

原 著

ドナー核に極性化割球および非極性化割球を用いたウシの核移植

川田 訓¹・小山 久一²・鈴木 裕之³¹農林水産省家畜改良センター新冠牧場, 静内町 056-0141²酪農学園大学, 江別市 069-8501³弘前大学, 弘前市 036-8560

Polarized or non-polarized blastomeres as donor nuclei in the production of bovine nuclear transfer embryos

Satoshi KAWATA¹, Hisaichi KOYAMA², Hiroyuki SUZUKI³¹National Livestock Breeding Center Niikappu station, Shizunai-cho 056-0141²Rakuno Gakuen University, Ebetsu-shi 069-8501³Hirosaki University, Hirosaki-shi 036-8560

キーワード : 核移植, ウシ受精卵, 極性化割球, 非極性化割球, FITC-Concanavalin A染色法

Key words : Nuclear transfer, Bovine embryos, Polarized blastomere, Non-polarized blastomere, FITC-Concanavalin A staining

ABSTRACT

The mammalian embryos became polarized, appeared polarized and non-polarized cells in developing to blastocyst stage. Polarized cells were thought to form trophectoderm, whereas non-polarized cells were thought to form inner cell mass in blastocyst. The polarization recognized distribution of microvillus on blastomere. It was possible to classify between polarized blastomere and non-polarized blastomere by difference for microvillous distribution. We investigated the efficiency of FITC-Concanavalin A staining that to classify polarized or non-polarized blastomere of bovine embryos and the relationship between polarization of blastomere that classified with FITC-Concanavalin A staining and developmental potential of reconstituted embryos by nuclear transfer with polarized or non-polarized cells. Nuclear donor cells, which 16-32 cell stage, were produced by IVM-IVF-IVC of oocytes. Blastomere isolated bovine embryos were stained with FITC-Concanavalin A. Transfer of no stained donor cell resulted in significantly higher rate of fused than use of donor cells stained with FITC-Concanavalin A (64.9 versus 39.0). There were no differences that, however, developments rate to 2-cell, 8-cell, morulae and blastocyst stage of reconstituted embryos that transferred stained or non-stained blastomere. Those findings were thought that FITC-Concanavalin A staining influenced fusion of donor cell and recipient oocyte. Isolated blastomere stained with FITC-Concanavalin A were observed by fluorescent microscope, classified polarized cells and non-polarized cells and transferred to recipient oocytes. Transfer of non-polarized cells resulted in significantly higher rate of development to morulae and blastocyst stage than transfer of polarized cells (34.3% versus 9.1%). Those were no difference that, however, fusion and development to 2- and 8-cell stage of reconstituted embryos that transferred polarized or non-polarized cells.

Those findings were thought that non-polarized blastomere maintained more development capacity than polarized blastomere. In the case of nuclear transfer with embryo cells, also, it was suggested that efficiency production of reconstituted embryos was possible by transfer of non-polarized blastomere.

要 約

受精卵は胚盤胞への発生の過程で極性化が生じ、極性化割球は栄養膜細胞層を形成し、非極性化割球は内細胞塊を形成する。この極性化は、微絨毛の分布の違いにより確認することができ、極性化割球と非極性化割球に分類することが可能である。そこで本研究では、受精卵割球の微絨毛の分布を観察するために用いる FITC-Concanavalin A 染色法が核移植後の再構築胚の発生に及ぼす影響ならびに FITC-Concanavalin A 染色法で選別した割球の極性化の有無と再構築胚の発生との関係を追及した。体外成熟-受精-発生培養により作出した 16-32 細胞期胚の割球を供試した。個々に分離した割球は FITC-Concanavalin A 染色を施した。FITC-Concanavalin A 染色割球および無染色割球をドナー核とし、レシピエント卵子へ移植したとき、融合率 (39.0% および 64.9%) は無染色割球において有意に高かったが、8 細胞期および桑実胚および胚盤胞への発生率においては両者の間に差は認められなかった。このことから、FITC-Concanavalin A 染色法は、融合には影響を及ぼすが、それ以後の胚の発生には影響を及ぼさないと考えられた。分離割球を FITC-Concanavalin A 染色後、蛍光観察を行い、極性化または非極性化に分類し、それぞれの割球をレシピエント卵子へ移植した。非極性化割球をドナー核として核移植したとき、融合率、2 細胞期および 8 細胞期への発生は認められなかったが、桑実胚および胚盤胞への発生は極性化割球を核移植したときと比較して有意に高かった (34.3% および 9.1%)。

