

家畜繁殖用精液の改良技術開発

永田 マリアポーシャ、山下 健一*

家畜の繁殖性改善は、畜産業の生産性向上による食糧供給の安定化とともに、地方の産業振興やバイオエコノミーとしての位置づけなど、幅広い意義を持つ。我々は、牛の繁殖性改善のため、手薄とされる精子側の研究に取り組んだ。研究開発の方向性は、ヒトの不妊治療にかかる報告を参考にして、健全性の高い精子は、運動性も高いという点に着目し、運動している精子を周囲の溶液に流れを生じさせて集合させるという技術を開発することで、初めて人工授精にそのまま使える数の精子の捕集を成功させ、実証試験で良好な受胎成績を得た。併せて、実証試験の中で、受胎に有利な精子の性質を、その泳ぎの形に関係があることを明らかにした。

キーワード：化学工学、流体、家畜、繁殖、精子

Development of a bovine sperm selection procedure for improvement of livestock fertility

MariaPortia B. NAGATA and Kenichi YAMASHITA*

Improving the reproductive performance of livestock has wide-ranging significance that includes promotion of local industry, bioeconomy, and stabilization of food supply. Our research focused on sperm manipulation to improve the reproductive performance of cattle. Our experiments were based on previous studies on infertility treatment for humans by relying on the advantages of motile spermatozoa, i.e. spermatozoa that are able to swim against the flow of solutions, which is regarded as an attribute of healthy and physiologically functional spermatozoa. For the first time, we succeeded in collecting a number of spermatozoa that can be used for artificial insemination and obtained good conception results in a field trial. In addition, the field trial clarifies the advantageous relationship between sperm trajectory and conception.

Keywords: Chemical engineering, fluidics, livestock, breeding, spermatozoa

1 はじめに

世界の人口は今後しばらく増え続けると考えられており、さらに経済成長に伴う食生活の変化も加わって、量的な食糧需要とともに動物性タンパクという質的な需要の変化も見込まれ、畜産業における生産性向上への技術的要請は高い。併せて、畜産を含む農業の持続的発展は食文化や地方における産業振興など、幅広い側面の意義も持つ。さらに近年は、バイオエコノミー、SDGs、動物福祉などの新しい概念からの社会要請も加わり、これまではそれぞれ別分野と考えられてきたような概念を両立する方向性で研究開発を企画する必要がある。特にバイオエコノミーは近い将来の技術革新の軸のひとつと考えられており、例えば経済産業省は「バイオ×デジタルによる新たな経済社会（バイオエコノミー）に向けて」という資料^[1]をまとめており、その市場規模は2030年にはおよそ1.6兆ドルとも言われて

いる。

日本では、畜産は農業の生産高のおよそ35%を占め、米・野菜・果実をしのぎ分類別で1位に位置する規模である^[2]。一方で、動物相手という特性から常時就労が常態化し「休めない」産業の最たる例となっており^[3]、人口減少や高齢化の影響を特に大きく受けている。畜産の中でも、市場規模や環境影響の面で特に大きな影響力を持つのが「牛」である。本研究では、大きく育てる「肥育」ではなく、「繁殖」の段階への対応に焦点を絞った。牛は理想的な繁殖でも1年に一度しか産まず、しかも豚などと違い一度に1頭しか産まない。1頭の価格が高く、大型の動物であるために飼育費用も高額であり、繁殖の成否が経営に与える影響が大きい。また、種雄牛と呼ばれる、経済形質に優れ繁殖能力が確認された雄牛から採取された精液が希釈され、0.5 mLずつ小分けされストロー状の容器に封入したものが凍

産業技術総合研究所 製造技術研究部門 〒841-0052 鳥栖市宿町 807-1
Advanced Manufacturing Research Institute, AIST 807-1 Shuku-machi, Tosu 841-0052, Japan * E-mail: yamashita-kenichi@aist.go.jp

Original manuscript received May 16, 2019, Revisions received June 14, 2019, Accepted June 17, 2019

結状態で流通しており、これを解凍して雌牛の繁殖器官に注入するという、「種付け」すなわち人工授精による繁殖が行われている。つまり、牛の繁殖において生体の雄牛は登場しない。現在の牛の繁殖のほとんど（90%以上）は人工授精によるものであり、次世代技術としての体外受精や受精卵移植も実用化されているものの、人工授精の簡便さ、蓄積された実務経験に勝ることができず普及しているとは言い難い^[4]。国内の人工授精による繁殖の成功率（受胎率）は、この30年ほどの間は長期下落傾向にあり、現在ではおよそ、肉用牛で50～60%、乳用牛で40～50%である^[5]。繁殖性の向上のために、雄側（精子・精液）と雌側（卵子や繁殖器官）の両方からの研究が行われているが、多くは選抜育種、雌側の獣医学臨床のもの、加えて最近ではICTを活用した発情監視などであり、例えば凍結精液の製造方法自体は1950年代から変わっていない^[6]など、雄側の研究は手薄である。

