

羊에 있어서의 性比調節

金相根

忠南大學校 農科大學

Studies on the Control of Sex Ratio in Sheep and Goats

Kim, Sang Keun

Agricultural College, Chungnam National University

I. 緒論

人間이나 家畜에 있어서 後代의 性을 人爲的으로 支配하려는 研究는 많은 研究者들에 의해 多角的인 側面에서 끊임없이 試圖되어 왔으나, 대부분의 研究가 만족할만한 結果를 얻지 못하였지만, 이러한 계속적인 研究가 後續되는 研究의 成功을 위한 밑거름이 되어 現在의 性支配에 대한 研究는 상당한 水準에 도달하고 있는 實情이다.

家畜에 있어서 性比調節에 관한 研究는 精子頭部의 크기나 무게(比重), B-body test, 電氣的 性質 및 運動速度에 의한 X,Y精子的 分離에 관한 많은 研究報告가 있으나 큰 成果를 얻지 못하였던중, 哺乳動物에 있어서의 性比調節은 Eichwald와 Silmsler (1955)가 생쥐의 皮膚移植 實驗에서 組織適合性 Y 抗原(histocompatibility-Y antigen; H-Y antigen)을 發見한 以來 이 分野의 研究는 큰 進展을 이루어, 最近에는 免疫學的 方法에 의하여 受精卵의 性을 鑑別한 다음 選擇의으로 移植함으로써, 後代의 性을 調節하려는 研究가 活潑히 進行되어 最近의 研究報告에 의하면, 8~16細胞期의 생쥐 受精卵을 monoclonal H-Y 抗體와 補體로 處理한 胚盤胞를 移植하여 얻은 86~95.8%가 雌性이었다고 하며(Bryant, 1980; Epstein等, 1980; White, 1982), Wachtel等(1984)은 大家畜인 소에 있어서도 受精卵에 monoclonal H-Y 抗體를 處理함으로써 원하는 性을 가진 仔牛生産에 成功하였다고 報告하고 있다. 이러한 事實들을 미루어 볼 때, 後代의 性을 人爲的으로 支配하려는 人類의 念願도 멀지않아 解決될 것으로 豫見된다.

本稿에서는, 羊의 性比調節에 관해 本人이 遂行한 protein column method와 H-Y antibody에 의한 性比調節 結果와 其他 方法들의 그것과 比較 考察

하여 앞으로 羊의 性比調節에 관한 研究에 基礎資料를 提供하고자 한다.

II. 研究方法의 概要

哺乳動物에 있어서 産仔의 性 支配에 대한 研究는 오래전부터 研究되어 왔는데 이들의 研究方法를 大別하면 다음의 3가지로 要約할 수 있다.

第1의 方法은 交配前後의 雌畜에 여러가지 刺戟이나 處理 즉, 營養, alcohol, pH 및 內分泌的 方法에 의해 處理를 하여 원하는 性의 精子에 의해 受精을 試圖하는 方法으로, 1900년대 초까지는 이 方面의 研究가 많이 이루어졌다. 그러나 이 方法에 대한 贊反兩論으로 확실히 性을 支配할 수 있는 方法으로 確認되지 못했다.

第2의 方法은 精子를 미리 X精子和 Y精자로 分離하고, 分離한 精子를 人工授精에 의해 産仔의 性比를 調節하려는 方法이다. 이때 精子의 分離는 精子頭部의 크기나 무게(比重), 電氣的 差異, 運動速度 및 B-body or F-body test에 의한 分離등이 實施되고 있지만 아직 完全하고도 確實한 方法은 確立되어 있지 않다. 最近에는 無擔體 電氣泳動裝置를 利用하여 사람에서는 어느정도 X, Y精자의 分離에 成功하고 있고, 또 이를 土臺로 牛精子에서도 研究되고 있다.

第3의 方法은 胚의 性을 判別하여 性을 判別한 胚를 recipient에 移植하여 원하는 性의 産仔를 얻는 方法이다.

이것을 綜合해 보면, 家畜의 性比調節에 있어서 X, Y精자의 分離는 精子頭部의 크기나 무게(比重), B-body test, 電氣的 差異 및 運動速度에 의한 分離方法이 주로 利用되고 있으며, 胚의 性鑑別은 胚중 少量의 營養膜細胞나 分離, 切斷胚의 性染色體

의 분석, H-Y antibody와 胚를 處理한 第2 抗體의 適用에 의한 性染色體의 分析等이 주로 利用되고 있다.

Ⅲ. X, Y精자의 分離에 의한 性比調節

1. 非繁殖季節에 있어서의 羊의 繁殖

羊은 1年중 特定한 季節 즉 日照時間이 短縮되는 시기에 繁殖活動이 旺盛하게 이루어지는 季節繁殖動物이므로, 非繁殖季節의 發情誘起와 受精卵의 採卵은 性比調節과 관련지어 볼때 대단히 重要하다고 하겠다.

1) 非繁殖季節의 發情誘起

非繁殖季節에 있어서의 羊의 發情誘起 및 發情同期化 方法은 주로 progesterone과 合成 progesterone이 많이 使用되고 있다. Fukui等(1985)은 非繁殖季節인 5~7월에 MAP(Methyl Acetoxy Progesterone, Upjohn Inter. Australia) 60mg을 吸着시킨 sponge를 腔内に 9일간 插入한 후, sponge 除去日에 750IU의 PMSG를 注射하는 方法에 의해 發情을 誘起하고 自然交配시켰을때 100%의 發情誘起와 30%의 分娩率을 나타냈으며 腹當 産仔數는 2.33頭였다고 한다. 또한 MAP sponge의 單獨處理보다는 PMSG 등의 호르몬을 併用處理하는 것과, sponge 除去 2日前보다 除去日에 호르몬處理가 發情誘起 및 分娩率에 있어 좋은 成績을 나타냈다고

報告하였다. 대체로 非繁殖期에는 progesterone이 들어있는 腔内插入器具(PRID)를 12~14일간 腔内に 插入후 除去時 PMSG 450~750IU를 筋肉注射하면, 約 36時間후에 發情이 誘起되고 受胎率은 30~70%이다. 또한 一定時期에 集中的인 發情을 誘起하자면 30~40mg FGA(Flurogesterone Acetate)를 10日동안 腔内に 插入後 除去日에 750IU를 注射하고, 48時間과 60時間에 授精시키는 方法이 주로 利用되고 있다. 한편 緬羊에서는 PGF₂α에 의한 發情誘起 試驗이 實施되고 있지만 progesterone 處理時보다 受胎率이 낮으므로 이에 대한 계속적인 研究가 要請된다.

2) 受精卵의 採卵

受精卵의 採卵은, 繁殖季節에 있어서는 自然發情의 羊에서, 非繁殖季節의 경우는 前記한 非繁殖季節의 發情誘起 方法을 이용할 경우 年中 어느 時期에서도 發情 및 多排卵誘起에 의해 受精卵의 採卵이 可能하다. Fukui等(1985)은 MAP sponge를 9日間 處理後, 除去日에 600~750IU의 PMSG를 注射하는 方法에 의해 多排卵을 誘起하였을때 3~5個의 受精卵이 回收되었다고 報告하였다. 대체로, 發情을 誘起한 후 新鮮한 原精液이나 凍結精液을 子宮内に 人工授精後 非外科的 方法 또는 腹腔内視鏡에 의해 採卵하였을 때 平均 4~6個의 卵이 回收된다.

