

## X, Y精子の分離によるウシの雌雄産み分け

浜野光市・李 喜和\*・銭 暁喬\*・上田 大\*・船内克俊\*・古舘 誠\*・湊 芳明\*

信州大学農学部附属農場

\*家畜改良事業団・家畜改良技術研究所 〒371-0121 群馬県前橋市

**要 約** ウシでの雌雄産み分け法としては、現在、Xあるいは、Y精子を分離、採取し、これらを受精することにより性予知産子を得るのが、最も効率的な方法である。フローサイトメーターを用いたX, Y精子の分離は、蛍光色素で染色したDNAの含量の違いを区別して精子を分離する方法であり、これにより分離したX, Y精子を利用して性予知胚を得る試みが最近増えつつある。一方、顕微授精による子ウシ作出が試みられているが、精子頭部を利用した子ウシ生産の報告はまだない。そのため、これらの技術を組み合わせ、フローサイトメーターで分取したウシ精子の頭部を利用して性予知子ウシを生産する可能性を探ろうと、分取精子頭部を顕微授精し、得られた受精卵の胚ならびに個体への発生能を調べた。Y精子として分取した画分中、FISHによりY精子と同定されたものの割合、すなわちフローサイトメーターによる精子頭部の分離精度は82%であった。これら精子頭部を注入した卵子のうち、6.9%が胚盤胞に発生した。さらに、これらの胚を48頭の受卵牛に移植したところ、10頭(20.8%)が分娩し、うち8頭が雄であった。これらの結果はフローサイトメーターで分取したウシ精子頭部の顕微授精により、80%の確率で雌雄産みわけが可能であることを示した。

**キーワード**：雌雄産み分け、精子頭部、ウシ、フローサイトメーター、顕微授精

### はじめに

近年、安定した食料の生産と供給が追求されているなか、畜産、とくにウシを中心とした家畜の生産をとりまく情勢はきわめてきびしい状況にある。すなわち、酪農は生乳の生産調整、乳価および子ウシの取引価格の変動、飼料の需給等きわめて多くの問題を抱えている。一方、輸入牛肉の自由化による価格競争の激化が進むなか、濃厚飼料の供給を国外に高度に依存している肉用牛生産においても的確な対応が迫られている。高い再現性でウシの雌雄産み分けができれば、酪農経営では能力の高い雌ウシから後継牛としてホルスタイン種雌ウシを確実に生産できるし、肉用牛経営では肥育効率の良好な黒毛和種雄ウシまたはF<sub>1</sub>雄ウシのいずれかを選択して生産できることになり、安定した酪農経営、肉用牛の肥育・繁殖経営あるいは乳肉複合経営が可能になると思われる。

### ウシの雌雄産み分け

雌雄産み分け技術は生まれてくる子ウシの性を自

受理日 9月30日

採択日 11月18日

由に支配できる方法として、その確立が期待されるものである。これまで、ウシを含む家畜の雌雄産み分けは胚と精子の両レベルから試みられてきた。現在、胚レベルでは、バイオプシーあるいは割卵等の操作により得た細胞のDNAを調べることで胚の性判別が可能になっており、検査時間が短く、精度も高いことから、これを利用し目的胚のみを残すことによる雌雄産み分けはほぼ実用化の域に達している。しかしながら、この方法では性の判別はできても、その結果望まない性の胚はそのまま無駄に棄てることになり、効率は悪い。

これに対し、精子レベルでの性のコントロールはX染色体あるいはY染色体のいずれかを持つ精子(以下、X精子、Y精子と略す)を分離・採取し、これを受精に用いて希望する性のみの産子を得ようとするものであり、実現できれば、無駄がなく効率的である。しかし、実際にはX, Y精子の分離は技術的に多くの困難を伴うことから、世界的にもまだ実用に供し得るような方法は得られていない。これまでにX, Y精子で大きさ、密度、荷電性、抗原性等に違いがあると想定し、これらの差に基づく精子の分離が種々検討されてきた<sup>1)</sup>。密度勾配遠心法<sup>2,3)</sup>、沈降法<sup>4)</sup>、電気泳動法<sup>5)</sup>がそれである。しかしながら、現在までのところ精子の相対的DNA含量の違いに基づく分離法<sup>6)</sup>以外、再現性のある有効

