Application of F-body Test and Percoll Density Gradient Centrifugation in Separating Boar X- and Y-bearing Spermatozoa

Satoru OHTANI, Hirohito YAMAKAWA, Shiichi NISHIDA,
Tetsurou MATSUMOTO*, Hiroshi NAGASHIMA**,
Yasuhiko KANOU and Shyoso OGAWA

*Dept. of Animal Reprod. Meiji University, 1-1-1 Higashimita,
Tamaku, Kawasaki, 214*

**Tokyo Metropolitan Livestock Experimental Station*

***Research Center of Nisshin Flour Milling Co. Ltd.*

(Accepted for publication November 30, 1987)

Summary. An attempt was made to separate X- and Y-bearing sperms from the washed boar sperm suspension, applying the Percoll density gradient centrifugation and the method of the detection of F-body in the sperms. Seven gradients Percoll solutions (30~75%) were layered successively in the centrifuge tube, and 1.4 ml aliquots of washed sperm suspension were loaded on the gradients. Then they were centrifuged at $250\times g$, for 5, 10 or 15 minutes at $23\pm 3^{\circ}\text{C}$, respectively. After centrifugation, each 0.2 ml of the fractions was collected from the interfaces of each gradient and bottom of the tube. Concentration and motility of sperms in the fractions were determined with the light microscope and F-body of them were detected by the quinacrine mustard fluorescent staining method with the fluorescence microscope. The microscopic observations revealed that; (1) The content of F-body bearing sperms in the fractions obtained from middle layers was the highest showing from 39.7 to 55.1% ($48.9\pm 5.6\%$) at 10 min. centrifugation. The incidence of F-body decreased gradually toward the fraction of the bottom of the tube reaching from 7.6 to 13.7% ($10.1\pm 2.1\%$) at the lowest rate, and (2) the sperm in the bottom of the tube after centrifugation, showed active motility nearly same as unfractionated semen. From these results, it is suggested that a fraction containing a dense X-bearing sperm with active motility could be obtained by applying the centrifugation in density gradients composed of Percoll solutions. **KEY WORDS:** SEPARATION OF X AND Y SPERMS, BOAR SPERMS, F-BODY.

Jpn J Anim Reprod 34, 31-38, 1988

豚の X と Y 精子の分離における F-body の検出試験 ならびに Percoll 密度勾配遠心分離法の適用

大谷 悟・山川 宏人・西田 司一*・松本 徹郎**
長嶋比呂志***・加納 康彦・尾川 昭三

明治大学農学部 214 神奈川県川崎市多摩区東三田 1-1-1

*元東京大学農学部 177 東京都練馬区立野町 7-3

**東京都畜産試験場 198 東京都青梅市新町 715

***日清製粉(株)中央研究所 354 埼玉県入間郡大井町鶴ヶ岡 5-3-1

ヒト男性のリンパ細胞のキナクリン蛍光染色により、主としてY染色体に蛍光小体 (F-body) の検出されることが知られている (Zech, 1969; Barlow and Vosa, 1970; George, 1970; Laberge and Gagne, 1971; Pearson *et al.*, 1971)。この F-body はヒト男性の頰粘膜細胞の interphase 核 (Pearson *et al.*, 1970) や精子頭部 (Barlow and Vosa, 1970; Pawlowitzky and Bosse, 1971) にも検出されている。Barlow and Vosa (1970) はこの F-body を有する精子はY染色体精子であり、これを欠く精子をX染色体精子であると推論した。現在ではこの推論は妥当だと考えられていて、ヒトのY染色体精子の識別には F-body が指標として用いられるようになった。Pearson *et al.* (1971) は24種の哺乳動物のリンパ細胞についてキナクリンマスタード (Q-M) 染色を施して F-body の検出を行い、F-body はヒトとゴリラの細胞のみ認められたと報告した。

一方、Bhattacharya (1976) はウシおよびウマの精子にもヒト精子の F-body と同様なものが存在することを報告し、この精子をY染色体精子と結論している。以来10年以上を経過したが、その間、この Bhattacharya の知見を支持する研究報告は全く見当たらない。依然として F-body はヒトや一部の霊長類のY染色体精子に特有なものであるとの考え方が支配的である。

