

－短 報－

ウシにおける一胚移植後の双子分娩例 (1例報告)

秋山 清・柏木 聰・佐藤 洋三朗

神奈川県畜産試験場 神奈川県海老名市 〒243-04

要旨：黒毛和種経産牛に過剰排卵処理を行い、人工授精後7日目に回収した胚盤胞を凍結保存した。凍結融解後の1胚において透明帯内に2個の細胞塊が観察された。この胚を受胚牛に移植したところ、移植後261日目に一卵性双子(♀♀)を分娩した。凍結前後の胚の形態、および産子の胎膜数から、一卵性双子の発生は受精後早期に起こり、ウシの透明帯脱出以前の胚でも一卵性双子の発生が起こる可能性があることが示唆された。

キーワード：ウシ、一卵性双子、胚移植。

哺乳動物の一卵性双子は、マウス胚盤胞のanti-polar trophoblastがプラスチックシャーレ底に接触して培養された場合^[1]や妊娠雌マウスへのビンクリスチンの投与^[2]により実験的な発生が認められている。しかし、自然発生的な一卵性双子の発生機構については充分に解明されていない^[3]。ウシでは一卵性双子の発生が起こる時期は着床以後であり、胚盤胞の内細胞塊が2個の原始線条を形成し、その結果2個体が生ずるとされてきた^[4, 5]。Rowson and Moor^[6]はヒツジにおいて受精後9日目と13日目に回収した胚を検査したところ、透明帯より脱出した胚盤胞上に2個の胚盤を持つ胚を見いだし、このような胚から一卵性双子が発生するものと推察した。福島ら^[7]は過剰排卵処理牛より回収した胚の中にひとつの透明帯内に胞胚腔をもつ細胞集団が2個存在する胚を認めたことを報告した。しかし、いずれの報告も一卵性双子発生機構について推測の域を出ない。我々は形態的に一卵性双子へ発生する可能性があると推測される胚を移植し、実際に一卵性双子を確認したので報告する。

供胚牛として黒毛和種経産牛(5歳、4産分娩後78日)

(受付 1995年2月3日／受理 1995年4月25日)

別刷請求先：〒243-04 海老名市本郷3750

神奈川県畜産試験場 秋山 清

目)を用いた。発情後8日目より卵胞刺激ホルモン(アントリノ、デンカ製薬、3日間、合計24AU)とPGF₂α(プロナルゴンF、アップジョン)投与により過剰排卵処理を施した。人工授精後7日目にバルーンカテーテルを用いて子宮灌流により胚回収を行った。回収した胚は倒立顕微鏡(400倍)下で形態を観察し、移植可能胚を分類した。移植可能胚は鈴木の方法^[8]に準じて凍結保存、融解を行った。胚を10%グリセリンを含む修正PBS内で30分間平衡し、0.25ml容量のプラスチック製ストローに12.5%ショ糖を含む修正PBS層、少量のグリセリン液層、胚を含むグリセリン液層、ショ糖液層の順に吸引し充填した。冷却はプログラムフリーザー(R-204、プラナー)を用いて、室温から-7°Cまで1°C/分で冷却し、植氷を行い、同温度で10分間保持した後、-30°Cまで0.3°C/分で冷却し、同温度で10分間保持したのち液体窒素中に浸漬した。融解は38°C温水中にストローを10秒間浸漬して行い、ストロー内にあらかじめ充填したショ糖液層と胚を含むグリセリン液層を混合して、ストロー内でグリセリン除去を行った。胚をストローより回収し、修正PBS中に移し、倒立顕微鏡(400倍)下で形態を観察した。生存と判定された胚は発情周期を同期化した受胚牛の黄体側子宮角に移植した。移植後53日目に直腸検査により妊娠判定を行った。

子宮灌流により3個の胚が回収された。回収された胚はFig. 1に示すとおり胚盤胞から拡張胚盤胞であった。Fig. 1aの胚を凍結融解したところ、Fig. 2に示すように透明帯内において胚盤胞を2分離したような2個の細胞塊を持つ形態が観察された。この胚を受胚牛に移植したところ妊娠が確認され、移植後261日目に同性双子(雌；体重13kg及び14kg)を分娩した。産子には外貌の異常は認められなかったが2頭とも分娩後に死亡した。産子は分娩時にはそれぞれが羊膜、絨毛膜をもって分娩された。また、産子の鼻紋はFig. 3に示すとおり、極めて類似した形態であったが完全には一致しなかった。

