

20. ウシ凍結精液による人工授精技術の修正と高度化

農林水産研究指導センター畜産研究部・畜産技術室⁽¹⁾

○後藤雅昭・佐藤邦雄・岡崎哲司⁽¹⁾

1 背景

近年のウシにおける受胎率低下には発情発見や人工授精技術などの人的要因、子宮や卵巣の状況などの雌牛の繁殖機能、月齢や発情周期にあわせた給餌方法および暑熱の影響などの飼養環境、低受胎に関連する遺伝的要因など、さまざまな要因が関わっていると考えられている。凍結精液を用いた人工授精が前提となる牛の繁殖においては、①凍結精液の品質の改善、②精子機能性の保持、③それら精子を用いた適切な人工授精法ができれば、受胎率を全体的に向上させる可能性がある。

しかし、ウシの凍結精液技術は 1965 年頃に確立し、現在ほぼ 100 %普及していることから大幅にその技術の修正を図ることは困難である。一方で、ブタ凍結精液技術については、2008 年以降当研究部と広島大学との共同研究により精液の前処理方法や、精子の機能性保持に着目した希釈液や融解液の開発をポイントとして技術開発を行い、2011 年度から県内で普及を開始している。

当研究部で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。今回、その知見をウシ凍結精液に応用することで、融解後も高い精子運動能力を有した凍結精液技術の開発を試みたので、その概要を報告する。

2 試験方法

(1) 季節変動が凍結融解後の精子の運動能力に及ぼす影響の検討

家畜において、季節変動は男性ホルモンであるテストステロンの濃度を変動させ、精子成熟や活力に影響を与えることが知られている。そこで、県の基幹種雄牛である寿恵福、藤平茂および隆茂 38 の 3 頭の凍結精液を供試し、採取した時期によって季節変動の影響を受けるかどうか検証した。解析項目および手法は、精子運動パラメーターは 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。なお、環境要因が作用しないようにそれぞれ牛の月齢を固定して解析を行った。

(2) 融解液を封入した新規ストロー法の効果検証

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 0.5ml の精液のみを子宮内に注入するのに対し、豚では 5ml の精液と融解液 80ml の混合液を子宮内に注入する。融解液を使用するメリットは 2 点考えられ、1 点目は融解液に凍結融解後精子が正常に運動するための有効因子として抗酸化剤や、受精能獲得抑制剤、エネルギー源となるグルコースなど糖類を包含することができること、2 点目は凍結時に用いるグリセリンの毒

性を融解時の希釈により緩和することである（表 1）。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について、融解後の精子の機能性を比較検討した（図 1）。なお、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⁾

表 1 融解液の混合によるメリット

豚で開発された融解液の混合によるメリット

- 融解後精子が正常に運動するための**有効因子を包含**することができる
 抗酸化剤 : N-acetyl L cysteine
 受精能獲得抑制剤 : EDTA-2NA
 エネルギー源 : グルコースなどの糖類
- 凍結時に用いる**グリセリンの毒性を融解時に緩和**する
 (グリセリン濃度 豚:2% 牛 : 7%)

精液をストローの中心に位置し、融解液を挟み込む新規ストロー法と従来法

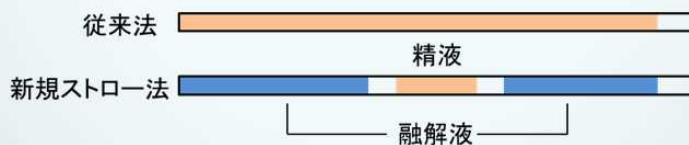


図 1 従来法と新規ストロー法

3 結果および考察

(1) 季節変動が凍結融解後の精子の運動能力に及ぼす影響の検討

融解 3 時間後において、冬季および秋季に採精・凍結保存された凍結精子(以下、秋季精子、冬季精子)が高い精子運動率、精子直進速度を示した（図 2）。特に精子運動率では、夏季 78.9 ± 2.3 %に対し、冬季 94.7 ± 0.8 %、秋季 90.5 ± 1.1 %と有意に高い値を示した。

