

1. 肉用牛の産肉性向上に関する研究

(1) 牛の生産率向上

7. テオフィリンとピルビン酸塩が牛の精子の凍結能に与える影響

Effect of theophylline and pyruvate on motility of frozen bovine spermatozoa

佐藤 亘・小田原 利美

要

旨

牛の人工授精において受胎率を決定する凍結精液の要因としては、注入される生存精子数と活力が最も重要であるが、雌畜の排卵は季節、個体差、栄養などの影響を受け、授精適期が常に一定ではないため、牛の人工授精における受胎率向上には、精子生存率、活力の向上とともに凍結融解後の生存時間の延長も重要な要因と考えられる。本試験では、凍結融解後の精子生存率および活力の低下防止と生存時間の延長を目的として、ホスホジエステラーゼ活性阻害剤であるテオフィリンおよびカフェインと、精子の中間代謝産物であるピルビン酸塩の精液希釈液への添加について検討を行った。

テオフィリン、カフェインを精液希釈液に添加したところ、両者とも精子の生存率、活力の向上に有効であったが、テオフィリンはカフェインと比較して凍結融解後の活力の維持に有効であり、精液希釈液の改良に活用できることが示唆された。また、精液希釈液に用いる際の有効添加濃度は、3~6mMが適当であり、高濃度の添加では生存率の低下、生存時間の短縮につながると考えられた。またテオフィリン、カフェインとも効果の程度には種雄牛毎に差が認められたが、両添加区ともに凍結融解後の精子生存率および活力向上効果が認められた。また全種雄牛において両添加物の添加により、生存率や活力が低下する個体は認められなかった。

ピルビン酸 Na を精液希釈液に添加した試験では、冷却保存約 20 時間後、凍結融解後ともに生存率および活力向上には効果は認められず、テオフィリンまたはカフェインと併用した凍結試験においては、併用区は対照区と比較すると、生存率と活力が向上する傾向にあったが、テオフィリンまたはカフェインのみを使用すると、より高い生存率と活力成績が得られた。

テオフィリン添加精液を用いた受胎試験では、試験区と対照区の間で受胎率に差は認められなかった。しかし、有効精子数を約 5.0×10^6 に希釈したものや、適期より早期と判定された時期に授精を行ったものについて比較すると、受胎率の向上効果が認められた。

以上の成績から、牛精液希釈液への添加はテオフィリン 3~6mM の低濃度添加が有効であるものと考えられ、また精子の受胎率向上に効果があるものと考えられた。

(キーワード : 凍結精液、ピルビン酸塩、テオフィリン)

背景・目的

牛の人工授精において受胎率に影響を与える凍結精液の要因としては、注入される生存精子数と活力が最も重要である。一方、雌畜の排卵は、季節、個体差、栄養などの影響を受け、発情の状態や授精適期が常に一定ではないため、凍結精液による受胎率の向上には、凍結融解後の精子生存率と活力の向上に加えて、生存時間の延長も不可欠であると考えられる。

本研究では、凍結融解後の精子生存率と活力向上、および生存時間の延長を目的として、ホスホジエステラーゼ活性阻害作用により精子の活性を向上すると報告のあるテオフィリンおよびカフェイン^{1),2),3),4)}と、精子の中間代謝産物であるピルビン酸の精液希釈液への添加が、牛精子の凍結融解後の生存率と活力、および受胎率に与える影響について検討を行った。

材料および方法

当場にて飼養中の黒毛和種種雄牛より擬牝台を用

いた人工膾法により採取し、スライド加温装置上で鏡検により生存率、活力検査を行い各試験に供試した。

各試験区における精液の処理方法は、32.5℃に加温した「新鮮卵黄 20%加 - トリスクエン酸糖液(A液)」を採取直後の精液に等倍量加え、約 2 時間かけて冷却した後に A 液を最終液量の 1/2 まで再添加(一次希釈)した。その後 16 時間 4℃で保存後に「Glycerol 14%加 - A 液(B液)」により点滴希釈(二次希釈)を行い、約 2 時間のグリセリン平衡の後に 0.5ml ストローに充填し、プログラムフリーザー(サイラボ社 Ice Cube 1810)により凍結を行った。

