ブタ精子の 10℃ 保存における精漿濃度が精子の運動性に及ぼす影響

田内静花・酒井幹子・山内伸彦*・下司雅也*

永井 卓*・橋爪 力・梶田博司

岩手大学農学部, 盛岡市上田 020-8550

* 農林水産省東北農業試験場, 盛岡市下厨川 020-0123

(1998 年 9 月 22 日受付)

要 約 保存液中への精漿の添加濃度が液状保存ブタ精子の運動性に及ぼす影響について検討した。精液は 2 頭のランドレース種雄ブタより採取した。遠心分離により精子と精漿を分離後, 精漿を 0, 1, 5, 15, 25, 50 および 75% の割合で Modena に添加し, これらに精子を浮遊させた計 7 試験区を設定し, 10℃ 下で保存した。なお, Modena を用いて濃厚部精液を 5 倍希釈したものを対照区とした。精子の運動性は Motility Analyzer を用いて, 保存 1, 7, 14, 21 および 28 日目に解析した。精漿を 0, 1 および 75% 添加した区の Motile および Progressive の値は, 雄ブタ A, B とも, 保存日数の経過につれ対照区の値に対して有意な低下を示した ($P < 0.05$)。これに対し, 5~25% 添加した区においては全保存期間を通して有意な変化は認められなかった。

以上の結果から, 保存液中への精漿の添加は保存精子の運動性保持に有効であるが, その濃度範囲は 5~25% であることが示された。また, 常法通りに濃厚部精液を 3~5 倍希釈した場合その精漿濃度は有効範囲内にあることが確認された。

結 言

ブタの人工授精においては主として液状保存精液が用いられている。液状保存液としては, 現在までにポリザノン, BTS, Kiev, Zorlesco, M-18, Butsch-wiler および Modena などが開発され, 利用されている¹⁻⁶⁾。この中でも Modena は長期保存性が良いという報告⁶⁾もあり, 日本国内ではわが国で開発されたポリザノンおよび M-18 のほかに, Modena も利用されるようになった。液状保存では濃厚部精液のみを希釈する場合と全精液を希釈する場合⁷⁾があり, 保存液と精漿との比率が著しく異なる。また, 保存時の精漿の有用性および影響については様々な報告があり, 特に凍結保存の場合, 精漿による塩害を避けるという目的で凍結前に精漿の除去が

行われる^{7,8)}。また, ウシ精子では精漿は冷却あるいは凍結による損傷を増強させる⁹⁾。一方, 精漿中には活性酸素種の影響から精子を防御する物質の存在が知られている^{4,10-14)}。さらに精漿中には精子の受精能や代謝能に関係する酵素など多種多様な物質が含まれている。したがって, 精子を保存する際に精漿の存在は精子の性状に様々に影響すると考えられる。しかしながら, ブタ精液を液状保存する際の精漿濃度の影響についての検討は十分に行われていない。

この実験では, 各種濃度の精漿を添加した Modena を用いてブタ射出精子を保存し, 精漿濃度が保存後の精子の運動性に及ぼす影響について検討した。

Effect of Seminal Plasma on the Motility of Boar Spermatozoa Stored at 10℃ for 28 Days

S. TAUCHI, M. SAKAI, N. YAMAUCHI*, M. GESHI*, T. NAGAI*, T. HASHIZUME and H. MASUDA

Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka, 020-8550

*Tohoku National Agricultural Experiment Station, Morioka, 020-0123

材料および方法

1) 供試精液

精液は岩手県農業研究センター畜産研究所繋養の正常な繁殖能力を有するランドレース種雄ブタ 2 頭（以下、雄ブタ A, B と称する）より手圧法により、濃厚部のみを採取した。

2) 精液の希釈・保存方法

濃厚部精液の一部を 50 ml 遠沈管に入れて、500 G, 15 分の遠心により得られた精漿を 0, 1, 5, 15, 25, 50 および 75% 添加した 7 試験区の Modena 保存液を調整した。残りの精液は Modena で希釈後遠心分離して、得られた沈澱精子を 7 試験区の Modena 保存液に浮遊させた。保存時の精子濃度は 1×10^8 /ml とし、0.5 ml マイクロチューブに分注後、空気層を除き密閉して、10℃ の恒温室にて保存した。対照区については、原精液を遠心後そのまま精子を再浮遊した後 Modena でおよそ 5 倍に希釈した。精子濃度を 1×10^8 /ml に調整し、試験区と同様に保存した。なお、対照区の精漿濃度はおよそ 15% であった。

