

精子の移動能による雄ウシの受胎性評価

田中沙知・川名陽子・濱野光市・齋藤 治・高橋達夫*・宮脇耕平*
・有馬 博

信州大学農学部附属農場, *長野県畜産試験場

Evaluation of Bull Fertility by Sperm Migration

Sachi TANAKA, Yoko KAWANA, Koh-ichi HAMANO, Osamu SAITO,
Tatsuo TAKAHASHI*, Kohei MIYAWAKI* and Hiroshi ARIMA

要 約

本実験は、雄ウシの受胎性を予測できる精子評価法の検索を目的に、受胎性の異なる黒毛和種ウシの凍結融解後の洗浄精子のペトリディッシュに設けた培地内における移動能を調べた。

精子は、71%の高受胎率を示す雄ウシ1個体と43%の2個体、1%以下の低受胎の1個体の凍結精子を用いた。培地はウシの頸管粘液を2%BSA添加BOで2倍に希釈した培地(BO/CM)と、1%BSA添加BO培地(BO/BSA)の2種類を用いた。精子の洗浄は、すべてBO/BSAを用いた。

ディッシュ内には長さ21cmの分節を作製した。2時間インキュベーション後の先頭の1精子の移動距離、先頭の30の精子集団の生存性とそれぞれの移動距離を測定した。

分節内を移動中の先頭集団の複数精子の生存性は、培地の違いにより異なり、BO/CMにおいて、雄ウシの受胎性と正の相関が認められた。先頭集団の複数精子の移動能は、雄ウシの受胎性とは相関は認められなかった。BO/CM内における先頭の1精子の移動能は、低受胎の雄ウシの精子が他の個体の精子に比べて有意に低かった。1回洗浄後の精子のBO/BSA内の移動能は、高受胎の雄ウシの精子が他の低受胎の個体の精子と比べて有意に高い値となった。以上のことから、ディッシュ内にBO/BSAで分節を作製し、BO/BSAで1回洗浄後、先頭の1精子の移動能を調べることで雄ウシの受胎性を予測することが可能であることが示唆された。

はじめに

人工授精に用いられる精液の評価は、授精前の精子の運動性と奇形に関する検査が中心であり、授精後の精子の受精能、さらには雄ウシの受胎性を判断することは難しい。

精子の雌生殖道内での移動と生存性は、生殖道の生理的および内分泌的变化に大きな影響を受ける。精子の雌生殖道の通過には様々な要因が影響し、精子の運動性もその1つとしてあげられる。精子の運動性は、雌の発情周期に伴う生殖道液を中心とした環境の変化や生殖道組織の収縮、あるいは上皮・腺細胞の運動に影響される¹⁾。技術的な要因から生体での精子の移動能力を客観的に判断することは困難である。近年、体外でコンピュータを利用して精液の解析を行うことで運動精子を客観的に評価する精子分析(CASA)法²⁾が開発された。これにより評価の再現性を高めることはできたが、

この方法では精子の運動性はスライドガラス上の任意の部位での検査と、ある瞬間における計測値しか表すことはできない。したがって、この検査結果は必ずしも長時間にわたる精子の運動性や移動能力を反映するものではなく、受胎率との相関は高くないといわれている²⁾。

これ以外の体外での精子の移動に関する研究では、種々の培地内を移動する精子の運動性や移動能力が評価されている。これまで、ウシ頸管粘液を利用したヒト^{3,4,5,6)} およびウシ⁷⁾ 精子の移動能力から、受精能あるいは受胎性を評価する試みが進められてきたが、再現性の高い結果は得られていない。ヒト精子では、不妊治療を目的とした、頸管粘液内でのヒト精子の貫通能力を調べた報告^{3,4,5,6,8,9)}が多い。最近、ペトリディッシュに設けた合成ヒト卵管培地内での、ヒト精子の移動能力を調べ、精子の凍結および洗浄処理による移動能力の違いが確認された⁹⁾。また、頸管粘液内を通過する精子の能力テストがヒト精子の受精能評価に、補助的に利用可能であることが報告されている^{3,6,8)}。凍結融解後のウシ精子においても、頸管粘液貫通能力が主観的な精子の運動性の評価よりも、受胎率と相関があると報告されている⁷⁾。また、受胎性の異なる雄ウシの精子は、洗浄後の運動性維持率の比較から、受胎率と正の相関があることが報告されている^{9,10)}。

