

ニワトリの孵化前受精卵における簡易型分子性判別法の開発

広島大学大学院生物圏科学研究科生物資源科学専攻(家畜育種遺伝学)・准教授 西堀 正英

■ 目的

本研究は、孵化前の受精卵から生体試料を採取し、採取試料(血液あるいは組織)から簡易的(DNA抽出せず)かつ簡便(電気泳動で検出しない)に判定でき、判定個体を確実に孵化させることが可能な分子性判別法の開発を目的として実施した。さらに養鶏産業で利用できるようなシステムと低コストを実現できるような方法を開発することを目標とした。本研究において孵化前卵で雌雄判別ができれば、家畜福祉の面からもさらに効率よく雌個体のみを選抜できる可能性が期待される。また、この方法は鳥類全てに応用可能であり、絶滅危惧種や希少種などの性判別を動物園などの現場ですぐに活用できる。

■ 方法

本研究では、【検討1】ニワトリ胚の生物学的性分化の割合(性比)をしらべ、フィッシャーの生物学的性比と比較検討をした。【検討2】胚発生段階においてどの発生ステージで、血液を採取するのか、あるいは表皮以外の組織片(卵管内で母体と接触する組織はDNA鑑定試料としては不可)を採取するかを検討し、【検討3】産業的に分子性判別法を自動化可能か、について検討をおこなった。

【検討1】採卵鶏(ハクシヨクレグホーン)の受精卵を購入し、鶏飼養管理マニュアルにしたがって孵卵器に受精卵700個を入卵した。検卵後、14日以上胚発生を継続していたものについて、割卵、解剖し生殖器を観察することで性判別を行った。【検討2】産卵中のハクシヨクレグホーンメスから卵巣を取り出し、卵殻のついていない胚を成長順にならべ、その胚表面から胚子を取り出し、そこからDNAを抽出し分子性判別を行った。また、胚発生1日目から1日ごとに21日目卵までを用いて胚発生の段階と胚表面の血管の発達を調べた。各受精卵を検卵器を用いて、卵の表面の血管の位置を確認し、ミニルーターを用いて注射針の通る程度の穴(直径φ2mm)をあけ、滅菌チップを用いて採血した。採血後、メディカル(サージカル)テープで穴を保護し、孵卵を続けた。孵化後、肛門鑑別と剖検によりすべての個体の性を肉眼で判別した。採血した血液を1滴(1μL)用い、DNAを抽出せず血液からダイレクトPCRにより*CHD(chromo-helicase-DNA binding protein)1*遺伝子を増幅し電気泳動でタイピングした。用いた個体は孵化した際に、PCRで分子性判別した性と剖検の結果を照合した。【検討3】以上の流れを基本とし、自動化することを目指し、(1)*CHD1Z*と*CHD1W*のタイピングをクロマト検出(PAS_Painted-Array Strip法)を改良して行った。*CHD1Z*と*CHD1W*それぞれのPCR primerにはタグDNAを付けておいた。PAS検出では専用のペーパーに*CHD1Z*と*CHD1W*のタグDNAに対するanti-DNA strandを化学的に貼り付けておき、PCR反応液をペーパーの一端から吸収させ、PCR増幅産物タグとanti-DNA strandが結合すれば発色する試薬の基で展開した。このことからPCR産物があればクロマトペーパーが発色し、*CHD1Z*と*CHD1W*の有無が簡単かつ約15分で結果が得られるシステムを利用した。

■ 結果および考察

本研究では、コマーシャル鶏の受精卵の性比を調査し、オス：メス=1.08:1.00となりオスの方がやや多いことを見出した。胚発生段階においてどの発生ステージで、血液を採取するのか、あるいは表皮以外の組織片(卵管内で母体と接触する組織はDNA鑑定試料としては不可)を採取するかを検討し、6日目胚以降の胚の表面に発達した血管から採取した血液を用いた分子性判別では安定した判別が期待できることとともに、採血後、引き続き孵卵を続け、ヒナを得ることができていることを確認した。

■ 結語

本研究により、6日目胚以降の胚の血管から採血し、その血液を鋳型にPCRを行い、その産物をPASで検出することに成功した。本研究では、養鶏産業や研究所レベルで分子性判別法を自動化するための基礎技術としてPASを用いた迅速かつ正確な性判別法を考案し、そのシステムを構築することができた。