

マウス及びウシ胚の染色体分析による性判別の検討

大久 範 幸・堀 内 俊 孝

(宮城県畜産試験場)

Sexing of Mouse and Bovine Embryos by Chromosomal Analysis

Noriyuki OHISA and Toshitaka HORIUCHI

(Miyagi Prefectural Experiment Station of Animal Husbandry)

1 はじめに

酪農家にとって雌子牛を得ることは、経営上重要な問題である。

最近、牛受精卵移植技術の発展にともない、染色体分析法で性判別された二分割胚の移植により、期待する性の産子が得られることが報告されている。しかし、初期胚の染色体分析法はまだ確立されておらず、その分析率も低いのが現状である。

今回、マウス初期胚及び二分割胚を中心に、一部ウシ胚を用い、染色体分析による性判別法を検討したので報告する。

2 材料及び方法

ICR系雌マウスを用い、PMSG7.5IUを皮下注射、次いで48時間後にhCG 10IUを腹腔内注射し、過剰排卵誘起法後、同系の雄マウスと交尾させた。腔栓確認を受精第1日目 (Day-1) とし、Day-4の朝PB1で子宮を灌流し、胚盤胞のみを供した。

一方、ウシでは、発情後9~14日目の黄体期に、PMSG 1800~2000IUを筋注し、3日後の朝夕2回PGF2 α を24mg・12mgを筋注し、過剰排卵誘起を行った。次いで発情を確認した後、LH-RHを200~400 μ gを投与し、12と24時間後に2回人工授精を行った。発情日を0として、7日目に修正ダルベッコウのリン酸緩衝塩類溶液で非外科的に子宮を灌流し、ウシ胚を回収した。形態的にB~Cランクの胚盤胞を試験に用いた。

図1に今回実施した染色体分析法を示した。マウス胚盤胞、及び分割胚は、0.04 μ g/ml コルセミド添加 Ham's F10 (20% 非働化子牛血清添加) で、38 $^{\circ}$ C 5% CO $_2$ を含む空気相下で2時間培養した。次いで、0.4% プロナーゼで透明帯を弱化させ、マウス胚は、60% 牛胎児血清中で、ウシ胚は3% 血清加0.9% クエン酸ナトリウムでそれぞれ低張処理を行った。

染色体標本作製は、美甘らの漸進固定・空気乾燥法²⁾に従い実施した。低張処理後の胚は、第1固定液で5分間固定し、充分洗浄したスライドガラスに付着させ、第2固定液を静かに流し胚の細胞群を平らに拡げ再固定した。次いで、第3固定液で1分間固定し、細胞質を柔らかくした。固定処理後、温湿風乾燥装置により適度の湿度を含んだ温風で乾燥の後、25倍希釈ギムザ液で染色した。作製した標



図1 染色体分析法

本について核数と中期核板数を調べ、マウスについては、StichとHsuの方法⁴⁾に従って性別を判定した。

3 結 果

図2に雌と判別したマウス胚盤胞の中期核板と核型分析したものを示した。常染色体19対とX性染色体が2本認められた。図3に雄と判別したマウス胚の中期核板と核型分析したものを示した。常染色体19対とX性染色体及びY性染色体が認められた。

表1にマウス胚盤胞及び二分割胚を分析した結果を示した。71個の胚のうち、62個で中期核板が確認され1個当たりの中期核板数は6.5個、分裂指数20%、性判別した胚数は36個(51%)で、内訳は雌27個、雄9個であった。

一方、二分割胚では、分析した59個のうち47個に中期核板が見られ、1個当たりの中期核板数は約3.3個、性判別した胚数は27個(47%)で、雌11個、雄16個であった。図4に雌及び雄と判別したウシ胚の中期核板像を示した。

表2にウシ胚を分析した結果を示した。分析した8個のすべてに中期核板が確認され、1個当たりの平均中期核板数は4.9個、分裂指数は7%、性判別できた胚は5個(62%)で、内訳は雌2個、雄3個であった。

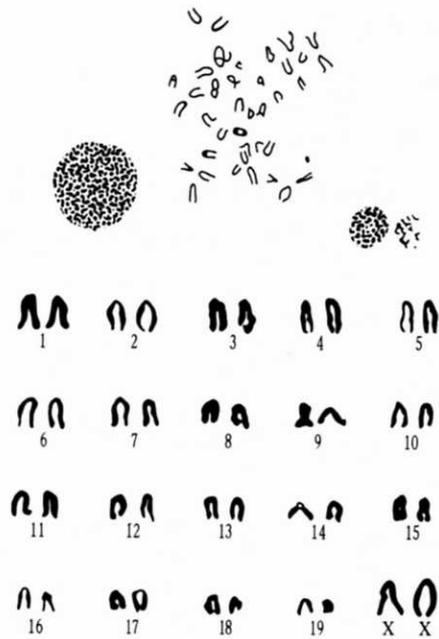


図 2 雌マウス胚の核型分析



図 3 雄マウス胚の核型分析



図 4 ウシ胚の中期核板像

4 考 察

本研究では、マウス胚盤胞及び二分胚を中心に、一部ウシ胚を用い、美甘らの方法に準じ染色体標本作製し性別判定を実施した。その結果、マウス胚は、約50%で性別判定が可能で従来³⁾より高い判別率であった。しかし、二分胚では、中期核板数が約半数に減少し、染色体像の得られない胚が増加した。二分胚での性別判定率を高めるためには、培養条件及び細胞分裂を刺激する物質の添加などの検討が必要と思われる。一方、ウシ胚では、60%と高率に性別判定が可能だったが、染色体は、Hishinuma *et al*¹⁾の報告と同様、全体的に萎縮する傾向がみられた。そのため、性別判定の精度を高めるためにはウシ胚では、コルセミド濃度や他の細胞分裂阻止剤の検討を要するものと思われる。

引 用 文 献

- 1) Hishinuma, M. ; Kanagawa, H. ; Utaka, K. ; Sakai, M. ; Teranishi, M. ; Seike, N. 1984. Chromosomal sex determination of bovine embryos. *J. Mamm. Ova. Res.* 1:169-176.
- 2) 美甘和哉. 1977. 哺乳類卵子および未着床胚の染色体観察と分析. *臨床産婦人科* 31:1137-1141.
- 3) 中川 明, 高橋芳幸, 金川弘司. 1985. 染色体検査によるマウス二分胚の性別判定. *哺乳卵研誌.* 2:79-82.
- 4) Stich, H.F. ; Hsu, T.C. 1960. Cytological identification of male and female somatic cell in the mouse. *Exp. Cell Res.* 20:248-249.

表 1 マウス胚盤胞及び分割胚の染色体分析による性別判定

供試卵	分析卵数	中期核板確認卵数(%)	中期核板数	分裂指数*	性別判定可能卵数	
					総計(%)	雌雄
胚盤胞	71	62 (87)	6.5±0.8	20.8±2.9	36(51)	27 9
分割卵	59	47 (80)	3.3±0.4	12.7±2.3	27(46)	11 16

注. *中期核板数/総核数

表 2 ウシ胚の染色体分析による性別判定

分析卵数	中期核板確認卵数(%)	中期核板数	分裂指数*	性別判定可能卵数	
				総計(%)	%雌雄
8	8 (100)	4.9±1.1	7.4±1.3	5(62)	2 3

注: *中期核板数/総核数