

豚凍結精液の実用化に関する試験
豚凍結精液による人工授精技術の確立

Establishment of Artificial Insemination Technology with Boar Freezing Semen

岡崎哲司・廣瀬啓二・丸山信明・津田剛

要 旨

本試験では、現場で実用的な豚凍結精液による人工授精技術を開発することを目的とし、実験 1 において基礎となる希釈液を決定しするため、NSF 及び BF-5 の比較検討を行い、実験 2 において、希釈液の浸透圧及び Glycerol 濃度が豚凍結精子に及ぼす影響を検討した。また、実験 3 では、豚において精巢上体精子は射出精子と比較して耐凍能が高く受精能が高いという報告から、採精後 10 分以内に精漿を除去し、凍結することを試みた。

実験 1 NSF は BF-5 と比較して、精子膜及び先体の正常率には有意な差が認められなかったが、融解後精子運動率と精子生存指数は培養 2 時間以降有意に高い値を示したことから基礎希釈液を NSF に決定した。

実験 2 融解後精子運動率及び精子膜・先体正常率において、希釈液の浸透圧とグリセロール濃度の最適な組み合わせを検討した結果、高浸透圧・低グリセロール条件（浸透圧 400mOsm/kg, 最終 Glycerol 濃度 2.0%）が他の処理区と比較して優れていることが明らかとなった。また、この新規希釈液は IVF において高い受精率を示し、さらに、受胎試験においても受胎率 80%、着床率 68.1%と高い値を示した。

実験 3 除去区は精漿区と比較して運動性・精子膜及び先体正常性が向上し、精子凍結に有効な手法であることが示された。

キーワード（豚、凍結精液、人工授精）

背景及び目的

種々の希釈液が豚凍結精液の製造に用いられているが、液状精液と比較して、受胎率および産子数は低いのが現状である¹⁾²⁾³⁾。凍結融解精子は、細胞膜の機能性の低下、先体およびミトコンドリア膜の損傷などにより、運動性が低いため受精能が充分でないと考えられている⁴⁾。凍結障害の緩和には Glycerol が有効であるが、他の動物種で用いられる添加濃度では豚精子は、これら耐凍剤による毒性を受け⁵⁾⁶⁾、受精能は低下するため、低濃度 Glycerol 条件で高い凍結障害緩衝能を有する凍結希釈液の開発が必要である。近年、不透過性の高浸透圧希釈液を用いることにより、凍結融解精子の運動性および細胞膜機能が向上することが報告された⁷⁾ことから、本試験では、実験 1 において、2種類の希釈液を用いて凍結能を比

較し、実験 2 で高浸透圧条件下における最適な Glycerol 濃度の検討を行った。

さらに、近年凍結精巢上体精子は凍結射出精液より融解後の運動性、先体の正常性、卵子侵入率が高い⁸⁾こと、また、ミニブタにおいて凍結前に精漿を除去すると融解後の運動率、先体反応、卵子侵入率は有意に向上する⁹⁾ことが報告されたことから、本試験では、さらなる凍結法の改良のため、産業豚において、採精後 10 分以内に精漿を除去し凍結することを試みたので報告する。

試験方法

実験 1 希釈液の比較検討

供試豚はランドレース種 3 頭(以下豚 A、B、C)とし、それぞれ隔週で採精を行った。希釈液は豚凍

結精液利用技術マニュアル³⁾を基にしたmNSF- (第1希釈液)、mNSF- (第2希釈液)及びBF-5 (Beltsville F5)を精子運動率、精子膜正常率及び精子先体正常率において比較検討した。また、精子運動性は、精子運動指数として表した。

実験2 希釈液の浸透圧及び Glycerol 濃度が豚凍結精子に及ぼす影響

供試豚はランドレース種 3 頭(以下豚 A、B、C)とし、それぞれ隔週で採精を行った。mNSF- は 300、400、500mOsm/kg となるようにイオン交換水で調整し、mNSF- は最終 Glycerol 濃度を 0.5、1.0、2.0、3.0%に調整し、計 12 処理区設定した。調査項目は融解後精子運動率、精子膜及び先体正常率、体外受精(IVF)における精子侵入卵率、受胎試験における受胎率及び着床率(胎子数/黄体数)とした。

