

## ウシ体外受精胚の発育速度と性比率の関係

誌名	愛知県農業総合試験場研究報告 = Research bulletin of the Aichi-ken Agricultural Research Center
ISSN	03887995
著者	小林, 章二 武井, 真理 中前, 均
巻/号	29号
掲載ページ	p. 247-251
発行年月	1997年10月

## ウシ体外受精胚の発育速度と性比率の関係

小林章二\*・武井真理\*・中前 均\*

摘要：ウシの体外受精において胚盤胞に発育するまでの日数別に、7日目 (Day7)、8日目 (Day8) 及び9日目 (Day9) に分類した胚をPCRによって性別別し、胚の発育速度と性比率の関連を調べた。9回の反復実験に合計92個の胚を供したが、各日数別の雄の占める率は、Day7が65% (28/43)、Day 8が48% (19/40)、Day9が44% (4/9) であった。また、Day7あるいはDay8のみの成績しかない3回を除いた6回の反復実験においてDay7とDay8, 9の性比率の比較では、雄比率がDay7で61% (23/38)、Day8, 9で44% (14/32) であった。さらに、6回の反復実験のそれぞれにおいてDay7とDay8, 9の性比率をみても、5回の実験でDay7の方がDay8, 9よりも雄の占める割合が高い傾向を示した。統計的に有意な差はみられなかった ( $P=0.08$ ) が、総合的には発育の速い胚に雄が多く含まれる傾向が示された。

キーワード：ウシ胚、体外受精、PCR、発育速度、性比率

## Interrelation between Developmental Velocity and Sex in Bovine In Vitro Fertilized Embryos

Shoji KOBAYASHI, Mari TAKEI and Hitoshi NAKAMAE

Abstract: Sex determination via the polymerase chain reaction (PCR) was performed using bovine in vitro-fertilized embryos.

The blastocyst-stage embryos that were collected at days7, 8, and 9 of culture were divided into three groups to compare the embryonic development with their sex. The percentages of males on days7, 8, and 9 were 65% (28/43), 48% (19/40), and 44% (4/9) respectively ( $P=0.08$ ). In six of the 9 replicates of in vitro-fertilization, which included the blastocyst-stage embryos on both day7 and 8, or all of day7, 8 and 9, the percentages of males on day7, or day8 and 9 were 61% (23/38) and 44% (14/32) respectively. Five experiments of the 6 replicates showed that male embryos at day7 occupied higher percentages than those of day8 and 9 respectively.

These results indicate totally that male embryos develop faster than female embryos.

Key words: Bovine embryos, In vitro-fertilization, Polymerase chain reaction, Developmental velocity, Sex ratio

## 緒 言

家畜胚の移植及び保存技術が向上するにつれて、胚の性別判別技術の開発による雌雄産み分けの研究に目が向けられるようになってきた。はじめは、胚の細胞の分裂期 (M-phase) にXY染色体を核型同定 (Karyotyping) することで性別判別を行っていたが<sup>2, 3, 4, 18)</sup>、最近ではPCRによって性別関連遺伝子を検索する方法でヒト<sup>10)</sup>や種々の動物<sup>11, 15)</sup>の性別判別が試みられている。家畜の中で最も盛んに研究されているのがウシで、胚またはその栄養芽細胞層の一部を試料として、ZFY/ZFX<sup>1, 7, 14)</sup>、SRV<sup>12)</sup>、あるいはBOV97M<sup>16, 17)</sup>などの性別関連遺伝子領域をPCRで検索して性別判別を行い、判定の確実性も高まってきた。また、PCRに供するためにバイオプシーした胚の生存性や個体発生への影響の研究<sup>9)</sup>も行われている。

一方では、早期胚の発育に性別差が認められるか否かの研究<sup>8, 11, 13)</sup>も行われている。生体から採取したウシ胚のXY染色体の核型同定による性別と胚発育との関連では、発育の速い胚ほど雄の比率が有意に高くなるという報告<sup>2, 3)</sup>や、有意差はないが傾向があるという報告<sup>18)</sup>がある。また、生体由来胚で性別と胚発育に関連性があると報告したAveryらは、体外受精 (IVF) 由来のウシ胚でも発育の速い胚ほど雄比率が高いことをXY染色体の核型同定によって確認した<sup>4)</sup>。最近では、PCRによる性別判別がよく使われており、モルモット<sup>13)</sup>やブタ<sup>11)</sup>の生体由来胚では胚発育と性別に関連性はなかったという報告があるが、ウシのIVF由来胚では関連性があるという報告<sup>5, 6)</sup>もある。

