

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

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***

I 要 約

沖縄県畜産試験場で飼養するアグー3頭、ランドレース2頭の計5頭を用いて凍結精液の作製を試みた。また、作製した凍結精子の性能評価として凍結融解後の精子における、Computer-assisted Sperm Analyzer (CASA)による運動性、Williams染色による精子奇形形態、ならびに、トリプルステイン(TS)法による精子の先体保有および生存性について検討を行なった。さらに、同凍結精子を用いた体外受精(IVF)を行い、各観察結果とIVF成績との間に相関があるか否かについて検討した。その結果、以下の点が明らかとなった。

1. アグーは供試した全ての精子が凍結融解後においても運動性を保持していた。
2. アグー凍結精子の運動性は、融解後15分で活発となり、融解後360分で全ての供試豚の運動精子率が10%以下となった。また、ランドレースは融解後15~60分まで約50%の運動精子率を維持したがアグーの融解後60分の運動精子率はランドレースと比較して低い傾向にあった。
3. 供試したアグー精子は融解後360分に全ての個体で運動精子が観察されなくなった。
4. 雄個体No. 2A由来のアグー凍結精液は精子運動性が極端に低く、アグー個体間で凍結融解精子の運動性に差があることが示された。
5. アグー凍結精液における融解後の精子奇形率は20%以内で、精子頭部の変形や損傷の割合は小さかった。このことから本法で作製された凍結精液は、凍結融解処理における精子形態への悪影響は少なかったと考えられた。
6. アグー凍結精子の先体保有および生存性は、先体を有する生存精子の割合が55.0~63.5%と最も高く、先体を有しない生存精子および死滅精子の割合はそれぞれ5%以下と低かった。
7. アグー凍結精子による精子侵入率および多精子受精率はそれぞれ18.3~58.9%、15.4~31.7%で、ランドレース凍結精子と比較して精子侵入率は低い傾向にあった。
8. アグー凍結精子の融解後15分~30分の運動精子率とIVFにおける精子侵入率の間に有意な正の相関が認められた。このことから、CASAによる運動性解析結果から凍結精子の卵子への侵入能がある程度推定できる可能性が示唆された。
9. IVFによりアグーを含む全ての供試豚の凍結精子が受精し胚盤胞期胚が得られた。このことから、本法により作製したアグー凍結精液を用いて人工授精や受精卵移植を行うことにより産子を得ることが期待できると考えられた。

II 緒 言

本県には戻し交配により復元された琉球在来豚アグーがいる。アグーは14世紀頃中国から導入された豚が原型といわれているが、発育が遅く、小型で産子数が少ないためその経済性がみだせず消滅しかけたこともある¹⁾。しかし、近年、肉質においてアグーの特性が認められるようになり、県産豚ブランドとしての活用が期待されている。当场では、これまでの調査で、アグーには優れた肉質特性があるいっぽうで近交退化の影響と考えられる繁殖性の低下等が認められ近交度を考慮した効率的な交配を行う必要があることを提言した^{2, 3)}。そのため今後のアグーの維持・増殖においては、貴重な遺伝資源を効率的に活用できる凍結保存技術のアグー精子に対する活用が期待されている。しかし、ウシ精子に比較してブタ精子の耐凍能は著しく劣っており、その結果、凍結・融解後のブタ精子の生存性や運動性は低

く、授精後の受胎率も低い。そのため、凍結精液による人工授精は豚では未だ普及率は低く、実用化まで至っていない^{4, 5)}。また、当場で飼養しているアグーは、液状精液作成に伴う希釈処理により精子活力が著しく低下するため、人工授精時には新鮮射出精液しか使用できず、実情ではアグー精液を効率的に利用することは困難である。

そこで、今後、近交度を考慮した上でアグーの維持・増殖を目的とした効率的な繁殖技術を確立するための基礎試験として、本研究では、当場で飼養しているアグーおよび、比較対照としてランドレースの射出凍結精液を作製し、凍結融解後の精子奇形形態、先体保有および生存性について調べるとともに、IVFによる凍結融解精子の受精能力を評価した。