2. X, Y精자의 分離에 의한 性比調節

Table 1. Summary of historical developments of separation of X-and Y-bearing spermatozoa

Items	Researcher (year)
Head size of spermatozoa	Zeleny & Faust(1915), Schilling et al.(1967), Moruzzi(1979), Saeki(1970), O'Donnel(1969), Laufer et al.(1977)
Specific gravity of spermatozoa	Schilling u. Uzunov(1970), O'Donnel(1969)
Electrophoresis & galvanotaxis	Shishito et al.(1974,1975), Mudd & Mudd(1929), Bangham(1961), Ericion et al.(1973)
Flow cytometry	Gledhill et al.(1976)
B-body test	
Protein column method	White et al(1984)
Immunological method	

* Sheep & Goat

Table 2. Summary of historical developments of the control of sex ratio by treatment of H-Y antibody

Species	Researcher (Year)
Mouse & rat	Mclaren(1962), Lappe & Schalk(1971), Goldberg et al. (1971), Mathieson(1976), Bennet et al. (1973,1975), Krco et al. (1976), Wachtel(1977), Epstein et al. (1980), Billingham(1981), White et al. (1982,1983), Farber(1984), Utsumi et al. (1983), Allen et al. (1983), Shelton(1984), Joyce et al. (1984), Hiroyuki et al. (1985) Han et al. (1986), Ko et al. (1986 ^{a,b}), Shin et al. (1986), Shim et al. (1986), Baik et al. (1986)
Rabbit	Bedford & Bibeau(1967), Stambauch & Buckley(1971), Schilling & ThormAhlen(1976), More O'ferrall et al. (1968), Zaros et al. (1983)
Swine	Courot et esnault (1973)
Sheep & goat	Schilling u. Uzunov(1970)
Horse	Sharp et al. (1980)
Cattle	Hare et al. (1976), Ohno et al. (1976), Singh & Hare(1980), Wachtel et al. (1984)

이 방법은 이미 記述한 바와 같이, X,Y精子중 어느 한쪽을 賦活시키거나 또는 抑制하여 生體内に 있어서 選擇的인 受精을 誘導함으로써 産仔의 性을 人爲的으로 調節하려는 方法이다. 以下에서는 X精子와 Y精子의 分離에 關하여 方法別로 記述코자 한다.

1) 精子頭部の 크기에 의한 分離

Zeleny와 Faust (1915)가 처음으로 緬羊精子의 頭部の 크기를 測定하였는데, 測定精子數 498個중 低部가 5.94 μ , 上部가 6.73 μ 이었고 觀察比도 1.00 : 1.070였다고 한다. 한편, Schilling等(1967)은 緬羊精子로서 精子의 沈降分離를 實施한 結果, 가벼운 上層精子와 무거운 下層精子를 測定하였을때 下層精子는 上層精子에 比해 頭長에서 4.8%, 幅에서 6.7% 정도 크다고 報告하였다. 한편, 佐伯等(1947)은 山羊의 精子頭部の 크기를 測定한 結果, 個體에 따라 다르고, 또 同一個體라 하더라도 精液採取의 時期, 方法에 따라 다소 차이가 있지만, 成熟羊의 精子頭長은 8.4~9.0 μ (平均 8.7 μ), 頭幅은 4.1~

4.3 μ (平均 4.2 μ)이었으며 頭長의 分布曲線은 單峯이었고, 精子頭部の 크기에 2型性은 보이지 않았다고 하였다. 그후, O, Donnel(1969)은 緬羊의 射精精子 및 幼若精子의 體績을 electronic cell counter로 測定한 結果, 精液중의 遊離細胞質滴의 體績은 細胞質을 갖지않은 精子의 約 1/3이었으며, 射精精子의 體績의 크기는 25~29 μ^3 , 細胞質滴 9~11 μ^3 및 精巢內 精子 37~45 μ^3 이었다고 報告하였다. Shettles等(1976)은 位相差顯微鏡에 의해 精子를 觀察한 結果, X精子는 頭部가 가늘고 길며 큰데 비해 Y精子의 頭部는 둥글고 적다고 하였는데, 毛利(1985)는 이러한 結果는 上下左右方向으로부터 본 精子頭部の 形을 X,Y精子의 差異로 誤認하고 있다고 批判하였다. 이러한 結果들을 미루어 볼 때, 精子頭部の 크기에 의한 X,Y精子의 分離는 事實上 不可能한 것으로 考察된다.

3. 精子의 무게(比重)에 의한 分離

X,Y精子의 무게가 다르기 때문에 이를 기반으로

Table 3. Result on fertility in ewes during the non-breeding season

No. ewes treated*	No. ewes heated(%)	No. ewes lambed	Prolificacy**
10	10(100)	3(30)	2.33

*:Treated with MAP sponge for 9 days and 750IU PMSG on sponge removal

** :No. lambs born/No. ewes lambed

Treatment	No. ewes treated	No. ewes heated(%)	No. ewes lambed	Prolificacy
MAP sponge(9 days)	14	9(64)	3(33)	1.00
MAP sponge(9 days) +750IU PMSG	17	17(100)	11(65)	1.45
MAP sponge(9 days) +2mg E ₂ *+750IU PMSG	18	13(72)	7(54)	1.57

*:Injection of 2mg estradiol-17 β (E₂) at insertion of MAP sponge

Table 4. Result on fertility in ewes during the non-breeding season

Injection time of PMSG	MAP sponge + Hormone	No. ewes treated	No. ewes in estrus & inseminated	No. ewes lambed(%)	Prolificacy
750 IU PMSG at the removal of MAP sponge	Physiological saline	8	7(88)	1(14)	2.00
	Gn RH	8	8(100)	5(63)	2.00
	Anti-PMSG*	9	8(100)	3(33)	2.67
	Subtotal	25	24(96)	9(38)	2.22
750 IU PMSG 2 days before removal of MAP sponge	Physiological saline	7	7(100)	5(71)	1.20
	Gn RH	7	7(100)	4(57)	2.75
	Anti-PMSG	6	5(83)	3(60)	1.67
	Subtotal	20	19(95)	12(63)	1.83

*:2ml of rabbit anti-PMSG serum diluted with 0.9% (v/v) physiological saline to neutralized 750 IU PMSG

兩者를 分離할 수 있다는 發想은 오래전부터 있었다. Loir 와 Lanneau(1974)는 trypsin으로 處理한 精巢의 細胞(各種 精細胞의 混合)를 Ficoll 比重을 여러층으로 汗중에서 重力에 의한 沈降速度에 의해 分離하였다. 沈降速度和 細胞의 平均的 크기에 따라 I~VI의 6細胞帶로 나누었다. 이들 細胞帶중의 여러 단계의 精細胞, 特히 成熟過程의 精子細胞(spermatid)의 同定은 細胞學的, 運動樣相 및 H³-thymidine을 이용한 autoradiography 등의 方法으로 測定한 結果 圓型精子細胞의 93~96%는 VI帶에서 얻어졌다고 하며, 伸張型 精子細胞는 그 成熟過程別로는 分離되지 않았지만 生化學的 觀察에 도움이 되는 細胞集團이 얻어졌다고 報告하였다. 한편 人間에 있어서의 人爲的인 性的 支配는 人倫問題와 관련이 있어 이에 따른 철저한 規制가 必要하지만,

