

1. 核移植によるクローン牛作出技術の開発

ウシ体外成熟卵子の活性化誘起処理

酪農科：中里 敏・永井晴治・藤山雅照*

佐々木正憲**

*現 種畜場

**現 岐阜家畜保健衛生所

要 約

ウシ体外成熟卵子の活性化誘起法ならびに活性化卵子の胚盤胞への発育率について検討を行った。

22時間成熟培養したウシ卵子を電気刺激後、シクロヘキシミド処理（6時間）することにより高率に活性化が誘起できた。とくに直流パルスの電圧60V/mm、パルス幅50 μ 秒×1回の条件で95.2%と高い活性化率を示した。

さらに活性化処理の開始直後からサイトカラシンDで倍数体誘起処理（18時間）を行いCR1aa¹⁾培地で培養した結果、79.6%の卵子が分割し、44.9%が胚盤胞へ発育した。

以上のことから、新鮮なウシ体外成熟卵子を直流パルスによる電気刺激とシクロヘキシミド処理を組み合わせた複合活性化処理する場合、60V/mmの電圧で刺激することが最も有効であることが明らかとなった。

緒 言

ウシ胚の核移植効率を安定・向上させるためには人為的的刺激で高率に活性化させることが必要である。

活性化とは卵子内に精子が侵入した後、細胞質内に起きる一連の変化であり、この変化の過程を経ないと受精後の正常な発育は起こらない²⁾。ウシでは第2成熟分裂中期（MII期）のステージで排卵される³⁾が、受精は卵子を活性化し第2成熟分裂を再開させ、胚の発生を進行させる。そしてこの卵子活性化作用は、受精時に3～4時間にわたり反復して生じる細胞質内のカルシウム濃度の上昇として、広く認められている⁴⁾。一方、核移植技術においては受精現象を行わずに再構築胚の発生を行うため、この活性化を人為的的刺激で誘起させることが必要となる。

卵子の活性化誘起法にはエタノール処理、カルシウムイオノフォア処理、直流パルスによる電気刺激、シクロヘキシミド処理、イノシトール三リン酸処理などがあり、単独あるいは複合処理することにより人為的に活性化が可能なが報告されている。

このうち一般的に活用されている電気刺激に関しては、使用する機種やチャンパーの違いあるいは電気刺激用の電解質溶液の種類により、条件設定は研究室ごとに微妙に異なるものと考えられる。

そこで今回、当研究室における最適な活性化条件

を検討するため、直流パルスによる電気刺激と卵成熟促進因子 metaphase promoting factor (MPF)⁵⁾不活化のための蛋白合成阻害剤であるシクロヘキシミドを併用した活性化誘起法に関する試験を行った。

材料及び方法

1. 体外成熟卵子

食肉処理場でと殺直後のウシ卵巣を採取し、魔法瓶内で37°Cに保温した生理食塩水（ペニシリン10万単位/l、ストレプトマイシン100mg/l添加）に浸漬して実験室に持ち帰り、新しい生理食塩水で洗浄後、ビーカーに入れて37°Cの水槽中に保温した。次に卵巣を1個ずつペーパータオル上で転がし水分や血液等を除去した後、2～7mmの小卵胞から注射器で卵胞卵子を吸引採取し、尖底試験管に移してストックした。採取した試験管内容物をピペットで実体顕微鏡下のシャーレに移して、マウスピースを付けたパスツールピペットで卵子を集め成熟培地にストックした。その後、3～4枚の成熟培地に順次移動して洗浄した。成熟培地は10%CS加TCM-199液で500 μ l当り約50個ずつの卵子を投入し、炭酸ガス培養器内（38.8°C、5%CO₂、95%空気下）で22時間成熟培養した。なお卵子は緊密な卵丘細胞が付着し、細胞質が均一なもののみを培養に供した。成熟培養