Ⅲ 材料および方法

1. 供試精液

当場で飼養しているアグー3頭(1A, 2A, 3A)、ランドレース2頭(4L, 5L)の計5頭の種雄豚から擬牝台を使用し、手圧法⁶⁾で精液を採取した。精液の採取時に、アグー精液においては濃厚部が不明瞭なため射出された精液の全量採取し、ランドレース精液においては濃厚部のみを分離採取した。また、膠様物を取り除くため精液採取瓶の口を2枚の牛乳濾紙で覆うことで濾過処理を行なった。

2. プタ凍結精液の作製

凍結精液の作製は、Purselら⁷⁾およびYiら⁸⁾の方法を参考に修正を加えて実施した(図1)。採取した精液を室温で約60分間静置した後、精液と等量の前処理液(VMD-MULBERRYⅢ)を静かに混和し、遠心分離(600×g, 10分, 24℃)による洗浄を行い、上清を除去した。上清除去後の精子を室温に調整したLactose-egg yolk (LEY)一次希釈液(表1)で精子濃度が 10×10^8 sperm/mlになるように希釈し約2時間かけて徐々に5℃まで冷却した。さらに5℃になった時点から約1時間静置した後、LEY希釈液に1%濃度でOrvus ES Paste(OEP)と4%濃度でグリセリンを加えた同温の二次希釈液(表2)を等量加え、最終精子濃度が 5×10^8 sperm/mlになるように調整した。精液の凍結は、二次希釈液を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分後に錠剤化凍結精液を液体窒素中に浸漬した。

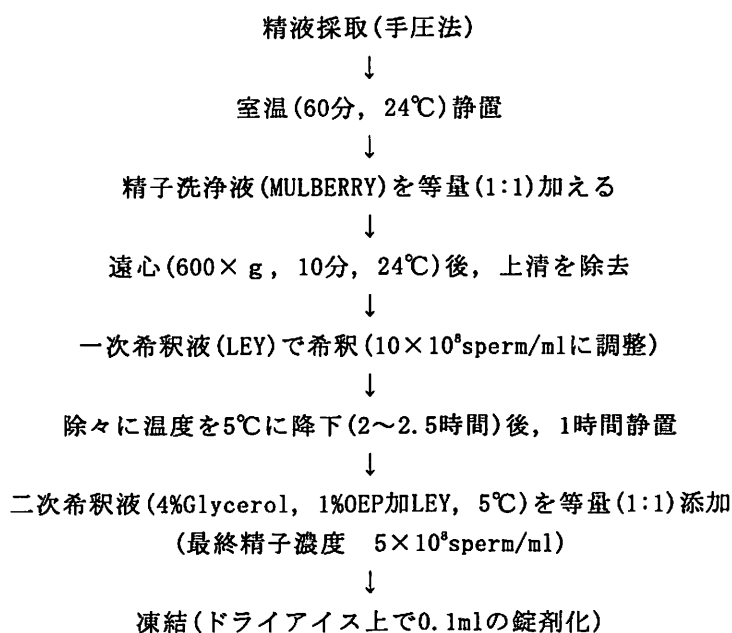


図1 凍結精液作成手順

表1 一次希釈液(LEY)の組成 (100ml中)

Lactose·H ₂ O	310.0mM	8,936.0mg
Egg yolk		20ml
Penicillin G	100IU/ml	6.5mg
Streptomycin	50Ug/ml	5.0mg

表2 二次希釈液(1%OEP, 4%glycerol加LEY)の組成

1st LEY solution	95ml
OEP	1ml
Glycerol	4ml

3. 凍結融解後の精子運動性

錠剤化凍結精液の1錠(0.1ml)を38℃に加熱した3mlの修正モデナ液中で素早く融解した後、38℃で保温した。凍結融解精子の運動性は、融解後5, 15, 30, 60, 120, 180, 300, 360, 420分に約8 μ lの精子懸濁液をスライドチャンパー上に滴下し、カバーガラスをかけ38℃に保温した状態で精子運動性解析装置(Ceros Sperm Analyzer, Hamilton-Thorne Research)を用いて解析し、これを4反復行なった。

