

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：87110

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16010

研究課題名(和文)子宮内免疫反応制御による牛性選別精液人工授精方法の確立とその制御機構の解明

研究課題名(英文) Establishment of artificial insemination method with bovine sex-sorted semen by controlling uterine immune response and elucidating the control mechanism

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：乳牛性選別精液は、経産牛での受胎率が低いことが問題となっている。その要因として、封入精子数が大幅に少なく、また選別による精子へのダメージが報告されている。そこで、深部注入器を用いた人工授精において、精子の運動性に関与するミトコンドリアへの保護効果があると報告されているレスベラトロールを同時注入することによって、精子運動性や子宮内膜遺伝子発現への影響および受胎率について検討した。検討の結果、レスベラトロール注入により、精子運動性が長く維持されるとともに子宮内膜における炎症性サイトカイン(IL-1)の遺伝子発現が抑制されることが明らかとなった。受胎率については、影響が認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

牛性選別精液の人工授精において高い受胎率を得るためには、よい発情の牛に確実に授精することが一番と考えられており、注入技術の改良によって受胎率向上を図ることは難しいのが現状である。本研究により、レスベラトロールを性選別精液と同時注入することによって、子宮内での精子生存性を向上させられる可能性があることが明らかとなった。今後さらなる検討により、より多くの卵子に受精させる必要がある過剰排卵処置牛への授精などへの応用にも期待される。

研究成果の概要(英文)：The use of sex-sorted semen in dairy cows is problematic as it is associated with a low conception rate in multiparous cows. One contributing factor is that the number of enclosed spermatozoa is significantly lesser than that in normal semen, and another factor is the damage sustained by the spermatozoa during sorting. Resveratrol has been reported to have a protective effect on mitochondria involved in sperm motility. Therefore, in this study, we investigated the effect of intrauterine infusion of resveratrol in the sex-sorted semen AI system using deep intrauterine insemination. We examined post-thaw sperm motility, inflammatory cytokine mRNA expression in the endometrium after AI, and the conception rate.

The result of the examination clarified that the addition of resveratrol extended sperm motility and suppressed the expression of mRNA for inflammatory cytokine interleukin-1 in the endometrium. However, no effect was observed on the conception rate.

研究分野：家畜繁殖

キーワード：性選別精液 人工授精 乳牛 レスベラトロール カフェイン 深部注入器 炎症性サイトカイン 子宮内膜遺伝子発現

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 牛性選別精液とは、X精子および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。性選別精液が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から優秀な後継牛を確保することができる。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%で、通常精液に比べると低く、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、選別操作による精子活力低下、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。我々は、豚において、精漿およびカフェインが体外における白血球の走化性およ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およびCOX-2が関与していることを示した(Yamaguchi et al. 2013)。

(3) 牛においては、深部注入器を用いた性選別精液のAIにおいて、カフェインを添加した精液希釈液を同時注入することにより、AI後の子宮内白血球数の増加を抑制できることを報告した(山口ら. 2021)。また、受胎率については、有意差はないものの慣行法より高い傾向を示した。

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精子の生存性を向上させることに加え、精子の運動性に関与するミトコンドリアへの保護効果が報告されているレスベラトロールを添加して精子の運動性を長期化することにより牛性選別精液AI後の受胎率を向上させるための基盤研究を行う。具体的な研究項目は、精子運動性を指標とした最適なレスベラトロール添加濃度の解明、性選別精液AI後の子宮内膜をサンプリングし、炎症性サイトカインなどの遺伝子発現へ及ぼす影響、性選別精液AI後の受胎率へ及ぼす影響について検討した。

3. 研究の方法

(1) 試験1: 精液希釈液へのレスベラトロールの添加が精子運動性や精子ATPに及ぼす影響
試験方法: 凍結精液を融解後、20mM カフェイン添加モデナ液にレスベラトロールを0~300 μ M添加した希釈液で等倍に希釈し、38℃で培養した。対照は、希釈せずにそのまま培養したものとした。精子中のミトコンドリア活性の指標となるATP含量は、融解6時間後に計測した。

(2) 試験2: 性選別精液人工授精後の子宮内膜遺伝子発現への影響

AI方法: レスベラトロール300 μ M添加希釈液1mlを用いてYTガンで性選別精液のAIを実施。

試験区: AI未実施(Control)、空気注入(慣行法、Air-AI)、レスベラトロール無添加希釈液による注入(NoRes-AI)、レスベラトロール添加希釈液による注入(Res-AI)