一方、近年、ヒトの不妊治療の分野では、分析機器や胚培養技術の進歩などを背景に、精子側の要因の大きさが明らかになってきている。例えば、健全性の高い精子は、有意に着床率・受胎率・流産率で有利であることが報告されている^[7]。ここでいう精子の「健全性」とは具体的に、「DNAの断片化が少ない」など生殖細胞として持つべき要素や機能の完全性のことである。さらに、高い運動性を持つ精子^[8]や形態のよい精子^[9]は高い健全性を有していること、その運動性の高さは雌性生殖器内での移動に有利で、受胎性を高めるために重要であること^[10]が報告されている。また、牛の不受胎のうち4分の1は、受胎に気付

かれることもないほど超早期の流産であることも報告されており^[11]、授精後に発生停止しないような胚の健全性確保の観点からも、精子の健全性の改善が重要であることが示唆される。すなわち、日本の畜産における牛の受胎率向上、それがもたらす生産性向上や労務負担の軽減を目指すあたり、精子・精液側による改善余地は大きいと見越し、ほぼ未開拓であった繁殖用精液の改良に関する研究開発を始めた。

受胎率の長期下落傾向の原因は複合的なものであり、経済形質を追求してきた育種改良の結果進んだ近交退化や、暗黙知依存の発情監視体制の担い手の高齢化などが絡み合っており、多様な研究が必要であることは明らかである。我々は、ヒトの不妊治療分野で近年、精子側の重要性が知られるようになったことを参考に、ほとんど手付かずの凍結精液の改良に取り組むこととした。

2 研究計画の設計

社会的要請の整理から具体的な研究内容を構築していくまでの検討過程を整理したものが図1である。

橋渡しという最終目標のためには、運動性の高い精子を得るだけではなく、農場での実証試験が必須であり、当然ながら産総研だけでは対応できない課題である。つまり、異分野融合の取り組みが必要であるとともに、畜産という特性から共同して研究を進める相手先が地方に分散しており、必然的に地域連携の取り組みとなった。