生存率と活力の判定は、スライド加温装置上で鏡検により判定し、生存率は活力+++を示す精子の割合で示し、活力は生存精子の前進運動のレベルを 5 段階評価して示した。(表 1)

表 1 精子の全身運動の評価基準

スコア	判定基準
1	振動するが、前進運動を殆ど示さない。
2	振動しながら、緩やかな前進運動を示す。
3	ほぼ正常である。
4	正常かつ活発な前進を示す。
5	通常以上の激的な運動を示す

試験 1 テオフィリン添加濃度の検討

テオフィリンを B 液へ 3、6、9、12、15mM 添加したものをを用いて二次希釈を行い、4 または 38 にて保存した。4 下で培養したものは 24 時間後に、38 で培養したものは二次希釈直後、3、6、12 時間後に判定を行った。

試験 2 テオフィリン、カフェインの比較試験

2 - 1 添加濃度および生存時間の比較

テオフィリンまたはカフェインを B 液へ各々 3、6、9、12、15mM 添加したものをを用いて凍結融解後に 38 下にて培養し、融解直後、1、3、6、時間後に判定を行った。

2 - 2 両剤に対する感受性の比較

テオフィリンまたはカフェインを B 液へ 5mM 添加し、凍結融解後の生存率と活力について判定し、テオフィリン、カフェインに対する感受性の程度について、さらに比較検討した。生存率については、採取直後の生存率に対する凍結融解後の比で表し、平成 13 年 5 月～平成 14 年 2 月の間に製造した際の検査成績 (約 58,000 本) の総平均、および供試種雄牛の製造時検査成績の個体平均を用いて環境要因を差し引くことにより、試験年月日 (季節) 牛個体毎の耐凍性や、体調などによる影響を補正して比較した。

試験 3 ピルビン酸塩添加についての検討

3 - 1 添加濃度の検討

B 液にピルビン酸 Na を 1、5、10mM 添加した希釈液を用いて凍結融解後に判定を行い、ピルビン酸塩添加濃度について検討した。

3 - 2 ピルビン酸塩とテオフィリン、カフェイン併用についての検討

ピルビン酸 Na 1mM テオフィリン 5mM カフェイン

表 3 テオフィリン添加、未凍結、4 24時間培養後の精子生存率、活力 (n=4)

採取直後	73.8 ± 4.1					
試験区	対照区	3mM	6mM	9mM	12mM	15mM
生存率	46.9% ± 8.9% ^a	62.5% ± 5.4% ^b	54.4% ± 10.1%	53.3% ± 10.3%	45.0% ± 9.6%	46.3% ± 1.3%
活力	4.0 ± 0.4	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.2	4.3 ± 0.5	4.8 ± 0.5	4.5 ± 0.5

a, b : 異符号間で有意差あり (p<0.05)、平均 ± SD

5mMを各々B液へ添加した場合と、ピルビン酸 Na とテオフィリンまたはカフェインを併用した場合の凍結融解後の生存率、活力について判定した。(表 2) また生存率は試験 2 と同様に、採取直後の生存率に対する凍結融解後の比で表し、環境要因を差し引くことによって、試験年月日 (季節) 牛個体毎の耐凍性や、体調などによる影響を補正して比較した。

表 2 試験区と添加物

試験区	添加物
対照区	無添加
teo	テオフィリン 5mM
caf	カフェイン 5mM
p	ピルビン酸Na 1mM
pteo	テオフィリン 5mM + ピルビン酸Na 1mM
pcaf	カフェイン 5mM + ピルビン酸Na 1mM

試験 4 テオフィリン添加精液を用いた受胎試験

受胎試験には種雄牛 3 頭の凍結精液を供試し、受胎率の低下する夏期に繁殖雌牛 747 頭に対して人工授精を実施し、繁殖障害罹患牛、ホルモン剤投与による発情誘起牛などを除く 684 頭について受胎率を比較した。