4. 凍結融解後の精子奇形形態

錠剤化凍結精液1錠(0.1ml)を3mlの生理食塩液中で融解した後、Williams染色⁹⁾を行った。染色標本は、400倍または1000倍の光学顕微鏡下で、1枚の標本につき400個の精子を無作為に観察し、精子の奇形を形態別に分類した。

5. 凍結融解後の精子の先体保有および生存性

精子の先体保有および生存性の判別は、Talbotら^{10,11)}の方法に準拠しTS法により行った。すなわち、錠剤化凍結精液3錠(0.3ml)を9mlの修正モデナ液で融解し、遠心洗浄(1500rpm, 5分)した後、1mlの体外受精用培地 Porcine Gamete Medium(PGM)tac5を加え精子懸濁液とした。この精子懸濁液の塗沫標本を作製して図2に示す染色を行った。染色標本は、1000倍の光学顕微鏡下で、1枚の標本につき200個の精子頭部を無作為に観察した。また、TS法の染色結果により、精子後帽部が淡褐色で先体部がピンク色のものを先体を有する生存精子、後帽部が淡褐色で先体部が不染のものを先体を有しない生存精子、後帽部が暗褐色で先体部がピンク色のものを先体を有する死滅精子、後帽部が暗褐色で先体部が不染のものを先体を有しない死滅精子として4種類に分類した。

6. 体外受精

ブタ未成熟卵子の採取、体外成熟培養(IVM)、IVFならびに受精卵の体外培養(IVC)は、吉岡¹²⁾の方法に準拠して行った。また、全ての培養は、湿度飽和条件下のマルチガスインキュベーター内(39℃, 5%CO₂, 5%O₂, 90%N₂)で行った。

1)ブタ卵胞卵子の採取

と場由来の卵巣の直径3~6mmの卵胞から18G注射針を装着した10ml注射筒で吸引することで卵丘細胞卵子複合体(COCs)を採取した。

2)体外成熟培養

IVMは、採取したCOCsを卵子洗浄用溶液(TALP-Hepes)で2回洗浄した後、卵子成熟用培養液(NCSU-37)で2回洗浄し、20~22時間培養した。その後、dbcAMPとホルモンを除去したNCSU-37でさらに24時間培養した。

3)精子処理と体外受精

IVFには、錠剤化凍結精液5錠(0.5ml)を修正モデナ液30mlに融解して遠心洗浄(500 \times g, 5分)した後、80%および40%パーコールを含む同液に洗浄後の精液を重層し遠心(700 \times g, 20分)した。下層部の精子は、さらにPGMtac5で遠心洗浄(500 \times g, 5分)後、最終精子濃度を 2×10^6 sperm/mlに調整し、成熟培養後の精子とともにPGMtac5中で10時間培養した。

4)体外発生培養

媒精後の卵子は、卵子洗浄用培養液(PXM-Hepes)1mlが入った遠沈管に入れ、4分間ボルテックスにて振動攪拌し、卵丘細胞を除去した後、PXM-Hepesで3回洗浄した。一部の卵については、ホールマウント

標本を作製して位相差顕微鏡下で核相を観察することで受精状況を調べた。残りの卵子は体外発生用培養液(PZM-5)で2回洗浄した後、同培養液で5日間培養して胚盤胞期への胚発生率を調べるとともに、胚盤胞期まで発生した胚に対しては、空気乾燥標本を作製して胚盤胞期胚の細胞数を計測した。

IV 結 果

1. 凍結融解後の精子運動性

図3に凍結融解後の運動精子の経時的な変化を供試豚ごとに示した。その結果、アグーおよびランドレース共に精子の運動性は融解後15分で活発となり、融解後360分で全ての供試豚の運動精子率が10%以下となった。また、ランドレースは融解後15~60分まで約50%の運動精子率を維持したがアグーの融解後60分の運動精子率はランドレースと比較して低い傾向にあった。

