

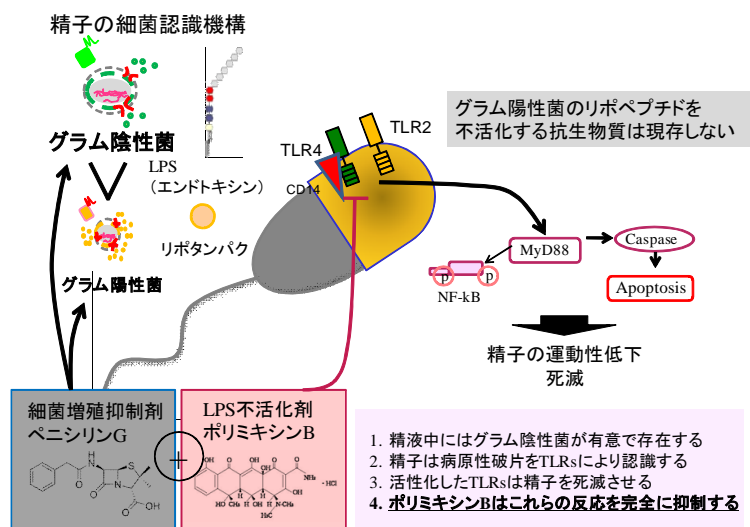
23. ブタ凍結精液を用いた人工授精技術の確立

大分県農林水産研究指導センター畜産研究部豚・鶏チーム
○岡崎哲司・秋好禎一・菅正和(病鑑)・吉田周司・丸山信明・
阿部正八郎・手島久智

養豚業の種付け業務において、液状精液による人工授精が定着しつつあるが、急な発情に対応できないこと、保管期間が7日間程度と短いことなどの理由から、その普及率は40%で停滞している。凍結精液による人工授精法は、これらの欠点を全て解消し、年間を通じて安定的な繁殖成績が得られると期待されるが、ブタにおけるその受胎率および一腹産子数は現在においても未だ低く、全く実用化されていないのが現状である。そこで、本研究では、「凍結方法」および「融解方法」をそれぞれ最適化し、高い繁殖成績を示す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。

精子は凍結時に細胞膜損傷の原因となる細胞内氷晶形成を抑制するため耐凍剤であるGlycerolを添加する。一方、Glycerolは細胞毒性を示し、ブタは他動物種と比較してGlycerolに対する感受性が高い。したがって、Glycerolの機能を補助する凍結希釈液の開発が求められる。そこで、凍結希釈液の浸透圧を400mOsm/kgの高張条件にし、細胞内氷晶形成を抑制することでGlycerol濃度を3%から2%へと低減した新規凍結希釈液を開発した。これにより、融解後の高い運動性が維持され、人工授精による受胎率も80%へと改善された。