な方法は見いだされていない。

### フローサイトメーターによるX, Y精子の分離

ウシでは、X染色体がY染色体より大きく、X精子は相対的DNA含量がY精子よりも3~4%多いことが知られている<sup>7,8)</sup>。フローサイトメーターは、レーザー光線を試料に照射し、そこから発する蛍光や散乱光を分析して、大きさやDNA量の違いから細胞を選択、回収することができる装置である。フローサイトメーターを用いたX, Y精子の分離は、蛍光色素で染色した精子をそのDNA量に比例した蛍光量の違いに基づいて区別し、分離する方法である。しかしながら、現在の技術では通常の人工授精に直接利用できる運動性のある精子を大量に分離することは容易ではない。ただ、最近では、分離したX, Y精子を、体外受精あるいは顕微授精等の手法を利用することで性予知胚の生産に利用することは可能になってきた。Johnsonら<sup>9)</sup>はウサギにおいてフローサイトメーターで分離したX, Y精子を外科的に卵管内に注入(人工授精)して、8~9割の確率で産子の産み分けに成功した。その後、ウシ<sup>10)</sup>、ブタ<sup>11)</sup>において、分取したX, Y精子による体外受精を利用した産み分けが試みられ、例数はまだ少ないものの、ほぼ目的にかなう精度で雌雄それぞれの産子を作出するのに成功している。最近では、非外科的人工授精技術を利用した子宮深部への分離生存精子の注入により、狙った性の胚を作出、その受胎、分娩に至ったと言う報告もウシ<sup>12)</sup>、ヒツジ<sup>13)</sup>で見られる。さらに、顕微授精技術<sup>14,15)</sup>を利用した産子作製の試みも始められている。

一方、フローサイトメーターは、X, Y精子のいずれかに特異的なマーカーを見つけたことを目標に、分離したXあるいはY精子を生化学的あるいは分子生物学的手法によって分析するために(必ずしも運動性を必要とはしない)、精子、あるいは精巣内の生殖細胞を分取するのにも有効である。これまで、こうした目的から、分離した精子のタンパク質を生化学的に調べた報告もあるが、ウシ<sup>16,17)</sup>、ブタ<sup>18)</sup>のいずれにおいても有効な物質の同定までには至っていない。

フローサイトメーターを利用した、より高い精度でのX, Y精子の分離条件を検索するためには、分離精子のX, Yを効率良く判定する方法も必須となる。現在のところ、最も確実に応用範囲の広い方法は、PCR(polymerase chain reaction)法を利用

したY特異的なDNA塩基配列の検出による判別である。PCR法は、技術的に十分利用可能な方法であるが、プライマーとして使用するY特異的な塩基配列とPCR法自体に特許申請が行われており、また、精子1個1個を取り扱うため、あまり効率的とは言えない<sup>19)</sup>。一方、FISH(fluorescence in situ hybridization)法は、精子の固定法、脱凝縮法等に関していくつかの解決すべき問題点を残しているが、PCR法に比べ一度に多数の精子を検査できる方法であり、効率的なX, Y精子の判別が可能となる方法である<sup>20)</sup>。

既述のとおり、フローサイトメーターで分離したXあるいはY精子による人工授精、体外受精あるいは顕微授精が報告されはじめ、低率ではあるが、性予知胚の生産が可能になりつつある。しかしながら、この方法の場合、分取した精子が凍結・融解に耐えられる生存性、運動性を維持していないこと、単位時間当たりを得られる精子数が少ないこと等の問題があり、従って、精子の運動性に影響されず、かつ少ない精子による性予知胚の作出が可能ことから、人工授精、体外受精よりはむしろ、顕微授精技術との組み合わせの方が有効と思われる。