다만 200餘 致死的인 伴性遺傳病(그의 大部分은 X-染色體上의 遺傳子에 의해 男兒로 發現하는)에 대해서는 遺傳子操作을 包含한 各種 治療法과 함께 兩親이 원한다면 女兒를 出産하는 것이 可能한데, Kaneko等(1983)은 Fig. 1, 2에서 보는바와 같이 human 精液을 密度를 달리한(1.11~1.06) Percoll 溶液위에 놓고 250g, 30分간 遠沈으로 약 25%의 精子가 沈澱하고 그의 약 94%가 X-精子로 判別되었다고 하며, 이러한 X, Y精子의 分離試驗은 F-body檢出에 의한 顯微鏡的 判定에 의해 이루어졌으며, Percoll層을 더 細分化하여 12層으로 하였을때 X-精子의 分離는 100%에 가까운 成功率를 얻었다고 報告하였다. Bhattacharya等(1976)은 牛精漿中에서 細胞膜을 融解하는 papaya protease를 牛精液에 添加하여 室溫에서 10分間 消化시킨 다음 여기

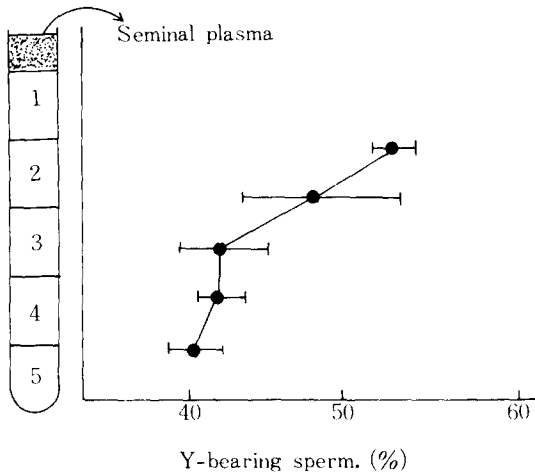


Fig. 1. The content of Y-bearing sperm in various fractions after centrifugation in Percoll.

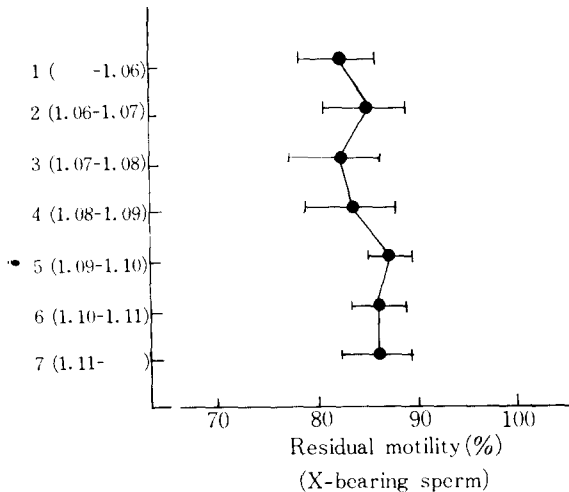


Fig. 2. The residual motility of recovered sperm after density gradient centrifugation in Percoll.

에 0.05%의 Quinacrine mustard 色素를 添加하여 10~30分間 染色시킨 다음에 螢光顯微鏡으로 B-body를 檢出하는 方法에 對해 報告하였는데, 이러한 B-body檢出法은 보다 精確하게 Y-精子를 檢出할 수 있을뿐만 아니라 모든 家畜에서도 應用이 可能하여 X,Y精子의 分離에 크게 寄與한 것으로 考察된다.

4. 電氣的 性質에 의한 分離

電氣的 性質의 差異에 의한 X,Y精子의 分離는 주로 電氣泳動法과 走電性의 利用法이 活用되고 있다. Mudd와 Mudd(1929)는 新鮮精液을 特別히 設計한 泳動室에서 直流 2.3V, 200 μ A로 30分間 通電하면 陽極에 X-精子, 陰極에 Y-精子가 많이 모이고, 이와같이 分離한 精子로 人工授精하면 원하는 性의 産仔가 얻어진다고 報告하였다. Bangham (1961)은 綿羊精子에 對해 電氣泳動的 性質을 調査한 結果, X,Y精子간에는 表面荷電의 差가 있다고 하여, 以後 電場에 나타난 것에 의해 많은 分離試驗이 施行되었다. Schröder(1934)에 의하면 電氣泳動에 의해 X-精子는 陽極에, Y-精子는 陰極으로 移動하며, convection counter streaming galvanination法으로 分離했을 때에 同 一한 樣相을 나타내며, 또한 X-精子는 Y-精子보다도 沈降速度가 빠르며 兩者의 密度는 同 一하다고 報告하였다.

5. Flow cytometry法에 의한 分離

X,Y精子의 分離方法으로서 flow cytometry法은 Fig. 3에서 보는바와 같이, 羊의 精子를 特殊한 螢光色素로서 DNA를 染色한후, flow cytometry에 의해 DNA量을 測定하여 X,Y精子를 分離하는 것

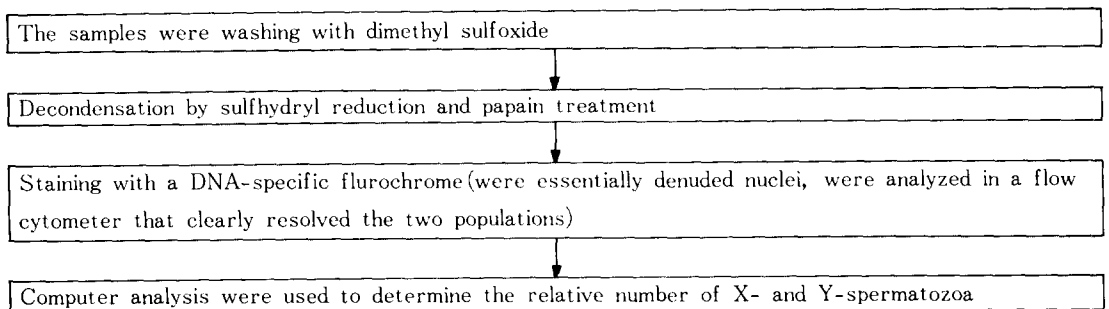


Fig. 3. Flow cytometric method.

(= analytical technique, which measures the DNA content of individual spermatozoa)

으로서, 精子的 DNA 量이 2 個의 peak 로 나뉘어 지는 것이 Gledrill 等(1984)에 의해 報告되었다. 이 方法으로는 수천 精子的 DNA 量의 測定이 가능하여 X, Y 精子를 分離할 수 있지만, 固定한 資料를 利用하기 때문에 살아있는 精子的 分離는 불가능하여 다만 分離 檢定에 利用될 수 있을 따름이다(Pinkel 等, 1985).