異分野融合における注意点としては一般的に、常識と考えている前提が異なっていたり、期待するアウトプットと

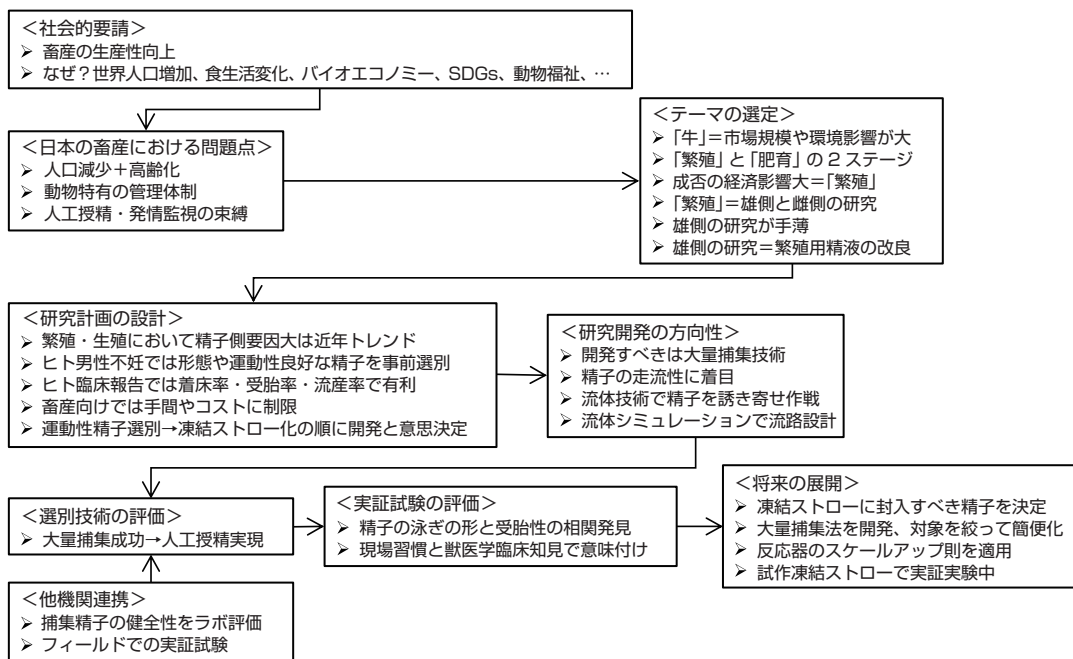


図1 社会的要請を踏まえた研究企画から具体的な取り組み内容へブレイクダウンしていく思考の流れの概略図

それを実現するハードルの高さについて共通認識を持ってないことなどがある。本研究でも同じであり、例えば、運動性の高い精子の選別によりフィールドで良好な成績が得られても、それを社会実装につなげるためには、精子選別のスケールアップという化学工学的なハードルが立ちほだかる。そのハードルを先に解決しなければ精子選別を研究する意味がないと考えるのか、それとも、精子選別の具体的な条件が決まらなければスケールアップを検討することができないと考えるか、事前には決着がつかなかった。また、産総研側からは、どのような作業内容がどの程度の作業負担になるのか想像がつかず、現実的に実施できない内容との指摘を他機関から受けることがあった。

そこで本研究を進めるにあたり、最初に研究方針の大枠と役割分担について決めるにとどめ、具体的な実験方法は各機関に一任した。その中で得られたデータを基に技術的優位性を評価することで、その精査を踏まえて次に取り組むべき内容を徐々に明確化した。つまり、工程表というような具体的な作業計画をはじめから準備していたものではない。また、このような進め方は、牛という大型動物を対象とした実験の場合、その実験機会は限られ、思い通りの実験計画を立てることはできないため、データの精査と次の実験計画の策定を都度繰り返す必要があったことも一因である。

家畜繁殖用精液の改良を行うにあたって、ヒトの男性不妊への対応とは違って、大型の設備や手間、金銭的成本をかけることができないという前提の下に研究開発を企画した。ヒトの不妊治療では、運動性の高い精子を選別することで健全性の高い精子を得るということは従来からなされてきたが、少数の精子しか集めることができないので、主に顕微授精に用いられてきた。一方、牛の繁殖のほとんどを占める人工授精に対応するためには、捕集する精子の数を従来技術の数十倍にまで高めなければならない。この点への対応は主に工学的な手法により取り組むべきであるので、産総研が担うこととした。農場にて、牛の様子を見ながら作業を行うという実証試験がいずれ必要になることから、煩雑な作業を求めないようなものとしなければならなかった。一方、実証試験を行う機関では、人工授精を行う前に精液の性状をその都度評価するとともに、雌牛の繁殖検診を行うことで、発情行動を発見した時刻、人工授精を行った時刻、卵胞の大きさや排卵の推定時刻などの記録を行った。大学は、主に精子の細胞生物学的な分析を行うことで、産総研による精子選別技術の妥当性、受胎性との因果関係の検討を行った。

加えて将来構想として整理したこととして、「最終成果物は凍結精液ストローである」とした。家畜繁殖用精液の規

格形態であるストロー型容器に封入され、この形態で成果物を提供するということは、農家にとっては、今までと何も変わらない日常作業であることを意味する。つまり、新たに技術を習得することも、設備を導入することも必要ない。どのような精子を封入すればよいかを明らかにし、そのような精子を大量捕集する方法を開発できた次の段階として、凍結ストロー化を進めるという手順について共通認識を整理した。このうち、産総研の主たる分担は、現行の精液ストローの製造工程と親和性の高い製造設備を、安価に簡便に開発するというプロセス技術である。しかしながら、異分野融合の体制では期待感が先行し、この各段階のハードルの高さについて何度も認識を整理することとなった。

3 参画機関の業務を踏まえた研究要素の選択

家畜の繁殖性の改善を、繁殖用精液の改良を通じて行うという大枠について、研究の流れとしては、運動性の高い精子を大量に捕集する技術の開発、捕集された精子が生殖細胞として高い健全性を有していることの確認、そして農場にて繁殖作業に用いて成績を実証する、という3つになる。産総研が主に分担したのは運動性が高い精子の捕集技術の開発の部分であり、捕集精子の分析は主に農業・食品産業技術総合研究機構、佐賀大学、富山大学、富山県農林水産総合センター、そして農場での実証は家畜改良センター、佐賀県畜産試験場、森永酪農販売株式会社が担った。これらの機関に産総研側から声をかけ、家畜の繁殖性改善に精子側の改良が重要であるとの認識を共有でき、その具体的方法として運動性が高い精子を選別することに同意した機関に、その機関での業務内容や設備を考慮して分担をお願いした。

産総研にて分担する運動性が高い精子の選別については、いくつかの従来技術や手法がある。もっとも単純なものとしては、運動性が高い精子が気液界面に集まることから、その部分からピペットなどで吸い取る作業が慣習的に行われている。遠心分離して沈降後に、運動性の高い精子が泳ぎ出てきたところで捕集すること（Swim-up法）もごく一般的になされており、加えてこの作業をより簡便かつ確実に行うための器具も使用されている。このほか、遠心分離の際に密度勾配を生じる溶液（パーコール）を用いる方法などが行われている^[12]。これら従来法は、運動性の高い精子を集めるというよりは、運動性を失ったり死んだりした精子を取り除くという観点で設計されたものと考え、我々の発想と区別しやすいと思われる。なお、このような前処理を行うことは、牛の体外受精やヒトの不妊治療では一般的である。