ごく最近になって我々は家畜や小実験動物精子に F-body を検出し、そしてこの F-body は哺乳動物に共通して検出され得るものと推察した (Ogawa *et al.*, 1987a, b)。さらに我々はこの F-body はブタ、イヌの雄のリンパ細胞や雄マウスの骨髓から採取した細胞の interphase 核にも検出することに成功した (Ogawa *et al.*, 1987c)。これらの報告より、F-body の検出法は、多くの哺乳動物のY精子の同定法として適用できる可能性を示唆している。

Kaneko *et al.* (1983, 1984) はヒト精液を Percoll の密度勾配に積層させて遠心分離し、得られた分画中の精子の Q-M 染色によって F-body を検出した結果、管底部にX精子を高濃度に含有する試料を得たと報告した。

我々はブタ精子浮遊液中のX、Y精子の分離が可能か否かを調べる目的で、この Percoll 密度勾配遠心分離を行い、これによって得られた各分画について精子の運動性を調べると共に、それらの精子に Q-M 染色を施し、X、Y精子の同定を行った。その結果、精子を高濃度に含有し、さらにその組成に占めるY精子の比率が著しく小さい分画が得られた。

材料と方法

豚精液: デュロック5頭、ランドレース2頭ならびに大ヨークシャ1頭の種雄豚 (東京都畜産試験場繁養種豚) から人工陰によって採取した。射精開始後2分以内の濃厚精子部分 (通常60~100 ml 程度) を採取した。膠様物質を除去し、直ちに豚精液希釈保存用 M-18 (武田薬品) により2~3倍に希釈し、24時間で10℃前後、30~48時間で5~6℃になるよう冷却し、5~6℃の冷蔵庫中で保存した。これらの保存精液は採取日から1週間以内に実験に使用した。

精子の洗浄: 前記の方法により保存された希釈精液を遠心分離によって洗浄した (精子の F-body の検出においては、粒子状夾雑物が混入しない、よく洗浄された精子を用いる必要がある)。すなわち、遠心管 (内径31 mm, 全長100 mm) に希釈精液40 ml を移し、37℃の微温湯中で約5分間加温した後、80×g で5~10分間遠心分離した。これにより精液中に含有する大型の夾雑物はほぼ管底部に沈降させることができた。上層部の精子含有部分を採取した。この試料の精子性状を家畜精子、農研式精液性状検査板 (FHK) を使用して鏡検した。その結果より、(1)各精子の輪郭が鮮明で微細な夾雑物が極めて少ないと認められた場合は、直ちに上清精液区分を次記の密度勾配遠心分離に移した。一方、(2)微細な夾雑物が依然として多い場合は、更に Ficoll-Paque (Pharmacia) による洗浄処置を行った。すなわち遠心管 (内径13 mm, 全長100 mm) に Ficoll-Paque 3 ml を移し、その液面上に前記の上清精液区分4 ml を静かに積層し、これを200×g で5~10分間遠心分離した。このようにして、Ficoll-Paque と精液層との境界面に、夾雑物の極めて少ない精子浮遊液が得られた。この液に含まれている Ficoll-Paque を除去する必要があるため、採取された清浄精子浮遊液について2~3倍量のダルベッコの PBS (Dulbecco and Vogt, 1954) を加えて遠心分離 (200×g, 5分間) した。上層液区を棄却し、残る沈澱精子部分について再度2~3倍量の PBS を加えて混和し、同様の遠心分離を行った。このようにして得られた沈澱精子部分を最終洗浄精子として用いた。

精子の分離用 Percoll 密度勾配: Percoll (Pharmacia) 原液に種々の濃度の Ham F₁₂ (Ham, 1965) 液 (日本製薬) を加えて、Percoll 濃度が30, 40, 50, 60, 65, 70, 75%の7種類の溶液を作製した。これら溶液の pH は HEPES を用いて 7.3~7.4 になるよう調製され、結局それらの浸透圧は 280~320 mOsm/kgH₂O の生理的条

件下範囲にあるように調製された。これらの Percoll 各濃度液の各々 0.7 ml ずつを遠心管 (内径 16 mm, 全長 100 mm) の底部から上方に向かって最初に 75% Percoll を置き、液の濃度差が 5% ずつ薄くなるように、60% Percoll まで積層した。さらにその上に濃度差が順次 10% ずつ薄くなるように、最上層が 30% Percoll になるまで積層し、7 段階の密度勾配を作製した。この密度勾配の最上層 (30% Percoll) の液面上に、先述の洗浄処置を施した精子浮遊液 (精子濃度: $1.7 \sim 2.3 \times 10^8$ /ml PBS) 1.4 ml を密度勾配を崩さないように静かに積層した (Fig. 1-a)。

