

染色体検査法によるウシ胚の性判定と性判定済み 凍結 2 分離胚の移植事例

富永敬一郎・福島護之・秦谷 豊

要 約

乳牛では雌牛のみを生産し、和牛では目的に合わせた性の子牛を生産するために、胚の性判定技術の確立が望まれている。そこで、古典的ではあるが的中率の高い染色体検査による胚の性判定法を検討し、さらに、一部の性が判明した凍結 2 分離胚を移植した。

- 1 Dayban (1983) の低温固定法による性判定率が非分離胚 (71.4 %, 10/14) に比べ、2 分離胚で低かった (48.3 %, 14/29)。
- 2 Iwasaki ら (1988) の漸進固定法を分離処理を施さない発育遅延胚を用いて検討した結果、細胞数は非分離胚と 2 分離胚の間であったにもかかわらず、性判定率がやや高くなった (80.0 %, 16/20)。
- 3 雌と判定した 3 個の凍結 2 分離胚を 3 頭の実胚牛へ移植した結果、2 頭が受胎し、得られた 2 頭の子牛の性は判定成績と一致した。
- 4 雄と判定した 4 個の凍結 2 分離胚を 4 頭の実胚牛へ移植した結果、2 頭が受胎し分娩した 1 頭の性は判定成績と一致したが、残り 1 頭は妊娠 40 日目に流産したため性別は不明であった。

Bovine Frozen Split Embryo Transfer After Sexing by Cytological Analysis According to Sex-chromosome Detection

Keiichiro TOMINAGA, Moriyuki FUKUSHIMA and Yutaka HATAYA

Summary

To control the birth of only female dairy cows and to control the birth of both male and female by choosing the sex of offspring according to their utilization in Japanese Black cows, techniques of sexing embryos are expected to evolve. For this study we utilized the classical embryo sexing method of chromosome examination having high justification rate. Furthermore we transferred some sexed embryos after freezing and thawing by the method of glycerol dilution in a plastic insemination straw.

- (1) The sexing rate of transferable whole embryos was higher than that of transferable split embryos (71.4 % vs 45.2 %, respectively) using the cold temperature fixation method according to Dayban (1983).
- (2) The sexing rate of retarded embryos, regardless of being less in cell number than that of transferable embryos, was somewhat high (80.0 %) using the gradient fixation method according to Iwasaki et al. (1990).
- (3) Three female frozen embryos transferred to 3 recipients resulted in 2 pregnancies. Four male frozen embryos transferred to 4 recipients resulted in 2 pregnancies. One of two pregnant recipients delivered a normal male calf, however the other calf's sex was not identified as a result of abortion 40 days post insemination. The sexes of calves were in agreement with pre-determined sexes.

キーワード：ウシ胚, 低温固定法, 漸進固定法, 染色体検査, 性判定

緒 言

乳牛では後継牛を必要とする場合に高能力の雌子牛のみを生産し、和牛では種雄牛を作る場合や肥育素牛を必

要とする場合には雄子牛、繁殖農家で後継牛を必要とする場合には雌子牛を選択的に生産する胚の性別判定技術の確立が望まれている。性判定胚移植法として、胚を切断して性判定用胚と移植用胚に分け、性別が分った胚を新鮮胚あるいは凍結胚で移植し子牛を生産する方法が一

般的である^{2, 6, 10-12, 16)}。最近, PCR法³⁾やFISH法⁷⁾等の性判定法が開発されているが, 本研究では, 古典的ではあるが的中率の高い染色体検査法を検討した。固定法として, Dayban(1983)¹⁾の低温固定法を用い, 非分離胚と分離胚との判定率を比較し, 次に, Iwasakiら(1988)^{4, 5)}の漸進固定法に変更して, 非分離の発育遅延胚を検討した。さらに, 染色体検査で性が判明した胚の一部の胚を凍結保存後移植して, 少数例ではあるが子牛を得た。