今回、この関連性を確かめるため、ウシIVF胚を試料としてPCRによる性別判別を行い、胚の発育と性別の関係調べたので概要を報告する。

## 材料及び方法

### 1 体外受精胚の作成

#### (1) 卵子の収集と培養

と畜場で、黒毛和種及びホルスタイン種と黒毛和種の交雑種の卵巣をと殺後20分以内に採取し、30°Cのリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に保存して2時間以内に実験室に持ち帰り、カミソリ刃によるスライシングで卵子を収集した。成熟培養には、25mM Hepes buffered M199 (SIGMA) に2.5mM ピルビン酸ナトリウム、1.0mM L-グルタミン、60IU/ml ペニシリンG、60µg/ml 硫酸ストレプトマイシン及び10% ウシ胎児血清 (FCS: GIBCO) を加えた培養液を用い、5% CO<sub>2</sub>-15% O<sub>2</sub>-80% N<sub>2</sub> 気相、38.5°C のインキュベーターで20時間培養を行った。

#### (2) 媒精と発生培養

媒精は、2種類の黒毛和種の精液を使い、IVF-TALP (Tyrode's液に炭酸水素ナトリウム、ピルビン酸ナトリウム、乳酸ナトリウム及びウシ血清アルブミン (BSA: SIGMA) を加えて修正した溶液) の100µl ドロップ内に成熟卵子20個とウシ卵管上皮細胞を入れ、スィムアップ法により得た凍結融解精子を1~2X10<sup>6</sup>個/ml加えて5% CO<sub>2</sub>-

15% O<sub>2</sub>-80% N<sub>2</sub> 気相、38.5°C のインキュベーターで12~14時間培養を行った。その後、卵子をHepes-TALP (10mM Hepes加修正Tyrode's液) で洗浄し、発生培地に移して媒精と同じ条件のインキュベーターで培養した。発生培養には、M199 (SIGMA) に5.0mM ピルビン酸ナトリウム、0.5mM L-グルタミン、60IU/ml ペニシリンG、60µg/ml 硫酸ストレプトマイシン、3.5mg/ml BSA及び10% FCSを加えた培養液を用いた。予め、50µl の発生培地にウシ卵管上皮細胞をコンフルエント状態に培養しておき、卵子を移す2時間前に培地交換した。発生培養中は、3日目毎に培地交換を行った。培養期間は媒精後 (PI) 9日目までとし、7日目以降胚盤胞 (BL) に発育した胚を性別判別試験に使用した。

#### (3) 供試胚の分類

供試胚の発育ステージはすべてBLとし、媒精開始時間を0として、培養168~<192時間でBLに発育した胚を7日目胚 (7-dPI)、192~<216時間を8日目 (8-dPI)、216~<240時間を9日目胚 (9-dPI) として分類した。供試胚は0.5% アクチナーゼ (科研製薬) により透明帯を除去した後、10µl のオートクレーブしたMiliQ水と一緒に0.5mLのPCRチューブに入れて-80°Cで保存した。

## 2 PCRによる性別判別

性別判別のためのPCRは市販のウシ胚性別判別キット (XYセレクター: 伊藤ハム) を使用した。プライマーはキットに含まれているため塩基配列が不明であるが、電気泳動においては、290bp付近にY染色体特異性バンドが、また、100bp付近にXY共通バンドが見られる。試料の処理、PCR方法及び電気泳動はキット添付資料の指示に従って行った。

