

琉球在来豚（アグー）の効率的繁殖技術の確立

(1) ブタ凍結精液作製時の室温放置に用いる精子処理液と放置時間の検討

仲村敏　大城まどか　稲嶺修　鈴木直人
吉元哲兵*　建本秀樹*　渡慶次功*　玉代勢秀正

I 要 約

琉球在来豚アグー（アグー）精子に適した凍結保存技術を確立するため、アグーおよびランドレースの射出精液を供試して、以下の2つの試験を行った。

試験1は凍結処理前の室温放置時に用いる精子処理液の違いが、凍結・融解後の精子性状に及ぼす影響について検討した。精子処理液は、精漿液(SP)、モデナ液(Modena)、Beltsville thawing solution (BTS)、D-Glucose-PBS(D-PBS)およびCa-and Mg-free Tyrode solution(mTyrode)の5種類の溶液で比較した。

試験2は凍結処理前の室温放置時間の違いが、凍結・融解後の精子性状へ及ぼす影響について検討した。室温放置時間は、室温放置なし(0時間)、1および2時間の3区分で比較した。各試験の結果は以下のとおりであった。

1. アグー精子はBTSを用いて室温放置した場合に、運動精子率(Motile)、前進運動精子率(Progressive)、精子細胞膜正常率およびアクロシン活性が他の精子処理液に比べ高い値であった。
2. ランドレース精子はModena使用して室温放置した場合に、Motile、融解後60分のProgressiveが他の精子処理液に比べ有意($P < 0.05$)に高かった。しかし、精子細胞膜正常率、アクロシン活性は精子処理液間にほとんど差はなく、各精子性状検査で一致した成績は得られなかった。
3. アグー精子は室温放置0時間区が、1および2時間区よりMotileおよびProgressiveが高く維持される傾向を示し、精子細胞膜正常率、アクロシン活性および体外受精における精子侵入率も有意($P > 0.05$)に高い値を示した。また、室温放置時間が短いほど精子性状性が高く維持される傾向にあった。
4. ランドレース精子は室温放置0時間区が、1および2時間区よりMotileおよびProgressiveが高く維持される傾向を示した。しかし、精子細胞膜正常率、アクロシン活性および体外受精における精子侵入率は、各室温放置時間区間に差は認められなかった。

以上のことから、ランドレースでは精子処理液や室温放置時間について、一致した評価が得られなかった。しかし、アグー精子の場合は、採精後素早く精漿を除去し、BTSを添加・洗浄した後、室温放置なしで希釈液を加え、冷却・凍結処理を行うことが有効な方法であると示唆された。

II 緒 言

現在、低迷する県内養豚業の活性化を図るため、アグーを活用した「おきなわブランド豚」生産システムの構築に取り組んでいる。しかし、アグーは閉鎖的群管理下で継続的に近親交配が行われてきた結果、近交に起因すると思われる繁殖能力の低下²⁾が認められている。また、アグーは一般的な西洋品種より精子性状が劣っており、活力が十分な液状精液や凍結精液が得られにくいことから、自然交配や射出新鮮精液を利用して人工授精を行っている³⁾。そのため、効率的な繁殖技術の確立がブランド化への課題となっており、種豚の広域的活用や増殖に有効な凍結精液を利用した人工授精技術を実用化することが必要と考えている。

そこで、本試験ではアグー精子に適した凍結保存技術の確立を目的に、ブタ凍結精液作製時の室温放置に用いる精子処理液と放置時間について検討を行った。

III 材料および方法

1. 試験設定

1) 試験1: 室温放置時に用いる精子処理液の検討

凍結処理前の精子処理液は SP, BTS, Modena, D-PBS および mTyrode の 5 種類とし、各精子処理液で 1 時間室温放置した場合における凍結・融解後の精子性状に及ぼす影響について検討した。なお、精子性状の評価は、精子運動性、精子細胞膜正常性および精子アクロシン活性を指標とした。

2) 試験2: 室温放置時間の検討

凍結処理前の室温放置時間は 0, 1 および 2 時間とし、放置時間の違いにおける凍結・融解後の精子性状に及ぼす影響について検討した。なお、精子性状の評価は、精子運動性、精子細胞膜正常性、精子アクロシン活性および体外受精能を指標とし、室温放置時の精子処理液は、試験1の結果によりアグー精子に最も有効な BTS を用いた。

2. 試験期間および場所

試験は 2004 年 4 月から 2005 年 2 月に沖縄県畜産試験場で実施した。

3. 供試精液

精液の採取は、手圧法⁴⁾により当場で飼養しているアグー 4 頭、ランドレース 2 頭の計 6 頭の種雄豚から行った。採取した精液は、牛乳濾紙による濾過処理で膠様物を除き試験に供試した。なお、アグーは濃厚部分画が不明瞭なため射出された全精液、ランドレースは濃厚部分画を分離採取した。