凍結精液に添加するテオフィリンは、B 液へ 5mM 添加するものとし、有効精子数が約 $5.0 \sim 6.0 \times 10^6$ および $8.0 \sim 10.0 \times 10^6$ となるように希釈して人工授精を行った。また授精の際、授精時期を雌畜の状態や直腸検査などにより判定し、「早め」「適期」「遅め」の 3 区に区別して受胎率を比較した。

結 果

試験 1 テオフィリン添加濃度の検討

テオフィリンを添加して 4 で培養したところ、24 時間後の生存率は、3mM 添加区で $62.5 \pm 5.0\%$ と対照区と比較して有意に高かった。(表 3)

また 38 で培養した場合にも同様に生存率、活力の向上と生存時間の延長が認められ、3mM および 6mM 添加区では生存率、活力とも優れていた。(表 4)

表4 テオフィリン添加、未凍結、38 培養時の精子生存率、活力 (n=2)

採取直後	70.0 ± 0.0					
試験区	対照区	3mM	6mM	9mM	12mM	15mM
38 直後	57.5% ± 2.5% 4.5 ± 0.5	65.0% ± 5.0% 5.0 ± 0.0	62.5% ± 7.5% 5.0 ± 0.0	57.5% ± 2.5% 5.0 ± 0.0	56.5% ± 8.5% 4.5 ± 0.5	55.0% ± 5.0% 5.0 ± 0.0
3時間後	47.5% ± 7.5% 3.5 ± 0.5	52.5% ± 7.5% 4.5 ± 0.5	51.3% ± 3.8% 5.0 ± 0.0	45.0% ± 10.0% 4.5 ± 0.5	43.8% ± 3.8% 4.5 ± 0.5	47.5% ± 2.5% 5.0 ± 0.0
6時間後	27.5% ± 12.5% 2.5 ± 0.5	36.3% ± 8.8% 3.8 ± 0.3	37.5% ± 10.0% 4.0 ± 0.0	28.8% ± 8.8% 3.5 ± 0.5	30.0% ± 10.0% 3.5 ± 0.5	32.5% ± 12.5% 4.0 ± 1.0
12時間後	15.0% ± 0.0% 2.0 ± 0.0	20.0% ± 0.0% 3.0 ± 0.0	35.0% ± 0.0% 4.0 ± 0.0	30.0% ± 0.0% 4.0 ± 0.0	30.0% ± 0.0% 3.0 ± 0.0	30.0% ± 0.0% 3.0 ± 0.0

上段：生存率、下段：活力、平均±SD

試験2 テオフィリン、カフェインの比較試験

2 - 1 添加濃度の比較

テオフィリン添加区では3~12mM カフェイン添加区では3~15mMの添加で生存率が向上する傾向にあった。しかしテオフィリン15mM添加区では、生存率は低下する傾向にあった。(図1)

活力については両添加区ともに全ての濃度域で向

上していたが、保存6時間後では、カフェイン添加区は6mM添加時のみが平均値3.0以上を示したのに対し、テオフィリン添加区は3、6、9mM添加区で平均値3.0以上を示し、特に3mM添加区では3.7±1.2、6mM添加区では3.8±1.0と優れており、活力の向上および維持に対する効果が認められた。(図2)

