

## 牛受精卵の性別判定方法の検討

秋山清・仲沢浩江・仲沢慶紀・岸井誠男

Practical Studies on Sexing of Bisected Bovine Embryo

Kiyoshi AKIYAMA, Hiroe NAKAZAWA, Yoshinori NAKAZAWA and Yoshio KISHII

牛受精卵の性別判定のために検査用細胞の分割方法及び性別判定方法について検討した。分割後の受精卵の生存率、発育率はプロネース区、シュークローズ区、透明帯切開区がサイトカラシン区に比べて優れていた。供試卵の品質ランク別ではAランクがBランクに比べて修復培養後の形態が良好であり、品質ランクに従い分割後の形態的品質が低下する傾向であった。受精卵の性別判定率は染色体検査法ではコルセミド区は50.0%、ビンブラスチン区は88.9%でありビンブラスチン区が優れていた。PCR法ではDNA抽出方法による性別判定率の差は認められず、Aランク卵では87.9%、Bランク卵では77.8%の性別判定率であり、品質ランクにより低下する傾向であった。性別判定率及び判定までの所要時間からPCR法が染色体検査法に比べて優れていた。

**キーワード：**牛、受精卵、性別判定、分割操作、染色体検査法、PCR法

畜産において、必要な性別の産子を計画的に生産することが可能になれば、経営の効率化に対する効果は極めて大きいと考えられる。牛を始めとする哺乳動物の性別は受精する精子の持つ性染色体構成（X、Y染色体）により決定する。しかし、雌雄を産み分けるためにそれぞれの性染色体構成を持つ精子を分別し、人工授精に用いる実用的な技術は得られていない。一方、牛受精卵の性別判定は、H-Y抗原抗体法<sup>1)</sup>、受精卵の発育速度差による方法等<sup>2)3)</sup>が検討されているが、現状で最も確実な受精卵の性別判定方法は顕微操作により切断分離された受精卵の細胞から染色体検査<sup>4)5)</sup>や雄特異的DNA断片の検出<sup>6)7)</sup>により性別を判定する方法である。これにより、性別既知の移植用受精卵を作製することで希望する性別の子牛を出産させることが可能である。この方法により、受精卵移植技術を利用した雌雄産み分けが可能なが既に報告されている。しかし、現状の分割方法や性別判定方法では受精卵の生存性や受胎率に問題が見られる。

本試験は性別判定受精卵を利用した雌雄産み分け技術の構築を目的として、検査用細胞を採取するための分割方法及び性別判定方法について検討した。

### 材料及び方法

#### 1. 供試材料

黒毛和種経産牛を供卵牛として、FSH減量投与方法及びPVP溶解FSH1回投与方法<sup>8)</sup>により過剰排卵処理を施し、人工授精後7日目に採取した後期桑実胚から胚盤胞を供試した。

#### 2. 顕微操作

供試受精卵は次の方法で性別判定のための検査用細胞を採取した。

(1)プロネース区：2%プロネース（科研製薬、アクチナーゼE）添加PBS中で透明帯を脆弱化した後、20%子牛血清（CS）添加修正PBS中に保持し受精卵の細胞を分割した<sup>4)</sup>。

(2)シュークローズ区：0.2Mシュークローズ添加PBS中に受精卵を保持し、シャーレ底に受精卵を付着させた後に分割した<sup>9)</sup>。

(3)サイトカラシン区：プロネース区と同様の処理により透明帯脆弱化処理後に0.5 $\mu$ g/mlサイトカラシンB及び20%CS添加修正PBS液にて10分間処理し、20%CS添加修正PBS中で分割した。

(4)透明帯切開区：胚盤胞以降の受精卵を0.2Mシュークローズ添加PBS中でシャーレ底に付着させ、内部細胞塊と反対側の透明帯の一部を切開した。その

後5%CS添加TCM199 (25mM HEPES緩衝、Earl塩、G IBCO) 中で8~32時間前培養を行い、脱出途中胚盤胞に発育した段階で栄養膜細胞の一部を分割した。