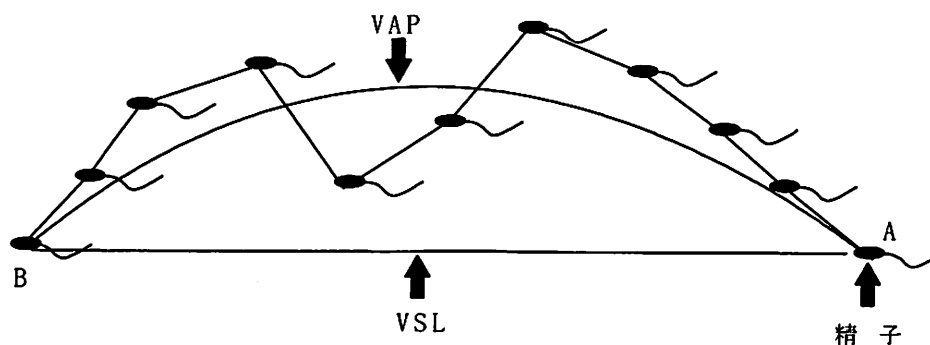
4. ブタ凍結精液の作製

供試精液を室温で $700 \times g$, 5 分間遠心分離し、上精を除去した後、精子処理液で 4.5 倍に希釈し、室温放置した。放置後、 $700 \times g$, 5 分間遠心分離・上清除去の操作を 2 回行い、一次希釈液 (Beltsville F5;BF5) で精子濃度が 10×10^8 sperm/ml になるように調製し、約 3 時間かけて徐々に 5°C まで冷却した。 5°C で約 1 時間静置後、2% 濃度でグリセリンを加えた同温の二次希釈液を等量加え、最終精子濃度が 5×10^8 sperm/ml になるように調製した。精液の凍結は、二次希釈液添加後、直ちに小穴を開けたドライアイス上で 0.1ml ずつ錠剤化凍結し、約 5 分後に液体窒素中に浸漬した。

5. 精子性状性検査

1) 精子運動性

錠剤化凍結精液の 1 錠 (0.1ml) を 38°C に加温した 2.5ml の精子融解液 (mTyrode) に浮遊させ、 38°C のアルミブロック恒温槽内に保持した。精子運動性は、精子運動性解析装置 (Ceros Sperm Analyzer, Hamilton-Thorne Research) を用いて測定した。なお、精子運動パラメーターは Motile および Progressive とした (図 1)。



- 1) 平均経路速度 (VAP, $\mu\text{m/s}$): 精子経路 AB を経過時間で除した値の平均値
- 2) 直線経路速度 (VSL, $\mu\text{m/s}$): 直線 AB を経過時間で除した値の平均値
- 3) 直線係数 (STR, %): VSL/VAP
- 4) 運動精子率 (Motile:%): $\text{VAP} > 7.4 \mu\text{m/s}$, $\text{VSL} > 6.6 \mu\text{m/s}$
- 5) 前進運動精子率 (Progressive:%): $\text{VAP} > 50.0 \mu\text{m/s}$, $\text{STR} > 80\%$

図1 精子運動パラメーターの模式図

2) 精子細胞膜正常性

錠剤化凍結精液を精子濃度が 2.0×10^6 sperm/ml になるように精子洗浄用溶液（PVA-PBS）に浮遊させた。精子浮遊液 $100 \mu\text{l}$ と CFDA/PI 染色液 $100 \mu\text{l}$ を混合し、遮光状態で 39°C 、 $15 \sim 30$ 分間染色後、 0.2% glutaraldehyde 溶液 $25 \mu\text{l}$ を加え固定し、 400 倍の蛍光顕微鏡下（励起波長 $350 \sim 460\text{nm}$ 、吸収波長 510nm ）で観察した。判別は、完全に緑色蛍光を示している精子を細胞膜正常、一部もしくは完全に赤色蛍光を示している精子を細胞膜障害とした。

3) 精子先体タンパク質分解酵素活性（精子アクロシン活性）

錠剤化凍結精液を 39°C の PVA-PBS に浮遊させ、 $600 \times g$ 、 4 分間の遠心分離・上澄除去の操作を 3 回行った後、同洗浄液で精子濃度 2.0×10^6 sperm/ml に調製した。精子浮遊液 $20 \mu\text{l}$ を固相化ゼラチンスライドに重層し、 37°C 、 2 時間湿潤条件で培養した後、 200 倍の位相差顕微鏡下で観察した。評価は精子先体タンパク質分解酵素の作用によりゼラチン被膜上に形成された光輪（halo）直径を精子アクロシン活性の指標とした。なお、halo の直径はマイクロメーターで計測した。

