

免疫機能に着目したブタ繁殖技術向上に関する研究

岡崎 哲司・秋好 禎一・森 学・手島 久智

大分県農林水産研究指導センター畜産研究部

共同研究 : 広島大学大学院生物圏科学研究科

要約 ブタ凍結精液による人工授精 (artificial insemination; AI) 技術は、貴重な雄個体の遺伝資源保存や発情適期に AI が可能になるなど現場ニーズがあるにもかかわらず、実用化されていないのが現状である。我々はこれまでに、融解直後の精子に生じる受精能獲得が AI 後の低受胎の原因であること、精漿はそれを抑制し、精漿含有融解液を用いることで高い繁殖成績が得られることを明らかとしてきた。しかし、精漿には伝染性ウイルス疾病を招く危険性があることから、精漿の機能を補完した合成融解液の開発が求められている。融解後の受精能獲得は細胞外の Ca^{2+} を取り込むことで助長され、精漿はそれを抑制していたことから、これらの現象に Ca^{2+} が関与していると考えられる。細胞外 Ca^{2+} キレーターである EGTA の融解液への添加は精子細胞内 Ca^{2+} 上昇と、それに起因する受精能獲得を抑制した。また、融解後の精子の運動率および体内受精率も改善したことから、EGTA の有効性が確認された。しかし、EGTA 融解液による AI では、卵管内受精率は高いにもかかわらず、胎子の着床率は 51% と非常に低く、さらに、着床胎子においても、その死亡率が高かった。この結果から、精漿には免疫抑制因子が存在し、これらが、精子が抗原となり遊走された白血球による胚の貪食を防ぐと仮説を立てた。精漿中から強い免疫抑制作用を有する cortisol を同定し、融解液への cortisol 添加は、凍結精液を AI 後 24 および 48 時間の子宮腔内白血球数を有意に抑制し、正常妊娠モデルとなる「液状精液による人工授精」の子宮内白血球数と類似した動態を示した。この EGTA および cortisol を添加した合成融解液で人工授精した場合の着床率は飛躍的に向上し、繁殖成績も受胎率が 84%、一腹産子数 10.1 頭と実用化レベルに達した。

キーワード: ブタ、精漿、凍結精液、人工授精、免疫

緒言

ブタにおける凍結精液を用いた人工授精 (AI; artificial insemination) は、優秀な遺伝形質を有する雄ブタの後代を獲得するため一部の研究機関で行われているのみで、生産現場ではほとんど利用されていない。ブタにおける凍結精液技術は、優秀な雄個体の遺伝資源保存や発情適期に AI ができるなど経済的な価値は高いことからその開発研究は進められている。しかし、AI による受胎率は 50%、一腹平均産子数は 5 頭程度と液状精液 (受胎率 80%、一腹平均産子数 10 頭程度) と

比較するとその差は歴然である。この低繁殖性の主因は、精子凍結融解後の低い生存性および運動性であり、これには凍結時のダメージのみでなく、凍結融解時の温度ストレスによって生じる自発的な受精能獲得 (capacitation) が密接に関わっていることが報告されている^{1, 2)}。近年、我々は、capacitation 抑制作用を有する精漿を融解液へ添加することで capacitation の指標となる精子タンパク質のチロシン残基のリン酸化と、その後誘起される先体反応を抑制でき、AI 後の繁殖成績が向上したことを報告している^{1, 2)}。この精漿

含有融解液による AI は、液状精液と同等の繁殖成績を示すことが可能³⁾だが、精漿には豚繁殖・呼吸障害症候群 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)、サーコウイルス II 型 (porcine circovirus type 2, PCV2)、パルボウイルス (porcine parvovirus, PPV) およびオーエスキューウイルス (Aujeszky's disease, ADV) など経済損失を増大させているウイルスが混入するため、AI 時の感染リスクも否定できない。したがって、このようなウイルスが存在しない SPF (specific pathogen-free) 農場や非感染農場では疾病を蔓延させると懸念される。また、精漿成分は季節毎、個体毎によって大きく変動することから精漿含有融解液の品質を安定化させることが困難である。そのため、全ての農場で安定的かつ安全に使用可能にするためには精漿の正の作用を利用し、融解液に精漿を添加せずとも、同等の機能を有する合成融解液 (人工精漿) の開発が求められる。これまでに、凍結融解精子における精漿の役割はほとんど明らかとされていない。そこで、本研究では精漿の凍結融解精子に対する正の役割を追求、それを模倣した人工精漿を開発すると共に精漿に依存しない人工授精技術を確立することを目的とした。

