

新規遺伝子増幅法(LAMP法)による 牛受精卵性判別キットの研究開発

北海道立畜産試験場遺伝子診断応用研究グループ(代表:陰山聡一)

陰山聡一¹・平山博樹¹・森安 悟¹・澤井 健¹・繪野澤真樹¹・尾上貞雄¹・

南橋 昭¹・山本裕介¹・森 清一¹・高野 弘²・納富継宣²・渡辺恵子²・

副島隆浩²・森 安義²・平野剛史²・藤田奈由²・高橋芳幸³・片桐成二³・

堂地 修⁴・山科秀也⁵・松崎重範⁶

現所属先: ¹北海道立畜産試験場・²栄研化学株式会社・³北海道大学・

⁴酪農学園大学・⁵(財)北海道農業開発公社十勝育成牧場・

⁶(社)ジェネティクス北海道試験研究室

1 技術開発の背景と目的

一般の酪農経営においては、後継牛として雌子牛が必要である。雄子牛の方は不要なのですぐに売却されてしまう。後継雌牛を得るために、高価な精液を用いて授精や受精卵移植を行っても、雌子牛が産まれるとは限らない。妊娠期間の約280日を待っても、雄子牛が生まれると、高価な精液や受精卵がまったく無駄になり、牛群の改良も大幅に遅れてしまう。また、肉牛経営では、肥育素牛には肥育に有利な雄子牛が望まれ、後継雌牛には雌子牛が必要である。そこで、酪農家、畜産農家のいずれにおいても、産子の雌雄産み分けが実現すれば、より効率的な経営が可能になる。

1980年代までに、様々な産み分け法が検討されたが、実用に至るものはなかった(例: H-Y抗原の有無、受精卵の成長速度、受精卵の染色体検査、精子の比重差、精子の表面電荷、精子のDNA含量差)。1990年代に入り、特定の遺伝子を大量に増幅するPolymerase Chain Reaction (PCR)法を用いて、移植前に受精卵から採取した少数の細胞で雄牛に特異的な遺伝子を検出することが可能になり、雌雄産み分けが実用的になってきた。北海道立畜産試験場は1991年から性判別用プライマーの開発に着手した。そして、雄牛に特異的なDNA配列(S4; 1997年特許取得)を新たに同定してプライマーを設計し、PCR法による性判別技術を確立した。また、性判別用機材を積載した試験用車両により、農家の庭先で性判別を実施するなどして、技術の普及や利用方法の検討も行なった。

しかし、性判別受精卵の利用は十分に普及しなかった。その理由としては、PCR法によるDNA増幅と電気泳動による判定の煩雑さ、時間がかかること、さらに、PCR法のための温度制御装置、電気泳動装置および紫外線照射装置などの高価な設備が必要なことがあげ

られる。

一方、栄研化学株式会社は1999年に新たな遺伝子増幅法であるLoop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)法を開発した。LAMP法は、短時間に特異的かつ大量に目的のDNA配列を増幅することができるので、迅速な遺伝子診断に適している。また、一定温度で反応が進行し、反応液の白濁により増幅産物を検出できるために電気泳動が不必要など、現場での応用に適した特徴を有している。

そこで、本研究グループはすでに特許を取得している雄特異的DNA配列と新しい遺伝子増幅技術を組み合わせて、簡易で迅速な牛受精卵の性別判別技術の開発と試薬のキット化を図ることとした。

2 技術開発の概要

本研究グループはLAMP法を用いた新しい性別判別キットの開発に向けて、2001年1月に、実際の畜産現場で性別判別を実施している北海道内の関係機関を対象に、市販の性別判別キットの問題点と新しく開発する性別判別キットへの要望などを調査した。その結果、民間企業では、移植のほとんどが乳牛であることから、雌の誤判定防止が最も強い要望であった。そこで、牛雄特異的DNA配列の検出に加えて、牛雌雄共通配列の検出も行い、サンプリングミスや反応失敗などで増幅しなかった場合と雌の場合の判別ができるキットの開発を目指した。本研究課題は2001年度から北海道が新たに設けた重点領域特別研究課題に採択され、産・官・学の共同プロジェクトとして取り組んだ最初の課題である。

1) プライマー設計および反応条件の検討

道立畜試が既に特許を取得していた牛雄特異的DNA配列 (S4) および雌雄共通DNA配列 (1.715 satellite DNA) から、LAMP用プライマーをそれぞれ3および15セット設計し (図1)、プラスミドDNAを試料として特異性および反応時間を指標にプライマーの選択お