4) 精子体外受精能

精子体外受精能の評価は、体外受精による精子侵入率を指標とした。なお、ブタ未成熟卵子の回収、体外成熟培養、精子前培養、体外受精は、建本ら⁵⁾の方法に準拠して行った。また、全ての培養は、 39°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 、 $95\%\text{Air}$ 、湿度飽和条件下の CO_2 インキュベーター内で行った。

(1) 未成熟卵子の回収

と場由来の未成熟雌の卵巣を細切法により直径 $2 \sim 5\text{mm}$ の卵胞内の卵丘細胞卵子複合体（COCs）を回収した。

(2) 体外成熟培養

採取した COCs を卵子成熟用培養培地（M199）で 3 回洗浄後、培養用プラスチックシャーレ内の M199 ドロップに COCs を入れ 44 時間培養した。体外成熟培養後の COCs は 0.1% ヒアルロニダーゼ添加による酵素処理とボルテックス処理により卵丘細胞を除去し、体外成熟用培地（mTBM）ドロップに移した。

(3) 精子前培養体外受精

錠剤化凍結精液 1 錠を 39°C の 4ml の精子洗浄用溶液（PVA-PBS）に浮遊させ、 $600 \times g$ 、 4 分間の遠心分離・上澄除去の操作を 2 回行った後、mTBM に BSA および Caffein を添加した精子前培養培地 $50 \mu\text{l}$ で希釈した。この精子浮遊液を $50 \mu\text{l}$ の精子前培養培地ドロップ内に添加（精子濃度 5.0×10^6 sperm/ml）し、 90 分間前培養を行った。

(4) 体外受精

前培養終了精子に体外受精培地（PZM-3）を添加し、精子濃度 2.0×10^6 sperm/ml に調製し、成熟培養後の卵丘細胞除去卵子とともに PZM-3 ドロップ内で 7 時間媒精した。 7 時間媒精後の卵子はボルテックス処理し、卵透明帯付着精子を除去した後、再び 3 時間の媒精を行った。

(5) 精子侵入率の検査

媒精終了後の卵子をホルマウント標本にし、 400 倍の位相差顕微鏡下で核相を観察した。判別は、卵細胞質内に精子頭部もしくは雄性前核ならびに尾部の両方が確認できる卵を精子侵入卵とした。

6. 統計処理

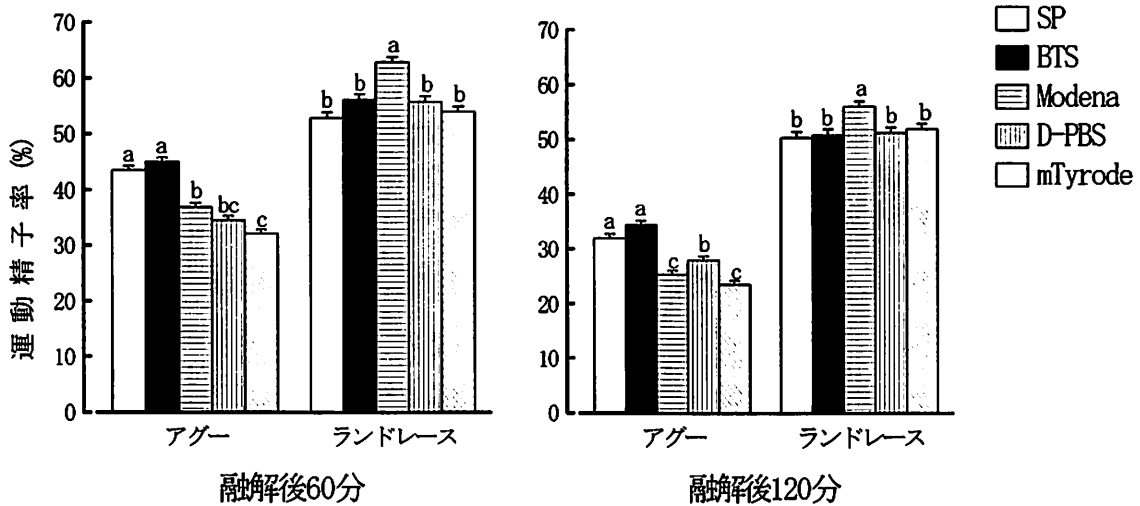
統計処理は統計処理ソフト R の Tukey-Kramer 法を用いて処理した。なお、平均値には標準誤差を付して表し、パーセントデータはアークサインの角度変換を行った後、統計処理に用いた。

