

産子数向上のための精液に関する研究

Development of novel artificial insemination technique using frozen-thawed boar semen

岡崎哲司・吉田周司¹⁾・手島久智

要 旨

本研究では、現場で実用可能な豚凍結精液による人工授精法を開発することを目的とした。本技術を普及させるためには雄豚個体間の耐凍能の差異を最小限にする必要がある。

実験 1 では、耐凍能を左右する因子が精漿中の細菌であること、細菌の膜構成成分であり、病原性を示す LPS (lipopolysaccharide) が精子の先体部および尾部に発現・局在する Toll-like receptor4 (TLR4) により認識され、精子はアポトーシスにより死滅することを明らかとした。この LPS-TLR4 系は LPS 不活化剤 Polymyxin B (PMB) の添加により抑制可能で、それをを用いた精液処理法を考案した。

精漿中にはグラム陽性菌も検出されるため、LPS 以外にも耐凍能を左右する因子が存在すると考えられる。

そこで、実験 2 では、より安全に精子を凍結するため、精漿を採精後直ちに除去する手法を開発し、これにより耐凍能の低い個体の融解後精子運動性は改善され、耐凍能の課題を解決した。しかし、この手法により作出した融解精子は自発的な受精能獲得や先体反応を誘起しており、人工授精による受胎率は著しく低かった。融解液への精漿添加はこれら精子活性化を効果的に抑制した。

以上の結果から、採精後直ちに精漿を除去し、Penicillin G+PMB 処理した前処理液で置換して凍結する融解時に精漿含有融解液にて精子を溶かし、人工授精を実施する、という新しい豚凍結精液による人工授精法を開発し、受胎率 80% 以上、一腹産子数 10 頭以上という繁殖成績を可能とした。

キーワード (豚、凍結精液、人工授精)

背景及び目的

本県は、系統豚「おおいたエル 07」及び優良種豚大ヨークシャー、デュロックの改良に成功している。これらの遺伝子を衛生的かつ迅速に普及し、生産者の収益性を向上させるため凍結精液による人工授精は必要な技術である。我々は凍結用希釈液を高浸透圧および低グリセロール条件で精子を凍結することで融解後精子機能性を向上できることを報告した¹⁾が、耐凍能の低い個体が存在するため、総合的に凍結融解後の精子運動性は低くなり、受胎率及び一腹総産子数も未だ低いのが現状^{2,3)}であり、実用化には至っていない。

豚凍結精液を用いた人工授精の主要な 3 ステップである「精子の凍結処理」、「融解」、「人工授精」それぞれを最適化し、新鮮精液での成績と同等で、

安価、安全でかつ簡便なブタ凍結精液を用いた人工授精法を開発することを本研究の目的とする。

試験方法

1. 豚精子の凍結・融解・人工授精

精子は濃厚部を採取し、凍結希釈液は修正 NSF¹⁾を用いて凍結し、基礎融解液には Modena solution を使用した。融解した精液は PMSG-hCG 処理により発情同期化あるいは自然発情中の雌豚に頸管注入法により人工授精を実施した。一回の精液注入量は 50ml (精子数 50 億) とした。

2. 精子運動率、精子膜、先体膜正常率、アポトーシス誘起率

精子運動率は CASA 搭載運動解析装置にて、ま

1) 大分県農業大学校

た、精子膜および先体膜は PI-SYBR14 および FITC-PNA の免疫蛍光染色法によりそれぞれ観察し、測定した⁴⁾。また、アポトーシスの検出は Annexin-V assay を用いて蛍光顕微鏡にて観察した。

3. タンパク質の発現・局在解析

精子に発現する Phospho-tyrosine, Toll-like receptor2/4 (TLR2/4), Cleaved caspase-3 の発現はウェスタンブロットにより、局在は免疫蛍光染色法により検出した。