実験3 採精直後の精漿除去が凍結精子に及ぼす影響

供試豚はランドレース種 3 頭(以下豚 A、B、C)とし、それぞれ隔週で採精を行った。採精後 10 分以内に精漿を遠心分離し除去区とした。調査項目は運動率・膜機能性とした。

実験 1、2、3 共に凍結プログラムは豚凍結精液利用技術マニュアル(丹羽ら)に従った。融解液には modena 液を使用し、融解後の精子運動率は 37 で 0.5、3、6 時間培養し、光学顕微鏡下(×100)あるいは、CASA system(Hamilton Thorn Research)で測定した。精子先体の正常率は FITC 標識 agglutinin と Propidium Iodide(PI)、精子膜正常率は SYBR14 と PI の二重蛍光染色により判定した。また、IVFは食肉屠場の未経産豚由来卵子卵丘細胞複合体(COCs)をLH,FSH,10%FCS添加NCSU37培地で48時間培養後、精子密度 1×10^6 cells/mlでIVFを6時間行った。その後、卵子を発生培地に移し12時間培養後、ホールマウントにより精子侵入卵を観察した。

生体の受胎試験は、雌豚にPMSG-hCG処理後40時間で 1×10^8 cells/mlの精子濃度を50ml、1回人工授精した。受胎は超音波診断により人工授精後21日後に行い、受胎35日齢で、出荷・屠殺後、卵巣・子宮複合体を回収し、胎子数及び黄体数をカウントした。

統計学的分析は、一元配置分散分析で検定後

Duncan's test あるいは Student-t 検定を行った。また、浸透圧 300mOsm/kg、Glycerol 3.0%区と浸透圧 400mOsm/kg、Glycerol 2.0%区を比較した試験は二元配置分散分析で行った。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 希釈液の比較検討

融解後精子運動率は、mNSF 区が培養 2 時間以降において BF5 区と比較して有意に高かった(図1)。また、精子活力を表す精子生存指数においてもmNSF 区はすべての培養時間で有意に高い値を示した(図2)。精子先体及び精子膜正常率には有意な差はなかった(表1、2)。以上のことから、基礎希釈液は mNSF が適していると考えられ、以後の凍結希釈液にはmNSFを使用した。

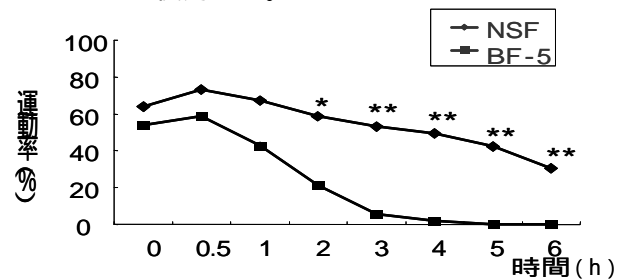


図1 各希釈液の融解後精子運動率(%)

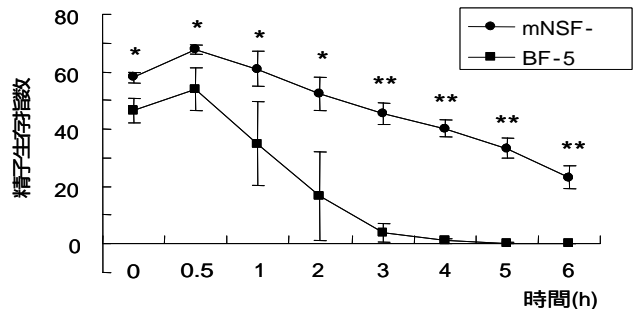


図2 各希釈液の融解後精子生存指数

* P<0.05、** P<0.01

表1 各希釈液の融解後精子先体正常率(%)

	NSF	BF5
豚A	71.9	64.4
豚B	75.4	77.1
豚C	75.3	74.4

表2 各希釈液の融解後精子膜正常率(%)

	NSF	BF5
豚A	33.9	31.4
豚B	33.8	36.2
豚C	30.9	33.3

実験2 希釈液の浸透圧及び Glycerol 濃度が豚凍結精子に及ぼす影響

豚Aの凍結融解後の精子運動率は、浸透圧 300 および 400mOsm/kg 条件下では Glycerol 2.0、3.0% が高い値を示し、浸透圧 500mOsm/kg 条件下においては、Glycerol 2.0%のみが高い値であった（図3）。それぞれの浸透圧において、Glycerol2.0%条件下では、培養 3 時間までにおいては、浸透圧 300mOsm/kg 区に比較して、浸透圧 400 および 500mOsm/kg 区の精子運動性は有意に高い値を示した（図4）。