IV 結 果

1. 試験 1：凍結処理前の室温放置時に用いる精子処理液の検討

1) 精子運動性

図 2 に各精子処理液における Motile を示した。融解後 60 分および 120 分のアグーの Motile は、SP、BTS が他の精子処理液に対して有意 ($P < 0.05$) に高い値を示した。また、BTS は SP より高い Motile を示す傾向にあった。いっぽう、ランドレースの Motile は、Modena が他の精子処理液に対して有意 ($P < 0.05$) に高い値を示した。また、すべての精子処理液でアグーはランドレースより低い Motile を示した。



図

2 各精子処理液における運動精子率の成績

注 1) 平均±標準誤差。

2) 同品種内の異符号間に有意差有り (P<0.05)

図 3 に各精子処理液における Progressive を示した。融解後 60 分のアグーの Progressive は SP, BTS が D-PBS, mTyrode より有意 (P<0.05) に高い値を示し, 融解後 120 分では BTS が他の精子処理液より高い Progressive を示した。いっぽう, 融解後 60 分のランドレースの Progressive は Modena が他の精子処理液に対してが有意 (P<0.05) に高い値を示し, 融解後 120 分では SP, BTS, Modena が D-PBS および mTyrode より有意 (P<0.05) に高い Progressive を示した。また, すべての精子処理液でアグーはランドレースより低い Progressive を示した。

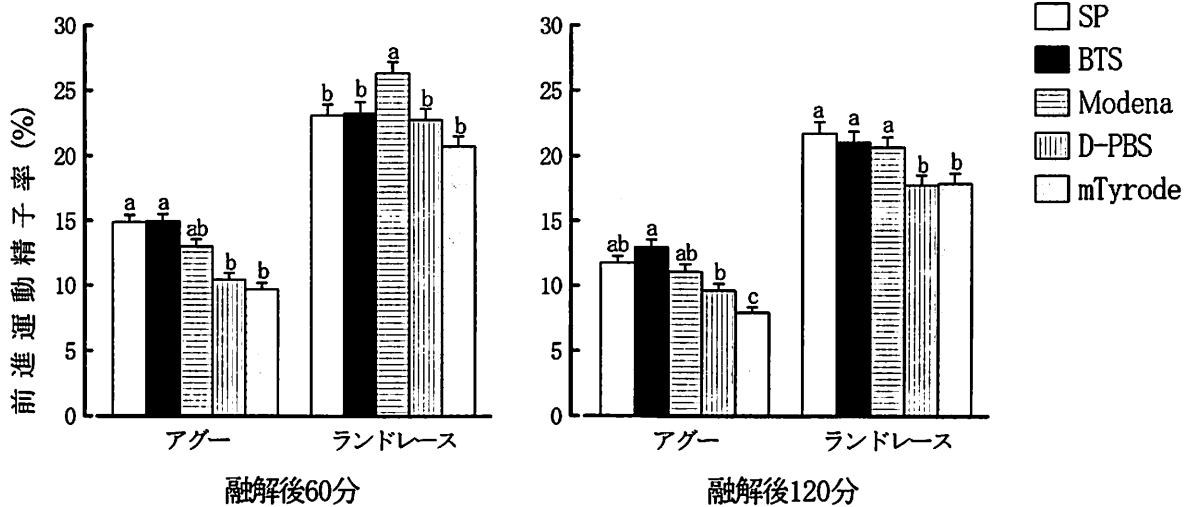


図3 各種精子懸濁液における前進運動精子率の成績

注 1) 平均±標準誤差。

2) 同品種内の異符号間に有意差有り (P<0.05)

2)精子細胞膜正常性

図 4 に各精子処理液における精子細胞膜正常率を示した。アグーの精子細胞膜正常率は, mTyrode が他の精子処理液に対して有意 (P<0.05) に低い値を示した。また, 精子細胞膜正常率が最も高かったのは BTS であった。いっぽう, ランドレースの精子細胞膜正常率は, 精子処理液の違いによる差は認められなかった。また, すべての精子処理液でアグーはランドレースより低い精子細胞膜正常率を示した。