これらの結果から、非極性化割球は極性化割球よりも高い発生能を持つことが考えられた。また、受精卵割球をドナー核とする核移植においては、非極性化割球を用いた再構築胚の効率的生産が可能と考えられた。

緒 言

受精卵は卵割を繰り返すことにより細胞数を増やし桑実胚、胚盤胞に達するが、その過程において極性化が生じる。マウス胚では後期 8 細胞期であることが知られており、16 細胞期において極性化割球と非極性化割球が存在し (ZIOMEK *et al.*, 1982)、割球表面の微絨毛の分布の違いによって極性化を判断することができる (DUCIBELLA *et al.*, 1977; HAN-DYSIDE 1980; JOHNSON and ZIOMEK 1981; JOHNSON *et al.*, 1986)。極性化割球は栄養膜細胞層を形成し、非極性化割球は内細胞塊を形成すると考えられている (WILEY 1988)。また、この微絨毛の分布の変化は、ウシにおいても同様に発現すると報告されている (川田ら 1997; KOYAMA *et al.*, 1994)。従って、予め非極性化割球を確認した受精卵割球による核移植を行うこ

とが、効率よく再構築胚を作出できる方法の 1 つと考えられる。しかし、極性化の有無を確認した後の受精卵割球によるウシの核移植に関する報告は極めて少ない (NAVARA *et al.*, 1994)。

そこで本研究では、ウシ核移植において、割球の微絨毛の分布により極性化を判定するために用いる FITC-Concanavalin A 染色法が核移植後の再構築胚の発生に及ぼす影響 (実験 1) と FITC-Concanavalin A 染色法で選別した割球の極性化の有無と再構築胚の発生との関係 (実験 2) を追究した。

材料と方法

レシピエント卵子

レシピエント卵子には、食肉処理場由来のウシ卵巣の小卵胞 (直径 2-8 mm) から吸引採取した卵胞内卵子に体外成熟培養を施し、得られた第一極体放出後の成熟卵母細胞から除核したものをを用いた。体外成熟培養は、8% ウシ胎子血清 (FCS; GIBCO) および 0.02 AU FSH (デンカ製薬) を添加した TCM199 (GIBCO) を用い、5% CO₂、95% 空気、飽和湿度、38.5°C の気相条件下で 20-24 時間行った。除核は、0.2% ヒアルロニターゼ (SIGMA) 溶液中で卵母細胞を裸化し、サイトカラシン B (C.B, 5 μg/ml; SIGMA)、8% FCS 添加 TCM199 に 15 分間浸漬した後、マイクロピペットによって行った。除核の確認は 0.001% アクリジンオレンジ (和光純薬) 染色によって行った。なお、以下の培養における気相条件は体外成熟培養と同じである。

レシピエント卵子の活性化処理

活性化処理は、体外成熟培養 24-26 時間目に行った。まず、0.1% ポリビニールアルコール (SIGMA)、0.05 mM CaCl₂ および 0.1 mM MgSO₄ 添加 0.3 M マンニトール (和光純薬) 溶液で 15 分間平衡後、白金線電極の間にレシピエント卵子を置き、細胞融合装置 (BTX, ECM 200) を用いて直流パルス (75 V/mm, 50 μsec) を 2 回与えた。活性化後のレシピエント卵子は直ちに 1% シクロヘキシミド (SIGMA) および 8% FCS 添加 TCM199 で 6 時間培養した後、ドナー核を移植するまで 8% FCS 添加 TCM199 中で培養しながら保存した。

ドナー核

ドナー核の受精卵割球には、レシピエント卵子と同様に体外成熟培養を行った成熟卵母細胞に体外受精および体外発生培養を施して得られた 16-32 細胞期胚の割球を用いた。体外受精はホルスタイン種雄牛の凍結精液を用い、2% カフェイン (SIGMA) およびヘパリン (2.6 U/ml; 小玉) 添加 BO 液で精子浮遊液 (精子濃度 1.0 × 10⁷/ml) を作製し、6 時間の媒精を行った。体外発生培養は 8% FCS 添加 TCM199 で行い、体外

