

豚凍結精液を用いた人工授精における 精漿の作用と人工精漿の開発

島田 昌之 (広島大学大学院生物圏科学研究科動物生殖学)

岡崎 哲司 (大分県農林水産センター畜産試験場)

Shimada, M. and Okazaki, T. (2010). The effects of seminal plasma in pig artificial insemination using cryopreserved spermatozoa; the development of chemical defined seminal plasma for pig artificial insemination

ALL about SWINE 36, 10-15

はじめに

私たちは、同一個体から回収した射出精子と精巢上体精子をそれぞれ凍結保存し、その融解後の運動性測定の結果から、精子の凍結融解後の運動性の違いは、精子自身の問題というよりも精漿（精液の液状成分、精液＝精漿＋精子）に原因があると考え、精漿に着目した研究を行ってきた。その結果、精漿は、豚精子の凍結に何らポジティブな影響をもたらさず、細菌感染などにより凍結前に精子に悪影響を及ぼすことがわかった。一方、融解時に精漿が存在すると、精子の細胞膜におこる損傷を緩和させ、その結果、凍結融解後の精子の機能性を向上させること、さらには人工授精において、精漿成分が子宮内の免疫環境を制御し、着床を促進させるというポジティブな因子であることもわかった。すなわち、凍結精液を用いた人工授精において、精漿は相反する作用を示し、そのために既存の技術では十分な成績が得られてこなかったと考えられる。そこで、私たちは、精漿による相反する作用を引き起こす仕組みを解明し、ポジティブな作用のみを代替える人

工精漿を開発することにより、豚凍結精液を用いた人工授精により新鮮精液を用いたそれと同等の高い繁殖成績を得ることに成功したので、本稿で紹介する。

精子凍結過程における精漿の影響

一般的な豚精子の凍結法は、射出精液をペニシリン G などの抗生物質を加えた処理液で希釈し、2 時間程度かけて 15℃ まで冷却する。この段階になって、精液を精子と精漿に遠心分離して、精子を卵黄を加えた一次希釈液で再浮遊させ、5℃ まで冷却後、グリセロールを加えた二次希釈液を加え、平衡処理後、-196℃ で凍結する (1)。室温から 15℃ までの冷却時において、2 時間もの間精漿に精子が曝されることは、精子が冷却および凍結傷害に対する耐性 (耐凍性, freezability) を獲得するために必要と考えられてきた (2)。しかし、私たちは、全く精漿に曝されることのない精巢上体精子の凍結融解後の運動性は高いことから、この精漿への長時間の曝露は不必要ではないかと考えた。さらに、射出精子において凍結融解後の運

動性が低い個体であっても、精巢上体精子のそれは高いという結果が得られたことから、耐凍性の低い個体では、この精漿に長期間曝されることが精子の機能を低下させ、その結果、凍結によるダメージを受けやすくなっていると考えた。

そこで、定法により凍結精液を作製し、それを用いて一頭の雄由来の凍結精液を3頭の雌豚に人工授精し、一頭でも受胎が認められた場合、その雄個体を Good freezability、受胎が認められなかった雄個体を Poor freezability と区分した。Good freezability の雄においては、射出精子を直ちに遠心して精子を精漿と分離し、その後冷却、凍結を行っても、定法で凍結した精子と同様の融解後の運動性を示した。一方、Poor freezability においては、定法では凍結融解後の精子運動性は非常に低かったが、直ちに精漿を除去した区では、Good freezability におけるそれと同様の高い値が認められた。さらに、体外受精に供試した結果、Poor freezability であっても精漿除去により高い受精率が得られた。この結果は、精子の凍結には、精漿への曝露は必要ないことを強く示唆するものであり、耐凍性が低い個体では、精漿が直接的に精子に悪影響を与えていることが明らかとなった (3,4)。

精漿中への細菌感染

豚の射出精液において、精漿中の細菌感染の有無により、その後の精子の運動性、凍結融解に及ぼす影響について検討した。その結果、検査した22個体のうち19個体で細菌感染が認められ、その多くがグラム陰性菌であった。感染細菌数と精子の運動性との間には、採精直後では全く相関関係は認められなかったが、37°C、3時間培養後に

