

1. 牛の受精卵移植の実用化に関する研究 (1) 牛受精卵の性別判別実用化試験

Vitrification or cryopreservation method for the cattle sexing embryo

藤田達男 梅木英伸 志村英明 久々宮公二 志賀一穂

要 旨

牛受精卵の性別判別技術を実用化するうえで最も課題となっている切断胚の保存方法について、全国27道県の関係機関が共同試験を行い一定の成果が得られたので、平成15年度の成績も含めて、これまでの試験成績をまとめて報告する。

平成7～15年度に性別判別を行った460胚の判別結果は、雄201胚、雌215胚、不明44胚、判定率は90.4%であった。判定に用いた判別試薬キット別の判別率は、YCD キット(組合貿易、以下 YCD)：89.5%、Loopamp 牛胚性別判別キット(栄研化学、以下 LAMP または LAMP 法)：95.2%であった。LAMP 法は、サーマルサイクラーと電気泳動装置が不要で手技が簡単であり YCD より安価なため、今後はこの診断キットが主流になると考えられた。共同試験開始当初はエチレングリコール(EG)によるダイレクト法を基本に糖の種類や糖添加の効果、または胚切断後の修復培養時間の効果等を検討したが有効な手法の開発に至らなかった。平成12年からガラス化法に取り組み、平成14年から超急速ガラス化法に着手した。保存方法別に移植成績を比較した結果、超急速ガラス化法の一つであるであるゲルローディングチップ(GLT)法の受胎率は、他の保存法と比べて有意に高かった($P<0.05$)。GLT 法は、実験室での加温操作を要することが難点として挙げられるが、移植者との連携を工夫すれば十分普及性のある技術と考えられた。これまでに性別判別胚386胚を移植した結果、108頭が受胎(受胎率28%、11頭流産)し、85頭の子牛が誕生した。性別判別胚由来産子の性と判別結果との一致率は91.7%であった。不一致は、雌胚と判定した胚から生まれた雄7頭であり、雄胚と判定した胚での不一致はなかった。

以上のことから、牛胚の性別判別技術において課題となっていた胚保存法は、普及性にまだ課題を残しつつも、現状では GLT 法による超急速ガラス化法が最も優れていると思われる。人為ミスも含めて10%程度の誤判定があったが、LAMP 法の導入によって判別率はさらに改善すると思われ、今後、本技術を応用した実践的な展開が期待できる。

(キーワード：牛胚性別判別 凍結保存 ガラス化保存)

背景及び目的

牛の胚移植は着実に農家段階へ普及しつつあり、胚移植が肉用牛や乳用牛の改良に利用されるようになったいま、希望する性の子牛生産ができる実用的な胚の性別判別技術の確立が望まれている。近年、遺伝子工学の進歩により、特定の DNA 断片を短時間に増幅する PCR(Polymerase Chain Reaction)法が開発され、ウシY染色体特異塩基配列をプライマーとして、胚細胞の雄性 DNA を増幅・検出するウシ胚性

判別法が開発され、性別判別胚からの子牛の生産も行われている^{1,2,3,4)}。本試験では、牛胚の性別判別技術を普及させる上で最もネックになっている胚の凍結保存技術について、受精卵移植普及定着化事業(雌雄産み分け型)に参画する27道県と共通の試験課題を設定し問題解決に当たってきた。平成8年の共同試験参加以降、本県が共同試験の中で取り組んだ研究テーマは以下のとおりである。

平成15年度試験成績報告書：33（2004）

平成8年度：PCR サンプル採取法、凍結保存液(EG への糖添加の有無)の検討

平成9年度：凍結保存液(EG への糖添加の有無)、切断後の修復培養時間の検討

平成10年度：切断後の修復培養時間(3～5時間または20～24時間)の検討

平成11年度：ダイレクト法、ワンステップ法の比較、変性細胞採取の検討

平成12年度：ダイレクト法、ワンステップ法、ガラス化(VSED)法の比較

平成13年度：ダイレクト法、ガラス化(VSED)法の比較

平成14年度：ワンステップ法、超急速ガラス化法(GLT)、ガラス化法(VSED)、の比較

平成15年度：超急速ガラス化(GLT または OPS)法、ワンステップ法の比較

材料及び方法

1．供試胚

黒毛和種供卵牛の腔内に黄体ホルモン製剤(CIDR)を挿入し、10日目から FSH 総量20AU の減量投与法で過剰排卵処理⁷⁾を行い、処理2日目にプロスタグランジン F2 (ジノプロスト製剤：エストラメイト)750mg を投与し、同時に CIDR を除去した。発情日に12時間間隔で2回人工授精し、発情日を0日として7日目に非外科的に胚を回収した。回収胚は保存液(20%子牛血清+0.4%牛血清アルブミン添加修正 PBS)で洗浄し、A～AB ランクの後期桑実胚及び初期胚盤胞期胚を供試した。

