

# 雌雄産み分け用ウシ精子選別技術の実用化

群馬県前橋市金丸町

ウシ精子選別技術実用化グループ

(代表：木村博久)

## 1 背景

後継乳用牛として雌子牛を確保することや、増体に優れる肉用雄子牛を得ることに代表される子牛の雌雄産み分けは、長い間、畜産関係者の望む技術であった。

哺乳類の性はX染色体（以下「X」という。）とY染色体（以下「Y」という。）と呼ばれる2種類の性染色体によって決定される。雌はXを2つ、雄はXとYを1つずつもっている。雌が生産する卵子はXしかもたないのに対し、雄が生産する精子はXとYの2種類をもつので、X精子が受精すれば受精卵はXが2つになることから雌の個体となる。逆に、Y精子が受精すれば、受精卵はXとYの両方をもつことになるので、雄になる（図-1）。つまり、精子が性の決定を左右することから、X精子とY精子を分けることができれば、雌雄産み分けが可能になる。

哺乳類の染色体は、XがYより大きく、ウシでは、X精子がもつDNAの量はY精子より3.8%多いことが知られている。1980年代の後半、米国農務省のJohnsonらは、このことを利用して、細胞膜を透過しDNAに可逆的に結合する蛍光試薬Hoechst33342で染色した精子をフローサイトメーターで一個ずつ流しながら蛍光を測定することで、X/Y精子を識別・分取する技術を開発した。図-2にその原理を示した。①から流れてきた個々の精子に②でレーザー光線を当て2方向から蛍光強度を測定し、③コンピューターで瞬時にX精子かY精子かを解析する。④その精子が液流の先端に移動したとき、液全体に荷電する。荷電液滴が液流から分離した直後に⑤偏向板により回収するというものである。

## 2 フローサイトメーターの性能向上と技術開発

(社)家畜改良事業団は、このJohnsonらの報告に早くから着目し、日本での雌雄産み分け技術

の獲得と実用化のための研究に乗り出すこととなった。まず、1988年にJohnsonの指導のもとに日本で初めて本技術の導入を行い、メーカーのエンジニアと綿密な打ち合わせを繰り返し、当団にとって初代のフローサイトメーターとなるEPICS-753を導入した(図3の1)。この機種の子選別速度は5~10万個/時間であったが、この速度を得るためには尾部を超音波で切断し頭部のみとする必要があった。このことから、本機で選別した精子頭部を用いた本技術の有効性に関する基礎的な研究を実施するために、顕微鏡下で精子頭部を卵子に注入する顕微受精技術を導入することとなった。

1997年に、改めてエンジニアと特殊な形状のノズルの作製や2台のレーザーの設置に関する詳細な打ち合わせを行った上で、2世代目のフローサイトメーター、FACS Vantageを導入した(図3の2)。この機種では選別速度が30~40万個/時間に向上したのみならず、尾部の付いた人工授精に利用可能な運動性をもつ完全な形の精子の選別が可能となったが、人工授精用精液として実用化するにはほど遠いレベルであった。

一方、1996年には米国農務省から本技術に係る特許の独占実施権を取得したXY社が設立された。また、XY社はフローサイトメーターのメーカーであるサイトメーション社に精子選別専用機の開発を行わせており、この専用機を導入するためにはXY社から共同研究ライセンスを取得することが必要であった。それまでの当団の研究はJohnsonの了解のもとに進めてきたものであったが、2000年3月にXY社から共同研究ライセンスを取得し、同年5月には当団にとって3世代目のフローサイトメーターとなるサイトメーション社のMoFlo-SX(図3の3)を2台導入するとともに、操作技術を習得させるために職員2名をXY社に派遣し、日本国内での実用化を目指して試験を開始した。

導入からしばらくは性能が安定せず、なかなか思い通りの選別効率が得られなかった。併せて、選別した精子が凝集する現象がしばしば観察され、シース液や希釈液の調製に用いる試薬の見直しや液自体の組成の再検討も余儀なくされたが、試行錯誤を繰り返しながらも、一つ一つ要因を洗い出し、原因を究明していくことで、精子の凝集を防止できるようになった事に加え、融解後活力や回収率の向上も実現した。