後、0.1%ヒアルロニダーゼ液に移して、ボルテックス、ピペッティング操作により卵丘細胞を剝離し、第1極体の放出された卵子を選抜して用いた。

2. 卵子の活性化誘起処理

1) 直流パルスによる電気刺激

電気刺激には島津製作所製の細胞融合装置 S S H-10型、チャンバーは同社製の F T C-72(電極間隔1.0mm)、反応液は Zimmerman Cell Fusion Medium を用いた。

約10個の供試卵子を時計皿中の反応液に一旦なじませた後、反応液を入れたチャンバーの電極間に少量の液とともに移し電気刺激を与えたが、パルス幅50μ秒の条件で、電圧を50, 60, 75, 90, 100V/mmと変化させ、それぞれ1回ずつ通電し、その後BSA(3mg/ml)加CR1aa培地で18時間培養した。

2) シクロヘキシミド処理

電気刺激を与えた卵子をシクロヘキシミド(10μg/ml)含有BSA加CR1aa培地で6時間処理し、その後BSA加CR1aa培地に移し、さらに12時間培養した。

培養終了後、各卵子を四隅にワセリン・パラフィンを配したスライドグラス上に置きカバーグラスで軽く圧して、カルノア液で48時間固定した。その後、1%アセトオルセインで1時間染色し、アセトグリセロールで透徹後、位相差顕微鏡下で雌性前核形成の有無を観察した。1個以上の前核が認められた卵子は、すべて活性化卵子と判定し、各区の活性化率を求めた。

3) 活性化卵子の倍数体誘起(サイトカラシン処理)

電気刺激を与えた卵子をサイトカラシンD(2.5μg/ml)およびシクロヘキシミド含有

BSA加CR1aa培地で6時間処理、その後サイトカラシンD含有BSA加CR1aa培地で12時間培養後、一部の卵子を固定・染色し、雌性前核の数を調べた。残りの卵子はさらにBSA加CR1aa培地で培養し、電気刺激後48時間目にあらかじめ顆粒膜細胞(10⁶個/ml)をシートさせておいた10%CS加CR1aa培地に移し、単為発生率を調べた。

3. 統計処理

結果の解析はすべてx²検定で行った。

結 果

1. 電気刺激による活性化誘起処理

22時間成熟培養した卵子をZimmerman Cell Fusion Medium中で電気刺激した結果、すべての区で活性化卵子が認められたものの活性化率は2.5~26.2%と低率であった。また、活性化卵子には2個の前核を形成したのも認められたが、ほとんどが1個の前核を形成した卵子であった。

なお、90V区および100V区では電気刺激によって変性する卵子が認められた。

2. シクロヘキシミド処理

電気刺激とシクロヘキシミド処理を併用することにより、電気刺激のみの場合と比較して各区とも高率に活性化が誘起できた。とくに60V区、75V区の活性化率はそれぞれ95.2%、88.4%と他の区に比べ高い値を示した。また各区の活性化卵子はほとんどが1個の前核を形成した卵子であり、2個の前核を形成した卵子の割合は少なかった。

3. 活性化卵子の倍数体誘起(サイトカラシン処理)

90V区および100V区で変性卵子が認められたことから、50V区、60V区、75V区の3区で試験を実施した。

表1 電気刺激による活性化

電 圧	処 理 卵 子 数	活性化 卵 子 数 (%) ¹⁾	前核形成卵子数 (%) ²⁾		
			1	2	3 ≤
50V	42	11(26.2) ^a	10(90.9)	1(9.1)	0
60V	40	5(12.5) ^{ab}	4(80.0)	1(20.0)	0
75V	42	8(19.0) ^{ac}	7(87.5)	1(12.5)	0
90V	40	1(2.5) ^b	1(100.0)	0	0
100V	42	4(9.5) ^{bc}	3(75.0)	1(25.0)	0

実験回数は各区とも4回

異符号間で有意差あり (P<0.05)