4. 実験計画

実験 1；精液中の細菌および細菌性内毒素が精子機能性に及ぼす影響

我々は精漿中に耐凍能を左右する因子が存在するという知見から、本研究では精液中の細菌に着目した。精液中の細菌の種と数を測定し、それらと精子運動性の相関を算出した。また、グラム陰性菌、陽性菌それぞれの内毒素 LPS (lipopolysaccharide) および Pam3Cys (Pam3Cys-Sr-(LYS)₄) が精子機能性に及ぼす影響を検討するとともに、これらを認識する TLR2/4 (Toll-like receptor 2/4) の発現を解析した。

実験 2；耐凍能を考慮した新規凍結・融解処理法の開発

精液中からはグラム陽性菌が優位な個体も存在し、これらの内毒素を中和する抗生剤は現在のところ存在しない。そこで、凍結処理過程において、対照区では精漿と数時間共培養するのに対し、試験区は採精後直ちに精漿を除去することを試みた。

5. 統計学的分析

数値は平均値 ±S.E.M で表す。統計学的分析は、一元配置分散分析で検定後最小有意差検定を行った。受胎率は二乗検定により分析した。統計分析は STATVIEW(Concepts, Inc., Berkeley, CA, USA) を用いて行った。

結果及び考察

実験 1；精液中の細菌および細菌性内毒素が精子機能性に及ぼす影響

ブタ精液中から *Pseudomonas aeruginosa*, *proteus mirabilis*, *E. coli* などのグラム陰性菌が多く検出された(0 ~ 15,000CFU/ml) (表 1)。ブタ射出精液を抗

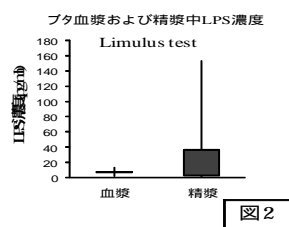
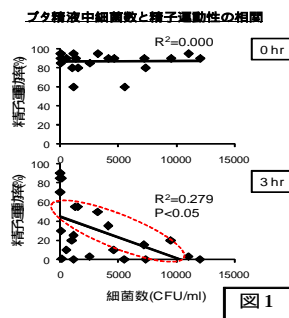
生物質無添加、37 度で培養した結果、採精直後の精液中細菌数と培養 3 時間後の精子運動率との間に負の相関関係が認められた (図 1)。

表 1

精液中細菌検査

グラム陰性菌	単離された雄ブタ数(n=22)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
<i>Escherichia coli</i>	3
<i>Proteus mirabilis</i>	3
<i>Klebsiella spp.</i>	1
グラム陽性菌	
<i>Aerococcus viridans</i>	4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1
<i>Cellulomonas spp.</i>	1

この負の作用が Penicillin G や Amikamycin では影響を与えなかった (未発表データ) ため、グラム陰性菌および陽性菌の内毒素である LPS や Lipoprotein などが直接的に精子へ悪影響を及ぼしていると推察された。実際、精液中から LPS を Limulus test⁵⁾ により検出した (図 2)。免疫



細胞において、LPS は自然免疫を司る TLR4 により⁶⁾、グラム陽性菌の膜成分は TLR2 により認識されることが知られているが⁷⁾、精子がこのような細菌を含む非自己認識機構を保有しているかは全く知られていない。そこで、ブタ精子における TLRs の発現およびその機能解析を行った結果、TLR4 および TLR2 共に mRNA、タンパク質レベルで検出され、それぞれ先体部および尾部に強く局在していた (図 3, TLR2 は未発表データ)。

さらに LPS、Pam3Cys の添加は精子運動率を低下させ、Caspase-3 の分解に伴うアポトーシスを誘起し、生存率を低下させた (図 4 リガンド Pam3Cys は未発表データ)。