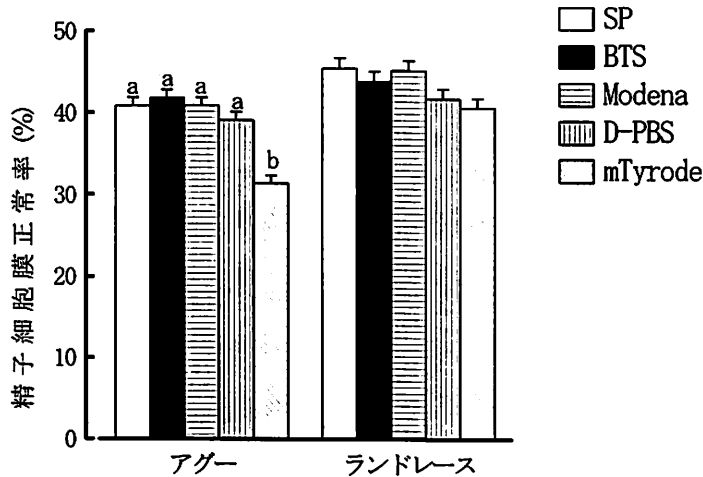


図4 各精子処理液における精子細胞膜正常率の成績

注1) 平均±標準誤差。

2) 同品種内の異符号間に有意差有り (P<0.05)

3)精子アクロシン活性

図5に各精子処理液における精子アクロシン活性の成績を示した。アグーのアクロシン活性はBTS, D-PBSが他の精子処理液に対して有意(P<0.05)に高い値を示した。いっぽう、ランドレースのアクロシン活性は、精子処理液の違いによる差は認められなかった。

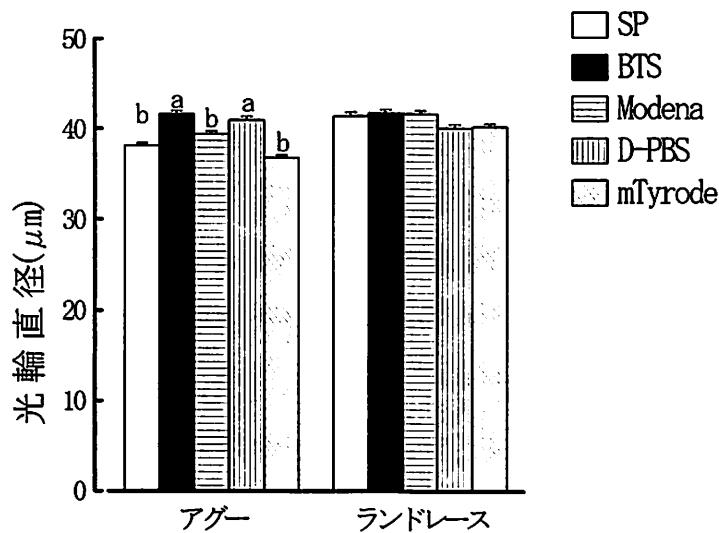


図5 各精子処理液における精子アクロシン活性の成績

注1) 平均±標準誤差。

2) 同品種内の異符号間に有意差有り (P<0.05)

2. 試験2：凍結処理前の室温放置時間の検討

1)精子運動性

図6に各室温放置時間におけるMotileの推移を示した。アグーのMotileは、室温放置時間を設けない0時間区が1および2時間区に対し常に高い値で推移した。アグーと同様にランドレースのMotileも融解直後を除き、0時間区が他の試験区より高い値で推移した。

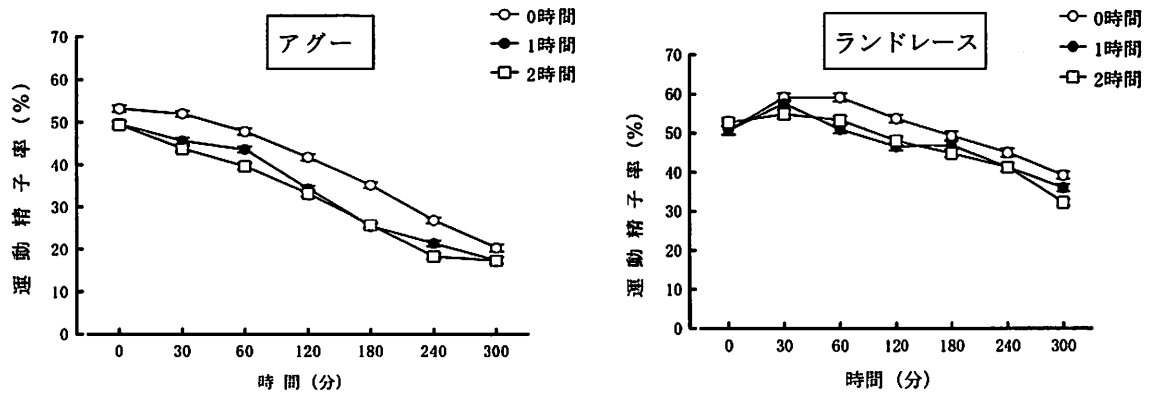


図6 各室温放置時間における運動精子率の推移
注) 平均±標準誤差。

図7に各室温放置時間における Progressive の推移を示した。アグーの Progressive は室温放置時間を設けない0時間区が1および2時間区に対し常に高い値で推移した。いっぽう、ランドレースの Progressive は融解後60分に0時間区が1および2時間区に対し高い値を示したが、融解後60分以降はいずれの時間区においてもほぼ同様な Progressive を示した。