発生培養開始3日目(媒精日=0日目)に、8細胞以上に発生した胚のみを単層形成させた卵管上皮細胞との共培養し、さらに発生培養を行った。

発生培養4-6日目の胚の透明帯を酸性D-PBS (pH2.5) とプロナーゼ (SIGMA) 溶液で除去した後、 Mg^{++} および Ca^{++} 欠 D-PBS (GIBCO) 中でピペッティングにより個々の割球に分離した。分離後の割球は核移植または FITC-Concanavalin A 染色に供するまで、8%FCS 添加 TCM199 で培養しながら保存した。

FITC-Concanavalin A 染色法

FITC-Concanavalin A 染色法は ZIOMEK *et al.* (1981) の方法に準じて行った。すなわち、0.01% FITC-Concanavalin A (SIGMA) および 0.4% BSA 添加 D-PBS に 0.02% アジ化ナトリウム (SIGMA) を添加した染色液に分離した割球を 15 分間浸漬して染色した。染色後、蛍光顕微鏡 (励起光 495 nm; NIKON) で極性化割球および非極性化割球に分類した。蛍光顕微鏡による観察は、1 回の紫外線照射を 1 秒以内とし、10 回以内の照射に留めた。

核移植および融合

核移植は、マイクロマニピュレーター (NARISIGE) に装着したマイクロピペットに吸引したドナー核をレシピエント卵子の囲卵腔におき、レシピエント卵子に活性化刺激を与えてから 9 時間目にマンニトール液に 15 分間浸漬したのち、白金線電極の間にレシピエント卵子とドナー核の接触面が平行となるように静置し、活性化刺激と同じ条件の直流パルスを 2 回与えた。融合後、完全に融合した卵子のみを選び、8%FCS 添加 TCM199 中で卵管上皮細胞との共培養を 10 日間継続した。

本実験を行うにあたって、ドナー核とする 1 胚に含まれる割球数よりもレシピエント卵子数が少ない場合が多々生じた。その場合は、割球を無作為に移植し、残った割球は廃棄した。

実験1 FITC-Concanavalin A 染色法が核移植後の再構築胚の発生に及ぼす影響

Concanavalin A の細胞毒性を検討するため、FITC-Concanavalin A 染色割球および無染色割球をドナー核として用いて核移植を行い、その成績を比較検討した。

なお、無染色割球は染色操作および紫外線照射は行わなかった。

実験2 ドナー核に極性化割球および非極性化割球を用いた核移植

FITC-Concanavalin A 染色法によって選別した極性化および非極性化割球をドナー核として核移植を行い、再構築胚の発生に及ぼす影響を検討した。

統計処理

統計処理は、実験1および実験2における2細胞、8細胞および桑実胚および胚盤胞への発生の比較を χ^2 検定にて行った。

結 果

Table 1 にドナー核を分離した胚の構成割球数を示した。Table 2 に実験1の結果を示した。FITC-Concanavalin A 染色割球および無染色割球をドナー核としたときの融合率は、染色割球において有意に低下することが認められた (39.0% および 64.9%; $P < 0.01$)。2細胞期胚、8細胞期胚および桑実胚および胚盤胞への発生率においては無染色割球と染色割球の間で差は認められなかった。

実験2の結果は、Table 3 に示した。非極性化割球をドナー核として核移植したとき、融合率、2細胞期お

Table 1 Mean number of blastomere in embryos isolated donor cells

Donor cell treated	No. of embryo used	No. of blastomere (range)	No. of blastomere (mean \pm SEM)
Non stained	11	10-42	21.3 \pm 10.6
Stained	15	19-39	26.8 \pm 6.5

Table 2 Development of nuclear transfer embryos with FITC-Concanavalin A stained donor cells.

Donor cell type	No. of attempted	fusion No. (%) ²⁾ of oocyte fused	No. (%) ³⁾ of embryos developed to		
			2-cell	8-cell	Molurae and Blastocyst
Non stained	151	98 ^a (64.9)	70(71.4)	35(35.7)	33(33.7)
Stained	118	46 ^b (39.0)	39(84.8)	24(52.2)	14(30.4)

Values in parentheses are percentages

1): Values in parentheses are average number of blastomeres in embryos

2): No. of oocyte fused/No. of attempted fusions

3): No. of embryos developed to/No. of oocyte fused a vs. b: Values within column with difference superscripts differ, $p < 0.01$

Table 3 Development of nuclear transfer embryos with polarized or non-polarized donor cells selected by FITC-Concanavalin A stain method.