現在まで、精子の顕微授精による産子の作出が試みられ、ウサギ<sup>21)</sup>、ウシ<sup>22)</sup>、ヒト<sup>23)</sup>、マウス<sup>24)</sup>、ヒツジ<sup>14)</sup>において報告がある。しかしウシにおいては、顕微授精後の胚ならびに産子への発生率が低い<sup>22)</sup>ことも知られている。マウスでは、最近尾部を除去した精子頭部の顕微授精により産子が得られている<sup>25)</sup>。マウス<sup>26)</sup>、ヒト<sup>27)</sup>において、精巣内の精子形成過程の細胞の注入・授精により得られた胚から産子作出の報告もある。しかしながら、ウシでは、尾部を除去した精子頭部の顕微授精による産子の作出は報告されていない。

### 精子頭部の顕微授精による性予知ウシ生産

フローサイトメーターで分取したウシ精子あるいは精子頭部のX, Y判別の結果、尾部を除去した精子頭部において、より高い精度で分離できることが確認されている<sup>28)</sup>。このことから、精子レベルでの産み分けを高い精度で進めるためには、尾部のない精子頭部の利用が望ましいと言える。

前項に述べた背景に加え、こうしたことから、フローサイトメーターで分取したウシ精子頭部を利用した性予知ウシ生産の可能性を探るために、これら精子頭部を体外で成熟させたウシ卵子に顕微授精

し、胚ならびに個体への発生能を調べた<sup>29)</sup>。

フローサイトメーターを利用したウシ精子頭部の顕微授精による性予知子ウシの生産は、図1のようにして行った。

フローサイトメーターはCoulterのEPICS 753(図2)を用い、Johnsonらの報告<sup>6)</sup>に準じ、ウシ精子を分離できるように改良した。すなわち、前方の散乱光検出器を蛍光検出器に置き換え、さらに、先端を約20-30度の角度に研磨したインサージョンロッドを利用した。精子頭部は、黒毛和種の凍結精液を融解後、遠心分離により、精子を分離、洗浄し、 $5 \times 10^6/ml$ の濃度に調製のもの、超音波処理により尾部を切断して準備した。精子頭部のDNA染色はヘキスト33342を $10\mu g/ml$ の濃度となるように添加して37°Cで1時間インキュベーションして行った。X, Y精子頭部の分取は、精子頭部の扁平面の蛍光強度を測定してDNA含量の異なる2つの集団を区別して行った。

分離後、回収した蛍光強度の低い精子頭部は、凍結し冷凍庫(-30°C)で使用時まで保存した。その

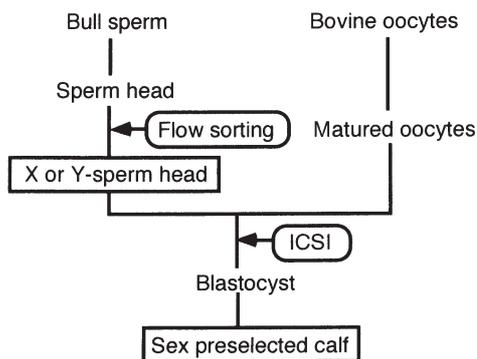


Figure 1. Production of sex preselected calf with intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using flow sorted sperm head

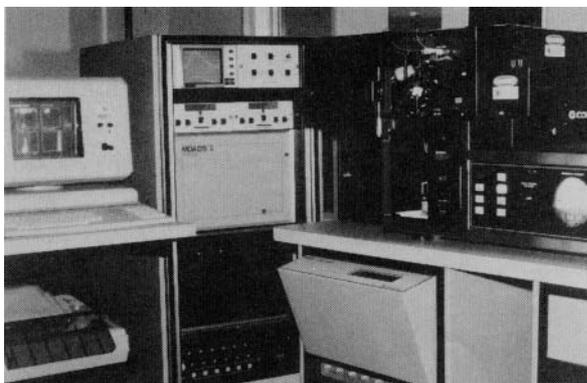


Figure 2. Modified flow cytometer used for sperm sorting

Table 1. X, Y confirmation of flow-sorted bull sperm heads with FISH

Sperm head sorted for:	No. of samples used for confirmation	Results of confirmation	
		X-sperm (%)	Y-sperm (%)
Y-sperm	28	1975 (18)	8998 (82)
X-sperm	28	10421 (94)	665 (6)