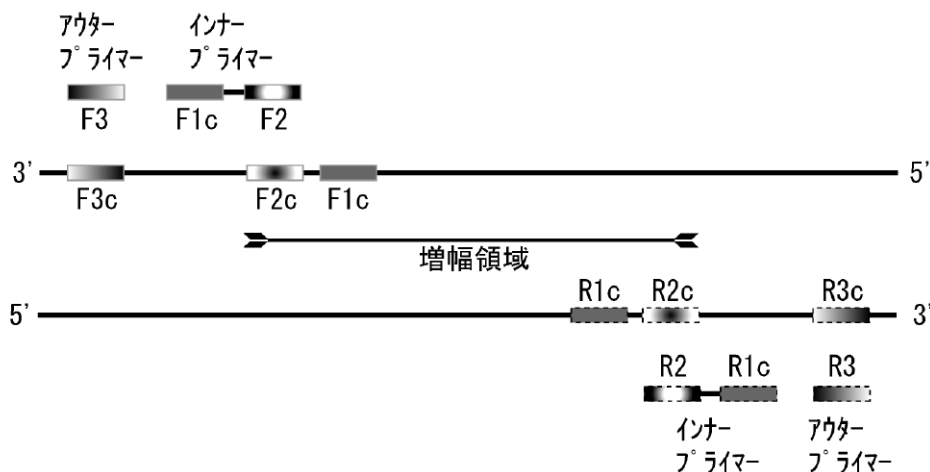
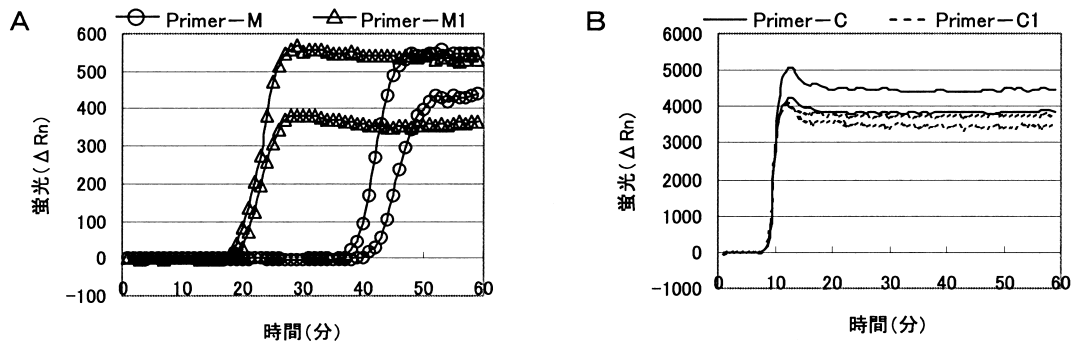


図1 LAMP用プライマーの設計概要

よびプライマー配列の変更を行った。その結果、最も特異的かつ迅速に反応が起こる雄特異的プライマーPrimer - M1および雌雄共通プライマーPrimer - C1のセットを選択することができた（図2AおよびB）。



プラスミドDNA： A；60000 copy B；600000 copy

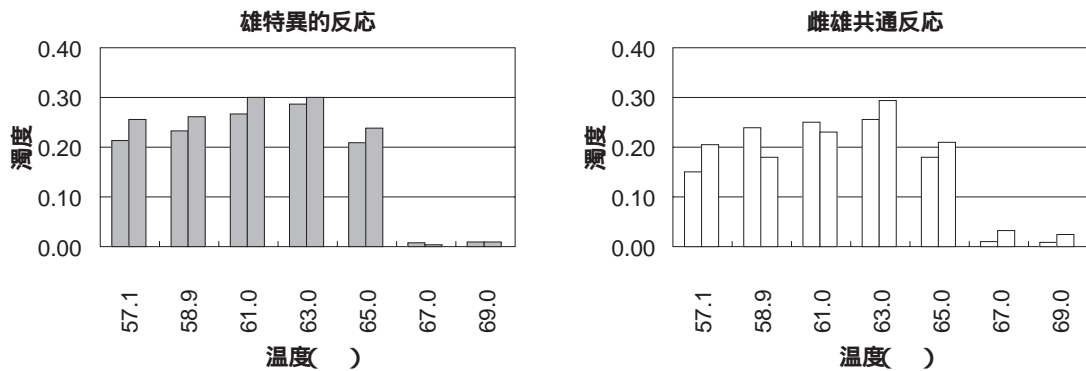
図2 LAMP用プライマーの反応時間

次に、プラスミドDNAおよび白血球より抽出したDNAを試料として、反応温度（57.1～69.0℃）増幅に要する時間および検出感度の検討をリアルタイム濁度測定装置（図3）を用いて行った。

