

PCR 法による牛胚の性判別

西 康裕・余谷 行義*・榊原 秀夫**

畜産部

要 旨

PCR による牛胚の性判別法では、その前段階として、胚の一部のバイオブシーが必要であるが、採胚からバイオブシー、性判別、移植までのすべての操作を1日で行うことは労力的に困難な場合が多い。そこで、著者らは凍結胚を融解・培養し、翌日、バイオブシーと性判別を行い移植する方法と、新鮮胚をバイオブシーした後、培養し、翌日、性判別と移植を行い、一部を凍結保存する方法について検討した。

バイオブシー後の生存率は、凍結胚、新鮮胚いずれにおいても体内胚の方が体外胚より高かった。しかし、新鮮胚をバイオブシー後、凍結保存すると、体内胚、体外胚ともに生存率は低くなった。

性判別胚(体内胚)の移植後の受胎率は、凍結胚で3/7(42.9%)、新鮮胚1/5(20.0%)であった。新鮮胚をバイオブシー後、凍結した胚では受胎例は見られなかった。

受胎した4頭中1頭は流産したが、結果的に雄子牛2頭、雌子牛2頭(双子)が生まれ、いずれも胚の性判定と一致した。

キーワード：PCR 法、性判別、バイオブシー

緒 言

胚移植技術は牛の改良並びに増産に有効な手段として、普及、定着化しつつあるが、産子の雌雄産み分けが可能となれば、より効率的な技術としての展開が期待できる。

近年、遺伝子工学の進歩により、Y染色体の特異配列を用いた Polymerase Chain Reaction (PCR) 法による性判別が開発され、これが現在、最も有効な方法とされている¹⁾。

この手法ではPCRにかける前段階として胚の一部をバイオブシーしてサンプルを採取しなければならない。このため、胚の生存力が低下することは避けられず、新鮮胚を直ちに性判別して移植するのが最良である。しかし、採胚→バイオブシー→PCR→移植までの一連の操作を1日で行うのは労力的、時間的に困難なことが多い。そこで、著者は2日かけて凍結胚をバイオブシーして性判別する方法および新鮮胚をバイオブシー後、性判別し、凍結する方法について検討した。

方 法

1. 凍結胚のバイオブシー

液体窒素中で保存した7～9日齢の和牛凍結胚(体内胚および体外胚)を加温融解し、耐凍剤を除去した。そして卵丘細胞を単層培養した5%子牛血清添加のTCM199培地で約18時間培養し、生存を確認した胚についてバイオブシーを行った。

バイオブシーは胚をリン酸緩衝液(以下PBS)で5～6回洗浄後、φ90mmシャーレー上にあらかじめ用意したPBS 100μlのドロップ中に移し、胚の内細胞塊を傷付けないよう栄養膜部分を20～30%だけマイクロマニピュレーターに装着したマイクロブレードで切断した。このようにして得られた細胞片(以下サンプル)はPBS及び生理食塩水で洗浄後、10μlの蒸溜水をあらかじめ入れておいた0.5mlマイクロチューブに移し、PCRに供した。切断胚は元のTCM199培地に移し、2～3時間培養後、胞胚腔の再形成状態で生存を確認し、一部の

* 現：中央家畜保健衛生所

** 現：南勢家畜保健衛生所

胚を乳牛に移植した。

2. 新鮮胚のバイオプシー

常法^{1,2)}により作成および回収した7～9日齢の和牛新鮮胚（体内胚および体外胚）をPBSで5～6回洗浄後、凍結胚と同様にバイオプシーし、得られたサンプルをPBS及び生理食塩水で洗浄後、10 μ lの蒸留水を入れた0.5mlマイクロチューブに入れ、PCRに供した。切断胚は約18時間培養し、胞胚腔の再形成で胚の生存を確認した後、凍結又は移植に供した。

3. PCR法による性別判別

サンプルを2分間、97℃で加熱しDNAを抽出後、性別判別用キット（XYセレクター）を調製し、サンプルと混ぜ、流動パラフィンを重ねて用いた。PCR装置（TSR-300）で最初に①2分間95℃の熱変性→②30秒間95℃の熱変性→③40秒間50℃のアニーリング→④30秒間70℃の伸長反応を行い、次に②～④を44サイクル繰り返した。

