

## PCR法による性判別技術の確立

渡辺晃行，根本聡実，山口大輔，菅原徹<sup>1</sup>，足立憲隆

The Sexing of Bovine Embryos by Polymerase Chain Reaction

Akiyuki Watanabe, Satomi Nemoto, Daisuke Yamaguchi, Touru Sugawara\*, Noritaka Adachi

### 要 約

近年，牛胚から切除した細胞の遺伝子を増幅するPCR (Polymerase Chain Reaction) 法により性特異的なDNAを判定し雌雄産み分けを行う方法が報告された。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，操作の煩雑さ，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，安定した普及技術として確立することを目的とした。

試験方法はマイクロブレードを利用した切断法による判定率，移植による受胎率を調べた実験1とマイクロブレードによる切断法およびマニピュレータを利用した吸引法による判定率，生存率および受胎率を調べた実験2を行なった。

実験1による胚の性判別成績は84.0% (137/163)であった。バイオプシー後の培養時間による移植の成績では短時間培養 (3-4時間) 後の受胎率は新鮮胚で46.7% (14/30)，凍結後移植で28.0% (7/25)，ガラス化胚で33.3% (5/15)であった。長時間培養後の受胎率は新鮮胚で36.4% (4/11)，凍結融解後移植で9.1% (2/22)，実験2の新鮮胚の性判別成績は77.1% (64/83)，凍結融解後判定胚は65.4% (55/84)，生存率はそれぞれ74.7% (62/83)と59.5% (50/84)であった。細胞切除の違いによる判定率および生存率は7日目胚の切断法では判定率90.5% (19/21)，生存率95.2% (20/21)，受精後6日目胚での吸引法による判定率，生存率はそれぞれ92.3% (12/13)，84.6% (11/13)，受精後7日目胚での吸引法による判定率，生存率はそれぞれ52.6% (10/19)，21.1% (4/19)であった。受胎率は新鮮胚が41.2% (7/17)，凍結融解後判定胚は50% (1/2)であり，フィールドでの利用が可能と考えられた。

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，牛では胚から切除した細胞の遺伝子を増幅する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<sup>1) 2)</sup>。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，操作の煩雑さ，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

#### 実験1

##### 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した生体内由来新鮮胚 (Aランク胚) を用いた。

##### 2. 方法

###### 1) 胚のバイオプシー

採取した胚 (受精後7日目) を0.2M シュークローズ加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。

<sup>1</sup> 現 茨城県県北家畜保健衛生所

## 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 $\mu$ l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)に移し換えた。

## 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 $\mu$ M $\beta$ 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 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>、95%空気の気相条件下で3~5時間および20~24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 $\mu$ lとサンプル細胞が含まれる0.1%PVA加PBS2 $\mu$ lを入れ95 $^{\circ}$ 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。多槽式PCR増幅器(サーマルシーケンサー, 岩城硝子株式会社)を用い、反応条件を95 $^{\circ}$ C30秒、50 $^{\circ}$ C40秒、70 $^{\circ}$ C10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(PAGE12.5%、ATTO)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ブロマイド染色(0.5 $\mu$ g/ml、5分間)で、UVトランスイルミネーターで254nm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。

## 5) バイオプシー胚の凍結

緩慢冷却: 培養を行なった胚を、0.1Mトレハロース(Tre)+1.8Mエチレングリコール(EG)の20%子牛血清(CS)加PBSで-7 $^{\circ}$ C植氷後-0.3 $^{\circ}$ C/分にて-30 $^{\circ}$ Cまで温度下降し、液体窒素に投入した。

ガラス化: バイオプシー後培養を行なった胚を25%EG-25%DMSO(50%VSED, 雪印)でLN<sub>2</sub>蒸気冷却20秒後液体窒素に投入した。

## 実験2

## 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グリコールによる緩慢冷却法により凍結された胚で30 $^{\circ}$ Cの温水に20秒浸漬して融解した胚(凍結融解胚)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

吸引法<sup>3)</sup>による胚の採取はマニピレータを使用し、受精後6日目および7日目の正常胚から細胞を3個から5個程度吸引採取した。切断

法については実験1と同様の方法で行なった。

## 2) バイオプシーサンプル細胞の回収

実験1と同様の方法で行なった。

## 3) バイオプシー胚の培養

培養時間は3~5時間のみ。その他の条件は実験1と同じ条件で行なった。

## 4) サンプル細胞の性判別

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 $\mu$ l)を使用した。ヒートブロック式のDNA増幅装置(Applied Biosystems, PCR System2400)で反応条件を95 $^{\circ}$ C5秒、50 $^{\circ}$ C5秒、72 $^{\circ}$ C5秒を45サイクルで増幅を行なった。その他の条件は実験1と同じ条件で行なった。

## 結果および考察

実験1の性判別の成績を表1に示した。性判別を163個の胚で実施したところ、雄判定胚が74個、雌判定胚が63個、判定不能が26個あった(判定率84.0%)。性判別のためには胚の一部を採取するため、胚の損傷が大きく、その後の生存性に影響を与える。損傷を最小限にするためには、より少ない細胞や変性部分の細胞を使用することが望ましいが、それではPCR反応のためのテンプレートDNA量が十分でなく、プライマーによるDNA増幅が行なわれなくなり判定不能となる可能性が大きい。今回の判定不能についてはサンプリングエラーによるものと思われる。