分割操作は倒立顕微鏡下で行い、マイクロマニピュレーターに接続した金属刃 (FEATHER BIO-CUT No. 715) により受精卵の細胞塊を切除した。供試受精卵が初期胚盤胞期以降の場合には栄養膜細胞側を切除した。

### 3. 修復培養

検査用細胞を分割された受精卵 (以下、分割卵) は39°C、5%CO<sub>2</sub>、95%空気の条件で5%CS添加TCM199中で卵丘細胞との共培養により切断面の修復培養を15~20時間行った。

修復培養後の分割卵は形態観察により次の4群に分類した。Ⅰ型：内部細胞塊と栄養膜細胞が明瞭な胚盤胞の形態に発育したもの。Ⅱ型：内部細胞塊及び栄養膜細胞の発育が認められるが変性細胞等の付着するもの。Ⅲ型：胞胚腔の形成が認められないもの。Ⅳ型：変性細胞や胞状化細胞の集合体

### 4. 染色体標本作製

供試卵を金属刃で1/2程度切除して得た細胞塊を染色体標本作製に用いた。検査用細胞塊は分裂阻止剤として0.04μg/mlコルセミド (GIBCO)、または0.4μg/mlビンブラスチン (和光) を添加した5%CS添加TCM199で培養し、分裂阻止培養を行った。分裂阻止培養はコルセミド区は4時間、ビンブラスチン区は16時間とし、39°C、5%CO<sub>2</sub>、95%空気の条件で卵丘細胞との共培養により行った。分裂阻止培養終了後、牛島らの方法<sup>9)</sup>に従い細胞塊を0.9%クエン酸ナトリウム溶液にて7分間保持して低張処理を行い、固定液 (メタノール：酢酸：蒸留水=3:2:1) 中で1分間保持して固定処理した後に、スライドガラス上に移し、酢酸を滴下して2次固定した。

標本は10%ギムザ液 (Merck) にて5分間染色し、生物顕微鏡下 (1,000倍) で、中期核板中に60本の染色体を認め、X染色体が2本確認された場合には雌、X及びY染色体が確認された場合またはX染色体が1本確認された場合には雄と性別判定した。

### 5. PCR法

供試卵を金属刃で1/3程度切除して得た細胞塊をPCR法に用いた。検査用細胞塊はPBS (-) で5回及び滅菌超純水で5回洗浄後、10μl滅菌超純水を入れた0.5mlチューブ内にサンプリングした。その後、ミネラルオイルを重層し、次の方法で細胞からDNA抽出を行った。煮沸法では沸騰水中で10分間煮沸し、氷水中で急速冷却し細胞を破壊した。凍結法では液体窒素中に浸し凍結融解を3回繰り返すことにより細胞を破壊した。DNA抽出方法の検討は体外受精

由来胚盤胞を2等分割し、それぞれの細胞塊を用いた。DNA増幅は雄特異プライマーとしてBOV97M<sup>10)</sup>、雌雄共通プライマーとして牛αラクトアルブミン遺伝子 (BαLA)<sup>11)</sup> を組み合わせた二重プライマー<sup>12)</sup> を用いPCR反応 (92°C1分、55°C2分、72°C3分、40回反復) によるDNA増幅を行った。

分割卵の性別判定は性別判定用キット (XYセクター、伊藤ハム) を用い、添付マニュアルに従い45回のPCR反応によるDNA増幅を行った。PCR反応終了後に反応液の一部を2%アガロースゲルで電気泳動し、紫外線照射下で増幅DNAの検出を行った。雌雄共通DNA断片のみが検出された場合には雌、雄特異DNA断片及び雌雄共通DNA断片が検出された場合には雄と性別を判定した。

## 結果及び考察

牛の雌雄産み分け技術は採取した受精卵の細胞片から性別を判定し、性別既知の受精卵を移植に用いることにより可能になった。その際、採取した検査用細胞から効率的に性別を判定することと同時に移植用受精卵の生存性や受胎能力の低下をできる限り抑える必要がある。

