

《解説・情報・資料》

種卵で雌雄を見分けることができるか：
日本の伝統的雌雄鑑別から近代技術まで

島田清司

名古屋大学大学院生命農学研究科, 名古屋市千種区不老町 464-8601

はじめに

応用研究のすすめ

『近ごろの大学の研究発表は、少しもわからない』とわが日本家禽学会でよく耳にすることである。本当に耳の痛い言葉である。私達の基礎研究は、その成果がなかなか目に見える形で応用につながらない。また、産業界が求めている課題が何かわかっていないこともあり、わかかっていても実施が困難なこともあり、しようもしないこともあると思われる。いいわけがましいが、応用研究の重要性を認識しつつも知識優先であったり研究業績(論文の数や質)優先の高等研究教育制度の中でジレンマがあることも事実である。いずれにしても、もっともっとわかりやすい応用研究を發表しなければならないと思う。

一方で、基礎研究も思わぬところで日の目をみることもある(その1例をあとで紹介)。ここでとりあげる『家禽の性(オスとメス)』は、基礎研究でも極めて魅力的で、産業界にとっても関係の深いテーマの1つである。シチメンチョウやニワトリはオスの成長速度が早いことから産肉性において経済的に有利であり(ウズラではメスが早い)、メスは産卵するので経済的に有利なことは明白である。

雌雄鑑別のパイオニア

増井清博士は、橋本博士とともに小川、大野氏の協力をえて1922年(大正11年)農林省畜産試験場において雄鶏の交尾器と初生雛の雌雄鑑別の研究に着手された。当時世界でもこの研究は誰も手掛けておらず、彼らのその後の研究成果は基礎研究が実用性をもった日本オリジナルな畜産学的成果として高く評価されるものである。当時、食料増産は国家的使命であったので雛を育てたあとで雌雄がわかるのではなくて、卵からかえったばかりの雛のうちで雌雄鑑別ができるということは採卵養鶏に

2002年5月29日受付 2002年6月27日受理

とって画期的なことといえる。

種卵の雌雄はわからない?

「養鶏業者の強い希望は、種卵で雌雄を見分けることである。もしこれができれば経済的に非常に有利である。専門的知識人は現代の生物学の基礎では解決し得られないことがはっきりしているので、この問題に手を染めた人を聞かない。……中略……しかし、Z卵子とW卵子を見分けることは、実験的に強拡大して見ればあるいは見分け得るかもしれないが、今日の生物学的方法ではこれを見分けることは不可能であり、また将来研究によって方法が開発され得られるや否や予想することもできない。」と昭和50年発刊の増井清博士の言葉である(鶏の性と雌雄鑑別の研究)。

種卵の雌雄はDNAでわかる

しかしながら、研究は日進月歩の発展をとげ、DNAによる性鑑別が可能となりほんの少しの血液や細胞があればオスカメスがわかる。これは水野重樹博士(当時、東北大学農学部教授;現在、日本大学資源生物学部教授)らによって発見されたことで、ニワトリではメスのみに見られるW型性染色体上のDNAリピート配列があることによるものである。したがって、孵化する以前に、鶏胚2-3日目でも雌雄を判別することが可能となっている。しかし、この方法を用いて養鶏業界で雌雄判別が実用化されたという話は聞かれない。その主たる理由は、この方法が現在のところまだ経済的採算があわないからである。ところが、この方法とは全く別な方法で発生途中の種卵で雌雄を見分けることができその実用化が進められつつある。それが最近になってEMBREX社(米国ノースカロライナ州)から発表された。その技術は、孵卵中の卵の中の雌胚の尿のう液中のエストロゲン(女性ホルモン)が雄胚の濃度より高いことに基づいている。