まず、保存試料を融解後、スピンドウンしてチューブの底に沈めてから、97°Cに保持したPCRサーマルサイクラー (TaKaRa) で2分間熱変性処理を行った。その後、1検体につき添付の反応液 (PCRバッファーとプライマー) を9.9µl加え、更に、酵素液 (DNAポリメラーゼ) を0.1µl加えた後、ミネラルオイル (SIGMA) 1滴を加えてスピンドウンし、サーマルサイクラーでDNA増幅を行った。PCRプログラムは、95°Cで1分間保持した後、97°C5秒-50°C5秒-72°C5秒を44サイクル繰り返すように設定した。PCR産物は1検体につき10µl採取し、3µlの色素液 (25%グリセロール、0.05%ブロムフェノールブルー、0.05%キシレンシアノール) と混合して8%ポリアクリルアミドゲルにアプライし、ミニゲル電気泳動槽 (Mupid: ADVANCE) にTBE液 (0.0445M Tris-borate+0.001M EDTA) を緩衝液として満たして泳動した。

## 3 統計処理

性別判別結果は $\chi^2$ 検定で分析し、 $P \leq 0.05$ を有意な差として性別と胚の発育速度との関連を調べた。

## 試 験 結 果

ウシ卵子の体外受精によって得られた合計92個のBLを

第1表 9回の反復実験におけるBL到達日齢と性比率の関係

Days Stage	Exp. 1		Exp. 2		Exp. 3		Exp. 4		Exp. 5		Exp. 6		Exp. 7		Exp. 8		Exp. 9		Total(Ratio)	
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M (%)	F(%)
7 BL	8	7	5	0	1	2	3	1	4	2	2	3	5	0	-	-	-	-	28(65)	15(35)
8 BL	3	5	4	2	2	0	1	2	0	1	0	3	-	-	6	5	3	3	19(48)	21(53)
9 BL	-	-	1	2	2	3	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4(44)	5(56)
Total	11	12	10	4	5	5	5	3	4	3	2	6	5	0	6	5	3	3	51(55)	41(45)
Ratio(M)	48		71		50		63		57		25		100		55		50			

注) BL;胚盤胞、Exp.;実験、M;雄、F;雌、Ratio;性比、Ratio(M);雄比率

供試し、9回実験を反復してPCRによる性判別を行い、その結果の一覧を第1表に示した。胚の発育日齢別のBLの割合は、7-dPIが47% (43/92)、8-dPIが43% (40/92)、そして9-dPIが10% (9/92)であった。また、これらの胚を熱変性処理し、Y染色体特異性DNA及びXY共通DNAをPCRによって増幅し、電気泳動を行った結果の一部を第1図に示した。第1図-Aに示すように、雄の判定基準となるY染色体特異性DNAバンドは290bp付近にみられ、また、XY共通のDNAバンドは100bp付近にそれぞれ現れている。第1図-Bは7-dPIのBLの結果の一部を示しており、また、第1図-Cは8-dPIのBLの結果の一部を示している。

第1表にみられるように、9回の反復実験における92個のBL全体の雌雄割合は、雄が55%、雌が45%とやや雄の比率が高い結果となった。各日齢別の雄割合を総合的にみると、7-dPIが65% (28/43)、8-dPIが48% (19/40)、9-dPIが44% (4/9)となり、初めに高い比率を占めた雄の割合が、発育速度が遅くなるに従って低くなる傾向がみられた (P=0.08)。しかし、この9回の反復実験の中には、Exp. 7のように7-dPIのみ、あるいはExp. 8、9のように8-dPIのみの成績しかないグループも含まれている。この3回については各実験それぞれの中での発育速度と性比の比較ができない。そこで、第2表ではこの3回の実験を除いた6回の実験について集計整理した。

第2表は7-dPIと8、9-dPIの比較として表示したが、合計6回の反復実験に使用した70個のBLの性比の内訳は、雄が53% (37/70)、雌が47% (33/70)であり、第1表で示した9回の反復実験の合計の雌雄割合よりもわずかながら半々に近づいている。胚の日齢と性比の比較でみると、7-dPIの雄比率が61% (23/38)と雄に偏りを示したのに対して、8、9-dPIは雄比率が44% (14/32)と逆に雌に偏りを示した。個々の実験における性比では、Exp. 2のように全体の71%が雄に偏ったグループやExp. 6のように全体の75%が雌に偏ったグループなど若干のバラツ