### 3 試験結果

2001年から5年間に得られた成果は次のとおりである。

- (1)選別速度；種雄牛延べ44頭の平均選別速度はX精子1,183万個/時間、Y精子1,357万個/時間であった。
- (2)選別純度；X精子92.8%、Y精子92.4%であった。
- (3)未経産牛に対する人工授精の受胎率；選別精子300万個で47.9%(1,018/2,124)、同数の非選別精子で58.7%(498/849)となり、有意の差があった(表1~3)。
- (4)生存子牛分娩率；選別精子88.6%、非選別精子89.3%であり、両者間に有意の差は認められ

なかった（表4）。

(5)妊娠期間；選別精子 281.1 日、非選別精子 281.3 日であり、両者間に有意の差は認められなかった（表5）。

(6)生時体重；選別精子 36.9kg、非選別精子 37.5kg であり、両者間に有意の差は認められなかった（表6）。

(7)産子の性比；X 精子による雌子牛生産率は 93.8% (570/608)、Y 精子による雄子牛生産率は 92.5% (541/585)、非選別精子による雌子牛生産は 48.7% (307/631) であった（表7）。

(8)産子の発育性1；X 精子によるホルスタイン種雌牛およびY 精子による黒毛和種去勢牛の発育性は、非選別精子による産子のものとの間に顕著な差は認められなかった（図4及び5）。

(9)産子の発育性2；X 精子によるホルスタイン種雌牛への初回種付け時期は、非選別精子による産子のものと同時期であった（図6）。

(10)体外受精卵の受胎率；選別精子あるいは非選別精子を用いて生産した体外受精卵の受胎率に有意の差は認められなかった（表8）。

## 4 選別精液の配布

これらの成果をもとに、生産現場に受け入れられるか関係機関や有識者の意見も聞きつつ総合的に判断した結果、実用化は可能との結論に達した。そこで、XY 社の技術審査を経て、2006 年8月に牛選別精液生産に関する商業ライセンス契約を締結した。これを受けて、選別精液を用いて生産した体外受精卵は同年10月から、人工授精に用いることができる選別精液は、「Sort 90」という名称で2007年2月から一般配布を開始している。また、研究及び生産体制の増強を図るため、同年11月には3台目のMoFlo-SXを導入、2009年5月および2010年2月に、当団にとって第4世代となる改良型のMoFlo XDP-SX（図3の4）をそれぞれ2台ずつ導入し計7台の体制を整えた（図7）。これら2機種に分取速度は、MoFlo-SXが1,500～1,800万個／時間、MoFlo XDP-SXが2000万個超／時間となっている。

2009年度の生産実績は、乳用種選別精液22,192本、肉用種選別精液959本、計23,151本であった。

選別精液を用いた農家においては、後継牛の確保といったこれまで直面していた問題に応える成果が如実に表れてくる中、なお一層の期待が寄せられていることから、当団では、これに応えるべく、輸送原精液からの選別精液生産等の新しい技術開発や技術水準向上に向けたさらなる改善を図るための検討を加えつつ、関係機関の協力のもと、これらを着実に実施しているところである。

## 5 事例・業績に関する資料等

### 1) 誌上発表

- 『雌雄産み分け技術：「選別精液 Sort90」』戸田昌平、Dairy News、P5107、676号、(2009)
- 『牛精液雌雄判別技術の現状と課題』木村博久、畜産技術、P17、645号、(2009)
- 『牛 XY 選別精液の生産とその課題』木村博久、家畜人工授精、P1、251号、(2009)
- 『牛の雌雄産み分け用の選別精液の生産技術とその実用性』、湊 芳明、家畜人工授精、245号、(2008)
- 『牛の選別精液を用いた雌雄産み分け「選別精液の生産と実用性」』、湊 芳明、LIAJ News、No. 109、(2008)
- 『精子レベルでの牛の雌雄産み分け技術・フローサイトメーターによる選別精液の生産と実用性』湊 芳明、ET ニュースレター、P1、No. 32、(2008)
- 『XY 精子選別による子牛の雌雄産み分け』、木村博久、養牛の友、特集 繁殖技術の最新動向、日本畜産振興会、P38、7号 (2007)
- 『X、Y 選別精子によるウシの人工授精』湊 芳明、新しい畜産技術 一近未来編一、P52、(2007)
- 『牛の雌雄産み分け技術の現状について』佐々木捷彦、家畜人工授精、P3、213号、(2002)