2．PCR サンプル採取

供試胚をミネラルオイルで覆ったバイオブシー液(0.1M ショ糖添加 PBS)50 μ l ドロップに入れ、シャーレ底面に付着した胚を、マイクロマニピュレーターに接続した金属刀(フェザー社製)を用いて、図1に示したように栄養膜細胞の10～20%または胚変性細胞を切断分離した。先端を細くしたパスツールピペットでこれを吸引採取し PCR 用マイクロチューブに収納した¹⁾。

3．バイオブシー胚の培養

バイオブシー胚は、培養を行わずにただちに保存するか、または、培養液(100 μ M メルカプトエタノールを添加した20%牛胎児血清加 TCM199)に入れ、5%炭酸ガス培養器で3～5時間、20～24時間培養した。



図1：マイクロブレードによる胚バイオブシー中央の黒い楔形がマイクロブレード。その上の切断片を PCR サンプルに使用。残りの部分を移植。

4．バイオブシー胚の保存法

プログラムフリーザーを用いた緩慢凍結法では、保存液の組成別に10%エチレングリコール(10%EG)区、10%EG+0.1M ショ糖(10%EG+Suc)区、10%EG+0.1M トレハロース(10%EG+Tre)区からなるとダイレクト法と、10%グリセロールを保存液としてストロー内に希釈液(0.6M ショ糖)を入れた One step straw 法を行った。

ガラス化法では、VSED 溶液(EG：ジメチルスルホキシド(DMSO)：0.4%牛血清アルブミン添加修正 PBS を1：1：2の割合で混合)を用いた VSED 段階希釈法^{8,9)}を行った。

超急速ガラス化法では、基本液(20% CS 加 TCM 199)に20%EG + 20%DMSO + 0.6M ショ糖を添加したガラス化液を使用し、保存容器としてゲルローディングチップを用いる GLT 法¹⁰⁾と、0.25ml ストローを加工して作製したオープンプルドストローを用いる OPS 法¹⁰⁾を行った。

5．PCR 法または LAMP 法による性別判別

A. B. Technology 社¹¹⁾が開発した YCD(以下

YCD)、および Miller ら¹²⁾が発見した雄特異的遺伝子 BOV97M プライマーを用いた方法は、PCR 法によって雄特異的塩基配列と雌雄共通塩基配列を増幅させ雄特異的バンドの有無で雌雄を判別した。栄研化学が市販化した Loopamp 牛胚性判別キット(以下 LAMP または LAMP 法)¹³⁾では、雄特異的遺伝子が増幅したことによって生じる混濁の有無によって雌雄を判別した。PCR 法において雌雄共通バンドが検出されない場合、LAMP 法では雌雄共通遺伝子検出液で混濁が生じない場合、その胚は判別不明とした。

6．融解(加温)および移植

ダイレクト法と One step straw 法では野外で移植者が融解した。ダイレクト法では融解後直ちに、One step straw 法では移植者がストロー内の保存液と希釈液を混合することによって耐凍剤除去を行ったのち移植に供した。ガラス化法および超急速ガラス化法では、当試験場実験室内で加温後、二段階の希釈液¹⁰⁾で耐凍剤除去を行ったのち移植に供した。移植は、家畜保健衛生所を通じて各地域の獣医師または受精卵移植師によって行われた。レシピエントは発情が明確で発情7～8日目の黒毛和種またはホルスタイン種とした。

7．受胎確認および産子の性別確認

移植後40日前後に直腸壁から超音波診断装置を用いて受胎の有無を確認した。受胎確認、産子の性別確認は家畜保健衛生所が行った。

8．統計処理

受胎率などの統計的な比較は、²独立性の検定および Fisher の直接確率計算法で行った。

結果及び考察

平成7～15年度に460胚の性判別を行った結果、雄201胚、雌215胚、不明44胚、判定率は90.4%であった(表1)。判定に用いた判別試薬キット別の判別率は、YCD：89.5%、LAMP：95.2%であった。YCD

表1．判別試薬キット別胚判別成績

プライマー			不明	合計	判別率
YCD	167	181	41	389	89.46
BOV97M	5	4	0	9	100.00
LAMP	29	30	3	62	95.16
合計	201	215	44	460	90.43

表2．保存法別胚移植成績

保存方法	培養時間	移植頭数	受胎頭数	受胎率
新鮮移植	0～3	15	4	26.7
10%EG	0	47	12	25.5 b
10%EG+Suc	0	30	6	20.0
	3～5	28	6	21.4
	20～24	27	7	25.9
	小計	85	19	22.4 c
10%EG+Tre	0	4	2	50.0
	3～5	37	9	24.3
	小計	41	11	26.8 b
One Step	0	38	14	36.8
	3～5	67	19	28.4
	20～24	21	2	9.5
	小計	126	35	27.8 b
VSED	3～5	34	10	29.4
OPS	3～5	14	4	28.6
GL-Tip	3～5	24	13	54.2 a
合計		386	108	28.0