6. Protein column에 의한 分離

精도가 있는 protein 이나 BSA(Bovine serum albumin)에서는 X, Y 精子的 活力과 運動性에 差異가 있다는 報告가 있다. Protein column에 의한 分離 方法은 Fig. 4에서 보는바와 같이 緬羊의 精子濃度를 ml 당 200×10^6 으로 調整하여 稀釋液 A(300mM fructose, 95mM citric acid)와 稀釋한 다음 2ml를 取하여 이것과 稀釋液 B(360mM Tris, 33.3mg glucose, 113.7mM citric acid) 및 6% (v/v) BSA 6ml를 添加하여 2時間 靜置後 column의 上層液(top) 2ml와 下層液(bottom) 6ml를 各各 試驗管에 取하여 1,000 r.p.m.으로 15分間 遠沈한 다음 上清液

은 버리고 再遠沈하여 다시 上清液은 버리고 下清液의 精子와 1:1 比率로 稀釋液 C(360mM Tris, 33mM glucose, 113mM citric acid, 18% (v/v) egg yolk, 6% (v/v) glycerol)와 稀釋한후 人工授精時까지 液體室素中에 保存하였다. 上層液(top)과 下層液(bottom)을 各各, 發精을 誘起한 緬羊의 子宮頸管을 통하여 人工授精한 結果, 61.9%와 69.6%가 分娩하였고 이때 雌雄의 性比는 各各 76.9%와 23.1%, 18.8%와 81.3%였었다. 한편, White 等(1984)은 BSA column에 의한 上層液(top)과 下層液(bottom)을 各各 人工授精한 다음 分娩한 雌雄의 性比는 各各 63.3%와 36.4%, 25.0%와 75.0%였다고 報告하였다.

7. 免疫學의 方法에 의한 分離

體外에서 X, Y-精子를 分離하는 手段으로 免疫學의 方法에 의한 研究가 많이 進行되어 왔다. 生體內에 어떤 異物이 侵入하면 그 生體內에 侵入한 異物(抗原)에 대하여 反應하는 物質(抗體)이 生成된다. 이 抗原과 抗體間의 反應을 抗原-抗體反應(an-

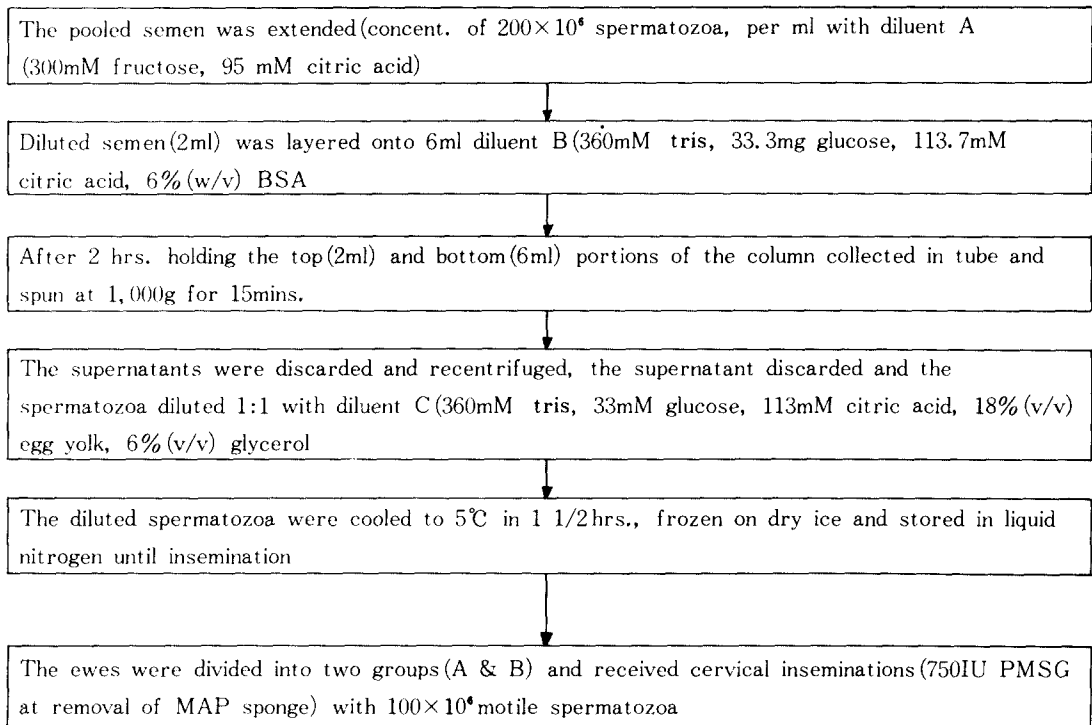


Fig. 4. Experimental procedures for protein column method

Table 5. Lambing following insemination of spermatozoa from the top and bottom of BSA columns

BSA column portion	No. ewes treated	No. ewes lambed	No. males (%)	No. females (%)
Top	21	13 (61.9)	3 (23.1)	10 (76.9)
Bottom	23	16 (69.6)	13 (81.3)	3 (18.8)

*:Suffolk ewes

Table 6. Sex of progeny resulting from embryos treated with H-Y antibody and complement

Species	Source of antibody	No. of embryos examined	Sex ratio		Reference
			Female (%)	Male (%)	
Mouse	Anti-spleen (female)	17	14 (82)	3 (18)	Shelton et al. (1984)
	Anti-spleen (male)	17	8 (47)	9 (53)	
	Anti-spleen	29	26 (89.7)	3 (10.3)	Hiroyuki et al. (1985)
	Anti-testis (blastocyst)	19	15 (79)	4 (21)	Sato et al. (1984)
	Anti-testis (morula)	16	0 (0)	16 (100)	
	Anti-spleen (blastocyst)	30	23 (77)	7 (23)	
	Anti-spleen (morula)	31	2 (6)	29 (94)	
Anti-testis & spleen*	16	13 (81.3)	3 (18.7)	Shim et al. (1986)	

*:H & P(Hoppe & Pitts medium)+H-Y antibody+NGPS (normal guinea pig serum)

tigen-antibody reaction)이라 한다. 抗體中에는 抗原을 가진 細胞의 活性을 抑制하거나 死滅케 하는 細胞毒性 (cytotoxicity)을 가진 것이 있다. 이를 利用하여 X-精子和 Y-精子中 어느 한쪽 精子의 活性을 抑制하거나 死滅케 하여 性支配를 하려는 研究들이 이루어졌다. 免疫學的 方法에 의하여 後代의 性을 人爲的으로 支配하려는 研究는 精子에서 먼저 試圖되었는데, Bennett와 Boyse(1973), Methieson (1976), Hoppe와 Koo(1983)는 생쥐의 精子에 H-Y 抗體를 處理한 후, 體外受精 또는 人工授精을 實施하였으나 有意한 結果를 얻지 못하였다. 그러나, Bryant (1980)는 H-Y 抗體를 吸着시킨 column에 생쥐의 精液을 통과시켜 얻은 Y分劃 및 X分劃의 精子로 人工授精을 實施하여 各各 92.3%와 95.8%의 雄性 및 雌性産子를 얻었다고 報告하였다. 이러한 事實을 미루어 볼 때, 免疫學的 方法에 의한 X, Y

精子의 分離는 性比調節에 있어 다른 分離方法에 비해 가장 有効한 方法으로 思料된다.

IV. 受精卵의 性判別에 의한 性比調節

受精卵의 性判別에는 小量의 染色質을 採取하여 性染色體를 檢査하거나, 胚를 2個의 胚로 分離하여 그중 하나의 胚를 性染色體 分析에 利用하고 다른 하나는 移植하는 方法과 雄組織에서 發見되는 H-Y 抗原에 特殊한 組織抗體를 利用하는 方法으로 특히 螢光分子나 酵素를 가진 第2抗體를 적용하면 螢光顯微鏡下에서 (雄性 胚는 螢光, 雌性 胚는 非螢光) 受精卵의 性判別이 가능한데 이를 具體的으로 記述하면 다음과 같다.

