

# ウシ多生子における血液キメラのDNA解析

福成和博・吉川恵郷・児玉英樹・鈴木暁之\*

## 摘 要

自然または人為的に作出したウシ多生子（双子～四つ子，計38組）について，動物遺伝研究所が開発したマイクロサテライトDNA（MSDNA）マーカーを用い，血液キメラの解析および個体識別を試みた．さらに，異性双子雌のフリーマーチン発生防止技術の確立を目的とし，異なる双子生産方法における血液キメラの発生率を調べた．その結果，解析サンプルとして白血球および尾房の外根鞘細胞を用い，血液キメラの解析および産子間の個体識別が可能であることを確認した．異なる双子生産方法における血液キメラの発生率は，人工授精および過剰排卵処理後の未回収胚による作出法では91.7%（22/24組）であったが，両側2胚移植および追い移植法では50.0%（6/12組）と有意（ $p<0.01$ ）に低下した．

キーワード：ウシ，胚移植，双子生産，フリーマーチン

## 緒 言

ウシの胚移植技術を活用した双子生産は，2胚移植と追い移植の方法がある．ウシの双子以上の多胎妊娠では，絨毛膜血管の吻合による血液交流のため胎子に血液キメラを生じることが多く，異性多胎では性染色体キメラ<sup>5)6)</sup>が高率に発生し，異性双子雌のフリーマーチン<sup>5)</sup>が問題となっている．

また，キメラ個体の血液には相互のDNAが混在するため，血液材料のみで多胎子間の個体を識別できず，DNA判定により牛肉の産地や生産履歴を追跡することができない問題が生じる．

血液キメラは二卵性双子産子の分子生物学的検索の報告<sup>9)</sup>および多生子で染色体分析を実施した報告<sup>6)</sup>が見られるが，多生子の分子生物学的検索を実施した報告は少ない．

今回，自然多胎または人為的に作出した多生子を材料として（社）畜産技術協会附属動物遺伝研究所（以下，動物遺伝研究所と略す）が開発選定した個体識別用マイクロサテライトDNAマーカー（以下，MSDNAマーカーと略す）<sup>1)</sup>によるPCR-電気泳動法を用いてウシ多生子の血液キメラの解析と個体識別を試みた．また，双子生産方法の違いによる血液キメラ発生防止技術に関する報告はみられないことから，手法別の血液キメラ発生率を調査し，発生防止技術について検討したのでその概要を報告する．

## 材料および方法

1992年から2005年にかけて38組の多生子産子の血液，尾房の外根鞘細胞を採材し，ゲノムDNAを調整して試料とした．

### 1 血液キメラの解析と個体識別

#### (1) ゲノムDNAの調整

血液および体毛根部の各試料は生後1ヶ月齢以上のウシから採材し，尾房の外根鞘細胞が付着した20本以上を用いた．ゲノムDNAはヘパリン全血および毛根細胞から，EASY-DNA Kit（Invitrogen™）により抽出した．

#### (2) プライマーとポリメラーゼ連鎖反応（PCR）

プライマーは動物遺伝研究所が開発した常染色体上のFAM（水色），TET（緑色），HEX（黄色）の蛍光色素でラベルされた23種類のMSDNAマーカー<sup>1)</sup>を用いた（表1）．PCRは鋳型DNAを20ng，Primerを各1.6pmol，10×PCR Bufferを1.5μl，Ampli Taq Gold（タカラ）を0.375unit加え，合計15μlになるよう反応液を調整し，94℃で4分間の加熱後，94℃30秒，55℃（または60℃）30秒，72℃30秒のサイクルを30回繰り返し，72℃5分間加熱するプログラムで増幅した．

#### (3) ゲノムDNAの解析

PCR終了後，PCRの温度条件により区別されている2

\* 現岩手県農林水産部畜産課

表1. 23種類のマイクロサテライトマーカー (MSDNAマーカー)