分割卵の生存性及び発育性を表1に示した。プロネース区、シュークロース区、サイトカラシン区及び透明帯切開区の修復培養後の生存率はそれぞれ100%、100%、91.6%及び94.1%であり、修復培養後の胚盤胞以降への発育率は95.5%、96.3%、83.3%及び94.1%であった。サイトカラシン区では他の処理に比べて生存率、発育率の低下が観察された。また、修復培養後の分割卵の形態分類では切断操作による損傷が少ないⅠ型の割合はそれぞれ72.7%、66.7%、58.3%及び70.6%、変性細胞等が付着するⅡ型の割合は22.7%、29.6%、29.2%及び23.5%、胞胚腔の形成が見られないⅢ型の割合は4.5%、3.7%、4.2%及び0.0%、変性細胞や胞状化細胞の集合体であるⅣ型の割合は0.0%、0.0%、8.3%及び5.9%であり、サイトカラシン区ではⅣ型の割合が増加した。

受精卵の分割操作は金属刃で受精卵を上方より圧迫し分割する方法で行うのが一般的であるが、その際、一時的に透明帯内の圧力が上昇し細胞の損傷を引き起こすものと考えられる<sup>13)</sup>。そこで、プロネース区では透明帯の脆弱化により、シュークロース区では浸透圧差による細胞塊の収縮により、透明帯内の圧力上昇を防ぎ細胞の損傷を抑えている。一方、サイトカラシン区では細胞骨格形成阻害剤であるサイトカラシンB的作用により分割時の細胞の損傷が低減されることを期待した。しかし、修復培養過程の観察では分割卵の細胞同士の結合

表1 分割方法が修復培養後の分割卵の形態に及ぼす影響

前処理方法	供試卵数	修復培養後の形態				生存卵数(率)	発育卵数(率)
		I	II	III	IV		
プロネース区	22	16 (72.7%)	5 (22.7%)	1 (4.5%)	0 (0.0%)	22 (100%)	21 (95.5%)
シュークローズ区	27	18 (66.7%)	8 (29.6%)	1 (3.7%)	0 (0.0%)	27 (100%)	26 (96.3%)
サイトカラシンB区	24	14 (58.3%)	7 (29.2%)	1 (4.2%)	2 (8.3%)	22 (91.6%)	20 (83.3%)
透明帯切開区	17	12 (70.6%)	4 (23.5%)	0 (0.0%)	1 (5.9%)	16 (94.1%)	16 (94.1%)

I：内部細胞塊と栄養膜細胞が明瞭 II：変性細胞が付着  
III：胞胚腔の形成なし IV：変性細胞や胞状化細胞の集合体

表2 受精卵の品質が修復培養後の分割卵の形態に及ぼす影響

ランク	供試卵数	修復培養後の形態			
		I	II	III	IV
A	47	35(74.5%)	9(19.1%)	2(4.3%)	1(2.1%)
B	27	11(40.7%)	9(33.3%)	4(14.8%)	3(11.1%)
C	4	0	2(50.0%)	2(50.0%)	0
計	78	45(57.6%)	20(25.6%)	8(10.3%)	4(5.1%)

I：内部細胞塊と栄養膜細胞が明瞭 II：変性細胞が付着  
III：胞胚腔の形成なし IV：変性細胞や胞状化細胞の集合体

が弱く、細胞塊辺縁からの細胞の遊離が認められ、その結果、修復培養後の生存性や形態の改善につながらなかったものと考えられる。透明帯切開区では人為的に作製した透明帯の開口部から8の字形に脱出途中の栄養膜細胞を分割採取することから、移植用受精卵に対する分割捜査時の内圧上昇、金属刃への接触が少ないため、生存性が良好となったと考えられる。

受精卵に対する分割操作は、その良否によっては細胞の破壊や操作器具への細胞の付着などにより分割卵の構成細胞数を減少させるなど形態的品質の低下を招くものと考えられる。修復培養中の形態観察では分割操作による損傷の少ない受精卵は短時間に分割面が修復し球状の立体構造となり、胚盤胞では1時間以内に胞胚腔の再形成が観察されるものが多かった。一方、操作時の損傷の大きい分割卵では胞胚腔の再形成が遅く、培養後に変性した細胞の付着や遊離が観察され、形態的な品質が低下したものと思われる。