キがみられたが、日齢と性比の比較ではExp. 3以外の5回の実験はすべて7-dPIの方が8-dPIよりも雄の出現率が高い傾向を示した。

今回の実験に供したBLの生産率、つまり、BL/卵巣の比率を算出すると、9回の体外受精におけるBL生産率は、 $0.95 \pm 0.21$  (±SD)であり、これはAVERYら (1992)<sup>5)</sup>が胚の性比判別を行ったときのBL生産率0.84に近い結果であった。

## 考 察

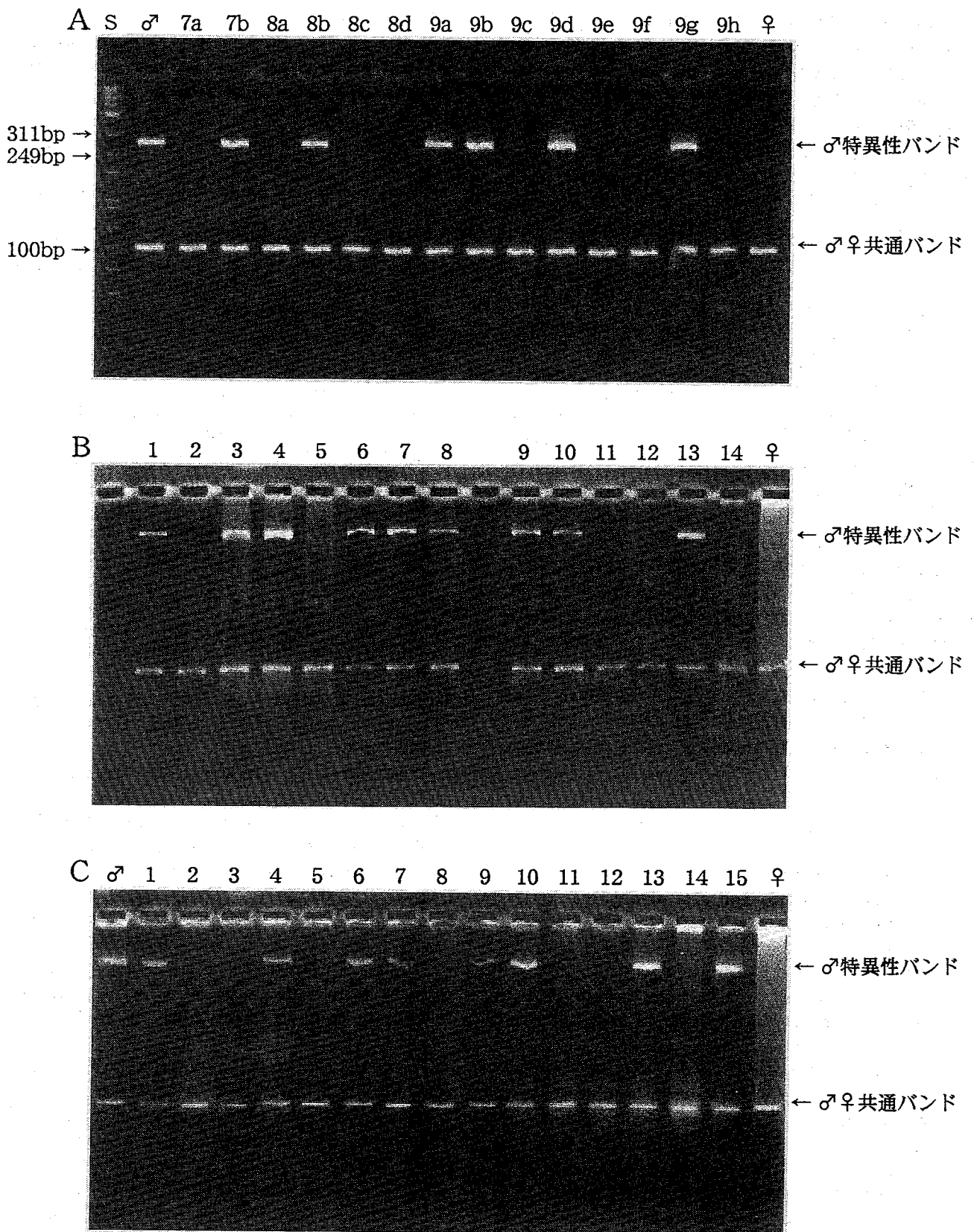
この試験は、体外受精において観察されるウシ胚の発育速度の差が、性の違いに関連するか否かを見極めるために実施した。Xuら<sup>18)</sup>は8-dPIの早期胚盤胞から脱出胚盤胞までの発育ステージの中で、有意差ではないが発育の進んだ胚に雄が多くなることを示し、更に、胚の細胞数の分析から平均細胞数169以上の胚で雄割合が有意に高くなったことを報告している。今回の結果を総合的にみると、BL到達日齢別の雄の占める割合は7-dPIが65%、8-dPIが48%、そして9-dPIが44%となっており、有意差はないものの (P=0.08)、BL到達日齢が高くなるに従って雄割合が減少する傾向がみられた。これはXUら<sup>18)</sup>の傾向と同様であり、また、Averyら<sup>5)</sup>のPCRによる成績 (7-dPI=60%、8-dPI=40%、9、10-dPI=33% : P=0.043)にも一致した結果となった。更に、今回の反復実験の各々の結果をみると、日齢比較可能な6実験 (第2表)のうち5回までが、7-dPIのBLの方が8、9-dPIのBLよりも雄割合が高い傾向を示している。総合的にみると今回の結果は、Averyら<sup>4、5)</sup>が言うように、雄胚の方が雌胚よりも成長が速いということを表している。