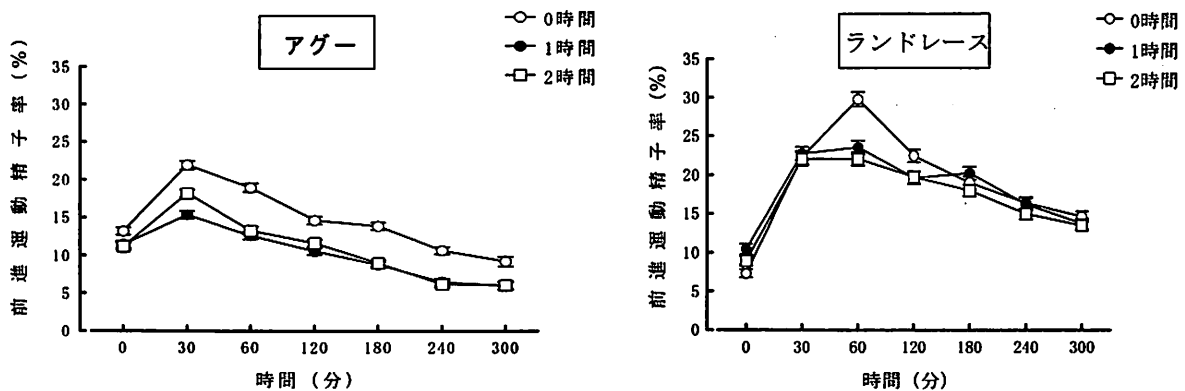


図7 各室温放置時間における前進運動精子率の推移
注) 平均±標準誤差。

2)精子細胞膜正常性

図8に各室温放置時間における精子細胞膜正常率を示した。アグーの精子細胞膜正常率は室温放置時間を設けない0時間区が1および2時間区に対し有意(P<0.05)に高い値を示した。また、室温放置時間が長くなるほど精子細胞膜正常率が低下する傾向にあった。いっぽう、ランドレースの精子細胞膜正常率は室温放置時間の違いによる差は認められなかった。

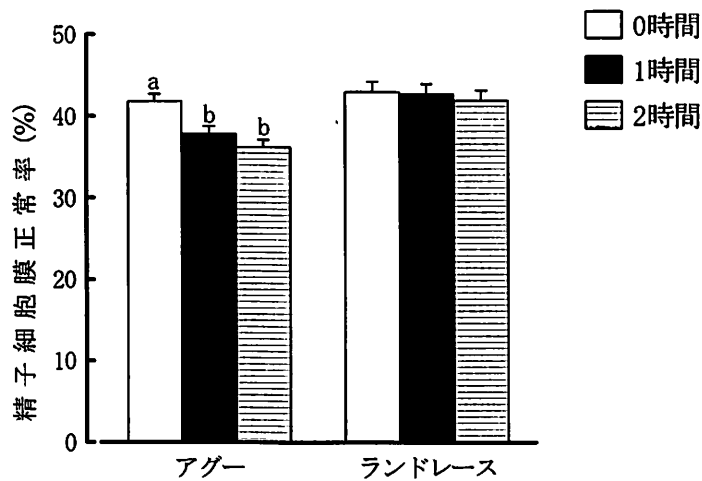


図8 各室温放置時間における精子細胞膜正常率の成績

注 1) 平均±標準誤差。

2) 同品種内の異符号間に有意差有り ($P < 0.05$)

3)精子アクロシン活性

図 9 に各室温放置時間における精子アクロシン活性の成績を示した。アグーの精子アクロシン活性は室温放置時間を設けない 0 時間区が 1 および 2 時間区に対し有意 ($P < 0.05$) に高い値を示した。また、室温放置時間が長くなるほど精子アクロシン活性が低下する傾向にあった。いっぽう、ランドレースの精子アクロシン活性は室温放置時間の違いによる差は認められなかった。

