検定終了時 (12 か月齢) 撮影

## 第五章 総括

家畜の繁殖技術とは、後代を効率よく生産する技術全般であるため、親と子の遺伝的な能力を引き上げる育種技術とは本質的に重複する部分もある。なぜなら、後代の生産方式は遺伝的能力評価の方式に深く関わるからである。実際に、精液の凍結保存と人工授精により雄親の選抜強度を飛躍的に高めることが可能となり、過剰排卵処理と受精卵移植の発達により雌親の遺伝的能力を効率よく後代に伝えることができるようになった。加えて、経膣採卵-体外受精 (OPU-IVF) 技術の開発により、雌の遺伝資源の活用という観点からこれまで以上に牛群全体の遺伝的能力向上を効率的に推し進めることができるようになった。そして、OPU-IVF 技術は種雄牛造成の場面においても活用されている。こうした背景から、本研究では、OPU-IVF 技術を基盤とし、より効率的な育種改良を可能にする繁殖技術の開発という観点から研究を行った。

本論文の第二章においては、OPU により採取した未受精卵子の利用性を高めることを目的とし、ガラス化凍結保存した未受精卵子を用いて ICSI を実施し、生産した受精卵の正常性を確認するとともに子ウシを生産することに初めて成功した。これにより、OPU によって採取された卵子をガラス化保存して ICSI によって成体まで発生する受精卵を効率よく生産できる可能性が示された。第三章においては、受胎率の改善効果があるとされる TVs について凍結融解後の生存性を改善し、さらに凍結 TVs が子宮へ移植した後に発育して伸長胚栄養膜と同等の組織形態および IFNT タンパク質分泌能を持つことを明らかとした。これにより、これまで不明だった TVs の子宮内の動態が一部解明された上、胚の着床メカニズムを調査するための解析ツールとなる可能性も見出された。第四章においては、肉用種雄牛の遺伝的能力の新判定法の開発にも繋がる性判別した一卵性双子胚の生産技術の開発に取り組み、OPU-IVF 技術に由来する性判別一卵性双子個体の作製に初めて成功し



た。これらの技術の融合によって、OPUにより遺伝的能力の高い雌ウシから卵子を大量に確保しつつ割球分離によって雄一卵性双子の受精卵生産し、妊娠認識の強化が期待されるTVsを効率的に作製して共移植を行うことで、確実に雄双子を生産する技術体系が構築される。これにより、双子検定を活用した種雄牛造成を加速させることが可能になる(図15)。

本研究で提案するこれらの新たな繁殖技術は、優れた遺伝的能力を持つ雌ウシの遺伝資源の有効活用、種雄牛造成に向けた効率的な一卵性双子胚の生産、および受精卵移植における受胎率向上という、体外胚生産技術を軸とした肉用牛の種雄候補牛の造成体系における重要な局面において従来法の改善を実現し、ウシの改良増殖効率を包括的に向上させる新方式の基盤となる可能性を示した。今回開発された技術を駆使し、優れた遺伝的能力を有する種雄牛が開発されていくことを期待したい。