Percoll 密度勾配による精子の遠心分離ならびに分画採取法: 同一の洗浄精子試料の内、それぞれ所定量 (1.4 ml ずつ) を 3 本の遠心管の密度勾配に積層し、残りの一部は対照実験として遠心分離せず、F-body を有するものの率 (%) を算出した。これら 3 本の遠心管を $23 \pm 3^\circ\text{C}$ の条件下で、スウィングローターを用いて $250 \times g$ で 5 分、10 分および 15 分間遠心分離した『このような遠心分離により、ヒト精子では Percoll 各濃度液の境界面および管底に分布することが認められている (Rohde *et al.*, 1975; Kaneko *et al.*, 1983)。我々も、精子の分布状態を示すと考えられる懸濁帯状層が Percoll 各濃度液の境界面に、また、管底部では白色沈澱層を認めた。このため本実験では各分画に分布した精子を Percoll 液を含んだまま採取する方法を採用した』。遠心管 (ポリスチレン製) 側壁における Percoll 各濃度液の境界面に相当する箇所 (計 7 箇所) にあらかじめ小孔をあけておき、その小孔すべてを塞ぐため、遠心管外側から粘着テープで密封した。テープの上から小孔のある位置がわかるように印を付けた。遠心分離後ただちに上記の遠心管の各印から注射針 (18G $\times$ 1 1/2" T. w.) を水平方向に穿刺して、各分画部分の試料 (Percoll 各濃度液の境界面および管底部の液分を示す) 0.2 ml ずつを、1 ml 注射筒によって吸引採取した。採取は上方界面から順番に下方に移動した (Fig. 1-b)。これら全分画 (計 8 部分) 試料の採取には、2~3 分間を要した。これら 0.2 ml の各試料について、0.1 ml は F-body 検出用に、残りの 0.1 ml は精子濃度および精子活力の検査に使用した。

各分画の精子濃度、精子活力の検査ならびに F-body の検出: 各分画から採取された試料について Percoll 液の除去をせず、そのまま精子濃度、精子活力の検査および F-body の検出を行った。精子濃度の検査にはトーマ氏血球算定盤を使用し、精子活力検査には農研式精液性状検査板を使用し、各々常法に従って顕微鏡下で検査し

Fig. 1. a) Diagram of seven gradients Percoll solutions loaded with washed sperm suspension. b) Diagram of recovery of the sperms after density gradient centrifugation. A 18G $\times$ 1 1/2" T. w. hyperdermic needle, attached with tuberculin syringe, was introduced into the tube along with the place of each gradients border (arrowed) from the point marked previously on the adhesive tape covering the pinholes bored on the wall of the tube, and 0.2 ml of the fraction containing sperms at interface (arrowed) of each gradients was withdrawn.

て、得られた各々の値を記録した。F-body の検出は Ogawa *et al.* (1987 a, b) の方法に従った。すなわち、各分画より得られた試料の精子濃度が 5×10^7 /ml になるように PBS で希釈し、調整した (すでに 5×10^7 /ml 以下の分画試料についてはそのまま使用)。この試料についてディスパーゼ (2000 P. U./ml; 合同酒精) によるタンパク消化処理と、Q-M 液 (0.005% 濃度; Sigma) による染色処理とを施した。次いで Q-M 染色を 40 分あるいは 100 分間行った後に検体を落射型蛍光顕微鏡 (BH 2 RFL, オリンパス光学; B 励起フィルター, 吸収フィルター: O 515) を用いて鏡検した。各分画から得た試料それぞれにつき 200 個の精子を数え、その頭部に F-body を有するものの率 (%) を算出し、表示した。

対照群の F-body 出現率は、洗浄精子浮遊液を 75% Percoll で 5×10^7 /ml に希釈した後、上記と全く同じ方法を用いて算出した。

結 果

洗浄処置により夾雑物の混入が極めて少ない精子試料は、遠心分離直前では濃白色の帯状となって最上層 (積層部) に認められた。これが遠心分離の経過時間とともに下層の界面および管底に移動し、濃淡が異なる幾つか

Fig. 2. Distribution profile of sperm after Percoll density gradient centrifugation. a) 5 min.
b) 10 min. c) 15 min.