材料および方法

【実験 1】精子融解後に起こる capacitation に及ぼす Ca^{2+} と精漿の影響

溶液中の Ca^{2+} が精子融解後の capacitation に与える影響を検討するため、融解精子を Ca^{2+} 添加あるいは無添加培地で培養し、融解後の精子のタンパク質チロシン残基のリン酸化を westernwesternblotting にて検出した⁴⁾。また、 Ca^{2+} 含有培地に精漿を 10% (v/v) 添加し、融解後の精子に起こる capacitation, Ca^{2+} と精漿の関係を追求した。

【実験 2】細胞外 Ca^{2+} キレート剤 EGTA が融解後の精子細胞内 Ca^{2+} および精子機能性に及ぼす影響

Ca^{2+} キレート剤である EGTA (WAKO) と細胞内 Ca^{2+} レベル (Fluo-3/AM を用いた蛍光強度測定および

蛍光顕微鏡観察) および, capacitation への影響について検討すると共に, 融解後の精子運動率と先体膜損傷率を指標に融解液へ添加する至適 EGTA 濃度について検討した⁴⁾。

【実験 3】EGTA 含有融解液を用いた人工授精試験

実験 3 では, 実験 2 で得られた至適濃度の EGTA 添加あるいは無添加融解液を用いて凍結精液を AI し, 体内における受精能を卵管内受精率および着床率を算出することで比較評価した⁴⁾。さらに, これまでに開発してきた 2 ステップ凍結融解処理法 (精漿含有融解液を用いた AI) を利用した人工授精も実施し, その繁殖成績と比較検討した。

結果および考察

射出精子における capacitation は精子細胞内の Ca^{2+} の急激な増加によって誘起される。この細胞内 Ca^{2+} の上昇は, 細胞外からの Ca^{2+} 流入が初期のトリガーとなり, 細胞内の Ca^{2+} ストアからイオンが放出されるためと考えられている。一方, 凍結融解後の精子においては, 凍結融解刺激による原形質膜の物理的損傷により, Ca^{2+} チャンネルを介さずに直接細胞内へ流入すると考えられる。そこで, まず, ブタ凍結融解精子においても細胞内 Ca^{2+} が増加しているか否かを細胞内 Ca^{2+} 指示薬である Fluo-3/AM を用いて観察した。その結果, 融解直後から精子頭部および中片部で強い Ca^{2+} シグナルが検出され, 培養時間に依存してシグナル強度は増加した (図 1)。

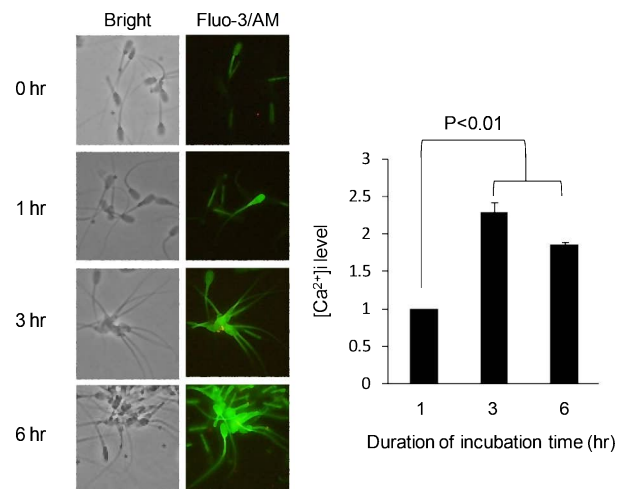


図1. 融解後の精子における経時的細胞内 Ca^{2+} 濃度変化

B; 培養1時間のControlの値を1とした相対比で示す

これらの精子ではタンパク質のチロシン残基のリン酸化が検出され、capacitation が誘起されており、さらに、培養液へ Ca^{2+} を添加することでそれらは増大した (図 2) . 一方、培養液に 10% (v/v) 精漿