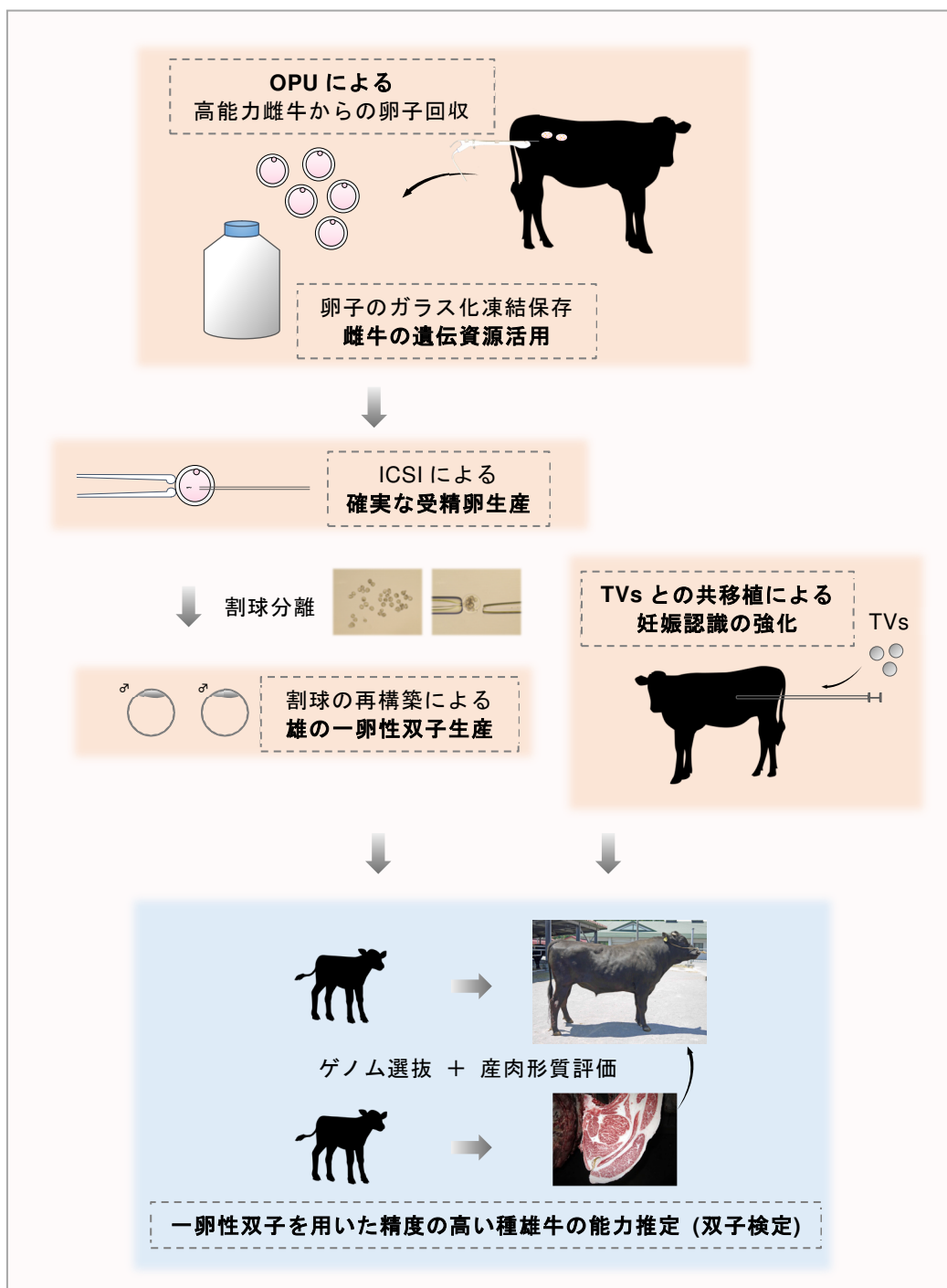


図 15 本研究で開発した技術を活用した肉用牛の効率的育種への展望

## 要旨

ウシの受精卵移植技術は、遺伝的能力の高い雌ウシから複数の受精卵を生産し、レシピエント牛に移植して産ませることで複数の後代を短期間に得ることを可能にする。したがって、遺伝的能力が高い雌ウシの遺伝資源である卵子の利用性を高めることができることから、生産現場において普及が進んでいる技術となっている。現在では、経膈採卵 (OPU) と体外受精 (IVF) 技術を用いた受精卵生産方式が主流となり、優れた遺伝的能力を持つ種雄牛の造成の場面においても活用されている。このように、繁殖技術は育種改良を推進する上で有効な手段であり、繁殖技術の改良は効率的な育種改良法の構想に繋がる。本研究では、育種改良効率化の可能性を広げるべく、3つの体外受精関連技術について研究を行った。

### (1) ガラス化保存した未受精卵子を利用した子ウシ生産系の開発

特別な機材を使用せずに細胞の低温保存が可能なガラス化により保存した卵子は、新鮮卵子に比べて受精後の発生率が低いという問題がある。これは、ガラス化過程において引き起こされる透明帯の変性による精子侵入率の低下が原因であると考えられている。そこで本研究では、精子を直接注入する顕微授精 (ICSI) をガラス化 OPU 卵子に適用することで、個体発生可能な受精卵の作製を目指した。その結果、ガラス化 OPU 卵子を ICSI によって受精させた受精卵は、新鮮卵子を IVF により受精させたものに比べて胚盤胞期までの発生率が低下するものの、卵割、すなわち発生を開始した受精卵が胚盤胞期に発育する割合は、新鮮卵子と同等の発生率を示すことが明らかとなった。また、ガラス化 OPU 卵子を用いて ICSI により生産した受精卵の胚盤胞期における細胞分化関連遺伝子の発現を調べたところ、新鮮 IVF 受精卵と同様の発現様式を示すことが確認された。さらに、ガラス化 OPU 卵子を用いて ICSI により生産した受精卵をレシピエント牛に移植することにより、2頭の子

ウシを誕生させることに初めて成功した。このことから、ガラス化した OPU 卵子を ICSI によって受精させることにより、個体発生可能な受精卵を作製できることが証明された。

## (2) 妊娠認識を補助する栄養膜小胞の凍結融解後の生存性改善および子宮への移植後の動態

受精卵の受胎には、母体による妊娠認識が必要不可欠である。ウシでは受精卵の栄養膜細胞から産生されるインターフェロンタウ (IFNT) を始めとした妊娠認識機構が明らかにされている。このことから、移植胚の受胎を補助するために、栄養膜細胞を含む栄養膜小胞 (TVs) の共移植が効果的であると考えられてきた。TVs は、着床期の 14-17 日齢の伸長期から、将来胎子を形成するエピブラストを切除して、胎盤を形成する栄養膜部分を切り出して作製することができる。実際の胚移植の際には、TVs を凍結保存し用時調製することができれば利便性が飛躍的に高まる。しかし、これまでに凍結 TVs の作製条件は十分に検討されていない。そこで本研究では、TVs が多く得られる生産手段を確立することを目的として伸長胚の回収日について検討を行い、次いで凍結保存条件を探った。その結果、過剰排卵処理後の人工授精から 14 日後に回収することで、多くの TVs が作製できることが判明した。TVs の凍結保存条件として、栄養膜細切直後の小胞形成前に凍結処理を行うことにより、小胞を形成した後に凍結する従来の方法に比べて融解後の生存率が高くなることがわかった。さらに、TVs を移植した場合の子宮内における動態についても調べた。移植した凍結 TVs について 21 日齢伸長胚の栄養膜と比較したところ、組織学的および細胞免疫学的手法による観察では、凍結 TVs は 21 日齢の伸長胚の栄養膜と同様の特徴を示していた。また、妊娠認識に重要な因子の一つである IFNT 遺伝子の mRNA 相対発現値は低かったものの、タンパク質は同等レベルで発現していること

