

2. 牛胚の性別別技術の確立（第1報）

酪農科：中里 敏，永井晴治
井上哲郎，吉田豊昭

要 約

牛の改良・増殖のスピードアップを図るため、PCR法を用いた性別別試験を実施し、その実用性について検討を行った。

PCR法による性別別率は97.3%であり、バイオプシー後の移植用サンプルの生存率も97.4%と高い成績が得られた。

また、性別別胚の受胎率は新鮮胚移植で72.7%、凍結胚移植では41.2%であり、分娩した子牛（3頭）の性は、いずれもPCRの判定結果と一致していた。

このように、性別別率の高さ、判定の正確度及び新鮮胚移植の受胎成績等からPCR法による性別別技術は、実用化に最も近い技術であることが示唆された。今後は、凍結胚の受胎率向上のため、バイオプシー後の胚の培養技術並びに凍結保存技術（とくに耐凍剤、凍結曲線等）についての検討が必要である。

緒 言

牛の受精卵移植技術は種雄牛の造成や優良繁殖雌牛の増産など改良・増殖面に活用されているが、性別別技術を応用することができれば、さらに改良・増殖のスピードアップを図ることができる。

この性別別技術については、古くから研究がなされ、大別すると①精子分画人工授精法、②性別判定胚移植法の2つに分類することができる。

精子分画人工授精法としては、パーコール密度勾配遠心分離¹⁾、無担体電気泳動法²⁾などがある。これらはX、Y精子間の密度や荷電量の差を想定して行われたものであるが、正常精子におけるこれらの差の存在は未だ確認されておらず、精子分離の理論的裏付けはほとんどない。また、フローサイトメーター／セルソーター法³⁾については、精子分離に長時間を要し、選別された精子の活力の低下が著しいため、実用化には至っていない。

次に、性別判定胚移植法としては、性染色体解析⁴⁾、雄特異的抗体処理法⁵⁾などが試みられてきた。しかし、これらの手法による性別判定には、判定の精度や効率、手間等の問題が残されており、未だ試験段階である。

一方、最近では、分子生物学的手法の発展により雄特異的DNA配列を利用したPCR (Polymerase Chain Reaction: ポリメラーゼ連鎖反応) 法による

性別別技術が開発⁶⁾され、最も実用的な判定法として注目されている。

今回、われわれはこのPCR法を用いた性別別試験を実施したので、その概要を報告する。

材料及び方法

1. 供試胚

過排卵処理した黒毛和種及びホルスタイン種から回収したA～Bランクの後期桑実期胚～胚盤胞期胚を用いた。

2. バイオプシーサンプルの採取

胚のバイオプシーは、マイクロマニピュレーター（成茂）に刃先角度が15度のマイクロブレード（フェザー）を取り付け、押し切り法により、胚の10～20%を採材した。

なお、胚の操作は、0.2Mシュウクローズ加修正リン酸緩衝液（m-PBS）中で実施した。

3. PCRによる解析

ウシ胚性別別キット「XYセレクター」（伊藤ハム）を使用し、PCRはThermal Cycler Model TP480 (TaKaRa) で実施した。なお、PCRプログラムはキットの定法に従った。

4. 性別判定

PCR産物と色素液の混合液をアガロースゲルにのせ、電気泳動及びエチジウムブロマイド染色

を行い、トランスイルミネーター（フナコシ）上でバンドの観察を行った。そして、雄特異的PCR産物と雌雄共通PCR産物の2本のバンドが得られた場合には雄と判定し、雌雄共通PCR産物1本のバンドのみが得られた場合には雌と判定した。

5. 移植用サンプルの培養

100μM β-メルカプトエタノール含有20%子牛血清 (CS) 加 TCM199培地を用い、38.8°C、5% CO₂、95%空気の条件下で、3~24時間培養し、移植または凍結処理を行った。

なお、バイオブシー後の移植用サンプルの生存率の判定は、培養後胞胚腔が観察された胚を生存と判定し、腔形成の程度及び胚の変性割合で形態的にランク付けを行った。

6. 胚の凍結保存及び融解（ダイレクト法）

胚の凍結は、0.4%ウシ血清アルブミン (flac-tion V) 含有20%CS加m-PBS液を基礎媒液とし、1.8M エチレングリコール+0.1Mシュエクロース+4mg/mlリノール酸アルブミンを加えた耐凍剤を用いて行った。

培養後の胚を0.25mlストローに吸引し、室温で15分間平衡を行い、あらかじめ-7°Cに温度設定したプログラムフリーザー (FHK) に移した。30~60秒後に植氷を行い、計10分間保持し、-7~-30°C間を毎分-0.3°Cで冷却、その後-30°Cでさらに10分間保持後、液体窒素中に投入して凍結保存した。

