

迅速なフリーマーチン判定法の検討

安野僚太郎・瀬田剛史・福留信司・中川浩・佐藤義政
新潟県農業総合研究所畜産研究センター

The study of the rapid diagnosis of freemartin

Ryotaro YASUNO, Takeshi SETA, Shinji FUKUDOME,
Hiroshi NAKAGAWA and Yoshimasa SATO
Niigata Agricultural Research Institute Livestock Research Center

要約 ウシ胚性判別試薬キットを用いた LAMP 法を応用して、迅速な異性多胎由来雌ウシのフリーマーチン判定法を検討した。ホルスタイン種の異性多胎由来雌ウシの血液を用い、実験室内で LAMP 法を実施した (LAMP 専用機器法)。フリーマーチン個体は雄特異的 LAMP 反応および雌雄共通 LAMP 反応共に陽性で、フリーマーチンではない個体は雌雄共通 LAMP 反応のみ陽性であった。LAMP 反応に必要な反応温度を温湯と保温ポットを用いた方法 (ポット法) と LAMP 専用機器法をそれぞれ実施し、結果を比較した。ポット法および LAMP 専用機器法のフリーマーチン判定結果は 96.7% (29/30) が一致した。フリーマーチンではないと判定した 2 頭について専門機関にフリーマーチン検査を依頼したところ、いずれもフリーマーチンではないと推察され、正常な繁殖能力をもつことを確認した。

ホルスタイン種の多胎分娩発生率は年々増加している (三宅ら 2010, 坂口 2009)。原因として Wiltbank ら (2000) は乳量の増加を挙げ、高泌乳牛は肝門脈の血流量が多くなり、主席卵胞以外の卵胞の排卵を抑制するエストロジオール等が代謝され、血中濃度が低下するため複数の排卵が起こると報告している。このような複数の排卵により異性多胎で分娩された雌仔ウシは 92~93% が血液キメラを示し、正常な性の分化が起こらず、生殖器に先天的な異常をもつ (浜名ら 2006)。このような個体をフリーマーチンという。現在のフリーマーチン検査は専門機関において、PCR により雄遺伝子等を検出する方法で行っている。この検査は依頼してから結果が分かるまでに 3 週間を要し、また多くがフリーマーチンであると判定されるため、異性多胎由来雌ウシの中には正常な繁殖能力をもつ個体もいるのにも関わらず (岡山ら 2011)、多くの農場では未検査のまま肉用として出荷されている。これまでにウシ胚の性判別に用いられる LAMP 法 (陰山ら, 2004) を応用し、異性多胎由来雌ウシの血液から雄特異的遺伝子を検出することでフリーマーチン検査を実験室内で迅速に行えることが報告されている (Hirayama ら 2007)。筆者らはこの方法を応用し、LAMP 専用機器を用いずに農場内で実施可能な LAMP 法

について検討した。

材料および方法

1. 実験室内で行う LAMP 法

異性多胎由来雌ウシ 7 頭および正常雌ウシ 3 頭について、それぞれの血液 50 μ l を蒸留水 4.95ml で希釈し、さらに、希釈血液 0.5ml を 0.05M NaOH 0.5ml で 2 倍に希釈した。このうち 6 μ l をウシ胚性判別試薬キット (Bovine Embryo Sexing Kit, 栄研化学株式会社) の Extraction Solution 6 μ l と混合し、室温で 5 分間以上静置した (抽出液)。雄特異的 LAMP 反应用液は抽出液 5 μ l および Bst DNA Polymerase を含む Reaction Mix. I 20 μ l を反応チューブ (Reaction Tube, 栄研化学株式会社) に添加した。雌雄共通 LAMP 反应用液も同様に抽出液 5 μ l および Bst DNA Polymerase を含む Reaction Mix. II 20 μ l を反応チューブに添加した (サンプル液)。また、血液成分が反応液を白濁させて LAMP 反応の検出を阻害しないことを確かめるために、抽出液 5 μ l を Bst DNA Polymerase を含まない Reaction Mix. II 20 μ l に添加した。全てのサンプルは Loopamp エンドポイント濁度測定装置 LA-100 (テラメックス株式会社) を用い、63°C, 35 分 LAMP 反応を行っ

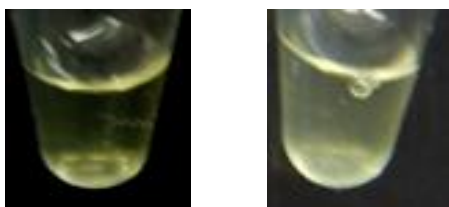
た後、80℃で2分間酵素を失活させた。判定は反応終了後20分以内に濁度を測定し、濁度が0.2を超えた場合を陽性反応とした(LAMP専用機器法)。

【フリーマーチンの判定】

フリーマーチンの判定は、雄特異的 LAMP 反応および雌雄共通 LAMP 反応が共に陽性であった場合はフリーマーチンであると判定する。また、雄特異的 LAMP 反応は陰性で雌雄共通 LAMP 反応のみ陽性であった場合はフリーマーチンではないと判定する。