1. 性染色質의 檢査에 의한 性比調節

胚의 性染色質의 檢査에 의한 性比調節은, Barr와 Betram(1949)이 性染色質은 암컷의 靜止核에만 存在한다는 것을 報告한 以來 그 存在의 有無를 利用하여 胚의 雌雄鑑別이 實施되어 왔다. 그후 Edwards等(1967)은 5¼日齡의 토끼 胚盤胞로부터 200~300個의 細胞를 採取하여 性染色質의 檢出을 實施하여, 性鑑別을 한 109個의 胚를 受卵뿔에 移植한 結果 17%의 産仔率을 얻었으며, 産仔의 性은 미리 鑑定한 性과 같았으나 産仔率이 극히 낮았다고 한다. 이 方法은 多量의 胚細胞가 鑑定에 必要하며, 家畜의 胚에서는 性染色質의 檢出이 곤란한 점등의 缺點이 있다.

2. 性染色體의 檢査에 의한 性比調節

受精卵의 性染色體 檢査에 의한 性判別은 2 가지 方法으로 나뉘어진다. 첫째는 受精卵으로부터 少量의 染色質을 採取한후 性染色體를 檢査하여 XX와 XY染色體의 胚를 判別하는 方法이다. Hare等(1976)은 이 方法에 의해 檢査한 胚의 68%가 性의 判別이 가능하였다고 하며, 鑑別한 胚의 移植에 의해 33%가 妊娠하였다고 한다. 採取한 細胞를 體外에서 增殖시켜 이들의 細胞를 이용하여 性을 判別하는 技術이 確立된다면 이 時期의 胚는 凍結 保存하는 方法에 의해 實用化 技術로서 受精卵 移植技術에 活用될 수 있을 것으로 생각된다. 둘째는 胚를 2個의 胚로 切斷 分離하여 그중 하나의 胚를 利用하여 染色體를 檢査하는 方法이다. 이 方法을 利用하여 胚의 性을 判別하기 위해서는 recipient에 移植後의 産子生産率이 無處理胚와 큰차가 없는 胚의 分離方法의 確立 및 分離胚의 凍結保存等の 技術을 開發하는 것이 必要하다. 受精卵은 初期 卵割期에 有絲分裂의 異常이 일어나거나 細胞가 融合하는 경우를 除外하고는 核型이 변하는 일은 극히 적어서(King, 1984), 染色體分析에 의한 性支配가 可能하여, 最近에는 受精卵移植 技術이 發達됨에 따라서 受精卵의 分割球중 일부를 취하여 核型分析으로 性을 判別한 후에 選擇의으로 移植하여 後代의 性을 支配하려는 研究가 活潑히 進行되고 있다(Vickers, 1967; Singh와 Hare, 1970). 染色體分析에 의한 受精卵의 性支配가 可能해지면 移植前에 受精卵의 性을 判別한 후에 冷凍保存하여 필요한 時期에 원하는 性의 受精卵을 移植하게 되므로 受精卵移植術의 實用化에 進一步할 수 있으며, 또한 free-martin

의 發生豫防等 大家畜에서의 産業的인 意義가 크다고 하겠다.

3. H-Y 抗體의 處理에 의한 性比調節

哺乳動物의 性을 支配하려는 最近의 試圖는, 免疫學의 方法에 의하여 受精卵의 性을 鑑別한 다음 選擇의으로 移植함으로써 後代의 性을 調節하려는 研究가 活潑히 進行되고 있다(Boyse & Bennett, 1973; Sacco & Shivers, 1973; Okawa & Yanagimachi, 1975; Wachtel, 1975; Ohno, 1976; Krco & Goldberg, 1976; Tsunoda & Chang, 1978; Epstein et al., 1980; White, 1983; Utsumi, 1983; Shelton, 1984). 이러한 研究들은 Eichwald와 Silmser(1955)가 近視繁殖을 시킨 雄性생쥐의 組織에서 組織適合性 抗原(histocompatibility Y-antigen, H-Y antigen)을 發見한 후, 이 H-Y 抗原에 대한 遺傳學的, 免疫學的 特性을 究명한 많은 研究結果에 根據를 두고 進行되어 왔다. 그러나 現在까지 報告된 研究報告들은 주로 實驗動物을 위주로 한 研究가 主宗을 이루고 있으며, 家畜에 대한 研究報告는 基礎的인 研究를 除外하고는 거의 없는 實情이다. H-Y 抗體의 製作은 Fig. 5에서 보는바와 같이, 羊의 脾臟이나 精巢를 homogenation하여 100 r.p.m.으로 10分간 遠心分離한 다음 下層液은 버리고 上層液은 4℃에서 30,000 r.p.m.으로 20分間 再遠沈한 후 adjuvant와 混合하여 H-Y 抗原을 製作하고, 이를 1週간격으로 7회에 걸쳐 同種羊에 注射하여 免疫시킨후 8週에 採血하여 抗血清을 分離하여 H-Y 抗體를 製作한다. 이때 H-Y 抗體生成의 確認은 間接免疫螢光法(indirect immunofluorescence test)이나 Farber等(1984)의 E-LISA法(enzyme-linked immunosorbent assay)으로 確認한다. 抗體生成이 確認된 H-Y 抗體와 補體를 混合한 培養液으로 8~16細胞期와 桑實胚의 羊受精卵을 CO₂ incubator(5% CO₂, 95% air, 37℃)에서 24~48時間 培養하면서, 螢光顯微鏡下에서 形態의 特性을 觀察하여 胚盤胞까지 正常的으로 發生한 受精卵을, 發情을 誘起한 羊의 子宮內에 移植한 다음 出産한 産仔의 性比를 調査하는 方法이 利用되고 있다. Goldberg等(1971)은 精子細胞障害 活性試驗(sperm cytotoxicity test)을 통하여, 血清學的으로 H-Y 抗原의 存在를 確認하였으며, Koo等(1973)은 電子螢光顯微鏡 檢査法(immunoelectron microscopy)에 의하여 H-Y 抗原이 精子의 尖體(acrosome)에