ここでは、筆者が(社)全日本初生雛雌雄鑑別協会の方々と約5年にわたってのおつきあいの中で教えて頂い

たこと、世界に誇る日本オリジナルな畜産技術としての初生雛雌雄鑑別の成立や、西洋で開発された羽毛鑑別をふりかえり、現在進行中の種卵の雌雄鑑別法(EMBREX社)をノースカロライナ大学の友人、Petitte博士の話をもとに紹介する。さらに、私共がチャレンジしているニワトリ雛の性的人為的コントロール法について述べてみたい。

初生雛雌雄鑑別法の確立

増井清博士らの研究によれば、家鴨のような交尾器ではないがニワトリの雄雛には退化した交尾器官がみられ、生殖隆起部とその一部として周囲にみられる隆起基部が雄はよく発達しているが、メスには存在しない。生殖隆起部は、生殖突起(又は単に突起ともいう)と基部(八字状)から成り、オスに独特な形状がある。この生殖隆起は成鶏になっても形態的に初生雛のものと全く同じで、わずかに成長しているに過ぎない。メスには原則的に生殖隆起はないが、例外的に紛らわしいオスの排泄腔の形態を持ったメスがみられる。

白色レグホーン種の肛門鑑別は、雌雄の差が比較的に明らかでオスとメスの個体差が小さい。これに対し、名古屋種やその他の地鶏では雌雄鑑別がより難しいものがある。さらに積み重なるデータが得られ、産業界の人々によって初生雛雌雄鑑別法の実用化が生まれ、世界の人々に大きな貢献を果たしてきた。このところの事情は「チックセクサーの世界」で加藤巷二氏が世界各国で活躍したいわゆる鑑別師を紹介している。

雌雄鑑別ができるようになるには6ヶ月間養成所へ通い、さらに2-5年間実施訓練を受けた後、スピードと正確さでもって試験に合格した人が鑑別師の資格を与えられる。鑑別師は1時間に1,200羽の雛を98%以上の正確度で雌雄鑑別する。その集中力から外国人にとっては鑑別師の作業は芸術であり、禅僧の技にたとえられるほどである。現代においては、後述する羽毛鑑別によって肛門鑑別が徐々に交代しつつある。しかしながら、育種用原種のニワトリや、地鶏あるいは他の家禽のある種の雌雄鑑別には鑑別師の技術が必要とされる。そして、このような貴重な技術は、我が国が誇るべきもののひとつであり、いつまでも継承されることを祈ってやまない。

羽毛鑑別法

現在、最も普及している羽毛鑑別法は、Z型の性染色体上の遅羽性遺伝子及び速羽性遺伝子の伴性遺伝(図1)を利用したものである。Z型の性染色体上の優性(K)の遅羽性遺伝子を持つ母鶏に劣性(k)の速羽性遺伝子を持つ父鶏を交配することによって、雄雛では遅羽性が発現し、雌雛では速羽性であることから雌雄が判別できる。現在、日本でも商業雛の70-75%が、欧米

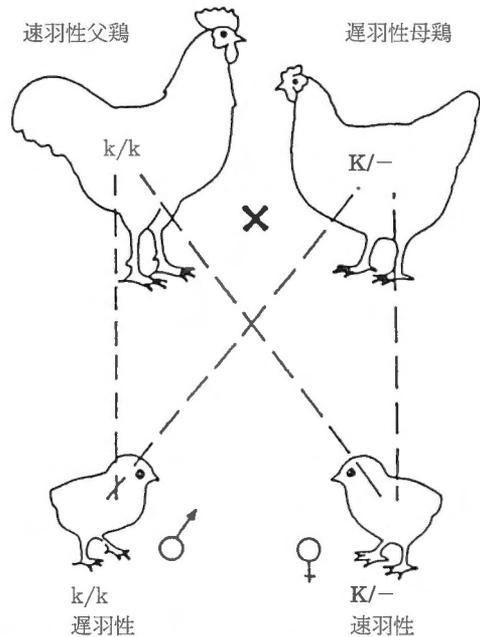
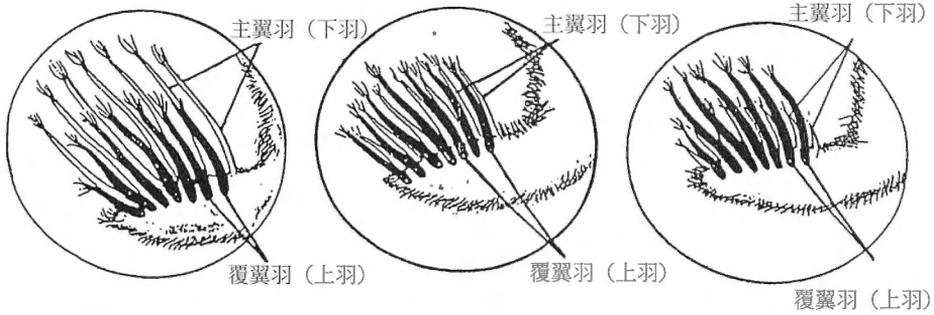