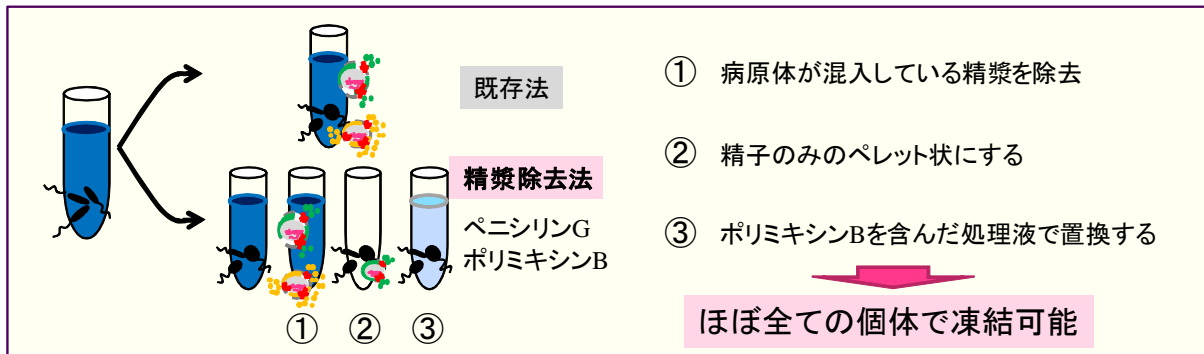
しかしながら、この開発保存液を用いても凍結できない個体が半数程度存在した。したがって、ブタの凍結精液による人工授精技術を普及させるためには、個体間の耐凍能の差異を解決しなければならない。そこで、我々は耐凍能を左右する負の因子として、精液の細菌に焦点をあてた。精液にはグラム陰性菌が優勢で多く検出され、その内毒素であるLipopolissacharide (LPS)も細菌数依存的に精液から検出されたことから、LPSなどの内毒素が精子に悪影響を及ぼしていると推察した。マクロファージなどの免疫担当細胞において、LPS受容体およびco-receptorとして知られるToll-like receptor4 (TLR4)・CD14が精子に発現していること、LPSはその濃度依存的に精子運動率・生存率を低下させ、Caspase-3に依存したアポトーシスを誘起したことから精子はTLR4を介して細菌を認識し、アポトーシスを誘起し、その結果、運動性が低下するという精子の初期免疫応答が初めて明らかとなった。したがって、凍結処理過程で



LPS を中和することが重要であるため、LPS 不活化剤 Polymyxin B (PMB) の影響について検討した。100 μ g/ml 濃度の PMB 添加は、精漿中 LPS 活性を完全に不活化し、Penicillin G との複合処理により融解後の精子機能性を有意に向上させた。さらに、人工授精においても高い受胎率・一腹産子数が得られた。

精液にはグラム陽性菌も検出されるが、これら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とから、採精後、直ちに精漿を除去して凍結する方法が耐凍能の低い個体の精子を凍結可能とする最適な手法であると考えられる。実際、この手法は耐凍能の低い個体の融解後の精子機能性を耐凍能の高い個体と同水準にまで向上させた。

新規精液凍結処理法の開発

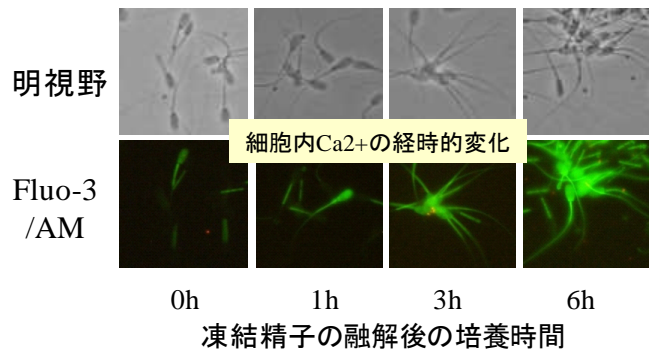


しかし、これらの精子では融解直後から自発的な受精能獲得や先体反応が促進されていた。精漿は受精能獲得を抑制するという報告があることから、融解液へ精漿を添加する実験を試みたところ、融解液への 10% (v/v) 添加はそれらを抑制する充分量であることが明らかとなった。以上の結果から、採精後、直ちに精漿を除去して凍結し、10% (v/v) 精漿含有融解液にて精子を融解する「2 ステップ凍結融解処理法」を開発し、これを用いた人工授精で受胎率 81%、一腹産子数 10.4 頭という高い繁殖成績を得ることに成功した。

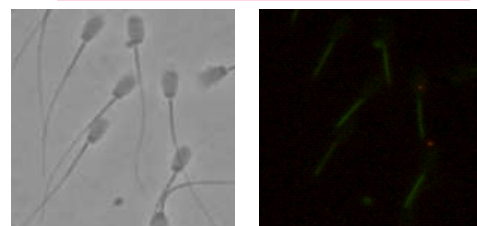
精漿には様々なウイルスが検出されるため、融解液へ精漿を添加し、人工授精する 2 ステップ凍結融解処理法は、これらのウイルス疾病を蔓延させる恐れがある。したがって、全ての農家で使用可能な技術とするためには、精漿添加融解液と同等の機能を有した完全合成融解液の開発が必要である。融解液への EGTA 添加は、融解後の精子細胞内 Ca^{2+} 上昇を抑制し、それによる自発的な受精能獲得を抑制し、体外における受精能を高めた。しかし、EGTA 合成融解液による人工授精では、卵管内受精率は 82% と高いにもかかわらず、

