

PCR法により雌雄判別した牛胚の凍結に関する試験 (第2報)

栗原昭広・瀬尾哲則

要 約

性別のためバイオブシーした牛の体内受精胚を、異なる手法で凍結保存し、受胎率に与える影響を検討した。

- 1 牛の体内受精胚 36 個の性別判定を実施したところ、性別判別率は 83.3%であった。
- 2 ダイレクト手法による保存法とガラス化保存法の受胎率はどちらも低い成績 (22.2%、25.0%) であった。

緒 言

希望する性の牛を生産することが可能であれば、優秀な後継雌牛を効率よく作出できたり、産肉性に優れ市場価値の高い雄牛を生産することで、酪農及び肉牛農家への経営上のメリットを格段に向上させることができる。

性を特定する場合、精子の段階で分別できれば最も波及効果が大きく、利用価値の高い技術となる。現時点では、フローサイトメーターによるX精子とY精子の分離を75~90%の精度で分離が可能となっているが、その凍結精液による受胎率は対照 (63%) と比較して低い成績であり、実用段階に至っていない。

一方、すでに受精した牛胚の雌雄判別は、胚の発育速度 (発育の進んでいる胚は雄胚が多い) や品質 (高品質胚は雄胚が多い) によりある程度可能であると報告されている²⁾ が、確率論の域を越えることはない。

その点、牛Y染色体 (雄) の特異的塩基配列をプライマーとして雄特異的DNAを増幅して検出する胚の性別判別法 (PCR法) は、若干の時間や経費がかかるにしても、判定精度及びその簡便さから既に実用化されており、判定用の試薬も市販されている。

しかし、このPCR法による牛胚の性別判別は、性を判定するための検体を胚の一部を切断 (バイオブシー) して得るため、胚は少なからずダメージを受け、凍結した場合の生存性の低下が指摘されている³⁻⁴⁾。

雌雄判別胚の有効利用とその普及のためには、性別判別胚の凍結技術の確立が必要不可欠である。既報⁵⁾ により、ダイレクトトランスファー法における凍結保存法 (ダイレクト法) では受胎率が低く、実用化に適さないことが判明した。そこで、低ランク卵や損傷卵の凍結に有効な保存方法として、ガラス化保存法⁶⁾ が提唱されてきたので、その手法を検討した。

方 法

1 供試胚

発情後 9~14 日目の供試牛に、卵胞刺激ホルモン (FSH) 20AU 減量投与及びPGF2 α (ジノプロスト製剤: エストラメイト) 750mg (3ml) 投与による過剰排卵処理を行い、処理開始から5日目に人工授精した。人工授精後7日目に定法⁹⁾ により卵を回収した。回収した卵のうち、後期桑実胚~胚盤胞期胚のAランク⁹⁾ のものを供試した。

2 PCR用サンプル (バイオブシーサンプル) の採材

胚をミネラルオイルで覆った 0.1Mシュークロース (Suc) を含む修正EPBSに入れてシャーレ底面に付着させ、マイクロピピュレータ (ナリシゲ製) に接続した金属刀 (バイオカットブレード、フェザー社製) を用いて胚の一部を切断分離して、PCR用の材料とした。

3 切断分離胚 (バイオブシー胚) の培養

移植に供する側の胚は、雌雄産み分け技術利用促進事業 (性別判別型) 共同試験マニュアル⁷⁾ に従い、20%牛胎児血清及び 100 μ M β -メルカプトエタノール (β -ME) を添加したTCM199 培地で、性別判別するまで (3 時間程度)、5%CO₂・38.5°Cで培養した。

4 バイオブシーサンプルの性別判定

バイオブシーサンプルに牛性別判別用キット「XYセレクター」 (伊藤ハム株式会社製) を加え、PCR装置 (岩城硝子社製) を用いて、雄に特異的なDNAを増幅した。増幅したDNAを電気泳動し、紫外線照射下で雄特異的バンドの有無により雌雄の判定を行った⁸⁾。