マーカー名	色素	BTA	PCR産物サイズ	アリル数	ヘテロ率
(Group 1)					
DIK023	6-FAM	11	86-109	10	0.83
DIK069	6-FAM	3	142-164	12	0.68
DIK010	6-FAM	24	185-201	9	0.68
DIK024	6-FAM	1	229-251	9	0.78
DIK089	HEX	4	82- 98	7	0.65
DIK102	HEX	15	123-163	12	0.68
DIK097	HEX	12	192-212	10	0.90
DIK020	HEX	10	230-254	9	0.70
DIK106	TET	8	95-123	5	0.70
DIK068	TET	28	145-165	9	0.88
DIK039	TET	19	194-220	5	0.60
DIK096	TET	9	246-256	5	0.83
(Group 2)					
BM6026	6-FAM	5	158-172	6	0.38
ETH185	6-FAM	17	224-246	9	0.39
ILSTS6	6-FAM	7	283-297	8	0.58
RM041	HEX	2	78- 94	6	0.47
BM5004	HEX	20	118-146	9	0.67
CYP21	HEX	23	190-220	11	0.61
BM4505	HEX	26	225-251	12	0.69
INRAI130	TET	22	100-116	7	0.40
BM103	TET	21	147-157	6	0.48
ILSTS93	TET	6	174-198	6	0.39
DIK093	TET	13	224-244	6	0.35

表2. 2胚移植と追い移植により生産された双子産子の概要

No.	個体 (性別と品種)	移植方法	移植器	材料の由来
1	同性双子産子 (雌 B、雌 B)	2 胚	2 連式	白血球、体毛根部
2	同性双子産子 (雌 B、雌 B)	2 胚	2 重鞘	白血球、体毛根部
3	異性双子産子 (雄 B、雌 B)	2 胚	2 連式	白血球
4	同性双子産子 (雌 B、雌 B)	2 胚	2 重鞘	白血球、体毛根部
5	同性双子産子 (雄 B、雄 B)	2 胚	2 連式	白血球、体毛根部
6	異性双子産子 (雄 B、雌 B)	2 胚	2 連式	白血球、体毛根部
7	異性双子産子 (雄 B、雌 B)	2 胚	2 連式	白血球、体毛根部
8	異性双子産子 (雄 N、雌 N)	2 胚	2 連式	白血球、体毛根部
9	異性双子産子 (雄 N、雌 N)	2 胚	2 連式	白血球
10	同性双子産子 (雄 B、雄 H×B)	追 い	カスー	白血球、体毛根部
11	異性双子産子 (雄 B、雌 H)	追 い	カスー	白血球
12	異性双子産子 (雄 B、雌 H)	追 い	カスー	白血球

B: 黒毛和種, N: 日本短角種, H: ホルスタイン種  
H×B: 黒毛和種雄とホルスタイン種雌の交雑種

つのグループ (12種類, 11種類) についてFAMおよびTETの蛍光色素でラベルされた反応後溶液をそれぞれ2  $\mu$ l, HEXの蛍光色素でラベルされた反応後溶液8  $\mu$ lをPCRで増幅したサンプルにそれぞれ1マーカーずつ混合した。この混合溶液2  $\mu$ lを94°C 5分間加熱乾燥後、赤色の蛍光色素でラベルされたサイズマーカーを2  $\mu$ l加え、94°C 2分間加熱後に、氷冷し1  $\mu$ lを泳動した。電気泳動はアクリルアミドゲル溶液((株)バイオメイト)を用い、DNAオートシーケンサー本体の蛍光検出器までの長さが36cmのゲルを作成し、377 DNA Sequencer (PE Applied Biosystems) により2時間行った。泳動データはGenescanとGenotyper (PE Applied Biosystems) でMSDNAマーカー型を判定し、血液キメラの有無と個体識別を実施した。

#### (4) 雄特異的バンドと双子産子胎盤血管吻合の観察

異性多生子4組の雄特異的バンド検出は、XYセクター ((株)伊藤ハム) を用い、常法により白血球由来のDNAから判定した。

また、双子産子を分娩したウシ1頭から胎盤を取り出し、絨毛膜血管の吻合の状態を観察した。

#### (5) 統計処理

血液キメラ発生率は、 $\chi^2$ 検定法により有意差の検討を行った。

## 2 産子の生産方法別の血液キメラ発生率調査

### (1) 2胚移植と追い移植による産子

2胚移植は、ホルスタイン種、日本短角種、交雑種(ホルスタイン種×黒毛和種:H×B)を供試し、2連式移植器またはカスー式移植器を用いて、発情日から7日目の受胎牛の両側子宮角に1胚ずつ移植を実施した。追い移