Table 1. The lowest incidence of F-body of sperms in the collected fractions

Donor	Fraction no. ^{a)}	Centrifugation at 250×g (min.)	Incidence of F-body (%)	Sperm concentration (×10 ⁷ /ml)	Sperm motility (###, %) ^{b)}	Incidence of F-body (control) ^{c)} (%)
1	8	10	7.9	14.0	65	42.1
2	7	10	12.4	6.8	60	41.0
3	8	10	9.0	7.0	30	45.9
4	8	10	9.5	9.2	50	37.5
5	8	10	7.6	51.5	50	33.3
6	8	10	9.6	21.0	50	38.1
7	8	10	13.7	19.5	60	41.0
8	8	10	11.1	16.5	60	42.6
10.1±2.1*						40.2±3.8*

a) Fraction no.(refer to Fig. 1).

b) Percentage of the sperms showing the progressive movement(###).

c) Sperms diluted in 75% Percoll solution.

* MEAN±SD

Fig. 3. Change of the content of F-body-bearing sperms and the population of sperm (three specimens; donor A, B, C) in various fractions after 5, 10, 15 min.-density gradient centrifugation in Percoll.

The percentage of the F-body bearing sperm was not determined in the fractions collected from upper layer at 10 min. after centrifugation and from upper and middle layers at 15 min. after centrifugation, because few sperms were found there.

の懸濁带状層および沈澱を形成するのが認められた (Fig. 2-a~c)。

遠心分離後にこのような各界面および管底部から採取された試料に含まれる精子濃度ならびに F-body 出現率には、個体による差異が認められた (Fig. 3)。しかしながら Table 1 が示すように、供試した 8 例の全例にお

いて、遠心分離 10 分後の管底部ならびに一部の個体では 70% と 75% Percoll との境界面に、F-body 出現率の非常に低い ($10.1 \pm 2.1\%$ (平均値 $\pm$ SD) 範囲 7.6~13.7%) 精子分画が得られた。なお、これらの対照群 (遠心分離処置前) の F-body 出現率は $40.2 \pm 3.8\%$ (33.3~45.9%) であった。

遠心分離の経過時間 (5~15 分間) に伴う密度勾配の各分画 (Fig. 1 に示した分画番号参照) における精子濃度および F-body 出現率の推移には先述の如く個体差がみられたが、それらの代表的な 3 例を Fig. 3 に示す。遠心分離 5 分後 (Fig. 3-5 min.) では、いずれの例においても大部分の精子は分画番号 3~5 の中層部に存在し、管底部にはほとんど沈降していなかった。また分画番号 1~8 の各分画採取試料間では F-body 出現率に極端な差異は認められなかった。遠心分離 10 分後 (Fig. 3-10 min.) では、多くの精子は分画番号 4~6 の中層部に移行しており、また管底部にも高濃度の精子が認められた。この中層部の分画 (分画番号 5) で得られた試料の F-body 出現率は、39.7~55.1% の範囲であった (Figs. 3 & 4-a)。一方、これより下層の分画では F-body 出現率が低下した。特に管底から得られた試料では、精子濃度が高い ($7.0 \sim 51.5 \times 10^7/\text{ml}$) にもかかわらず、F-body 出現率は極めて低く、7.6~9.6% を示した (Figs. 3 & 4-b)。さらに 15 分間の遠心分離 (Fig. 3-15 min.) により管底部での精子濃度はいずれの例においても急激に増加した。しかしながら遠心分離 10 分後の管底部で極めて低かった F-body 出現率は、ここでは 28.9~39.7% と増加する傾向がみられた。

一方、このようにして採取された各分画の精子活力は

Fig. 4. Micrograph showing the highest incidence (a) and the lowest incidence (b) of the F-body (arrowed) bearing sperms after Percoll density gradient centrifugation for 10 min..

(a) in the fraction collected from the middle layers of the gradients.

(b) in the fraction collected from the bottom of the tube.

