

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14987

研究課題名(和文)高妊孕性精子とは何か：牛精子サブポピュレーション構成に着目した受胎性予測法の開発

研究課題名(英文)Development of a method for prediction of bull semen fertility focusing on the structures of sperm motility subpopulation

研究代表者

菅野 智裕 (Kanno, Chihiro)

北里大学・獣医学部・助教

研究者番号：20834469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、人工授精受胎率の良好な精子、すなわち高妊孕性精子の特徴を決定することを目的として、精子の運動性サブポピュレーションをはじめ、精子細胞機能と、人工授精受胎率との関係を解析した。その結果、高受胎性精液中には、頭部を細かく頻繁に振動して直進する、凍結精液融解から時間が経過しても高いミトコンドリア活性を維持する、寿命の長い精子を多数含む一方、低受胎性精液は、頭部を大きく振動しながら曲線的に運動し、精液融解後の時間経過とともに細胞膜の完全性を維持できなくなる精子を多く含むことが明らかとなった。本研究課題の遂行により、人工授精の実施無しに牛精液の受胎性予測を可能とする要因の一部を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、精子の実験室的検査は広く行われてきた一方、その妊孕性を高精度に予測可能な手法は無かった。本研究の成果から、牛における高妊孕性精子の特徴の一端を解明することができた。今後、学術的には精子の運動様式の差異を生み出す機構の解明、社会的には人工授精所における精液検査の手法や新規凍結精液作製による、精液の品質管理および向上に、それぞれ繋がっていく知見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the relationship between bovine sperm quality, including sperm motility subpopulation, and semen fertility to clarify the characteristics of highly fertile sperm. As a result, sperm in semen with high conception rate in artificial insemination (AI) showed linearly moving with high beat-cross frequency, maintain high mitochondrial activity even after thawing of frozen semen. This suggests sperm with linear movement have a long life span and high fertility. On the other hand, sperm in semen with a low conception rate in AI moved curvilinearly with large amplitude of head. These sperm could not maintain cell membrane addition integrity after a long time after thawing of semen. The results of this study show some of the factors that make it possible to predict the fertility of semen from cattle without AI tests in the field.

研究分野：繁殖学

キーワード：精子 牛 人工授精 妊孕性 運動性サブポピュレーション

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

牛の生産にはほとんどの場合、凍結精液が利用されている。凍結精液の品質管理を目的として、様々な精子性状の検査が行われているが、人工授精受胎率を予測できるような手法は無い。高妊孕性精子の特徴が不明な状況では、凍結精液の品質改善において、どのような精液を作製すべきかを定めることができない。

### 2. 研究の目的

牛精子の運動様式すなわち運動性サブポピュレーションをはじめ、細胞機能、寿命、受精能獲得状況などにより精子性状を判定し、生産現場における人工授精受胎率との関係を解析し、人工授精受胎率の良好な精子、すなわち高妊孕性精子の特徴を決定することを目指す。

### 3. 研究の方法

人工授精受胎率が異なる種雄牛由来の凍結精液を用いて、精液融解後の精子性状を評価した。精子の運動性は、精子運動性自動解析装置 (CASA) を用いて精子個々の運動性パラメータを測定した後、クラスター解析の手法にて、精子の運動様式によるグループ分け (サブポピュレーション解析) を実施して評価した。細胞機能は蛍光染色およびフローサイトメトリーを利用して、細胞膜完全性、先体完全性、ミトコンドリア活性、細胞内カルシウム濃度、活性酸素、細胞膜流動性の各項目を評価した。それらの結果と人工授精受胎率との関係を解析し、人工授精受胎率が高い精液中に含まれる精子の特徴付けを行った。

また、これらの手法の有用性を検証するため、黒毛和種およびホルスタイン種由来の凍結精液の精子運動性および細胞機能の比較を行い、それらのホルスタイン種雌牛への人工授精時の受胎率との関係を検討した。さらに、雄雌の産み分けを可能とするが通常の精液よりも人工授精受胎率が低いことが知られている性選別精液についても、CASA を用いた精子運動様式評価を実施した。

### 4. 研究成果

人工授精受胎率が異なる精液間において、高受胎性精液中には、頭部を細かく頻繁に振動して直進する精子 (図1) が多数含まれていた。これらは凍結精液融解から時間が経過しても生存しており、高いミトコンドリア活性を維持していた。一方、低受胎性精液は、頭部を大きく振動しながら曲線的に運動 (図1) し、精液融解後の時間経過とともに細胞膜の完全性を維持できなくなり死滅する精子を多く含むことが明らかとなった。すなわち、高受胎性精液中の精子は寿命が長く、そのような精子は頭部を頻繁に振って直進運動を示すという特徴が判明した。一方、細胞内カルシウム濃度、活性酸素、細胞膜流動性については精子妊孕性との関連が報告されているものの、本研究においては人工授精受胎率による差異を認めなかった。