融解後60分以内の運動精子率の最大値および最小値では、No. 3Aのアグーの融解後15分の運動精子率(61%)が最も高く、No. 2Aのアグーの融解後60分の運動精子率(22%)が最も低かった。

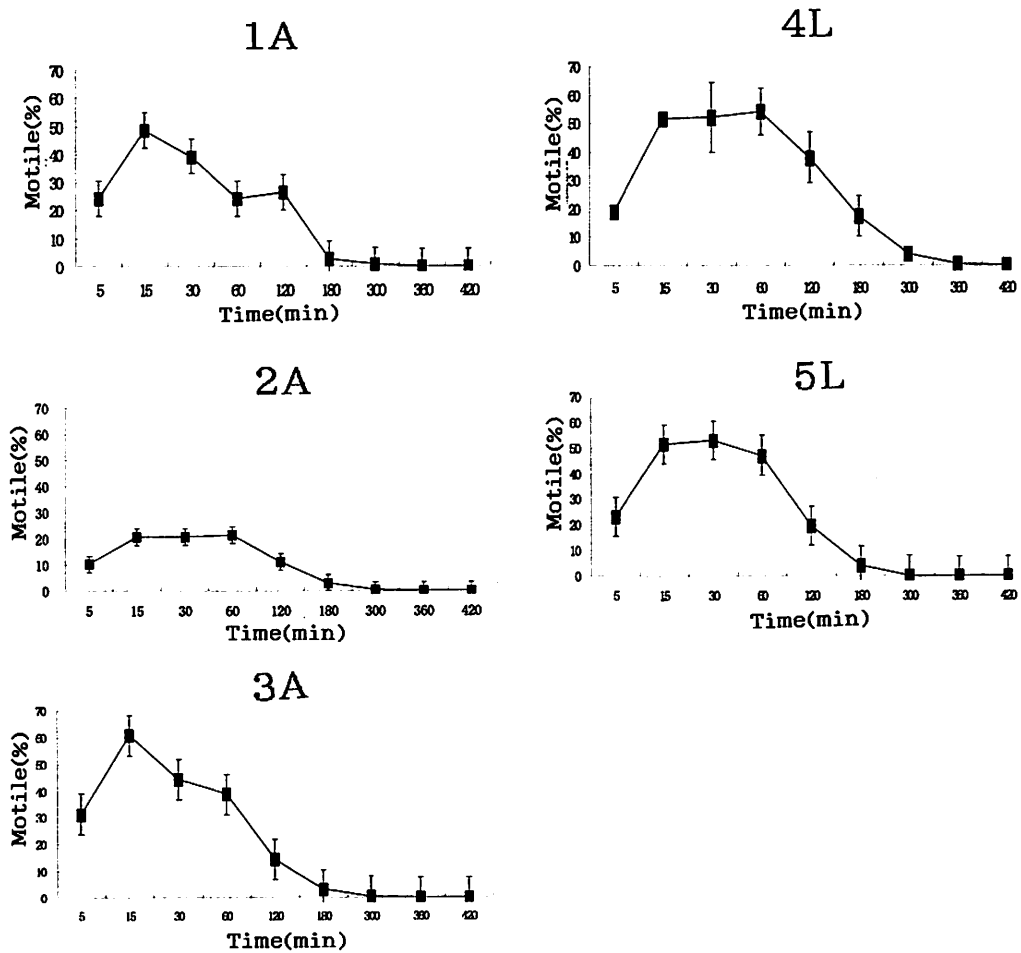


図3 凍結融解後の運動精子の経時的変化
注) 平均±標準誤差。

2. 凍結融解後の精子奇形形態

表3に供試豚ごとに凍結融解後の精子の奇形形態別分類結果を示した。アグー精子の奇形率は14.0~18.5%であり、ランドレース精子と同じかあるいは低い傾向にあり、アグーの個体間に有意な差は認められなかった。奇形を形態別に分類した奇形発生率では、アグー精子は精子尾部の欠損あるいは発育不