一部の精子頭部はB.C.1.2<sup>30)</sup>(ウシ雄特異的DNA)をプローブに利用したFISH法によりX, Yを判別した。

プローブDNAはB.C.1.2をプライマーにPCR法によりウシ雄DNAを増幅後、さらにデオキシゲニン標識し、エタノール沈澱ののち、保存・利用した。ホルムアミドを添加したプローブDNAは75~80°C, 10分間のインキュベーション後、氷水中で冷却し、ハイブリダイゼーションに使用した。

分離精子は遠心分離によりスライドグラスに付着させ、低張処理、メタノール酢酸による固定後、パパイン(37°C, 10分間)およびDTT(dithiothreitol)(室温, 10分間)による酵素処理を行い、洗浄・風乾した。精子標本は100%エタノールに5分間浸漬し、脱水した。ホルムアミドに溶解後、変性した標識DNAに等量のハイブリダイゼーション液を混合した液を、変性、脱水後の精子標本上に添加した。標本スライドグラスはパラフィルムで覆い、加湿容器内に静置して、37°C, 1~4時間インキュベーションした。ハイブリダイゼーション後の標本は洗浄し、染色した。プローブDNAの染色はFITC(fluorescein isothiocyanate)染色液を添加し、加湿容器内で行い、さらにPI(propidium iodide)による対比染色後、鏡検した。FISH法による精子頭部のX, Y判別の結果、顕微授精に供試した低蛍光強度分画中に占めるY精子頭部の割合は82%であった(表1)。

ウシ卵子は、黒毛和種雌ウシの屠場卵巢から吸引採取した直径2~5mmの卵胞から得て、5%ウシ血清(CS)および10mMハイポタウリン(hypotaurine)添加TCM199培地内で22~26時間成熟培養して用いた。精子頭部の注入は、顆粒膜細胞を除去し、第1極体の認められた卵子に行った(図3)。卵子の活性化処理(7%エタノール, 5分間浸漬)は精子頭部注入前に1回、さらに注入後30分と60分の2回行った。体外で24時間成熟培養した卵子に顕微授精した時、供試卵子の46.6%が卵割した(表2)。顕微授精後の卵割卵子は、5%CS添加

CR 1-aa 培地を用い、39.5°C、5% CO<sub>2</sub>、5% O<sub>2</sub>、90% N<sub>2</sub>の条件で培養した。その結果、体外で24時間成熟培養した卵子からの胚の6.9%が受精後7～8日目に胚盤胞期胚にまで発生した(表2)。これらの胚を一個ずつ、48頭のホルスタイン種受卵牛に移植した結果、10頭(20.8%)が受胎、分娩した。10頭の分娩牛の妊娠期間は、それぞれ286, 279, 279, 285, 288, 293, 300, 287, 278及び279日であり(平均値±標準偏差: 285.4±7.1)、それぞれの産子の体重は30, 35, 33, 35, 25, 45, 40, 30, 35および40kg (34.8±5.8)であった。10頭の産子の性は、雄8頭、雌2頭であり、産み分けの確率は80%であった。

以上のことから、フローサイトメーターで分離したウシ精子頭部の顕微授精と胚移植による性予知子ウシの生産は十分可能であり、雌雄産み分けの確率は80%程度であることが明らかとなった。