植は、ホルスタイン種と日本短角種を供試し、受胎牛の発情日に人工授精を行い、7日目に非黄体側子宮角に1胚移植を実施した。得られた双子産子は12組でその概要を表2に示した。

#### (2) 人工授精と未回収卵による産子

人工授精を実施した黒毛和種、ホルスタイン種、日本短角種、交雑種(H×B)から双子産子21組と三つ子1組が得られた。

過剰排卵処理を施し採卵した黒毛和種雌牛4頭から未回収卵による双子産子3組と四つ子1組が得られた。

これらの方法で得られた多生子の概要を表3に示した。

## 結 果

### 1 血液キメラの解析と個体識別法

Genotyper (PE Applied Biosystems) で解析したMSDNAマーカー型の判定結果を表4に示した。本研究で得られた双子産子36組中28組(77.7%)は白血球由来MSDNAマーカー型が同一パターンであり、血液キメラを認めた。また、三つ子では3頭全て、四つ子では各2頭(雄2頭/雌2頭)で白血球由来MSDNAマーカー型は同一パターンを示し、血液キメラを認めた。キメラ個体の雌は白血球由来DNAから雄特異的バンドを確認し、フリーマーチンと診断した。四つ子は雄雄、雌雌間で血液キメラを示したが、雌雌は雄特異的バンドを認めず、

表3. 人工授精と未回収卵により生産された双子産子の概要

No.	個体 (性別と品種)	生産方法	材料の由来
13~21	異性双子産子 (雄 H、雌 H)	人工授精	白血球、体毛根部
22~25	同性双子産子 (雄 H、雄 H)	人工授精	白血球、体毛根部
26~30	同性双子産子 (雌 H、雌 H)	人工授精	白血球、体毛根部
31	同性双子産子 (雌 H×B、雌 H×B)	人工授精	白血球、体毛根部
32~33	異性双子産子 (雄 N、雌 N)	人工授精	白血球、体毛根部
34~36	異性双子産子 (雄 B、雌 B)	未回収卵	白血球、体毛根部
37-1	異性三つ子 (雄 B)	人工授精	白血球、体毛根部
37-2	異性三つ子 (雌 B)	人工授精	白血球、体毛根部
37-3	異性三つ子 (雌 B)	人工授精	白血球、体毛根部
38-1	異性四つ子 (雄 B)	未回収卵	白血球、体毛根部
38-2	異性四つ子 (雄 B)	未回収卵	白血球、体毛根部
38-3	異性四つ子 (雌 B)	未回収卵	白血球、体毛根部
38-4	異性四つ子 (雌 B)	未回収卵	白血球、体毛根部

表4. ウシ多生子のDNAマーカー型による個体識別結果

No.	生産方法	産子の状況	白血球由来DNA型	毛根由来DNA型	キメラ	フリーマーチン
1	2 胚	同性双子	異なる	異なる	無し	—
2	2 胚	同性双子	異なる	異なる	無し	—
3	2 胚	異性双子	異なる	異なる	無し	無し*
4	2 胚	同性双子	同一	異なる	有り	—
5	2 胚	同性双子	同一	異なる	有り	—
6	2 胚	異性双子	同一	異なる	有り	有り*
7	2 胚	異性双子	同一	異なる	有り	有り*
8	2 胚	異性双子	同一	異なる	有り	有り*
9	2 胚	異性双子	同一	異なる	有り	有り*
10	追 い	同性双子	異なる	異なる	無し	—
11	追 い	異性双子	異なる	異なる	無し	無し*
12	追 い	異性双子	異なる	異なる	無し	無し*
13	人工授精	異性双子	異なる	異なる	無し	無し
14	人工授精	異性双子	異なる	異なる	無し	無し
15~21	人工授精	異性双子	同一	異なる	有り	—
22~25	人工授精	同性双子	同一	異なる	有り	—
26~30	人工授精	同性双子	同一	異なる	有り	—
31	人工授精	同性双子	同一	異なる	有り	—
32~33	人工授精	異性双子	同一	異なる	有り	—
34~36	未回収卵	異性双子	同一	異なる	有り	—
37-1~3	人工授精	異性三つ子	同一	異なる	有り**	有り*
38-1~4	未回収卵	異性四つ子	同一	異なる	有り***	無し*