が明らかとなった。このことから、移植後の凍結 TVs は少なくとも 7 日程度までは子宮内で栄養膜細胞としての性質を維持したまま発育することが明らかとなった。

### (3) 遺伝的能力の判定精度を高める一卵性双子生産技術の開発

近年、ゲノム育種が普及して遺伝的改良の効率が飛躍的に向上しており、個体をと畜しなければ評価できない「と体形質」についても利用が進んでいる。しかし、評価値の信頼度は形質によって高低があり、複数形質の効率的改良という観点からゲノム育種は万能とはいえない。そこで、肉用牛の種雄牛造成において、一卵性双子による候補牛自身としての計測値に基づいた評価と、ゲノム育種価に基づいた評価とを組み合わせることで、より信頼性の高い遺伝的評価ができる可能性がある。具体的には、現時点でゲノム評価値の信頼度の低い脂肪交雑などの形質では候補牛の一卵性双子の表型値に基づいて評価し、ゲノム評価値の信頼度が高い枝肉重量などの形質のゲノム評価値と組み合わせることで総合的に判断することによって、より正確な遺伝的能力評価が下せるかもしれない。そのためには種雄牛候補となる雄の一卵性双子を作出することが求められるが、体外受精技術を活用して性判別をした上で安定的に双子を作出する方法は確立されていない。そこで本研究では、性判別を実施した上で一卵性双子胚を用意し、個体までの発生能力を確かめることを目的とした。受精から 4 日および 5 日目の 16-32 細胞期の受精卵について、割球を一旦分散させた後に、性判別用に 2 割球を採取し、残りの割球を 2 つの受精卵に再構成するという手法で受精卵の生産を試みた。その結果、それぞれ 40.0%、58.8% の割合で双子となる胚盤胞が得られ、また雄胚を確実に判定することができた。さらに、5 日目の分離によって発生した胚盤胞期胚の免疫蛍光染色観察からは、将来胎盤を形成する TE 細胞においては CDX2 が、将来胎子部分を形成する ICM 細胞においては SOX2 がそれぞれ優先的に発現していることが確認され、こ

れらは通常の受精卵と同様であったことから、再構成した後でも細胞分化が正常に起こっていると推察された。最後に、5 日目で分離した受精卵についてレシピエント牛に移植したところ、2 組の一卵性双子を含む 6 頭の子ウシ生産例が得られた。以上の結果から、性判別を行った一卵性双子胚から個体を生産することが可能であることが初めて示され、種雄牛造成を目的とした繁殖技術として利用できることが示された。

## 結論

これまで、家畜繁殖技術の発展は育種改良に貢献してきた。近年、ウシにおいて、OPU-IVF 技術が発展してきたことに伴い、遺伝的能力の高い雌ウシから卵子を採取し、種雄牛造成に活用することが可能となってきた。本研究では、OPU-IVF 技術を基盤として、より効率的な育種改良法の可能性を広げるべく、繁殖技術の改良について多角的に取り組んだ。その結果、OPU により採取しガラス化保存した未受精卵子を利用して ICSI を行うことで個体生産が可能であることを示した。また、妊娠認識を補助することが期待される TVs の凍結保存方法を改善し、移植後には子宮内で一定期間発育することも確認した。さらに、体外受精を利用して、性判別した上で一卵性双子を効率的に生産できる技術の開発にも成功した。これらの技術を駆使することによって、ウシの改良増殖に大きく貢献するものと期待される。

## 謝辞

本研究を遂行し取りまとめるに際して、終始ご指導とご助言を頂きました遺伝繁殖学研究室の准教授・川原学博士、教授・高橋昌志博士、助教・唄花子博士に心より深く感謝いたします。本論文の御高閲を賜りました、畜牧体系学研究室教授・上田宏一郎博士、動物機能栄養学研究室教授・小池聡博士に心より感謝いたします。本研究を推進する上で重要な知識を授けて頂きました農研機構北海道農業研究センターの山崎武志博士に心より感謝いたします。大学院へ派遣させていただいた地方独立行政法人青森県産業技術センターの関係者皆様に、大変感謝いたします。畜産研究所の職員および農場スタッフには、本研究の推進において様々なご配慮、サポートをして頂きましたことを心より感謝申し上げます。研究に供試した牛たちには、かけがえのない研究材料・研究データを提供していただきました。心より感謝いたします。遺伝繁殖学研究室の先輩・後輩の皆様には、実験のご指導・ご協力をして頂き、本研究を遂行することができました。深く感謝申し上げます。最後に、終始支えてくれた家族に心より感謝いたします。

## 参考文献

- [1] 農林水産省. 農林水産物・食品の輸出拡大実行戦略 (令和4年6月改訂); 2022.  
<https://www.maff.go.jp/j/shokusan/export/progress/attach/pdf/index-19.pdf>.
- [2] 農林水産省. 牛受精卵移植実施状況 (平成27年度); 2015.  
[https://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l\\_katiku/attach/pdf/index-10.pdf](https://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l_katiku/attach/pdf/index-10.pdf).
- [3] Willett EL, Black WG, Casida LE, Stone WH, Buckner PJ. Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. *Science* 1951; 113:247.
- [4] Mutter LR, Graden AP, Olds D. Successful non-surgical bovine embryo transfer. *A I Dig* 1964; 12.
- [5] Sugie T. Successful transfer of a fertilized bovine egg by non-surgical techniques. *J Reprod Fertil* 1965; 10:197–201.
- [6] Wilmut I, Rowson L. The successful low-temperature preservation of mouse and cow embryos. *Reproduction* 1973; 33:352–353.
- [7] Wilmut I, Rowson L. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vet Rec* 1973; 92:686–690.
- [8] Ferré LB, Kjelland ME, Strøbech LB, Hyttel P, Mermillod P, Ross PJ. Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal* 2020; 14:991–1004.
- [9] Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol Reprod* 1982; 27:147–158.
- [10] Lu K, Gordon I, Gallagher M, McGovern H. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilisation of oocytes matured in vitro. *Vet Rec* 1987; 121:259–260.