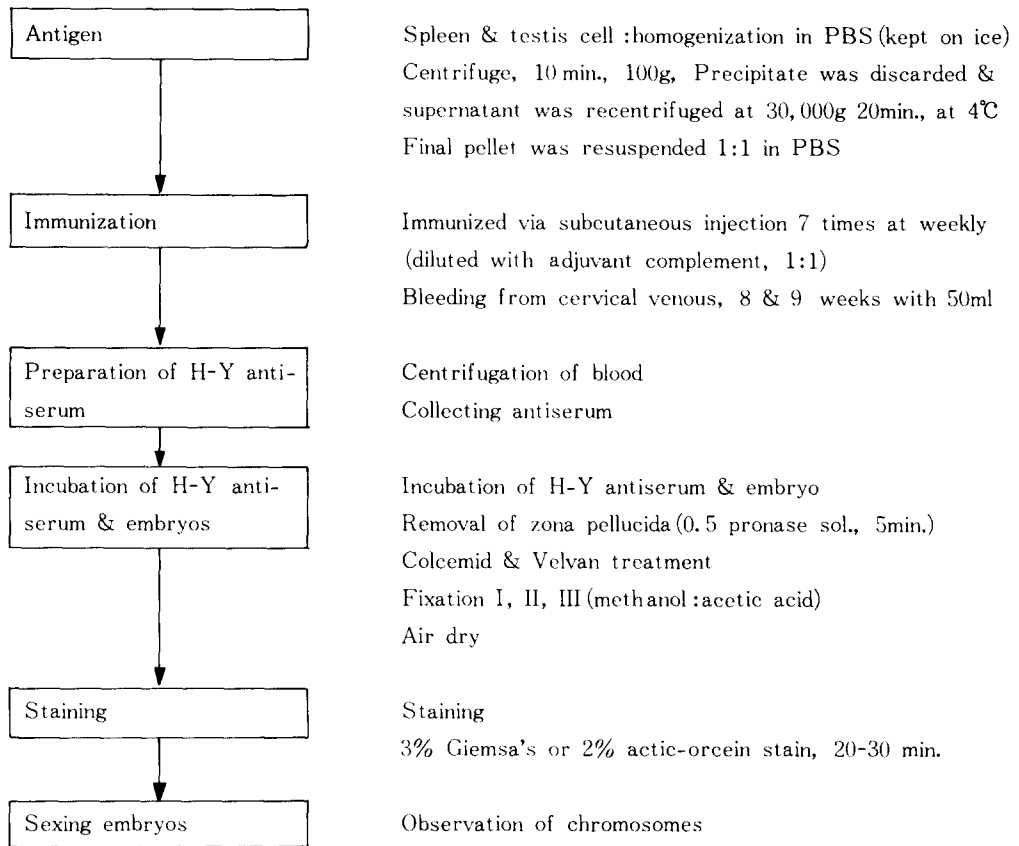


Fig. 5. Schmatic representation of sex determination by chromosomal analysis

集中心되어 있다는 사실을 발견하였으며, Ohno 등(1976)은 소의 free-martin gonad를 사용하여 H-Y 항원이 精巢로서 發達을 結定한다는 것을 證明하였다. 또한, Wachtel(1974)은 Y-chromosome과 관련된 細胞表面의 抗原들은 human을 포함한 哺乳動物의 種에 있어서 서로 交叉反應이 있다는 것을 立證하였고, 異型 配偶子의 鳥類나 兩棲類의 雄性에서도 H-Y 抗原이 存在하며, 8 細胞期 雄性胚의 細胞膜에서 H-Y 抗原이 存在한다고 報告하였다. 羊의 testis와 spleen을 利用하여 各各 製作한 H-Y 抗體와 胚盤胞 및 桑實胚를 處理하여 移植하였을 때 雌雄의 性比는 82.6%와 17.4%, 79.0%와 21.0%로 나타났다. 한편, H-Y 抗體와 補體를 mouse 受精卵과 處理하여 移植하였을 때의 雌雄의 性比는 77~82%와 94~100%였다고 報告하였다(Shelton 등, 1984; Hiruyuki 등, 1985; Sato 등, 1984; Shim 등, 1986). 이러한 結果들을 미루어 볼 때, H-Y 抗體를 受精卵과 處

理하여 移植하였을 때 상당한 水準의 性比調節이 가능한 것으로 判斷된다.

4. Monoclonal H-Y 抗體의 處理에 의한 性比調節

Cloning이란 單一細胞로부터 增殖한 同·遺傳子를 가진 細胞群을 만드는 것을 말하며, H-Y 抗原에 대한 抗體를 分泌하는 spleen cell과 myeloma cell을 融合시켜 hybridization에 의해 增殖, 選別, cloning시켜 單一細胞群으로부터 增殖한 monoclonal H-Y 抗體와 受精卵을 處理하여 性을 調節하려는 方法이다. Monoclonal H-Y 抗體에 의한 羊이나 家畜에 있어서의 性比調節에 관한 研究報告는 찾아볼 수 없으나, 다만 實驗動物인 mouse나 rat 등에서는 研究되고 있다. 最近에는 8~16細胞期の 생쥐 受精卵을 monoclonal H-Y 抗體 및 補體와 處理하여 胚盤胞까지 正常的으로 發生한 受精卵을 移植하여 얻은

Table 7. Sex of progeny resulting from ewe embryos treated with anti H-Y antibody and complement

Source antibody	No. of embryos examined	No. of embryos developed (%)	Survival after transfer (%)	Sex ratio	
				Female (%)	Male (%)
Anti-testis	186	152 (81.7)	69 (45.4)	57 (82.6)	: 12 (17.4)
Anti-spleen	212	194 (91.5)	81 (41.8)	64 (79.0)	: 17 (21.0)

*:Suffolk ewes

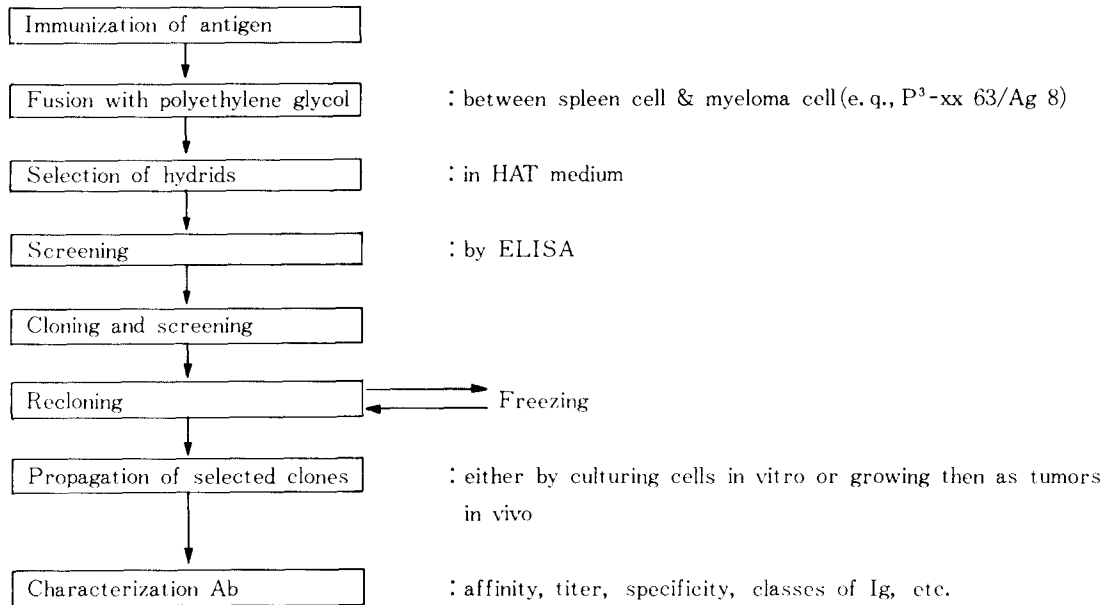


Fig. 6. Basic protocol for the production of monoclonal antibody

Table 8. Sex ratio of full-term fetus developed from H-Y monoclonal antibody exposed rat morula and blastocyst

Source of antibody	Step of development	No. of embryos	No. of pregnancy (%)	No. of fetus	Sex ratio	
					Female (%)	Male (%)
Anti-testis	Blastocyst	34	6 (17.6)	19	15 (79)	: 4 (21)
	Morula	32	6 (18.7)	16	0 (0)	: 16 (100)
Anti-spleen	Blastocyst	27	11 (40.7)	30	23 (77)	: 6 (23)
	Morula	27	8 (30.0)	31	2 (6)	: 29 (94)