\* フリーマーチン判定は牛雄特異的遺伝子 (SR Y) をPCR法で増幅しバンドを確認。

\*\* 3個体で血液キメラ

\*\*\* 雄雄血液キメラ/雌雌血液キメラであり、雄雌間の血液交流はなし

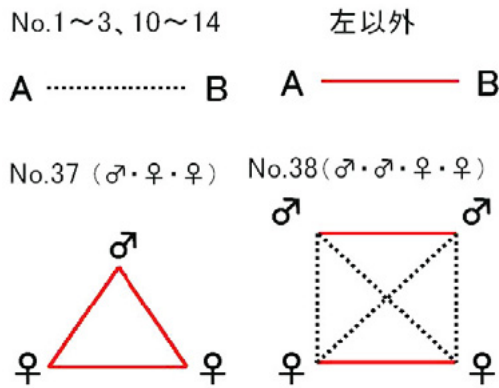


図1. 多生子の血液交流模式図



図2. 胎盤血管吻合

フリーマーチンではないと診断した。今回解析した多生子のDNA解析結果から、血液交流の模式図を図1に示した。実線は吻合有り、点線は吻合無しを示し、双子産子No.1-3, 10-14の組で血液交流がなく、それ以外の双子産子は血液交流が有ることを示している。また、No.37の三つ子は3頭全てに血液交流があり、No.38の四つ子では雄2頭と雌2頭の間で血液交流が無かったことを示している。

絨毛膜観察は、双子産子1組で行い、血液交流を示す臍静脈と臍動脈の側枝が吻合し、肥大している状態を認めた(図2)。

血液キメラを示した多生子は、毛根細胞由来のMSDNAマーカー型が多生子間で異なっていた。Genotyper (PE Applied Biosystems) でエレクトロフェログラムとして出力したMSDNAマーカー型の判定

例を図3に示した。判定結果はMSDNAマーカー型のピークとして表示される。通常PCRにより増幅されたある特定の染色体部位は、ホモの場合1本、ヘテロの場合2本のピークが出現する。図3はNo.37の三つ子の白血球由来DNAと毛根細胞由来DNAを解析したものである。図3-1は白血球由来MSDNAマーカー型を示しており、三つ子間での血液交流によりDNAが混在し、3頭全てが3本の同一ピークであったため、個体を識別することはできなかった。図3-2は毛根細胞由来MSDNAマーカー型を示しており、それぞれ異なる2本のピークであるため、MSDNAマーカー型を区別でき、個体識別が可能であった。ここで示したNo.37-1(雄)とNo.37-3(雌)の毛根細胞由来MSDNAマーカー型は同一であるが、他のマーカー型は異なっており、一卵性でないことが確認され識別が可能であった。