一方で、これら従来法によって集められる精子の数や質

は、両立できていなかった。健全性という点で質的均一性を確保しようとするれば精子の数は、例えば数百から千の単位である。一方、この数を大きく上回る数を集めようとするれば質を確保することが難しかった。牛の繁殖で主流の人工授精に適用するには、数百万から一千万を超える数の精子が必要と考えられていたため、数的にケタ違いに高いものが要求される。なお、従来法では質的健全性の高い精子だけを大量に集めることが難しかったため、このような精子だけで人工授精を行うために必要な精子数は不明であった点には注意されたい。

過去の文献の調査から、捕集する精子の質を確保するためには、マイクロ流体を選択するのが適していると考察した。精子の大きさ（数十マイクロメートル単位）と、マイクロ流路の大きさ（数百マイクロメートル単位）の関係が、ふるい以外の効果で精子を選び出すのにちょうどよく、そのためのツールも様々な形態が検討されており、さらに選別された精子の質的性質の検証の例も数多く報告されている^[13]。一方で、精子の大きさに対してマイクロ流路をあまり大きくできないため、一度に多くの精子を集めることに制限があり、数的なハードルをどのように超えるかに問題があった。

精子の運動にかかわる性質を整理すると「rheotaxis」という現象が知られている。一言で言えば「流れを遡る」性質である。現象自体は古くから知られるが、近年、その動きの詳細などの報告もなされている^[14]。この現象は、流れで精子を誘導できるという可能性を示すものと考え、「精子に自ら集まってもらう」という技術的構想に至った。ただし、これまで家畜繁殖分野の研究に携わってきた研究者には、当初は奇異な構想に思えたようであった。

一方、産総研以外の機関で行った実証試験では、ラボ内のように整理された条件の下に実験を計画することができないため、データの整理に機械学習などの技術を応用したが、詳細は後述する。人工授精は発情行動の発見に基づき行うものであるが、実際の現場では、牛の飼養規模や形態、人員体制により、当然見落としの可能性もある。今回の研究に携わった機関での牛の飼養形態は、牛舎内の個別区画につながれた状態のところと、放牧と牛舎を時間ごとに行き来するところの2つの形態があった。後者の場合、牛が放牧に出かけている間は、発情行動を発見することも人工授精を行うことも難しい。一方、牛舎飼いの場合は、牛の背中に発情行動を記録する簡易なステッカーを貼ったり、エコーによる卵胞の観察などを目安として頻繁な監視を行ったりすることで、ほぼ確実に発情行動を発見することができたとともに、人工授精後、エコーにより排卵を確認することも行った。

4 各要素の研究開発内容

運動性の高い精子を多数集めるために流れを用いること、そして流れによって精子を誘き寄せるといった研究の基本構成を実現するために、具体的に用いるべき手段を検討した^{[15][16]}。

「流れ」で「精子を誘導する」、すなわち流体操作技術と精子の運動という2つの要素の間をつなぐために、流体シミュレーション技術を用いて検証を行った。この時、設定したパラメータは、精子の運動の性質（速さが数十～百マイクロメートル毎秒であることなど）や、現実的に作製できるマイクロ流路の細さが100 μm程度であることなどを基とした。

また、マイクロ流路内での流れはゆっくりした流れの「層流」であり、流路の中心部は壁際より流速が速い。マイクロ流路1本だけでは、輸送できる精子の数はまだまだ足りないという計算になった。つまり、流速が速い部分と遅い部分の差ができるだけ小さくなるようにしなければ、精子の分離効率が上がらないという見積りである。この問題の解決の発想は単純なものであり、流路中に仕切り板を設ける構造とした。この時、精子の大きさや、現実的に作製できる壁の大きさを、シミュレーションの前提条件とした。例えば、数を増やすために壁を薄くしすぎると、仕切り壁は自立できなくなり、型から抜く時に壊れる、などの問題が起こる。しかし、捕集する精子の数は、まだこれでも足りない。

もっと積極的に精子を集める必要に迫られ、図2に示すような層状の三日月型流路を設けることにした。三日月型形の端部から運動性の有無にかかわらず精子を吸引捕集し、マイクロ流路の入口付近まで運ぶ。運ばれた精子のうち、運動性の高い精子はマイクロ流路の流れを感じて遡っていき、運動性のない精子は、流れに乗って押し戻される。このような分離が連続的に行われるような構造として三日月型形の流路を検討するという点に飛躍があると思われる