### これからのX、Y精子分離技術

上述の性予知子ウシ生産技術の組み立てはフロー

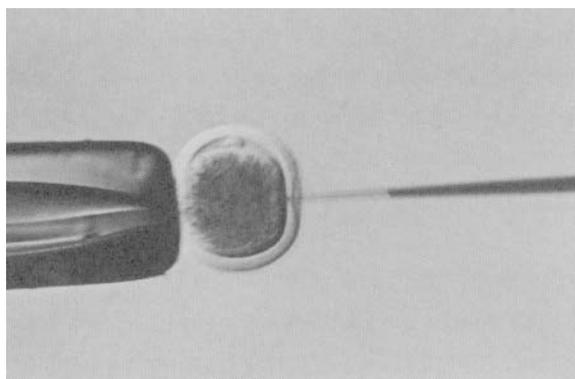


Figure 3. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) by in vitro matured bovine oocyte using flow sorted sperm head

Table 2. Effects of maturation time of oocyte on developmental ability of embryos produced by ICSI\* using flow-sorted sperm heads

Maturation time (h)	No. oocytes injected	No. (%) of embryos** developed to	
		2-cell embryos	Blastocyst embryos
22	21	3 (14.3)	1 (4.8)
24	909	424 (46.6)	63 (6.9)
26	1266	610 (48.2)	44 (3.5)

\*ICSI: intracytoplasmic sperm injection

\*\*Embryos were cultured in vitro after ICSI

サイトメーターによる精子頭部の分離技術と顕微授精技術から構成される。この技術から生産される子ウシの産み分けの確率は現段階では8～9割を越えることはできない。さらに、体外受精技術と比較して、顕微授精という高度技術の修得が必要であり、移植可能な胚への発生率が低い事実も考慮しなければならない。

現状の雌雄産み分け技術では、フローサイトメーターで分離した精子頭部を顕微授精に利用すれば、産子への発生は低率であるが、およそ80%の確率で希望する性の子ウシ生産が可能である。

今後、分離精子頭部を利用した顕微授精による性予知子ウシの生産において、精子および卵子、胚の処理条件等の改善により、胚盤胞・個体への発生率が向上すると思われる。また、精子の分離技術が進歩し、体外受精に供試可能なX、Y精子の分離も可能になると考えられる。

将来、人工授精レベルで雌雄の産み分けを可能にする精液を生産するためには、精子の生存性および運動性を損なわないような精子分離技術の確立が必要である。そのために、DNA量の違い以外にも、X、Y精子のどちらかに特異的なマーカーとなる物質を見出し、これに対する抗体などを作製することにより、X、Y精子のいずれをもそれぞれ認識できるようになることが望ましい。

### 引用文献

- 1) Amann, R.P.: Treatment of sperm to predetermine sex, *Theriogenology*, 31, 49-60, 1989.
- 2) 榎田博司・川倉一彦・高橋政義・関野美晴・岩崎説雄: パーコール密度勾配遠心法による牛精子の分離, 畜産試験場研究報告, 48, 29-34, 1988.
- 3) Kaneko, S., Yamaguchi, J., Kobayashi, T. and Iizuka, R.: Separation of human X- and Y-bearing sperm using Percoll density gradient centrifugation, *Fertility & Sterility*, 40, 661-665, 1983
- 4) Ueda, K. and Yanagimachi, R.: Sperm chromosome analysis as a new system to test human X- and Y-sperm separation, *Gamete Research* 17, 221-228, 1987.
- 5) 榎田博司・高橋政義・関野美晴・川倉一彦・福島達哉・西村実: 無担体電気泳動装置により分離した牛精子の受精による産子の性比, 日本畜産学会報, 60, 409-413, 1989.
- 6) Johnson, L.A. and Pinkel, D.: Modification of a laser-based flow cytometer for high resolution DNA analysis of mammalian spermatozoa. *Cytometry*, 7,

