

牛凍結精液の生産性向上

(5) アクリジンオレンジ蛍光染色法を用いた低受胎種雄牛の分類への応用の可能性について

棚原武毅 真喜志修 運天和彦

I 要 約

アクリジンオレンジによる蛍光染色法を用い、低受胎種雄牛精液と受胎性に問題のなかった種雄牛精液の精子の変性率の違いを調査した。染色によって赤、黄に蛍光染色された精子を変性を受けた精子とし、緑に蛍光染色された精子を変性を受けていない精子として分類し、精子の変性率を比較したところ以下の結果を得たので報告する。

低受胎種雄牛の2検体の精液についてそれぞれ、46.2%、46.8%の精子が変性を受けており、対照の種雄牛4頭の精子の変性率と比較して有意に高い値となった。

以上の結果より、黒毛和種種雄牛において蛍光染色法を用いた低受胎牛の分類への応用の可能性が示唆された。

II 結 言

国内においての牛の交配は、そのほとんどが人工授精により行われており、人工授精の最大の効用は遺伝的に優れた雄を効率的に利用することである¹⁾。そこで、沖縄県畜産試験場においても凍結精液を製造、配布している。これまで当場では精子活力の良好な凍結精液を製造することを目的として、精子運動解析装置²⁾を用いた精子の運動性評価について検討を行ってきた。しかしながら、人工授精後、牛体内で受精に至るまでの間に精子は受精能を獲得する必要がある、運動性以外にも精子内部の酵素活性やそれに伴う細胞膜の変化なども受精に影響することが報告されている^{3, 4)}。いっぽう、人精子において、精子核クロマチンの脱凝縮処理後、アクリジンオレンジにて蛍光染色し、精子の変性率を調査した結果、変性率と男性不妊との間に有意な相関があり、男性不妊の検査においてアクリジンオレンジを用いた精子の検査は有効である⁵⁾との報告もある。

そこで、本試験では過去に低受胎であった種雄牛と受胎率に問題のなかった種雄牛の精子をアクリジンオレンジにて蛍光染色し、精子の変性率の違いを検討したので報告する。

III 材料および方法

1. 試験区分

受胎率が14.9%の照福土井を低受胎種雄牛とし、受胎率が50.0%以上の種雄牛を対照として表1に示した。人工授精は1998年から2002年の間に各種種雄牛とも複数の人工授精師によって行われ、受胎率は受胎の確認をノンリターン法または胎膜触診法⁶⁾によって求めた。

表1 試験区分

項 目	種雄牛名号	受 胎 率
低受胎種雄牛	照 福 土 井	14.9%(10/67)
	照 溝	52.3%(23/44)
対 照	姫 桜	79.7%(47/59)
	北 富 士	54.8%(34/62)
	照 照	66.7%(30/45)

2. 供試牛および供試精液の概要

供試牛および供試精液の概要について表2に示した。照福土井の採取時月齢は24~36カ月齢であり、近交係数は20.5と他の種雄牛より高かった。

照福土井の精液については、採取時期の異なる2つの精液を供試した。精子の活力は顕微鏡的検査手法⁷⁾によって求めた。

表2 供試牛および供試精液の概要

種雄牛名号	生年月日	近交係数	採取年月日	精液量(ml)	精子数(億/ml)	活力
照福土井	1996. 3. 16	20.5	1998. 3. 12	10.0	12.9	40+++
"	"	"	1999. 3. 2	8.0	13.9	50+++
照溝	2000. 3. 28	13.1	2003. 4. 10	5.0	9.6	45+++
姫桜	1991. 4. 3	9.4	1998. 2. 26	9.0	22.6	50+++
北富士	1997. 10. 7	8.6	1999. 2. 25	5.0	9.7	40+++
照照	2000. 1. 18	6.5	2002. 3. 29	5.0	19.7	40+++