☆精子の運動性を持続させる(精漿の役割①)

融解後精子運動性低下原因は精子内への Ca^{2+} 流入



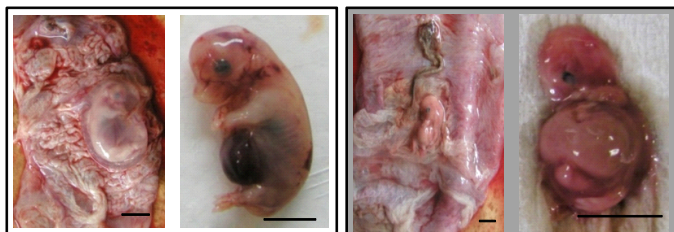
Ca^{2+} キレート剤 (吸着剤)
EGTA



☆胚の着床を促進させる(精漿の役割②)

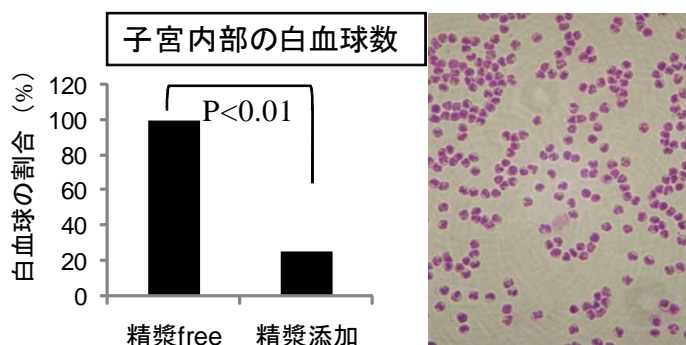
精漿含有融解液

EGTA融解液



正常な着床胎子

死滅胎子



精漿成分は、子宮内の白血球数を減少させ、異物である(非自己である)胎子を母体が許容できるようにしている

精漿中の免疫抑制因子Cortisolの同定



胎子の着床率は 51%と精漿添加融解液による人工授精のそれと比較して有意に低く、さらに、着床胎子においても、白血球による侵襲を受けていた。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