### 2) 講演

- 『牛 XY 選別精液の生産とその課題』木村博久、第 37 回家畜人工授精優良技術発表全国大会、ヤクルトホール、平成 21 年 2 月
- 『家畜改良事業団における牛精子選別技術の現状』木村博久、第 49 回日本哺乳動物卵子学会シンポジウム、名古屋国際会議場、平成 20 年 5 月
- 『雌雄産み分け：家畜改良事業団のとりくみ』正木淳二、ART Forum '02、長良川国際会議場、平成 14 年 10 月

### 3) 学会発表

- 『過去 5 年間のウシ選別精液の人工授精試験成績および産子の発育性と繁殖性の調査成績』湊 芳明・戸田昌平・壺岐直史・船内克俊・上田 大・坂本与志弥・内山京子・木村博久、第 109 回日本畜産学会大会、常盤大学、平成 20 年 3 月
- 『フローサイトメーターによる X、Y 選別精子の活力低下防止の検討』船内克俊・戸田昌平・壺岐直史・上田 大・内山京子・木村博久・湊 芳明、第 107 回日本畜産学会大会、麻布大学、平成 19 年 3 月
- 『フローサイトメーターによるウシ選別精液の人工授精成績に及ぼす選別時間および産歴の影響について』湊 芳明・壺岐直史・船内克俊・戸田昌平・上田 大・内山京子・木村博久、第 107 回日本畜産学会大会、麻布大学、平成 19 年 3 月