おいて負の相関関係がみられた。細菌は増殖し、その結果、精液中の pH などが変化し、精子の運動性が低下したと考えられたことから、ペニシリン G やアミカマイシンといった溶菌性あるいは増殖抑制系の抗生物質を添加したが、精子の運動性に改善はみられなかった。一方、精液中で多く検出されたグラム陰性菌は、その膜構成因子である LPS を内毒素として放出する。そこで、LPS の毒素活性を有するリポド A 構造に特異的に結合し、中和するポリミキシン B を添加した。予想通り、精液中には血中と比較して数 100 倍濃度の LPS が検出され、ポリミキシン B は精液中の LPS 活性を完全に抑制し、精子の運動性を回復させた (5)。この結果は、多くの雄豚において、採精時に細菌の混入が生じ、それが精子の運動性を低下させていることを示しており、凍結精液作製時に少なくとも精液として2時間保管してから、洗浄をする現行法では、精子が凍結処理前にすでに LPS により機能を低下している可能性が強く示唆された (6)。

精子の自然免疫能

精液中の細菌感染は、白血球を集積させ、それが TNF α などのサイトカインを放出し、精子の運動性を低下させるという報告がある (7)。しかし、我々は、精子が自身で細菌の構成因子を Toll-like Receptor (TLR) family を介して認識し、それにより精子細胞膜の損傷によるアポトーシス (プログラム細胞死) を誘起する結果 (最終的に死滅する)、早期に運動性が低下することを明らかとした (図 1)。このことは、細菌感染した精液では、精子の細胞膜が既に損傷していることを示しており、それが精子の耐凍性を低下させてい

ると考えられる。精子に発現する TLR において、上記に示すように TLR4 を刺激する LPS の毒素を中和する抗生剤、ポリミキシン B が市販され

ている。しかし、他については TLR の細胞内の機能を抑制する薬剤がヒトの敗血症の治療薬として開発が進められているが、未だ市販されていない。さらには、精子に発現する TLR には、ウイルスを認識する TLR9 などもあることもわかってきた。この精子の自然免疫能は、病原体に感染した精子が受精することにより、次世代にその影響が伝播されることを防いでいると考えられるが、凍結精液の作製などの生殖工学的利用においては、精子の運動性低下を引き起こす要因となる。

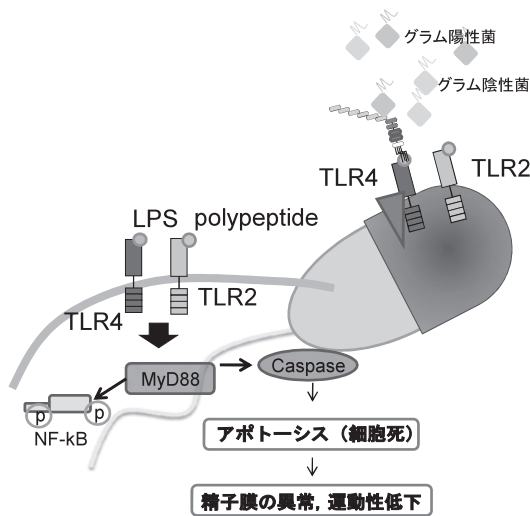


図 1. 精子の TLR を介した自然免疫能
精液中にグラム陰性菌・グラム陽性菌が感染している。精子は TLR2/4 を介して精液中細菌感染を認識し、アポトーシスを誘起させ、運動性を低下させる。

精漿除去により作成した凍結精液の性状

以上のような点からも、採精後直ちに精漿を除去し、LPS を中和するポリミキシン B、細菌の増殖を抑制するペニシリン G などの抗生物質を添加した希釈液で精子を洗浄後、同液において 15℃ まで温度を低下させることが、凍結精液の作製の第一ステップとして重要となる (図 2)。先に述べたように、精漿除去により作出した凍結精