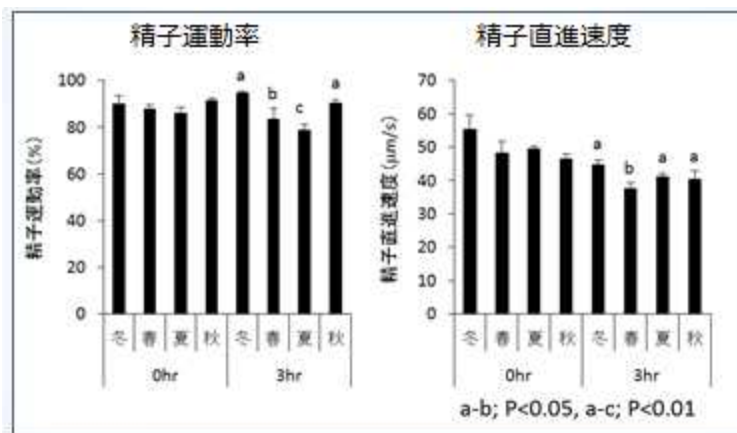


図 2 季節変動が精子運動パラメーターに及ぼす影響

また、精子細胞膜および先体膜正常率については、蛍光顕微鏡下でカウントした（図3、4）その結果、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、秋季精子および冬季精子において正常に細胞膜を保持している割合が高かった（図5）。これらの結果から秋季精子および冬季精子が最も受精能力を保持していると推察された。