不全の出現率がランドレース精子より高かったが、アグーとランドレースの間に有意な差は認められなかった。また、No. 2Aのアグーは精子頭部の屈折の出現率が高く、No. 3Aのアグーは、精子頭部の過大あるいは精子頭部の過小が多いという特徴が認められた。

表3 凍結融解後の精子における奇形形態別分類の結果

単位：%

供試雄個体No.	頭部				頸部				欠損 發育不全	尾部			合計
	過大 ・ 過小	変形 ・ 損傷	その他	計	小滴 屈折	付着	その他	計		屈折 ・ 湾曲	その他	計	
1A	2.0 ^{bc}	1.5	0.5 ^{ab}	4.0 ^{ab}	0.5 ^b	1.5	1.0	3.0 ^{bc}	5.0	2.0 ^b	0.0	7.0	14.0
2A	1.0 ^c	0.5	1.5 ^a	3.0 ^{bc}	6.5 ^a	3.5	0.0	10.0 ^{ab}	4.5	1.0 ^b	0.0	5.5	18.5
3A	5.0 ^{ab}	1.5	0.0 ^b	6.5 ^{ab}	0.0 ^b	1.0	0.0	1.0 ^{bc}	4.5	1.5 ^b	0.5	6.5	14.0
4L	6.5 ^a	1.5	0.0 ^b	8.0 ^a	0.0 ^b	3.0	0.5	3.5 ^{bc}	3.5	3.5 ^{ab}	0.0	7.0	18.5
5L	0.5 ^c	0.0	0.0 ^b	0.5 ^c	6.0 ^a	1.5	0.5	8.0 ^{ab}	3.5	6.5 ^a	0.0	10.0	18.5

注) 同列の異符号の文字間に有意差有り (P<0.05)。

3. 凍結融解後の精子の先体保有および生存性

表4に凍結精液の融解後の精子先体の有無および生存性で分類した結果を示した。その結果、生存精子で先体を有する割合が55.0~79.5%と高く、ついで死滅精子で先体を有する割合が15.0~41.0%であった。生存精子で先体を有しないおよび死滅精子で先体を有しない割合は5%以下と低かった。また、アグーとランドレースを比較した場合、アグーは、ランドレースより生存精子で先体を有する割合が低く、逆に死滅精子で先体を有する割合が高い傾向にあった。しかし、分類された各項目におけるアグーとランドレース間に有意な差は認められなかった。

表4 凍結融解後の精子における先体保有および生存性の分類結果

供試雄個体No.	生存精子 (%)			死滅精子 (%)		
	先体			先体		
	有	無	計	有	無	計
1A	55.0	5.0	60.0	35.5	4.5	40.0
2A	63.5	0.5	64.0	34.5	1.5	36.0
3A	55.5	2.5	58.0	41.0	1.0	42.0
4L	77.0	3.0	80.0	18.5	1.5	20.0
5L	79.5	3.5	83.0	15.0	2.0	17.0

4. 体外成熟卵子との体外受精

表5に凍結融解精子を用いたIVM卵子へのIVFの成績を示した。その結果、精子侵入率は18.3~72.6%であり、多精子侵入率は15.4~54.7%ならびに雄性前核形成率は56.5~92.3%であった。また、アグーとランドレースを比較した場合、アグーの精子侵入率はランドレースのそれより低い傾向にあった。そしてNo. 2Aのアグーの精子侵入率(18.3%)は、他の供試豚の精子侵入率より有意に低かった (P<0.05)。いっぽう、雄性前核形成率はランドレースよりアグーの方が高い傾向にあったが、個体間の差は認められなかった。

表6にはIVF後の胚の発生成績を示した。媒精後2日目の卵割率および5日目の胚盤胞期への胚発生率は、それぞれ35.6~71.7%、2.5~16.7%であり、卵割率においては個体間に有意差が認められたが (P<0.05)、発生率においては有意な差はなかった。また、アグー精子による胚盤胞期胚の平均細胞数は約47.0~54.3個でランドレースより多い傾向にあったが、個体間で有意差は認められなかった。