Blastomeres type	No. of attempted fusion	No. (%) ¹⁾ of oocyte fused	No. (%) ²⁾ of embryos developed to		
			2-cell	8-cell	Moluræ and Blastocyst
Polarized	38	11(28.9)	8(72.2)	6(54.5)	1 ^a (9.1)
Non-polarized	80	35(43.8)	31(88.6)	18(51.4)	12 ^b (34.3)

Volues in parentheses are percentages

1): No. of oocyte fused/No. of attempted fusions

2): No. of embryos developed to/No. of oocyte fused

a vs. b : Volues within columus with difference superscripts differ, $p < 0.05$

よび8細胞期への発生に差は認められなかったが、桑実胚および胚盤胞への発生は極性化割球を核移植したときと比較して有意に高かった(34.3%および9.1%, $P < 0.05$).

考 察

本実験で割球の極性化を識別するのに用いた FITC-Concanavalin A 染色法は蛍光反応が明瞭で、割球の微絨毛の観察が容易にできる利点がある。しかし、FITC-Concanavalin A は細胞毒性を有することが知られており(千田ら 1994; GUNTHER *et al.*, 1973)、染色後の割球を核移植に用いると、再構築胚の発生率に影響を及ぼすことが考えられる。このことに関して、FITC-Concanavalin A 染色の影響を検討した本実験(実験 1)の結果は、染色割球で 2 細胞期の発生率は差がないものの、融合率が低くなることを

示し、FITC-Concanavalin A 染色液による影響が示めされた。FITC-Concanavalin A がどのようなメカニズムで割球に影響したかは不明であるが、実験 1 の核移植過程で染色割球をマイクロピペットに吸引したとき細胞膜が崩壊してしまうものが多数観察された。このことは染色割球の細胞膜が変質して脆弱化していることを示唆しており、融合率低下との関連が考えられた。KEFFER *et al.*, (1994) は卵母細胞を Hoechst 33342 で染色し、10 秒以内の観察ならば卵母細胞に対する影響はないと報告している。本実験では蛍光顕微鏡下の紫外線照射は 1 回 1 秒以内とし、合計 10 回の照射を限度として観察を行ったが蛍光観察中もしくは観察後の染色割球に形態的变化はなんら認められなかったので、紫外線の影響はなかったものと考えられる。

ドナー核に用いた割球の極性化の有無と再構築胚の

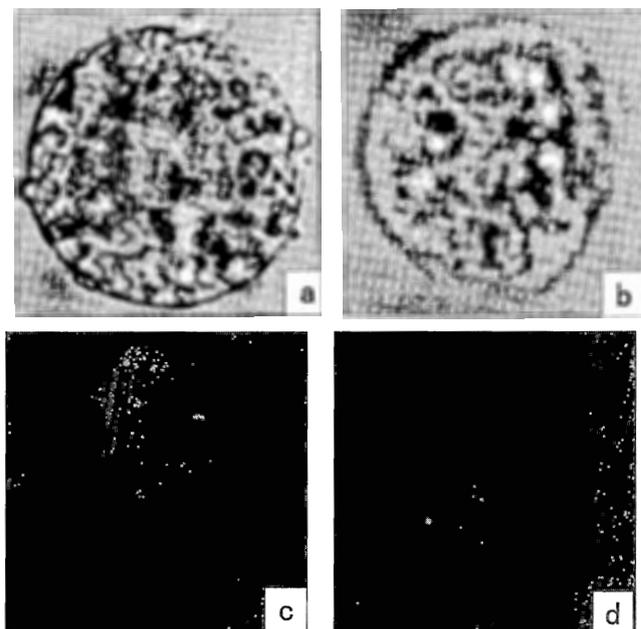


Figure 1. Phase-contrast (a, b) and fluorescence photomicrographs (c, d) of blastomere of 32-cell stage embryo with FITC-Concanavalin A staining. ($\times 200$)

(a, c) Polarized blastomere. (c) The polarized labelling observed with upside surface of blastomere. (b, d) Non-polarized blastomere. (d) The uniform surface labelling.