精子凍結処理法

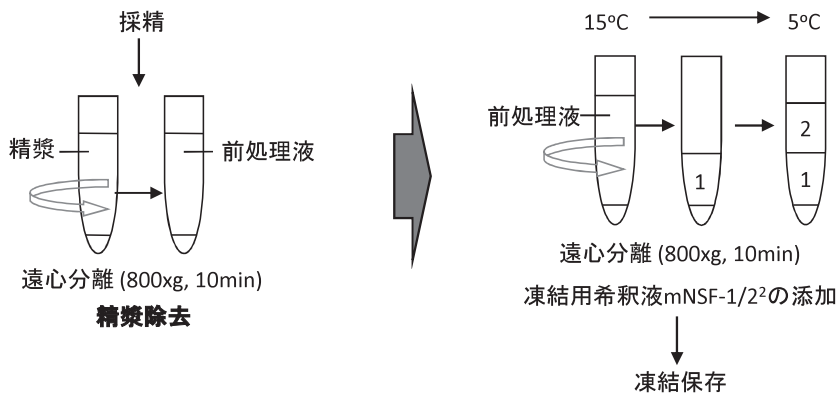


図 2. 新しい精子凍結処理法の概要

採精後 15 分以内に精漿除去し、ペニシリン G+ ポリミキシン B を添加した前処理液および凍結希釈液を用いて凍結する。

子の融解後の運動性は高く、体外受精においても十分な受精能を有している。しかし、この精子を人工授精に用いた時、その受胎率はきわめて低いものであった。

そこで、注意深く精子の運動を観察した結果、精漿除去により作出した凍結融解精子では、融解直後の運動性が受精能獲得時にみられるような hyper activation (超活性化) 状態であることが見いだされた。受精能獲得の指標となる精子タンパク質のチロシンリン酸化状態も、融解後、直ちに誘導されており、精子内部の Ca^{2+} の上昇も生じていた。その結果、一時的に高い運動性を示した後、精子は自発的に先体反応を誘起してしまうため、体内での受精能を失っていると考えられた。

EGTA 添加融解液の開発

この融解時における精子内部の Ca^{2+} 上昇に起因する一連の反応を抑制するために、融解液中に Ca^{2+} のキレート剤 (吸着剤) である EGTA を添加する手法を考案した。一般的な融解 (希釈) 液である Modena や BTS には、2 価イオンに対するキレート剤である EDTA が加えられているが、これは、 Ca^{2+} よりも Mg^{2+} や Zn^{2+} への親和性が高い。 Mg^{2+} や Zn^{2+} は、生命活動 (細胞の生存、機能性) に必要な酵素反応の補因子として機能することから、高濃度の EDTA 添加は精子に悪影響を与えることとなる。そこで、 Ca^{2+} への親和性が高い EGTA の添加効果を検討した。その結果、融解液への EGTA 添加により融解過程で生じる精子内部の Ca^{2+} 上昇は生じず、細胞膜が安定化し、長時間の培養後においても精子の運動性は維持されていた。そこで、この精漿除去により凍結し、EGTA 添加液で融解した凍結融解精子を用い

た人工授精を行った。その結果、卵管から回収した卵子の受精率は有意に向上し、受胎率は 80% を超えたが、着床率 (着床数 / 排卵数) は 50% 以下と低いものであった。さらに、一部の胎子は貪食されていたことから、子宮内の免疫環境が着床を許容していない (妊娠の準備ができていない) と推察した (8)。

精漿内の細胞性免疫抑制因子

人工授精により注入された精子は、雌にとって異物であり、それを攻撃・除去するために子宮腔内の白血球数が増加する。しかし、その増加は一時的であり、初期胚が子宮に到達する時期には、すでにその数は減少し、着床・妊娠が成立する。しかし、精漿を除去して凍結し、EGTA 含有融解液で融解した精子を人工授精した時、子宮腔内の白血球数は高い値を維持していたことから、これが胎子を攻撃し、着床率を低下させている原因と考えられた。つまり、精漿には子宮内の免疫環境を制御する因子があることになる。そこで、精漿中のサイトカイン、ケモカイン類とコルチゾール濃度の測定を行った。その結果、抗体アレイにより炎症性サイトカインとともに、炎症を抑制する IL13 なども検出され、コルチゾール濃度が高いことも明らかとなった。コルチゾールは、炎症抑制因子であり、ヘルパー T 細胞の分化をコントロールし、細胞性免疫機能 (異物を直接的に攻撃する機能) を低下させることが知られている。そこで、凍結精液を用いた人工授精において、コルチゾールを同時注入する新たな人工授精法を考案した (図 3)。このコルチゾール注入は、人工授精後の白血球数の増加を抑制し、着床率の向上をもたらした (9,10)。