遠心時間の経過とともに変化した。精子濃度の高い分画では精子活力も高い傾向が認められ、例えば遠心分離5分後の中層部の分画では精子濃度が高く、これらの分画試料中の精子活力は $\#30 \sim \#65$ の範囲にあり、最も活発な前進運動精子の多いことを示した。遠心分離10分あるいは15分後になると上層部や中層部からの分画中では精子濃度が減少すると同時に、含まれている精子の活力が明らかに減退し、 $-100 \sim \#20$ の範囲を示した。一方、管底部から得られた試料では、精子濃度が高いと同時に精子活力も良好で $\#30 \sim \#70$ の運動性を示した。これは遠心分離直前の精子活力とほぼ同じであり、精子活力が極めて良好に維持されていることを示している。

洗浄処置を施しても夾雑物が依然として多く含まれた精子試料について、一例だけではあるが、Percoll 密度勾配遠心分離をおこなった。この試料では、遠心分離前の鏡検の結果、大多数の精子は夾雑物に凝集あるいは吸着されていて、遊離遊走する精子が少ない性状を示した。遠心分離5分後で50%と60%Percoll との境界面に濃白色の帯状層が形成され、これより上層のPercoll 液は白濁していた。この白濁部には運動精子が存在したが、夾雑物と混在して、一部はこれに凝集しているものが認められ正確な精子の性状検査には不適當であった。一方、白色帯状層より下層部の分画は透明であった。この部分から採取した試料には精子が全く存在しなかった。この白色帯状層を採取して鏡検した結果、夾雑物と精子が凝集し、一種のペレット状を呈していた。15分間の遠心分離では、この白色帯状層は若干下方(60%と65%Percoll との境界面)に移動した。しかしながらこれより上層部あるいは下層部の精子分布状態は、依然として遠心分離5分後のものと大差がなかった。このように、豚精液では夾雑物を多く含んだ精子試料をX、Y精子分離の目的でPercoll 密度勾配遠心分離に供するには不適當と判断された。

考 察

Rohde *et al.* (1975)はショ糖不連続密度勾配にヒト精子を積層し超遠心分離を行うと、精子は各密度界面に分布し、それらの精子をキナクリンマスタード(Q-M)染色によるF-bodyの検出法で測定すると、上方ではY精子が多く、下方に向う程X精子が増加すると報告した。しかしショ糖を用いた密度勾配ではその高浸透圧のためにヒト精子の生存性が著しく阻害されることが知られている(Rohde *et al.*, 1975; Kaneko *et al.*, 1983)。そのためKaneko *et al.* (1983)は修飾コロイド状シリカゲ

ル、パーコール(Percoll)の密度勾配を作製し、遠心分離によりヒトのXとY精子の分離を試みた。その結果、(1)このようにして得られた各分画の精子は活発な前進運動を示し、(2)Q-M染色法を用いて、分離された各分画のY精子比率を求めると、Percoll 密度の上昇に伴って減少して、密度1.11 g/ml以上の分画では約27%となった。彼ら(Kaneko *et al.*, 1984)はPercoll 密度層をより細かくして、遠心時間や遠心速度などの条件を検討した結果、250×g、30分間の遠心分離操作で、積層した精子のうちおよそ25%を管底から回収した。そして、その約94%がX精子で占められていることから、X精子はY精子より沈降速度が大きいと報告した。

本研究に用いた豚精液のPercoll 密度勾配遠心分離5分間の処置により(Fig. 3-5 min.), 得られた各分画間において、F-bodyを有する精子の率に大きな偏りは認められなかった。中層部の分画にはF-body出現率のやや高いものもあったが、各例では一致せず、一定の傾向がみられなかった。これに対し、10分間の遠心分離では(Fig. 3-10 min. および Table 1), 殆んどの試料において、F-body出現率の極めて低い($10.1 \pm 2.1\%$)分画が最下層(管底部)に集積した。我々はヒト精子の場合と同様に、F-bodyを有する精子はY精子を示し、F-bodyを欠く精子はX精子であると一応推定している。10分間の遠心分離により管底部でF-body出現率の低い精子分画が得られたことは、比重の大きいX精子が集積されたものと推定される。換言すれば、比重の大きい精子(X精子)はF-bodyの染色反応を示さないものと考えられよう。したがって、X精子がPercoll 密度勾配遠心分離法で分離されたと考えるのが妥当であろう。この結果は、ヒト精子のPercoll 密度勾配遠心分離によって高比率のX精子分画を得たとのKaneko *et al.* (1984)の報告と一致している。そして、動物種は異なるけれども、豚精子においてもヒト精子と同様な処置でX精子の比率の高い分画が得られる可能性が示唆された。なお、このF-body出現率の最も低い分画における精子濃度は個体によりかなり差異があり、必ずしも一定していなかった。これには採精用種豚の個体差、例えば精液中の夾雑物の性状や、その含有量の多寡などが関係しているものと推定される。さて遠心分離時間がさらに続いて15分間に至ると(Fig. 3-15 min.), 各分画間におけるF-body出現率には大きな差がなくなった。管底部でもF-body出現率の極端に低い分画(10分間の遠心分離で得られたような)は生じなかった。このような現象は遠心分離10分後で一度は管底部にX精子が高比率に得られたものの、これよ