- [11] van Wagendonk-de Leeuw AM. Ovum Pick Up and In Vitro Production in the bovine after use in several generations: A 2005 status. *Theriogenology* 2006; 65:914–925.
- [12] 公益社団法人全国和牛登録協会. 和牛登録事務必携 (令和3年度版) 2021.
- [13] Hashiyada Y. The contribution of efficient production of monozygotic twins to beef cattle breeding. *J Reprod Dev* 2017; 63:527–538.
- [14] 古川力. クローン技術を応用した肉牛の育種システム. *日本胚移植学雑誌* 2001; 23:88–94.
- [15] Kang YK, Koo DB, Park JS, Choi YH, Lee KK, Han YM. Influence of oocyte nuclei on demethylation of donor genome in cloned bovine embryos. *FEBS Lett* 2001; 499:55–58.
- [16] Dean W, Santos F, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Walter J, Wolf E, Reik W. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: Aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:13734–13738.
- [17] Cezar GG, Bartolomei MS, Forsberg EJ, First NL, Bishop MD, Eilertsen KJ. Genome-wide epigenetic alterations in cloned bovine fetuses. *Biol Reprod* 2003; 68:1009–1014.
- [18] Watanabe T. Genomic breeding value evaluation for economically important traits of Japanese Black cattle. *J Anim Genet* 2016; 44:3–10.
- [19] 石原盛衛. 和牛の多胎性に関する研究. *中國四國農業試験場報告* 1952; 1:71–90.
- [20] Willadsen SM. A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. *Nature* 1979; 277:298–300.

- [21] Willadsen S, Polge C. Attempts to produce monozygotic quadruplets in cattle by blastomere separation. *Vet Rec* 1981; 108:211–213.
- [22] Ozil JP, Heyman Y, Renard JP. Production of monozygotic twins by micromanipulation and cervical transfer in the cow. *Vet Rec* 1982; 110:126–127.
- [23] Tagawa M, Matoba S, Narita M, Saito N, Nagai T, Imai K. Production of monozygotic twin calves using the blastomere separation technique and Well of the Well culture system. *Theriogenology* 2008; 69:574–582.
- [24] Pieterse MC, Kappen KA, Kruip TAM, Taverne MAM. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 1988; 30:751–762.
- [25] Galli C, Duchi R, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G. Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: From the research laboratory to clinical practice. *Theriogenology* 2014; 81:138–151.
- [26] Díez C, Muñoz M, Caamaño JN, Gómez E. Cryopreservation of the bovine oocyte: current status and perspectives. *Reprod Domest Anim* 2012; 47 Suppl 3:76–83.
- [27] Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  by vitrification. *Nature* 1985; 313:573–575.
- [28] Aono A, Nagatomo H, Takuma T, Nonaka R, Ono Y, Wada Y, Abe Y, Takahashi M, Watanabe T, Kawahara M. Dynamics of intracellular phospholipid membrane organization during oocyte maturation and successful vitrification of immature oocytes retrieved by ovum pick-up in cattle. *Theriogenology* 2013; 79:1146–1152.
- [29] Hwang IS, Hochi S. Recent progress in cryopreservation of bovine oocytes. *Biomed Res Int* 2014; 2014:570647.

- [30] Mogas T. Update on the vitrification of bovine oocytes and invitro-produced embryos. *Reprod Fertil Dev* 2018; 31:105–117.
- [31] Fuku E, Kojima T, Shioya Y, Marcus GJ, Downey BR. In vitro fertilization and development of frozen-thawed bovine oocytes. *Cryobiology* 1992; 29:485–492.
- [32] Fuku E, Liu J, Downey BR. In vitro viability and ultrastructural changes in bovine oocytes treated with a vitrification solution. *Mol Reprod Dev* 1995; 40:177–185.
- [33] Hyttel P, Vajta G, Callesen H. Vitrification of bovine oocytes with the open pulled straw method: Ultrastructural consequences. *Mol Reprod Dev* 2000; 56:80–88.
- [34] Hochi S, Kanamori A, Kimura K, Hanada A. In vitro fertilizing ability of bovine oocytes frozen-thawed at immature, maturing, and mature stages. *J Mamm Ova Res* 1997; 14:61–65.
- [35] Mavrides A, Morroll D. Cryopreservation of bovine oocytes: Is cryoloop vitrification the future to preserving the female gamete? *Reprod Nutr Dev* 2002; 42:73–80.
- [36] Rho GJ, Lee SL, Kim YS, Yeo HJ, Ock SA, Balasubramanian S, Choe SY. Intracytoplasmic sperm injection of frozen-thawed bovine oocytes and subsequent embryo development. *Mol Reprod Dev* 2004; 68:449–455.
- [37] Mavrides A, Morroll D. Bypassing the effect of zona pellucida changes on embryo formation following cryopreservation of bovine oocytes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005; 118:66–70.
- [38] Mezzalira JC, Ohlweiler LU, Klein N, Brum D dos S, Leivas FG, Mezzalira A, Dos D, Brum S, Leivas FG, Mezzalira A. Intracytoplasmic sperm injection after vitrification of immature oocytes in follicular fluid increases Bovine Embryo production. *Acta Sci Vet* 2017; 45:1–7.