注1) 照福土井：種雄牛は同一で精液の採取月日が異なる。

2) 近交係数：5代祖まで調査し求めた。

3) 活力：凍結融解後。

3. 試験方法

凍結精液は融解後、洗浄液にて洗浄し、低温状況下で低pH・非イオン界面活性剤液にてばく露し、その後アクリジンオレンジ液にて蛍光染色した。蛍光観察は励起波長460~490nm, 吸収波長515nmにて行い、赤、黄に蛍光染色された精子は変性を受けた精子、緑に蛍光染色された精子は変性を受けていない精子と分類し、500個の変性率を算出し、4反復行った。

IV 結果および考察

精子の変性率

低受胎種雄牛と対照の精子の変性率について、それぞれ個体ごとに表3に示した。また、低受胎種雄牛と対照の精子の変性率の平均を図1に示した。

低受胎種雄牛である照福土井の2検体の精液については、それぞれ、46.2%、46.8%の精子が変性を受けており、対照の照溝、姫桜、北富士、照照の4頭の種雄牛の精子の変性率と比較して有意に高い値となった。

また、低受胎種雄牛の精子の平均変性率は46.5%で、対照の8.3%と比較して38.2ポイント高い値となっており、低受胎種雄牛においては採取年月日が異なる精液においても変性率が高い傾向が認められた。

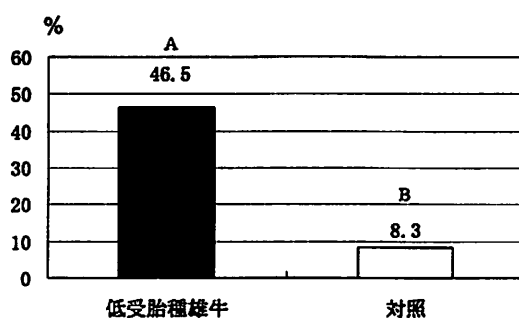
アクリジンオレンジ染色液は通常、核のDNAを特異的に蛍光染色するときに用いられるが、今回の試験の結果、低受胎種雄牛は対照と比較して精子の変性率が著しく高い特徴を示したことから、蛍光染色法を用いた低受胎種雄牛の分類への応用の可能性が示唆された。

表3 精子の変性率

項目	低受胎種雄牛		対照			
	照福土井	照福土井	照溝	姫桜	北富士	照照
変性率	46.2±3.6 ^a	46.8±3.0 ^a	8.1±1.3 ^{bc}	9.8±2.2 ^{bc}	9.9±2.7 ^{bc}	5.2±1.0 ^{bc}

注1) 照福土井：種雄牛は同一で精液の採取月日が異なる。

2) 異なる大文字間に1%水準、小文字間に5%水準で有意差あり。



注) 異符号間に1%水準で有意差あり。

図1 低受胎種雄牛および対照の精子の変性率

謝 辞

本研究を行なうにあたりご指導いただきました，静岡大学農学部の高坂哲也教授に感謝申し上げます。

V 引用文献

- 1) 金井幸雄・森裕司，1997，繁殖，森田琢磨・清水寛一編，新版畜産学，229-234，文永堂出版
- 2) 棚原武毅・真喜志修・千葉好夫，1999，牛凍結精液の生産性向上(3)精子運動解析装置を用いた精子の運動性評価の検討，沖縄畜試研報，39，21-24
- 3) 毛利秀雄監修，1992，精子学，152-164，東京大学出版会
- 4) 西川義正監修，1972，哺乳動物の精子，385-402，学窓社
- 5) Shibahara H., Onagawa T., Ayustawati., Jorsaraei S., Hirano Y., Suzuki Y., Suzuki T., Takamizawa S., Suzuki M. 2003, Clinical significance of the Acridhine Orange test performed as a routine examination: comparison with the CASA estimates and strict criteria, *J. Andrology*, 26, 236-241
- 6) 星修三・山内亮著，1986，新版家畜臨床繁殖学増補版，178-179，朝倉書店
- 7) 日本家畜人工授精師協会，1999，家畜人工授精師講習テキスト(平成10年版)，310-331

研究補助：伊芸博志