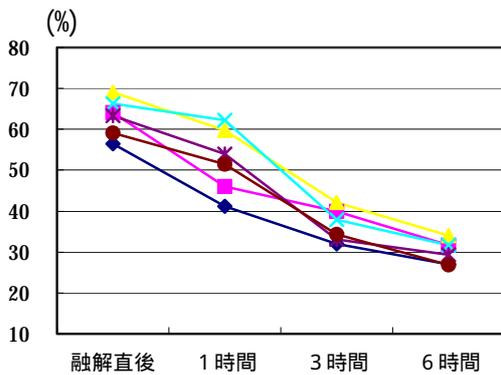


図1 - 1 凍結融解後生存率の経時的变化
カフェイン添加区

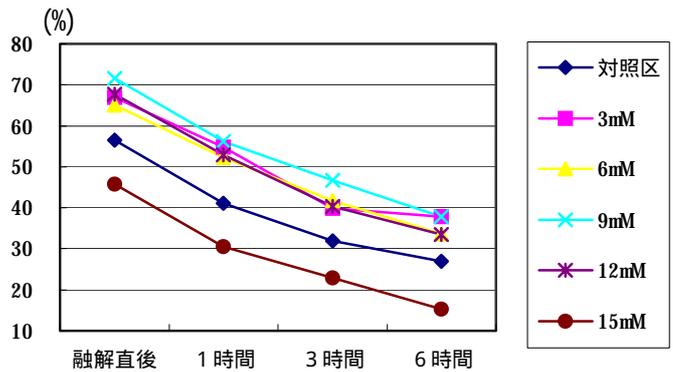


図1 - 2 凍結融解後生存率の経時的变化
テオフィリン添加区

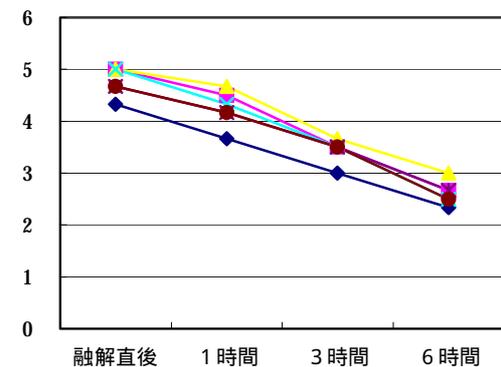


図2 - 1 凍結融解後活力の経時的变化
カフェイン添加区

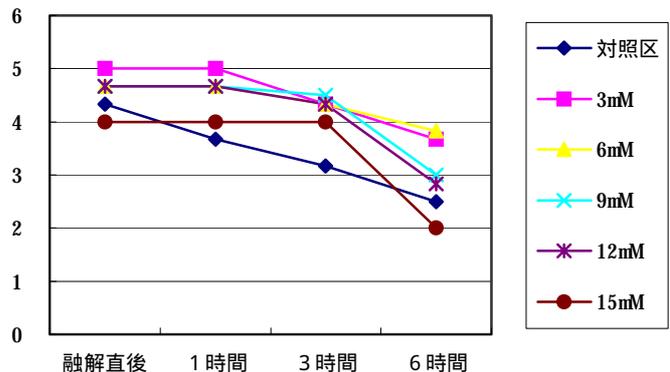


図2 - 2 凍結融解後活力の経時的变化
テオフィリン添加区

2 - 2 両剤に対する感受性の比較

テオフィリン、カフェイン添加区とも対照区と比

較して凍結融解後の生存率、活力の有意な向上が見られたが、両添加区間では有意な差は認められなかった。また同一種雄牛内での運動性向上の程

度には両添加区間で差違が認められたが、生存率および活力が対照区に比較して低下するものは全種雄牛について認められなかった。(表5)

表5 テオフィリン、カフェイン添加精液の凍結融解後の活力比較

n= 対照区：49, teo：39, caf：25

	対照区	teo	caf
生存率	48.5% ± 7.0%a	53.5% ± 10.92%b	55.2% ± 11.51%b
活力	4.1 ± 0.3a	4.8 ± 0.4b	4.7 ± 0.5b

生存率は採取直後の生存率に対する比を、採取日、個体による差を補正し、平均±SDで示す。
a, b：異符号間で有意差あり(p<0.05)

試験3 ピルビン酸塩添加についての検討

3-1 添加濃度の検討

凍結融解後の検査では、ピルビン酸 Na1mM添加区で生存率が高い傾向にあったが、その差は有意ではなかった。また、10mM添加区では、対照区に比較して生存率が有意に低かった。(表7)