Quinacrine染色技術をご指導頂きました雪印乳業株式会社受精卵移植研究所宇高健二技師に感謝いたします。

材料及び方法

1 供試胚: 低温固定では, FSH-PG法により過剰排卵処理した黒毛和種供胚牛の子宮から人工授精後7日目に回収した後期桑実期から胚盤胞期の14個の移植可能胚を非分離胚として用い, 分離胚として, 胚を横から切断後上から切断する2段階切断分離法¹⁵⁾を用いて, ほぼ均等に胚を切断した29個を用いた。漸進固定では, 桑実期の20個の発育遅延胚を分離処理を施すことなく供試した。

2 染色体検査法

(1) 固定法

1) 低温固定: 細胞分裂を中期で停止させるために, VinblastineとPodophyllotoxin各0.04 ug/mlを含むBMOC-3液で37℃, 5%炭酸ガスの条件で, 4時間培養し, Daybanの固定法に従って低張処理と低温固定を行った。つまり, 0.9%塩化カリウム液で20分間低張処理した後, メタノール:酢酸=3:1液を用い, -20℃で5~10分間第1固定し, 次に伸展処理のために, メタノール:酢酸:水=4:3:1液を用い, 20℃で第2固定し, 最後にメタノール:酢酸=1:1液を用い, 20℃で第3固定した。この間の湿度を90%以上に設定した。

2) 漸進固定: VinblastineとPodophyllotoxinの濃度を各0.08 ug/mlに変更して, Iwasakiらの漸進固定法で染色体標本を作成した。つまり, 0.9%クエン酸ソーダ液を用い, 20℃で8分間低張処理した後, メタノール:酢酸:低張液=15:5:8液を用い, 20℃で5分間第1固定し, 次にメタノール:酢酸=3:1液を用い, 20℃で40分間第2固定して, 最後に伸展処理のために, メタノール:酢酸:水=3:3:1液を用い, 20℃で第3固定した。

(2) 染色と観察: Quinacrine染色後, B励気(励気波長B-490nm), 吸収フィルターにO-515フィルターをセットした蛍光顕微鏡(オリンパス社製)を用いて染色体

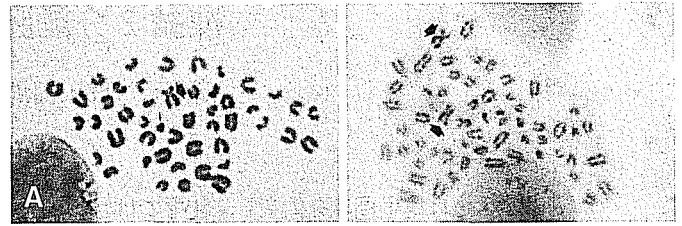


図1 細胞分裂中期の染色体像(×1000, Gimsa染色)
A: 60, XY, B: 60, XX → X染色 → Y染色体

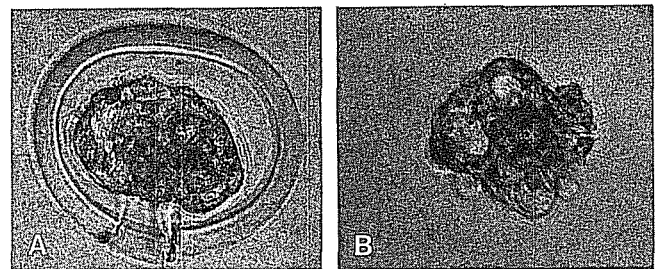


図2 移植胚と検査胚(胚番号: 67-03)
A: 凍結前の透明帯封入胚, B: 検査胚

を1000倍で観察し, さらにGimsa染色して光学顕微鏡で再観察した。

(3) 性判定: 細胞数と中期核板数を数え, 中期核板のX染色体とY染色体の有無によって性を判定した(図1)。

3 性判定胚の凍結: 2分離胚を凍結する前に, 未受精卵や変性卵の卵細胞を除いた透明帯を用い, ホールディングピペットで上から抑えることによって透明帯の切断部を開け, 切断刃で誘導し, 透明帯内に胚を封入した(図2)。現地融解が可能な移植を行うために, ストロー内2段階グリセリン希釈直接移植法¹⁵⁾を用いた。