*:Sato et al. (1984)

86~95.8%가 雌性이었다고 하며(Bryant, 1980; Epstein 등, 1980; White, 1982), Sato 등(1984)은 精巢와 脾臟을 利用하여 製作한 monoclonal H-Y抗體로 胚盤胞 및 桑實胚를 處理하여 移植하였을 때

어난 産仔의 雌雄의 性比는 各各 79%와 21%, 0%와 100% 및 77%와 23%, 6%와 94%였다고 한다. 한편, Wachtel(1984)은 monoclonal H-Y抗體로 處理한 다음 FITC와 labelling 한 第2抗體로 7~11

Table 9. Presumptive H-Y phenotype in bovine embryos treated with monoclonal H-Y antibody and FITC labeled secondary antibody

Test	No. of embryos treated	Age of embryos (days)	H-Y ⁽⁺⁾	H-Y ⁽⁻⁾	H-Y ^(?)
A	10	10-11	4	4	2
B	7	10-11	2	4	1
C	16	7-8	9	7	0
D	7	8	3	2	2
E	7	8	4	1	2
F	5	8	3	2	0
G	12	7	4	5	3
H	6	7	3	3	0
I	5	7	2	3	0

*:FITC(Fluorescein Isothiocyanate)

Table 10. Sex of progeny resulting from transfer of sexed mouse embryos by monoclonal H-Y antibody

Treatment	No. of embryos transferred	No. of fetus	Sex ratio		Reference
			Female(%)	Male(%)	
FITC*-labeled antibody assay					
Fluorescing	156	23	5(22)	18(78)	White et al. (1983)
Non-fluorescing	98	23	19(83)	4(17)	

*:FITC(Fluorescein Isothiocyanate)

日齡의 초受精卵에 處理하였을때 抗體反應의 結果는 H-Y⁽⁺⁾, 45.3%, H-Y⁽⁻⁾, 41.3%였으며, 13.3%는 抗體와 反應하지 않았다고 報告하였다. 또한, White等(1983)은 monoclonal H-Y抗體로 處理한 다음 FITC로 coupling된 第2抗體로 mouse受精卵에 處理한후 偽妊娠된 mouse에 移植하였을때 태어난 産仔의 雌雄의 性比는 各各 22%와 78%, 83%와 17%였다고 報告하였다. 한편, Wachtel等(1984)은 人家畜인 소에 있어서도 受精卵에 monoclonal H-Y抗體를 處理함으로써 원하는 性을 가진 仔牛生産에 成功하였다고 報告하였다. 이러한 結果들을 미루어 볼때, 後代의 性을 人爲적으로 支配하려는 人類의 念願이 곧 解決될 수 있는 劃期的인 性比調節 方案으로 期待된다.

V. 結 論

哺乳動物에 있어서의 性比調節은 대체로, 交配前 後의 雌畜에 營養, 알코올, pH 및 內分泌의 刺戟에 의해 원하는 性의 精子에 의해 受精을 試圖하는 方法과, 미리 X-精子和 Y-精자를 精子頭部の 크기나 무게, 電氣의 差異, 運動速度等에 의해 分離하여 分離한 精자를 人工授精시켜 産仔의 性을 調節하려는 方法과 受精卵 또는 分離胚中 1/2胚의 性染色體 分析에 의해 性이 判別된 胚를 recipient에 移植하여 바라는 性의 産仔를 얻는 方法으로 要約된다. 家畜은 물론 羊에 있어서의 性比調節에 관한 研究報告는 基礎的 研究外는 거의 없으나 사람이나 實驗動物에 관한 研究報告는 많은 實情이다. 最近에는 性比調節에 있어 免疫學的 方法 즉, H-Y抗體나 monoclonal H-Y抗體를 利用하여 受精卵에 處理한 다음 胚의 性染色體를 分析하여 性이 判別된 胚를 選擇의으로 移植함으로써 상당한 成果를 얻고 있다. 特히 이러한 免疫學的 方法에 의해 마우스에서는

90% 以上の 性을 調節할 수 있는 段階에 있으며 人家畜인 소에 있어서도 원하는 性을 가진 仔牛生産에 成功하고 있다. 이러한 事實로 미루어 볼때, 後代의 性을 人爲적으로 支配하려는 人類의 念願도 곧 解決될 수 있을 것으로 豫見되며, 今後 이 分野에 관한 研究도 活氣를 띠게되어 크게 進展될 것으로 期待된다.

VI. 引用文獻

1. Bangham, A.D. 1961. Electrophoretic characteristics of ram and rabbit spermatozoa. *Proc. Roy. Soc. Lond., Ser. B*, 155:292-305.
2. Bennett, D. and E.A. Boyse. 1973. Sex ration in progeny of mice inseminated with sperm treated with H-Y antiserum. *Nature*, 246:308-309.

3. Bhattacharya, B.C. 1962. Die Verschiedene Sedimentations geschwindigkeit der X-und Y-spermien und die Frage der willkurlichen Gescelecht-bestimmung. *Z. Wiss. Zool.*, 196:203-250.
4. Bhattacharya, B.C. et al. 1976. *Indian Journal of Exp. Biol.*, 14(5):610-611.
5. Billingham, R.E. and I.M. Hings. 1981. The H-Y antigen and its role in natural transplantation. *Hum. Genet.*, 58:9-17.
6. Bryant, B.J. 1980. Method and material for increasing the percentage of mammalian offspring of either sex. *US Patent.*, 4, 191, 749.
7. Edwards, R.G. and R.L. Gardner. 1967. Sexing of live rabbit blastocysts. *Nature*, 214:576-577.
8. Eichwald, E.J. and C.R. Silmsler. 1955. *United Communication. Transplant. Bul.*, 2:148-149.
9. Epstein, C.J., S. Smith, and B. Travis. 1980. Expression of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. *Tissue Antigen*, 15:63-67.
10. Farber, C.M., D. Liebenthal, S.S. Wachtel, and C.C. Rundles. 1984. Detection of H-Y in the enzyme-linked immunosorbent assay. *Hum. Genet.*, 65:278-279.
11. Fukui, Y., M. Kobayashi, and H. Ono. 1985. Effects of injection time of pregnant mare's serum gonadotropin and individual rams on fertility of ewes in a trial of out-of-season breeding. *Japan J. Anim. Reprod.*, 31:16-24.
12. Gledhill, B.L., D. Pinkel, S. Lake, D.L. Garner, and L.A. Johnson. 1984. Identifying and separating X- and Y-chromosome-bearing mammalian sperm by flow cytometry. *Anim. Reprod. and Artifi. Insemi.* 2:55 (abstr.)
13. Goldberg, E.H., E.A. Boyse, D. Bennett, M. Scheid and E.A. Carswell. 1971. Serological demonstration of H-Y (male) antigen on mouse sperm. *Nature*, 232:378-380.
14. Hare, W.C.D., D. Mitchell, K.J. Betteridge, M.D. Eaglesome, and G.C.B. Randall. 1976. Sexing two-week old bovine embryos by chromosomal analysis prior to surgical transfer preliminary methods and results. *Theriogenology*, 5(5):243-253.
15. Hiroyuki, A., Y. Takahashi, and H. Kanakawa. 1985. Sex determination of ddY mouse morulae by anti-male spleen cell serum. *Japan J. Anim. Reprod.*, 31(2): 74-77.
16. Hishinuma, M., H. Kanakawa, K. Utaka, M. Sakai, M. Teranishi, and N. Seike. 1984. Chromosomal sex determination of bovine embryos. *J. Mamm. Ova. Res.*, 1(2):169-176.
17. Hoppe, P.C. and G.C. Koo. 1983. Reacting mouse sperm with monoclonal H-Y antibodies does not influence sex ratio of egg fertilized in vitro. *J. Reprod. Immunol.*, 6:1-9.
18. Kaneko, S., J. Yamaguchi, T. Kobayashi, and R. Izuka. 1983. Separation of human X-and Y-bearing sperm using Percoll density gradient centrifugation. *Fertil. and Steril.*, 40(5):661-665.
19. King, W.A. 1984. Sexing embryos by cytological methods. *Theriogenology*, 21:7-17.
20. Koo, G.C. 1981. Serology of H-Y antigen. *Hum. Genet.*, 58:18-20.
21. Krco, C.J. and E.H. Goldberg. 1976. H-Y (male) antigen: Detection on eight-cell mouse embryos. *Science*, 193:1134-1135.
22. Loir, M. and M. Lanneau. 1974. Separation of ram spermatids by sedimentation at unit gravity. *Exp. Cell Res.* 83:319-327.
23. Mathieson, B.J. 1976. Selective expression