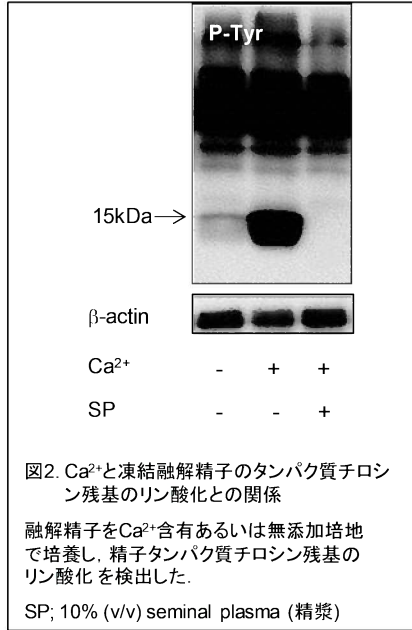


図2. Ca^{2+} と凍結融解精子のタンパク質チロシン残基のリン酸化との関係

融解精子を Ca^{2+} 含有あるいは無添加培地で培養し、精子タンパク質チロシン残基のリン酸化を検出した。

SP; 10% (v/v) seminal plasma (精漿)

を添加すると、 Ca^{2+} 依存性の capacitation は完全に抑制されていた。つまり、融解時の精子に起こる capacitation は細胞外 Ca^{2+} により制御され、かつ精漿の作用により Ca^{2+} の流入を抑制していると示唆された。そこで、このような精漿の機能を模倣するため、細胞外 Ca^{2+} に高い親和性を示す 2 価イオンキレート剤であるグリコールエーテルジアミン四酢酸 (EGTA; *o, o*-Bis (2-aminoethyl) eglycol-*N, N, N', N'*-tetraacetic acid) が細胞内 Ca^{2+} 上昇と capacitation にどのような影響を及ぼすかについて検討した。融解液への 6 mM EGTA 添加は、精漿添加時と同様に capacitation を抑制し、さらには、融解後に持続的に観察される細胞内 Ca^{2+} 上昇は認められず、その効果は長時間の培養でも保持されていた (図 3) . これらの結果から、精漿の有する capacitation 抑制作用は EGTA の融解液への添加で模倣できることが示された。

一般的に融解液として用いられる Modena 液には 2 価イオンをキレートする EDTA が 6 mM 含まれている。しかし、EDTA は Ca^{2+} に対する親和性が EGTA と比べて低く、溶液中の Ca^{2+} を完全にキレートするためには、これ以上の高濃度を添加する必要がある。