精子におけるTLR4の発現

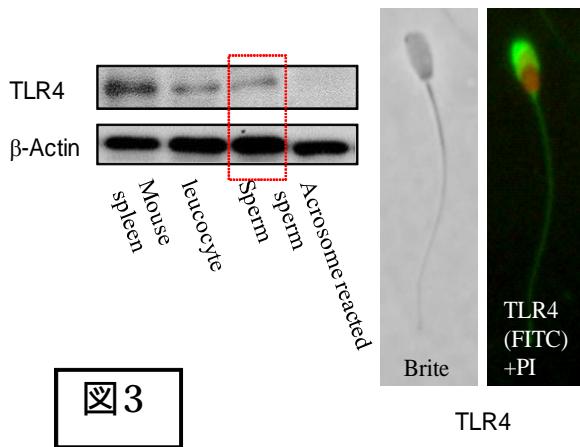


図3

LPSが精子機能性に及ぼす影響

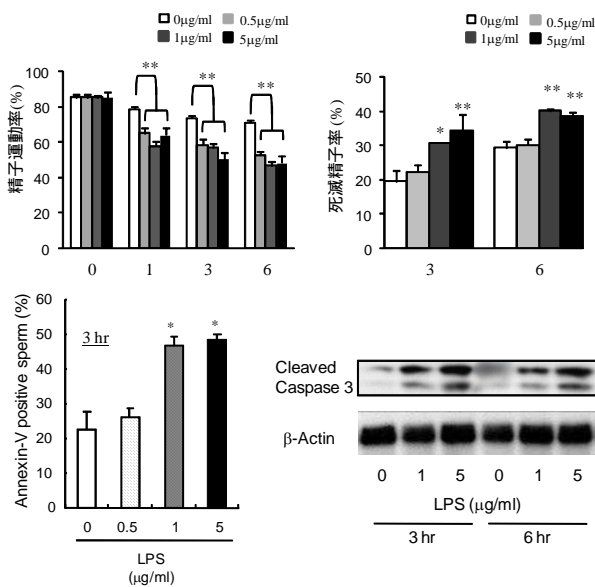


図4

以上の結果から、精子は TLRs を発現し、それが精液中の細菌感染を認識し、アポトーシスにより生存性を低下させるという、精子の初期免疫応答が初めて明らかとなった。

以上の結果から、凍結処理前に精液中の細菌あるいは LPS が精子に直接的に作用し、融解後の精子運動性を低下させていると考えられる。そこで、次に LPS の生物活性部位である Lipid A 構造を不活化する⁸⁾ 抗生物質 PMB の効果を検討した。まず、LPS 存在下での至適 PMB 添加濃度を検討した結果、100 mg/ml の PMB 添加は LPS による運動性低下および

Caspase-3 の活性化によるアポトーシス誘起を抑制可能とした(図5)。

LPS存在下におけるLPS不活化剤(PMB)が精子運動率に及ぼす影響

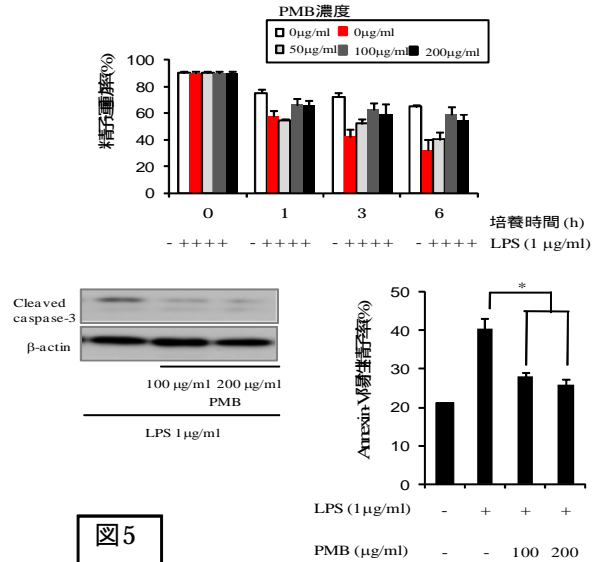
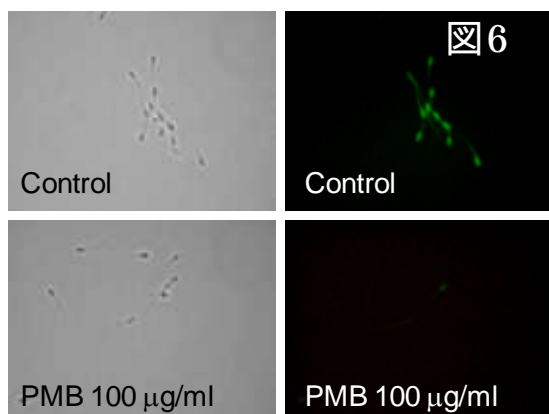