3) 運動性の解析

希釈保存精液は 1, 7, 14, 21 および 28 日目に Modena を用いて 3×10^7 sperm/ml に希釈した。38℃, 1 時間の振とう培養後、Hamilton-Thorne Research Motility Analyzer (Ver. 10. 6) (以下、Motility Analyzer と略記) を用いて、精子の Motile および Progressive を測定した。それぞれの定義は以下に示す通りであった。

Motile : 5 μ m/sec 以上の速度を有する精子の割合。

Progressive : STR > 80.0% かつ VAP > MVV (25 μ m/sec) である精子の割合

STR : VAP/VSL

VAP (μ m/sec) : Path Velocity, 平均細胞パス速度。

VSL (μ m/sec) : Progressive Velocity, 直線速度を示し、トラックの始めから終わりまでの直線速度を経過時間で割った値。

4) 統計処理

全ての結果を arcsin 変換後、ANOVA および Fisher の PLSD 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た。

結 果

個体別の結果は次のようであった。

図 1. モデナ希釈液で 10℃ 保存したブタ精子の運動率と精漿濃度 (雄ブタ A)

Fig. 1. Motile of boar sperm (Boar A) stored at 10°C in Modena extender containing several concentrations of seminal plasma. Each value represents the mean $\pm$ SE for three replications in a boar.

* $P < 0.05$ compared with each corresponding values for controls.

雄ブタ A

1) Motile について

図 1 に示すように、5, 15, 25 および 50% 区においては全保存期間を通して対照区に対して有意な低下は認められなかった。しかし、0% 区においては 1 日目以降、また 1 および 75% 区においては 14 日目以降、対照区の値に対して有意な低下を示した ($P < 0.05$)。

各試験区での変化を見ると、対照区および 15% 区は保存 28 日目に、0, 1 および 75% 区においてはそれぞれ保存後 1, 14 および 7 日目以降、採取日の値に対して有意に低下した ($P < 0.05$)。

2) Progressive について

図 2 に示すように、5, 15, 25 および 50% 区においては全保存期間を通して対照区に対して有意な低下は認められなかった。しかし、0% 区においては保存 1 日目以降、1 および 75% 区においては保存 14 日目以降、対照

図 2. モデナ希釈液で 10°C 保存したブタ精子の前進運動率と精漿濃度 (雄ブタ A)

Fig. 2. Progressive of boar sperm (Boar A) stored at 10°C in Modena extender containing several concentrations of seminal plasma. Each value represents the mean $\pm$ SE for three replications in a boar. * $P < 0.05$ compared with each corresponding values for controls.

図 3. モデナ希釈液で 10°C 保存したブタ精子の運動率と精漿濃度 (雄ブタ B)

Fig. 3. Motile of boar sperm (Boar B) stored at 10°C in Modena extender containing several concentrations of seminal plasma. Each value represents the mean $\pm$ SE for three replications in a boar. * $P < 0.05$ compared with each corresponding values for controls.

区の値に対して有意に低下した ($p < 0.05$)。

各試験区での変化を見ると、対照区においては保存 21 日目以降、0% 区においては 1 日目以降、1 および 75% 区においては保存 7 日目以降、採取日の値に対して有意に低下した ($p < 0.05$)。また、15% 区においては全保存期間を通して有意な変化は認められなかった。

雄ブタ B

1) Motile について

図 3 に示すように、5、15 および 25% 区においては全保存期間を通して対照区に対して有意な低下は認められなかった。しかし、0% 区において保存 1 日目以降、75% 区においては 7 日目以降、1% 区においては 14 日目以降、対照区の値に対して有意に低下した ($P < 0.05$)。また、雄ブタ A とは異なり、50% 区において保存 28 日目に対照区の値に対して有意に低下した ($p < 0.05$)。

各試験区での変化を見ると、対照区においては保存 28 日目に、0% 区においては 1 日目以降、1 および 75% 区においてはそれぞれ 21 日目以降、採取日の値に対して有意に低下した ($p < 0.05$)。また、15% 区においては全