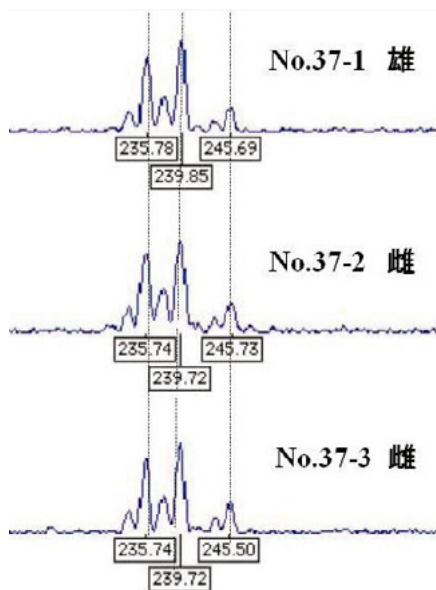


図3-1. 白血球由来MSDNAマーカー型

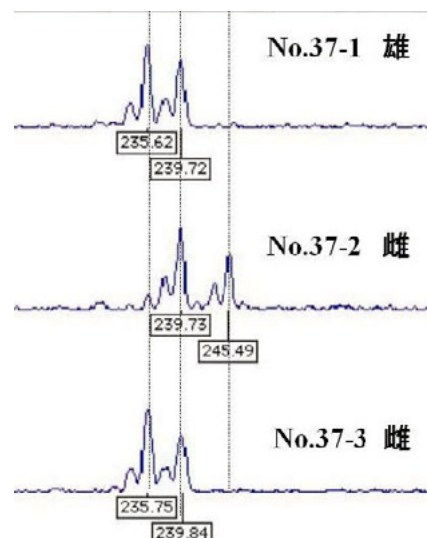


図3-2. 毛根細胞由来MSDNAマーカー型

表5. 産子の生産方法別の血液キメラ発生率

生産方法	検査頭数	血液キメラ 非発生頭数	同左発生率 (%)
両側2胚移植	9	3	33.3
追い移植	3	3	100
小計	12	6	50.0 a
人工授精	21	2	9.5
未回収卵	3	0	0
小計	24	2	8.3 b

※：a、b異符号間に有意差有り (P<0.01)

## 2 産子の生産方法別血液キメラの発生率調査

産子の生産方法別に区分した血液キメラの解析結果を表4に示した。両側2胚移植により得られたNo. 1-9の双子産子9組中6組(66.6%)で白血球由来MSDNAマーカー型が同一パターンであり、血液キメラを認めた。追い移植により得られたNo.10-12の双子産子3組全てで白血球由来MSDNAマーカー型が異なっており、血液キメラを示さなかった。人工授精により得られたNo.13-33双子産子21組中19組(90.5%)で白血球由来MSDNAマーカー型が同一パターンであり、血液キメラを認めた。過剰排卵処理を施し採卵した黒毛和種雌牛の未回収卵から得られたNo.34-36の双子産子3組全てで白血球由来MSDNAマーカー型が同一パターンであり、血液キメラを認めた。

血液キメラ発生率を調査した結果を表5に示した。両側2胚移植と追い移植法で得られた双子産子12組中6組(50.0%)で血液キメラを認めなかった。人工授精と過剰排卵処理を施し採卵した黒毛和種雌牛の未回収卵から得られた双子産子24組中2組(8.3%)は血液キメラを認めず、両側2胚移植と追い移植法で得られた双子産子に比べ血液キメラ発生率が有意に高かった。

## 考 察

ウシの双子妊娠では、妊娠約40日までに絨毛膜血管が吻合すると血液キメラが高率に起り(90%~95%)<sup>6)7)8)</sup>雌はフリーマーチンとなることが報告されている。本研究で、人工授精又は未回収卵による双子の白血球由来MSDNAマーカー型を解析したところ、24組中22組(91.7%)の多生子で血液キメラを認めた。フリーマーチン牛の絨毛膜観察でLillie<sup>10)</sup>や三宅ら<sup>7)</sup>は絨毛膜血管の吻合を解剖学的に観察し、我々も1組の絨毛膜観察で血液交流を示す臍静脈と臍動脈の側枝が吻合して肥大している状態を認めた。

また、三宅ら<sup>6)</sup>は雌雄胎子の絨毛膜血管吻合によって雌胎子は雄胎子由来の血球原基細胞を受け取り、性染色

体キメラを有すると報告している。今回異性三つ子の白血球由来MSDNAマーカー型を解析したところ血液キメラを認めた。異性四つ子は雄雄、雌雌間で血液キメラを示したが、雌に雄特異的遺伝子が検出されないことからフリーマーチンではないと診断した。このようにMSDNAマーカーを用いた異性多胎の血液キメラ解析は、多胎産子の血液交流の関係をj知ることが可能で、雌産子を繁殖に供せるか否かの判定に有効であると考えられた。

MSDNAマーカーによる個体識別の解析には、各染色体に1つずつMSDNAマーカーが配置されており、通常ホモの場合に1つ、ヘテロの場合に2つのピークとしてマーカー型を観察することができる。今回多生子は血液交流により染色体が2個体分になり、最高で4つのピークが観察され、血液キメラを認めた産子間の白血球由来MSDNAマーカー型は同一となり、個体を識別することができなかつた。このような場合には、毛根細胞由来DNAのMSDNAマーカー型が異なることを安田ら<sup>1)</sup>は報告しているが、今回同様の成績が得られ、ウシ多生子の個体識別は、毛根細胞を活用することで判定が可能であった。

