

令和元年6月28日現在

機関番号：87110

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18810

研究課題名(和文) 子宮免疫反応制御技術を活用した新たな牛性選別精液人工授精システムの開発

研究課題名(英文) Development of a novel artificial insemination system with bovine sex-sorted semen using uterine immune reaction control technology

研究代表者

山口 昇一郎 (YAMAGUCHI, shoichiro)

福岡県農林業総合試験場・畜産部・研究員

研究者番号：30502520

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：牛性選別精液は通常精液と比べて封入精子数が少ないため、経産牛での受胎率が低いことが課題となっている。本研究では、精子損耗の要因となる子宮内白血球を制御し、子宮内での精子生存性を高めることによって性選別精液の受胎率が向上するかについて検討した。深部注入器を用いた牛性選別精液人工授精体系において精液と同時にカフェイン添加押出し液(通常は空気注入)を注入することにより、子宮内の白血球増加が抑制され、子宮内での精子生存性が高まることによって受胎率が向上する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、カフェイン添加押出し液を用いることによって牛性選別精液人工授精に起因する子宮内での白血球の増加が抑制され、精子生存性が高まることで受胎率が向上する可能性が示唆された。現在、性選別精液は経産牛で受胎率が低いため未経産牛での使用が推奨されている。しかし、酪農家からは能力が判明している経産牛での利用拡大が求められている。今後さらなる技術改良を行うことによって性選別精液利用拡大による酪農生産基盤拡大が期待される。

研究成果の概要(英文)：A lower number of encapsulated spermatozoa is obtained from bovine sex-sorted semen compared with normal semen; thus, it has a low conception rate in dairy cows. In this study, we examined whether the conception rate of bovine sex-sorted semen could be improved by increasing the number of uterine sperm and controlling the migration of polymorphonuclear leukocytes into the uterine lumen. The conception rate in a deep intrauterine artificial insemination system was suggested to be improved by coinjection of bovine sex-sorted semen and caffeine-supplemented diluent (usually air-infused), thereby inhibiting the migration of polymorphonuclear leukocytes into the uterine lumen and improving sperm viability.

研究分野：繁殖

キーワード：性選別精液 人工授精 牛 カフェイン 深部注入器 子宮内免疫反応制御 白血球 精子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 牛性選別精液とは、X 精子及び Y 精子の DNA 含量の違いに基づいて選別されたものであり、現在では、90%以上の精度で目的とする性の子牛が生産可能となっている。性選別精液を酪農現場において効率的に活用することができれば、泌乳能力等が優れた雌牛に性選別精液を用いて優秀な後継牛を確保することができる。さらに、後継牛を確保したうえで、低能力雌牛には、黒毛和種精液による人工授精 (F1 生産) もしくは黒毛和種の受精卵移植を行うことで子牛販売による副収入の増加が期待され、飼料高騰に苦慮している酪農家からの期待も大きい。一方で、性選別精液の人工授精 (AI) 後の受胎率は、未経産牛では、50%程度、経産牛では 30~40%となっており、通常精液と比べると低く、性選別精液普及の妨げとなっている。性選別精液における低受胎率の要因としては、選別操作による活力低下、また封入精子数が少ないこと (通常精液と比較し 1/4 程度) が挙げられている。

(2) AI により子宮内に注入された精子 (精液) は、雌体内で異物と認識され、子宮内に遊走した白血球にその多くが貪食される。申請者らは、豚において、精漿及びカフェインが体外における白血球の走化性及び精子貪食能を抑制し (Li et al. 2011, 2012)、豚凍結精液の AI に用いる精液希釈液への 10mM カフェインの添加が、AI 後の子宮内白血球数を抑制するとともに生存精子数を増加させ、その結果、繁殖成績を向上させることを明らかにした (Yamaguchi et al. 2009)。また、子宮上皮細胞における異物認識反応には、炎症性サイトカインの一部であり走化性に係る因子である IL-8 及び COX-2 が関与していることを示した (Yamaguchi et al. 2013)。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究成果をもとに、子宮内免疫反応を制御して、封入精子数が大幅に少ない牛性選別精液の受胎率を向上させる技術を確立することが目的である。具体的な研究項目は、深部注入器を用いた牛性選別精液 AI 体系における精液押し出し液 (通常は空気による注入であるが、本研究では精液と押し出し液を子宮内に同時注入する) について検討するため、希釈液 (押し出し液) への 10mM カフェイン添加による性選別精子の運動性への影響、AI 後の子宮内白血球数や精子生存率への影響、ホルスタイン種泌乳牛における子宮内免疫反応制御による性選別精液 AI 後の受胎率に及ぼす影響について検討した。

