

## 牛の受精卵雌雄鑑別技術確立に関する研究

誌名	埼玉県畜産試験場研究報告 = Bulletin of the Saitama Prefectural Livestock Experiment Station
ISSN	02899442
著者	吉羽, 宣明 山田, 均 大竹, 通男
巻/号	27号
掲載ページ	p. 37-40
発行年月	1989年9月

# 牛の受精卵雌雄鑑別技術確立に関する研究 —H—Y抗体処理による牛およびめん羊受精卵の雌雄鑑別試験—

吉羽 宣明      山田 均      大竹 通男

Studies on Establishment of Embryo Sexing Technique in the Cattle  
Sexing of cattle and sheep embryos by H—Y antibody

Nobuaki YOSHIBA, Hitoshi YAMADA, Michio OHTAKE

畜産の分野において、生まれてくる子畜の性をコントロールできれば、効率的改良や需要に応じた性の産子の増産が可能となり、産業的、経済的意義が大きい。

現在、家畜のいわゆる雄雌の産み分け法については、精子と受精卵の両面から研究が行われている。

精子に関しては、X精子とY精子の分別やF—bodyの検出などが試みられているが、確実な方法は確立されていないようである。

受精卵においては、受精後1~2週間目に受精卵から一部の細胞を分離して性染色体を検査する方法が行われてきた。この方法は性染色体を判定できれば的中率が高い。しかし、操作が煩雑なうえ、受精卵のように細胞数が限られていると、標本の作製が困難で判定率が低い。また、受精卵に損傷を与えるため、移植後の受胎率が低い、という問題が残されている。

一方、雄の細胞に特異的に存在するHistocompatibility—Y抗原(H—Y抗原、組織適合抗原)に対する抗体を作製し、これにより受精卵の雌雄鑑別をする試みが近年なされてきた。これは、H—Y抗体を感作することにより、発育が抑制される卵(雄)と抑制されない卵(雌)に分ける方法である。この試みは、実験動物の受精卵を中心に行われている<sup>3, 4, 5)</sup>が、家畜の受精卵における報告<sup>2)</sup>は少ない。

そこでH—Y抗体を使用し、牛およびめん羊受精卵の雌雄鑑別を試みた。

## 材料および方法

### 1 供試卵

1) 牛受精卵: 当場で飼養しているホルスタイン種に対し、既報<sup>1)</sup>に準じてFSH(アントリン、デンカ製薬)24~28AUおよびPGF<sub>2α</sub>(パセナランHiまたはF、第一製薬)15mg×2で過排卵処理をした。発情発現後、適期と思われる時期に、凍結精液を用いて人工授精した。受精卵の採取は、初排卵確認日を1日目として6日目に2wayバルーンカテーテル(富士平工業)を用いて実施した。灌流液には、牛血清アルブミン1g/ℓを添加したEagle MEMまたはDulbecco's PBS(日水製薬)を用いた。

2) めん羊受精卵: 牛と同様に性周期の黄体期に、FSH18~19AUおよびPGF<sub>2α</sub>5mg×2で過排卵処理をした。発情発現中は、朝夕自然交配をした。発情発現日を0日目として5日目に開腹し、子宮角と卵管を上向き同時灌流して卵を採取した。灌流液には、Eagle MEMを用いた。

### 2 H—Y抗体

H—Y抗体は、京都大学農学部家畜繁殖学教室で作製されたもので、培養液にH—Y抗血清を混合したものである。抗体は作製後から供試前まで凍結保存した。

### 3 抗体処理方法

プラスチックシャーレにH—Y抗体の小滴をつくり、これにパラフィンオイルを重層した。そして抗体の小滴に受精卵を1個づつ入れ、CO<sub>2</sub>培養器(5% CO<sub>2</sub>、95% 空気)で培養した。培養温度は、試験回数1~6で37℃、7~10で38.5℃であった。

受精卵は、抗体処理前に25%子牛血清加Dulbecco's PBS(GIBCO, Cat. NO.310-4287)で1時間前培養した。これは、受精卵が採卵・卵検索時の物理的ショック等でシュリンクし、発育

ステージを見誤るのを防ぐためである。

#### 4 雌雄の鑑別方法

受精卵を抗体処理開始後、3時間間隔で6～9時間目（一部は15および17時間目）まで発育状態を観察した。そして、明らかに発育したもの、すなわち、処理前が桑実期であれば胚盤胞期になったもの、あるいは処理前が早期胚盤胞期であれば胚盤胞腔が拡大したものを雌とした。明瞭な発育が認められなかったものは、雄と判定した。