図1. 羽毛鑑別に用いられる遅羽性伴性遺伝(雌ではZの他にW型の性染色体があるがここには遅羽性に関する遺伝子がないので一で示されている)

では90-95%がこの方法によっているようである。しかしながら一時期、年によって羽毛による雌雄鑑別の正確度が低かったり、あるいは鶏種によっては雌雄鑑別の成績が不安定であった。このため、(社)全日本初生雛雌雄鑑別協会は、1997~1999年の3年にわたって羽毛鑑別の正確度の調査を行った。筆者が非熟練者として、他に熟練者としてプロフェッショナルの鑑別師2人が加わった。図2にみられるように典型的な雌雛は、下羽が上羽より伸長している。典型的な雄雛は下羽が上羽と同程度にしか伸びていない。不規則な型を示す雄雛として下羽がそれ程伸びていないが上羽が下羽より伸びている例があり、非熟練者では誤鑑とすることが多い。ある程度熟練すればこの誤鑑は防がれると思われるが、もっと不規則な例では、鑑別師による羽毛鑑別の正確度を得るまでには至らない。産卵用雛を羽毛鑑別した場合、1997年では非熟練者は精度97.6%、熟練者は98.9%、鑑別師は99.8%であった。1998, 1999年の産卵用雛の羽毛鑑別は高い精度に保たれ、育種技術成果が安定していることを示していると思われた。ブロイラー雛の場合は、産卵用雛の羽毛鑑別比べて難しくなっていることがうかがえる。それにしても熟練者でも98.5%の精度であるから安定しているといえる。しかしながら、供給される系統に



A. メス

B. オス (1)

C. オス (u)

イラストの様に下羽 (主翼羽) が上羽 (覆翼羽) より長ければメスです。同じ長さであればオスです。イラストの様に下羽 (主翼羽) が上羽 (覆翼羽) より短ければオスです。

図 2. 上羽と下羽の成長速度の違いによる羽毛鑑別の実際

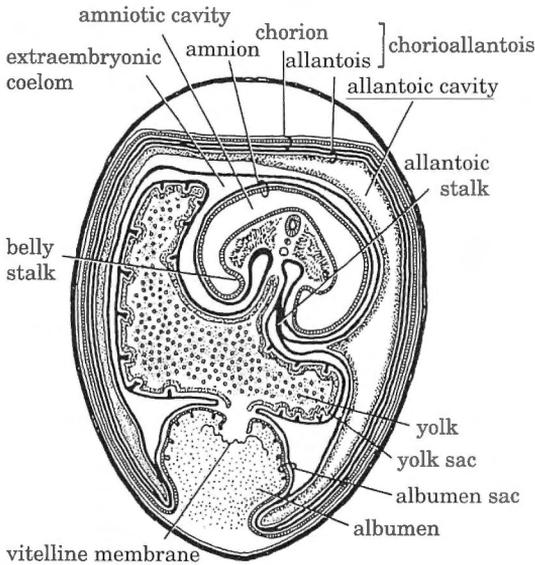


図 3. 孵卵 14 日の鶏胚の解剖断面図 (尿のう, allantoic cavity は卵の外側を全体に分布)