- [39] Rho G-J, Kawarsky S, Johnson WH, Kochhar K, Betteridge KJ. Sperm and oocyte treatments to improve the formation of male and female pronuclei and subsequent development following intracytoplasmic sperm injection into bovine oocytes. *Biol Reprod* 1998; 59:918–924.
- [40] Ock S-A, Bhak JS, Balasubramanian S, Lee HJ, Choe SY, Rho G-J. Different activation treatments for successful development of bovine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. *Zygote* 2003; 11:69–76.
- [41] Oikawa T, Takada N, Kikuchi T, Numabe T, Takenaka M, Horiuchi T. Evaluation of activation treatments for blastocyst production and birth of viable calves following bovine intracytoplasmic sperm injection. *Anim Reprod Sci* 2005; 86:187–194.
- [42] Ock S-A, Rho G-J. Parthenogenetic development and ploidy following various chemical activation regimens of bovine oocytes. *J Vet Med Sci* 2008; 70:1165–1172.
- [43] Van Soom A, Boerjan ML, Bols PEJ, Vanroose G, Lein A, Coryn M, De Kruif A. Timing of compaction and inner cell allocation in bovine embryos produced in vivo after superovulation. *Biol Reprod* 1997; 57:1041–1049.
- [44] Ali J, Shelton JN. Vitrification of preimplantation stages of mouse embryos. *Reproduction* 1993; 98:459–465.
- [45] Momozawa K, Fukuda Y. Establishment of an advanced chemically defined medium for early embryos derived from in vitro matured and fertilized bovine oocytes. *J Reprod Dev* 2011; 57:681–689.
- [46] 堂地修, 今井敬. リノール酸アルブミンがウシ体外受精由来切断分離胚の凍結・融解後の生存性に及ぼす影響. *酪農学園大学紀要* 2001; 26:51–56.

- [47] Daigneault BW, Rajput S, Smith GW, Ross PJ. Embryonic POU5F1 is Required for Expanded Bovine Blastocyst Formation. *Sci Rep* 2018; 8:1–11.
- [48] Kuijk EW, Du Puy L, Van Tol HTA, Oei CHY, Haagsman HP, Colenbrander B, Roelen BAJ. Differences in early lineage segregation between mammals. *Dev Dyn* 2008; 237:918–927.
- [49] Goissis MD, Cibelli JB. Functional characterization of SOX2 in bovine preimplantation embryos. *Biol Reprod* 2014; 90:1–10.
- [50] Nagatomo H, Kagawa S, Kishi Y, Takuma T, Sada A, Yamanaka K-I, Abe Y, Wada Y, Takahashi M, Kono T, Kawahara M. Transcriptional wiring for establishing cell lineage specification at the blastocyst stage in cattle. *Biol Reprod* 2013; 88:158, 1–10.
- [51] Goissis MD, Cibelli JB. Functional characterization of CDX2 during bovine preimplantation development in vitro. *Mol Reprod Dev* 2014; 81:962–970.
- [52] Bai H, Sakurai T, Someya Y, Konno T, Ideta A, Aoyagi Y, Imakawa K. Regulation of trophoblast-specific factors by GATA2 and GATA3 in bovine trophoblast CT-1 cells. *J Reprod Dev* 2011; 57:518–525.
- [53] Spencer TE, Bazer FW. Conceptus signals for establishing and maintenance of pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2:1–15.
- [54] Bai H, Sakurai T, Kim MS, Muroi Y, Ideta A, Aoyagi Y, Nakajima H, Takahashi M, Nagaoka K, Imakawa K. Involvement of GATA transcription factors in the regulation of endogenous bovine interferon-tau gene transcription. *Mol Reprod Dev* 2009; 76:1143–1152.
- [55] Emuta C, Horiuchi T. Effects of timing of activation and aging of bovine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) on cleavage and subsequent

- embryonic development in vitro. *J Reprod Dev* 2001; 47:399–405.
- [56] Li X, Hamano KI, Qian XQ, Funauchi K, Furudate M, Minato Y. Oocyte activation and parthenogenetic development of bovine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. *Zygote* 1999; 7:233–237.
- [57] Hou Y p., Liu Y, Dai Y p., Li R, Shi WQ, Wang H p., Wang L l., Li N, Zhu S e. Improved parthenogenetic development of vitrified-warmed bovine oocytes activated with 9% ethanol plus 6-DMAP. *Theriogenology* 2009; 72:643–649.
- [58] Unnikrishnan V, Kastelic J, Thundathil J. Intracytoplasmic sperm injection in cattle. *Genes (Basel)* 2021; 12:1–18.
- [59] Águila L, Felmer R, Arias ME, Navarrete F, Martin-Hidalgo D, Lee HC, Visconti P, Fissore R. Defective sperm head decondensation undermines the success of ICSI in the bovine. *Reproduction* 2017; 154:307–318.
- [60] Malcuit C, Maserati M, Takahashi Y, Page R, Fissore RA. Intracytoplasmic sperm injection in the bovine induces abnormal  $[Ca^{2+}]_i$  responses and oocyte activation. *Reprod Fertil Dev* 2006; 18:39–51.
- [61] Oikawa T, Itahashi T, Numabe T. Improved embryo development in Japanese black cattle by in vitro fertilization using ovum pick-up plus intracytoplasmic sperm injection with dithiothreitol. *J Reprod Dev* 2016; 62:11–16.
- [62] Oikawa T, Itahashi T, Yajima R, Numabe T. Glutathione treatment of Japanese Black bull sperm prior to intracytoplasmic sperm injection promotes embryo development. *J Reprod Dev* 2018; 64:303–309.
- [63] Heyman Y. Factors affecting the survival of whole and half-embryos transferred in cattle. *Theriogenology* 1985; 23:63–75.
- [64] Heyman Y, Chesné P, Chupin D, Ménézo Y. Improvement of survival rate of frozen