1) 処理卵子数に対する百分率

2) 活性化卵子数に対する百分率

表2 電気刺激とシクロヘキシミド処理による活性化

電 圧	処 理 卵 子 数	活性化 卵子数 (%) ¹⁾	前核形成卵子数 (%) ²⁾		
			1	2	3 ≤
50V	45	34(75.6) ^a	27(79.4)	6(17.6)	1(2.9)
60V	42	40(95.2) ^b	37(92.5)	3(7.5)	0
75V	43	38(88.4) ^{ab}	37(97.4)	0	1(2.6)
90V	39	29(74.4) ^a	24(82.8)	5(17.2)	0
100V	44	35(79.5) ^a	29(82.9)	6(17.2)	0

実験回数は各区とも4回 異符号間で有意差あり (P<0.05)
 1) 処理卵子数に対する百分率 2) 活性化卵子数に対する百分率

表3 活性化卵子の倍数体誘起 (サイトカラシン処理)

電 圧	処 理 卵 子 数	活性化 卵子数 (%) ¹⁾	前核形成卵子数 (%) ²⁾		
			1	2	3 ≤
50V	81	58(71.6)	15(25.9)	42(72.4) ^a	1(1.7)
60V	80	63(78.8)	7(11.1)	55(87.3) ^b	1(1.6)
75V	82	63(76.8)	19(30.2)	43(68.3) ^a	1(1.6)

実験回数は各区とも4回 異符号間で有意差あり (P<0.05)
 1) 処理卵子数に対する百分率 2) 活性化卵子数に対する百分率

複合活性化処理に加えサイトカラシンDで処理して倍数体誘起を行った結果, 71.6%~78.8%の卵子が活性化され, このうち1個あるいは3個以上の前核を形成したのもみられたが, 多くは2個の前核を形成した卵子であった。とりわけ60V区では2前核形成率が87.3%であり, 他の区より有意に高い値であった。

またサイトカラシンDで処理した卵子を10%CS加CR1aa培地で培養したところ, 分割率は62.0%~79.6%, また胚盤胞への発育率は38.0%~44.9%で各区の間に有意な差はみられなかったもののいずれも60V区で高い値を示した。

表4 倍数体誘起処理後の単為発生率

電圧	処理卵子数	分割卵 (%) ¹⁾	胚盤胞期 (%) ¹⁾
50V	50	31(62.0)	19(38.0)
60V	49	39(79.6)	22(44.9)
75V	48	36(75.0)	21(43.8)

実験回数は各区とも3回
 1) 処理卵子数に対する百分率

考 察

電気刺激後の活性化率は卵子の aging と関連があり⁶⁾, 体外成熟培養時間が延びるにつれ高い値を示す^{7,8)}ことが報告されている。しかしこのような加齢卵子では核移植を行う場合, 除核の成功率が低下するため培養後22~30時間で活性化処理が行われて

いる。

体内では受精は排卵直後に行われるが, このような排卵直後の卵子では活性化の誘起がきわめて難しいことが知られている。これは, 通常の単為発生刺激で引き起こされる一回のカルシウム濃度の上昇では, 十分にMPF活性が低下しないため, 刺激により一旦はサイクリンBの崩壊が合成を上回ったとしても, すぐに回復してしまうため³⁾と考えられている。今回の実験でも22時間成熟培養した卵子を用いて, パルス幅50 μ 秒の条件で電圧を50~100V/mmまで段階的に変化させ, それぞれ1回ずつ電気刺激を与えたが, 活性化率はいずれも低い値を示した。また90Vより高い電圧では活性化率はさらに低くなり変性する卵子が認められたことから, 今後50~75V/mm程度の電圧でのパルス幅や刺激回数の検討が必要であると思われる。

しかしながら最近, ウシの新鮮な成熟卵子であっても直流パルス+カルシウムイオノフォア+シクロヘキシミドの複合処理⁷⁾, エタノール+シクロヘキシミド^{8,9)}あるいは直流パルス+蛋白合成阻害剤(シクロヘキシミド, ピューロマイシン, 6-ジメチルアミノプリン)¹⁰⁾などの複合活性化処理により高率に活性化誘起が可能なが報告されている。今回の実験でも電気刺激後に蛋白合成阻害剤であるシクロヘキシミドで6時間処理することにより, 高率に活性化が誘起でき, 中でも60V/mm, パルス幅50 μ 秒×1