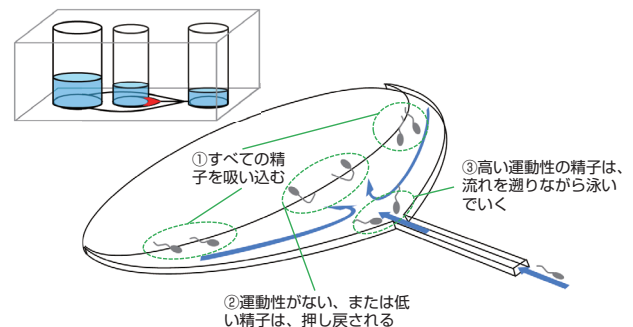


図2 運動性精子選別器具の全体概略図と三日月形層状流路（赤色部分）の位置関係、ならびに三日月層状流路内での溶液の流れと精子の動きの概略

かもしれないが、広い空間に流れが急に飛び出した時、周囲の液体を引き込むような流れが生じるということは、流体の粘性力に着目できる機械工学の知見がある者であれば思いつくことができるであろう。このような分離を繰り返すような流れとそれを実現する流路を流体シミュレーションで設計し、実際の精液処理量や農場での使いやすさも考慮の上、器具全体の設計を決定した。このような全体設計に続いて、切削加工による型起こしとシリコンゴムへの転写で器具を作製した。この技術で作製した運動性の高い精子選別器具は、図2の概略図、図3の写真のような見た目目はシンプルなものであり、この器具の3つの液溜めの穴の液面の高低差で送液するため、ポンプなどの外部機械仕掛けなどは必要ない。

この器具を用いて、実際の運動の高い精子選別を行うと、例えば、一般的な繁殖精液の凍結ストロー1本分（封入精子数3000万～6000万、液量0.5 mL）から、約30分間の選別操作により、100万から1000万程度の運動性の高い精子が得られることを確認した。実際に得られる精子数は、元の精液中の精子の濃度や質に依存する。この精子数は、牛の場合、そのまま人工授精に用いることができる数を達成していることを示す。

加えて、送液の速度などを調整することで、単に運動しているかどうかだけでなく、「まっすぐ泳ぎ」「蛇行した泳ぎ」（図4）など、精子の運動の形で選別することも可能である。精子は成熟した精子細胞となっても最初から受精能力を有しているのではなく、雌性生殖路内で様々な生化学的な反応や運動性の増進を経て、受精可能な状態へと変化していく（Capacitation = 受精能獲得）が、この過程で泳ぎの形も変化することが知られている。つまり、精子を運動の形で選別するという事は、言い換えれば精子の変化のステージごとに選別するという事であり、どのような性質の精子が人工授精に有利であるかを調べるための手段を初めて実現したということでもある。



図3 運動性精子選別器具の外観写真

5 結果の評価

運動性の高い精子は、質的健全性も高いという相関は知られているが、本開発技術で選別処理された精子についても評価を行った。捕集した運動精子のDNA断片化率を調べたところ、処理前がおおよそ7%であったのに対し、処理後はおおよそ0.4%と、大幅な改善が確認された。DNA断片化率が低いということは、言い換えれば、精子が運んでいるDNAの完全性が高いことを示している。市販されている繁殖用精液のDNA断片化率が5%前後であること^[17]を踏まえると、十分に良好な値と考えられる。また、処理後精液は、ミトコンドリア活性が高く、かつ、その活性の高さが長時間維持されることが分かった。例えば、処理後6時間において、未処理精液のミトコンドリア活性が約20%まで低下していたが、処理済み精液は約60%の活性が残っていた。

本技術開発は家畜の牛の繁殖を目的とするものであるから、実際に農場で人工授精を行い、その成績を検証しなければならない。複数の農場に、上記器具をあらかじめ置いておき、雌牛の発情行動が発見されたら、解凍した精液をこの器具を用いて処理し、人工授精を行った。受胎/不受胎の鑑定は40～50日後に行われるものであり、後日、人工授精に用いた処理後精液の運動性の検査結果とともに妊娠鑑定結果の提供を受けるという流れで試験を行った。通常の人工授精に用いられる家畜繁殖用精液の凍結ストロー1本には2000万から3000万の精子が封入されているが、本試験では捕集する運動性の高い精子をおおよそ100万に統一し人工授精を行った。この精子数で、通算の受胎率が対象区（試験実施農場）の過去数年間の受胎率と同等であった。なお、妊娠の経過や産まれた子牛はすべて正常であった。