よっては成績の低いものがあつたのでこの平均的な結果だけでは必ずしも万全というわけではないので注意しなければならない。

種卵の雌雄鑑別の自動化実用化の試み

Inovoject Egg Injection System

EMBREX 社は, Inovoject Egg Injection System を開発した会社で, 孵化した雛にワクチン注射する手間を省くため, 種卵に小さな穴をあけ, そこへワクチン注射し穴を封入するプロセスを自動化させている。1 時間に 2~5 万卵を処理できるようなのである。聞くところでは欧米ではメジャーな孵卵場が, 日本および韓国の 2, 3 の孵卵

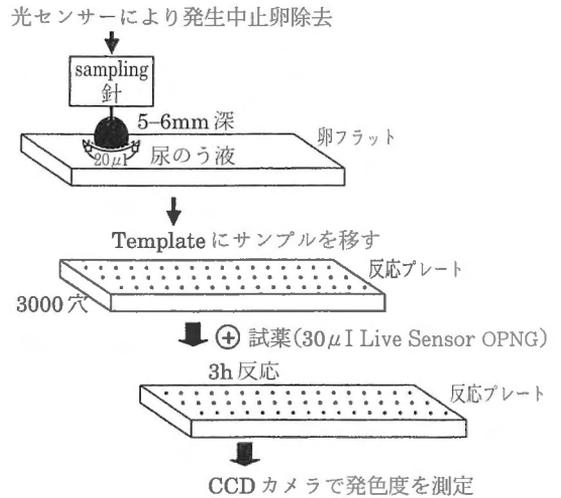


図 4. 生物センサーを用いた鶏胚雌雄鑑別自動化システム (卵の中に針を入れ尿のう液 20µl を吸いとる。このサンプルを反応プレートに移す。)

場がそのリース契約をしているという。企業は経済性と安全性の面から利用するかどうかを考えなくてはならない。いずれにしても, この機械的システムの延長上に考案されたのが, 種卵の雌雄鑑別であると想像される。ワクチンは高価である。にもかかわらず, 今までの注射自動化システムでは, 産卵系統の雛では孵化後に淘汰されるオスにもワクチンを注射しているので半分量のワクチン代が無駄になっているわけである。したがって, メスの種卵にのみワクチンを注射することが望まれている。

生まれたばかりの種卵ではオス, メスの区別が現在の技術では知りようがない。それで孵卵を始めた種卵で, できるだけ早くオスカメスカを知りたいという欲求が生

まれる。ここで注目されたのが血液中の雌ホルモン（エストロゲン）ではなくて尿のう液（図3）中の雌ホルモンである。エストロゲンは人でも卵巣（当然、女性）でできるホルモンである。ニワトリの発生中の胚では微量ではあるがメス胚の卵巣でできるし血液はもちろん、排出される経路で尿のう液にもでてくるのである。そして雌胚の尿のう液中エストロゲンとオス胚の尿のう液中エストロゲンを測定した人たちが Gill, D.V., Robertson, H. A., and Betz, T.W. (1983) である。これは純粋な基礎研究で1983年に発表され、この時この人たちは、オスとメスをわけつもりはまったくなかったのである。しかし、この発表が今になってはじめて注目されることとなっている。

17日胚の尿のう液中のエストラジオール（エストロゲンの一つ）濃度を測定すると雄胚では42 pg/ml以下であるのに対し、雌胚では113-830 pg/mlであった（pgはピコグラムと読む）。gの1000分の1は、mgで、mgの1000分の1は、 μg （マイクログラム）で、 μg の1000分の1は、ng（ナノグラム）で、ngの1000分の1がpgである。それではなぜ血液ではなくて尿のう液のエストロゲンかという血液は採取する段階で出血を伴い生存率を低くする原因になりやすい。尿のう液はそれ程の支障がなく採取法は EMBREX 社は、Inovoject Egg Injection System をもってすれば自動化が可能である（図4）。