回の刺激とシクロヘキシミド ($10\mu\text{g}/\text{ml}$) 処理の組み合わせにより95.2%と最も高い活性化率が得られた。またほとんどの活性化卵子で前核の形成は1個であり、第2極体の放出を伴う正常な活性化が誘起されたことが示された。これは高いMPF活性を維持している新鮮な成熟卵子であっても複合処理することにより、卵子内のカルシウム濃度を反復して上昇させ、MPF活性を低下させることができたものと推察される。

青柳ら⁷⁾は複合活性化処理の場合、直流パルスは $100\text{V}/\text{mm}$, $90\mu\text{秒} \times 1$ 回、また大久津ら⁸⁾も Kono et al.¹¹⁾の方法に準じて $100\text{V}/\text{mm}$, $25\mu\text{秒} \times 2$ 回の刺激を与え、高率に活性化が誘起できたと報告しているが、今回の実験結果ではこれらより弱い電気刺激が有効であった。この原因については、使用する機種やチャンバーの違いあるいは電気刺激用の電解質溶液の違いが影響しているものと思われる。

第2極体放出抑制効果をもつサイトカラシンDで処理したところ、各区とも活性化率は若干低下したものの2個の前核を形成する割合は増加した。とくに60V区では87.3%と他の区に比べ有意に高い値を示し、さらにCR1aa培地を基礎培地として培養した結果、79.6%の卵子が分割し、44.9%が胚盤胞へ発育した。活性化刺激は受精(精子侵入)時の細胞内遊離カルシウムイオン濃度の変化によく似かよった状態を人為的に作出することが重要な条件となるが、今回の成績から60V/mmの電気刺激とシクロヘキシミド処理を組み合わせた複合活性化処理は核移植に適した人為的活性化誘起法であることが示唆された。

謝 辞

本研究の実施にあたりご協力いただいた佐世保市保健所及び佐世保食肉センターの皆様には感謝いたします。

参考文献

- 1) C.F.Rosenkrans Jr., N.L.First: Culture of bovine zygotes to the blastocyst stage: Effects of amino acids and vitamins, *Theriogenology*, 35, 266 (1991)
- 2) 青柳敬人: 核移植による牛受精卵のクローニング技術, *E T ニュースレター*, 14, 1-3 (1994)
- 3) 内海恭三: 肉用牛生産におけるバイオテクノロジーの利用(4), *畜産の研究*, 48, 507-511 (1994)
- 4) 河野友宏: スパームファクター・精子に存在する卵活性化因子, *E T ニュースレター*, 16, 40-45 (1995)
- 5) 佐藤英明: ウシ卵母細胞の成熟と死の制御, *日畜会報*, 62, 978-989 (1991)
- 6) 角田幸雄: ウシ胚の核移植, *日畜会報*, 63, 192-200 (1992)
- 7) 青柳敬人, 小西正人: ウシ体外成熟卵子の人為的活性化処理による胚盤胞への発育に関する研究, *J Reprod Dev*, 40, j5-j10 (1994)
- 8) 大久津昌治ほか: ウシ体外成熟卵子の活性化誘起と単為発生能, *西日本畜産学会報*, 38, 14-18 (1995)
- 9) G.A.Presicce, X.Yang: Development of 24h in vitro matured bovine oocyte following parthenogenetic activation by ethanol and cycloheximide treatment, *Theriogenology*, 41, 277 (1994)
- 10) S.Takahashi, C.Kubota, T.Tokunaga, H.Imai: Parthenogenetic activation and development of bovine oocytes treated with protein synthesis or protein phosphorylation inhibitors, *Theriogenology*, 45, 156 (1996)
- 11) T.Kono, S.Iwasaki, T.Nakahara: Parthenogenetic activation by electric stimulus of bovine oocytes matured in vitro, *Theriogenology*, 32, 569-575 (1989)