以上のように、ヒト精子を中心にさまざまな精子の受精能の評価が試みられてきた。しかしながら、人工授精後の正確な受胎率の評価方法は、まだ確立されていない。そこで本研究は、人工授精に利用する雄ウシの受胎性が予測可能な評価法を探索することを目的に、受胎性の異なる黒毛和種雄ウシ精子のペトリディッシュ内に設けた培地および雌ウシ頸管粘液内での移動能力を調べた。

材料及び方法

供試精液： 黒毛和種ウシ精液は、人工授精後、71%の受胎率を示す雄ウシ1個体(A)、43%、43%の受胎率を示す雄ウシ2個体(B)(C)、1%以下の受胎率を示す雄ウシ1個体(D)の凍結精液を用いた。

培地の準備： 培地は、Brackett&Oliphant¹¹⁾(1975)の培養液(以下BO)を基礎培地に用い、これに1%ウシ血清アルブミン(和光)(以下BSA)を添加したBO(以下BO/BSA)を用いた。また、ウシ頸管粘液は、発情期の雌ウシから採取し、ストロー(0.25ml)に封入後、使用時まで凍結保存した。凍結保存したウシ頸管粘液は室温で融解後、2%BSAを添加したBOを同量加え、静かに攪拌し混合して調整した(以下BO/CM)。

カラムの準備： カラムは40 μ lのBO/BSAあるいはBO/CMを用い、直径60mmのプラスチックディッシュ(以下ディッシュ)(ファルコン)上に、一辺が3cmの分節をジグザグに連続して7本作製した。カラムはミネラルオイルで覆い、37 $^{\circ}$ Cに保温した。(図1)

精子の準備： 雄ウシA, B, C, Dのそれぞれの凍結精液は、37 $^{\circ}$ Cで融解後、等量のBO/BSAにより希釈し、1500rpm, 5分間、遠心分離することで洗浄した。精子浮遊液は、上澄を除去後、血球計算盤で精子濃度を計測し40 $\times 10^6$ 精子/mlとなるようにBO/BSAを加えて調整した。調整後の精子浮遊液は37 $^{\circ}$ Cに保温、静置した。3回の洗浄処理は上澄を除去後、BO/BSAを等量加え、同様に2回の遠心分離を繰り返す、精子濃度を調整した。

移動能テスト： ディッシュ内のミネラルオイル下の分節の先端に、洗浄後濃度を調整した精子浮遊液を2.5 μ lずつ静かに導入し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、95%空気の炭酸ガス培養器で2時間インキュベートした。インキュベーション後、倒立位相差顕微鏡（OLYMPUS）（100倍）で観察し、先頭の精子の移動距離を測定した。また、分節内の最長移動精子およびその後を移動する30の精子もあわせて観察し、それぞれの、生存率と移動距離を調べた。表記方法は、3cmの分節で1区画とし、さらに1区画の10等分を目視によって判定した。測定値は0.0から7.0までとした。