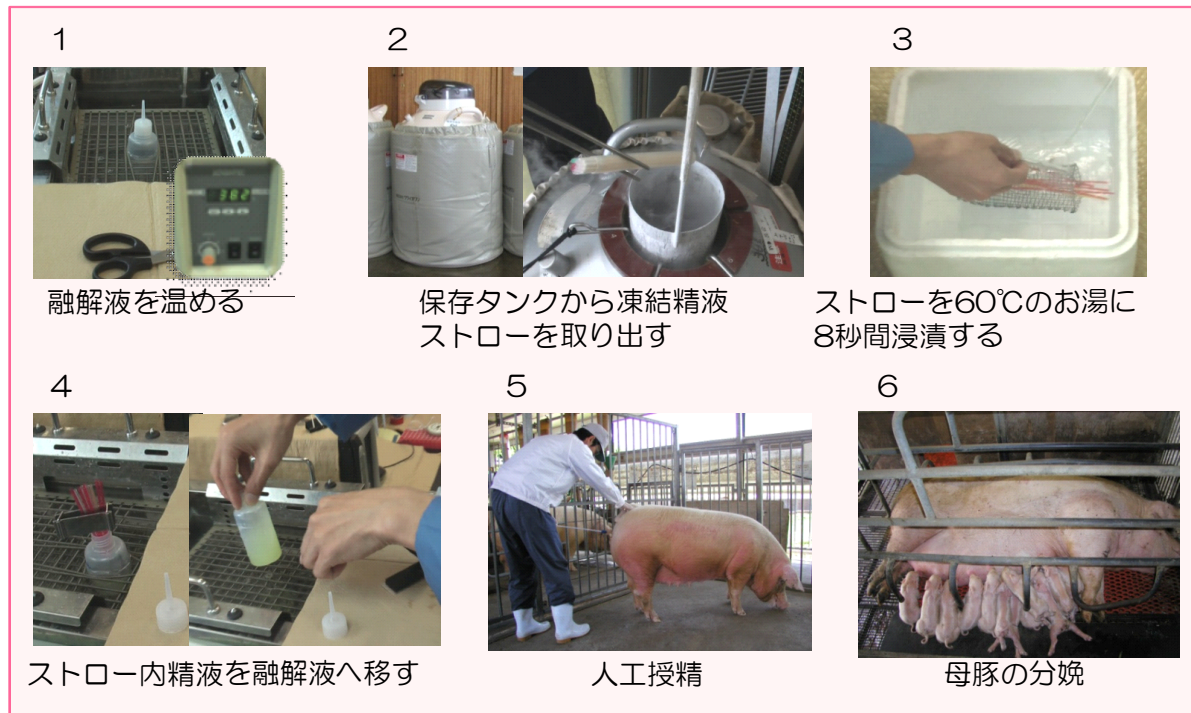
る胚の貪食を防ぐと仮説を立てた。候補因子として Cortisol が同定され、その子宮内への注入により着床率は 83%へと向上し、繁殖成績も受胎率が 91%、一腹産子数 9 頭と、精漿含有融解液を使用せずとも実用化レベルに達した。Cortisol はステロイドホルモンの一種でその副作用が懸念されるかもしれないが、分娩後の子豚の正常性には問題は見られず、その後の発育にも異常はなかった。

本研究により

1. 採精後、直ちに精漿を除去する
2. 100 μ g/ml 濃度の PMB を添加した前処理液にて精子を希釈する
3. 浸透圧 400mOsm/kg の高張条件にし、最終 Glycerol 濃度を 2%にした凍結希釈液にて精子を凍結する
4. 融解液へ 10% (v/v) 精漿あるいは、6mM EGTA+5 μ g Cortisol を含有した融解液にて精子を融解し、人工授精する

という精子と精漿の機能を考慮した新規ブタ凍結精液による人工授精法の開発に初めて成功した。

生産現場での利用方法



本技術の開発により、国内の優秀な雄ブタの遺伝資源保存が活発になり、持続可能な畜産業が実現可能になる。また、凍結精液による人工授精は液状精液を用いたそれと比較して衛生的であり、近年、各農場で蔓延しているウイルス防止対策の一手法となり得る。さらには、効率的な肉豚生産にも利用できるため、畜産物の安心安全の根底を支える技術となるであろう。

参考文献

- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WM. Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci.* 62:143-172. 2000.
- Okazaki, T, Abe S, Shimada M. Improved conception rates in sows inseminated with cryopreserved boar spermatozoa prepared with a more optimal combination of osmolality and glycerol in the freezing extender. *Animal Science Journal*, 80: 121-129, 2009.
- Okazaki T, Fujita Y, Mihara T, Shitanaka M, Negishi H, Richards JS, Shimada M. Expression of the Toll-like receptor system that recognize bacterial infection, controls fertilization ability in mammalian spermatozoa. *Reprod Immunol Biol.* 24:174 (abstract 13). 2009.
- Okazaki, T, Mihara T, Fujita Y, Yoshida S, Teshima H, Shimada M. Polymyxin B neutralizes bacteria-released endotoxin and improves the quality of boar sperm during liquid storage and cryopreservation. *Theriogenology.* 74: 1691-1700. 2010.
- 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.* 71:

491-498. 2009

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*. in press. 2011.

岡崎 哲司, 島田 昌之. 精子保護剤と着床促進剤を用いたブタ凍結精子の人工授精法の開発. 畜産技術、655 : 8-11. 2009.