- cattle blastocysts after transfer with trophoblastic vesicles. *Theriogenology* 1987; 27:477–484.
- [65] Hashiyada Y, Okada M, Imai K. Transition of the pregnancy rate of bisected bovine embryos after co-transfer with trophoblastic vesicles prepared from in vivo-cultured in vitro-fertilized embryos. *J Reprod Dev* 2005; 51:749–756.
- [66] Imakawa K, Anthony R V, Kazemi M, Marotti KR, Polites HG, Roberts RM. Interferon-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophoctoderm. *Nature* 1987; 330:377–379.
- [67] Helmer SD, Hansen PJ, Thatcher WW, Johnson JW, Bazer FW. Intrauterine infusion of highly enriched bovine trophoblast protein-1 complex exerts an antiluteolytic effect to extend corpus luteum lifespan in cyclic cattle. *J Reprod Fertil* 1989; 87:89–101.
- [68] Kimura K. Mechanisms for Establishment of Pregnancy in Mammalian Species. *J Mamm Ova Res* 2005; 22:101–118.
- [69] Nakamura K, Kusama K, Ideta A, Imakawa K, Hori M. IFNT-independent effects of intrauterine extracellular vesicles (EVs) in cattle. *Reproduction* 2020; 159:503–511.
- [70] Heyman Y, Camous S, Fèvre J, Méziou W, Martal J. Maintenance of the corpus luteum after uterine transfer of trophoblastic vesicles to cyclic cows and ewes. *J Reprod Fertil* 1984; 70:533–540.
- [71] Ryan DP, D’Hoore L, Snijders S, O’Farrell KJ. Intrauterine transfer of bovine trophoblastic vesicles during dioestrus after breeding to increase pregnancy rates in dairy cows. *Theriogenology* 1994; 41:287.
- [72] 高橋ひとみ, 南橋昭, 澤井健, 平山博樹, 森安悟, 渡辺晃行, 藤井陽一, 橋谷田豊, 下司雅也. 妊娠16日ウシ胚より形成した栄養膜小胞におけるインター

- フェロン $\tau$ 分泌量. 日本繁殖生物学会 講演要旨集 2006; 99:139.
- [73] 橋谷田豊, 谷口雅律, 藤井陽一, 宮地利江, 渡辺晃行, 小財千明, 高橋ひとみ, 岡田真人, 菅原徹, 藤井満貴, 横田昌己, 浦田博文, et al. 凍結-融解したウシ栄養膜小胞の子宮内投与が発情周期および移植胚の受胎率に及ぼす影響. 日本胚移植学雑誌 2007; 29:114–124.
- [74] 橋谷田豊, 藤井陽一, 谷口雅律, 宮地利江, 渡辺晃行, 浦田博文, 菅原徹, 横田昌己, 小財千明, 藤井満貴, 高橋昌志, 高橋ひとみ. 胚の直接移植法に準じたウシ栄養膜小胞の凍結保存. 日本胚移植学雑誌 2007; 29:106–113.
- [75] 橋谷田豊, 渡辺晃行, 谷口雅律, 藤井陽一, 宮地利江, 浦田博文, 藤井満貴, 横田昌己, 谷村英俊, 高橋昌志, 高橋ひとみ. 伸長期胚からのウシ栄養膜小胞の作出効率. 日本畜産学会報 2006; 77:471–478.
- [76] Betteridge KJ, Eaglesome MD, Randall GCB, Mitchell D. Collection, description and transfer of embryos from cattle 10–16 days after oestrus. *Reproduction* 1980; 59:205–216.
- [77] Betteridge KJ, Fléchon JE. The anatomy and physiology of pre-attachment bovine embryos. *Theriogenology* 1988; 29:155–187.
- [78] Maddox-Hyttel P, Alexopoulos NI, Vajta G, Lewis I, Rogers P, Cann L, Callesen H, Tveden-Nyborg P, Trounson A. Immunohistochemical and ultrastructural characterization of the initial post-hatching development of bovine embryos. *Reproduction* 2003; 125:607–623.
- [79] Hashiyada Y, Taniguchi M, Fujii Y, Takahashi H, Geshi M, Takahashi M. Improving fertility of frozen-thawed embryos transferred with trophoblastic vesicles by direct-co-transfer method in cattle. *Biol Reprod* 2008; 78:74–74.
- [80] Farin CE, Imakawa K, Hansen TR, McDonnell JJ, Murphy CN, Farin PW, Roberts



- RM. Expression of trophoblastic interferon genes in sheep and cattle. *Biol Reprod* 1990; 43:210–218.
- [81] Ealy AD, Yang QE. Control of interferon-tau expression during early pregnancy in ruminants. *Am J Reprod Immunol* 2009; 61:95–106.
- [82] Sakurai T, Nakagawa S, Kim MS, Bai H, Bai R, Li J, Min KS, Ideta A, Aoyagi Y, Imakawa K. Transcriptional regulation of two conceptus interferon tau genes expressed in Japanese black cattle during peri-implantation period. *PLoS One* 2013; 8:e80427.
- [83] 唄花子, 櫻井敏博, 藤原浩, 出田篤司, 青柳敬人, 今川和彦. 反芻動物の妊娠・着床期における研究の現状と課題. *日本畜産学会報* 2013; 84:301–308.
- [84] Johnson WH, Loskutoff NM, Plante Y, Betteridge KJ. Production of four identical calves by the separation of blastomeres from an in vitro derived four-cell embryo. *Vet Rec* 1995; 137:15–16.
- [85] Ogawa S, Matsuda H, Taniguchi Y, Watanabe T, Kitamura Y, Tabuchi I, Sugimoto Y, Iwaisaki H. Genomic prediction for carcass traits in Japanese Black cattle using single nucleotide polymorphism markers of different densities. *Anim Prod Sci* 2017; 57:1631–1636.
- [86] 独立行政法人家畜改良センター. 令和3年度広域後代検定評価方法について; 2022. <http://www.nlbc.go.jp/kachikukairyo/iden/nikuyogyu/kouiki2021.pdf>.
- [87] Kageyama S, Hirayama H. Sexing of bovine preimplantation embryos using Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). *J Mamm Ova Res* 2012; 29:113–118.
- [88] Hirayama H, Kageyama S, Moriyasu S, Sawai K, Onoe S, Takahashi Y, Katagiri S, Toen K, Watanabe K, Notomi T, Yamashina H, Matsuzaki S, et al. Rapid sexing of bovine preimplantation embryos using loop-mediated isothermal amplification.