統計処理： 平均値をF検定後、スチューデントt検定を行い、比較した。

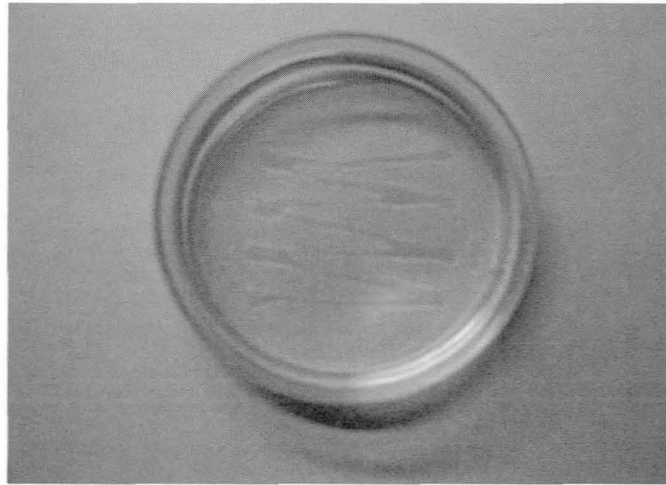
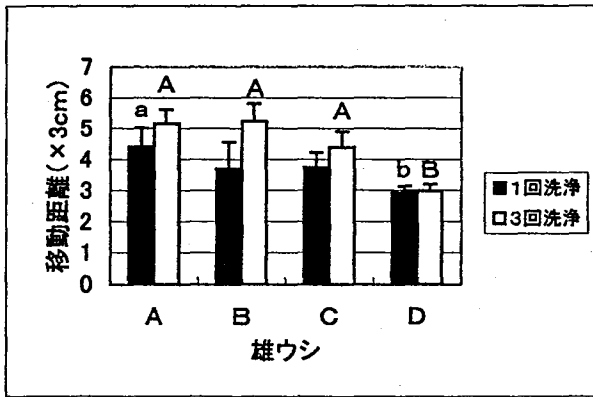


図1 精子の移動能評価用ディッシュ

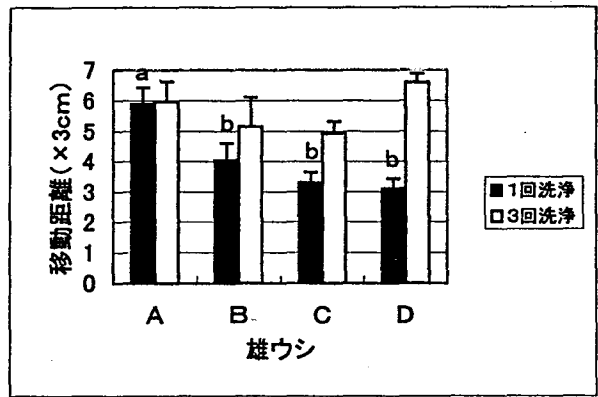
結 果

ウシ頸管粘液を含んだ培地BO/CMをカラムの作製に用い、BO/BSAで1回洗浄して移動能を調べた結果を図2に示した。雄ウシAの精子はDに比べ有意に高い値を示した。B、CはDよりも高い値を示したが、有意な差は見られなかった（図2）。同じカラムを用いてBO/BSAで3回洗浄後、移動距離を測定した場合、雄ウシDの精子はA、B、Cよりも有意に低い移動能を示した（図2）。カラムにBO/BSAを使用し同様にBO/BSAで洗浄し、移動距離を調べた結果を図3に示した。1回洗浄した場合、雄ウシAの精子は高い値を示し、B、C、Dとの間に有意な差が認められた。同様のカラムを用いてBO/BSAで3回洗浄した場合、それぞれの精子の値の間に有意な差は認められなかった。

先頭の精子およびその後の30の精子の移動距離と、インキュベーション2時間後の生存率を調べた結果は図4、5に示した。BO/CM培地に1回および3回洗浄後の精子を導入した時の移動距離は図4に示した。Dは最も低い5.7示したが、他の雄ウシの精子との間に有意な差は認められなかった（図4A）。BO/BSA培地を用いて調べた場合、Aが最も高い値を示し、B、C、Dの順に低い値を示した（図4B）。洗浄後に培地内を移動後の生存率を調べた結果は、図5に示した。BO/CM培地で1回洗浄後、Dは他の雄ウシより低い値を示し、雄ウシの受胎性に応じて低くなる傾向がみられた。3回洗浄後の精子では、A、BおよびDの生存率はそれぞれ86.70%、80.00%、48.35%となり、DはAよりも有意に低い生存率を示した。BO/BSA培地では、1回洗浄および3回洗浄ともに、Dが最も高い生存率、70.55%、75.45%を示した。



a, b 間、A, B 間で有意差あり (p<0.05)
 図2 先頭精子の移動能 (BO/CM培地)



a, b 間で有意差あり (p<0.05)
 図3 先頭精子の移動能 (BO/BSA培地)