3-2 ピルビン酸塩とテオフィリン、カフェイン併用についての検討

各試験区間で有意な差は認めなかったが、teo、caf区はそれぞれ、pteo、pcaf区と比較して、生存率、活力とも高い傾向にあった。(表8)

表6 ピルビン酸Na濃度と凍結融解後の精子生存率、活力

試験区	対照区	1mM	5mM	20mM
平均±SD	48.0% ± 8.4%a	51.7% ± 7.2%a	47.8% ± 14.0%	31.8% ± 10.4%b

平均±SD

a, b：異符号間で有意差あり(p<0.05)

表7 テオフィリン、カフェインとピルビン酸Naを併用した際の凍結融解後の活力比較

n = 8

試験区	対照区	teo	caf	p	pteo	pcaf
生存率	50.3% ± 6.7%	55.8% ± 7.1%	55.3% ± 9.4%	51.7% ± 7.2%	53.9% ± 7.4%	53.6% ± 7.1%
活力	3.9 ± 0.4	4.6 ± 0.5	4.6 ± 0.5	3.9 ± 0.4	4.4 ± 0.7	4.5 ± 0.5

生存率は採取直後の性生存率に対する比を、採取日、個体による差を補正し、平均±SDで示す。

試験4 テオフィリン添加精液を用いた受胎試験

受胎率は、対照区 63.45%、添加区 64.04%であり、両区間の受胎率に有意な差は認められなかったが、有効精子数が約 5.0 × 10⁶ の凍結精液を用いた授精や、

授精適期より早めと判定された授精において、添加区の受胎率が高い傾向にあった。

(図3, 4)

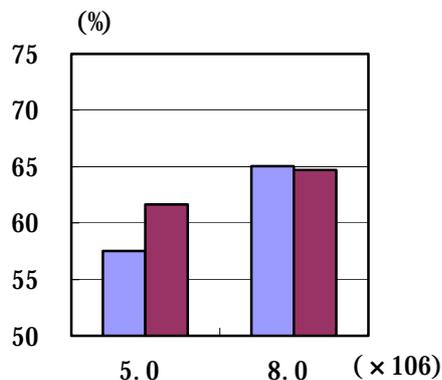


図3 有効精子数と受胎率

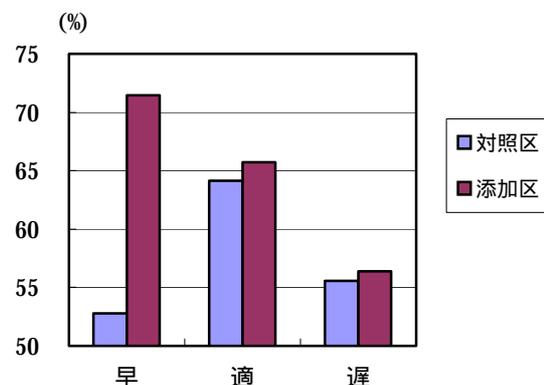


図4 授精時期と受胎率

考 察

雌畜の排卵は季節、個体差、栄養などの影響を受け、授精適期が常に一定ではないため、牛の人工授精における受胎率向上には、精子の生存率および活力の向上とともに、凍結融解後の精子生存時間の延長も重要な要因と考えられる。

テオフィリンとカフェインはキサンチン誘導体に属する薬剤であり、細胞内カルシウムの転位作用、アデノシン受容体遮断作用、cAMP 蓄積作用を持つことが知られている。宮本ら¹⁾、佐々木ら²⁾は、ホスホジエステラーゼ活性阻害作用を持つこれらの薬剤を牛精子に添加することにより、精子内の cAMP レベルが高まり、それによって精子の運動性が向上されると報告している。

試験 1 において、テオフィリンを添加し、4、38 で培養したものについて生存率、活力を経時的に検査したところ、生存率と活力に対する効果が認められ、有効添加濃度は 3~6mM であった。