4 移植: 28~188日の凍結保存後, 移植現場で37℃の温湯で融解し, ストローを移植器にセットして, 7頭の黒毛和種受胎牛の黄体側子宮角に胚を1個ずつ移植した。

5 統計処理: χ^2 検定法を用い, 例数の少ない場合にはYate'sの補正式を用いて統計処理した。

結 果

低温固定法による胚の染色体検査では, 性判定率が非分離胚の71.4%(10/14)に比べ, 2分離胚で低かった(48.3%, 14/29)(表1)。総細胞数は非分離胚では103.9個, 分裂中期像が6.64個に対して2分離胚ではそれぞれ26.7個, 1.83個と少なかったが, 非分離, 2分離胚とも性比は50%であった。固定法をIwasakiらの漸進固定法に変更した場合には, 発育遅延胚を供試した

表1 低温固定法を用いた染色体検査成績

検査項目	非分離胚	2分離胚
供試胚数	14	29
総細胞数	103.9 (37-228)	26.7 (3-74)
中期核板数	6.64 (0-19)	1.83 (0-9)
細胞分裂指数	6.4	6.8
判定可能胚数	10	14
雄	5	7
雌	5	7
判定率	71.4	48.3

表3 染色体検査による性判定胚の移植成績

供胚牛 胚番号	採胚凍結 月 日	性	保存 期間	結果	備 考
59-06	90 1 25	♀	130	不妊	
56-20	90 1 30	♂	28	不妊	
67-09	90 5 2	♀	33	分娩	妊娠期間 285 日 ♀ 22.0 kg
50-28	90 8 30	♂	49	妊娠	流産 40 日齡
50-24	90 8 30	♂	188	不妊	
18-01	90 10 19	♀	84	妊娠	母牛死亡 8 カ月齡胎児 ♀
67-03	90 10 26	♂	131	分娩	妊娠期間 306 日 ♂ 28.5 kg

表2 漸進固定法を用いた染色体検査成績

検査項目	発育遅延胚(非分離)
供試胚数	20
総細胞数	57.7(21-131)
中期核板数	5.20(1-11)
細胞分裂指数	9.0
判定可能胚数	16
雄	10
雌	6
判定率(%)	80.0

ため細胞数が少ないにもかかわらず(57.7個), 性判定率が高かった(80.0%, 16/20)(表2). 移植成績では, 雌と判定された3個の凍結2分離胚を3頭の受胚牛へ移植した結果, 2頭が受胎し, 得られた2頭の子牛の性は判定成績と一致した. また, 雄と判定した4個の凍結2分離胚を4頭の受胚牛へ移植した結果, 2頭が受胎し分娩した1頭の性は判定成績と一致したが, 残り1頭は妊娠40日目に流産したため性別は不明であった(表3).

考 察

胚の性判定成績に影響を与える要因には, 胚の細胞数¹⁷⁾, 栄養膜細胞及び内部細胞塊という胚の構成部位¹²⁾, 細胞分裂中期停止薬剤^{4, 5, 17, 18)} や染色体標本の固定法^{1, 4, 5, 13)} があり, 多くの研究者によって種々の検討が行われている. 胚の細胞数が多いと判定率が高くなり¹⁷⁾, 細胞の中でも内部細胞塊が多いと, 中期核板数が多い¹²⁾ ことも示されている. また, 分裂中期停止物質としてコルヒチンあるいは corcemid^{2, 14, 16)} や vinblastine と podophyllotoxin との混合^{4, 5, 6, 9)} あるいは vinblastine 単独^{17, 18)} が用いられているが, コルヒチン及び corcemid では処理時間が長くなると染色体の収縮が強くなり, 性別の判定が難しいと言われており, 分裂中期像を多く得るための長時間処理では, vinblastine が有効とされている¹⁷⁾. さらに, ソルコセリンの培養液への添加¹⁰⁾ や短時間培養後の薬剤処理¹⁷⁾ 等によって胚の細胞分裂活性の回復