その結果、63.0℃で最も高い増幅効率を得られ（図4）35分以内



図3 リアルタイム濁度測定装置



（各測定温度において2回の反応を実施；反応時間35分）
 図4 プラスミドDNAを用いたLAMP反応の至適温度の検討

に検出することができた（図5および6）。この反応条件で雄特異的反応は0.5pgまで、雌雄共通反応は0.01pgまで安定して検出することができた（図7）。1細胞当たりのゲノムDNA量は数pgとされていることから、本反応条件により受精卵から採取した細胞を用いた性別が可能であると考えられた。

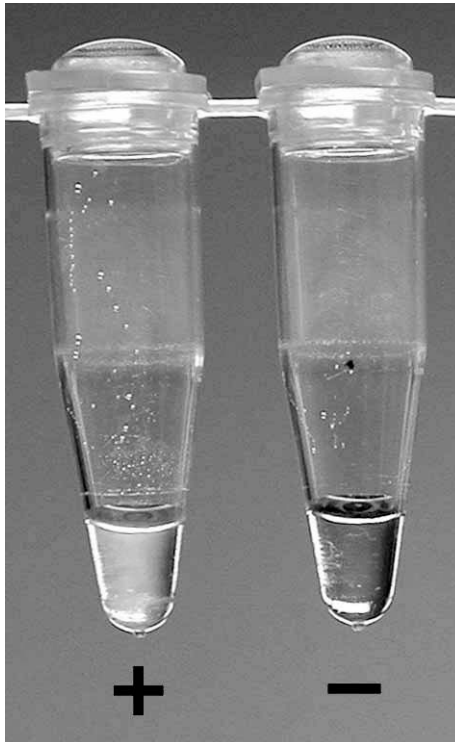
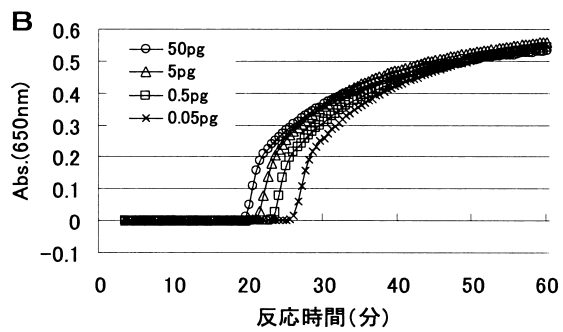
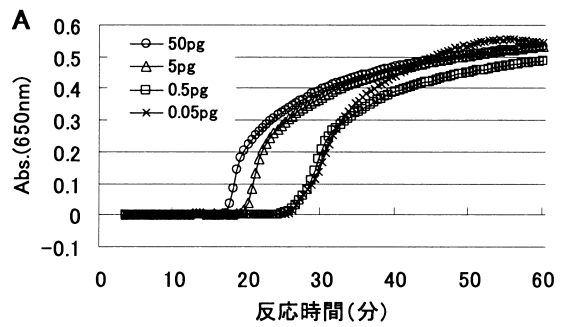


図5 白濁によるLAMP反応の検出



A：雄特異的反応 B：雌雄共通反応

図6 濁度のリアルタイム測定による白血球由来DNAの検出

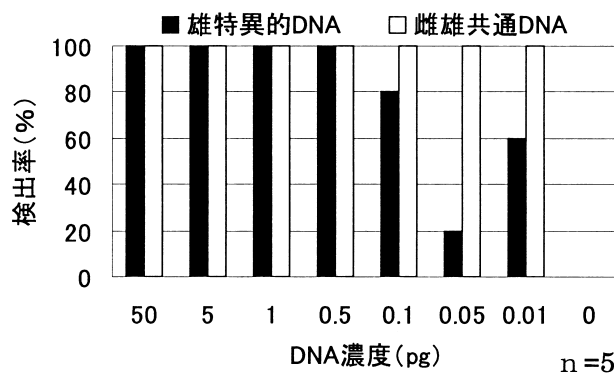


図7 LAMP法による白血球由来DNAの検出率

また、受精卵の細胞からのDNA抽出方法について三つの方法について検討したところ、NaOH法（0.03M NaOH中で5分間室温にて静置）が判定率および一致率ともに優れておりLAMP牛受精卵性判別キットのDNA抽出方法として最適と判断された（表1）。