胚の融解は、液体窒素からストローを取り出し、空気中で6秒間保持後、30°Cの微温湯に10~20秒間浸けて融解し、アルコール綿花でよく拭いた後、移植器にセットし移植した。

7. 移植試験

移植は、県内各地の受精卵移植師（民間）に依頼し、平成7年度は新鮮胚を6頭、凍結胚を4頭に移植した。また、8年度は12月末現在、新鮮胚を11頭、凍結胚を43頭に移植した。

結果及び考察

1. PCR法による判別率

供試胚の性判別率は表1に示したとおり、149個のうち145個で判別可能であり、判別率は97.3%と非常に高い成績が得られた。これは供試した胚が

表1 PCR法による判別率

供試胚	雄	雌	不明	判別率 (%)
149	50	95	4	97.3

※平成8年12月末現在

ほとんどAランク胚であったこととサンプリングミスが少なかったためと考えられる。中嶋ら⁷⁾は、透明帯切開後の分離変性細胞のみをサンプルとして判別率83.9%、また山口ら⁸⁾は、正常細胞を使用した場合 (91.4%) と分離細胞を使用した場合 (82.9%) の判別率に有意差は認められなかったと報告しており、今後、変性分離細胞をサンプルとした場合についても検討していきたいと考える。

一方、性判別した雌雄の比率をみると雌の割合が高く、ほぼ2:1であった。このことから、雌と判定した胚の中に雄の胚が含まれている可能性も否定できないと思われる。実際、判定時に雌雄共通バンドは明瞭に確認できるものの注意深く観察しないと雄特異的バンドが確認できないサンプルもあったことから、本来は雄胚であるが雄特異的バンドを見落とし、誤って雌と判定したケースもあると推察される。この点については、今後、分娩した産子の性を調査し、PCR判定結果と比較し検討を加えたい。

2. 移植用サンプルの生存率

バイオブシー後の移植用サンプルの生存率は表2に示したとおり、156個のうち152個で胞胚腔の形成が確認され、生存率は97.4%であった。これは、マイクロマニピュレーターの慎重な操作、つまりマイクロブレードの先端で胚を傷つけない程度に軽く触れ胚の向きを整えてからバイオブシーしたこと、あるいはバイオブシー胚の培養にβ-メルカプトエタノールを添加したことにより、生存率が高まったものと推察される。

なお、腔形成の程度及び胚の変性割合をみると、Aランクが79.5%、Bランクが17.9%であり、Bランク凍結胚での受胎も3例確認されたが、バイオブシー胚の品質をさらに向上させるためには後

表2 バイオブシー後の移植用サンプルの生存率

供試胚	Aランク	Bランク	変性	生存率 (%)
156	124	28	4	97.4

※平成8年12月末現在

表3 移植成績

年度	胚区分	移植頭数	受胎頭数	不明頭数	受胎率 (%)
7	新鮮胚	6	1	0	16.7
	凍結胚	4	1	0	25.0
	計	10	2	0	20.0
8	新鮮胚	11	8	0	72.7
	凍結胚	43	14	9	41.2
	計	54	22	9	48.9

※平成8年12月末現在

藤ら⁹⁾が報告しているように、顆粒膜細胞との共培養及び細胞賦活剤であるソルコセルルを添加した培地での培養¹⁰⁾などについて、今後検討する必要があると思われる。

3. 移植成績

1) 平成7年度

新鮮胚を6頭、凍結胚を4頭に移植し、それぞれ1頭ずつ受胎したが、いずれも流産であった。

2) 平成8年度（12月末現在）

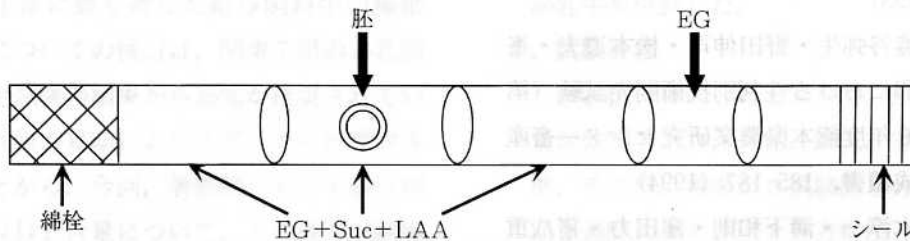
新鮮胚移植11頭のうち8頭が受胎（うち流産1頭）し受胎率72.7%、凍結胚については、43頭に移植し14頭受胎、受胎率は41.2%（ただし9頭は妊否不明）であった。