胚移植による双子生産の課題はキメラ率が高いことにあり、その発生防止技術の確立が重要となっている。今回実施したMSDNAマーカーの解析結果を産子の生産方法別に区分した結果、両側2胚移植と追い移植法から得られた双子産子12組中6組(50.0%)で血液キメラを認めなかつた。このことは胚の着床位置に関係することが報告<sup>3)</sup>されており、両法により胚が両側の子宮角に離れて着床して絨毛膜の血管吻合が起らず血液キメラが発生しなかつたと考えられた。通常、人工授精により受精した胚は排卵側子宮角の中央部よりやや後方に定着し、子宮内移動が生じる可能性は0.27%と極めて少ない<sup>4)</sup>。従って、追い移植法で受胎した胚は子宮角の中部で移動せず着床し、子宮角内で位置が離れたことにより血管吻合が起らなかつたと推察された。しかし、両側子宮角移植法では、胚の移植位置が浅い場合に血管吻合発生率が高まるjことが推察されるため、子宮角深部移植に努めることが留意点として考えられた。

今回の研究から両側子宮角2胚移植法と追い移植法は、双子生産で問題となる異性双子雌のフリーマーチン発生軽減対策として有効な技術となるjことが示唆された。

## 引用文献

- 1) Inoue M, Hirano T, Watanabe T, Mizosita K, Yamaguchi H, Nakane S, Sugimoto Y(1997), Individual Identification and Paternity Control of Japanese Black Cattle Based on Microsatellite Polymorphism, Anim. Sci. Technol. (Japan)68, No.5:443-449
- 2) 鈴木達行(1985), 双子生産技術とその応用, 臨床獣医 3:38-43
- 3) 関根宝吉(1989), 病気からみた子牛の上手な育て方, Dairy Japan 臨時増刊2:119-122
- 4) 高橋芳幸(1995), 胚の子宮内分布と移動, 獣医繁殖学 第二版:138-139
- 5) Mrarcum, J.B.(1974), The freemartin syndrome, Anim. Breed. Abstr. 42:227-242
- 6) 三宅陽一(1981), 乳牛の異性3, 4および5児の多胎10組と性染色体キメラに関する研究, 家畜繁殖誌 27:80~85
- 7) ——(1999), 絶対的不妊症の原因となるフリーマーチン症, 臨床獣医 VOL 17, No.1
- 8) —— (2000), 絶対的不妊症の原因となる単体フリーマーチン, 臨床獣医 VOL 18, No.8
- 9) 安田康明(2001), ウシの二卵性双子産子のキメラに関する分子遺伝的検索, 島根畜試研報34:11~14
- 10) Lillie, F.R.(1917), The free-martin; a study of the action of sex hormones in the foetal life of cattle, J.Exp.Zool.23:371-452

## DNA Analysis of Blood Cell Chimerism of Multiple Calves

Kazuhiro FUKUNARI, Yoshisato YOSHIKAWA,  
Hideki KODAMA and Toshiyuki SUZUKI\*

### Summary

The present study was undertaken to analyze blood cell chimerism and to discriminate multiple calves (38 sets) using microsatellite DNA markers (MSDNA marker). The results showed that discrimination of multiple calves was possible by analyzing white blood cells and external root sheath cells. Furthermore, we evaluated the percentage of blood cell chimerism between the different twinning procedures. The percentage of blood cell chimerism in twins obtained from artificial insemination (AI) and uncollected embryos after superovulation was 91.7% (22/24 pairs), which was significantly higher than the 50% (6/12 pairs) observed in bilateral embryo transfer and embryo transfer after AI. The results of the study indicate that MSDNA marker is useful for analysis of blood cell chimerism and discrimination of multiple calves. It also suggests that bilateral embryo transfer and embryo transfer after AI may contribute to the reduction of freemartinism in multiple calves.

Key words : cattle, embryo transfer, twin production, freemartin