り上層に接近して存在したX、Y精子が、15分間の遠心分離に伴い、ともに管底部に沈降して集積したためと推定するのが妥当であろう。

以上の結果から、この Percoll 密度勾配遠心分離による、F-body を欠く精子、すなわちX精子と推定されるものと、F-body を有するY精子と推定されるものの分離は；(1)それぞれが異なる密度界面で沈降平衡に達することによって生じるのではなく、(2)XとY精子の沈降速度の差に基づいて遠心分離時間に伴って生じる過渡的な現象であり、そして(3)X、Y精子の密度差がごく微小であるため、ごく限られた遠心分離時間でのみ効果的な分離が起こるものと考えられる。

したがって本実験で用いた方法によりX、Y精子の分離を行うに際しては、その分離効果を左右する要因として、Percoll 密度勾配の形状や遠心分離の速度（回転数）のみならず、遠心分離時間が挙げられる。効果的な分離を行うためにはこれらの個々の要因やそれらの相互関係、処置温度のみならず分離精子分画の採取法についても更に検討する必要がある。

次に洗浄処置後も依然として夾雑物の多い試料の Percoll 密度勾配遠心分離の結果では、X、Y精子の分離は不可能であった。この試料では先述の如く、精子は夾雑物に凝集された状態のものが多く、個々に遊離している精子は意外に少なかった。このため遠心分離を開始すると、まず夾雑物に吸着された凝集精子が沈降して中層部界面にペレット状に層を形成したものと考えられる。中層部の濃白色の帯状層の形成はこのことを示すもので、後から沈降してくる遊離した精子はここで沈着して、それ以下の層への沈降が不可能となる結果、精子の移動や分離ができなかったものと判断される。

本法によるX、Y精子の分離操作では極めて微小なX、Y精子の密度差を問題にする点から、多くの精子に付着物があつたり、精液中に夾雑物が多く存在すると、目的の分離は達成されないことになるわけである。Percoll 密度勾配遠心分離の前処置として、精液中の精子以外の夾雑物を完全に除去することが理想的であるが、その場合に、精子濃度や精子活力の低下を招来しないことが重要な点であろう。

本実験で用いた Percoll 密度勾配遠心分離によって精子の活力が低下するかどうかが問題である。いずれの遠心時間（5～15分間）においても精子濃度の高い分画部の精子は活力が高く、例えば遠心分離15分後においても管底部の高濃度の精子では運動性が高かった。さらに遠心分離10分後での F-body を欠く精子比率の高い分画部の

精子活力も極めて良好であり (Table 1), 積層時とほとんど変わらないことを示した。これらの結果から Percoll 密度勾配遠心分離による精子活力の低下は極めて少ないものと判断される。

Q-M 染色による豚精子の F-body の検出がヒト精子と同じように可能になったことから、本実験では F-body を欠く精子群は、これを有する精子群に比して比重が高く、遠心分離による沈降速度が速いことが判った。この事実、既述の如くこの F-body を欠く精子はX精子の可能性の高いことを強く示唆している。この F-body の有無によりYおよびX精子を同定する方法はヒト精子に適用されているが、依然として推論の域を出ず、必ずしも実証されているとは考えにくい。本実験では、F-body を欠く精子濃度の高い分画が得られ、しかもこの分画中の精子は活発な運動を示した。このことは、実験に供した動物種は異なるけれども、前記の推論を確かめるためにも極めて重要な意義を有するものと考えられる。このような精子群の授精操作を通じて得られた性比によってはじめて、F-body 有無によるX、Y精子の同定法の妥当性の有無が判定されるものと期待される。