次の問題は、きわめて微量なホルモン量をどのようにして測定するかである。これまでの方法では放射性物質を使ったり、結果がでるまでに何日もかかることが致命的であった。そこで利用されるのが分子生物学的技法である（ここからの説明はちょっと難解）。それで尿のう液

のエストラジオールをはかるためには、とくに測定系を自動化するために h は、Live Sensor (LifeSensors Inc. Malvern, PA) を使う。すなわち、酵母にエストロゲンレセプター（hER）を発現させ、エストロゲン応答部位（ERE）をもつ E. Coli β -ガラクトシダーゼレポーター遺伝子を発現させるようにしておく（図5）。そのような形質転換した酵母と尿のう液中のエストロゲンが反応して β -ガラクトシダーゼが産生されると黄色に発色するわけである。Live Sensor はフェムトモルレベルのエストロゲンを感知できるし、使用する酵母は、パン工場に一般に使われているものと同系統のものである。CCDカメラにより発色程度を検知し、胚の雌雄を判別する。上記分子生物学的アッセイ系とメカニカルな自動化装置でもって、雌雄判別結果を1日以内で出し、個体番号に応じて雌種卵と雄種卵を別々に並べかえ、必要なければ、雄種卵は淘汰できる。

要するに、孵卵17日目で1日約2万個を4-5時間で雌雄鑑別できる。予備実験によると、17日胚から尿のう液をサンプリングした場合の孵化率は、94.5%で、対照群では94.0%であり良好な結果である。現在、15-16日胚からの尿のう液サンプリングとワクチン併用の効果を検討中である。EMBREX社の種卵雌雄判別システムが実際どの程度、迅速かつ正確であるのか、実用にたえうるか、またコストはどうか、等の点については今後の課題であろう。EMBREX社の担当者は完成までには2、3年かかるかもしれないと言っている。

あたらしい性の人為的コントロール、産まれてくる雛をメスにすること

初生雛の雌雄鑑別から種卵の雌雄鑑別へと性判別の時期が早まってきたようであるが、いずれの場合も雄雛あ

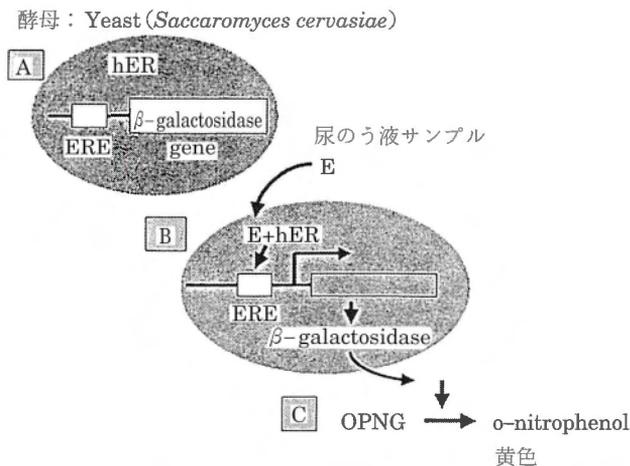


図5. 形質転換した酵母を用いた分子生物学的鶏胚雌雄鑑別法

るいは雄胚となる種卵は産卵数の半分であることに変わりなく、相当数の雄雛が淘汰され、経済的に無駄となる状況は同じである。2000年の万国家禽学会（モンリオール市）で英国の J. Metheringham は、淘汰されるオス雛の数（1年当たり）は中国では7,500万から1億、米国では2億1,900万、イスラエルでは600万と推定している。経済的な無駄もさることながら、淘汰の仕方が動物福祉の点から問題とされている。