3. 研究の方法

(1) 試験 1: 性選別精液 AI 体系における精液押し出し液の検討

精液押し出し液の違いが精子運動性に及ぼす影響について検討するため、性選別精液を培養して経時的な精子活力を検討した。押し出し液に用いる希釈液は HEPES 添加 Brackett and Oliphant 等張液 (B0 液)、モデナ液 (Modena) およびカフェイン等の入った調整済みの市販の体外受精用培養液 (IVF100、機能性ペプチド研) とした。B0 液およびモデナ液は 10mM カフェインを添加した。性選別精液は、3 頭の種雄牛の凍結精液を用いた。性選別精液は融解後、それぞれの希釈液で 38 °C・6 時間培養し、顕微鏡下でその運動性を評価した。対照区は、無希釈でそのまま培養したものとした。

(2) 試験 2: 性選別精液 AI 後の子宮内の白血球数および精子生存性への検討

カフェイン添加精液押し出し液 (以下希釈液はモデナ液とする) が、性選別精液 AI 後の子宮内の白血球数や精子生存性に及ぼす影響について明らかにするため、発情期の 5 頭の乳用種未経産牛に深部注入器を用いて性選別精液 AI を行い、AI 5 時間後に子宮灌流を行って、白血球及び精子を回収後、遠心処理した後顕微鏡下でそれぞれをカウントした。試験区は、AI 未実施区、カフェイン無添加区および 10mM カフェイン添加区とした。

(3) 試験 3: 性選別精液 AI による受胎率への影響

カフェイン添加押し出し液が受胎性に及ぼす影響について検討するため、泌乳牛に深部注入器を用いて性選別精液の AI を行った。対照区 (n=25) は空気による注入とし、試験区 (n=18) は押し出し液として 20mM カフェイン添加モデナ液 1ml (輸入精液の場合には 0.75ml) を用い、精液とともに押し出し液 (子宮内でのカフェイン最終濃度 10mM) を同時注入した。

4. 研究成果

試験 (1): 性選別精液 AI 体系における精液押し出し液の検討

性選別精液を融解後、精液を希釈して経時的な精子活力を顕微鏡下で評価した。培養 1 時間目までは運動性に差が認められなかったが、培養 3 時間目において B0 液区および IVF100 区において対照区及びモデナ液区に比べて有意な精子活力の低下が認められた (P<0.05、図 1)。モデナ液区は対照区と精子活力に差は認められずカフェインを添加する希釈液としてモデナ液が適していると考えられた。

試験 (2): 性選別精液 AI 後の子宮内の白血球数及び精子生存性への検討

カフェイン無添加区は AI 未実施区に比べ AI 後の有意な白血球数の増加が認められ (P<0.05、図 2)、灌流液からの精子発見率は 40% (2/5) であった。カフェイン添加区は白血球数の有意

な増加は認められず、精子発見率は 80% (4/5) であった。以上のことからカフェイン添加押出し液で精液とともに同時注入することで子宮内での免疫反応が低下し、精子生存性が向上することが示唆された。

試験 (3): 性選別精液 AI による受胎率への影響

泌乳牛への性選別精液 AI 後の受胎率は、対照区の 40.0% に対して、試験区は 44.4% であり、有意差は認められないものの試験区が高い傾向が認められた (図 3)。なお、試験区における AI 後の不受胎牛において AI に起因する子宮内膜炎等の発生は認められなかった。