表1 DNA抽出方法の検討

抽出方法	実験数	判定可能数 (%)	一致数 (%)
Tris	20	16 (80)	13 (81)
NaOH	20	19 (95)	19 (100)
PK-TW	20	18 (90)	17 (94)



図8 LAMP牛受精卵性判別キット

2) キットの評価試験

以上の結果を踏まえ作製したLAMP牛受精卵性判別キット（図8）の検出感度および精度について、受精卵から採取した細胞を試料として評価するとともに、-20℃における凍結保存安定性について検討した。

本キットにより雌と判定された試料は5細胞では1例を除き正しく判定され、一致率は95%であり、雄と判定されたサンプルは、全て正しく判定された（表2）。これらの結果より、本キットでは、確実に性を判定するために、胚盤胞の栄養外胚葉の10%以上を採取することとした。これは、正常に発生した胚盤胞であれば10~20細胞程度に相当する。また、本キットの凍結保存安定性試験を行った結果、-20℃保存で9ヵ月間凍結保存しても増幅に要する時間への影響は認められず、検出感度は低下しなかった（図9）。

表2 受精卵由来細胞を用いたLAMP牛受精卵性判別キットの検出感度評価

細胞数	実験数	判定可能数 (%)	LAMP による判定結果			
			♂	一致数 (%) ^a	♀	一致数 (%) ^a
1	48	38 (79)	12	12 (100)	26	17 (65)
2	44	42 (95)	16	16 (100)	26	22 (85)
3	47	45 (96)	19	19 (100)	26	22 (85)
4	46	46 (100)	20	20 (100)	26	22 (85)
5	44	44 (100)	22	22 (100)	22	21 (95)

・PCR による性判別結果との比較

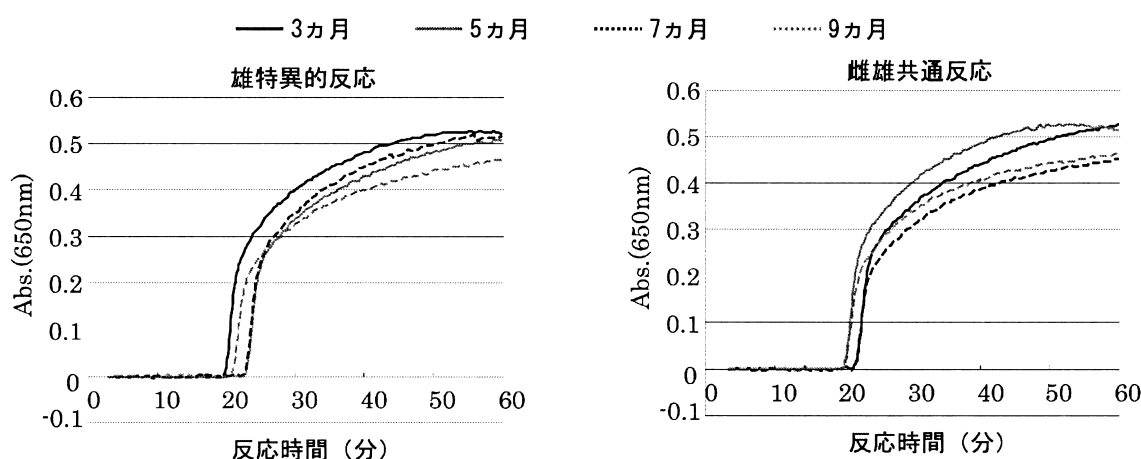


図9 LAMP牛受精卵性判別キットの凍結保存安定性試験 (試料: 5細胞)

3) 性判別受精卵の移植実証試験

LAMP法による性判別の有効性を実証するため、性判別受精卵の移植による実証試験を行った。113個の受精卵を性判別した結果、雄が58個、雌が55個とすべて判定することができた(表3-1)。61個の性判別受精卵を受胎牛に移植した結果、35例が受胎し、産子が得られた33例はすべて予想された性と一致した(表3-2)。以上の結果より、牛受精卵性判別におけるLAMP法の有効性が実証された。