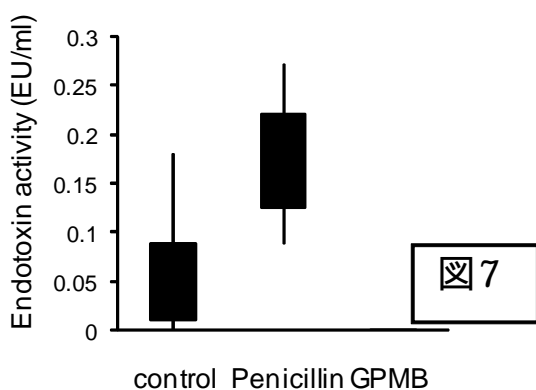
図5

次に、この至適濃度の PMB 添加が LPS の精子への結合あるいは精漿中の LPS 活性を阻害するか否かを FITC 標識した LPS および Limulus test を用いてそれぞれ検出した。PMB 無添加区においては、精子への LPS 結合が頭部および尾部に強く観察されたが、これら結合は PMB 添加により抑制された(図6)。また、精漿中の LPS 活性 (EU/ml) は細菌増殖抑制・溶菌作用を示す Penicillin G 添加により増加したが、PMB 添加はこれらを完全に不活化した(図7)。これらの結果は、一般的な精液処理で用いられる Penicillin G 単独処理は、溶菌作用により精液中へ LPS を放出させ、精子への悪影響を助長させていると考えられる。したがって、細菌の増殖と LPS による影響を二重防御する Penicillin G+PMB の複合処理が効果的であると結論づけられる。

ブタ精液におけるPMBのLPS不活化効果



ブタ精液におけるPMBのLPS不活化効果



そこで、実際にこの複合処理法を凍結精液作製過程へ応用することを試みた。精液前処理液および凍結希釈液を複合処理して精子を凍結した結果、融解後の精子運動率が増加し、人工授精による繁殖成績が改善された(表2)。

表2

PMB複合処理して凍結した精子を用いた人工授精による繁殖成績

ブタ No.	採精時	精子運動率 (%)		受胎			一腹産子数 (頭)		
		凍結融解後		P	P+PMB	P	P+PMB	P	P+PMB
		P	P+PMB						
D754	93	50	80	N	N	-	-	-	-
L167	89	41	48	N	Y	-	8	-	8
L947	91	45	60	Y	Y	12	14	-	14
L181	88	41	73	N	Y	-	10	-	10
L291	91	59	83	Y	Y	3	12	-	12
D327	89	25	78	N	Y	-	5	-	5
D621	93	84	87	Y	Y	11	9	-	9
D247	89	59	88	Y	Y	9	10	-	10
L381	90	25	55	N	Y	-	5	-	5
W7418	90	43	69	Y	Y	7	9	-	9