遺伝子発現解析方法: サンプリングした子宮上皮細胞は、常法によりRNA抽出後、cDNAを作成し、SYBR GreenによるリアルタイムPCRによって遺伝子発現を解析。解析した遺伝子は、炎症反応(TNF- α 、IL-1、IL-8)、抗老化因子(Sirt1)。

(3) 試験3: 受胎率に及ぼす影響

試験区は、レスベラトロール300 μ M添加希釈液1mlを用いてYTガンで性選別精液のAIを実施(Res-AI)。対照区は、空気精液を注入(Air-AI)。供試牛は、経産牛とした。

4. 研究成果

(1) 試験1: 精液希釈液へのレスベラトロールの添加が精子運動性や精子ATPに及ぼす影響
精液を融解後、3時間目までは精子運動性に差は認められなかったが、融解6時間後には、無希釈区が300 μ M添加区に比べ有意に運動性が低下した(図1)。また、精子運動性低下抑制の要因は、精子中のミトコンドリアが保護されたものと推察された(図2)。

(2) 試験2: 性選別精液人工授精後の子宮内膜遺伝子発現への影響

炎症性サイトカインであるIL-1の遺伝子発現は、レスベラトロール無添加の場合には、人工授精未実施に比べ有意に増加したが、レスベラトロール添加によって有意な増加が認められなかった(図3)。このことからレスベラトロールは、人工授精に起因する炎症反応を低下させる働きがある可能性が示唆された。その他の遺伝子は、差が認められなかった。

(3) 試験3：受胎率に及ぼす影響

受胎率には、レスベラトロールの影響は認められなかった(表1)。

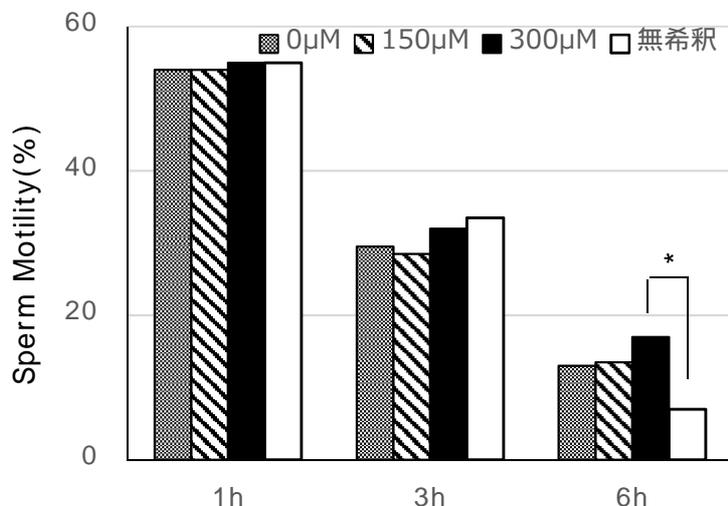


図1 レスベラトロールの添加が融解後の精子運動性に及ぼす影響

注)1. 供試種雄牛頭数 5 頭

注)2. *;有意差あり (P<0.05)

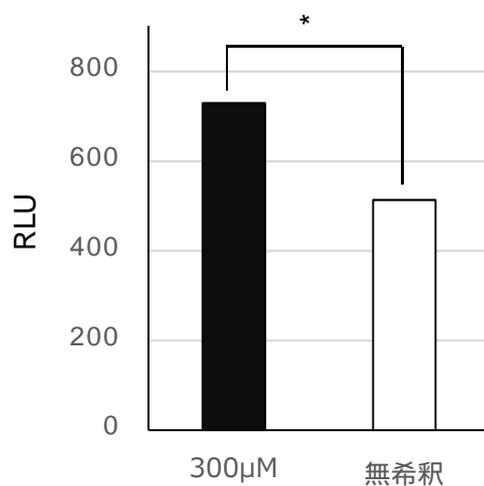
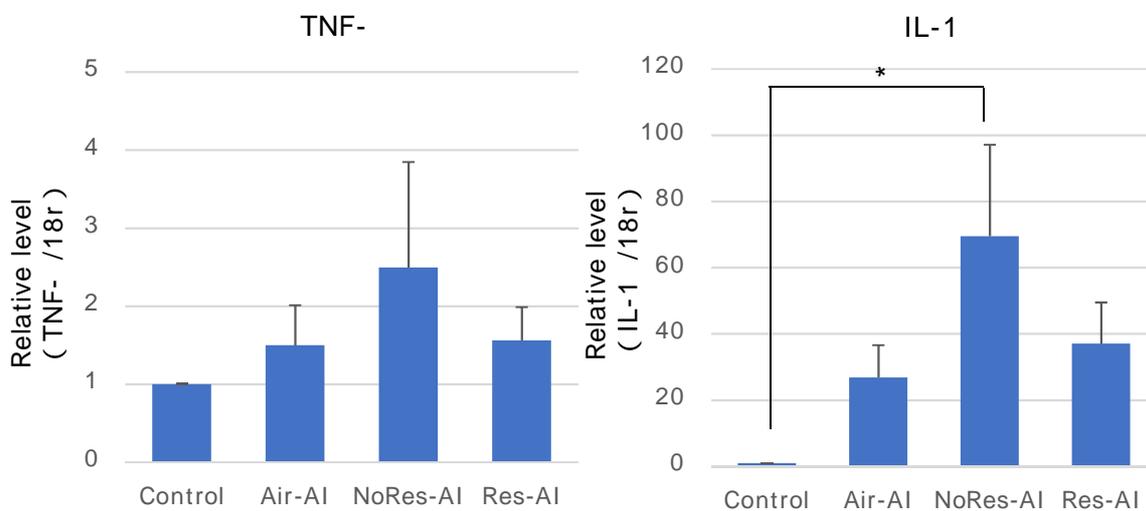