操作性の面ではシュークローズ区はプロネース区やサイトカラシン区に比べて酵素処理を行わず、受精卵をシュークローズ溶液で移し換えるだけで分割操作を行うことから、操作の簡易化の面では有効と考えられる。透明帯切開区は細胞塊を分割

する脱出途中胚盤胞の形態までの発育時間が受精卵毎にばらつきが大きく、8~32時間の前培養を行った。また、透明帯開口部からの脱出を内部細胞塊側から開始した例があり、これらの点から野外利用には検討を要するものと考えられる。

供試卵の品質ランク別に修復培養後の分割卵の形態を表2に示した。分割前にAランクの受精卵では修復培養後の形態から74.5%がI型と判定され、Bランクでは40.7%に低下した。II型の割合はAランクで19.9%、Bランクで33.3%、III型の割合はAランクで4.3%、Bランクで14.8%であった。CランクではII型及びIII型がそれぞれ50.0%であった。また、供試卵のうち5.1%が細胞の変性等により凍結及び移植に適さないIV型と判定された。本試験の分割卵の生存卵率及び発育卵率は吉羽ら<sup>7)</sup>、沼辺ら<sup>19)</sup>と同等の成績である。

一般に受精卵の品質判定は細胞塊の色調や輪郭などの形態的な分類に基づき行われる<sup>14)</sup>。牛島ら<sup>15)</sup>は受精卵の品質ランクに応じて受精卵を構成する細胞数が減少することを報告している。また、分割操作により受精卵の細胞数は8.6%<sup>16)</sup>、12~14%<sup>17)</sup>が損失することが報告されている。本試験では供試した受精卵の品質ランクに応じて、Aランクに比べてBランクやCランクでは修復培養後にI型の分割卵の割合

が少なく、Ⅱ型及びⅢ型の割合が増加する傾向であった。このことから分割操作は分割卵の細胞数の減少を招き、低ランク卵ではその影響が大きいために分割卵の形態的な品質の低下につながったものと考えられ、分割卵の生存性、発生性を向上するために品質ランクに応じた分割操作や修復培養方法の改良についてさらに検討が必要と考えられる。

分裂阻止培養が染色体検査法における性別判定に及ぼす影響を表3に示した。ビンブラスチン区では標本中の中期核板数及び分裂指数はそれぞれ $11.0 \pm 5.3$ 個及び $34.6 \pm 11.8\%$ 、コルセミド区では $2.9 \pm 2.4$ 個、 $11.2 \pm 8.9\%$ であった。また、中期核板のうち性別判定が可能であった核板数はビンブラスチン区で $2.8 \pm 1.9$ 個、コルセミド区が $1.0 \pm 1.1$ 個であり、性別判定率はそれぞれ $88.9\%$  (8/9)、 $50.0\%$  (8/15)であった。

染色体検査により性別判定が不可能であった主な理由は、標本中に中期核板が存在しなかったこと、染色体の短縮や染色体の重複などにより性染色体が特定できないことによるものであった。

染色体標本作製は紡錘糸形成を阻害する作用を持つコルセミドやビンブラスチンを含む培養液で一定時間細胞を培養した後に行った。ビンブラスチンはコルセミドに比べて染色体の短縮が少ない特性を持つことから、培養時間はコルセミド区では4時間、ビンブラスチン区では16時間に設定し試験を行った。その結果、標本中に見られる中期核板数、分裂指数、判別可能中期核板数はいずれもビンブラスチン区がコルセミド区に比べて高く、性別判定率はビンブラスチン区がコルセミド区に比べて優れており、コルセミドを用いた牛島ら<sup>4)</sup>、ビンブラスチン及びポドフィロトキシンを用いた沼辺ら<sup>19)</sup>の報告に比べて高い成績であった。これは