複数の農場にて実証試験を行ったため、各農場の業務運営の違いがあり、完全に試験条件を揃えることができないというのがこの種のフィールド試験の実際である。

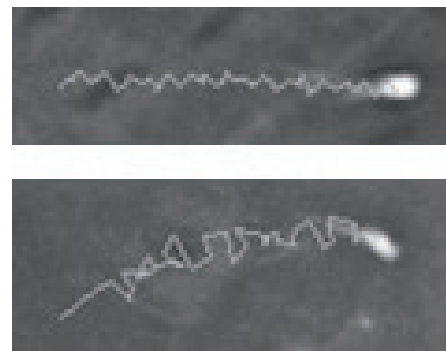


図4 精子の運動は均質ではなく、直線的な泳ぎや蛇行した泳ぎなどがある。泳ぎの形は、精子の状態を示す指標のひとつである。

表1 ヒトの不妊治療分野での報告と、牛の繁殖での運動性の高い精子の選別技術の効果

視点	ヒトの不妊治療分野で分かっていたこと	家畜繁殖で期待されること	本研究で明らかになったこと
(雌側ではなく) 精液側の改良を目指す理由	精子側要因の大きさが次々と明らかになっている	繁殖用精液の改良による効果が期待よりも大きいこと	運動性精子捕集を用い、約十分の一の精子数での人工授精で、従来とほぼ同じ受胎率を得た
精子の細胞としての質的健全性	形態や運動性が良好な精子は、質的健全性（DNA断片化が少ないなど）が良好	家畜の繁殖性改善のために、運動性の高い精子を捕集するという戦略は有効	独自の選別技術で集めた精子は、DNA断片化が大幅に少なかった（7%→0.4%）
臨床成績	高い着床率と受胎率、低い流産率	受胎率向上、胚死減（超早期の流産）の低減	少ない精子数でも受胎率維持
繁殖用精液としての改良の方向性	(該当なし)	家畜繁殖用精液の改良の方向性が明らかになること 受胎性向上が期待される精子を集めた凍結ストローの実現の可能性	人工授精での、精子の泳ぎの形と受胎性の関係
大量捕集の実現による波及効果	(該当なし)	体外受精・受精卵移植による繁殖の効率性を上げる	運動性精子選別で大量捕集技術を確立し、人工授精に成功

割合を高めておくことが有効であると推察される。すなわち、雌性生殖器内での卵子と精子の出会いのタイミングのチューニングを行うことで、受胎率向上が実現できるのではないかと、という発想である。

現在は、このような「人工授精に適した状態の精子」を凍結ストローとして製造し、農場での検証を続けている。凍結ストロー化するためには、大量生産に適した製造設備を念頭にしつつ運動性の高い精子の捕集をスケールアップする必要があるとともに、凍結保存の工程の見直しが必要である。

運動性の高い精子の捕集のスケールアップは、化学反応器のスケールアップの考え方を基に検討を行っている。蛇行した泳ぎの精子にターゲットを絞ることで、実際の捕集操作時の設定条件を単純化するなど、現場実装の際にわかりやすい運用ができるよう心掛けている。一方凍結保存工程に対しては、精子と同時に封入する抗凍結剤の添加方法や濃度の検討が必要となるが、この抗凍結剤には、卵黄やグリセロールが使用されている。運動性の高い精子選別する技術は、その名のとおりに、精子を運動させて捕集するものであるため、この工程に卵黄のような粒状の物体が、しかも精子の数よりはるかに多く共存することは、精子の運動進路を妨げるため、避けなければならない。一方で、凍結保存は、温度を4℃まで徐々に下げ、その後急速冷凍する段階を経るが、それぞれの段階で、精子を保護するために必要な凍結保存液の成分は決まっている。つまり凍結保存液を各成分にブレイクダウンして、どの段階でどの成分を入れておくべきであるのか、を検討しなければならない。

複数の条件の組み合わせで精液凍結ストローを試作

し、解凍後の精子の運動の状態を確認し、良好であれば農場での人工授精にて受胎率を確認するという実証の流れとなる。時間のかかる試験ではあるが、一般農家の協力なども得ながら進めており、近い将来、新しい家畜繁殖用精液を発表できるものと見込んでいる。

7 まとめ

本研究は家畜である牛の繁殖性改善を、精子・精液の側の改良により図ることを目指したものであったが、その具体的な進め方は、ヒトの不妊治療の分野での報告を参考とした部分が多かった。表1に、これまでヒトの不妊治療の分野で分かっていたこと、そこから類推して家畜繁殖で期待されること、そして本研究により実際に明らかになったことをまとめた。加えて本研究では、運動性の高い精子を数百万以上の数で捕集するための技術を開発し、この技術を用いた試験結果から、泳ぎ方と受胎性の関係を明らかにしたが、これらの成果は、ヒトの不妊治療へのフィードバックにつながるものと考えている。

