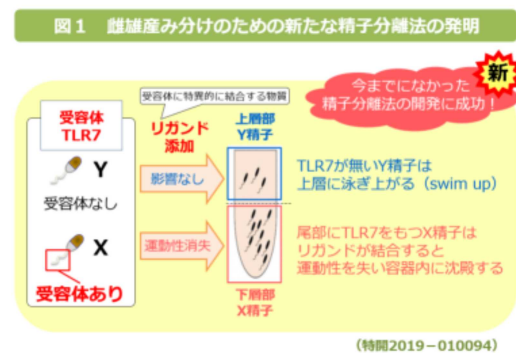


## 20. 生産者の所得向上を目指した雌雄産み分け技術の確立

農林水産研究指導センター畜産研究部  
○池堂萌果 (病鑑) 堀浩司

### 【背景および目的】

家畜の性差は経済性に大きく影響し、効率的な雌雄産み分け技術が求められている。雌雄産み分けについては、既存の技術としてXおよびY染色体のDNA含量の違いを利用したフローサイトメーター法が現在普及されているが、処理に時間を要し、一度に大量の精子の処理ができないこと、処理に用いる機械が非常に高額なため高コストであること、精子にレーザー光線を照射するため受胎率が低いことが課題としてある。広島大学の島田らは、X染色体保有精子（以下、X精子）のみに局在する受容体へ特異的に結合するリガンドを添加することで、短時間の培養で効率的にY染色体保有精子（以下、Y精子）を回収する簡易的な雌雄産み分け技術を開発し<sup>1)</sup>、現在、大分県と共同で特許を出願している（図1）。今回、牛の生産現場における新たな雌雄産み分け技術を確立する目的で、広島大学と共同し、リガンドの添加条件の検討や本技術を用いた牛の体外受精等を実施したのでその成績を報告する。



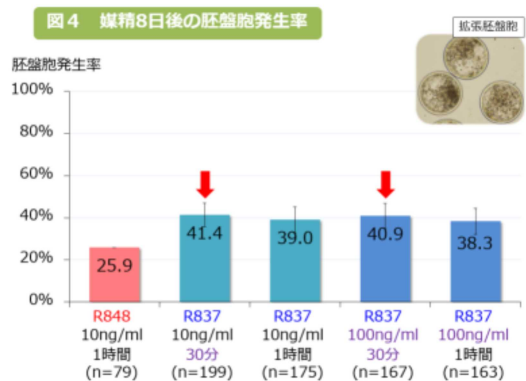
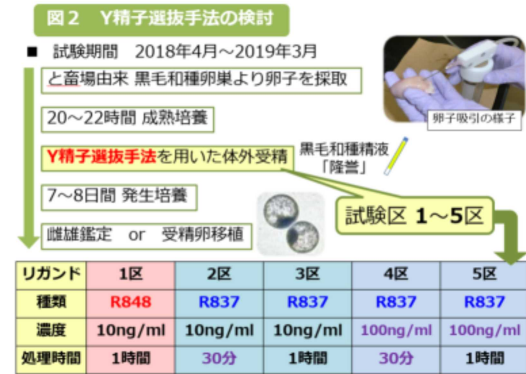
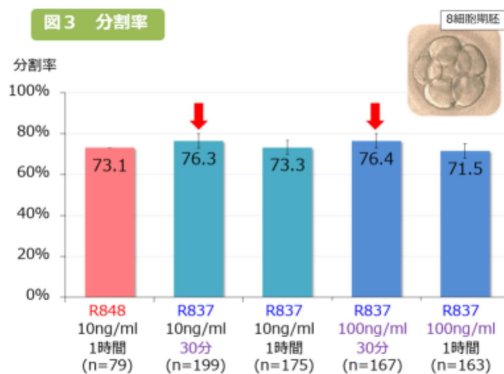
### 【材料および方法】

供試する卵子には、食肉処理場から採取した黒毛和種の卵巢 158 個より回収した卵丘細胞卵子複合体を用いた。成熟培養は、0.02 AU/ml FSH、1 μg/ml Estradiol-17β、0.2 mM ピルビン酸、100 U/ml ペニシリン G、100 μg/ml ストレプトマイシン、5%FCS 添加 TCM-199 を成熟培養液として 20～22 時間成熟培養し、精液は Y 精子選抜手法実施後に IVF100（機能性ペプチド研究所）を媒精液として 6 時間媒精した。成熟培養、媒精ともに 38.5 °C、5%CO<sub>2</sub> in air、湿潤の条件下で実施した。その後、卵丘細胞を除去して、38.5 °C、5%CO<sub>2</sub> 5%O<sub>2</sub> in air、湿潤の条件下で 2%BME、1%MEM、5%FCS 添加 mSOF を発生培養液として 7～8 日間発生培養を行い、生産された受精卵は PCR を用いて雌雄鑑定もしくは受精卵移植に用いた。Y 精子選抜手法について、利用する精液は全て黒毛和種「隆誉」の同一ロットのもののみとし、リガンドの種類、濃度、処理時間として「1 区：R848、10ng/ml、1 時間」、「2 区：R837、10ng/ml、30 分」、「3 区：R837、10ng/ml、1 時間」、「4 区：R837、100ng/ml、30 分」及び「5 区：R837、100ng/ml、1 時間」の 5 つの試験区を設定した（図 2）。また、受精卵移植については、媒精 7～8 日後に発生した拡張胚盤胞を緩慢凍結し、研究部内の乳