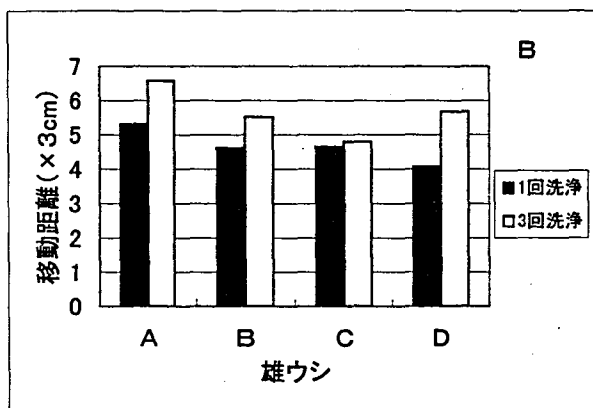
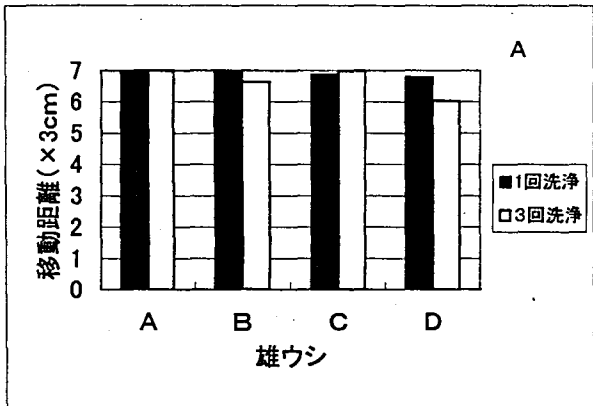


図4 先頭集団精子の移動能
 A BO/CM培地
 B BO/BSA培地

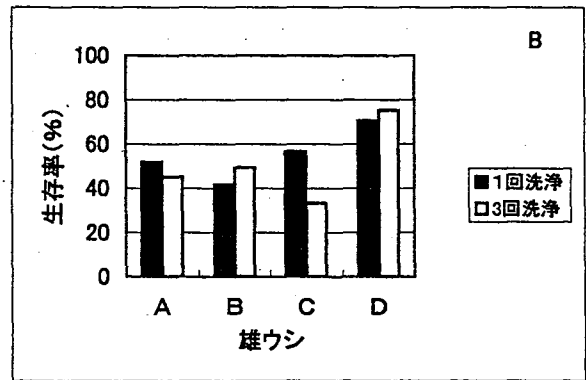
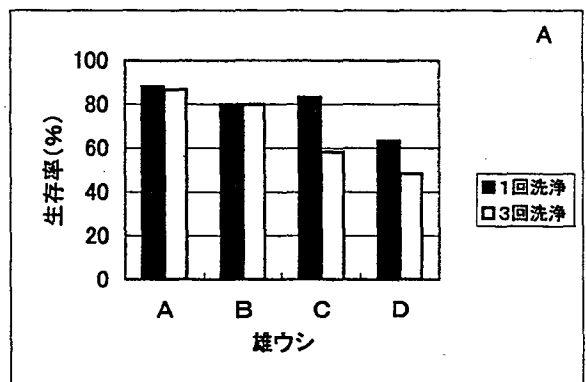


図5 先頭集団精子の生存性
 A BO/CM培地
 B BO/BSA培地

考 察

現在までに行われてきた頸管粘液を用いたさまざまな実験では、精子の直進運動と頸管粘液通過距離との相関が認められている^{4,5)}。しかしながら、受胎率との関係はまだ明らかにされていない。そこで、本実験では異なる培地を利用して受胎性の異なる雄ウシの精子の移動距離を計測し受胎率との相関を調べた。

本実験では、ウシの体外受精に利用される培地BO/BSAを用いて、ウシの頸管粘液を希釈した。精子は温度依存性が高いことが知られており、Muraseらの凍結融解精液を用いた、頸管粘液貫通力検査では、室温放置と38℃保持とでは、38℃に保持した方が高い値を示したと報告している⁷⁾。また、