分裂阻止培養を長時間行ったことにより、より多くの細胞を分裂中期に停止させ、性別判定可能な中期核板像を多く得たことによるものと考えられる。このことからビンブラスチン処理による分裂阻止培養は染色体検査法における性別判定率の向上に有効と考えられる。

DNA抽出方法がPCR法における性別判定に及ぼす影響を表4に示した。煮沸法によるDNA抽出では15個中15個(100%)、凍結法によるDNA抽出では17個中16個(94.1%)の受精卵細胞塊で性別判定が可能であった。

分割操作で採取した検査用細胞の性別判定結果を表5に示した。Aランク卵では33個のうち29個が性別判定され、判定率は87.9%であり、Bランクでは18個のうち14個が性別判定され、判定率は77.8%であった。

PCR法は細胞から抽出したDNAより雄特異的DNA断片を増幅し性別判定を行うことから、細胞数の少ない検体に対しても効率的に性別判定結果を導くことが可能とされている。本試験では検査用細胞からのDNA抽出方法が性別判定率に及ぼす影響を検討した。その結果、煮沸法と凍結法では同等の性別判定率が得られた。李ら<sup>12)</sup>は本試験と同様の二重プライマーを用いて検査用細胞の細胞数の影響を検討しているが、10~15個程度の細胞を検査材料として高率に性別判定が可能であることを報告している。本試験では検査用細胞の細胞数の検討は行っていないが、通常の分割操作で採取された細胞塊については十分な判別率を得ることが可能と考えられる。

分割操作で採取した検査用細胞の性別判定率はAランクがBランクに比べて高い傾向であり、供する受精卵の品質ランクが性別判定率に影響を及ぼす結果であった。このことについて牛島ら<sup>15)</sup>は品

表3 分裂阻止培養が性別判定に及ぼす影響

分裂阻止剤	供試卵数 (a)	総核数 (b)	中期核板数 (c)	分裂指数 (%) (c/b)	判定可能核板数	性別判定			判定率 (%) (d+e/a)
						雄 (d)	雌 (e)	不明	
コルセミド	16	$25.5 \pm 10.4$	$2.9 \pm 2.4$	$11.2 \pm 8.9$	$1.0 \pm 1.1$	4	4	8	50.0
ビンブラスチン	9	$30.4 \pm 13.4$	$11.0 \pm 5.3$	$34.6 \pm 11.8$	$2.8 \pm 1.9$	4	4	1	88.9

表4 DNA抽出方法が性別判定に及ぼす影響

DNA抽出方法	供試卵数	性別判定可能卵数	判定率
煮沸法	15	15	100.0%
凍結法	17	14	94.1%

表5 PCR法による性別判定成績

供試卵品質ランク	供試卵数	性別判定		判定率
		雄	雌	
Aランク	33	17	12	87.9%
Bランク	18	7	7	77.8%

質ランクの低い受精卵に由来する検査用細胞は、PCR反応前の洗浄操作により細胞が遊離、損失し、PCR反応に供される細胞数が減少し、性別判定率の低下を招くと報告している。

本試験の性別判定結果の性比は44:56(雌:雄)であり、わずかに雄の割合が多く、吉羽ら<sup>7)</sup>、沼辺ら<sup>19)</sup>の報告と同様の成績である。

なお、性別判定不能であった例は雄特異DNA断片、雌雄共通DNA断片ともに増幅されなかった例であり、PCRチューブ内への受精卵細胞塊のサンプリングミスが原因と考えられる。

PCR法は少数細胞でも判定結果を得ることが可能なことから、移植に供する受精卵の受胎能力を低下させないことや細胞数の少ない低ランク卵を性別判定する場合などにも有効な手法と考えられる。しかし、PCR反応系に検体以外のDNAが混入した場合には誤った判定を招く危険性が指摘されており<sup>69)</sup>、器具の取り扱いや作業を行う環境には注意を払う必要があると考えられる。

本試験の実験系では受精卵の分割操作から性別判定までの所要時間は染色体検査法のピンブラスチン区では18時間程度、PCR法では6時間程度であり、PCR法では所要時間が1/3程度に短縮することができる。このため性別判定卵の新鮮卵移植は染色体検査法では供卵牛から受精卵を採取した翌日、PCR法では採取当日の夕方まで実施することが可能であり、受精卵採取から移植に至る全体の作業効率からもPCR法が優れていると考えられる。