判定後は、20%子牛血清加Ham-F10(GIBCO.Cat.No.320-1550)で3～13時間培養し、移植または既報<sup>6)</sup>に準じて凍結保存した。

#### 5 移植

1) 牛：新鮮卵および凍結・融解卵を場内および酪農家の受卵牛に1～2個ずつ移植した。移植にはIMV Cat.No.ZA035を用い、頸管経由法で黄体存在側の子宮角に移植した。なお、農家牛の選定ならびに移植は、農業共済家畜診療所の獣医師に依頼した。

2) めん羊：新鮮卵を場内の受卵羊に1～2個

ずつ手術的に移植した。移植部位は、黄体存在側の子宮角先端で、2個の卵を移植する場合は2個を同時にマイクロピペットに吸引し、子宮角内に注入した。

なお、試験期間は昭和61年4月から平成元年3月までであった。

### 成績および考察

#### 1 雌雄の鑑別成績

牛受精卵のH-Y抗体処理成績を表1に示した。10回にわたり計53個の受精卵を処理した結果、20個が抗体中で発育し雌と判定され、19個が発育を停止し雄と判定された。他の受精卵は、2個が処理中に変性し、12個が判定不能であった。

試験回次5では、10個の受精卵を17時間処理したが変化が見られず、判定不能とした。のちに、この時に使用した抗体には、培養液中に牛血清アルブミンが含まれていないことが判明し、これが判定不能の原因と思われた。

表1 牛受精卵のH-Y抗体処理成績

試験回次	供試卵ステージ	供試卵個	抗体処理から最終判定までの時間(h)	抗体中での発育(個)			
				発育(♀)	停止(♂)	変性	判定不能
1	CM	5	9	2	3	0	0
2	EB	1	6	0	0	0	1
	CM	4	6	2	2	0	0
3	CM	5	15	2	2	1	0
4	CM	4	9	3	1	0	0
5	CM	10	17	0	0	0	10
6	CM	6	9	1	4	1	0
7	CM	4	6	2	2	0	0
8	CM	3	6	1	2	0	0
9	CM	6	9	4	1	0	1
10	CM	5	9	3	2	0	0
計	—	53	—	20	19	2	12

注) ステージ: CM…後期桑実期 EB…早期胚盤胞期

表2 めん羊受精卵のH-Y抗体処理成績

試験回次	供試卵ステージ	供試卵個	抗体処理から最終判定までの時間(h)	抗体中での発育(個)			
				発育(♀)	停止(♂)	変性	判定不能
1	M	3	9	0	0	0	3
2	EB	1	6	1	0	0	0
	CM	5	6	2	3	0	0
3	EB	1	6	1	0	0	0
計	—	10	—	4	3	0	3

注) ステージ: M…桑実期 CM…後期桑実期 EB…早期胚盤胞期

めん羊受精卵のH-Y抗体処理成績を表2に示した。3回にわたり計10個の受精卵を処理した結果4個が雌、3個が雄と判定され、残り3個は判定不能であった。判定不能の3個は、いずれも桑実期の卵で、処理前に軽度の変性があり周囲の細胞が突出していた。このため、発育を観察するのが困難であった。

雌と判定された受精卵、すなわち抗体中で発育した受精卵の発育確認時間を表3に示した。牛受精卵では9時間以内に、めん羊受精卵では6時間以内に全ての卵で発育が確認された。このことから、9時間以上抗体処理した例数は少ないものの、9時間の抗体処理で雌雄の判定が可能と推察された。しかしながら、3時間程度で発育する卵の中には、抗体が作用する前に発育を開始しているものもあるのではないかと、という疑問が残った。

また、抗体処理を開始した時点での受精卵の発育ステージは、ほとんどが後期桑実期であったが同一試験回次でも微妙に発育程度の差があった。これらの卵を同時に抗体処理開始してもさしつかえないのか、今後検討する必要があると思われた。

表3 発育受精卵の発育確認時間

畜種	発育卵数	抗体中での培養時間					
		3	6	9	12	15	17(h)
牛	20	5	11	4	0	0	0
めん羊	4	1	3	0	-	-	-

更に、発育の目安となる胚盤胞腔の形成は、通常の正常受精卵のものに比べ不明瞭であり、発育の確認は容易ではなかった。

## 2 雌雄鑑別卵の移植、分娩成績

雌雄鑑別卵の移植、分娩成績を表4に示した。牛においては、5頭に雌と判定された新鮮卵を1個ずつ、2頭に雌と判定された新鮮卵を2個ずつ、1頭に雄と判定された新鮮卵を1個移植した。また、5頭には雌と判定された凍結・融解卵を1個ずつ移植した。