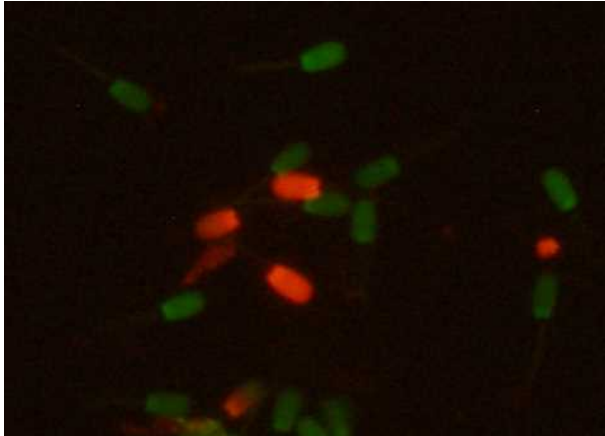


図3 PI-SYBR14 染色結果

緑は生存精子を、赤は死亡した精子を示す

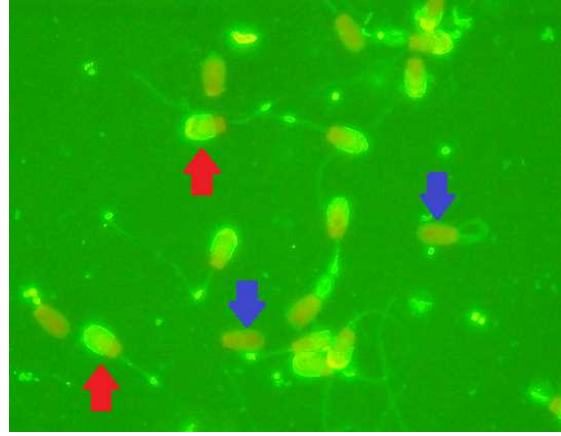


図4 FITC-PNA 染色結果

赤い矢印は正常、青矢印は異常と判断

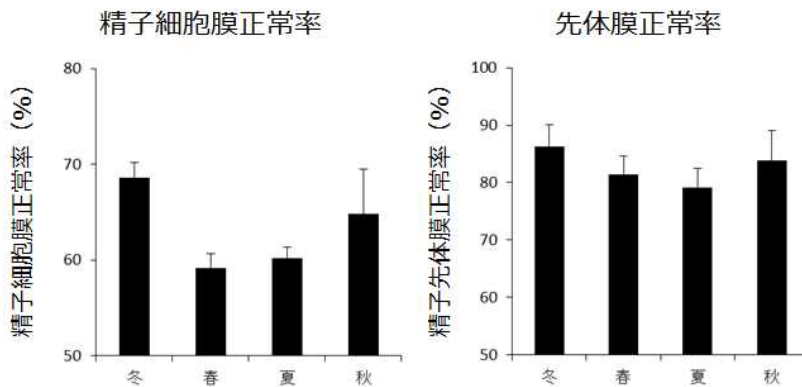


図5 季節変動が精子細胞膜におよぼす影響

(2) 融解液を封入した新規ストロー法の効果検証

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（図6）。また、精子直進速度においても、従来法では、3時間後以降急激に低下したのに対し、新規ストロー法では7時間後以降でも高い値を示し、融解直後の各運動パラメーターが持続していた。これは、前述したように融解液との混合によるグリセリン毒性の回避、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、抗酸化剤や、受精能獲得抑制剤などの要因が正の作用を發揮させたと考えられた。

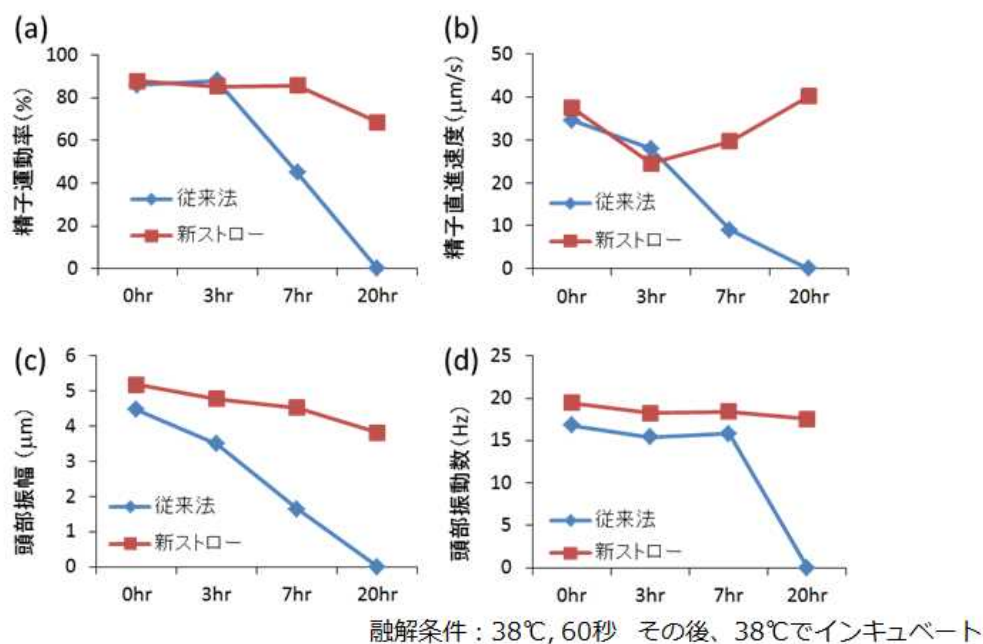


図6 従来法と新規ストロー法の凍結融解後精子運動パラメーターの推移

4 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るが、今回の結果から冬季および秋季にはより品質が高く、高い精子機能性を保持した凍結精液が作製できる可能性が示唆された。

また、牛精子においても凍結融解後の融解液の混合は有効であると考えられ、融解液をストロー内に精液とともに封入することで融解後の精子運動パラメーターが高く、長期間持続することが明らかとなった。このことから、発情微弱や人工授精のタイミングのずれによる受胎率低下を改善できる可能性が示唆された。当研究部の種雄牛チームでは乳牛の受胎率低下という課題に対し「液状精液を活用した牛の受胎率向上技術の開発」という試験研究課題をたちあげ、今年度から取り組んでいる。今回得られた融解液の有効性という知見は、液状精液でも活かされていくものと考えられ、人工授精技術の発展が期待される。

引用文献

- 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. 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. 2013. 50:157-163.