本例において胚は凍結融解の過程を経て透明帯内に2

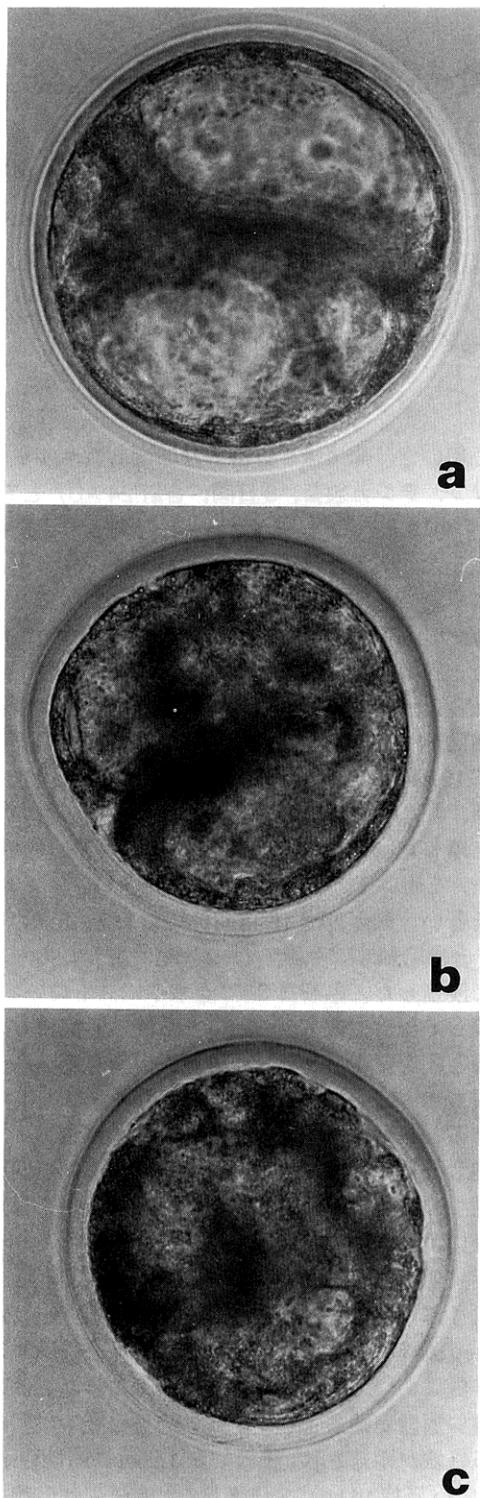


Fig. 1. Three embryos collected from donor cow on the 7 day after insemination.
a: developing two blastocysts in the zona pellucida. b: showing similar form with Fig. 1a embryo. c: fair class blastocyst.

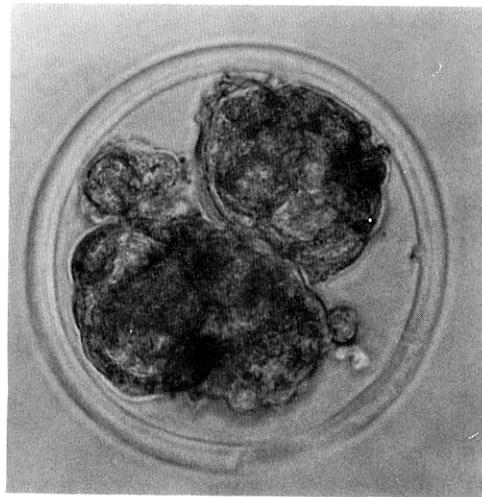


Fig. 2. The same embryo with Fig. 1a. Frozen thawed embryo contained two cell masses in the zona pellucida.

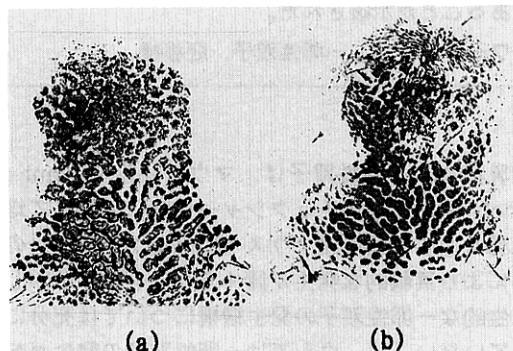


Fig. 3. Muzzle patterns in the twin calves produced by the transfer of Fig. 2 embryo. a: female, birth weight 13 kg, b: female, birth weight 14 kg.

個の細胞塊が観察された。それぞれの細胞塊は輪郭が明瞭であり、形態的には凍結保存によって受けた障害は少ないと思われた。供胚牛から回収直後の胚は拡張胚盤胞と判定されたが、すでに2個の胚盤胞が透明帯内で発生しており、融解後のショ糖液を用いた耐凍剤除去操作の過程でそれらが収縮し、2個の明瞭な細胞塊として観察されたものと推察される。

一卵性双子の発生時期は絨毛膜と羊膜の数から分類されている [9]。一卵性双子の多くは着床後に胚盤の分離が起こったことによるために、胎児は絨毛膜を共通に、羊膜を固有にもっている。しかし、受精後早期に一卵性双子の発生が起こった場合には、胎児はそれぞれ固有の絨毛膜及び羊膜を持つとされている。今回得られた双子