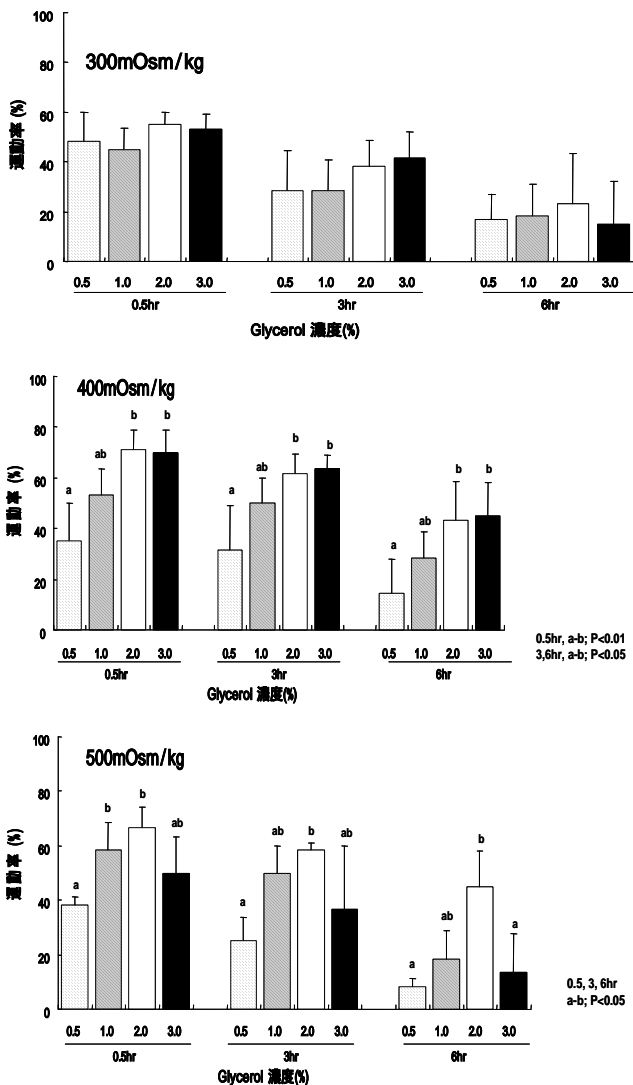


図3 各浸透圧(300, 400, 500mOsm/kg)における Glycerol 濃度の影響

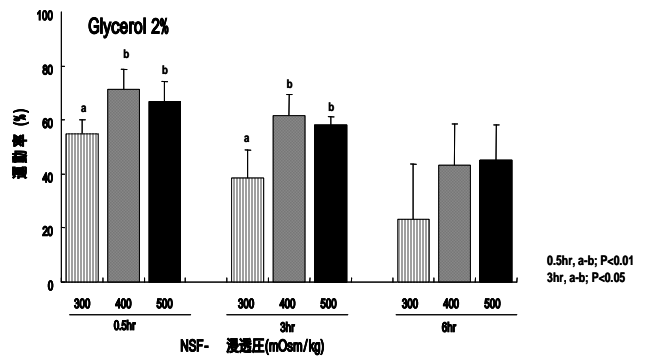


図4 Glycerol 2%条件下における各浸透圧が運動率に及ぼす影響

一方、精子膜正常率においては、Glycerol 2.0%、浸透圧 400mOsm/kg で他の処理区に比較して有意に高い値を示した（図5）。先体の正常率は、いずれの処理区においても 60%以上であり、処理区間に有意な差は認められなかった（図6）。