- 268-273, 1986.
- 7) Moruzzi, J.F.: Selecting a mammalian species for the separation of X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa, *J. Reproduction & Fertility*, 57, 319-323, 1979.
  - 8) Garner, D.L., Gledhill, B.L., Pinkel, D., Lake, S., Stephenson, D., Vandilla, M.A. and Johnson, L.A.: Quantification of the X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry, *Biology of Reproduction*, 28, 312-321, 1983.
  - 9) Johnson, L.A., Flook, J.P. and Hawk, H.W.: Sex selection in rabbits: Live birth from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting, *Biology of Reproduction*, 41, 199-203, 1989.
  - 10) Cran, D.G., Johnson, L.A., Miller, N.G.A., Cochran, D. and Polge, C.: Production of bovine calves following separation of X- and Y-chromosome bearing sperm and in vitro fertilization, *Veterinary Record*, 132, 40-41, 1993.
  - 11) Rath, D., Johnson, L.A., Dobrinsky, J.R., Welch, G.R. and Niemann, H.: Birth of piglets following in vitro fertilization using sperm flow cytometrically sorted for gender, *Theriogenology*, 47, 795-800, 1997.
  - 12) Seidel, G.E., Jr, Johnson, L.A., Allen, C.H., Welch, G.R., Holland, M.D., Brink, Z. and Cattell, M.B.: Uterine horn insemination of heifers with very low numbers of nonfrozen and sexed spermatozoa, *Theriogenology*, 48, 1255-1264, 1997.
  - 13) Cran, D.G., McKelvey, W.A.C., King, M.E., Dolman, D.F., McEvoy, T.G., Broadbent, P.J. and Robinson, J.J.: Production of lambs by low dose intrauterine insemination with flow cytometrically sorted and unsorted semen, *Theriogenology*, 47, 267, 1997.
  - 14) Catt, S.L., Catt, J.W., Gomez, M.C., Maxwell, W. M.C., and Evans, G.: The birth of a male lamb derived from an in vitro matured oocyte fertilized by intra-cytoplasmic injection of a single presumptive male sperm, *Veterinary Record*, 139, 494-495, 1996.
  - 15) Medvedev, S., Bossak, N., Eckert, J., Lucas-Hahn, A., Niemann, H. and Johnson, L. A.: Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with flow cytometrically sorted Y-chromosome bearing bovine sperm, *Theriogenology*, 47, 270, 1997.
  - 16) Miller, N.G.A., Jones, R., Dolby, C. and Howes, E.A.: A comparison of proteins extracted from population of X chromosome and Y chromosome-bearing bovine spermatozoa separated by FACS, *J. Reproduction & Fertility, Abstracts*, 17, 33, 1996.
  - 17) Howes, E.A., Miller, N.G.A., Dolby, C., Hutchings, A., Butcher, G. W. and Jones, R.: A search for sex-specific antigens on bovine spermatozoa using immunological and biochemical techniques to compare the protein profiles of X and Y chromosome-bearing sperm populations separated by fluorescence-activated cell sorting. *J. Reproduction & Fertility*, 110, 195-204, 1997.
  - 18) Hendriksen, P.J.M., Welch, G.R., Grootegoed, J. A., Lende van der T. and Johnson, L.A.: Comparison of detergent-solubilized membrane and soluble-proteins from flow cytometrically sorted X-chromosome bearing porcine spermatozoa by high resolution 2-D electrophoresis, *Molecular Reproduction & Development*, 45, 342-350, 1996.
  - 19) 戸田昌平・浜野光市・相澤明・中掘豊・中込弥男・佐々木捷彦: PCR法によるウシX,Y精子の判別, *J. Reproduction & Development*, 38, 5, a12, 1992.
  - 20) 戸田昌平・浜野光市・相澤明・堀雅明, 湊芳明: Fluorescence in situ Hybridization法によるウシ精子のX,Y判別, *J. Reproduction & Development*, 40, 5, a47 1994.
  - 21) Hosoi, Y., Miyake, M., Utsumi, K. and Iritani A.: Development of rabbit oocytes after microinjection of spermatozoa, *Proc. 11th Int. Cong. Anim. Reprod., Artifi. Insem.* p.331, 1988.
  - 22) Goto, K., Kinoshita, A., Takuma, Y., and Ogawa, K.: Fertilization of bovine oocytes by the injection of immobilised, killed spermatozoa, *Veterinary Record*, 127, 517-520, 1990.
  - 23) Palemo, G., Joris, H., Dovroey, P. and Van Steriteghem, A.C.: Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte, *Lancet*, 340, 17-18, 1992.
  - 24) Kimura, Y. and Yanagimachi, R.: Intracytoplasmic sperm injection in the mouse, *Biology of Reproduction*, 52, 709-720, 1995.
  - 25) Kuretake, S., Kimura, Y., Hoshi, K. and Yanagimachi, R.: Fertilization and development of mouse oocytes injected with isolated sperm heads, *Biology of Reproduction*, 55, 789-795, 1996.
  - 26) Kimura, Y. and Yanagimachi, R.: Mouse oocytes injected with testicular spermatozoa or round spermatids can develop into normal offspring, *Development*, 121, 2397-2405, 1995.
  - 27) Tesalik, J., Mendoza, C. and Testart, J.: Viable embryos from injection of round spermatids into oocytes. *New England J. Medicine* 333, 525, 1995.
  - 28) Johnson, L.A., Flook, J.P. and Look, M.V.: Flow cytometry of X and Y chromosome-bearing sperm