性判別胚の培養時間別移植結果を表2に示した。短時間培養後の凍結移植は25頭に行ない7頭が受胎し受胎率は28.0%、長時間培養後の凍結移植は22頭に行ない2頭が受胎し受胎率は9.1%であった。短時間培養後移植は30頭に行ない14頭が受胎、受胎率は46.7%、長時間培養後移植は11頭行い4頭が受胎し受胎率は36.4%であった。培養後凍結を行なう場合は短時間培養の方が良かったが、生移植を行なう場合は培養時間による差は見られなかった。ガラス化保存後融解移植の結果は15頭に移植を行ない5頭が受胎し受胎率は33.3%と良好な成績であった。

切断前の胚のステージ別移植成績を表3に示した。新鮮移植および凍結融解後移植において初期胚盤胞の受胎率が高く、また新鮮胚移植での拡張期胚盤胞で4頭移植を行ない3頭受胎、受胎率が75%であった。

表1 胚の性別別成績（実験1）

実施胚数	雄判定胚	雌判定胚	判定不明	判定率
163	74	63	26	84.0%

表2 培養時間別移植成績（実験1）

	培養時間	移植頭数	受胎頭数	受胎率
新鮮移植	3-4h	30	14	46.7%
	20-24h	11	4	36.4%
凍結移植	3-4h	25	7	28.0%
	20-24h	22	2	9.1%
ガラス化移植	3-4h	15	5	33.3%

表3 切断前胚ステージ別移植成績

ステージ	新鮮性別別胚			凍結性別別胚		
	移植数	受胎数	受胎率	移植数	受胎数	受胎率
CM	1	1	100.0%	2	0	0
EB	12	7	58.3%	9	4	44.4%
BL	11	3	27.3%	8	1	12.5%
EXB	4	3	75.0%	NT	—	—

CM：後期桑実胚、EB：初期胚盤胞、BL：胚盤胞、EXB：拡張期胚盤胞、NT：未実施

表4 性別別成績（実験2）

	判別率	生存率
新鮮胚	77.1% (64/83)	74.7% (62/83) a
凍結胚	65.4% (55/84)	59.5% (50/84) b
合計	71.3% (119/167)	67.1% (112/167)

異符号間で有意差あり (P<0.05)

表5 受胎成績（実験2）

	新鮮胚	凍結胚
受胎率	41.2% (7/17)	50.0% (1/2)

表6 細胞切除の違いによる判定率および生存率

	判定率	生存率
切断法	90.5% (19/21)a	95.2% (20/21)a
吸引法 (6日目胚)	92.3%	84.6%
吸引法 (7日目胚)	(12/13)a 52.6% (10/19)b	(11/13)a 21.1% (4/19)b

異符号間で有意差あり (P<0.05)

実験2での性別別の成績を表4に示した。新鮮胚での結果は供試胚83個で判別できたものが64個(判別率77.1%)で生存胚は62個(74.7%)だった。凍結胚では供試胚84個で判別できたものが55個(判別率65.4%)、その内バイオプシー後も生存していたものが50個(生存率59.5%)だった。新鮮胚での判別率が実験1より低下した原因として、スタッフの入替、増幅装置の変更等の技術的な要因が考えられる。

このため実験2の開始当初に低率だったことが全体に影響しているものと思われる。しかし、実験2での最終年度の新鮮胚での判別率は92.5%(19/21)、生存率は95.2%(20/21)と実験1よりも向上した。

移植成績を表5に示した。凍結胚で2頭、新鮮胚で17頭移植を行ない、それぞれ受胎した数は1頭(受胎率50%)と7頭(受胎率41.2%)であった。全体の受胎率は42.1%であった。凍結

胚については例数が少ないが、一度凍結し融解後バイオブシーを行なった胚でも受胎する可能性が示唆された。新鮮胚については受胎率41.2%で現在の受精卵移植の受胎率(約50%前後)を考慮しても十分フィールドでの利用が可能であると考えられる。

バイオブシーの方法の違いによる判定率および生存率を表6に示した。切断法の判定率は90.5% (19/21), 吸引法(受精後6日目胚)では92.3% (12/13), 吸引法(受精後7日目胚)では52.6% (10/19)であった。生存率はそれぞれ切断法で95.2% (20/21), 吸引法(受精後6日目胚)で84.6% (11/13), 吸引法(受精後7日目胚)で21.1% (4/19)であった。これにより受精から7日目の胚については吸引採取による方法は適していないことが示唆された。吸引法(受精後6日目胚)および切断法ではともに判定率および生存率で良好な成績であった。胚の発育段階および発育ステージにより最適なバイオブシーの方法を選ぶことが重要であり、これにより判定率の向上およびバイオブシー後の胚の生存率向上が期待できる。

胚性判別技術は改良手段として非常に効率良く、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、今回の実験1と実験2のように胚の判別率や生存率が技術者や機械器具操作の熟練度によるところが多いことや、インタクト胚に比べ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する必要がある。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する必要がある。

### 参考文献

- 1) Utsumi K. et. al. (1992) J. Reprod. Dev. 38, 35-43
- 2) 小西ら (1995) 和歌山県畜産試験場研究報告6号: 30~34
- 3) 森安ら (2001) 東日本受精卵移植技術研究会報17号: 46-47