References

- Barlow P, Vosa CG (1970) The Y chromosome in human spermatozoa. *Nature* 226: 961-962.
- Bhattacharya BC (1976) Pre-determination of sex in animal reproduction. *Proc 8th Intn Cong Anim Reprod Art Insem* 4: 876-878.
- Dulbecco R, Vogt M (1954) Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J Exp Med* 99: 167-182.
- George KP (1970) Cytochemical differentiation along human chromosome. *Nature* 226: 80-81.
- Ham RG (1965) Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined, synthetic medium. *Proc Nat Acad Sci* 53: 288.
- Kaneko S, Yamaguchi J, Kobayashi T, Iizuka R (1983) Separation of human X- and Y-bearing sperm using Percoll density gradient centrifugation. *Fert Steril* 40: 661-665.
- Kaneko S, Osio S, Kobayashi T, Mohri H, Iizuka R (1984) Selective isolation of human X-bearing sperm by differential velocity sedimentation in Percoll density gradients. *Biomed Res* 5: 187-194.
- Laberge C, Gagne R (1971) Quinacrine mustard staining solves the length variations of the human Y chromosome. *Johns Hopkins Med J* 128: 79-83.
- Ogawa S, Yamakawa H, Yamanoi J, Nishida S, Takeshima T, Matsumoto T, Tauchi Y, Nagashima H, Kanou Y (1987 a) Detection of fluorescent body

- in spermatozoa of bull, boar, dog, rabbit, rat and mouse. *Jpn J Anim Reprod* 33: 140-145 (in Japanese).
- Ogawa S, Yamakawa H, Yamanoi J, Nishida S, Kanou Y, Takeshima T, Tauchi Y, Nagashima H (1987 b) Are fluorescent bodies of Y-spermatozoa detectable in common with mammalian species. *THERIOGENOLOGY*: in press.
- Ogawa S, Tanaka K, Takeshima T, Igarashi H, Yamanoi J, Nagashima H, Matsumoto T, Yamakawa H, Kanou Y, Nishida S (1987 c) Detection of fluorescent-body in spermatozoa, lymphocytes and born marrow cells of human, pig, dog and mouse. *Bulletin of the Faculty of Agriculture Meiji University* 77: 1-8.
- Pawlowitzky IH, Bosse HG (1971) Y chromosomes associated with vacuoles in human spermatozoa. *Humangenet* 13: 338-340.
- Pearson PL, Bobrow M, Vosa CG (1970) Technique for identifying Y chromosomes in human interphase nuclei. *Nature* 226: 78-80.
- Pearson PL, Bobrow M, Vosa CG, Barlow PW (1971) Quinacrine Fluorescence in mammalian chromosomes. *Nature* 231: 326-329.
- Rohde W, Porstmann T, Prehn S, Dörner G (1975) Gravitational pattern of the Y-bearing human spermatozoa in density gradient centrifugation. *J Reprod Fert* 42: 587-591.
- Zech L (1969) Investigation of metaphase chromosomes with DNA-binding fluorochromes. *Exp Cell Res* 58: 463 (Abst).
- Pawlowitzky IH, Bosse HG (1971) Y chromosomes

要 約

我々は Percoll 密度勾配による遠心分離を利用して、豚精子浮遊液から X 精子と Y 精子の分離を試みた。遠心管に 7 段階からなる Percoll 密度勾配 (30~75%) を作製し、その上に洗浄精子浮遊液 1.4 ml を積層した。23±3°C で遠心分離 (250×g) を 5 分、10 分および 15 分間行った。各密度界面および管底から各々 0.2 ml ずつ計 8 試料を採取した。採取された試料に含まれる精子について、精子濃度、精子活力および F-body 出現率を光学顕微鏡および蛍光顕微鏡を用いて調べた。F-body の検出は Ogawa *et al.* (1987 a, b) の方法に従った。この結果、(1) 遠心分離 10 分後に管底部で得られた精子の F-body 出現率は 10.1±2.1% (平均値±SD)、範囲 7.6~13.7% であって、中層部の分画のもの (48.9±5.6% (39.7~55.1%)) に比し、極端に低い値を示した。(2) これら管底部での精子活力は遠心分離前のものとほぼ同じであり、高い運動性を示した。豚精子の F-body の検出が可能になったことから、豚精子に Percoll 密度勾配遠心分離を適用することにより、精子活力をあまり低下させることなく、X 精子比率の高い精子分画が得られることが示唆された。