PCR産物は2%アガロースゲルを用いて100Vで30～40分間電気泳動を行った。次にエチジウムブロマイドで5分間染色後、UVトランスイルミネーターで紫外線を照射し、雄特異的バンドが検出されたサンプルを雄、検出できなかったものを雌と判定した。

結 果

凍結胚を融解した後、生存胚についてバイオプシーしたところ、表1に示すように体内胚では22個中20個（90.9%）が生存していたのに対し、体外胚は17個中10個（58.8%）で、生存率はかなり低かった。

表1 凍結胚のバイオプシー後の生存性

	供試胚数	バイオプシー胚数	生存胚数	生存率(%)
体内胚	32	22	20	90.9
体外胚	28	17	10	58.8

新鮮胚についてバイオプシー後の生存率は、表2に示すように、体内胚で27個中24個（88.9%）、体外胚で18個中11個（61.1%）で、凍結胚の場合と同様、体外胚の生存率が低い傾向がみられた。

表2 新鮮胚のバイオプシー後の生存性

	バイオプシー胚数	生存胚数	生存率(%)
体内胚	27	24	88.9
体外胚	18	11	61.1

さらに生存胚について凍結し、融解後の生存率をみる

と、表3に示すように、体内胚20個中10個（50.0%）体外胚5個中2個（40.0%）とともに低かった。

表3 バイオプシー胚の凍結後の生存性

	凍結融解胚数	生存胚数	生存率(%)
体内胚	20	10	50.0
体外胚	5	2	40.0

バイオプシー後の切断胚とサンプルをともにPCR法で性別判別し、その精度を調べた結果を表4に示した。

17例中14例で両方とも判定できたが、3例のサンプルでは判定不能であった。両方で判定できた14例のうち、性別判定が異なったのは僅か1例のみで、約93%の高い確率であった。

表4 性別判別精度の判定

No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
サンプル	♂	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
切断胚	♂	♀	♀	♀	♂	♀	♂	♀	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♂	♀	♂

性別判別できた体内胚の一部を当センター内の乳牛に移植し、その結果を表5に示した。凍結胚をバイオプシーおよび性別判別したものでは、7頭中3頭で受胎（受胎率42.9%）した。また新鮮胚をバイオプシーおよび性別判別したものでは5頭中1頭で受胎（受胎率20.0%）が確認された。

しかし新鮮胚をバイオプシーおよび性別判別した後、凍結保存した場合は、4頭に移植したが受胎個体は見られなかった。

表5 性別判別胚の移植成績（体内胚）

胚の処理方法	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
凍結胚→バイオプシー及び性別判別	7	3	42.9
新鮮胚→バイオプシー及び性別判別	5	1	20.0
新鮮胚→バイオプシー及び性別判別→凍結	4	0	0.0
計	16	4	25.0

受胎した4頭中1頭は流産した。雄と判定した後、乳牛に移植したものは1996年11月24日と12月20日に雄子牛を1頭ずつ分娩した。また雌と判定した胚を2頭移植したものは1997年10月4日、雌双子を分娩した。いずれも胚による性別判定通りであった。

考 察

PCR法によるウシ胚の性別判別技術ではPCRの前段階として胚の一部をバイオプシーしてからサンプルを採

取ることが必要なため、胚の生存率が低下すると考えられている。このことから新鮮胚を性別別して、その日のうちに、移植するのが最も良いが、実際の場面では採胚から検卵に約2時間、胚の洗浄、バイオプシー、サンプリングに約3時間、PCRにかけ電気泳動後判定までに約3時間を要することから、受胎牛への移植までのこれらの操作を少ないスタッフで、1日で行うのは、労力的、時間的に難しい。そこで、著者らは凍結胚については前日に融解し、約18時間培養の後、翌日朝から生存胚についてバイオプシーをし性別別後、判定できた切断胚を午後、移植する方法を採った。また、新鮮胚については午前中に採取し、午後からバイオプシーし、サンプルはPCRにかけたまま翌朝まで放置、切断胚も培養継続し、翌日朝から電気泳動を行い性別別し、この判定できた胚を午前中に移植または凍結する手法を試みた。