この研究のオリジナリティは、下記の点にあると考えている。

- ・運動性の高い精子の誘導に流体技術を用いたこと、それによって大量処理を実現し、精液前処理による人工授精を世界で初めて成功させたこと。
- ・受胎に適した精子の性質を、泳ぎの形に「見える化」したこと、泳ぎの形ごとに均一な精子集団を単離する方法を実現したこと。

現状では、繁殖のほとんどを占める人工授精を対象として研究を進めているが、今後は得られた知見を活用して体外受精などへも展開したいと考えている。

謝辞

この研究は、国立研究開発法人 科学技術振興機構の研究成果展開事業「研究成果最適展開支援プログラム A-STEP フィージビリティスタディステージ 探索タイプの研究開発課題「解凍精液から元気な精子だけをオンサイトで簡便に得るための技術開発」、独立行政法人 日本学術振興会の科学研究費助成事業「基盤研究(B)の研究課題「流体操作技術による新たな精子選別技術の開発と実証試験」、農林水産省の委託事業「委託プロジェクト研究・繁殖性の改善による家畜の生涯生産性向上技術の開発」による支援を受けて行った。

参考文献

- [1] 経済産業省生物化学産業課「バイオ×デジタルによる新たな経済社会（バイオエコノミー）に向けて」<https://www.nedo.go.jp/content/100870410.pdf> 閲覧日2019-05-08
- [2] 生産農業所得統計<https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files/data?sinfid=000031813108&ext=pdf> 閲覧日2019-05-08
- [3] 一般社団法人ストレスオフ・アライアンス「ストレスオフ白書2018-2019」<https://prtimes.jp/main/html/rd/p/000000002.000038683.html> 閲覧日2019-05-08
- [4] 農林水産省生産局畜産部畜産振興課「牛受精卵移植実施状況」http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/1_katiku/attach/pdf/index-10.pdf 閲覧日2019-05-08
- [5] 一般社団法人家畜改良事業団家畜改良技術研究所「受精調査成績」<http://liaj.or.jp/giken/hanshoku/jyutai.html> 閲覧日2019-05-08
- [6] E. M. Walters, J. D. Benson, E. J. Woods and J. K. Critser: The history of sperm cryopreservation, *Sperm Banking: Theory and Practice* (A. A. Pacey and M. J. Tomlinson (eds.)), Cambridge University Press, 1–10 (2009).
- [7] A. Hazout, M. Dumont-Hassan, A. M. Junca, P. C. Bacrie and J. Tesarik: High-magnification ICSI overcomes paternal effect resistant to conventional ICSI, *Reproductive BioMedicine Online*, 12 (1), 19–25 (2006).
- [8] K. Shirota, F. Yotsumoto, H. Itoh, H. Obama, N. Hidaka, K. Nakajima and S. Miyamoto: Separation efficiency of a microfluidic sperm sorter to minimize sperm DNA damage, *Fertility and Sterility*, 105 (2), 315–321 (2016).
- [9] A. Berkovitz, F. Eltes, S. Yaari, N. Katz, I. Barr, A. Fishman and B. Bartoov: The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm, *Human Reproduction*, 20 (1), 185–190 (2005).
- [10] M. Zaferani, G. D. Palermo and A. Abbaspourrad: Strictures of a microchannel impose fierce competition to select for highly motile sperm, *Science Advances*, 5 (2), eaav2111 (2019).
- [11] P. Humblot: Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants, *Theriogenology*, 56 (9), 1417–1433 (2001).
- [12] 兼子智: 不妊治療における精子調製: 基礎と応用, *日本哺乳動物卵子学会誌*, 22 (1), 24–27 (2005).
- [13] S. M. Knowlton, M. Sadasivam and S. Tasoglu: Microfluidics for sperm research, *Trends in Biotechnology*, 33 (4), 221–229 (2015).
- [14] V. Kantsler, J. Dunkel, M. Blayney and R. E. Goldstein: Rheotaxis facilitates upstream navigation of mammalian sperm cells, *eLife*, 3, e02403 (2014).
- [15] M. P. B. Nagata, K. Endo, K. Ogata, K. Yamanaka, J. Egashira, N. Katafuchi, T. Yamanouchi, H. Matsuda, Y. Goto, M. Sakatani, T. Hojo, H. Nishizono, K. Yotsushima, N. Takenouchi, Y. Hashiyada and K. Yamashita: Live births from artificial insemination of microfluidic-sorted bovine spermatozoa characterized by trajectories correlated with fertility, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115 (14), E3087–E3096 (2018).
- [16] 産総研プレス発表「受精に有利な精子を泳ぎ方で選んで捕集する技術」, 2018年3月20日発表
- [17] K. Takeda, K. Uchiyama, M. Kinukawa, T. Tagami, M. Kaneda and S. Watanabe: Evaluation of sperm DNA damage in bulls by TUNEL assay as a parameter of semen quality, *Journal of Reproduction and Development*, 61 (3), 185–190 (2015).