表3-1 LAMP法による性判別受精卵の移植試験 性判別

受精卵	採取細胞数	判定結果 (%)	
		雄	雌
113	2-25 細胞	58 (51)	55 (49)

表3-2 LAMP法による性判別受精卵の移植試験 受精卵移植

移植数	受胎数 (%)	分娩数 (%) ^a	一致数 (%)
61	35 (57)	33 (94)	33 (100) ^b

^a 早期胚死滅; 1頭, 流産; 1頭

^b 雄; 12, 雌; 21

今回、我々が作製したLAMP牛受精卵性判別キットは、DNA増幅時間が35分であり、DNAの抽出から検出まで約1時間と、PCR法の2～3時間程度に比較して所要時間を大幅に短縮することができた。これは、LAMP法の特徴である目的とするDNA配列の迅速な増幅と反応液の白濁による増幅結果の可視化によるものである。また、受精卵から採取した細胞のDNAをNaOH法により抽出することにより、操作を簡略化できたことも要因のひとつである。

LAMP反応に使用した専用装置（ヒートブロック付き濁度測定装置）は、温度保持および濁度の測定が可能であり、増幅から判定までの一連の操作を正確かつ効率的に行うことができる。本装置を用いることにより、増幅結果をプラス/マイナスあるいは濁度として記録することができ、性判別受精卵を流通する場合にも客観的な判定結果を添付することができる。この装置は、複雑な温度制御を行うPCR装置に比較して安価に製造することができ、電気泳動装置あるいは紫外線照射装置も不要である。加えて、電気泳動のために増幅産物を扱う必要がないことからDNAコンタミネーションによる誤判定も発生しにくい。

3 開発技術の普及活動

本キットは2002年3月より試験販売を開始し、2003年9月末現在、国内55施設で利用されている（販売数は未公表）。これまで性判別に興味があっても導入に躊躇していた現場の獣医師などへも広がっている。また、2002年度には家畜改良センターの協力を得て、福島と日高で本キットによる技術研修会を開催し、細胞採取法や判別済み受精卵の凍結法など周辺技術も含めて現場技術者が実際に使える技術となるような活動も積極的に行っている。2004年2月には愛媛県にてこれまでの受胎成績も含めた技術研修会を開催する予定である。

国内だけでなく、2002年10月からは、中国の新疆および北京でin vitroの性能評価試験とフィールド試験を開始し、実験用試薬として販売を目指している。さらに2003年1月にニュージーランドで開催された国際胚移植学会での発表を契機に、欧米への展開も検討され始めた。また、北海道大学の高橋教授らは、韓国において本キットの技術指導を行い、国際胚移植学会で発表した研究成果の紹介とキットのデモを行った。

今後、性判別受精卵の凍結技術などの関連技術が改善され、本キットがさらに有効活用されることが望まれる。

4 開発技術の学術的評価

本研究グループの研究は、プライマー設計の基となる雄特異的DNA配列、遺伝子増幅技術の両者ともに海外に依存することなく国産の独自研究開発の成果であり、それらを組み合わせることによりLAMP法が実際に現場で使えることを初めて実証した点に大きな意義がある。

これらの研究成果は、J. Vet. Med. Sci.、日本畜産学会など国内での公表はもとより、ニュージーランド、中国における学会での発表やTheriogenologyなど海外学術雑誌にも受理され、学術的にも高い評価を得ている。

5 開発技術の産業への貢献

国産の遺伝子増幅技術を用いた牛受精卵性判別キットは、わが国では最初の試みである。DNA抽出から検出まで約1時間と、PCR法の2～3時間程度に比較して所要時間を大幅に短縮するキット（商品名：Loopamp牛胚性判別試薬キット）を開発したことにより、キット本体の価格低下だけでなく、必要な機器は、同時に開発された簡易な専用装置（ヒートブロック付き濁度測定装置）のみと技術の簡易化にも貢献した。所要時間の短縮は経費の中で最も大きな割合を占める人件費を大幅に削減することに貢献した。そのため、性判別受精卵移植の要望が増加しており、今後はホルスタインではほとんど全てが性判別を行った受精卵の移植となることが期待でき、畜産現場ですでに一般技術となった受精卵移植に大きな付加価値を与え、受精卵移植技術の利用拡大に大きく寄与している。また、本キットはLAMP法のコンセプトを具現化した第1号製品でもあり、LAMP法を様々な分野へ広げる上でも大きな役割を果たしている。海外においても、国産のキットが普及していけば、畜産における直接的貢献だけでなく、LAMP法を世界中に広め、新たな分野に適用することにもつながり、産業創出面での貢献もできると考えられる。

