

ウシ凍結精液による人工授精技術の修正と高度化

岡崎 哲司・佐藤 邦雄・川部 太一
大分県農林水産研究指導センター畜産研究部

要約 牛の凍結融解精液は、夏季に製造されたものと比較して、冬季のものは運動パラメーターが高いことが明らかとなった。また、融解液をストロー内に精液と共に封入して凍結することで、融解後の運動パラメーターは高く、それが 20 時間まで持続する。これらは、生産者への精液供給の新たな指標となり、さらに今後の人工授精の改善に繋がる成果である。

キーワード: 牛, 凍結精液, 人工授精

緒言

近年のウシにおける受胎率低下の要因は、遺伝的、飼養的、あるいは環境変化など様々である。そのため、その対策研究は、受胎率低下を引き起こすと言われている遺伝子の解明、飼養研究、および暑熱対策などの単一研究あるいは複合研究がなされているのが現状であり、それらの研究と共に繁殖研究を進めていくことが解決の一步である。

全体的な受胎率を向上させるためには、①凍結精液の品質の改善、②精子機能性の保持、③それら精子の適切な人工授精法が必要となる。しかし、ウシの凍結精液による人工授精法は 1965 年以降と古くから普及し、かつ、それは家畜人工授精師により行われているため、大幅にその授精技術を修正するのは困難である。当研究部はブタ凍結精液技術開発の中で、①～③を改善できる知見を得ている。そこで本研究では、それをウシ凍結精液に応用することで、融解後も高い運動能を有した凍結精液技術の開発を行うことを目的とする。

材料および方法

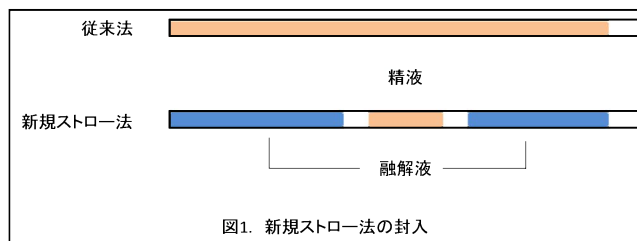
【季節変動が凍結融解後の精子の運動能に及ぼす影響】

季節変動がウシ凍結融解精子の機能に影響を

及ぼすか否かを検討した。寿恵福、藤平茂および隆茂 38 を供試牛とし、環境要因が作用しないようにそれぞれの牛の月齢を固定して解析を行った。精子運動パラメーター（精子運動率、精子直進速度、頭部振幅及び頭部振動数）は CASA 運動解析装置にて、細胞膜は PI-SYBR14 を用いてフローサイトメトリーで解析した。先体膜正常率は FITC-PNA にて免疫染色し、蛍光顕微鏡下で正常先体数をカウントした。

【融解液を封入した新規ストロー法の効果】

牛と豚の凍結精液技術の大きな違いは融解液の有無にある。牛では、凍結の際に 7%以上のグリセリンを添加するが、豚ではその細胞毒性の影響から 3%以下にすることが望ましい。牛においてもグリセリンの毒性は報告があることから、より低濃度で人工授精することが重要となる。そこで、精子と卵黄の凍結保存液の混合物をそのまま封入している従来法と、その混合物をストローの中心に位置し、融解液で挟み込む新規ストロー法



の比較解析を行った (図 1)。これにより、融解後、融解液と混ざり合うことによるグリセリン濃度の低下および融解液に含まれる有効成分による効果が期待され、融解後の精子の機能性が向上可能かについて検討した。融解液は、豚の希釈液として市販されているモデナ液に抗酸化剤である N-Acetyl L-Cysteine (NAC) を添加し、最終 pH を 6.0 に調整したものをを用いた¹⁾。

結果および考察

【季節変動が凍結融解後の精子の運動能に及ぼす影響】

作製された凍結精液は作製日などの季節に関わらずランダムに人工授精師や生産者に配布されている。しかし、採取・製造された季節により精子の活力が変動する可能性がある。そこで、季節変動が凍結融解後の精子の運動パラメーターおよび細胞膜のステータスに与える影響について検討した。その結果、融解後 1 時間では精子運動率および受精に大きく関わる直進速度は、あまり変化は見られなかったが、融解 3 時間後においては、両パラメーターで冬期に作製された精子が最も高い値を示した (図 2)。特に運動率では、夏季と比較して有意に高い値を示していた ($P < 0.01$)。また、精子細胞膜および先体膜のステータスにおいては、いずれの季節の凍結融解精子も有意な差は観察されなかったが、冬季精子の細胞膜は最も正常に細胞膜を保持していた。これらの結果から、冬季に作製された凍結精子が最も受精能を保持していると推察される。

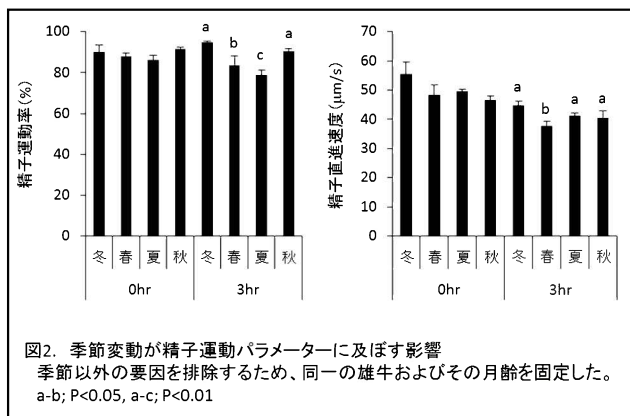


図 2. 季節変動が精子運動パラメーターに及ぼす影響
季節以外の要因を排除するため、同一の雄牛およびその月齢を固定した。
a-b; $P < 0.05$, a-c; $P < 0.01$