表5 体外成熟卵子との体外受精の結果

供試雄 個体No.	検査卵子数	卵子数		
		精子侵入(%)	多精子侵入(%)	雄性前核形成(%)
1 A	74	41(55.4) ^a	13(31.7) ^{AB}	27(65.9)
2 A	71	13(18.3) ^b	2(15.4) ^B	12(92.3)
3 A	73	43(58.9) ^a	10(23.3) ^A	36(83.7)
4 L	74	46(62.2) ^a	14(30.4) ^A	26(56.5)
5 L	73	53(72.6) ^a	29(54.7) ^A	38(71.7)

注1) 同列異符号の文字間に有意差有り (P<0.05)。

2) 多精子侵入率=多精子侵入卵数/精子侵入卵数。

3) 雄性前核形成率=雄性前核形成卵数/精子侵入卵数。

表6 体外受精後の胚の発生の結果

供試雄 個体No.	検査胚数	卵割胚数(%)	胚盤胞数(%)	胚盤胞期細胞数
		[2日目]	[5日目]	(平均±標準偏差)
1 A	102	49(48.0) ^{bc}	8(7.8)	47.0±14.4
2 A	118	42(35.6) ^{bc}	3(2.5)	54.3±29.3
3 A	102	54(52.9) ^b	14(13.7)	53.4±14.6
4 L	111	58(52.3) ^b	17(15.3)	38.5±14.5
5 L	120	86(71.7) ^a	20(16.7)	35.5±24.7

注) 同列異符号の文字間に有意差有り (P<0.05)。

5. 精子の運動性、奇形率、先体保有および生存性と体外受精との相関

融解後の精子運動性とIVFの成績では、融解後15分および30分の運動精子率とIVFにおける精子侵入率との間に有意な正の相関が認められた(融解後15分; $r=0.897$; $P<0.05$, 融解後30分; $r=0.969$; $P<0.05$)。

いっぽう、精子の奇形率、先体保有および生存性とIVFの成績との間には有意な相関関係は認められなかった。

V 考 察

今回、Purselら⁷⁾とYiら⁸⁾の方法を参考にして、当場で初めてアグーの射出凍結精液を作製した。当場で飼養しているアグーはランドレース等の一般経済豚と比較して精液の濃厚部が不明瞭なため、射出された精液の全量を用いて凍結処理したが、供試した全てのアグー精子が凍結融解後においても運動性を保持していた。特にNo. 1Aおよび3A由来の凍結精液は、副生殖腺液の含有量が少ない濃厚部の精液のみを凍結したランドレース精子と融解後15分における運動精子率を比較した場合、ランドレースと遜色ない精子運動性を示した。しかし、No. 2A由来の凍結精液では融解後の精子運動性が極端に低かった。

一般にブタ精子は、冷却に対する感受性が高く、耐凍能に顕著な個体差が認められる¹³⁾と言われており、アグーについても同様な個体差があることが示唆された。

精子の奇形率は正常な家畜精液で通常10%以内であり、これが20~30%を超える場合には受胎率の低下をきたすといわれている。さらに、凍結融解処理に伴う細胞障害により先体異常精子の出現率が増加することが知られている¹⁴⁾。今回作製したアグー凍結精液における融解後の精子奇形率は10%以上20%以内であり、また、頭部の損傷、変形の割合も小さかった。これらの結果から、本法で作製されたアグーの凍結精液は、凍結融解処理による精子形態への悪影響は少なかったと考えられる。

精子は活発な運動性と共に、先体反応と呼ばれる生理・形態学的変化を引き起こして、初めて卵子への侵入が可能となる。そのため、精子の先体の有無および生存性の比率を事前に知ることは、体外受精における精子の前処理法を検討したり、保存精子の受精能を推定する上で有意義とされている¹⁵⁾。今