保存期間を通して有意な変化は認められなかった。

2) Progressive について

図 4 に示すように、5、15、25 および 50% 区においては、対照区に対して有意な低下は認められなかった。しかし、0% 区においては保存 1 日目以降、75% 区においては保存 21 日目以降、1% 区においては保存 28 日目に対照区の値に対して有意に低下した ($P < 0.05$)。

各試験区での変化を見ると、対照区においては保存 7、14、21 日目に、0 および 75% 区においてはそれぞれ 1 日目および 7 日目以降、採取日の値に対して有意に低下した ($P < 0.05$)。また、15% 区において 21 日目に採取日の値に対して有意に低下した ($P < 0.05$)。以上を要するに、精漿を 0、1 および 75% 添加した区の Motile および Progressive の値は、雄ブタ A、B とも、保存日数の経過につれ対照区の値に対して有意な低下を示した ($P < 0.05$)。これに対し、精漿を 5~25% 添加した区においては全保存期間を通して有意な変化は認められず、液状保存における精漿の有効性が認められた。

図 4. モデナ希釈液で 10°C 保存したブタ精子の前進運動率と精漿濃度 (雄ブタ B)

Fig. 4. Progressive of boar sperm (Boar B) stored at 10°C in Modena extender containing several concentrations of seminal plasma. Each value represents the mean $\pm$ SE for three replications in a boar. * $P < 0.05$ compared with each corresponding values for controls.

考 察

保存液に添加した精漿濃度の違いにより、保存精子の運動性に大きな変化が認められた。精漿 0% 区では保存日数の経過に伴って精子の運動性は急激に低下したが、精漿 1% 添加区では保存 10 日頃までは対照区と同程度の運動性が保持された。ヒツジ精液では精漿中の 5-10 KDa の低分子物質が精子の生存性に関与しているとの報告¹⁵⁾があり、ブタにおいても精漿の添加は精子の生存性の維持に有効であったとの報告¹⁶⁾がある。さらに、精漿には活性酸素種に対する防御機能を有することが報告されており、精漿 0% 区における精子の運動性の低下は、活性酸素種消去機能の欠如に起因することと考えられる。活性酸素、とくに O_2^- や過酸化水素およびヒドロキシラジカルは常時普遍的に生成され、強い細胞毒性を持つことが明らかにされた¹⁷⁾。とくに細胞核で生成された O_2^- に対応して DNA 傷害が生ずることがラットの実験で明らかにされている¹⁸⁾ ことから、精漿中の活性酸素消去機能の欠如が細胞内ミトコンドリア DNA に損傷

を与え、その結果急激に精子の運動性が低下した可能性もある。しかし、最近、ブタ精子の運動性の維持に精漿中の低分子マス成分が有効に作用することが報告された¹⁶⁾ ことから、有効成分の除去も運動性低下の原因の一つであると考えられる。一方で、過剰な精漿の添加は 0% 区と同様、保存日数の経過に伴い運動性の低下を招いた。この理由については精漿の過剰な添加が希釈保存液の特性を損ねたものと思われる。すなわち、保存液中に含まれる緩衝剤としてのクエン酸塩や重炭酸塩などの塩類の割合が多量の精漿によって希釈されたことによって緩衝能力が損なわれて、水素イオン濃度が低下したことや適度な塩類バランスの喪失などが考えられる。あるいはブタ精液を 10°C 下で保存しても酸性ホスファターゼ活性を抑制できないこと¹⁴⁾ から、酵素類が多量に存在することはむしろ保存中に精子の運動性の低下を招く原因となることも考えられる。

以上のことから、5~25% の精漿添加が 10°C 保存ブタ精子の運動性保持には必要なことが示された。さらに希釈および保存を常法 (濃厚部精液を 3~5 倍に希釈) 通り行うことは、精子の運動性を高く維持するとともに、その精漿濃度も有効な範囲内にあることが確認された。