6 技術開発に関する発表論文等

- 1) 陰山聡一・牛胚性判別簡易化の試み・北海道牛受精卵移植研究会報・20:97-98（2001）
- 2) Kageyama, S., Yoshida, I., Kawakura, K. and Chikuni, K. A Novel Repeated Sequence Located on the Bovine Y Chromosome: Its Application to Rapid and Precise Embryo-Sexing by PCR. J. Vet. Med. Sci. in press
- 3) Hirayama, H., Kageyama, S., Moriyasu, S., Sawai, K., Onoe, S., Takahashi, Y., Katagiri, S., Toen, K., Watanabe, K., Notomi, T., Yamashina, H., Matsuzaki, S. and Minamihashi, A. Rapid sexing of bovine preimplantation embryos using loop-mediated isothermal amplification. Theriogenology in press
- 4) 陰山聡一・山本裕介・南橋 昭・森安 悟・伊東季春・千国幸一・雌雄多型を示すゲノムDNA断片による牛胚の性判別・第90回日本畜産学会大会・P111・1995
- 5) 平山博樹・陰山聡一・森安悟・澤井健・繪野澤真樹・渡辺恵子・平野剛史・森安義・富田憲弘・桃園恵子・古畑ちひろ・片桐成二・高橋芳幸・堂地修・松崎重範・山科秀也・尾上貞雄・南橋昭・第100回日本畜産学会大会・LAMP法によるウシ初期胚の性判別・P124・2002
- 6) 桃園恵子・片桐成二・永野昌志・高橋芳幸・LAMP法牛胚性判別試薬を用いたウシ体

- 外受精由来胚盤胞の性比の検討．北海道牛受精卵移植研究会報．21:55-57（2002）
- 7) Hirayama, H., Kageyama, S., Moriyasu, S., Takahashi, Y., Katagiri, S., Touen, K., Watanabe, K., Yamashina, H., Onoe, S. and Minamihashi, A. Rapid sexing of preimplantation bovine embryos using loop-mediated isothermal amplification. (2002 International embryo transfer society annual meeting.) Theriogenology 59 (1), P509. 2002
 - 8) 平山博樹. LAMP法によるウシ胚の雌雄判別. 酪総研 2002年1月号 酪農総合研究所発行
 - 9) 平山博樹. LAMP法による牛の雌雄産み分け技術. 酪農ジャーナル 2003年6月号 酪農学園大学エクステンションセンター発行
 - 10) 平山博樹. 雌雄産み分け技術 - LAMP法による迅速で簡易な性判別方法 - .農業技術 2003年第58巻第8号 農業技術協会発行
 - 11) 南橋 昭. ウシ胚の性判別技術と受精卵クローン技術への利用. 農林水産技術研究ジャーナル2003年5月号 (Vol.26, No.5) 農林水産技術情報協会
 - 12) 副島隆浩・渡辺恵子. 新しい遺伝子増幅法 (LAMP法) の原理と性判別への応用. 日本胚移植学雑誌第25巻2号. 2003
 - 13) 陰山聡一・平山博樹. 新しい遺伝子増幅法 (LAMP法) による牛胚の性判別. 日本胚移植学雑誌第25巻3号. 2003
 - 14) 新得畜産試験場 (1996) : PCR法による牛胚の性判別と新プライマーの開発 . 平成7年度北海道農業試験会議資料
 - 15) 新得畜産試験場 (1999) : キャピラリーPCR法による牛胚性判別所要時間の短縮 . 平成10年度北海道農業試験会議資料
 - 16) 新得畜産試験場 (2000) : 牛胚性判別技術の現場応用 . 平成11年度北海道農業試験会議資料
 - 17) 新得畜産試験場 (2002) : LAMP法による牛受精卵性判別キットの開発 . 平成14年度北海道農業試験会議資料

関連特許

- 1) 「牛胚の性判別に用いるプライマー」平成9年取得
- 2) 初期胚における遺伝情報の判定法とこれに使用される器具および初期胚から細胞を取り出す方法」平成13年出願済
- 3) 「牛胚性判別用プライマーおよびそれを用いた牛の性判別方法」平成14年出願済