ディッシュに設けた培地および精液はミネラルオイルで覆うことにより蒸発を防ぎ、恒温に保持し検査時の温度の影響を最小限にすることで、実験の再現性を高めた。BO/BSAで1回洗浄後の精子の移動能の比較では、高い受胎性を示す雄ウシAは低い雄ウシDより有意に高い値を示した。さらに、3回洗浄後における比較では、71~43%の受胎率を示した雄ウシ3頭A・B・Cと1%以下の値を示す雄ウシ1頭Dとの間に、有意な差がみられ、この2つの実験から、洗浄回数を増やすことによって精子の移動能に関して、低受胎雄ウシDを他の高受胎雄ウシと明確に区別することができた。洗浄回数を増やすことによって、精子浮遊液に含まれている凍害保護物質などが取り除かれたためと考えられる。これらの物質の除去によってやや受胎性の高い雄ウシB・Cの精子が移動距離を伸ばし、受胎性の低い雄ウシDの精子の移動距離との間に差がみられたと考えられる。

BO/BSAを培地に用いた1回洗浄後の精子の移動能の比較ではAの精子が有意に高い値を示し、3回洗浄後の比較では雄ウシの受胎性の違いによる移動能の差はみられなかった。1回洗浄後に高受胎の雄ウシAの精子の移動距離が大きい値を示したのは、受胎性の低い雄ウシB・C・Dの精子が残存する凍害保護剤に進行を阻害されたためだと推察され、これの存在する条件下でも高受胎の雄ウシAの精子は高い移動能を示した。これは、高受胎雄ウシAの精子が精子の移動にとって比較的悪条件であっても、より長距離を移動可能であると推論できる。BO/BSA培地を利用して3回洗浄後に精子の移動能を調べた場合、BO/CM培地を用いたときと同様に1回洗浄と比べていずれの精子も移動距離は長くなった。このことから、精液中の凍害保護物質が1回洗浄では残存しており、精子の移動能に影響を及ぼしていることが示唆される。また、BO/BSA培地と比較して、BO/CM培地で移動距離を測定したときの方が精子の移動距離が短くなる傾向がみられ、これは頸管粘液の粘性が精子の移動能を阻害していることが考えられる。3回洗浄により阻害物質が除かれていても、BO/CM培地に比べてBO/BSA培地内での精子の移動距離が長いことからもうかがえる。頸管粘液は約100から1000の微小分子の鎖を含むミセル単位に分けることができる巨大分子からなる。ムチン微小分子は少糖類とシアル酸側鎖で修飾されたポリペプチド骨格をもっている。頸管粘液はそれに含まれる蛋白質分解酵素によるムチンおよびその他の蛋白質の加水分解によって、物理的ならびに生理的变化を受ける¹²⁾。頸管粘液は、粘性・流体弾力性そして粘着性といった流動的特徴を持っており、プロゲステロンとエストロジェンのバランスが頸管分泌物の質的・量的な変化、あるいは生殖道内の筋肉や腺の運動を変化させて精子の移動に影響を与えることが知られている¹²⁾。運動精子は、大きな動く対象物に影響する慣性力より、むしろ粘液中の粘性力に力学的に平衡する、といわれている¹²⁾。これらのことから、BO/BSA培地を用いて3回洗浄した精子に差がみられなかった理由として、阻害するものがなかったために直進運動精子の培地内での移動距離が大きくなったのかもしれない。

さらに、本実験では先頭の30の精子の移動距離とその生存性を確認した。BO/BSAにより洗浄した精子のBO/CM培地内での移動能を調べた結果、1回洗浄および3回洗浄後の精子のいずれにおいても移動距離に有意差はみられなかった。しかしながら、BO/CM培地での検査においては、低受胎の個体の精子ほど生存率が低い傾向がみられたが、BO/BSA培地の検査では、高受胎雄ウシの精子の生存率が低い傾向にあり、逆の結果が得られた。雌生殖道内での精子の生存性は、受胎率と相関があると思われ、培地内での精子の生存性の比較が、BO/CM培地が雌生殖道内に近い環境であると推察された。本実験では、先頭の30精子の生存性について調べたが、さらに多数の精子について調べることも必要かもしれない。以上のことから、先頭1精子の移動能とあわせて、数時間後のBO/CM培地内の先頭集団複数精子の生存性も雄ウシの受胎性評価をする上で無視できないと思