5 バイオブシー胚の保存

バイオブシー胚の長期保存方法について、既報⁵⁾ におけるダイレクト法と新しい試みであるガラス化保存法との比較検討を行った。詳細については表1に示す。

表1 長期保存(凍結)手法

方法	ダイレクト法	ガラス化法
凍結液組成	1.8Mエチレングリコール 0.1Mシュクロース	20%グリセリン 20%エチレングリコール 0.3Mシュクロース 0.3Mキシロール 3%ポリエチレングリコール
(溶媒)	修正PBS	修正PBS
平衡時間	10分	1分
植水温度	-7°C	→30秒でストローに封入
冷却速度	-0.3°C/分	→液体窒素ガス中に2分
液体窒素投入温度	-30°C	→液体窒素に投入
備考(移植時)	ダイレクト移植	3段階凍結剤除去

6 移植及び受胎確認

受胎牛の発情日を0日として、7日目に移植した。移植を効率的に行うために、CIDR(イージーブリード)による発情同期化処理を実施し、移植に供した。

移植後45～60日に超音波診断装置(スーパーアイSSD-210DX、アロカ社製)により妊娠鑑定を実施した。

結果及び考察

1 性判別成績

性判別成績は表2に示すとおりである。

36個の胚を半別し、雄胚が11個、雌胚が16個、不明胚が6個で、性判定率が83.3%であった。判定出来なかったものは、電気泳動像の雄または雌雄共通バンドが極めて薄い場合や、泳動域全体が白く抜けてしまい、バンドが確認出来ない場合であった。これらの要因として、バイオプシーサンプルの細胞数が少なすぎたり、異物の混入などで生じた可能性がある⁵⁻⁶⁾。この判別率の成績は既報⁵⁾より低下したが、他の報告³⁻⁴⁾と比較して差はなかった。

表2 性判別成績

供試胚数	雄胚	雌胚	不明	判別率(%)
36	11	16	6	83.3

2 移植成績

雌雄判別胚の移植成績は表3に示すとおりである。判別胚を長期(凍結)保存した場合の受胎率は、ダイレクト法22.2%(2頭/9頭)とガラス化保存法25.0%(2頭/8頭)でもあまり良くない成績であった。

今回の試験では、ガラス化保存法の優位性は認められなかった。本来、ガラス化保存法に用いる凍結液は毒性がかなり強く、設定された短時間の内に処理しないとかえって細胞が損傷する⁶⁾。そのため、今回の低成績は、作業がスムーズに運ばず、時間がかかりすぎたために起因した可能性もある。また、そもそもガラス化保存法がバイオプシー胚の保存に適しているかという疑問も捨てるわけにはいかない。

そのため、共同研究道県とともに、データの集積と試験の継続により、さらに検討する必要がある。

表3 性判別長期(凍結)保存胚の移植成績

	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
ダイレクト法	9	2	22.2
ガラス化保存法	8	2	25.5

引用文献

- 1) 下平乙夫、畜産技術、第546号、35-38(2000)
- 2) 伊藤盛徳・後藤太一、人工授精研誌、8、95-99(1996)
- 3) 中嶋達彦・佐藤敬明・守田智・峰英征、熊本農七畜研試験成績、166-168(1996)
- 4) 後藤充宏・鴻野文夫・近藤正治、徳島畜試研報、第35号、1-4(1994)
- 5) 岩尾健・森本一隆・岡田綾子・栗原昭広、鳥取畜試研報、第27号、5-7(1998)
- 6) 新納正之、ウシ胚のガラス化保存法マニュアル、農林水産省家畜改良センター(1998)
- 7) 井上直弘、ガラス化(VSED)保存法マニュアル、宮崎県優良家畜受精卵総合センター(1999)
- 8) 伊藤ハム株式会社、XYセクター使用マニュアル(1995)
- 9) 金川弘司、牛の受精卵(胚)移植第2版、近代出版、64-68(1988)