図1. 哺乳類の性の決定

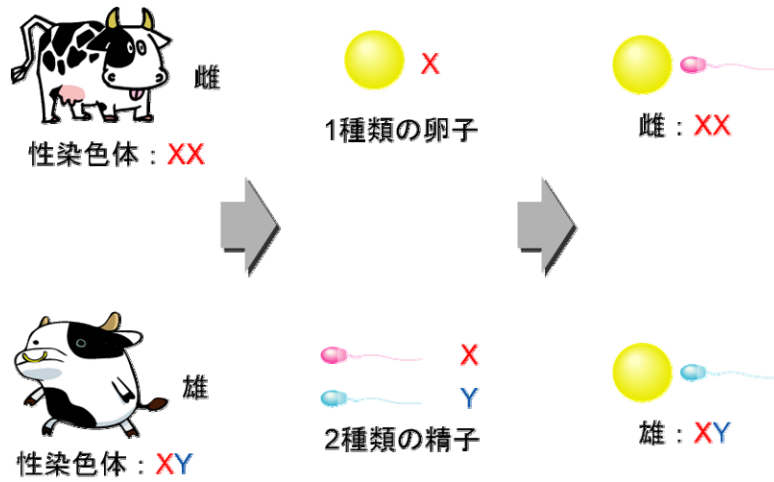


図2. フローサイトメーターによるX/Y精子の識別・分取

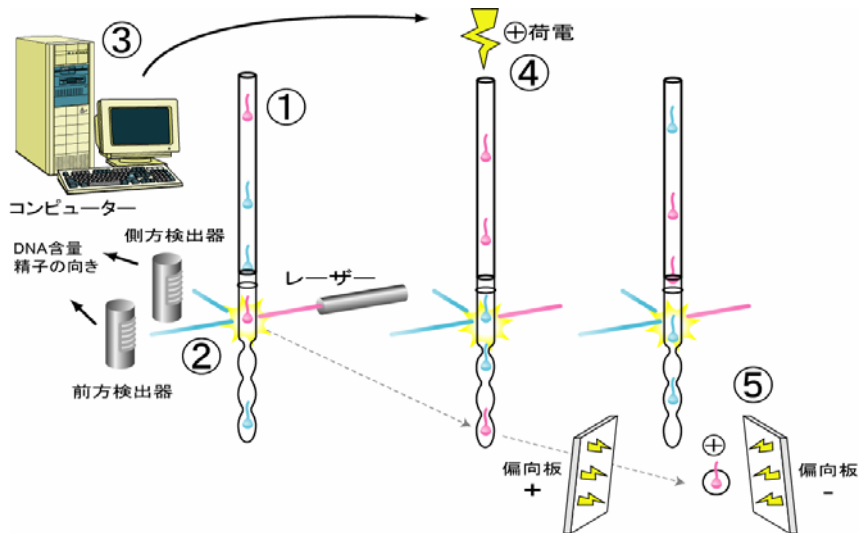


図3. 4世代のフローサイトメーター、1. EPICS-753、2. FACS Vantage、3. MoFlo-SX、4. MoFlo XDP-SX

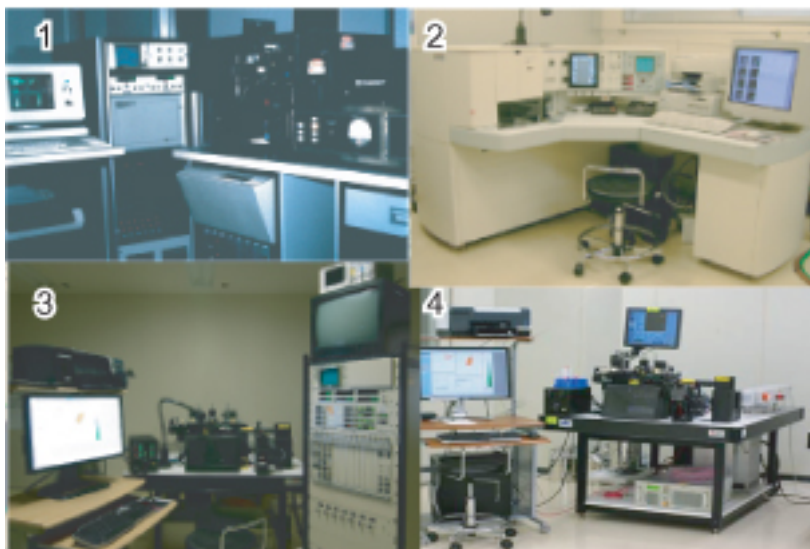


図4. X精子によるホルスタイン種雌牛の発育性（胸囲（cm））

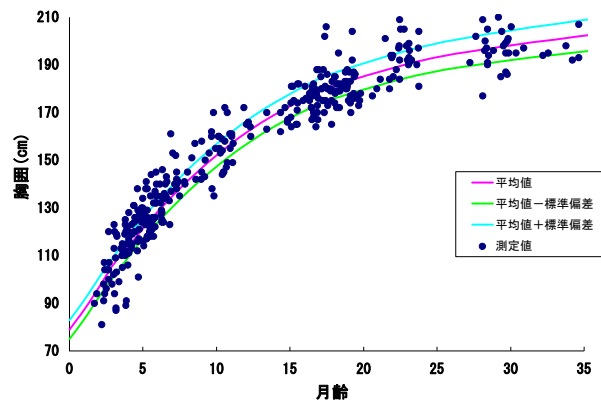


図5. Y精子による黒毛和種去勢牛の発育性（体重（kg））

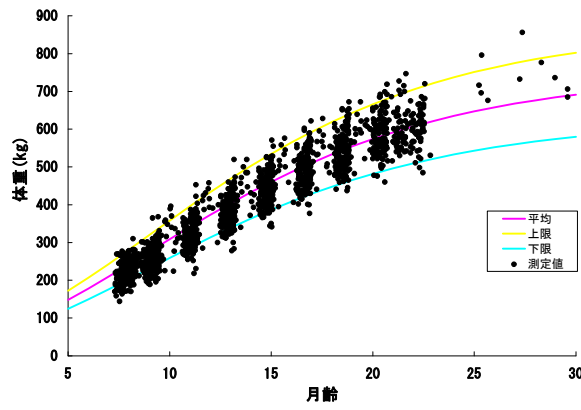


図6. X精子によるホルスタイン種雌牛への初回種付け時期

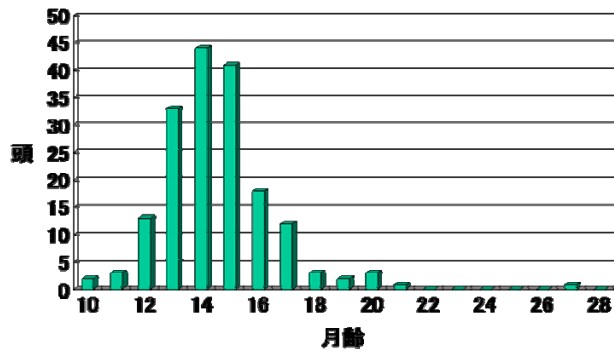


図7. 7台体制による研究及び生産体制の増強

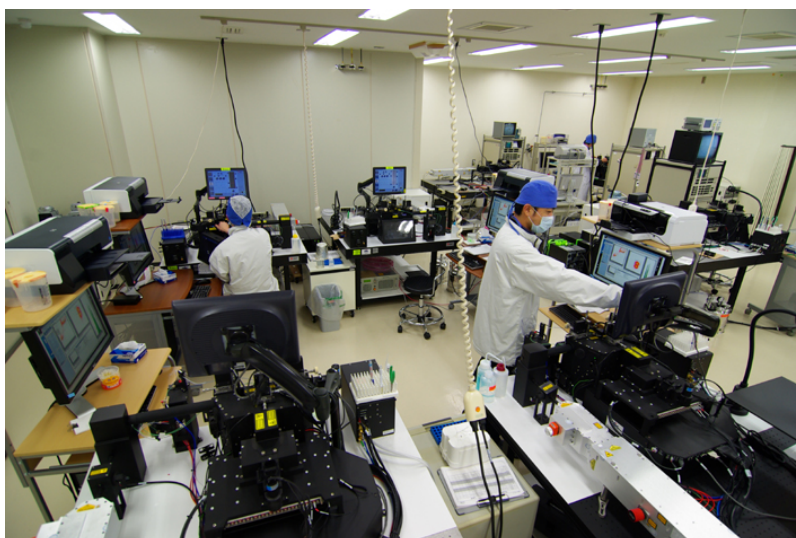


表1. 選別精子 300 万個による未経産牛受胎成績 (%)

区分	2001	2002	2003	2004	2005	計
選別区	53.3 (32/60)	51.7 (187/362)	53.5 (169/316)	43.6 (329/754)	47.6 (301/632)	47.9 (1,018/2,124)
対照区	60.0 (36/60)	54.3 (50/92)	59.1 (94/159)	56.5 (165/292)	62.2 (153/246)	58.7 (498/849)

表2. 選別精子 300 万個による乳用牛の受胎成績 (%)

区分	未経産牛	経産牛	計
選別区	46.2 (242/524)	33.6 (72/214)	42.5 (314/738)
対照区	58.4 (128/219)	40.0 (26/65)	54.2 (154/284)

表3. 選別精子 300 万個による肉用牛の受胎成績 (%)

区分	未経産牛	経産牛	計
選別区	53.1 (421/776)	29.8 (25/84)	51.2 (367/717)
対照区	58.6 (208/355)	48.1 (13/27)	57.3 (177/309)