回、実施したTS法による判別では、精子の先体の有無や生存性に個体差は認められなかったことから、凍結融解精子の先体損傷に個体差がないことが示唆された。しかし、IVFにおける精子侵入率については、個体差が認められたことから、ブタ精子は、IVFに伴う受精能獲得等の生理学的作用機序を惹起する際、個体間で異なる反応を示すことが推察された。すなわちTS法による先体の有無や生存性をIVF成績の指標とするためには、融解後の精子を経時的に検査する等のさらなる詳細な検討が必要であると思われる。

本研究では、凍結精子の融解後15~30分の精子運動率とIVFにおける精子侵入率の間に有意な正の相関が認められたことで、CASAによる融解後の精子運動性の解析結果から凍結精子の卵子への侵入能がある程度推定できる可能性が示唆された。しかし、IVFに際しては精子だけでなく卵子側の様々な要因により受精状況が大きく左右されるため、凍結精子の受精能評価については、さらなる検討を加える必要がある。また、生体内では精子が雌性生殖器内に射出されてから受精に至るまで数時間を要することや、多胎動物であるブタにおいては排卵が持続的に起こる。したがって、生体内におけるアグー凍結融解精子の受精能力は、精子運動性の持続時間や人工授精による受精率等を調査し、確認する必要があると思われる。

本研究で作製した射出凍結精子を用いた一連のIVM-IVF-IVC法の結果から、アグーを含む全ての供試豚の凍結精子が受精し胚盤胞期胚が得られた。Yoshiokaら^{16, 17)}は同様な方法で作出されたブタ胚盤胞期胚を雌子宮内に移植しから産子を得ることに成功している。すなわちアグーの凍結精子においても人工授精や受精卵移植により、産子を得ることが期待できると考えられる。今後は、アグーの貴重な遺伝資源を維持し有効に活用する意味に於いて、実用化に向けた試験・研究を推進することが重要である。

VI 引用文献

- 1) 宮城吉通 (1998) 沖縄在来豚「アグー」の復元と沖縄の食文化(1), 畜産コンサルタント, 407, 46-50
- 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) 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
- 4) 藤野幸広 (2002) 凍結・融解精液の利用実用化試験, 豚の繁殖衛生セミナー通信, 29, 11-13
- 5) 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), 290-293, 日本家畜人工授精師協会
- 6) 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
- 7) Pursel V.G., Johnson L.A. (1975) Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure, *J. Anim. Sci.*, 40, 99-102
- 8) Yi Y.J., Im G.S. and Park C.S. (2002) Lactose-egg yolk diluent supplemented with N-acetyl-D-glucosamin affect acrosome morphology and motility of frozen-thawed boar sperm, *Animal Reproduction Science*, 74, 187-194
- 9) 全国家畜産物衛生指導協会編 (2000) 獣医繁殖学マニュアル, 51-54, 農文協
- 10) Talbot P., Chacon R.S. (1981) A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reaction of human sperm, *Exp Zool. J.*, 215, 201-208
- 11) Talbot P., Chacon R.S. (1981) Observations on the acrosome reaction of human sperm in vitro, *Amer J Primatol*, 1, 211-219
- 12) 吉岡耕治 (2003) ブタ胚の体外生産, 豚の繁殖衛生セミナー通信, 30, 24-41
- 13) 飯田勲編 (1971) 哺乳動物の精子, 355-362, 学窓社
- 14) 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), 321-328, 日本家畜人工授精師協会

-
- 15)Kusunoki H., Sakaue M., Kato S. and Kanda S. (1987) Identification of acrosome-reacted boar spermatozoa by a triple-stain technique, *Jpn J Anim Reprod*, 33, 123-127
- 16)Yoshioka K., Suzuki C., Tnaka A., Anas I.M.K. and Iwamura S. (2002) Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium, *Biology Of Reproduction*, 66, 112-119
- 17)Yoshioka K., Suzuki C., Itoh S., Kikuchi K., Iwamura S. and Rodrigues-Martines H. (2003) Production of piglets derived from in vitro-produced blastocysts fertilized and cultured in chemically defined media: Effects of theophylline, adenosine, and cysteine during in vitro fertilization, *Biology of Reproduction*, 69, 2092-2099
-

研究補助：仲程正巳，赤嶺圭作