一方で、個々の反復実験の中には、Exp. 2のように全体的に雄に偏った成績 (♂=71%)やExp. 6のように逆に雌に偏った成績 (♀=75%)が含まれている。こうし

第2表 6回の反復実験におけるBL到達日齢と性比率の関係

Days Stage	Exp. 1		Exp. 2		Exp. 3		Exp. 4		Exp. 5		Exp. 6		Total(Ratio)	
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M (%)	F(%)
7 BL	8	7	5	0	1	2	3	1	4	2	2	3	23(61)	15(40)
8 BL	3	5	5	4	4	3	2	2	0	1	0	3	14(44)	18(56)
Total	11	12	10	4	5	5	5	3	4	3	2	6	37(53)	33(47)
Ratio(M)	48		71		50		63		57		25			

注) BL;胚盤胞、Exp.;実験、M;雄、F;雌、Ratio;性比、Ratio(M);雄比率



第1図 PCR産物の電気泳動結果

Aは7, 8, 9-dPIの成績の一部であり、Bは7-dPI、Cは8-dPIの成績の一部をそれぞれ示している。Y染色体特異性DNAバンドは290dp付近に、また、XY染色体共通DNAバンドは100bp付近に現れている。

S：サイズマーカー、♂：雄コントロール、♀：雌コントロール

た偏りは、1種類の精液で体外受精したAvery<sup>8)</sup>らの結果にも現れている。また、今回供試したBLは、BL生産率からみても、異なったウシ由来である可能性が高いと思われる。これらを考え合わせると、一部の実験結果に全体的な偏りが現れた原因は、卵子を提供した卵巣側の個体差による可能性が高いと思われる。

現在、商業ベースで行われているウシの胚移植には、ほとんどが生体由来の新鮮胚もしくは凍結保存胚が使われている。そして、胚の付加価値を高めるために、胚の一部をバイオプシーしてPCRによる性判別を行い、移植する例も少なくない。しかしながら、採取したすべての胚をバイオプシーし、PCRによる性判別を行って選択的移植をするには、コスト的にも無理があり、限られた優良種牛にのみ利用されるに過ぎないと思われる。今後は体外受精胚の活用が商業的に増えてくることが想定される。体外受精胚のスクリーニングとして今回の結果を応用し、胚を发育速度別に分け、例えば、发育の遅いグループのみPCRによって性判別すれば、より効率的に雌の選択が可能となる。

他方、今回の供試BLは1卵巣から平均1~2個作出されたものであるが、培養条件によっては3~4個/卵巣も可能と思われる。また、発生培地成分のグルコースの有無は性比に影響しなかったという報告<sup>9)</sup>もあるが、培地成分の変化によって发育と性比の関係が変わってくる可能性が全くないとは言いきれない。こうした条件変化においても今回と同様の結果が得られるか否かは今後の研究を待たなければならない。しかしながら、これまで一般的に行われている条件下では、成長の早いウシ胚には雄が多く含まれ、遅い胚には雌が多く含まれる傾向が示された。