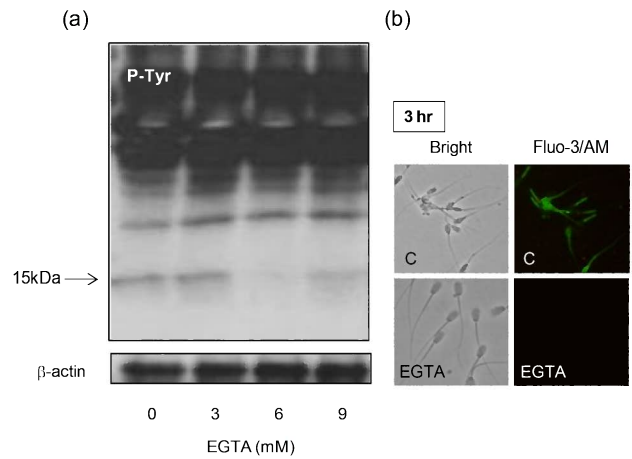


図3. Ca^{2+} キレート剤EGTAの融解液への添加が凍結融解精子のタンパク質チロシンリン酸化と細胞内 Ca^{2+} 濃度に及ぼす影響

この高濃度 (12 mM) の EDTA 添加は、融解後の運動率を低下させた (Okazaki et al., unpublished data) . この結果は、EDTA は Ca^{2+} をキレートすると共に、精子の運動能に関与していると報告されている Zn^{2+} , Mg^{2+} などの他の 2 価イオンも同時にキレートしたためと推察される。一方で、EDTA には 2 価イオンをキレートすることで、抗酸化作用を示すという正の効果も存在する。実際、精子運動率および細胞膜正常率を指標にすると EGTA の効果は 6 mM EDTA の存在下で増強された (図 4) . また、これら条件で培養した精子は、非常に高い運動率が長時間持続したことから、融解液へ EDTA と EGTA を併用することが重要であると結論づけた。このようにして開発した EDTA および EGTA を添加した融解液にて作出した凍結融解精子を AI に供試したところ、通常使用される Modena 液で作出したものと比較して、有意に高い受精率を示したことから (表 1) , EGTA により抑制状態にあった capacitation は受精時に可逆的に誘起され、これら精子は高い受精能を保持していることが明らかとなった。

以上の結果から EDTA および EGTA 添加融解液は融解時に誘起される capacitation を抑制し、高い運動率を維持させることで AI に有効なツールであることが示された。

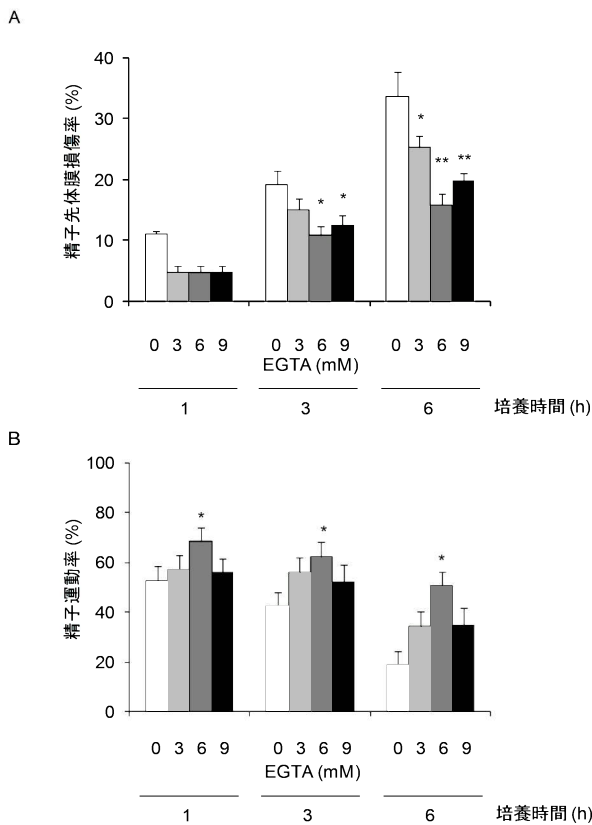


図4. 融解液へのEGTA添加が融解後の精子先体膜損傷率 (A) および運動率 (B) に及ぼす影響
各培養時間におけるEGTA無添加区と比較して有意差有り* (P<0.05), ** (P<0.01)

表1. EGTA含有融解液にて融解した精子を用いた人工授精における体内の受精能

処理区	人工授精に用いた雌ブタの頭数	卵管内受精率 (%)	着床率 (%)	受胎率 (%)
Control	23	33+/-8.3	-	9
EGTA	10	82+/-8.8*	51+/-12.0*	90*
SP	12	82+/-6.2*	78+/-11.4	83*

人工授精はeCG-hCG処理した雌ブタに1回のみ行った
人工授精は頸管注入用のカテーテルで行った
EGTA; 6mM EGTA, SP; Seminal plasma (精漿注入区)
着床率: 人工授精後30日齢の子宮内着床部位数/黄体数
受胎率: 受胎頭数/供試頭数
*着床率はEGTAとSP処理区間. 受胎率はControlと比較して有意差有り(P<0.05)
数値は平均値±SEM