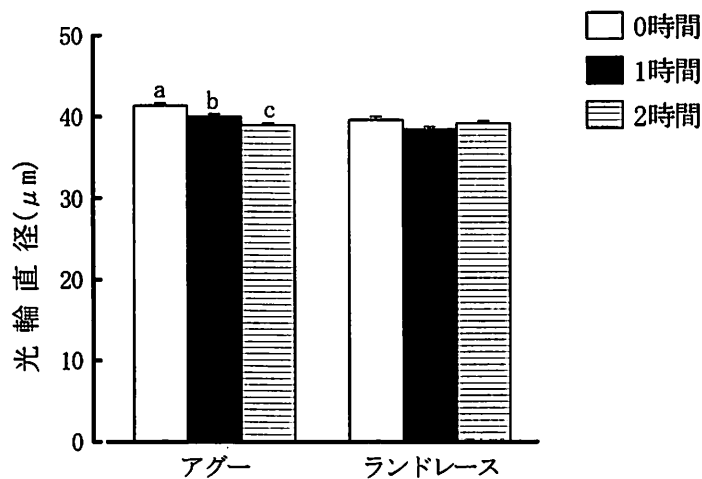


図9 各室温放置時間における精子アクロシン活性の成績

注 1) 平均±標準誤差。

2) 同品種内の異符号間に有意差有り ($P < 0.05$)

4)精子体外受精能

図 10 に各室温放置時間における体外受精による精子侵入率を示した。アグーの精子侵入率は室温放置時間を設けない 0 時間区が 1 および 2 時間区に対し有意 ($P < 0.05$) に高い値を示した。いっぽう、ランドレースには室温放置時間の違いによる体外受精能の差は認められなかった。

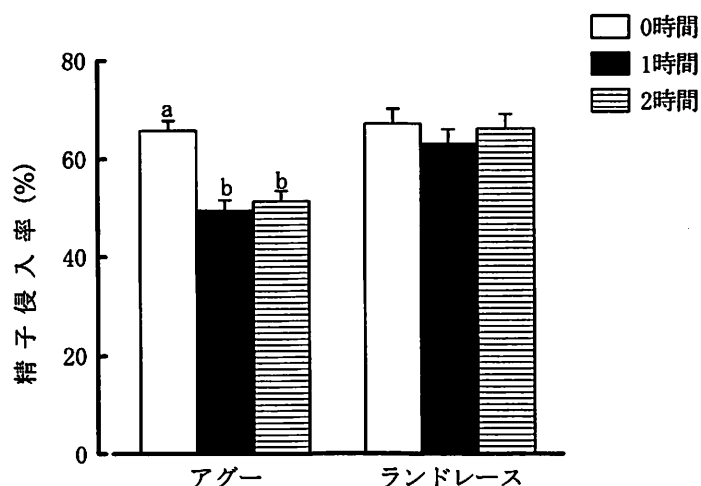


図10 各室温放置時間の違いによる精子侵入率の成績

注1) 平均±標準誤差。

2) 同品種内の異符号間に有意差有り (P<0.05)

V 考 察

試験1の凍結処理前の室温放置時に使用する精子処理液については、アグー精子はBTSを使用した方が他の精子処理液より精子運動性、精子細胞膜正常性および精子アクロシン活性が高く、最も良い状態で精子性状が維持されていると評価した。いっぽう、ランドレース精子ではModenaを使用した時に他の精子処理液より高い精子運動性を示した。しかし、精子細胞膜性状性および精子アクロシン活性は精子処理液による差は認められず、各精子性状検査で一致した成績が得られなかった。

試験2の凍結処理前の室温放置時間については、アグー精子は室温放置時間を設けない0時間区が1および2時間区より精子運動性、精子細胞膜正常性、精子アクロシン活性、精子侵入率が高く、最も良い状態で精子性状性が維持されていると評価された。また、室温放置時間が短いほど精子性状性が高く維持されることが示唆された。いっぽう、ランドレース精子は0時間区の精子運動性が他の試験区より良い傾向にあったが、その他の精子性状性検査は室温放置時間の違いによる成績に差は認められず、各精子性状検査で一致した成績が得られなかった。

Kawanoら⁶⁾はアグーと同様な小型種のミニブタの射出精液を凍結する際、採精後直ちに精漿を除去し室温放置した方が、精漿中で室温放置するより融解後の精子運動性や体外受精の精子侵入率が向上すると報告している。