2. 農場で実施できるフリーマーチン判定法

農場に 63℃と 80℃の温湯を入れた保温ポットおよびウシ胚性判別試薬キットを持ち込み、異性多胎由来雌ウシ 26 頭の血液について、農場内で LAMP 専用機器法と同様にサンプル液を調製した。サンプル液を入れたチューブは温湯が入らないようにパラフィンフィルムで覆い、発泡スチロールをフローターにして、63℃に調製した保温ポット中に 35 分間静置後、80℃の保温ポットに 2 分間静置し、白濁の有無を目視で確認した(ポット法)。判定は、白濁のみられたサンプルを陽性(+)、白濁しなかったサンプルを陰性(-)とした(図1)。また、同一の血液を用い実験室内で LAMP 専用機器法を行い、両者の結果を比較した。ポット法および LAMP 専用機器法でフリーマーチンではないと判定した個体については、専門機関による検査(PCR)を依頼した。



陰性 (-) 陽性 (+)

図1 ポット法の判定結果

3. 農場におけるポット法の作業の簡易化

Reaction Mix. I または Reaction Mix. II と Bst DNA Polymerase の混合作業をあらかじめ実験室内で行い農場でポット法を行った区(実験室内混合区)および前述の方法で農場で混合した区(農場混合区)を4頭の異性多胎由来雌ウシの血液について実施し、両者の結果を比較した。また、同一の血液を用いて実験室内で LAMP 専用機器法を実施し、結果を比較した。

4. フリーマーチンではないと判定した個体の繁殖能力

本試験でフリーマーチンではないと判定し、専門機関の検査でフリーマーチンではないと推察された2頭について過剰排卵処置(SOV)を行い、未經産採胚を実施した。SOV開始は、発情日を1日とし、9日または10日にエストラジオール安息香酸エステル(動物用オバホルモン注、あすかアニマルヘルス株式会社)0.25mlを投与し、14日目からFSH(アントリンR・10、共立製薬株式会社)20AUを4日間8回の漸減投与、処置3日目にPGF₂α類縁体(ダルマジン、共立製薬株式会社)2mlを1回処置、投与4日目にGnRH(スポルネン注、共立製薬株式会社)3mlを1回処置し、投与5日目に人工授精(AI)を行い、AIの7日後に多穴式バルーンカテーテル16fr(FHK社)を用い、採胚を行った。採胚後は、発情を待ってAIを行った。

結 果

1. 実験室内で行う LAMP 法

表1のとおり、異性多胎由来雌ウシ7頭の血液は、雄特異的 LAMP 反応および雌雄共通 LAMP 反応共に陽性であった。正常雌ウシ3頭の血液の雄特異的 LAMP 反応は陰性で、雌雄共通 LAMP 反応のみ陽性であった。

表1 LAMP法を応用したフリーマーチン判定法の結果

検体血液の由来	検体数	雄特異的 LAMP 反応		雌雄共通 LAMP 反応		FM(※) 判定	
		+	-	+	-	+	-
異性多胎由来雌ウシ	7	7	0	7	0	7	0
正常雌ウシ	3	0	3	3	0	0	3

※ FM:フリーマーチン

2. 農場で実施できるフリーマーチン判定法

表2のとおり異性多胎由来雌ウシ26頭の血液を用い、ポット法でフリーマーチン検査を実施したところ、24頭をフリーマーチンであると判定し、2頭をフリーマーチンではないと判定した。この結果は、LAMP専用機器法によるフリーマーチン判定結果と一致した。また、フリーマーチンではないと判定した2頭は専門機関にPCRを依頼し、いずれもフリーマーチンではないと推察された。

表2 フリーマーチン判定結果

検体数	フリーマーチン判定	ポット法	LAMP専用機器法	専門機関の検査(PCR)
26	+	24	24	NA
	-	2	2	2

3. 農場におけるポット法の作業の簡易化

表3のとおり、4頭中3頭で実験室内混合区、農場混合区およびLAMP専用機器法の結果が一致した。1頭は実験室内混合区と農場混合区で判定が異なった。LAMP専用機器法でフリーマーチンではないと判定したことから、専門機関へ検査を依頼したところ、フリーマーチンであると推察された。

表3 フリーマーチン検査結果

試験区	1頭目	2頭目	3頭目	4頭目
実験室内混合区	+	+	+	-
農場混合区	+	+	+	+
LAMP専用機器法	+	+	+	-
専門機関 (PCR)				+

4. フリーマーチンではないと推察された個体の繁殖能力

専門機関の検査でフリーマーチンではないと推察された1頭について、14か月齢で未経産採胚を実施し、9個の胚を回収し、2個の正常胚を得た。15か月齢で人工授精により妊娠し、289日後に正常に分娩し、泌乳した。また、2頭目の個体は14か月齢で未経産採胚を実施し、6個の胚を回収し、5個の正常胚を得た。15か月齢で人工授精を行い、現在妊娠鑑定待ちである。