上述した EDTA および EGTA 添加融解液を用いた AI で十分な数の着床胎子が得られるかを確認するため、PMSG-hCG により過排卵処理を施した雌ブタに 1 回 (50x10⁸ sperm/mL) AI 後、30 日後の子宮を回収し、着床率 (胎子数/黄体数) を算出した。その結果、EDTA と EGTA 添加融解液を用いた場合、着床率は 51% と低く、対照とした精漿 10% (v/v) 含有した融解液を用いた場合では 78% と有意な差が認められた。さらに、精漿を全く包含していない EDTA および EGTA 添加融解液では、着床胎子が免疫細胞による食作用を受け、死亡しているものが多く観察された。これらの結果から、精漿中に子宮内の免疫系を制御し、胚の着床を促進 (あるいは正常化) させる因子が存在しているのではないかと推察した。

AI 後に子宮内に遊走される白血球は、子宮腔内に残留した死滅精子を貪食し、子宮環境を整える役割がある。一方、Rozeboom ら^{5, 6)}は、これらの白血球が精漿存在下では AI 後 24 時間以内に消失することを報告している。また、マウスおよびヒト精漿には、種々のサイトカイン・ケモカインや抗炎症性ステロイドホルモンなどが含まれていることが示されている。したがって、精漿中の免疫抑制因子が、AI 後の精子が抗原となって起こる細胞性免疫能を抑制し、胚が子宮へ到達した時にはその免疫力は低下し、白血球による胚への侵襲を抑制していると考えた。しかし、ブタ精漿中の免疫抑制因子と AI 後の子宮内環境、さらには、それらが繁殖成績にどのように関与しているかについては全く明らかとされていない。そこで、ステロイドホルモンを中心に精漿中免疫抑制因子の同定を試みた。その結果、精漿中には免疫抑制作用を有する cortisol が 0.92 ng/ml 濃度で存在することが EIA により明らかとなった (表 2)。cortisol は prostaglandin (PG), leukotriene などの炎症性物質を阻害する他、細胞質に局在する glucocorticoid receptor (GR) に結合し、核内へ移行後、NF- κ B responsive element を負に制御

表2. 血漿および精漿中のCortisol濃度	
	Cortisol (ng/ml)
血漿	7.11±0.89
精漿	0.92±0.01

EIAにより血漿および精漿中Cortisol濃度を測定した
数値は平均値±SEM

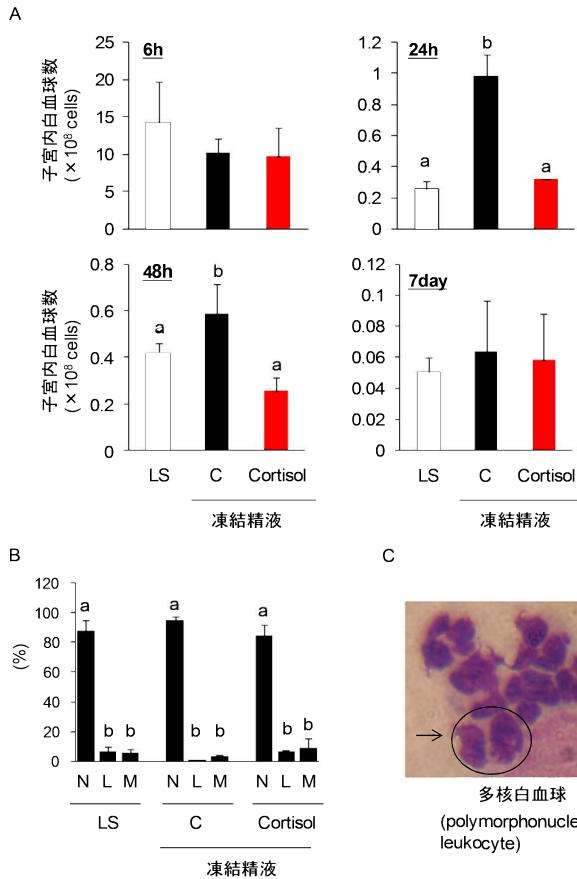


図5. 人工授精後の子宮腔内白血球数に及ぼすCortisolの影響
A; 子宮内白血球数 LS; 液状精液, C; Cortisol無添加を示す
B; N; 好中球, L; リンパ球, M; マクロファージ a-b, P<0.01