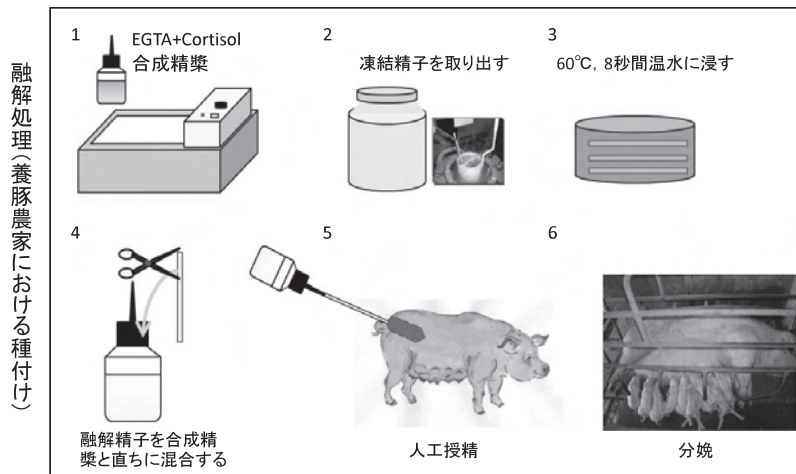


図3. 新規ブタ凍結精液による人工授精法の概要

凍結精液を用いた人工授精法の確立

採精後直ちに精漿を除去し、ペニシリン G+ ポリミキシン B を添加した希釈液で処理後、凍結し、EGTA 添加液で融解した精子をコルチゾールとともに子宮へと注入する、新規人工授精法（図3）により、80%以上の着床率と10頭前後の胎子数をもたらせることに成功した。注目すべき点として、EGTA やコルチゾールを添加した希釈液（人工精漿）のコストが、一回の人工授精あたり50円以下と安価である点が上げられる。また、コルチゾールによる胎子と母体への影響であるが、注入するコルチゾール量は、豚の炎症の治療時に投与する量に比較して1/1000程度であり、精漿内に含まれる量と同程度であること（自然交配において同程度のコルチゾールが子宮内に存在するという）、かつコルチゾールは代謝分解が早いこと、生まれてきた産子の平均体重、その後の発達も正常であることから、安全面での問題はないと考えている。実際、ポジティブリスト制度においても、コルチゾール投与5日後からの出荷が認

められている。

まとめと展望

本法によって、9割以上の雄豚において安定的に精子を凍結し、その凍結・融解精子を用いた人工授精で、新鮮精液を用いたそれと同等の高い繁殖成績をもたらすことが可能となった。すなわち、本法による凍結精液を用いた人工授精法が普及されることは、雄豚の飼育コストの低減につながるだけでなく、有用な雄の遺伝子を簡単に保存しておくことが可能となる。6割以上が自然交配により種付けが行われている本邦の豚生産の効率を向上させ、かつより効率よく育種改良することも可能とすることから、新規凍結精液+人工精漿を用いた人工授精法が多くの現場で利用されるよう、研修などを実施して普及に努めていきたい。

本技術は、特許公開、および出願中のものを含んでおり、その利用については下記に問い合わせてください。

(財)ひろしま産業振興機構ひろしま技術移転センター 担当; 堀 豊司

Tel; 082-255-9407

Fax; 082-255-9408

E-mail; hori@hiwave.or.jp

引用文献

1. Okazaki T, Abe S, Shimada M. Anim Sci J. 80; 121-129. 2009.
2. Pursel VG, Johnson LA, Schulman LL. J Anim Sci. 37: 528-31. 1973.
3. Okazaki T, Abe S, Yoshida S, Shimada M. Theriogenology. 71; 491-498. 2009.
4. 岡崎哲司, 島田昌之. 畜産技術. 642, 21-24. 2008.
5. Okazaki T, Mihara T, Shitanaka M, Liu Z, Richards JS, Shimada M. 投稿中
6. 岡崎哲司, 島田昌之. 養豚界. 第44巻第12号. 2009.
7. Perdichizzi A, Nicoletti F, La Vignera S, Barone N, D'Agata R, Vicari E, Calogero AE. J Clin Immunol 27: 152-162. 2007.
8. 岡崎哲司, 島田昌之. 養豚界. 第44巻第13号. 2009.
9. 岡崎哲司, 島田昌之. 畜産技術. 655, 8-11. 2009.
10. Okazaki T, Yoshida S, Sato W, Teshima H, Shimada M. Proceedings of The 4TH Congress of Asian Pig Veterinary Society. 178. 2009.