また試験 2 において、テオフィリンとカフェインを B 液に添加して凍結後の生存率および活力について検討したところ、両者ともに凍結融解後の精子生存率の向上が認められたが、テオフィリン 15mM 添加区では生存率の低下が認められ、テオフィリンの高濃度添加は生存率向上には不利であると考えられた。また活力については、培養 6 時間後にカフェイン添加区が 6mM 添加区のみ平均 3.0 を示したのに対し、テオフィリン添加区は 3mM、6mM、9mM 添加区で平均 3.0 以上を示し、特に 3mM、6mM 添加で高い傾向にあった。

以上の成績から、テオフィリンとカフェインは両者とも精子の生存率、活力の向上に有効であると考えられたが、テオフィリンはカフェインと比較して凍結融解後の活力の維持に有効であり、精液希釈液の改良に活用可能であることが示唆された。また、精液希釈液に用いる際の有効添加濃度は、B 液への 3~6mM 添加が適当であり、高濃度の添加では生存率の低下や生存時間の短縮に繋がると考えられた。

沢井ら³⁾はテオフィリンの添加により、精子の運動促進と生存時間の延長が認められ、カフェインと比較してより広い濃度域で精子に対する運動促進効果を示したと報告している。一方、坂井ら⁴⁾はテオフィリン 5mM 添加により凍結融解後の精子生存率が低下したと報告しており、ホスホジエステラーゼ活性阻害剤が精子に与える影響に関する報告は一様ではない。本試験の検査成績についても個体差が大きい傾向にあり、ホスホジエステラーゼ活性阻害剤に対する精子の感受性には種雄牛毎に個体差が存在すると考えられたため、当场にて飼養する全ての種雄牛を対象にテオフィリンとカフェインの比較試験を行ったが、テオフィリン、カフェインとも凍結融解後の精子生存率および活力向上効果が認められ、また全種雄牛において両添加物の添加により生存率または活力が低下する個体

は認められなかった。

精子の運動エネルギーは、精子内で呼吸系と解糖系において産生されるアデノシン三リン酸(ATP)によって得られると考えられており、ピルビン酸はこれら代謝系の中間代謝産物であり、精液希釈液に添加した場合新鮮および凍結融解後の精子活力の維持に有効とされている^{5),6)}。しかし試験 3 においては、凍結を行う時間と同程度の冷却保存時および凍結融解後ともピルビン酸 Na 添加による生存率および活力の向上は認められなかった。テオフィリンまたはカフェインと併用した場合についても、併用区は対照区と比較すると生存率、活力が向上する傾向にあったが、テオフィリンまたはカフェインを単独で使用した方がより高い生存率と活力の成績が得られ、これらの効果はテオフィリンおよびカフェインによる効果であると考えられた。

これらの成績から、テオフィリンのみを添加した凍結精液を用いて受胎試験を行ったところ、全体における受胎率には差は認められなかったが、有効精子数が少ないもの、適期から若干早期に授精を行ったものについては、受胎率の低下を防ぐ傾向が認められた。これはテオフィリンを添加した凍結精液は、融解後の活力が長時間維持されていることに起因するものであると考えられた。

以上のことから、テオフィリンを添加した精液希釈液は、牛の精子の凍結精液融解後の生存率と活力の向上、および生存時間の延長に有効であり、またそれによる受胎率の向上に効果があることが示唆された。

参考文献

- 1) 宮本元、西川正：日畜会報、50(9):601(1979)
- 2) 佐々木捷彦：家畜改良技術センター報告、3:60(1987)
- 3) 沢井利幸、藤山繁、平田浩一郎、田形弘、櫻腹孝正、重村右治：山口畜試研報、10:32(1994)
- 4) 坂井隆宏、永淵成樹、宮島恒晴：佐賀畜試研報、34:4(1997)
- 5) 佐々木捷彦：第 76 回日本畜産学会講演要旨、23(1984)
- 6) 岡崎尚之、長谷川清寿、安部茂樹、川平実：島根畜試研報、30:1~4(1995)