この結果、新鮮卵を1卵移植した2頭が受胎し、1頭が判定どおり雌の産子を生産した。残りの1頭は妊娠中である。また、新鮮卵を2卵移植した1頭が受胎し、判定どおり雌の双子を生産したが、1頭の産子は死産であった。これは、助産の処置が遅れたためと思われる。凍結・融解卵を移植した5頭は、いずれも不受胎であった。この原因は抗体処理およびその後の培養により、受精卵がある程度傷害を受け、更に凍結・融解時の傷害が加わったためと考えられた。

めん羊においては、受卵羊4頭のうち3頭に雌と判定した新鮮卵を移植した。この3頭中2頭は1卵、1頭は2卵移植であった。残りの1頭の受卵羊には雄と判定した新鮮卵1個を移植した。

この結果、3頭が受胎し3頭の産子を生産したが、判定が的中したのは2頭であった。判定が的

表4 雌雄鑑別卵の移植・分娩成績

畜種	畜名	受卵畜				移植卵	妊娠	産子	備考
		産歴	性周期	試験回次	新/凍				
(日)									
牛	1	2	6	1	凍結	♀	—	—	
	2	5	5	2	新鮮	♀	+	♀51.0 Kg	
	3	未	7	3	凍結	♀	—	—	
	4	5	7	3	"	♀	—	—	
	5	未	6	4	"	♀	—	—	
	6	5	7	4	"	♀	—	—	
	7	1	7	6	新鮮	♀	—	—	
	8	2	7	7	"	♀	—	—	農家牛
	9	2	8	7	"	♂	—	—	"
	10	2	7	9	"	♀♀	—	—	
	11	1	8	9	"	♀♀	+	♀2頭	31.40 Kg
	12	未	7	10	"	♀	—	—	
	13	未	6	10	"	♀	+	—	妊娠中
めん羊	1	不明	6	2	新鮮	♀♀	+	♀1.3 Kg	単子死産
	2	1	4	2	"	♀	—	—	
	3	2	6	2	"	♂	+	♂4.4 Kg	
	4	2	6	3	"	♀	+	♂6.0 Kg	死産

中した2頭は後期桑実期から抗体処理を始めた卵を移植した例であった。一方、的中しなかった1頭は早期胚盤胞期から処理開始した例であった。したがって、処理開始時の卵のステージと何らかの関連があるのか、今後検討する必要があると思われた。

3頭のめん羊産子のうち、2頭が死産であった。1頭(№4)は分娩時の胎位が尾位であったためと思われた。他の1頭(№1)は在胎日数が137日で正常範囲であったが、過小胎児(1.3kg)であり、このための死産と考えられた。過小胎児と抗体処理の関係は不明であった。

牛およびめん羊を合わせた雌雄鑑別の的中率は、83.3%(5/6)であった。また、例数が少ないが鑑別した新鮮卵の受胎率は、牛で37.5%(3/8)とやや低いが、めん羊では75%(3/4)であり、通常の受精卵移植と差がないものと推察された。

以上のことから、H-Y抗体処理によって受精卵を雌と雄に分類することができ、これらの卵を移植することによって、比較的高い率で希望の性の産子を得られることが確認された。しかし、抗

体処理の簡易化、的中率および受胎率の向上等について検討しつつ、雄と判定された卵を含めた移植例数を増やす必要があると思われる。

終わりに、H-Y抗体を提供して下さった、京都大学農学部家畜繁殖学教室の内海恭三助教授に深謝の意を表します。

## 文 献

- 1) 大竹通男、吉羽宣明：埼玉試研報、24, 48~50, 1986.
- 2) 佐藤英介、内海恭三、湯原正高：日本畜産学会第75回大会講演要旨、119, 1984.
- 3) 佐藤英介、田誠、内海恭三、湯原正高、山田雅保：日本畜産学会第77回大会講演要旨、87, 1985.
- 4) 内海恭三、湯原正高：昭和56年度秋季家畜繁殖研究会講演要旨、12, 1981.
- 5) 内海恭三、湯原正高：日本畜産学会第73回大会講演要旨、69, 1982.
- 6) 吉羽宣明、長妻義孝、大竹通男：埼玉試研報 23, 9~14, 1985.