凍結胚のバイオプシー後の生存率は、体内胚91%、体外胚59%であったのに対して、新鮮胚をバイオプシーした場合の生存率は、体内胚で89%、体外胚では61%で、いずれも体外胚の方が生存率が低かったが凍結胚と新鮮胚の間にほとんど差はなかった。ただし凍結胚の場合、もとの供給胚数から生存率を算出すると体内胚で32個中20個(62.5%)、体外胚では28個中10個(35.7%)となり、コスト等を考えるとバイオプシーに供する胚は新鮮胚の方が望ましいことは明らかである。

切断胚とサンプルの両方をPCR法で検査し、性別別の精度を確認したところ17例中3例の判定不能を除き、14例(82.4%)では両方での判定が可能であった。判定不能の原因としては操作中にサンプルを紛失したか、サンプル量が少なすぎたことが考えられる。また、両方での判定可能胚14例中13例(92.9%)で性が一致したが、1例ではサンプルでは雄、切断胚では雌と異なる判定であった。これはサンプル以外のDNAの混入があった可能性が考えられる³⁾。

少人数で採胚から性別別、移植までを1日で行う場合、労力的、時間的制約だけでなく、牛に触れた直後にバイオプシーやPCRを行わざるを得ず、これが検体以外のDNAの混入や精度、成功率を低下させる要因にもなる。このことから2日間かけて余裕を持って行う方が、判定精度を高めるためにも、現実的で有効な手段と言える。

また、性別別胚の一部を当センター内の牛に移植した成績では、例数は少ないものの、凍結胚で42.9%、新鮮胚で20.0%の受胎率が得られ、生産された子牛はいずれも判定通りの性であり、かつ正常に発育していることから、今回、著者らが試みた方法は実用的で有用性があると思われる。

ただし、新鮮胚をバイオプシー後、凍結したものでは生存率が低く、受胎例は得られなかった。実際にこの技術を野外で普及させるためには、あらかじめ性別別した凍結胚を用意し、必要なときに融解して利用できることが望ましく⁵⁾、今後、バイオプシー胚の凍結方法について検討を進める予定である。

引用文献

- 1) 西 康裕・榊原秀夫・余谷行義(1997)：牛の過剰排卵処理方法の簡易化，三重農技セ研報，25，63-66
- 2) 榊原秀夫・西 康裕・余谷行義(1997)：牛の胚移植技術に関する研究(第4報)牛体外受精の発生培養における添加物と培養液の検討，三重農技セ研報，25，55-61
- 3) 渡辺伸也・高橋清也・小西秀彦・今井裕(1992)：PCR法によるウシ胚の判定技術の検討，日畜会報，63(7)，715-720
- 4) 渡辺伸也(1995)：性別別，187，アニマルバイオテクノロジー，関崎勉ら編，，テクサン出版社，東京
- 5) 山中昌哉・板垣佳明・木村直子・須藤静世(1995)：バイオプシーした牛胚の凍結-融解後の体外での生存性，日胚移植学誌，17(1)，6-11

Sex Discrimination of Cattle-Embryos by the PCR Method

Yasuhiro NISHI, Hideo SAKAKIBARA, Yukiyosi YOTANI

Abstract

To discriminate the sex at the cattle-embryo stage by the use of PCR method, it is necessary to biopsy the embryos on the first step. But it is difficult to carry out all procedure from taking out to transplanting of embryos within a day. Then, we took the following methods : Frozen embryos were thawed and cultured for the first day, and the biopsy, the discrimination of the sex and the transplantation were made on the following day. After the biopsy for fresh embryos, they were cultured over night and on the next day the embryos were discriminated their sex and either transplanted or frozen for preservation.

The viability rate of frozen and fresh embryos after biopsy was higher *in vivo* than *in vitro*. But the viability of fresh embryos, when frozen to preserve after the biopsy, lowered both *in vivo* and *in vitro*.

The pregnancy rates of transplanted embryos sex discrimination were 42.9%, three out of seven embryos frozen, before the biopsy and 20.0%, one out of five for the fresh embryos biopsied, respectively.

No cow could conceive at all, when the embryos frozen after the biopsy were transplanted. One out of four pregnant calves aborted. As a result, two male and two female calves (twin) were born.

The sex of calves agreed well with that discriminated on embryos stage.

Key words: PCR, sexing, biopsy