執筆者略歴

永田 マリアポーシャ（ながた まりあぽーしゃ）

元産総研製造技術研究部門研究員。博士(情報学)。1997年フィリピン大学の微生物分野の修士課程を修了。同在学中に日本へ留学。その後、九州工業大学の博士後期課程を修了。2016年より産総研研究員、2018年退職。現在は製薬会社に勤務。この論文では、分子生物学や動物繁殖学にかかわる部分を担当した。



山下 健一（やました けんいち）

産総研製造技術研究部門研究グループ長。博士(工学)。2002年に九州大学大学院工学府化学システム工学専攻博士課程を修了し、産総研に研究職として採用。化学工学の専門性を活かして、この論文では、精子を誘導するための流体設計や、精子選別技術を現場で使用可能な具として提供するための設計などを担当した。



査読者との議論

議論1 全体について

コメント(湯元昇:国立循環器病研究センター)

流体操作技術で牛の凍結精液から運動性精子を選別し、人工授精にそのまま使える数の精子を捕集する技術を開発し、地域連携により、受精に有利であることを実際の牛の繁殖で証明した興味深い論文であり、シンセシオロジー誌の研究論文としてふさわしいものと判断します。

コメント(池上敬一:産業技術総合研究所)

著者らは、工学的手法を用いて、バイオ系の大学研究室や農場における実証を行う機関等と連携することにより、畜産の生産性向上に大きく寄与する可能性のある精子選別技術を開発しています。この開発研究においては、企画段階から個体や環境といった条件を制御しきれない畜産現場への適用を前提に、構成的な研究開発を実施しており、本誌の読者にとり示唆に富んだ事例となっています。

議論2 連携体制の構築について

コメント(池上敬一:産業技術総合研究所)

異分野連携という観点だけではなく、可能であれば、地域連携という観点からもご説明があるとありがたいです。

コメント（湯元昇：国立循環器病研究センター）

連携体制の構築には色々な苦勞があったと思いますが、どのように克服されたのでしょうか。連携体制の構築はシンセシオロジー誌に必要なシナリオとしては重要なポイントですので、可能な範囲で記述を追加して頂けないでしょうか。

回答（山下健一）

お尋ねの最重要ポイントは、「なぜこのメンバーなのか」ということかと思えます。詳しくは「3. 参画機関の業務を踏まえた…」の項目に追記しましたが、体制構築の流れとしては、産総研側から声をかけ、研究内容に同意していただき、かつ実際の実験に対応可能な設備等を有していたところをお願いしました。苦勞は、体制の構築の部分ではなく、各機関で統一できない試験条件や、各機関で得意なところの試験成績だけが部分的に積み上がっていく中で、どのように試験成績を読み取るか、というところでした。この解決方法は、この項目の最後の段落に書いております。

議論3 ヒトの不妊治療と牛の繁殖における研究の比較

コメント（湯元昇：国立循環器病研究センター）

ヒトの不妊治療における体外受精と牛の繁殖における人工授精で、分かっていること、分かっていたこと、著者らの研究で分かったことが分かりやすいように表を作成されては如何でしょうか。

回答（山下健一）

表1のようにまとめを追加するとともに、「7.まとめ」セクションに

説明を追記しております。また、もともとヒトの不妊治療で知られていなかったことと達成できていなかったことを、本研究では達成しておりますので、その点については本文中で「ヒトの不妊治療へのフィードバックの可能性」に言及しました。

議論4 精子の運動性と受胎率の関係について

コメント（池上敬一：産業技術総合研究所）

仮に運動性精子の数が100万であったとして、同一ストロー内に混入している非運動性精子の数が受胎率にどう影響するのか、非専門家に分かり易いように説明していただけないでしょうか？ DNAに損傷のある精子が悪影響をもたらすことは理解できますが、より明示的な説明があった方が良いと思います。例えば、非運動性精子は卵子に到達する確率が低いので少々の混入は問題にならないのでは？など、非専門家には良く分からない点があります。

回答（山下健一）

精子が雌性生殖器の中を移動し、卵子の近傍まで到達し、精子群として多数の精子が協調して卵子の中へ入るための道を作り、受精して卵割、発生までに至ることは、非常に多数の段階を経ております。以前より、死んだ精子が出す活性酸素が有害であることなどが多数報告されており、最近も同様の報告があります。死んだ精子（非運動性＝死んだ精子、とは限らない）は悪影響があり、損傷したDNAが運ばれることも悪影響であることは間違いないと考えられますが、その要因がどの段階にどれだけ影響したかを、定量的かつ明示的に述べることは難しいと考えております。