もし、雄雛のみ発生する種卵や雌胚のみ発生する種卵を産むようなニワトリができると上記の問題の解決に有益と考えられる。この意味で性転換実験が過去にも試みられている。例えば卵のうちに雌性ホルモンを注射して生まれてくる雛を雌にするとか、雄性ホルモンを注射して雄雛のみを得ようとして研究が行われているが成功はしていない。

その他に遺伝的雄の胚に卵巣を移植するなどの方法が使われたがやはり成功していない。エストロゲンのように卵巣で生産される主要雌性ステロイドホルモンで、アンドロゲン（雄性ステロイドホルモン）からアロマトラーゼという酵素によって変換される。アロマトラーゼインヒビター（阻害剤）を卵の内に（孵卵7日以前）に注射しておくことでエストロゲンの産生が阻害され、遺伝的雄の雛が雄に性転換する。成長した性転換鶏は外観上は雄と変わらず、生殖器は精巣で、精子の産生もみられる。私共の研究室では、この精子の中には雌に特異的なW染色体をもつものがあることを明らかにしている。この精子を使って卵子（WまたはZ染色体をもつ）と受精させるとWW卵とWZ卵ができ雌雛のみを生産できるのではと考え、そのための基礎研究を行っている。性転換鶏を交配しても精管が発達していないので受精卵は得られないし、精巣内精子は人工授精に十分な数がないので、体外授精が残された方法である。ニワトリで体外授精によって雛ができたという報告が1度だけされているがその後確認した人はいない。私達は、性転換鶏の精子に受精能があるかをいわゆるハムスターテストで検討した。ハムスター卵子に性転換鶏精子を顕微注射して培養してみると、極体の放出と雌性前核と雄性前核がみとめられたので受精能はあると考えられた。マウス卵子を用

いても同様な結論が得られたので、現在はニワトリの卵を使って体外授精を試みている。まだいくつかの課題が予想されるが、いろいろな改良を重ねて所期の目的を実現したいと思っている。

謝 辞

羽毛鑑別調査は、(社)全日本初生雛鑑別協会（上野暉男会長）のご協力によるものでここに深甚の謝意を表します。

この解説の一部は、万国家禽学会（2000年モンリオール市）および中部日本養鶏研究会（平成13年、名古屋市）で講演した内容です。中部日本養鶏研究会での原稿の多くを岩間達夫会長（独立行政法人、家畜改良センター岡崎牧場長）からご承諾いただきました。ここに厚くお礼申し上げます。

文 献

- 増井 清 (1975). 鶏の性と雌雄鑑別の研究. 共栄商事株式会社.
- 加藤巷二 (1993). チックセクサーの世界. 加藤養研.
- Abinawanto Shimada K, Yoshida K and Saito N. Effects of aromatase inhibitor on sex differentiation and levels of P45017a and P450arom messenger ribonucleic acid of gonads in chicken embryos. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 102 : 241-246. 1996.
- Abinawanto Shimada K, Saito N, Sugishima T and Shiokawa E. 1997. Effects of aromatase inhibitor on sex differentiation and levels of P450c17 and P450 arom mRNA of gonads in broiler embryos and broiler chickens. *Jpn. Poult. Sci.*, 34 : 318-328.
- Abinawanto Zhang C, Saito N, Matsuda Y and Shimada K. Identification of sperm bearing female-specific chromosome in the sex-reversed chicken. *J. Exp. Zool.*, 208 : 65-72. 1998.
- Gill DV, Robertson HA and Betz TW. In vivo estrogen synthesis by the developing chicken (*Gallus gallus*) embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.* 49 : 176-186. 1983.
- Tanaka K, Ada T, Koga O, Nishio Y and Hertelendy F. Chick production by in vitro fertilization of the fowl ovum. *J. Reprod. Fertility* 100 : 447-449.