発生能との関係については, NAVARA *et al.*, (1994) が FITC-Concanavalin A よりも毒性の少ない Succinyl-Concanavalin A を用いた染色法で極性化割球と非極性化割球を選別して核移植を行なったところ, 極性化割球による再構築胚の発生率が有意に低下することを報告している。本実験(実験2)においても, 非極性化割球による再構築胚の桑実胚および胚盤胞の発生率では有意の差が得られた。これらのことから受精卵割球をドナー核とする核移植においては, 非極性化割球を用いることで再構築胚の効率的な生産が可能と考えられた。また, 極性化割球を用いたときも桑実胚は得られた。ZIOMEK *et al.*, (1982) は, マウス胚において極性化割球の再集合胚を子宮内に移植したとき, 正常胚と同様の発生を観察したことを報告している。これは極性化割球の中にも全能性を有するものが存在していることを示唆するものであり, 割球の極性化と全能性との関係を検討する必要があると考えられた。

ZAKHARTCHENKO *et al.*, (1995) は, 桑実胚割球をドナー核として核移植を行ったところ, 小さい割球をドナー核としたほうが, 大きい割球を用いるよりも多くの胚盤胞が得られたことを報告している。著者らは, 桑実胚(32-74細胞)において, 非極性化割球の直径が極性化割球よりも小さい傾向にあることを観察している(未発表データ)。このことから, 非極性化割球をドナー核として用いたとき, 桑実胚および胚盤胞への発生率が有意に高かったのは, 極性化割球と比較して非極性化割球に全能性を維持している割球が多かったものと推察された。

謝 辞

実験を行うにあたり, ご協力いただいた酪農学園大学酪農学部家畜繁殖学の方々に感謝の意を表します。

供試材料のウシ卵巣の提供に便宜をいただきました, 北海道早来食肉衛生検査所および十勝畜産公社の方々に深謝いたします。

文 献

千田 智・鈴木雅洲・L.METTLER (1994) 細胞間接着物質-Concanavalin A がマウス受精卵の発育に与える影響。日不妊会誌, **39**: 156-160。
DUCIBELLA, T., T. UKENA, M. KARNOVSKY and E. ANDERSON (1977) Changes in cell surface and cortical cytoplasmic organization during early embryogenesis in the preimplantation mouse

embryo. *J. Cell Biol.*, **74**: 153-167.

- GUNTHER, G.R., J.L. WANG, I. YAHARA, B.A. CUNNINGHAM and G.M. EDELMAN (1973) Canavalin A derivatives with altered biological activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**: 1012-1016.
HANDYSIDE, A.H., (1980) Distribution of antibody- and lectin-binding sites on dissociated blastomeres from mouse morulae: evidence for polarization at compaction. *J. Embryol. exp. Morph.*, **60**: 99-116.
JOHNSON, M.H. and C.A. ZIOMEK, (1981) Induction of polarity in mouse 8-cell blastomeres: Specificity, geometry, and stability. *J. Cell Biol.*, **91**: 303-308.
JOHNSON, M.H., B. MARO and M. TAKEICHI, (1986) The role of cell adhesion in the synchronization and orientation of polarization in 8-cell mouse blastomeres. *J. Embryol. exp. Morph.*, **93**: 239-255.
川田 訓・小山久一・平尾和義・香川マズミ・鈴木裕之, (1997) ウシおよびウサギ胚割球における極性化に関する研究。日本胚移植学会誌, **19**: 70。
KEFFER, C.L., S.L. STICE and D. L. MATTHEWS, (1994) Bovine inner cell mass cells as donor nuclei in the production of nuclear transfer embryos and calves. *Biol. Reprod.*, **50**: 935-939.
KOYAMA, H.H. SUZUKI, X. YANG, S. JIANG and R.H. FOOTE, (1994) Analysis of polarity of bovine and rabbit embryos by scanning electron microscopy. *Biol. Reprod.*, **50**: 163-170.
NAVARA, C.S., M.M. SIMS and N. L. FIRST, (1992) Timing of polarization in bovine embryos and developmental potential of polarize blastomeres. *Biol. Reprod. (suppl)*, **46**: 71 (abstract).
WILEY, L.M. (1988) Trophectoderm: The first epithelium to develop in the mammalian embryo. *Scanning Microscopy*, **2**: 417-426.
ZAKHARTCHENKO, V., E. WOLF, G.A. PALMA and G. BREM (1995) Effect of donor embryo cell number and cell size on the efficiency of bovine embryo cloning. *Mol. Reprod. Dev.*, **42**: 53-57.
ZIOMEK, C.A. and M.H. JOHNSON (1981) Properties of polar and apolar cells from the 16-cell mouse morula. *Wilhelm Roux's Archives*, **190**: 287-296.
ZIOMEK, C.A., M.H. JOHNSON, and A.H. HANDYSIDE (1982) The developmental potential of mouse 16-cell blastomeres. *J. Exp. Zool.*, **221**: 345-355.