図2 レスベラトロールの添加が融解後の精子 ATP に及ぼす影響

注)1. 供試種雄牛頭数 8 頭

注)2. *;有意差あり (P<0.05)



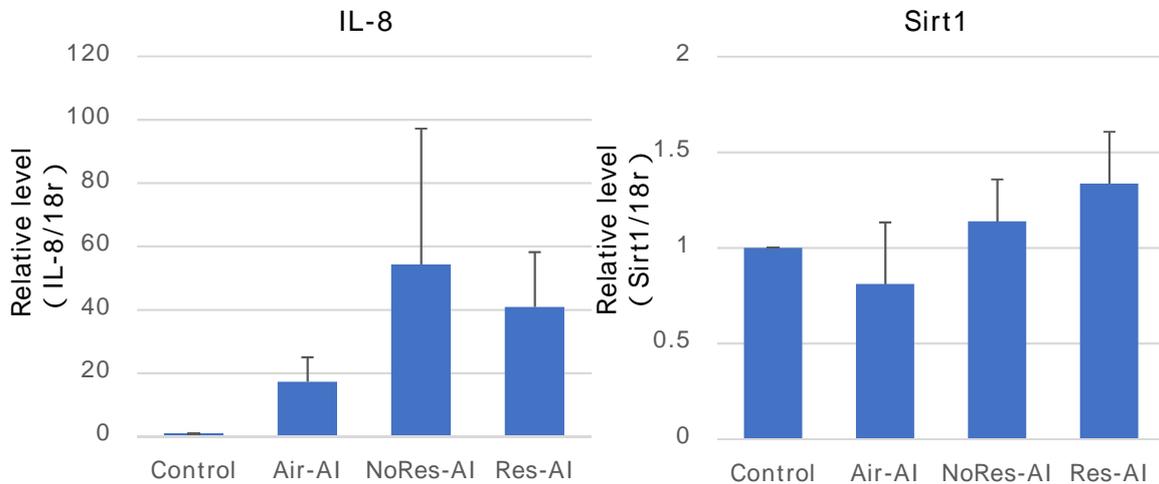


図3 人工授精後の子宮内膜遺伝子発現に及ぼす影響

注)1. 供試頭数 7 頭

注)2. *;有意差あり (P<0.05)

表1 受胎率に及ぼす影響

	受胎率 %
試験区 (Res-AI)	36.8(7/19)
対照区 (Air-AI)	42.1(8/19)

<引用文献>

- Li JC, Yamaguchi S, Kondo Y, Funahashi H.
Caffeine, dibutyl 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
- 山口 昇一郎, 林 武司, 柴田 果歩, 上田 修二, 柿原 孝彦. 乳牛性選別精液人工授精におけるカフェインの子宮内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. *日本畜産学会報* 92:465-470, 2021

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 YAMAGUCHI Shoichiro、HAYASHI Takeshi、SHIBATA Kaho、UEDA Syuji、KAKIHRA Takahiko	4. 巻 92
2. 論文標題 Effect of intrauterine caffeine infusion on the intrauterine environment and conception rate after artificial insemination with sex-sorted semen in lactating dairy cows	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nihon Chikusan Gakkaiho	6. 最初と最後の頁 465 ~ 470
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2508/chikusan.92.465	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口昇一郎、藤井英之、柿原孝彦
2. 発表標題 牛性選別精液人工授精におけるレスベラトロールの同時注入が、精子の運動性、子宮内膜遺伝子発現および受胎率に及ぼす影響
3. 学会等名 日本畜産学会第130回大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------