を図る方法も検討されている. これらの要因の中で, 本研究では細胞数及び中期核板数が胚の判定率へ影響したと思われる. また, 固定法としては Tarkowski の方法¹⁹⁾ が基本であるが, 最近では, 美甘らの漸進固定法^{6, 9)} やその改良法^{4, 5, 10)} が多く用いられている. 美甘らの方法も検討したが, 第2固定中に胚を紛失することが多かったため, 本研究では低温固定によって胚の紛失を防ぐ Dayban の方法を検討した. 分離しない胚と分離した胚の成績を比較した結果, 非分離胚では14個の内, 10個で性別が判定され, 判定率が71.4%であった. 一方, 分離胚では29個の胚の内, 14個で性別が判定され, 判定率が48.3%と低かった. これは総細胞数が非分離胚では103.9個, 中期核板数が6.64個に対して, 2分離胚では26.7個, 1.83個と少なかったためである. しかし, 性比についてはどちらも50%と偏りはなく, 細胞分裂速度や切断による損傷と性の依存性との関係はみられなかった. また, 2分離胚の細胞数が1/2より少なくなったのは, 切断による胚の障害部分が標本作成過程で脱落したためと思われ, 切断による細胞傷害の大きさを示唆している. Dayban の方法は低温で固定し, 室温に温度を上昇させたとき, 酢酸アルコールで胚をマイルドに固定する方法である. この方法を用いて, 非分離胚では実用的には十分とは言えないが, 71.4%の判定率が得られた. しかし, 切断処理をした2分離胚では, 細胞が少ないため, 性判定率が低く, 改良が必要であると思われた.

漸進固定法を用い, 非分離の発育遅延胚について検討した結果, 細胞数が57.7個と少なくなったにもかかわらず, 20個の内16個で性別が判定でき, 性別判定率が80.0%と高くなった. Vinblastine 濃度を高くしたため, 細胞分裂指数が向上したことも判定率を高めた要因と考えられる. Iwasaki らの方法は酢酸アルコールに低張液を混ぜることによって急激な酢酸の固定を防ぐ方法であり, 操作が容易であったことも判定率を高めた原因であると考えられる. 美甘らの漸進固定法の変法である

Iwasakiらの方法は、細胞数が少なく、分裂活性も低い発育遅延胚を用いた場合でも、判定率を改善したため、2分離胚に応用すれば、性判定率を向上できる可能性が示唆された。

凍結融解後に2分離胚から凍結保護物質として添加したグリセリンを希釈、除去するために、胚の入った1.4Mグリセリン液層と0.6M sucrose液層とをストロー内で混合した。この第1希釈で、分離胚が透明帯の切り口から脱出することが多かったため、ストローを5分間温湯中で垂直に保持し、胚を含む混合液層とBMOC-3液層とを混合して第2希釈を行い、次の温湯中でのストローの保持を、非分離胚と異なり、水平にした。第2希釈後に、2分離胚を綿栓まで落さないことによって、2分離胚が綿栓に接着することがなくなり、従来のストロー内グリセリン希釈が可能になったが、透明帯から脱出した2分離胚の確認には経験が必要であると思われる。

移植成績では、3個の雌の凍結2分離胚を3頭の受胎牛へ移植し、2頭が受胎し、得られた2頭の子牛の性は判定成績と一致した。また、4個の雄の凍結2分離胚を4頭の受胎牛へ移植し、2頭が受胎し、分娩した1頭の子牛の性は判定成績と一致したが、残り1頭は妊娠40日目に流産したため性別は不明であった。このように、性判定した凍結2分離胚移植においても50%以上の受胎率が得られ、著者らが報告した凍結2分離胚の受胎率¹⁴⁾と差がなかった。