いっぽう、ブタ精子はウシ精子などと比較して凍結融解処理に伴うコールドショック、浸透圧ショックならびに細胞内の氷晶形成などによる細胞障害を受けやすく、細胞膜や先体などを損傷した凍結・融解精子では生理学的機能が著しく低下する⁷⁾。Purselら^{8, 9, 10)}は冷却・凍結前の室温放置により凍結・融解過程でのコールドショックに対する抵抗性が高められると報告しており、ブタ凍結精液の作製時に一般的に広く活用されている「豚凍結精液利用技術マニュアル(日本家畜人工授精師協会)」¹¹⁾でも精子濃厚部を採取後、精漿が含まれた状態あるいは前処理液を混合した状態で数時間放置する方法がとられている。また精漿中には細胞膜を保護するタンパク質が含まれているが、精子の凍結に対して悪影響を及ぼす塩類やコレステロールも含まれており、精漿中で培養した精子では耐凍能の低下が起こることも指摘されている^{12, 13)}。そのため、精漿は放置後の冷却・凍結前に除去することが慣例となっている。

今回の精子処理液および室温放置時間の検討において、アグーとランドレースで異なった精子性状評価になったことは、精漿が持つ精子に有効な細胞膜保護といった作用より塩類やコレステロールによる有害な作用の方がアグー精子やミニブタ精子により強く影響したと示唆された。これはアグー精子が一

般的な西洋品種と比較して、精子の凍結に適した精子濃厚部と呼ばれる分画を有さず、精子活力なども弱いといった特性に起因していると考えられた。

アグー精子を凍結処理する場合、ただちに精漿を BTS に置き換えた方が精子性状が良い状態で維持されること、その場合、室温放置時間を設けない方がさらに良い状態で精子性状が維持できることが判った。このことは、生体由来の不特定な因子含む精漿の代わりに完全に化学合成された BTS を代用できるため、再現性が高く、精子処理液の組成改変が容易であり、また、室温放置時間の省くことにより時間の短縮が図れるくというメリットもあると考えられた。

今回の試験の結果、ランドレースでは精子処理液や室温放置時間について一致した精子性状性評価が得られなかった。しかし、アグー精子の場合は、採精後素早く精漿を除去し、BTS を添加・洗浄した後、室温放置なしで希釈液を加え、冷却・凍結処理を行うことが有効な方法であることが示唆された。

ただし、今回の試験結果においてもアグーの凍結・融解後の精子性状は、いまだランドレースより明らかに劣っていることから、今後も更なる技術改良を行い、アグー精子に適した凍結保存技術を確立する必要がある。

VI 引用文献

- 1)大城まどか・仲村敏・鈴木直人・太田克之・渡久地政康(2003)琉球在来豚(アグー)を活用した銘柄豚の確立(3)アグーの肥育試験および肉質評価, 沖縄畜試研報, 41, 71-78
- 2)大城まどか・仲村敏・鈴木直人・太田克之・渡久地政康(2003)琉球在来豚(アグー)を活用した銘柄豚の確立(2)アグーの繁殖性および哺育・育成成績への近親交配による影響, 沖縄畜試研報, 41, 67-70
- 3)仲村敏・大城まどか・鈴木直人・玉代勢秀正・吉岡耕治・鈴木千恵・菊地和弘・建本秀樹(2004)琉球在来豚(アグー)を活用した銘柄豚の確立(4)アグー凍結精液の作製および融解後の受精能評価, 沖縄畜試研報, 42, 64-71
- 4)日本家畜人工授精師協会(2003)家畜人工授精講習会テキスト(家畜人工授精編), 302-306, 日本家畜人工授精師協会
- 5)Hideki T, Keisuke O, Koji S, Norio M(2001)Enhancement of Developmental Competence after InVitro Fertilization of Porcine Oocytes by Treatment with Ascorbic Acid 2-O- α -Glucoside During In Vitro Maturation, *Biology of Reproduction*, 65, 1800-1806
- 6)Kawano N, Shimada M, Terada T(2004)Motility and penetration competence of frozen-thawed miniature pig spermatozoa are substantially altered by exposure to seminal plasma before freezing, *Theriogenology*, 61, 351-364
- 7)Mazur P(1984)Freezing of living cells : mechanism and implicationskonmma, *Am j pyysiol (CellPhysiol)*, 16, C125-C142
- 8)Pursel VG, Johnson L A, Rampacek GB(1972)Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock, *J Anim Sci*, 34, 278-283
- 9)Pursel VG, Johnson LA, Schulman LL(1972)Interaction of extender composition and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa, *J Anim Sci*, 35, 580-584
- 10)Pursel VG, Johnson LA, Schulman LL(1973)Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa, *J Anim Sci*, 37, 528-531
- 11)丹羽太左右衛門監修(1989)豚凍結精液利用技術マニュアル, 日本家畜人工授精師協会
- 12)Zeng WX, Trada T(2000)Freezability of boar spermatozoa is improved by exposure to 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin, *Reprod Fertil Dev*, 12, 223-228
- 13)Zeng WX, Trada T(1985)Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction, *Amer J Anat*, 174, 269-283