符号は 二乗検定による有意差を示す(ab間:p<0.05、ac間:p<0.01)

表3．胚切断後の培養時間別移植成績

培養時間	移植頭数	受胎頭数	受胎率
0	68	20	29.4
3～5	95	25	26.3
20～24	48	9	18.8
合計	211	54	25.6

では約10%に判定不能が出現した原因として、本研究開始当時の技術的未熟と変性細胞を PCR サンプルとして使用したことなどが考えられた。平成13年度から LAMP 法を取り入れた。この方法では専用の装置が必要であるがサーマルサイクラーと電気泳動装置が不要で手技が簡単であり、YCD よりも安価で判別率も高かった。今後は LAMP 法が牛の性判別の主流になると考えられる。BOV97M は MCSU との同時診断に使用したプライマーである。安定した優れたプライマーであるが商業的な使用はできない。

保存方法別の移植成績を表2にまとめた。共同試験開始当初は EG によるダイレクト法を基本に糖の種類や糖添加の効果の比較を行ったが有効な保存方

法の開発には至らなかった。新鮮胚移植は主に低ランク胚を用いて行ったため30%以下の受胎率であった。ダイレクト法を基本とした試験の中で、胚切断後の修復培養の効果を検討した。0～24時間以内では、培養時間が長くなるほど受胎率が低下する傾向がみられたが有意な差ではなかった(表3)。

平成12年度からガラス化法に着手し、まず VSED 段階希釈法に取り組んだ。この方法では保存時と加温時の時間管理が煩雑で多数の胚の処理は困難であった。これらの時間管理が受胎率を大きく左右すると考えられた。超急速ガラス化法では GLT 法と OPS 法の2通りを行ったが、GLT 法の方が受胎率は高かった。加温後の生存性確認では両法に差は無かったが、GLT の方が OPS よりも容器の壁が薄いので冷却速度が速いと考えられ、これが受胎率に影響していると考えられた。超急速ガラス化法を含めてガラス化法では、実験室での加温操作が必要で普及性に難点があるが、GLT 法は従来の緩慢凍結法より有意に高い受胎率を示したので、利用方法の工夫によって有効な保存技術となりうると考えられた。これまでに性判別された460胚の中から386胚を移植した結果、108頭が受胎(受胎率28%)し11頭は流産した(表3、4)。

表4．性判別胚由来産子の性別調査成績

胚性判別結果	産子の性			流産等により不明	一致率
			小計		
	34	0	34	5	100.00
	7	32	39	4	82.05
不明	5	7	12	2	
計	46	39	85	11	90.41

性判別操作を行った胚から85頭の産子が誕生した(表4)。不明胚を除いた一致率は91.7%であった。不一致は、雌胚と判定した胚から生まれた雄7頭であり、雄と判定した胚での不一致はなかった。これは雄特異的遺伝子を増幅し、特異的バンドの有無で雌雄を判別する手法に起因すると考えられた。

以上のことから、牛胚の性判別技術において課題となっていた胚保存法は、普及性にまだ課題を残し

つつも、現状では GLT 法による超急速ガラス化法が最も優れた保存法と考えられた。人為的ミスも含めて10%程度の誤判定があったが、LAMP 法の導入によって判別率はさらに改善すると思われ、今後、本技術を応用した実践的な展開が期待できる。

引用文献

- 1) Kameyama K, et al., Theriogenology, 39:241, abstr. (1993)
- 2) Thibier M, & Nibart M, Theriogenology, 43:71-80 (1995)
- 3) 沼部 孝ほか、日本胚移植学雑誌、17:183-190 (1995)
- 4) 後藤充宏ほか、日本胚移植学雑誌、17:19-25(1995)
- 5) 藤田達男ほか、大分畜試成績報告書、27:46-49 (1998)
- 6) 藤田達男、畜産技術、2003.2:26 - 29(2003)
- 7) 広瀬啓二ほか、大分畜試成績報告書、25:38-42 (1996)
- 8) Ishimori H, et al., Theriogenology, 40:427-433 (2000)
- 9) 井上直弘ほか、第95回日本畜産学会要旨(1999)
- 10) 富永敬一郎ほか、日本胚移植学雑誌、23:19-26 (2001)
- 11) Herr,C. & K.Reed, Theriogenology, 35:45-54 (1991)
- 12) Miller J.R, et al., Animal Genetics, 21:77-82 (1990)
- 13) Notomi T, et al., Nucleic Acids Reserch 28 (2000)
- 14) 藤田達男ほか、大分畜試成績報告書、30:47-51 (2001)
- 15) Shiga K et al., Theriogenology, 52:527-535 (1999)