

成績概要書（平成 19 年 1 月作成）

研究課題： 牛 X Y 分取精子の受精能および分取精度評価

（ X Y 精子分取精度の評価法および分取精子による効率的牛胚生産方法の開発）

担当部署： 道立畜試 基盤研究部 受精卵移植科・遺伝子工学科
家畜研究部 育種科

協力分担： ジェネティクス北海道 試験研究室

予算区分： 共同（民間等）

研究期間： 完 2003～2005 年度（平成 15～17 年度）

1. 目的

X および Y 精子の DNA 含量の差を利用し、フローサイトメータ（FCM）により分取する方法が開発され、牛の雌雄産み分けへの利用が検討されている（図 1）。現在、分取精度は 90% 程度まで向上しているが、分取効率が低く十分な精子を供給することはできない。

本実験では、FCM による精子分取精度の評価法を開発するとともに、分取精子による人工授精および体外受精で受精卵を生産し、分取精子の有用性を検討する。また、利用できる分取精子数を増加させるために、精子の処理方法を検討する。

2. 方法

- 1) X Y 分取精度評価法の検討
- 2) X Y 分取精子の凍結保存方法の検討
- 3) X Y 分取精子による効率的牛受精卵生産方法の検討

3. 結果の概要

1) PCR により X および Y 分取精子の性染色体検査を行った結果、FCM で再分取して評価した精度とほぼ一致し、想定された精度で分取されていることが確認された（表 1）。黒毛和種（種雄牛 A）Y 分取精子を用いて体外受精を行った結果、対照および Y 分取精子間の分割率および発生率に差はなく、いずれも媒精時間が 5 時間から 18 時間に延長することによって増加した（表 2）。種雄牛 B（参考値）は、媒精時間の延長により発生率が低下し、精液によって至適な媒精時間が異なることが示唆された。Y 分取精子による体外受精卵の雄の割合は対照に比較して高い値を示した（表 3）。

2) クエン酸緩衝液はトリス緩衝液に比較して先体正常率および運動精子率のいずれも高い値を示した（表 4）。また、クエン酸緩衝液と Multi thermal gradient (MTG) 凍結法の組み合わせで最も高い先体正常率および運動精子率が得られた。

3) 黒毛和種 Y 分取精子を用いて人工授精を行った結果、発生率および正常卵率のいずれも対照に比較して Y 分取精子の成績が低かった（表 5）。Y 分取精子による受精卵の雄の割合は対照に比較して高く、FCM で再分取して評価した精度と一致した（表 6）。受精卵移植により生産した子牛 3 例は、難産（双子）による死亡、生後直死および正常子牛が各 1 例であり、いずれも外貌、生時体重等に異常はみられなかった。生存した 1 例の体高および体重は黒毛和種の発育標準の範囲内であった。

本実験では、PCR による分取精子の精度評価法を確立した。黒毛和種の分取精子を用いた体外受精および人工授精により、雌雄産み分けが可能であることを示した。また、精液の希釈緩衝液および凍結法の改良により、精子の生存率を向上できることを示した。

表 1 X Y 分取精子の PCR 法による性染色体検査

精子	供試精子数	PCR 陽性精子数	PCR 法による精度		FCM による精度	
			X 精子数	Y 精子数	X 精子率	Y 精子率
対照	30	26 (87%)	15 (58%)	11 (42%)		
X 分取	30	26 (87%)	20 (77%)	6 (23%)	80-90%	10-20%
Y 分取	30	28 (93%)	5 (18%)	23 (82%)	10-20%	80-90%

表 2 黒毛和種 Y 分取精子による体外受精卵の発生成績

種雄牛	精子	媒精時間 (hr)	卵子数	分割 (%)	発生 (%)
A	対照	5	209	24 (11.5) ^a	4 (1.9) ^a
		18	263	133 (50.6) ^b	14 (5.3) ^b
	Y 分取	5	242	28 (11.6) ^a	1 (0.4) ^a
		18	284	149 (52.5) ^b	8 (2.8) ^b
B		5	162	109 (67.3)	38 (23.5)
		18	191	124 (64.9)	21 (11.0)

異符号間に有意差あり 種雄牛 B (非分取) の値は参考値

表 3 黒毛和種 Y 分取精子による体外受精胚の性判別

精子	性判別数	判定結果 (%)		FCM による精度 (%)
		雄	雌	
対照	58	33 (56.9)	25 (43.1)	
Y 分取	18	13 (72.2)	5 (27.8)	87 - 93

表 4 分取精子に対する精子希釈緩衝液および凍結法の影響

精子	緩衝液	凍結法	先体正常率 (%)	運動精子率 (%)
対照	クエン酸	Vapor	96.1 ± 2.1 ^a	76.7 ± 4.4 ^a
X 分取	トリス	Vapor	77.1 ± 4.5 ^{bc}	21.1 ± 8.0 ^c
		MTG	71.0 ± 5.0 ^c	28.3 ± 4.3 ^{bc}
	クエン酸	Vapor	81.9 ± 8.6 ^{bc}	40.2 ± 9.9 ^b
	クエン酸	MTG	86.9 ± 5.5 ^b	42.0 ± 1.1 ^b

異符号間に有意差あり

表 5 黒毛和種 Y 分取精子による人工授精 - 採卵 -

精子	採卵回数	回収胚数	桑実胚 (%)	正常卵 (%)
	対照	10	114	72 (63.2) ^a
Y 分取	11	136	25 (18.4) ^b	22 (16.2) ^b

異符号間に有意差あり 正常胚; 桑実胚以上の A~C ランク

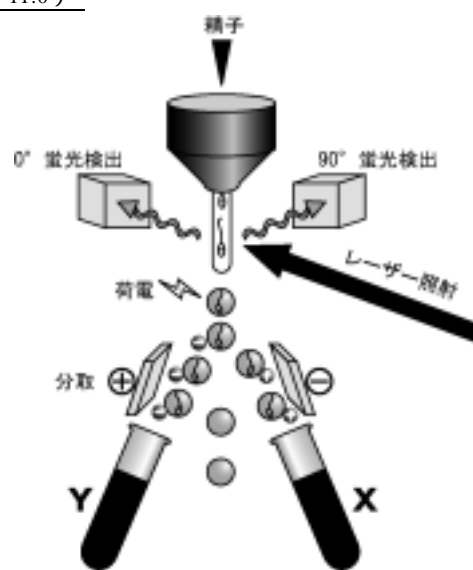


図 1 FCM による精子の分取

表 6 黒毛和種 Y 分取精子による人工授精 - 性比 -

精子	性判別数	判定結果 (%)			FCM による精度 (%)
		雄	雌	不明	
対照	67	25 (37)	39 (58)	3 (4)	
Y 分取	45	40 (89)	4 (9)	1 (2)	89-93

4. 成果の活用面と留意点

- 1) PCR 法による性染色体検査を FCM による精子の分取精度評価法として利用する。
- 2) FCM による精子の分取効率を改善するための基礎データとして利用する。
- 3) FCM による分取精子を用いた受精卵生産効率の改善のための基礎データとして利用する。

5. 残された問題とその対応

- 1) 個体毎の精子の分取効率、分取精度および分取精子の受精能を調査する必要がある。
- 2) 分取精子を用いて効率的に体外受精卵を生産する方法を検討する必要がある。
- 3) 少ない精子数で効率的に受精卵を得るために、未経産、経産牛、精子数および子宮への注入部位など考慮して人工授精方法を最適化する必要がある。