## 謝 意

本試験の実施にあたりPCR法の御指導を頂きました東京農業大学岩崎説雄教授に深謝いたします。

## 文 献

- (1)吉羽宣明・山田均・大竹通男 1991. 牛の受精卵雌雄鑑別技術確立に関する研究. 埼玉県畜産試験場研究報告. 28:23-26.
- (2)Itagaki Y, Kimura N, Yamanaka M et al, 1995. Developmental rate differences and sex of bovine preimplantation embryos generated in vitro. J Mamm Ova Res 12:73-78.
- (3)富永敬一郎・福島護之・秦谷豊 他 1996. 過剰排卵処理した黒毛和種から得られた胚の発育ステージあるいは品質と性との関係. 日本胚移植学雑誌. 18:146-153.
- (4)牛島仁・江藤哲雄・尾川昭三 1989. 牛半切胚の染色体検査による性別判定ならびに性別判定胚の移植試験. 家畜繁殖学雑誌. 35:63-68.

- (5)砂川政広・堀沢純・黒沢功 他 1992. ウシ8日目胚の性別判定と栄養膜半切片胚の凍結保存. 第7回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会資料. 8:73-74.
- (6)渡辺伸也・高橋清也・小西秀彦 他 1992. PCR法によるウシ胚の性別判定技術の検討. 日本畜産学会報. 63:715-720.
- (7)吉羽宣明・山本信義・福島毅 1996. PCR法による牛胚性別判定技術の野外応用. 日本胚移植学雑誌. 18:139-145.
- (8)秋山清・石渡浩江・宮下泰人 他 1996. PVP溶解pFSHの1回投与法による黒毛和種経産牛の過剰排卵処理. 神奈川県畜産研究所研究報告. 86:1-5.
- (9)Herr CM, Reed KC 1991. Micromanipulation of bovine embryos for sex determination. Theriogenology. 35:45-54.
- (10)Miller JR, Koopman M 1990. Isolation and characterization of two male-specific DNA fragments from the bovine gene. Animal Genetics. 21:77-82.
- (11)Vilotte JL, Mercier JC, Gaya P et al. 1987. Complete nucleotide sequence of bovine  $\alpha$ -lactalbumin gene: comparison with its rat counterpart, Biochimie. 69:609-620.
- (12)李喜和・岩崎説雄・中原達夫 1995. 二重プライマーを用いたPCR法による牛初期胚の性別判定. J Reprod Dev. 41:j97-j101.
- (13)三宅晃次・入江達彦・森啓明 他 1984. 白金イリジウム針による牛桑実期胚の切断方法. 家畜繁殖学雑誌. 30:5, 24-30.
- (14)家畜人工授精講習会テキスト(家畜受精卵移植編) 1985. 日本家畜人工授精師協会. 167-176.
- (15)牛島仁・富樫敏明・加藤孝 他 1995. 性別判定胚の生存性に及ぼす牛胚の品質の影響. 日本胚移植学雑誌. 17:164-169.
- (16)Skrzyszowska M, and Smorag Z 1987. Effect of Splitting on cell losses and the quality of bisected embryos. Theriogenology. 27:276.
- (17)Nibart N, Sripongpun S, Cedden F, et al 1988. Histological study of bovine intact and demi-embryos. Theriogenology. 29:283.
- (18)Yoshizawa M, Matsukawa M, Yoshida Y et al 1998. Required concentration and time of vinblastine treatment for chromosome preparation in bovine blastocysts derived from in vitro fertilization. J Reprod Dev, 44:59-64.
- (19)沼辺孝・高田直和・佐藤秀俊 他 1995. 牛胚の性染色体分析法およびPCR法による性別判定. 日本胚移植学雑誌. 17:183-190.
- (20)富永敬一郎 1994. ウシ胚の性別判定と性別判定胚の凍結保存. 家畜人工授精. 164:20-33.