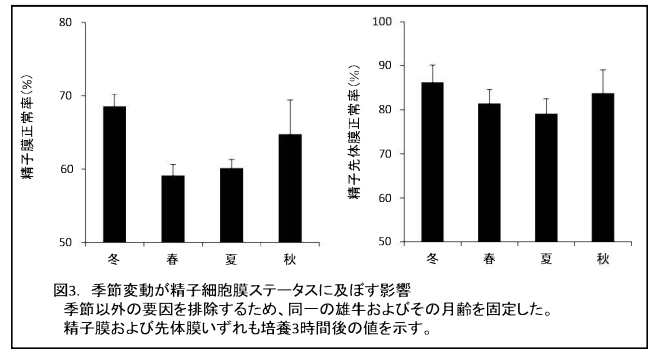


図 3. 季節変動が精子細胞膜ステータスに及ぼす影響
季節以外の要因を排除するため、同一の雄牛およびその月齢を固定した。
精子膜および先体膜いずれも培養 3 時間後の値を示す。

【融解液を封入した新規ストロー法の効果】

既存の凍結精液の利用方法の改善以外にも凍結方法の改善そのものもまた重要である。本試験では融解液を挟み込むストロー封入方法の修正を試みた。

その結果、融解後の精子運動率は、従来法のそれが低下し始める 7 時間後でも新規ストロー法においては高い値を維持しており、20 時間経過しても若干の低下程度であった。また、子宮内を通過するために重要な要因となる精子直進速度においても、従来法では、融解直後から 3 時間後までは活発に動いていたが、その後急激に運動パラメーターが低下したのに対し、新規ストロー法では融解 7 時間以降でも高い値を示し、融解直後の運動パラメーターが持続していた。これは、精子の頭部振幅および振動数が低下していないことから活発な状態が継続していることがうかがえる。この融解後の運動能の持続は、融解液との混合によるグリセリン毒性の回避のためと考えら

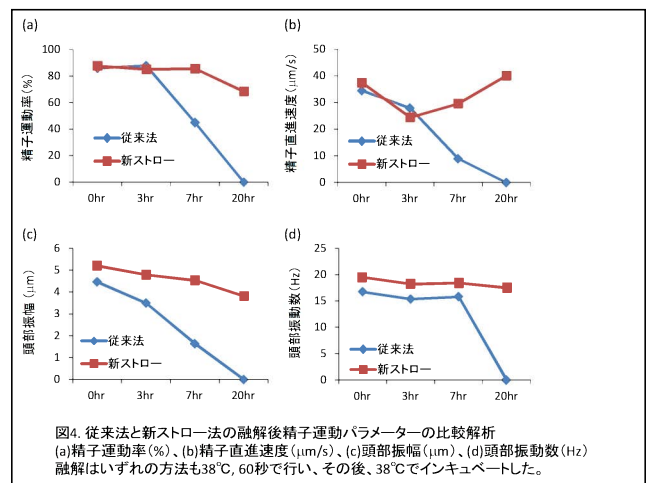


図 4. 従来法と新ストロー法の融解後精子運動パラメーターの比較解析
(a) 精子運動率 (%), (b) 精子直進速度 (μm/s), (c) 頭部振幅 (μm), (d) 頭部振動数 (Hz)
融解はいずれの方法も 38°C, 60 秒で行い、その後、38°C でインキュベートした。

れる。併せて、本試験で使用した融解液は豚精液希釈剤で用いられるモデナ液をベースとして NAC を添加したものであり、従来法には高濃度で含有されていないグルコースなどの糖類、抗酸化剤といった有効な成分、さらには EDTA-2NA などの受精能獲得抑制剤などの要因が正の作用を発揮させたと考えられる。

まとめ

これまでの牛の凍結精液の譲渡は、個体の精子の季節的変動を考慮せず行われていた。今回の結果から冬季に作製された凍結精液を中心とした譲渡が精子側からの受胎率向上に寄与すると考えられる。また、公的機関や民間企業では優れた雄個体の凍結精液のストックを多量に行っている。このことからストックしていた精液の廃棄も必要となるが、その際、夏季の精液を廃棄するという、新たな基準にもなりうるのではないかと考えられる。

新規ストロー法の利用については、さらなる融解液の改良が必須であり、それを用いた人工授精試験もまた実用化には必要である。これらの技術の進展が可能となれば、現在利用が増加している雌雄判別精子にも応用可能で、肉用牛のみならず乳用牛の人工授精の発展が期待される。

引用文献

- 1) 岡崎 哲司・知念 司・當眞 嗣平・秋好 禎一・佐藤 邦雄・生駒 エレナ・川部 太一.
2013. ブタ凍結精液における融解液への N-acetyl L-cysteine 添加は融解後の精子運動性の経時的低下を改善する. 日豚会誌, 50:157-163.