- of surface components on differentiated cells of the mouse: Immunoselection of Y-bearing sperm in a in vitro fertilization system. Ph. D. Thesis, Cornell Univ.
24. Mudd, S. and E.B.H. Mudd. 1929. The specificity of mammalian spermatozoa, with special reference to electrophoresis as a mean of serological differentiation. *J. Immunol.*, 17:39-52.
 25. Müller, U. 1982. Identification and function of serologically detectable H-Y antigen. *Hum. Genet.*, 61:91-94.
 26. O' Donnell, J.M. 1969. Intracellular level of sodium and potassium in bull spermatozoa in relation to cell metabolism. *J. Reprod. Fertil.*, 19:207-209.
 27. Ohno, S., L.C. Christian, S.S. Wachtel and G.C. Koo. 1976. Hormone-like role of H-Y antigen in bovine free-martin gonad. *Nature*, 261:597-598.
 28. Pinkel, D. et al. 1985. *J. Anim. Sci.*, 60: 1303.
 29. Rary, J.M., D.K. Cumming, H.W. Jones, and J.A. Rock. 1979. Assignment of the H-Y antigen gene to the short arm of chromosome Y. *J. Hered.*, 70:78-80.
 30. Sato, E., K. Utsumi, M. Yamada, and M. Yuhara. 1984. Sex identification of rat embryos by H-Y monoclonal antibody. *J. Mamm. Ova. Res.*, 1(1):107-109.
 31. Schilling, E., J. Jazbec, und R. Schmid. 1967. Grösse und Geschwindigkeit der Samenzellen vom Rind und Schaf und deren mögliche Beziehungen zum Geschlecht. *Zschr. Tierzücht. Zuchtbiol.*, 83: 331-339.
 32. Schilling, E., R. Lafrenz and F. Klobasa. 1978. Failure to separation human X- and Y-chromosome bearing spermatozoa by Sephadex gel filtration. *Androl.*, 10: 215-217.
 33. Schröder, V.N. 1934. Die physikalisch-chemische Analyse der Spermienphysiologie. V. Mitteilung :Über die Kunstliche Geschlechtsregulierung bei Säugetieren. *Biol. Zhur. Moskwa*, 3:465-476.
 34. Shelton, J.A. and E.H. Goldberg. 1984. Male-restricted expression of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. *Transplantation*, 37:7-8.
 35. Shettles, L.B. 1976. Separation of X and Y-spermatozoa. *J. Urol.*, 116:462-464.
 36. Singh, E.L. and W.C.D. Hare. 1970. The feasibility of sexing bovine morula stage embryos prior to embryo transfer. *Theriogenology*, 14:421-427.
 37. Tarkowaki, A.K. 1966. An air-drying method for chromosome preparations from eggs. *Cytogenetics*, 5:395-400.
 38. Tsunoda, Y. and M.C. Chang. 1976. Reproduction in rats and mice isoimmunized with homogenates of ovary testis with epididymis or sperm suspensions. *J. Reprod. Fertil.*, 46:379-382.
 39. Utsumi, K., E. Sato, and M. Yuhara. 1983. Sexing of mammalian embryos exposed to H-Y antisera. *J. Reprod. Immunol.*, Supplement, 59.
 40. Vickers, A.D. 1967. A direct measurement of the sex-ratio in mouse blastocyst. *J. Reprod. Fertil.*, 13:375-376.
 41. Wachtel, S.S., G.C. Koo, E.E. Zuckerman, U. Hammerling, M.P. Scheid, and E.A. Boyse. 1974. Serological crossactivity between H-Y (male) antigens of mouse and man. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 71: 1215-1218.
 42. Wachtel, S.S. 1984. H-Y antigen in the study of sex determination and control of sex ratio. *Theriogenology*, 21:18-28.
 43. Wachtel, G.M., S.S. Wachtel, D. Nakamura, C.A. Moreirafilho, M. Brunner and G.C.

- Koo. 1984. H-Y antibodies recognize the H-Y transplantation antigen. *Transplantation*, 37:8-13.
44. White, K.L., G. W. Linder, G.B. Anderson, and R.H. Bondurant. 1982. Survival after transfer of "sexed" mouse embryos exposed to H-Y antisera. *Thriogenology*, 18:655-662.
45. White, K.L., G.W. Linder, G.B. Anderson, and R.H. Bondurant. 1983. Cytolytic and fluorescent detection of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. *Thriogenology*, 19:701-705.
46. White, K.L., M.W. Linder, G.B. Anderson and, R.H. BonDurant. 1984. Immunofluorescent detection of a male-specific factor on preimplantation bovine embryos. *Thriogenology*, 21:275.
47. White, I.G., G. Mendoza, and W.M.C. Maxwell. 1984. Preselection of sex of lambs by layering spermatozoa on protein columns. *Reprod. in Sheep*, 299-300.
48. Zeleny, C. and E.C. Faust. 1915. Size dimorphism in the spermatozoa from single testis. *J. Exp. Zool.*, 18:187-240.
49. 佐伯祐次. 1947. 山羊精子の形態学的觀察. *日畜会報*, 18:67~70.
50. 福井 豊. 1984. 緬羊の人工繁殖に関する研究. *日本家畜繁殖誌* 30(3):134~139.
51. 毛利 秀雄. 1985. X-精子と Y-精子. *日本哺乳卵研究* 2(2):98~104.
52. 沈昊燮, 高正在, 金鍾培, 朴弘陽, 鄭吉生. 1986. 생쥐 受精卵에 대한 H-Y 抗體處理가 産仔의 性比에 미치는 影響. *韓畜誌* 28(12):759~764.
53. 鄭吉生. 1977. 家畜의 性比調節에 관한 研究動向. *韓國家畜研究會報* 1(1):73~82.
54. 西田 司一. 1984. 哺乳動物の性比と性支配. 養賢堂. 東京.
55. 久尾左知丸, 加藤淑裕, 入谷 明, 鈴木秋悦, 館隣. 1981. 哺乳動物の初期發生. 理工学社. 東京.