考 察

本試験は、農場内で実施できる迅速なフリーマーチン判定法を開発することを目的とし、異性多胎由来雌ウシの血液、ウシ胚性判別キット、温湯および保温ポットを用いてLAMP反応が行える方法について検討した。実験室内でLAMP法を行った結果、異性多胎由来雌ウシは雄特異的LAMP反応および雌雄共通LAMP反応ともに陽性となり、フリーマーチンと判定された。正常雌ウシ3頭はいずれも雄特異的LAMP反応は陰性であり、雌雄共通LAMP反応のみ陽性となり、フリーマーチンではないと判定された。また、LAMP専用機器法での異性多胎雌ウシをフリーマーチンと判定した割合は、各試験の対照区を含めて91.9% (34/37) となり、浜名ら (2006) の報告した92~93%と同等の値であった。以上から、LAMP法により異性多胎由来雌ウシの血液から雄特異的LAMP反応の有無を判定することでフリーマーチン検査が可能であると考えられた。

「2. 農場で実施できるフリーマーチン判定法」で行ったポット法とLAMP専用機器法の比較では、異性多胎由来雌ウシの26頭全てで結果が一致した。ポット法およびLAMP専用機器法共にフリーマーチンではないと判定し

た2頭はいずれも専門機関の検査でフリーマーチンではないと推察され、正常な胚を採取でき、正常な繁殖能力を持つことが分かった。以上から、ポット法は農場で実施できるLAMP法として有効と考えられた。しかしポット法は農場内で微量の試薬を扱うため作業が繁雑であり、また試料による試薬の汚染が起きる可能性も否定できない。これらの問題を避ける目的で、「3. 農場におけるポット法の作業の簡易化」において Reaction Mix と Bst DNA Polymerase の混合をあらかじめ混合し、農場に持ち込んで検査を行ったところ、実験室内混合区と農場混合区およびLAMP専用機器法の検査結果は4頭中3頭で一致した。1頭で実験室内混合区、農場混合区で判定結果が異なり、専門機関の検査ではフリーマーチンであると推察された。これはウシ胚性判別キットの雌判定の一致率が100%ではないことと (陰山ら, 2004, 藤田ら, 2004), 今回実施した方法の中で雄特異的LAMP反応またはLAMP反応自体を抑制するような要因があったためと考えられたが、原因は特定できなかった。また、異性多胎由来雌ウシを登録するには、専門機関によるフリーマーチン検査が必須となっており、LAMP法でフリーマーチンではないと判定されても、専門機関によるフリーマーチン検査を受ける必要がある。

専門機関によるフリーマーチン検査は、採血から農家に結果が届くまでに約3週間を要するが、LAMP法によるフリーマーチン検査法を用いた場合、血液を実験室に持ち帰ってから約1時間で、ポット法では採血後約45分で農家に結果を知らせることができた。これらLAMP法を用いた方法は、専門機関にフリーマーチン検査を依頼する対象となる仔ウシを選抜するための検査として有効である。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、検体の採取にご協力をいただいた農場の皆様、家畜保健衛生所の職員の皆様、臨床獣医師の皆様に深謝致します。

引用文献

- 藤田達夫, 梅木英伸, 志村英明, 久々宮公二, 志賀一穂. 2004. 牛受精卵の性別判別実用化試験. 平成15年度試験成績報告書 (大分県)
- 浜名克己, 中尾敏彦, 津曲茂久. 2006. 獣医繁殖学. 第3版. 文永堂出版, 東京都.
- Hirayama H, Katagiri S, Kageyama S, Minamihashi A, Moriyasu S, Sawai K, Onoe S, Takahashi Y. 2007. Rapid

sex chromosomal Chimerism analysis in heterosexual twin female calves by Loop-mediated Isothermal Amplification. *Animal Reproduction Science* 101, 38-44

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）. 2004. 新しい遺伝子増幅法（LAMP 法）による牛受精卵性判別キットの研究開発. *畜産技術* 1, 73-79

三宅陽一, 三好憲一, 森谷浩明, 松井基純, 羽田真悟. 2010. 乳用雌ウシにおける単胎および多胎分娩事故に関する調査結果. *産業動物臨床医誌* 1, 5-9.

岡山幸永, 植原陽, 三宅陽一, 羽田真悟, 赤塚勝功. 2011. 異性双子で繁殖性の認められた性染色体キメラ保有雌ウシの 1 例. *家畜診療* 58, 545-548

坂口実. 2009. 牛の双子—これまでの知見と留意点. *家畜診療* 56, 221-227.

Wiltbank M C, Fricke, P M, Ssangsritavong S, Sartori R, Ginther O J. 2000, Mechanisms that Prevent and Produce Double Ovulations in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science* 83, 2998-3007