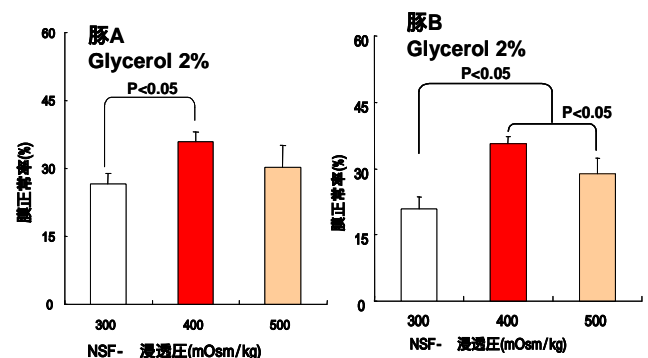


図5 各浸透圧における精子膜正常率

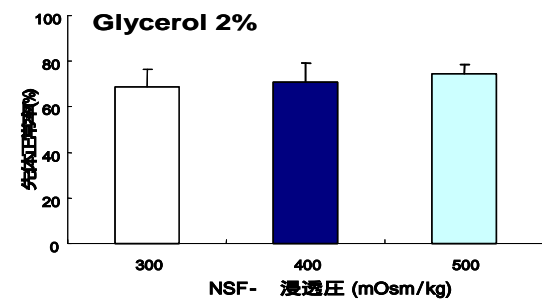


図6 各浸透圧における先体正常率

豚 B、C においても、Glycerol 2.0%、浸透圧 400mOsm/kg 条件で、精子運動率、精子膜正常率が高い値を示した。

また、浸透圧 400mOsm/kg、Glycerol2%条件を一般的に使用されている浸透圧 300mOsm/kg、Glycerol 3%条件と比較すると、豚 A、B、C いずれにおいても精子膜正常率は有意に高い値を示し（図7）、すべての培養時間で高い運動性を示した（図8）。

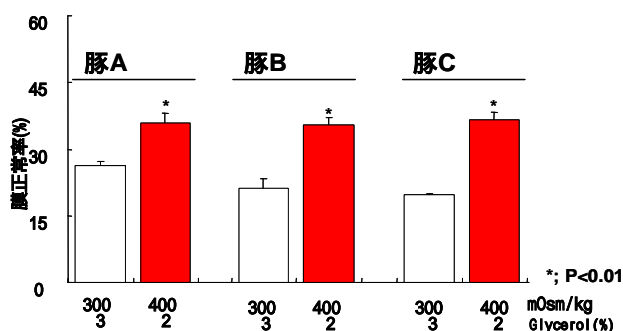


図7 精子膜正常率の比較

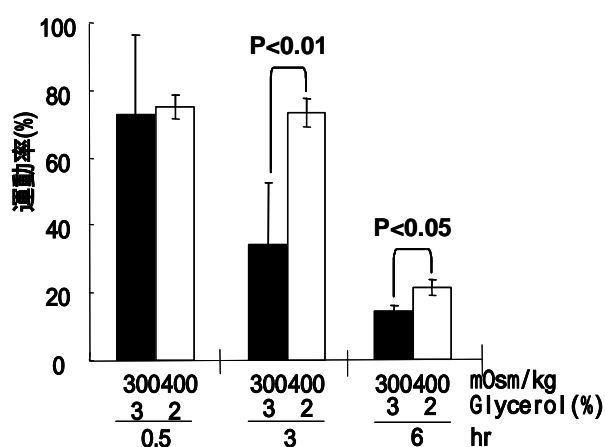


図8 運動率の比較

また、IVF における精子侵入卵率は Glycerol 2.0%、浸透圧 400mOsm/kg 処理区で高い傾向を示したが、有意な差は認められなかった(図 9)。

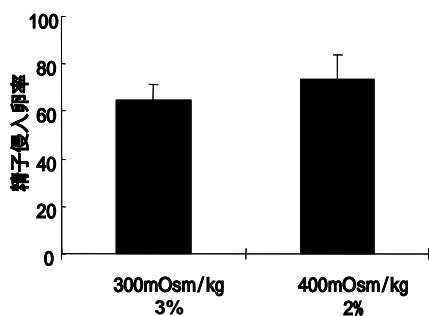


図9 IVF における精子侵入卵率 (%)

しかし、生体における受胎試験では Glycerol 2.0%、浸透圧 400mOsm/kg 処理区は液状精液と差はなく、受胎率 80%と高い値を示した。(表 3)

処理区	n	受胎率(%)	黄体数(範囲)	胎児数(範囲)	着床率(%)
fresh AI	3	100(3/3)	13.7(12-15)	10.7(10-11)	78.4
300mOsm/kg-3.0% AI	5	20(1/5)	13	7	53.8
400mOsm/kg-2.0% AI	5	80(4/5)	17.5 (14-22)	11.8(9-13)	68.1

表3 受胎試験における結果

以上の結果から、希釈液を高浸透圧条件にすることにより細胞内の脱水を誘起し、細胞内氷晶形成を抑制することで、精子膜及び先体正常率が向上し、その結果、運動性が向上したと考えられる。