- Theriogenology 2004; 62:887–896.
- [89] Simmet K, Reichenbach M, Reichenbach HD, Wolf E. Phytohemagglutinin facilitates the aggregation of blastomere pairs from Day 5 donor embryos with Day 4 host embryos for chimeric bovine embryo multiplication. *Theriogenology* 2015; 84:1603–1610.
- [90] Nagatomo H, Yao T, Araki Y, Mizutani E, Wakayama T. Agarose capsules as new tools for protecting denuded mouse oocytes/embryos during handling and freezing-thawing and supporting embryonic development in vivo. *Sci Rep* 2017; 7:1–9.
- [91] Gerri C, McCarthy A, Alanis-Lobato G, Demtschenko A, Bruneau A, Loubersac S, Fogarty NME, Hampshire D, Elder K, Snell P, Christie L, David L, et al. Initiation of a conserved trophoctoderm program in human, cow and mouse embryos. *Nature* 2020; 587:443–447.
- [92] Suwińska A, Czołowska R, Ozdzeński W, Tarkowski AK. Blastomeres of the mouse embryo lose totipotency after the fifth cleavage division: Expression of Cdx2 and Oct4 and developmental potential of inner and outer blastomeres of 16- and 32-cell embryos. *Dev Biol* 2008; 322:133–144.
- [93] Berg DK, Smith CS, Pearton DJ, Wells DN, Broadhurst R, Donnison M, Pfeffer PL. Trophoctoderm Lineage Determination in Cattle. *Dev Cell* 2011; 20:244–255.
- [94] Kohri N, Akizawa H, Iisaka S, Bai H, Yanagawa Y, Takahashi M, Komatsu M, Kawai M, Nagano M, Kawahara M. Trophoctoderm regeneration to support full-term development in the inner cell mass isolated from bovine blastocyst. *J Biol Chem* 2019; 294:19209–19223.
- [95] 山口大輔, 渡辺晃行, 足立憲隆, 谷村英俊, 笹木教隆, 藤井陽一, 谷口雅津, 齋藤公治, 浦田博文, 億正樹, 高橋ひとみ, 橋谷田豊. ウシ栄養膜小胞の体外

培養におけるインターフェロン $\gamma$ 産生に及ぼす要因. 日本胚移植学雑誌 2011;  
33:103-109.

- [96] 森美幸, 上田修二, 笠正二郎. 胚移植および人工授精における栄養膜小胞を利用した受胎率向上技術. 九州沖縄農業研究成果情報 2007; 22.

付表

<b>回収用 TCM199</b>	100 mL
TCM199	98 mL
NBCS	2.0 mL
抗生物質 Stock	100 $\mu$ L
ヘパリン Na	1,000 単位
ろ過滅菌後使用、用時調製	
<b>TCM199</b>	1 L
199 培地 (Sigma-Aldrich, M5017)	1 本
Hepes	2.862 g
NaHCO <sub>3</sub>	0.252 g
0.4M NaOH	12 mL
ろ過滅菌後、4°Cで保存	
<b>成熟用 TCM199</b>	10 mL
Medium 199 (ThermoFisher, 12340030)	9.0 mL
ピルビン酸 Na	0.022 mg
E <sub>2</sub> Stock	10 $\mu$ L
FSH Stock	10 $\mu$ L
システアミン Stock	10 $\mu$ L
抗生物質 Stock	10 $\mu$ L
NBCS	1.0 mL
ろ過滅菌後使用、用時調製	

<b>抗生物質 Stock</b>	60 mL
結晶ペニシリン G 明治 300 万単位 (Meiji Seika)	2 本
硫酸ストレプトマイシン注射用 1g (Meiji Seika)	3 本
1 回分ごとに分注し、-20°Cで保存	
<b>FSH Stock</b>	1.0 mL
アントリン R・10 (共立製薬)	10 A.U.
1 回分ごとに分注し、-20°Cで保存	
<b>E<sub>2</sub> Stock</b>	1.0 mL
β-エストラジオール	1.0 mg
エタノール (99.5)	1.0 mL
1 回分ごとに分注し、-20°Cで保存	
<b>システアミン Stock</b>	10 mL
システアミン	77.15 mg
1 回分ごとに分注し、-20°Cで保存	
<b>ガラス化前平衡液</b>	100 mL
199 培地 (ThermoFisher, 12340030)	メスアップ
エチレングリコール	3.0 mL
NBCS	20 mL
ろ過滅菌後、1 回分ごとに分注し、-20°Cで保存	

<b>VS14 液</b>	100 mL
199 培地 (ThermoFisher, 12340030)	メスアップ
エチレングリコール	30 mL
スクロース	34.23 g
NBCS	20 mL