することで炎症性サイトカイン (*IL-1* , *IL-2*, *IL-5*, *IL-6* など) 遺伝子の転写を抑制する. さらに, 抗炎症性サイトカイン遺伝子 (*Lipocortin*, *IL-1R antagonist*, *I* . . .) を転写させることで, 初期自然免疫の際に遊走される好中球などの白血球遊走を阻害する. この cortisol の子宮内免疫抑制作用を, AI 後の子宮腔内白血球数を指標に

検討した. AI 後 6 時間で子宮内に多核白血球 (polymorphonuclear leukocyte, PMN) が遊走され, その数は, 液状精液, cortisol 無添加および添加凍結融解精液いずれを注入した処理区間でも有意な差は認められなかったが, AI 後 24 および 48 時間後において, cortisol 無添加凍結融解精液を注入したそれは有意に高い値を示し, 子宮内へ cortisol を注入することでこれらは精漿を含有する液状精液と同水準にまで低下した (図 5) . これらの結果から, 精漿中に含まれる cortisol は子宮内で精子など異物に対して遊走される好中球を人工授精後 24 時間以内に減少させる免疫抑制作用をもつことが明らかとなった.

精漿中の生理活性物質が子宮内膜細胞に作用し, 着床サイトでのリンパ球誘引および分化を促すことで着床を成立させることもマウスやヒトで報告されている. 着床期の子宮粘膜中のリンパ球は, 父性抗原をもつ半同種移植片 (semi-allograft) である胎子 (児) を侵襲しないため, 着床サイトのリンパ球が細胞障害作用の低下した子宮内特異的な uterine NK-cell (uNK) と CD4⁺ helper T-cell (Th2) へと分化している. 近年, Robertson ら^{7, 8, 9} および Gutsche ら¹⁰ は, 精漿中の TGF- β と IL-8 が子宮粘膜細胞に作用することが着床サイトでのリンパ球集積と分化に重要であると報告している. 我々はブタにおいて, 精漿中に炎症性サイトカインであるマクロファージ遊走阻止因子 (MIF) や IL (interleukin) -17 を, 抗炎症性サイトカインとして IL-13 を検出していること, 着床期の子宮粘膜細胞に T-cell マーカーである CD3⁺ cell が散在していることを見いだしている (Okazaki unpublished data) ことから, ブタにおいても着床に重要な子宮粘膜中の T-cell が存在し, 精漿がそれらに何らかの役割を果たしているかもしれない. 今後, このような視点で精漿が胚の着床に果たす役割を研究していく必要がある.

これまでの研究で, cortisol が子宮腔内の白血球数を減少させ, 細胞性免疫能を抑制させることが明らかとなったことから, 自然発情中の雌ブタ

へ EDTA, EGTA および cortisol 含有合成融解液を用いて凍結融解精液の AI を行い, その繁殖成績を算出した. その結果, AI 後 30 日齢における子宮内の胎子着床率は 83%へと向上し, その値は, 精漿を 10% (v/v) 包含した融解液を用いた場合 (78%) と遜色ないものであった. さらに, 現場実証試験として, 81 頭の自然発情中の雌ブタに, 3 回の AI (5×10^9 sperm/回) を実施した. 受胎率は 80%で, 一腹平均産子数は 10.1 頭という好成績を示した. 対照区として, これまでに開発してきた精漿含有融解液を用いて人工授精した成績, 受胎率 81%, 一腹平均産子数 10.3 頭と比較しても有意な差は認められなかったことから, 本研究で開発された合成融解液は産業上においても十分利用可能なものであると示された.