## 引用文献

1. Aasen, E., Medrano, J. F. Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. *Biotechnology*. 8, 127-129 (1990)
2. Avery, B. Impact of asynchronous ovulations on the expression of sex-dependent growth rate in bovine preimplantation embryos. *J. Reprod. Fert.* 87, 627-631 (1989)
3. Avery, B., Schmidt, M., Greve, T. Sex determination of bovine embryos based on embryonic cleavage rates. *Acta vet. scand.* 30, 147-153 (1989)
4. Avery, B., Madison, V., Greve, T. Sex and development in bovine in-vitro fertilized embryos. *Theriogenology*. 35, 953-963 (1991)
5. Avery, B., Jorgensen, C. B., Madison, V., Greve, T. Morphological development and sex of bovine in vitro-fertilized embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 32, 265-270 (1992)
6. Behboodi, E., Gutierrez-Adan, A., Anderson, G. B. Inadvertent sex selection in a protocol of in vitro bovine embryo production. *Theriogenology*. 47, 265 (1997)
7. Bredbacka, P., Peippo, J. Sex diagnosis of ovine and bovine embryos by enzymatic amplification and digestion of DNA from the ZFY/ZFX locus. *Agric. sci. Finl.* 1, 233-238 (1992)
8. Bredbacka, K., Bredbacka, P. Glucose controls sex-related growth rate differences of bovine embryos produced in vitro. *J. Reprod. Fert.* 106, 169-172 (1996)
9. Carbonneau, G., Morin, N., Durocher, J., Bousquet, D. Viability of bovine IVF embryos biopsied with microsection or microaspiration technique for sexing. *Theriogenology*. 47, 226 (1997)
9. Hochiman, D., Zaron, Y., Dekel, I., Feldmesser, E., Medrano, J. F., Shani, M., Ron, M. Multiple genotype analysis and sexing of IVF bovine embryos. *Theriogenology*. 46, 1063-1075 (1996)
10. 陰山総一, 森安 悟, 田畑利幸, 千国幸一. 家畜の性決定遺伝子(SRY)保存領域のPCR法による増幅と塩基配列の種差. *日畜会報*. 63, 1059-1065 (1992)
11. Kaminski, M. A., Ford, S. P., Youngs, C. R., Conley, A. J. Lack of effect of sex on pig embryonic development in vivo. *J. Reprod. Fert.* 106, 107-110 (1996)
12. Kato, Y., Sato, S., Cui, X., Itagaki, Y., Sutou, S. Cloning and characterization of bovine Sry gene. *Anim. Sci. Technol. (Jpn.)* 66, 994-1001 (1995)
13. Peaker, M., Taylor, E. Sex ratio and litter size in the guinea-pig. *J. Reprod. Fert.* 108, 63-67 (1996)
14. Pollevick, G. D., Giambiagi, S., Mancardi, S., De Luca, L., Burone, O., Frasc, A. C. C., Ugalde, R. A. Sex determination of bovine embryos by restriction fragment polymorphisms of PCR amplified ZFX/ZFY loci. *Bio/Technology*. 10, 805-807 (1993)
15. Pomp, D., Good, B. A., Geisert, R. D., Corbin, C. J., Conley, A. J. Sex identification in mammals with polymerase chain reaction and its use to examine sex effects on diameter of day-10 or-11 pig embryos. *J. Anim. Sci.* 73, 1408-1415 (1995)
16. Watanabe, S., Awata, T., Takahashi, H., Masuda, H., Yasue, H. Detection of male-specific DNA sequence in bovine lymphocytes using polymerase chain reaction. *Anim. Sci. Technol.* 62, 1149-1152 (1991)
17. 渡辺伸也, 高橋清也, 小西秀彦, 今井 裕, 栗田 崇, 高橋秀彰, 舩田博司, 安江 博. PCR法によるウシ胚の性判定技術の検討. *日畜会報*. 63, 715-720 (1992)
18. Xu, K. P., Yadav, B. R., King, W. A., Betteridge, K. J. Sex-related differences in developmental rates of bovine embryos produced and cultured in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 31, 249-252 (1992)