成績概要書（2009 年 1 月作成）

研究課題：**牛 XY 分取精子を用いた雌受精卵の生産技術**
（XY 分取精子を用いた効率的家畜生産技術の確立）
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 病態生理科
家畜研究部 肉牛育種科
協力分担：(社)ジェネティクス北海道
予算区分：共同（民間）
研究期間：2006～2008 年度（平成 18～20 年度）

---

1. 目的

X精子と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XY精子を分取する方法は、人工授精現場段階で利用できる牛の雌雄産み分け技術として期待されている。現在、FCMによる精子の分取精度は 90％程度まで向上しており、人工授精による子牛の生産に利用されている。しかし、精子の分取効率は、分取速度が 3,000～4,000 精子/秒（10～12×10^6精子/時間）、凍結精液ストローの日生産量（稼働 6 時間）が 30 本（2×10^6精子/本）と低く、分取精子を生産するためには多くの労力と費用が必要とされる。

道立畜試では、分取の正確性と分取精子が実際に雌雄産み分けに活用できることを確認しているが、分取効率の有効な改善技術は開発されていない。そこで、分取精子を有効活用するためには､分取精子を用いた受精卵を生産し効率的に産子を得る方法が重要となる。本試験では、乳用雌牛の効率的生産システムの確立を目指し、分取精子の凍結用希釈緩衝液と X 分取精子を用いた雌受精卵生産方法を検討する。

2. 方法

1) 分取精子の凍結用希釈緩衝液の検討

分取した精子（FCM）をクエン酸あるいはトリス緩衝液で希釈後凍結し、精子画像解析装置 IVOS により融解後の運動性を、体外受精により分割率と受精率を評価した。

2) ホルスタイン雌牛生産のための雌受精卵生産技術の検討

(1) 体外受精時の精子活性化試薬（カフェインおよびテオフィリン）が分割率および受精率に及ぼす影響を検討した。

(2) クエン酸緩衝液で希釈後に凍結した X 分取精子を用いてホルスタイン種未経産牛における採卵を実施した。

3. 成果の概要

1)クエン酸緩衝液で希釈後に凍結した非分取精子は融解後の運動性が高く、分取精子でもクエン酸緩衝液で希釈後に凍結した場合に頭部振り回数と精子直進性が向上した（表 1)。体外受精では、分取精子による分割率および発生率が低下したが、クエン酸緩衝液で希釈後に凍結した分取精子は分割率の低下が少ない傾向を示した。

2)–(1) 非分取精子では、精子活性化試薬としてテオフィリンを用いた場合に体外受精の発生率が向上し、体外受精卵の生産効率が改善された（表 2)。X 分取精子では、分取操作によって受精率が低下しない場合はテオフィリン、受精率が低下した場合はカフェインを用いた場合に発生率が高い傾向を示した（表 3)。

2)-(2) X 分取精子を用いてホルスタイン種未経産牛から体内受精卵を生産でき（表 4)、受精卵移植によって雌牛を効率的に生産できると推察された。

本試験は、クエン酸緩衝液で分取精子を凍結することで融解後の精子運動性が向上すること、精子活性化法の選択でＸ分取精子による体外受精卵の生産効率を向上できることを示した。また、X 分取精子により雌体内受精卵が生産され、雌牛の生産効率を向上できる可能性を示した。

表 1　精子の凍結用希釈緩衝液が融解 60 分後の精子運動性に及ぼす効果

精子番号	分取の有無	凍結用希釈緩衝液の種類	実験回数	生存精子率(%)	前進運動精子率(%)	頭部振り回数	精子直進性
ホル A	分取	クエン酸	6	25.0 b	5.0 c	25.5	85.9 a
		トリス	6	26.7 b	3.0 c	18.0	73.4 b
	非分取	クエン酸	3	77.9 a	50.9 a	29.4	87.1 a
		トリス	3	66.8 a	18.5 b	21.7	74.8 b
ホル B	分取	クエン酸	6	33.1 b	8.3 b	28.0 b	90.9 a
		トリス	6	26.1 b	4.6 b	14.7 c	81.3 b
	非分取	クエン酸	3	69.1 a	51.0 a	39.6 a	92.6 a
		トリス	3	40.0 b	10.7 b	26.4 b	75.2 c

