

PCR法による性判別技術の確立（第4報）

渡辺晃行・根本聰実・山口大輔・董澤圭二郎¹

The Sexing of Bovine Embryos by Polymerase Chain Reaction

Akiyuki Watanabe, Satomi Nemoto, Daisuke Yamaguchi, Keizirou Nirasawa

要 約

PCR (Polymerase Chain Reaction) 法による性判別技術の普及定着には判定精度、判定胚の生存性および受胎率が重要な課題として挙げられる。バイオプシーした判定胚の判別率ではダイレクト凍結後融解して判定に使用した凍結胚で 58.3% (7/12), 新鮮胚では 78.0% (32/41) であった。バイオプシー後の生存性は凍結胚で 58.3% (7/12), 新鮮胚で 65.9% (27/41), 移植結果は凍結胚で 40.0% (2/5), 新鮮胚で 50.0% (1/2) と新鮮胚の方が判別率、生存率ともに高い傾向を示した。

キーワード：PCR 法, 性判別, 凍結胚, 新鮮胚, 受胎率

緒 言

次世代の畜産物生産には雌雄産み分け技術が強く望まれている。近年、牛では胚からの切除細胞の遺伝子を增幅する PCR 法により性特異的な DNA を判定し雌雄産み分けを行なう方法が報告された。胚の全国的な流通体制が整いつつある中で胚移植技術に本法を付加することで、生産現場での経済性の向上が期待される。しかし、本法による雌雄産み分け技術には、細胞を採取した胚の生存性、操作の簡易化、混入 DNA による誤判定などの課題を残している。これらの課題を検討し、安定した普及技術にするために、凍結胚および新鮮胚での判定率、生存性、受胎性の検討を行なった。

材料および方法

1. 材料

供試胚は黒毛和種およびホルスタイン種から採取

1 現（独）農業技術研究機構 農業草地研究所

した生体内由来胚を用いた。A ランク胚と判定されエチレンギリコールによる緩慢冷却法により凍結された胚で 30℃ の温水に 20 秒浸漬して融解した胚（凍結胚）および A, B ランク胚と判定された新鮮胚を使用した。

2. 方法

1) 胚のバイオプシー

採取した胚を 0.2M シューカロース加 PBS で洗浄後、マイクロマニピュレーターに装着したバイオカッター (FEATER) により内部細胞塊 (ICM) を除いた 1/4 程度を切断し分離した。

2) バイオプシーサンプル細胞の回収

分離したサンプル細胞は毛細ガラス管ピペットを使用し 20 μl の 0.1% PVA 加 PBS が入っている 6 穴シャーレ (リプロプレート・機能性ペプチド研) に移し変えた。

3) バイオプシー胚の培養

バイオプシーにより分離した胚を、100 μM β メルカプトエタノール (ME), 20%FCS 加 TCM199 (GIBCO) に洗浄後投入し、38.5℃, 5%O₂, 5%CO₂

90%窒素の気相条件下で3~5時間培養した。培養後切断部分が修復され腔を形成したものを生存胚とした。

4) サンプル細胞の性判別

マイクロチューブに滅菌蒸留水 8 μ lとサンプル細胞が含まれる 0.1%PVA 加 PBS 2 μ lをいれ 95°C, 2 分間の条件で細胞を破壊した。試薬にはウシ胚性判別キット XY セレクター(伊藤ハム)を使用した。ロットによる違いを無くすため、酵素液は伊藤ハムマニュアルの2倍量(1サンプル当たり 0.2 μ l)を使用した。ヒートブロック式の DNA 増幅装置

(Applied Biosystems, PCR System 2400)で反応条件を 95°C 5 秒, 50°C 5 秒, 72°C 5 秒を 45 サイクルで増幅を行なった。

電気泳動はポリアクリルアミドゲル (PAGE) 12.5%、AITO) を使用した。泳動条件は定電流 50mA, 15 分で行なった。ゲルの染色にはエチジウムプロマイド染色 (0.5 μ g/ml, 5 分間) で、UV トランスイルミネーターで 254 nm 波長により雄特異的DNA バンドの有無により性判定を行なった。

結果および考察

性判別の成績を表1に示した。凍結胚での判別率は 58.3% (7/12), 新鮮胚では 78.0% (32/41) で新鮮胚の方が高かった。全ての判別率では 73.6% (39/53) で目標としている 80%以上にはまだ達成していない。生存率では凍結胚で 58.3% (7/12), 新鮮胚 65.9% (27/41) とほぼ同じであった。全体の生存率では 64.1% (34/53) であった。

移植成績を表2に示した。凍結胚で 2 頭、新鮮胚で 5 頭移植を行ない、それぞれ受胎した数は 1 頭(受胎率 50%) と 2 頭(受胎率 40%) であった。全体の受胎率は 42.9% であった。

表1 性判別成績

	判別率	生存率
新鮮胚	78.0% (32/41)	65.9% (27/41)
凍結胚	58.3% (7/12)	58.3% (7/12)
合計	73.6% (39/53)	64.1% (34/53)

表2 受胎成績

	新鮮胚	凍結胚
受胎率	40% (2/5)	50% (1/2)

胚性判別技術は改良手段として非常に効率よく、また酪農においては経済的負担を軽減できるものであ

る。しかしながら、胚の判別率や生存率が技術者によるところが多いことや、受胎率の低さや誤判定などが普及の妨げになっている。このことから胚へのダメージをより軽減しさらに少ない細胞で効率よく判別するための技術を構築していく必要がある。また、普及性でみると、いつでも使えるための判別胚の凍結保存技術も必要不可欠なものである。今後はさらにこれらの問題点を 1 つずつ解決し、誰もが簡単に使える技術にしていく必要がある。