用牛延べ 15 頭へ新鮮卵または凍結卵の受精卵移植を行った。移植した 15 頭中 8 頭は、移植前に乳用牛の雌選別精液を人工授精した。そして、分割率、媒精 8 日後の胚盤胞発生率及び発生した受精卵の雄割合、受胎成績を調査した。

### 【結果】

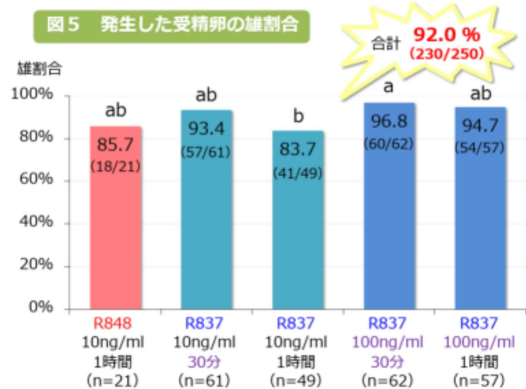
リガンドとして R837 を用いた 2 ～ 5 区での体外受精卵生産時の分割率（図 3）および胚盤胞発生率（図 4）については、各試験区間で有意



差は認められなかった。しかし、処理時間 1 時間の区と比較して処理時間 30 分の区でより高値となった。

1 ～ 5 区での受精卵の雄割合は、3 区と比較して 4 区で有意に高値となった。また、全ての試験区を合計すると雄割合は 92.0 %であった（図 5）。

精卵移植した 15 頭については、8 頭が受胎しており、その内 6 頭は移植前に人工授精を行ったものであった。2019 年 10 月末までに 2 頭が流産、3 頭が分娩しており、黒毛和種の雄・雌各 1 頭ずつが通常分娩、乳用牛の雌 1 頭が死産であった。2019 年 5 月に誕生した黒毛和種の雄子牛は、体型等にも異常は認められず、8 月の北部素牛市場で 90 日齢、110kg、55 万 5 千円で取引された（図 6）。



## 【考 察】

Y 精子選抜手法においてリガンドとして R837 を用いて検討を行ったところ、受精率及び胚盤胞発生率については、有意差は認められなかったが、処理時間 1 時間に比較して 30 分でより高値となった。これは、1 時間の方では、時間経過とともに嫌氣的解糖によって乳酸が蓄積し、精子の細胞内 pH が低下して運動性を消失してしまうため<sup>2)</sup>と考えられる。また、受精卵の雄割合について、1 時間 10ng/ml に比較して 30 分 100ng/ml の処理で有意に増加が認められた。これについては、広島大学の島田らにより時間経過に伴い TLR が分解され消失してしまうことが確認されていることから、1 時間の処理の方では X 精子が浮遊してしまったことが原因として考えられる。これらの結果より、リガンドとして R837 を用いる場合は、30 分 100ng/ml の処理が最適であると言える。

また、本調査において、新たな Y 精子選抜手法を用いた体外受精によって生産された受精卵は雄割合が 9 割を超え、既存の技術と比較しても同程度の雄割合であった。さらに、出生した受精卵産子は、発育良好で体型等にも異常が無く、新たな精子分離法で生産した体外受精卵産子に問題が無いことが確認された。専用機器が不要で、安価かつ簡易的に実施できるという点からも、新技術は既存技術に比べ非常に有用であると言える。今後はさらに例数を重ね、Y 精子選抜手法の精度を高めていくと共に、X 精子選抜手法についても検討し、新たな雌雄産み分け技術の確立を図りたい。

## 【参考文献】

- 1) Takashi, U., Natsumi, T., Masayuki, S. Activation of Toll-like receptor 7/8 encoded by the X chromosome alters sperm motility and provides a novel simple technology for sexing sperm. *Plos Biology*, 2019; 17(8): e3000398. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000398>
- 2) 池上順子, 加藤征史郎, 入谷明, 西川義正. 牛精子の運動性におよぼす無酸素条件の影響. *日畜会報*, 50(10): 716-720. 1979.