引用文献

- 1) AALBERS, J.G., L.A. JOHNSON, J.H.M. RADEMAKER and H.J.G. GROOTEN : J. Anim. Sci., **57** (suppl.1), 314-315, 1983.
- 2) AALBERS, J.G., L.A. JOHNSON, J.H.M. RADEMAKER and H.J.G. GROOTEN : Proc. 10th Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem., Urbana, II, 180, 1984.
- 3) ALLARD, D. : Reprod. Dom. Biol., **31**, 275-276, 1996.
- 4) JOHNSON, L.A., J.G. AALBERS and H.J.G. GROOTEN : Zuchthyg., **25**, 49-55, 1988.
- 5) JOHNSON, L.A., J.G. AALBERS, C.M.T. WILLES, J.H. M. RADEMAKER and C.E. REXROAD, Jr. : J. Anim. Sci., **54**, 132-136, 1982.
- 6) 曾根 勝・知久幹夫・吉田光敏・番場公雄・小笠 晃 : 日豚会誌, **29**, 41-50, 1992.
- 7) 丹羽太左衛門・門司恭典・橋爪 力 共著 : 家畜人工授精論 (第 4 版) 97-98, 190-111, 創文, 東京, 1994.
- 8) 樹田博司 : 畜産の研究, **38**, 13-16, 1983.
- 9) PREITT, J.A., M.J. ARNS and K.C. POOL : Theriogenology, **39**, 291-296, 1993.
- 10) ALMLID, T., S.E. STAVNE and L.A. JOHNSON : Zuchthyg., **22**, 193-202, 1987.
- 11) ALVAREZ, J.G., J.C. TOUCHSTONE, L. BLASCO and B.T. STOREY : J. Androl., **8**, 338-348, 1987.

- 12) JONES, R., T. MANN and R.J. SHERINS : Fertil. Steril., **31**, 531-537, 1979.
- 13) BREZEZINSKA, S.E., A.B. SLEBODZINSKI, B. PIETRAS and G. WIECZOREK : Biol. Trace Elem., **47**, 69-74, 1995.
- 14) IIDA, I., Y. SEGO, R. TAKAHASHI and K. MURAMATU : Jpn. J. Fert. Steril., **15**, 123, 1970.
- 15) ASHWORTH, P.J., R.A. HARRISON, N.G. MILLER, J. M. PLUMMER and P.F. WATSON : Reprod. Fertil. Dev., **6**, 173-180, 1994.
- 16) HARAYAMA, H., A. IMANO, M. MIYAKE and S. KATO : Anim. Sci. Technol (Jpn), **69**, 720-727, 1998.
- 17) MOSER, H.E. and P.B. DERVAN : Science, **238**, 645-650, 1987.
- 18) PESKIN, A.V. and L. SHLYAHOVA : FEBS. Lett., **194**, 317-321, 1986.

Effect of Seminal Plasma on the Motility of Boar Spermatozoa Stored at 10°C for 28 Days

Shizuka TAUCHI, Mikiko SAKAI, Nobuhiko YAMAUCHI*, Masaya GESHI*,
Takashi NAGAI*, Tsutomu HASHIZUME and Hiroshi MASUDA

Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka, 020-8550

*Tohoku National Agricultural Experiment Station, Morioka, 020-0123

This experiment was designed to clarify the optimum concentration of the seminal plasma in Modena extender for the liquid storage of boar semen at 10°C.

The sperm rich fraction was collected from 2 Landrace boars. About half volume of the semen was centrifuged to collect the seminal plasma. Washed spermatozoa were suspended to 1×10^8 spermatozoa/ml with Modena extender that contained either 0, 1, 5, 15, 25, 50 or 75% seminal plasma. As a control the sperm rich fraction was diluted five fold with Modena extender. Each sperm suspension was stored anaerobically in 0.5 ml microtube for 28 days at 10°C. The motility and progressive of spermatozoa were analyzed on the 1, 7, 14, 21 and 28 days of storage by Hamilton-Thorn Motility Analyzer. Each stored semen was diluted to 3×10^7 spermatozoa/ml with Modena extender and incubated for 60 minutes at 38°C prior to analysis.

The motility and progressive of boar spermatozoa stored in Modena extender containing 5 to 25% seminal plasma were maintained better than those stored in Modena extender containing 0, 1, 50 and 75% of seminal plasma.

This result indicates that the optimum concentration of the seminal plasma in Modena extender is 5 to 25%. This state can be accomplished by a general method of diluting the sperm rich fraction in the range of 1 : 3 to 1 : 10 with an extender.

Jpn. J. Swine Science, **36**, 1 : 18-22

Key words : seminal plasma, liquid preservation, dilution rate, boar spermatozoa