したがって、浸透圧 400mOsm/kg の高張条件とし、最終 Glycerol 濃度を 2.0%へと減少させた希釈液は豚凍結精液の製造に有効であることが示唆された。

実験3 採精直後の精漿除去が凍結精子に及ぼす影響

除去区は融解後運動率や精子膜において対照区の精漿区と比較して高い値を示した(図 10、11)。一方先体膜正常率は両区に差は認められなかった(図 12)。

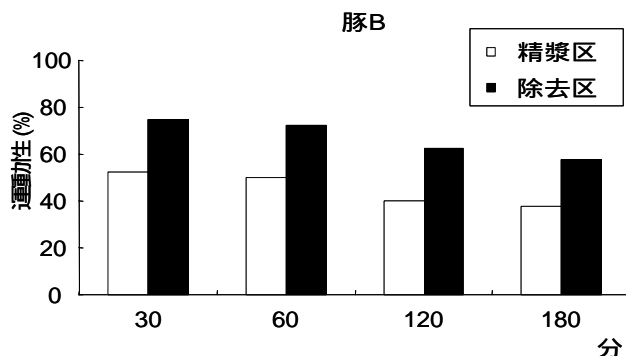


図10 融解後精子運動率の比較

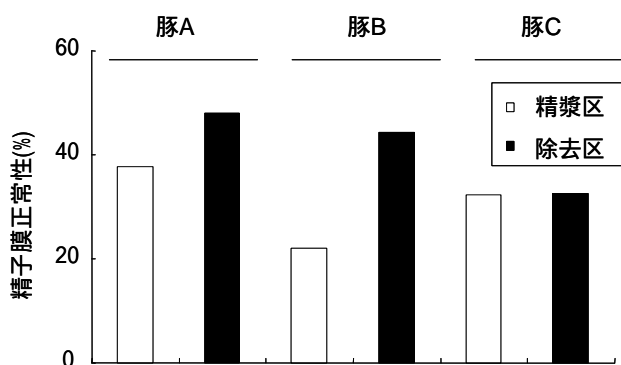


図 11 精子膜正常率の比較

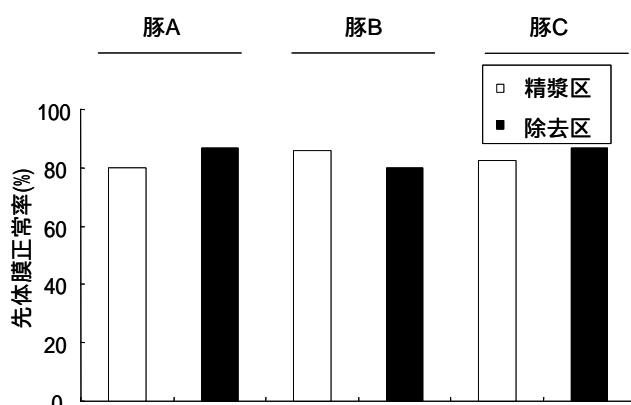


図 12 精子先体正常率の比較

これらの結果より、採精直後に精漿を除去することは豚凍結法において有効であることが示された。

以上 3 つの実験により、基礎希釈液を NSF とし、これを浸透圧 400mOsm/kg,の高張条件とし Glycerol 濃度を 2%へと減少させた新規希釈液で凍結した精子は高い受精率を有していることが明らかとなった。さらに、採精直後に精漿を除去し、この希釈液を用いることはさらなる受胎率向上に寄与できると期待される。

引用文献

- 1) Johnson LA, Aalbers JG, Willems CMT, Sybesma W. J Anim Sci. , 1981.52: 1130-1136.
- 2) Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC., 2000.Anim Reprod Sci. 62: 143-72
- 3) 豚凍結精液利用技術マニュアル 丹羽ら
- 4) Watson PF., 2000.Anim Reprod Sci. 60-61: 481-492
- 5) Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Zaneveld LJ. 1985.Cryobiology. 22(5); 434-7.

6) McLaughlin EA, Ford WC, Hull MG. 1992.J Reprod Fertil. 95(3); 749-54.

7) Zeng WX, Simada M, Isobe N, Terada T., 2001.Therio. 56: 447-458.

8) K.Kikuci. et. al. 1998. therio.50:615-623

9) N. Kawano. et. al. 2004. therio.61:351-364