P; Penicillin G, P+PMB; Penicillin G+Polymyxin Bを示す

Y; 受胎, N; 不受胎を示す

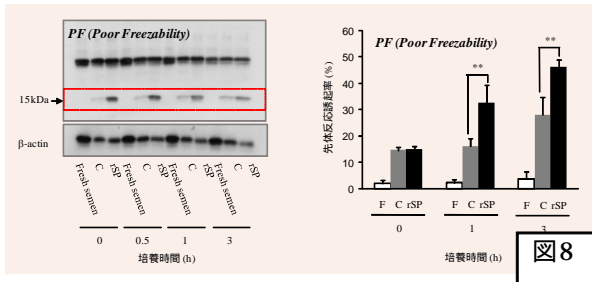
実験 2；耐凍能を考慮した新規凍結・融解処理法の開発

この LPS を抑制する方法においても融解後の運動率や人工授精の成績が改善されない個体も存在した。細菌検査した 22 頭の内、3 頭の雄ブタにおいて 3000 CFU/ml のグラム陽性菌が精漿中から検出されたこと、グラム陽性菌はポリペプチドあるいはペプチドグルカン等の病原性破片を分泌すること、実際、TLR2 のリガンドである Pam3Cys は LPS と同様に精子の膜の異常やアポトーシスを誘起し、運動率を著しく低下させたことから、PMB 処理でも精子の運動率あるいは人工授精後の受胎率が改善されない上記の問題は、グラム陽性菌の病原性破片であると推察された。しかし、グラム陽性菌の病原性破片を不活化する抗生物質は現在のところ存在しない。これらのことから、採精直後に精漿を除去することは、精子を精漿中のグラム陽性菌の病原性破片およびその他の精子に対して負に作用する因子の影響から回避して、凍結することを可能にする有効な手法であると考えられる。

耐凍能の低い個体(既存の凍結法により作製した精子を用いた人工授精で受胎率 0%だった雄個体と定義した)において採精直後の精漿除去は融解後精子運動率および体外受精率を著しく向上させた。しかし、精漿除去法により作出した耐凍能の低い個体の精子による人工授精では、受胎率が 9%にしか改善されなかった(未発表データ)。この結果は、運動性以外の精子機能が精漿を除去することによって変化したと推察した。

そこで、精子受精能獲得の指標であるタンパク質のチロシン残基リン酸化を anti-tyrosine antibody を用いて Western Blotting により、さらに、FITC-PNA を用いて先体反応を検出した。特異的なリン酸化チロシンのバンドはおよそ 15 kDa に検出された(図8)。

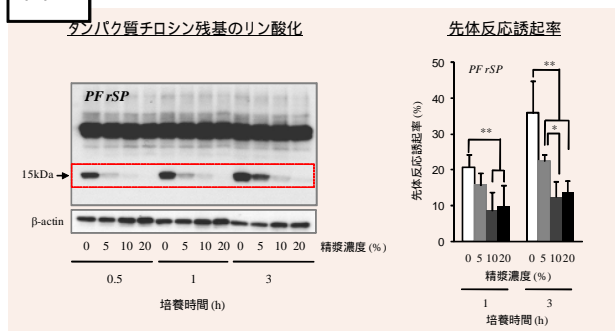
凍結過程の精漿の存在が融解後精子の受精能獲得および先体反応に及ぼす影響
タンパク質チロシン残基のリン酸化



この検出されたバンドは、精漿除去法にて作出した精子において陰性コントロールの射出精子および対照区と比較して強く検出された。このバンドが精漿除去法で作出した精子においてのみ融解直後から検出されたこと、先体反応誘起率が融解後の培養 1 時間で有意に増加したことから、精漿を除去して凍結する手法は、融解精子において、融解過程で自発的に受精能獲得と先体反応が生じ、先体が損傷しているため、体内での受精能を失っていると考えられた。

射出精子において、精漿は受精能獲得を抑制するという⁹⁾報告から、精漿を融解液へ添加し、それが抑制可能か否かについて検討した結果、精漿濃度依存的に活性化を抑制した。10%(v/v)の精漿添加量で効果的に抑制可能であることが示された(図9)。

図9 融解液への精漿添加が凍結融解精子の受精能獲得および先体反応に及ぼす影響



これまでの結果から、採精直後に精漿を除去し、Penicillin G+PMB 処理した前処理液にて希釈後凍結する 融解時に精漿 (Penicillin G+PMB) を添加した融解液にて精子を溶かして人工授精する、という精漿に着目した 2 ステップ凍結融解処理法を考案した。この手法を用いて人工授精を行った結果、耐凍