われる。

本実験においては、雄ウシの受胎性を評価するために、頸管粘液を含む培地内を移動する精子の移動距離を測定することを試みた。実験の結果より、50%頸管粘液を含むBO/CM培地ではなく、BO/BSA培地を用いてディッシュ内に分節を作製し、同液で凍結精液を融解し、1回の洗浄処理後に得た精子を用いて分節内の先頭の1精子の移動距離を調べることで、人工授精後の雄ウシの受胎率を予測するし、受胎性を評価することが可能であると考えられる。また、分節内を移動中の先頭の複数の精子集団の生存率は、頸管粘液を含むBO/CM培地において受胎率と相関があることが示唆され、雄ウシの受胎性評価に利用可能であると思われた。以上のことから、凍結・融解精子を利用した体外における黒毛和種雄ウシの受胎性の評価に有効な知見が得られたと考えられる。

参考文献

- 1) Amjad MH, Sailen B, Botros R, Pandurang MK, Lan HT. Analysis of in vitro migration patterns of human spermatozoa by a petri dish-based horizontal column. *Biology of Reproduction*, 61:406-410. 1999.
- 2) Graham JK. In vitro assays of bull fertility. *Proceedings of the 15th Technical Conference on Artificial Insemination & Reproduction*, 74-84. 1994.
- 3) 伊熊健一郎・須野成夫・松田孝之・長谷川昭子・香山浩二・磯島晋三 乏精子症患者精子の精子機能に関する検討—ヒト・ウシ頸管粘液内通過能ならびに透明帯除去ハムスター卵による受精能について—。 *日本不妊学会雑誌*, 34:134-141. 1989.
- 4) 宮崎豊彦・田辺清男・名取道也・青木類・遠藤勝英・小林俊文・飯塚理八 ウシ頸管粘液を用いたヒト精子の運動性評価。 *日本不妊学会雑誌*, 34:630-635. 1987.
- 5) 中島敬和・水沼英樹・宇津木利雄・伊吹令人・五十嵐正雄。 ウシ頸管粘液 (Penetrak) を用いたヒト精子機能の評価。 *日本不妊学会雑誌*, 34:126-133. 1989.
- 6) Schirren B. Penetration ability of human spermatozoa into standardized bovine cervical mucus (Penetrak) in patients with normal and pathological semen samples. *Andrologia*, 19:217-224. 1987.
- 7) Murase T, Mukohhima K, Sakaguchi S, Tsubota T, Kita I. A simplified technique to determine the ability of spermatozoa to penetrate the estrous cervical mucus in Japanese beef cattle. *Journal of Reproduction and Development*, 45:425-428. 1999.
- 8) 伊藤直樹・立木仁・南部明民・三熊直人・高木良雄・梅原次男・丸太浩・熊本悦明 男性不妊症精液におけるPENETRAKの検討。 *日本不妊学会雑誌*, 34:159-164. 1989.
- 9) 濱野光市・河人亜紀・北村圭・徳田陽子・斎藤治・高橋達男・宮脇耕平・辻井弘忠・有馬博 運動性、低浸透圧液および頸管粘液検査による黒毛和種雄ウシの受胎性評価 *日本畜産学会北陸支部会報*, 81:63-68. 2000.
- 10) 河人 亜紀 1999年度 卒業論文
- 11) Brackett BG, Oliphant G. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biology of Reproduction*, 12:260-274. 1975.
- 12) E. S. E. Hafez. 編著 吉田重雄・正木淳二・入江明監訳。ハーフェツ 家畜繁殖学, 第5版, 451-494. 西村書店. 新潟. 1992.