a,b,c：種雄牛内で異符号間に有意差あり（$p<0.05$）　クエン酸、トリス：pH 緩衝用試薬

表 2　非分取精子を用いた体外受精における精子活性化法の比較

精子番号	精子活性化試薬	実験回数	供試卵子数	分割卵数	(分割率)[a]	発生卵数	(発生率)[a]
黒毛 A	カフェイン	7	434	299	(77%)	80	(18%)b
	テオフィリン	7	456	365	(82%)	142	(28%)a
黒毛 B	カフェイン	6	371	316	(85%)	75	(18%)
	テオフィリン	6	365	302	(83%)	102	(29%)
黒毛 C	カフェイン	6	251	192	(77%)b	34	(14%)b
	テオフィリン	6	252	216	(86%)a	56	(22%)a
ホル C	カフェイン	6	297	260	(87%)a	35	(12%)b
	テオフィリン	6	294	230	(78%)b	58	(19%)a

a) 分割率および発生率は実験毎の値の平均値　種雄牛内で異符号間に有意差あり（$p<0.05$）
分割：2 細胞以上　発生：胚盤胞以上

表 3　分取精子を用いた体外受精における精子活性化法の比較

精子番号	分取の有無	精子活性化試薬	実験回数	供試卵子数	分割卵数	(分割率)[a]	発生卵数	(発生率)[a]
ホル D	X 分取	カフェイン	7	268	196	(72%)	15	(6%) b
		テオフィリン	7	280	220	(78%)	30	(12%) ab
	非分取	カフェイン	6	210	160	(77%)	26	(13%) ab
		テオフィリン	6	199	165	(83%)	40	(20%) a
ホル E	X 分取	カフェイン	6	161	66	(40%)	9	(5%) b
		テオフィリン	6	173	26	(15%)	1	(0.4%) b
	非分取	カフェイン	6	183	155	(85%)	22	(12%) b
		テオフィリン	6	160	121	(77%)	43	(27%) a

a) 分割率および発生率は実験毎の値の平均値　種雄牛内で異符号間に有意差あり（$p<0.05$）
分割：2 細胞以上　発生：胚盤胞以上

表 4　ホルスタイン種 X 分取および非分取精子を用いた採卵成績

分取の有無	精子番号	採卵頭数	推定黄体数 (/頭)	回収卵数	回収卵数／採卵	移植可能卵数 [a]	移植可能卵数／採卵
X 分取	ホル D	3	19 (6)	11 (58%)	3.7	7 (64%)	2.3
	ホル E	7	54 (8)	38 (70%)	5.4	11 (29%)	1.6
	ホル F	3	17 (6)	9 (53%)	3.0	5 (56%)	1.7
	合計	**13**	**90 (7)**	**58 (64%)**	**4.5**	**23 (40%)**	**1.8**
非分取	ホル D	3	15 (5)	5 (33%)	1.7	0 (0%)	0
	ホル E	4	31 (8)	22 (71%)	5.5	4 (18%)	1.0
	合計	**7**	**46 (7)**	**27 (59%)**	**3.9**	**4 (15%)**	**0.6**

a) AB ランク卵

4. 成果の活用面と留意点

1) 本成績は、精子の供給元が凍結 XY 分取精子の性状を改善するための参考となる。
2) 本成績は、XY 分取精子を用いた体外受精卵の作製に利用できるが、品種、個体および採精ロットなどによって精子の運動性や受精率が異なることに留意する。

5. 残された問題とその対応

1) 精子凍結用のクエン酸緩衝液が人工授精成績に及ぼす効果の検証。
2) X 分取精子を用いて作製した受精卵の移植試験による子牛の生産と性別の検証。
3) ホルスタイン種経産牛と X 分取精子による雌体内受精卵の生産効率の検討。