今後、性判定率をさらに向上し、融解後、胚の希釈操作を必要としない2分離胚の凍結、移植技術が確立されれば、性判定胚移植による性判明子牛生産技術は野外でも実用的な技術になると思われる。

引用文献

- (1) Dayban, A. P. (1983) : An improved method for chromosome preparations from preimplantation mammalian embryos, oocytes or isolated blastomere : *Stain Technology* 58(2), 69-72
- (2) Herr, W. C., D. Mitchell, K. J. Betteridge, M. D. Eaglesome, and G. C. B. Randll (1976) : Sexing two-week old bovine embryos by chromosomal analysis prior to surgical transfer : preliminary methods and results : *Theriogenology* 5(5), 243-253
- (3) Herr, C. M. and K. C. Reed : (1990) Micromanipulation of bovine embryos for sex determination : *Theriogenology* 35(1), 45-54
- (4) Iwasaki, S. and Y. Shioya, H. Masuda, A. Hanada and T. Nakahara (1988) : Chromosome preparation from 2-cell bovine embryos derived from follicular oocytes fertilized in vitro : *Jpn. J. Anim. Reprod* 34, 79-83
- (5) Iwasaki, S. and Y. Shioya, H. Masuda, A. Hanada and T. Nakahara (1988) : Sex ratio of early embryos fertilized in vitro with spermatozoa separated by percoll : *Theriogenology* 30(6), 1191-1198
- (6) Kamiguchi, Y., and K. Mikamo (1986) : An improved, efficient method for analysing human sperm chromosomes using zona-free hamster ova : *Am. J. Hum. Genet* 38, 724-740
- (7) 川倉一彦(1994) : 畜産における新技術(3) In situ ハイブリダイゼーションとその利用 : 畜産の研究 48(3), 423-427
- (8) King, W. A. (1984) : Sexing embryos by cytological methods : *Theriogenology* 21(1), 7-17
- (9) 美甘和哉(1987) : 哺乳類卵子および未着床胚の染色体観察と分析 : 臨床産婦人科 31, 1137
- (10) 沼辺 孝・大久範幸・高田直和・石川勇志・堀内俊孝(1994) : 牛胚の染色体分析による性判別 : 胚移植会誌 1(1), 59-62
- (11) Picard, L., W. A. King and K. J. Betteridge (1985) : Production of sexed calves from frozenthawed embryos : *Vet. Rec.* 117, 603-608
- (12) 砂川政広(1994) : 染色体分析による牛胚の性判別 : 胚移植会誌 1(1), 55-58
- (13) Tarkowski, A. (1966) : An air-drying method for chromosome preparations from mouse eggs : *Cytogenetics* 5, 401-410
- (14) 富永敬一郎・福島護之(1985) : 33%子牛血清添加リンゲル氏液を用いて凍結された牛胚のストロー内グリセリン希釈、直接移植法 : 家畜繁殖学会誌 31, 69
- (15) 富永敬一郎・福島護之・秦谷 豊(1991) : 牛分断胚の凍結 : 家畜繁殖研究会誌 13(1), 65-75
- (16) 牛島 仁・柏崎直巳・江藤哲雄・早川俊司・石田和昭・水野仁二・尾川昭三(1986) : 牛一卵性二分離胚を用いた胚の性予知 : 千葉畜産研報 10, 13-18
- (17) 牛島 仁・B. Tappa・秋山 清・江藤哲雄・尾川昭三(1994) : 牛半切胚の性判別におけるピンブラスチン処理の至適条件 : 胚移植会誌 1(1), 25-29
- (18) Yoshizawa, M., M. Takada, M. Nakamoto, T. Muramatsu and O. Okamoto (1992) : Adequate concentration and duration of vinblastine treatment for chromosome preparation in mouse embryos : 日畜会報 62, 511-518