ろ過滅菌後、1 回分ごとに分注し、-20°Cで保存

<b>ガラス化融解液</b>	100 mL
199 培地 (ThermoFisher, 12340030)	メスアップ
スクロース	17.117 g (0.5 M) 8.558 g (0.25 M)
NBCS	20 mL

ろ過滅菌後、1 回分ごとに分注し、-20°Cで保存

<b>BO 液</b>	10 mL
BO Stock	1 mL
ピルビン酸 Na	1.4 mg
NaHCO <sub>3</sub>	31.4 mg
0.5% フェノールレッド溶液	5 μL
ヘパリン Na	50 単位
BSA	30 mg

ろ過滅菌後使用、用時調製

<b>BO Stock</b>	100 mL
NaCl	13.16 g
KCl	0.6 g
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.66 g
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.212 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0.226 g

ろ過滅菌後、4°Cで保存

<b>90% Percoll 液</b>	10 mL
BO Stock	1 mL
Percoll	9 mL
NaHCO <sub>3</sub>	31.4 mg
0.5% フェノールレッド溶液	5 μL

ろ過滅菌後、4°Cで保存

<b>45% Percoll 液</b>	10 mL
90% Percoll 液	5 mL
精子洗浄液 (機能性ペプチド研究所, IVF110S)	5 mL

用時調製

<b>10% RD+KSOM/aa</b>	10 mL
KSOM/aa	9 mL
RPMI1640 (ThermoFisher, 11875101)	0.5 mL
DMEM (ThermoFisher, 11885084)	0.5 mL
ポリビニルピロリドン	10 mg
抗生物質 Stock	10 μL

ろ過滅菌後使用、用時調製

<b>KSOM/aa</b>	100 mL
KSOM Stock	10 mL
イノシトール	1.0 mg
ピルビン酸 Na	3.3 mg
グルタミン	9.9 mg
タウリン	25.0 mg
0.5% フェノールレッド溶液	40 $\mu$ L
NaHCO <sub>3</sub>	210.0 mg
BME アミノ酸溶液 (Sigma-Aldrich, B6766)	2.0 mL
MEM 非必須アミノ酸溶液 (Sigma-Aldrich, M7145)	1.0 mL
補足アミノ酸溶液	1.0 mL
ITS Stock	1.0 mL
DL-乳酸ナトリウム溶液	25 $\mu$ L

ろ過滅菌後、4°Cで保存。1 か月以内に使用

<b>KSOM Stock</b>	100 mL
NaCl	5.762 g
KCl	0.186 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0.0477 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.0493 g
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.250 g

ろ過滅菌後、4°Cで保存



<b>補足アミノ酸 Stock</b>	30 mL
ロイシン	79.2 mg
メチオニン	22.2 mg
トリプトファン	18.6 mg
グリシン	652.5 mg

ろ過滅菌後、4°Cで保存

<b>ITS Stock</b>	50 mL
インスリン-トランスフェリン-亜セレン酸ナトリウム培地サプリメント	1 バイアル
50 mM HCl	5 mL

50 mM HCl で溶解した後、ミリ Q 水で 50 mL とした。1 mL ずつ分注し-20°Cで保存

<b>活性化液</b>	2 mL
IVM 用培地	1,860 $\mu$ L
エタノール (99.5)	140 $\mu$ L

用時調製

<b>ダイレクト移植用凍結液</b>	100 mL
mPBS	メスアップ
トレハロース	3.783 g
エチレングリコール	10 mL
NBCS	20 mL

1 回分ごとに分注し、-20°Cで保存。融解後ろ過滅菌して使用

<b>mPBS</b>	1 L
ダルベッコ PBS(-)粉末 (日水製薬)	9.60 g
グルコース	1.00 g
ピルビン酸 Na	0.036 g
金属塩類溶液	1 mL
0.5% フェノールレッド溶液	400 $\mu$ L
BSA	1.5 g
抗生物質 Stock	1 mL
ろ過滅菌後使用、用時調製	
<b>金属塩類溶液</b>	10 mL
CaCl <sub>2</sub>	1.00 g
MgSO <sub>4</sub> · 6H <sub>2</sub> O	1.00 g
用時調製	
<b>TVs 培養液</b>	10 mL
Medium 199 (ThermoFisher, 12340030)	8 mL
NBCS	2 mL
システアミン Stock	20 $\mu$ L
ろ過滅菌後使用、用時調製	
<b>2.5% グルタルアルデヒド</b>	10 mL
50% グルタルアルデヒド	0.5 mL
0.2M リン酸バッファー	5 mL
用時調製	

<b>0.2M リン酸バッファー</b>	100 mL
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.593 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	5.802 g
常温保存	
<b>0.1M リン酸バッファー</b>	10 mL
0.2M リン酸バッファー	5 mL
用時調製	
<b>0.1% (w/v) PVP in PBS (-)</b>	100 mL
ポリビニルピロリドン	100 mg
PBS (-)	100 mL
ろ過滅菌後、1 回分ごとに分注し、-20°Cで保存	
<b>TTBS</b>	1 L
Tris	2.4228 g
NaCl	8.766 g
Tween 20	0.5 mL
HCl で pH 7.5 に調整後に Tween 20 を添加。室温で保存	
<b>2x サンプルバッファー</b>	20 mL
0.5M Tris-HCl (pH 6.8)	5 mL
n-ドデシル硫酸ナトリウム	0.8 g
スクロース	2 g
ブロモフェノールブルー	0.002 g
2-メルカプトエタノール	2 g
500 μL ずつ分注し、-20°Cで保存	

---

<b>0.2% Triton X-100 溶液</b>	10 mL
Triton X-100	20 $\mu$ L
PBS (-)	10 mL

---

4°Cで保存