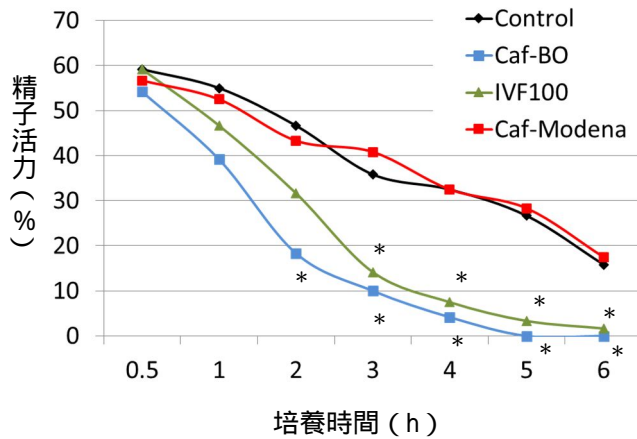


図 1 . 培養液の違いが性選別精子の運動性に及ぼす影響

注) n=3, *P<0.05

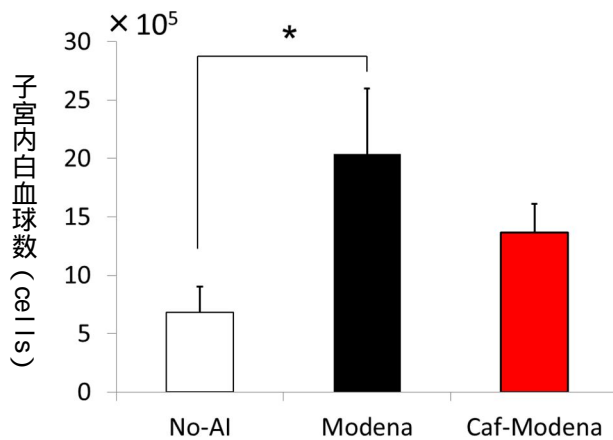


図 2 . 性選別精液 AI 後の子宮内白血球数

注) n=5, *P<0.05

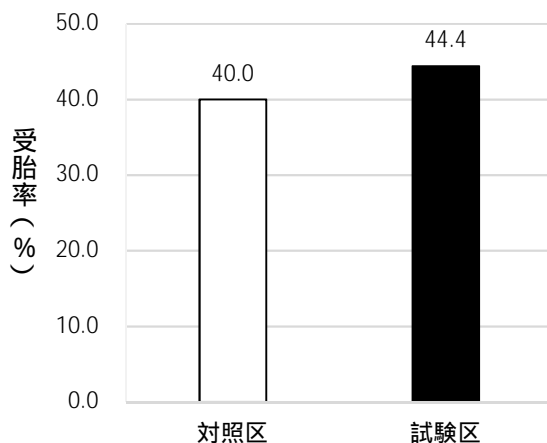


図 3 . 性選別精液 AI 後の受胎率

注) 対照区 ; n=25、試験区 ; n=18

以上のことから、深部注入器を用いた性選別精液 AI 体系において、押し出し液として 20mM カフェイン添加モデナ液を用いて性選別精液の AI を行うと、AI に起因する子宮内白血球数の有意な増加が抑制され、子宮内の精子生存性および受胎性を向上させる可能性があることが示唆された。

<引用文献>

Li JC, Yamaguchi S, Kondo Y, Funahashi H.
Caffeine, dibutyryl cyclic-AMP and heparin affect the chemotactic and phagocytotic activities of neutrophils for boar sperm in vitro. *Theriogenology* 75:1336-45, 2011

Li JC, Yamaguchi S, Funahashi H.
Boar seminal plasma or hen's egg yolk decrease the in-vitro chemotactic and phagocytotic activities of neutrophils when co-incubated with boar or bull sperm. *Theriogenology* 77:73-80, 2012

Yamaguchi S, Funahashi H, Murakami T.
Improved fertility in gilts and sows after artificial insemination of frozen-thawed boar semen by supplementation of semen extender with caffeine and CaCl₂. *Journal of Reproduction and Development* 55:645-649, 2009

Yamaguchi S, Suzuki C, Funahashi H, Kikuchi K, Nagai T, Yoshioka K.
Effects of caffeine on sperm characteristics after thawing and inflammatory response in the uterus after artificial insemination with frozen-thawed boar semen. *Theriogenology* 79:87-93, 2013

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計2件)

山口 昇一郎、林 武司、浅岡 壮平、上田 修二、馬場 武志、牛性選別精液人工授精におけるカフェインの添加が精子の運動性および人工授精後の子宮内白血球数に及ぼす影響、第 111 回日本繁殖生物学会大会、2018

山口 昇一郎、林 武司、柴田 果歩、上田 修二、柿原 孝彦、牛性選別精液人工授精におけるカフェインの同時注入が人工授精後の子宮内環境および受胎率に及ぼす影響、第 112 回日本繁殖生物学会大会、2019

[その他]

山口 昇一郎、高糖分高消化性 WCS の活用方法と性判別精液の新しい AI 方法について、福岡県人工授精師協会事例発表会、2017

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山口 昇一郎 (YAMAGUCHI, shoichiro)
福岡県農林業総合試験場・畜産部・研究員
研究者番号(8桁): 30502520

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。