- for DNA using an improved preparation method and staining with Hoechst 33342, *Gamete Research*, 17, 203-212, 1987.
- 29) 浜野光市・李喜和・上田大・船内克俊・古舘誠・湊芳明・佐々木捷彦：フローサイトメーターで分取した精子核の顕微授精・胚移植による子ウシの生産，日本畜産学会第92回大会講演要旨，p.205，1997.
- 30) Bishop, C.E., Cotinot, C., Fellons, M. Kirszenbaum, M. and Vaiman, M.: Sondes dADN spécifique du genome male des ruminants, leur preparation et utilisation. European Patent Organization, 235046 A1, 1987.

## Sex Preselection by Flow Cytometric Sorting of X- and Y-chromosome bearing Sperm in Cattle

Koh-ichi HAMANO, Xihe LI\*, Xiao-qiao QIAN\*, Masaru UEDA\*,  
Katsutoshi FUNAUCHI\*, Makoto FURUDATE\* and Yoshiaki MINATO\*

Research Farm, Faculty of Agriculture, Shinshu University

\*Maebashi Institute of Animal Science, Livestock Improvement Association of  
Japan, Inc., Maebashi, Gunma, 371-0121,

### Summary

Sex preselection by the use of X- and Y- chromosome bearing sperm has been recognized to be more efficient than that by sex confirmation of embryos. Separation of sperm by flow cytometric technique on the basis of the difference in DNA content between X- and Y- sperm is considered to be the best method for this purpose at present. Although it is not possible to separate sperm by this technique so precisely yet, the same technique is already well applicable for the separation of sperm head with enough reliability. Intracytoplasmic injection of a single sperm head is undoubtedly more certain and then economical than the ordinary artificial insemination and *in vitro* fertilization for the production of calves of an expected sex, but, to date, there is no report of the calf production from blastocysts derived from oocytes fertilized by the injection of sorted sperm heads.

In this review, we also report the result of a trial to produce calves by the intracytoplasmic injection of heads of Y-sperm sorted from bull semen by flow cytometry. Bull sperm were removed their tails by ultrasound sonication and stained with fluorescent dye for DNA, and then sperm heads were sorted into 2 populations according to their DNA contents by the use of a flow cytometer which was modified specially for the sperm separation. In the population of sperm showing lesser fluorescence, 82 % of sperm were proved to be the Y-chromosome bearing by fluorescence *in situ* hybridization. Single sperm heads of Y-rich population were injected under microscope to oocytes prepared by *in vitro* maturation and 6.9% of fertilized ova thus made developed to blastocysts. Then, by the transfer of 48 expanded blastocysts to 48 recipient cows, ten (20.8%) normal live offsprings, eight males and two females, were obtained. The result indicates that sex preselection in cattle could be made with probability of 80 %.

**Key word** : sex preselection, sperm head, bovine, flow cytometer, ICSI