表4. 人工授精受胎牛の生存子牛分娩率 (%)

区分	2001	2002	2003	2004	2005	計
選別区	83.6 (46/55)	92.4 (195/211)	91.1 (287/315)	86.4 (363/420)	86.9 (233/268)	88.6 (1,124/1,269)
対照区	91.7 (33/36)	91.9 (124/135)	89.8 (176/196)	87.8 (202/230)	87.8 (122/139)	89.3 (657/736)

表 5. 人工授精受胎牛の妊娠期間 (日)

区分	黒毛和種	ホルスタイン種	F 1	平均
選別区	286.9 ±5.5	277.9 ±5.8	284.0 ±5.6	281.1 ±6.6
対照区	286.3 ±4.9	278.9 ±5.4	283.4 ±5.0	281.3 ±5.8

表 6. 人工授精受胎牛の生時体重 (kg)

区分	黒毛和種	ホルスタイン種	F 1	平均
選別区	32.5 ±4.9	38.5 ±6.2	35.4 ±6.3	36.9 ±6.4
対照区	31.3 ±5.3	40.1 ±7.3	34.9 ±6.1	37.5 ±7.4

表 7. 生産子牛の性的中率 (%)

区分	2001	2002	2003	2004	2005	合計
X精子 (メス)	91.3 (21/23)	96.1 (98/102)	94.9 (93/98)	95.9 (211/220)	89.1 (147/165)	93.8 (570/608)
Y精子 (オス)	96.4 (27/28)	92.9 (92/99)	91.9 (182/198)	91.6 (163/178)	93.7 (77/82)	92.5 (541/585)
選別区での性的中率 (計)	94.1 (48/51)	94.5 (190/201)	92.9 (275/296)	94 (374/398)	90.7 (224/247)	93.1 (1,111/1,193)
対照区での性比 (メスの割合)	66.7 (22/23)	54.5 (72/132)	47.6 (88/185)	45.4 (99/218)	41.3 (26/63)	48.7 (307/631)

表 8. 体外受精卵の受胎成績

精液	移植胚	移植頭数	受胎頭数	受胎率 (%)
	新鮮	89	46	51.7
選別	凍結	67	33	49.3
	計	156	79	50.6
通常	計	549	279	50.3