新鮮胚移植成績とバイオペシー前の胚のランクについて、濱田ら¹¹⁾は、胚の品質鑑定を正確に行い、性別判定する胚を厳選することにより受胎率の向上が図れると報告しているが、今回、供試した新鮮胚はすべてAランクであり、また状態のよい受卵牛を確保できたことから好成績が得られたものと思われる。

凍結胚についても受胎率は7年度より向上し

たが、この要因として、耐凍剤の改良とストローへの胚の吸引方法の改良が考えられる。まず、耐凍剤については、当初は1.8Mエチレングリコールのみで凍結を行っていたが、これにシュクロースとリノール酸アルブミンを加えることにより、胚の凍結時の障害が緩和されたものと推察される。次に、ストローへの胚の吸引方法であるが、耐凍剤にシュクロースを添加した場合、植氷に手間取ったことから、図1に示すとおり、4層目に1.8Mエチレングリコールを吸引し、植氷のスペースを確保した。これにより、植氷をスムーズに行えたことも受胎率向上の一因と考えられる。

しかし、凍結胚移植の場合は、本県でのダイレクト法による凍結胚の受胎率よりも低い成績であった。富永ら¹²⁾は、バイオペシーした胚を培養液のみで短時間（3～4時間）あるいは長時間（18～24時間）培養した場合に、短時間に比べて長時間培養時に胚の品質の低下が著しかったが、長時間培養でも共培養法を用いることによって、品質の低下がいくらか改善されたと報告している。今回、われわれは培養液のみで



EG：エチレングリコール Suc：シュクロース LAA：リノール酸アルブミン

図1 ストローへの胚の吸引方法

基本液：PBS+20%CS+0.4%BSA
凍結媒液：1.8M EG+0.1M Suc+4mg/ml LAA in PBS

20~24時間培養後に凍結処理を行ったが、今後、凍結保存技術の確立のため、耐凍剤及び凍結曲線についてはもちろんのこと、共培養法、培養時間等についても検討する必要があると思われる。

3) 判定一致率

これまでに新鮮胚移植で2頭(雄1頭, 雌1頭), 凍結胚移植で1頭(雌)の産子が得られたが、いずれもPCRの判定結果と一致しており、判定一致率は100%であった。

謝 辞

本研究の実施に当たり、性判別胚の移植にご協力いただいた県内各地の受精卵移植師の皆様には感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) 鈴木達行: 不連続 Percoll 密度勾配によるウシ精子の性判別, Jpn J Anim Reprod, 35, 29-32 (1989)
- 2) 梶田博司: 電気泳動法による X-および Y-精子の分離, Jpn J Anim Reprod, 35, 33-37 (1989)
- 3) Johnson L.A.: Flow cytometric determination of sperm sex ratio in semen purportedly enriched for X- or Y-bearing sperm, Theriogenology, 29, 265 (1988)
- 4) 牛島仁・江藤哲雄・尾川昭三: 牛半切胚の染色体検査による性判別ならびに性判別胚の移植試験, Jpn J Anim Reprod, 35, 63-68 (1989)
- 5) 内海恭三: 雄性特異抗体を利用した胚の性分別, Jpn J Anim Reprod, 35, 76-87 (1989)
- 6) 伊藤ハム株式会社中央研究所: 性識別に関するプローブの開発, 平成4年度研究開発報告書, 183-199 (1993)
- 7) 中嶋達彦・澁谷弥生・野田伸司・松本道夫・峯英征: 受精卵における性判別技術開発試験(第5報), 平成6年度熊本県農業研究センター畜産研究所試験成績書, 185-187 (1994)
- 8) 山口浩・轟木淳一・溝下和則・窪田力・猪八重悟: 雌雄産み分け技術の確立, 鹿児島県肉用牛改良研究所研究報告, 1, 32-35 (1995)
- 9) 後藤充宏・鴻野文男・近藤正治: 性判別した牛胚の凍結保存, 徳島県畜産試験場研究報告, 35,

1-4 (1994)

- 10) 高倉宏輔・高橋博人・堂地修: ウシ切断2分離胚の移植後の生存性, 家畜繁殖技術研究会報, 14, 123-127 (1992)
- 11) 濱田勉・岡崎克美・関沢文夫・斎藤光男: 牛胚のPCR法による性判別試験(第1報), 栃木県酪農試験場研究報告, 120, 19-23 (1996)
- 12) 富永敬一郎・福島護之・秦谷豊: 牛分断胚の凍結, 繁殖技術会誌, 13, 65-75 (1991)