能の低い個体の精子を用いた場合においても受胎率が 70%と高い値を示し、全ての個体の精子を用いた時にも受胎率 80%以上、産子数 10 頭以上の液状精液を用いた人工授精と同等の繁殖成績を得ることに成功した(表3)。

表3 過排卵処理した雌ブタを用いた人工授精(1回のみ人工授精)

処理区	人工授精に用いた雌ブタの頭数	受胎率 % (範囲)	着床部位数 ¹⁾
液状精液	15	80(12/15)	12.3+/-0.6
PF rSP	23	9(2/23)	9.5+/-1.8
PF 2ステップ凍結融解処理法	47	70(33/47) [*]	12.3+/-0.6 [*]

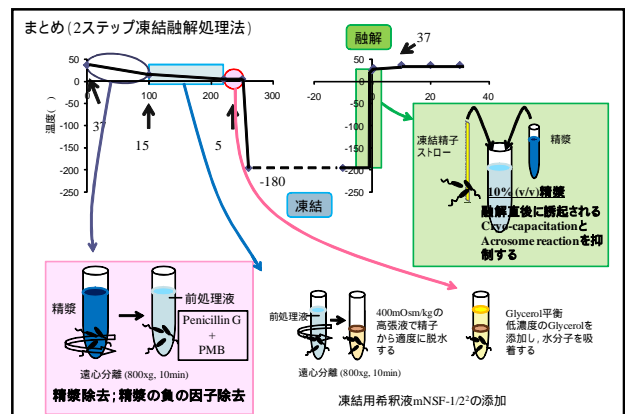
¹⁾ 1頭あたりの雌ブタの子宮内着床部位数

自然発情の雌ブタを用いた人工授精(3回人工授精)

処理区	人工授精に用いた雌ブタの頭数	受胎率 % (受胎頭数/人工授精頭数)	総産子数 ¹⁾	生存産子数
液状精液	140	81(114/140)	10.9+/-3.1	9.8+/-3.0
従来法	65	42(27/65)	8.3+/-3.3	7.3+/-3.3
2ステップ凍結融解処理法	64	81(52/64) [*]	10.4+/-3.3	9.7+/-3.3

¹⁾ 死産または白子を含め、ミイラおよび黒子は除いて算出した

この技術の普及を視野に入れて、平成 21 年 3 月に現場実証試験(臼杵市足立農場)を行った。6 頭の雌に人工授精を施し、妊娠率 100%、産子数 11.5 頭という液状精液のそれらと同等な結果であった。



本技術は、特許出願しております。
発明の名称；「受胎率および産子数向上豚凍結精子およびその製法」
特願 2007-325313
発明者；岡崎哲司(大分県), 島田昌之(広島大学)

引用文献

- 1) Okazaki T, Abe S, Shimada M. Anim Sci J, 2009. 80;121-129.
- 2) Johnson LA, Aalbers JG, Willems CMT, Sybesma W. J Anim Sci, 1981. 52;1130-1136.
- 3) Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC. Anim Reprod Sci, 2000. 62;143-72.
- 4) 岡崎哲司，廣瀬啓二，丸山信明，津田剛．大分県農林水産研究センター畜産試験場試験成績報告書．2007.
- 5) Elin RJ, Robinson RA, Levine AS, Wolff SM. N Engl J Med. 1975. 293;521-524.
- 6) Takeda K, Akira S. Int Immunol. 2005, 17;1-14.
- 7) Tsan MF, Gao B. J Leukoc Biol. 2004, 76;514-519.
- 8) Appelmek BJ, An YQ, Geerts M, Thijs BG, de Boer HA, MacLaren DM, de Graaff J, Nuijens JH. Infect Immun. 1994, 62;2628-2632.
- 9) Cross NL. Mol Reprod Dev. 1993, 35;316-323.