ステロイドホルモンである cortisol の注入は, 胎子と母体へ副作用を及ぼす懸念があるが, 子宮へ注入する cortisol 量は, ブタの炎症の治療時に投与する量に比較して 1/10,000 程度であり, 精漿に含有する量と注入量が同程度であること, かつ, cortisol は代謝分解が早いこと, 産子の一週齢平均体重, その後の発達も正常であることから, 本融解液を用いた AI は安全面においても影響はないと考えられる (図 6) .



図 6 EGTA+Cortisol完全合成融解液を用いた人工授精で誕生した子豚

引用文献

- 1) Okazaki T, Abe S, Yoshida S, Shimada M. Seminal plasma damages sperm during cryopreservation, but its presence during thawing improves semen quality and conception rates in boars with poor post-thaw semen quality. *Theriogenology*. 2009. 71:491-498.
- 2) Okazaki T and Shimada M. New strategies of boar sperm cryopreservation: Development of novel freezing and thawing methods with a focus on the roles of seminal plasma. *Anim. Sci. J.* 2012. 83: 623-629.
- 3) 岡崎 哲司・秋好 禎一・菅 正和・手島 久智・島田 昌之. 精漿含有融解液を用いた豚凍結精液による人工授精試験. *日豚会誌*. 2011. 48:147-151.
- 4) Okazaki T, Yoshida S, Teshima H, Shimada M. The addition of calcium ion chelator, EGTA to thawing solution improves fertilizing ability in frozen-thawed boar sperm. *Anim Sci J.* 2011. 82:412-419.
- 5) Rozeboom KJ, Troedsson MH, Crabo BG. Characterization of uterine leukocyte infiltration in gilts after artificial insemination. *J. Reprod. Fertil.* 1998. 114:195-199.
- 6) Rozeboom KJ, Troedsson MH, Rocha GR, Crabo BG. The chemotactic properties of porcine seminal components toward neutrophils in vitro. *J. Anim. Sci.* 2001. 79:996-1002.
- 7) Robertson SA. Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. *Cell Tissue Res.* 2005. 322:43-52.
- 8) Robertson SA. Seminal fluid signaling in the female reproductive tract: lessons from rodents and pigs. *J. Anim. Sci.* 2007. 85:E36-44.
- 9) Robertson SA, Ingman WV, O'Leary S, Sharkey DJ, Tremellen KP. Transforming growth factor beta--a mediator of immune deviation in seminal plasma. *J. Reprod. Immunol.* 2002. 57:109-128.
- 10) Gutsche S, von Wolff M, Strowitzki T, Thaler CJ.

Seminal plasma induces mRNA expression of IL-1beta, IL-6 and LIF in endometrial epithelial cells in vitro. *Mol. Hum. Reprod.* 2003. 9:785-791.

なお、本成果は、「精子用希釈液、及び、これを用いた人工授精方法」として特許出願しております。

特願 2009-144703

出願人：大分県・国立大学法人広島大学

出願日：平成 21 年 6 月 17 日

本成果を利用する場合には、ライセンス契約が必要となりますので、お問い合わせください。

本成果は、以下の文献に先行して発表しています。

Okazaki T and Shimada M. New strategies of boar sperm cryopreservation: Development of novel freezing and thawing methods with a focus on the roles of seminal plasma. *Anim. Sci. J.* 2012. 83: 623-629.

Okazaki T, Yoshida S, Teshima H, Shimada M. The addition of calcium ion chelator, EGTA to thawing solution improves fertilizing ability in frozen-thawed boar sperm. *Anim Sci J.* 2011. 82:412-419.

Okazaki, T., T. Akiyoshi, M. Mori, H. Teshima, and M. Shimada. 2012b. Development of chemical defined thawing solution focused on the role of seminal plasma, and its application to artificial insemination of cryopreserved boar semen. *Journal of Reproduction Engineering* 15: 7-12. (In Japanese).