はそれぞれ固有の絨毛膜、羊膜を持っていたことから、一卵性双子の発生は、胚発生初期に起こったものと考えられる。すなわち、発生初期に何等かの原因により、透明帯内に2個の細胞集団が形成され、それぞれが胚発生に必要な細胞数を有していたことによって一卵性双子を生じたものと考えられる。

一卵性双子の発生要因については不明な点が多いが、Donaldら [10] は母牛の産次や年齢、遺伝によるよりも、子宮内の条件変化により散発的に起こると述べている。今回、一卵性双子へ発生した胚と同時に回収された胚には、Fig. 1bに示すように Fig. 1a と類似した形態のものが得られており、胚発育過程における供胚牛の子宮内の条件変化との関わりが深いものと推察される。

一卵性双子は遺伝的に等しいといわれ、一卵性双子間に継承される身体的な特性は、皮膚、皮毛の色、斑紋、鼻紋、頭頸部、背腰線、肢蹄の形、旋毛の位置と数などが挙げられている [11]。しかし、桑実胚あるいは胚盤胞の切断二分離によって人為的に作出された一卵性双子においては、ホルスタイン種では皮毛の斑紋は類似しているが全く同じではないこと [12]、黒毛和種においては旋毛の位置と数は一致したが、鼻紋は異なること [13] が報告されている。同様に、今回得られた双子の鼻紋は完全には一致しなかったが、極めて類似した形態であり、双子が一卵性であることの傍証であると考えられる。

文 献

- 1) Hsu, Y.C. (1980): Monozygotic twin formation in mouse embryos *in vitro*. *Science*, 209, 605–606.
- 2) Kaufman, M.H. and O'Shea, K.S. (1978): Induction of monozygotic twinning in the mouse. *Nature*, 276, 707–

708.

- 3) Markert, C.L. and Seidel, G.E. Jr. (1981): Parthenogenesis, Identical Twins, and Cloning in Mammals. *New Technologies in Animal Breeding* (Brackette, B.G., Seidel, G.E. Jr. and Seidel, S.M., eds.), pp. 181–200, Academic press, New York.
- 4) McLaren, A. (1982): The embryo. *Reproduction in mammals: 2. Embryonic and fetal development* (Austin, C.R. and Short, R.V., eds.), pp. 1–25, Cambridge University Press, Cambridge.
- 5) Hafez, E.S.E. (1992): 双子. *家畜繁殖学*(吉田重雄他訳), pp. 220–221, 西村書店, 東京.
- 6) Rowson, L.E.A. and Moor, R. (1964): Occurrence and development of identical twins in sheep. *Nature*, 201, 521–522.
- 7) 福島護之・富永敬一郎・内海恭三(1985)：過排卵処理牛から回収された自然発生的な双生胚盤胞の1例について。家畜人工授精研究会誌, 7, 1, 22.
- 8) 鈴木達行(1987)：ウシの胚移植に関する開発的研究。家畜繁殖学雑誌, 33, 5, 11–23.
- 9) Renfree, M.B. (1982): Implantation and placentation. *Reproduction in mammals: 2. Embryonic and fetal development* (Austin, C.R. and Short, R.V., eds.), pp. 26–69, Cambridge University Press, Cambridge.
- 10) Donald, H.P. and Anderson, D. (1953): A study of variation in twin cattle. *J. Dairy Res.*, 20, 361–369.
- 11) Gilmore, L.O., Petersen, W.E., Fitch, J.B. and Hill, D.L. (1948): The similarities of identical cattle twins with reference to growth and blood composition. *J. Anim. Sci.*, 7, 511–512.
- 12) Seidel, G.E. Jr. and Elsden, R.P. (1990) : 一卵性双子の相違性。 *Embryo transfer in dairy cattle*(金川弘司監修), pp. 29–31, 日本家畜貿易：北海道。
- 13) 荒木敬之・藤田耕・但馬甚一・内海恭三・入谷明(1989)：胚の分断対移植と二胚移植によるウシ双子生産における要因の分析。家畜繁殖技術研究会誌, 11, 2, 1–10.

A Case of Twin Delivery after a Single Embryo Transfer in Cattle

Kiyoshi Akiyama, Satoshi Kashiwagi and Yohzaburoh Satoh

*Kanagawa Prefectural Livestock Experiment Station,
Ebina, Kanagawa 243-04, Japan*

Three expanded blastocysts were collected from the Japanese Black cow on the 7 day after insemination, and cryopreserved in LN₂. One of the frozen-thawed embryos contained two cell masses in the zona pellucida.

The embryo was transferred to the recipient cow, and twin calves (females: birth weight, 13.0 kg, 14.0 kg) were born on the 261 day after transfer.

Key words: Cattle, Identical twin, Embryo transfer.