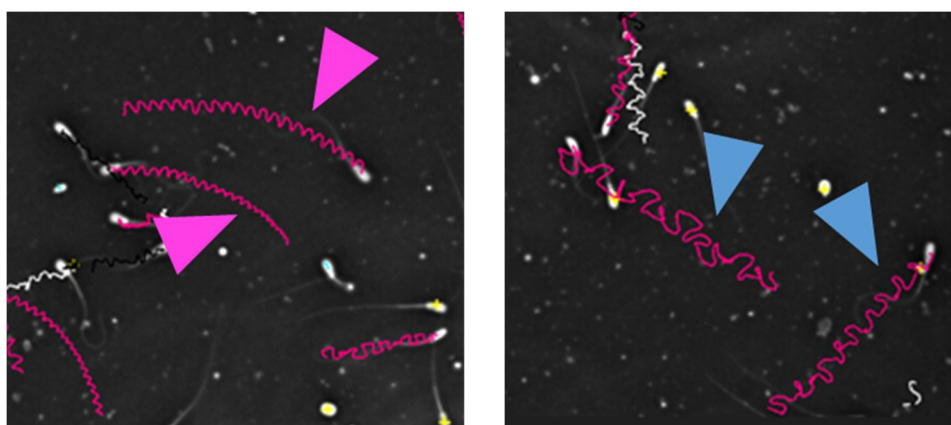


図1. 高受胎性精液 (左) および低受胎精液 (右) 中に多く存在する精子の運動様式

品種間での精子性状比較において、黒毛和種精液ではホルスタイン種の精液よりも、融解直後の時点で細胞膜正常、先体正常で高いミトコンドリア活性を有する精子の割合が高かった。また、精子サブポピュレーション構成を比較したところ、ホルスタイン種では頭部を大きく振りながら高速で運動する精子が多い一方、黒毛和種では運動速度はホルスタイン種に劣るが、頭部を細かく頻繁に振動しながら直進する精子が高率に存在していた。さらに、ホルスタイン種雌牛に人工授精を行った場合の人工授精成績を両品種間で比較したところ、ホルスタイン種比較して黒毛和種でより高い分娩率を示した。

さらに、性選別精液と通常の凍結精液とで精子運動様式を比較した場合でも、通常 of 凍結精液と比較して人工授精受胎率が低い性選別精液では、頭部を大きく振動しながら曲線的に運動する、低妊孕性精子に特徴的な運動様式を示す精子が高率に存在していた。

これらの結果から、人工授精受胎率が異なる精液間で明らかとなった精子妊孕性と細胞的特徴との関係は、品種間の比較や性選別処理による傷害でも当てはまる、牛精子において品種を超えた普遍的特徴である可能性が示された。

本研究で得られた成果から、学術的には高妊孕性精子が示す細胞的特徴、特に運動様式を生じるメカニズムの解明、酪農、畜産の生産上は、商業的に流通する精液の品質管理や新規凍結保存方法の開発による品質向上という観点から重要な成果であると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 TAKAESU Noboru, KANNO Chihiro, SUGIMOTO Kosuke, NAGANO Masashi, KANEKO Akihisa, INDO Yoriko, IMAI Hiroo, HIRAI Hirohisa, OKAMOTO Munehiro, SASHIKA Mariko, SHIMOZURU Michito, KATAGIRI Seiji, TSUBOTA Toshio, YANAGAWA Yojiro	4. 巻 84
2. 論文標題 Semen collection by urethral catheterization and electro-ejaculation with different voltages, and the effect of holding temperature and cooling rate before cryopreservation on semen quality in the Japanese macaque (&lt;i&gt;Macaca fuscata&lt;/i&gt;)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 429 ~ 438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.21-0590	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 -
1. 著者名 Elweza Ahmed E., Marey Mohamed A., Elesh Ibrahim F., Zinnah Mohammad A., Akthar Ihshan, Kanno Chihiro, Takagi Mitsuhiro, Miyamoto Akio	4. 巻 107
2. 論文標題 Zearalenone interferes with the sperm-triggered inflammation in the bovine uterus in vitro: Negative impact on sperm motility and survival	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Reproductive Toxicology	6. 最初と最後の頁 81 ~ 89
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reprotox.2021.12.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kanno Chihiro, Sun Sik Kang, Sakamoto Kentaro Q., Yanagawa Yojiro, Katagiri Seiji, Nagano Masashi	4. 巻 93
2. 論文標題 Relationship between frame rates and subpopulation structure of bovine sperm divided by their motility analyzed by a computer assisted sperm analysis system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/asj.13796	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 FURUKAWA Eri, KANNO Chihiro, YANAGAWA Yojiro, KATAGIRI Seiji, NAGANO Masashi	4. 巻 68
2. 論文標題 Relationship between the timing of insemination based on estrus detected by the automatic activity monitoring system and conception rates using sex-sorted semen in Holstein dairy cattle	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 295 ~ 298
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2022-006	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 -

1. 著者名 菅野智裕	4. 巻 14
2. 論文標題 牛人工授精用凍結精液に関する最新の知見と技術革新	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 産業動物臨床医学雑誌	6. 最初と最後の頁 10~16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 SATO Shogo, KAKIZAKI Takehiko, KONDO Kao, KANNO Chihiro, MAEDA Yosuke, ANDO Ryo, PARK Chun-Ho, KAWAGUCHI Hiroaki, TAKAHASHI Fumiaki	4. 巻 85
2. 論文標題 Arnold Chiari malformation classified as Chiari 1.5 malformation in a Japanese black calf	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 546 ~ 550
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.22-0463	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 -

1. 著者名 Takahashi Fumiaki, Kanno Chihiro, Maeda Yosuke, Sato Shogo, Takai Shinji	4. 巻 10
2. 論文標題 Oesophageal obstruction caused by ingestion of rice chaff used as bedding material in four Japanese black calves	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Veterinary Record Case Reports	6. 最初と最後の頁 e477
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/vrc2.477	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 KANNO Chihiro, SATO Shogo, KUSAKA Hiromi, MAEDA Yosuke, TAKAHASHI Fumiaki	4. 巻 85
2. 論文標題 Accidental laceration of the vaginal wall by an intravaginal thermometer as a calving detection device in a Japanese black cow	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 363 ~ 366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.22-0511	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 -

1. 著者名 Kanno Chihiro, Sakamoto Kentaro Q., Kang Sung-Sik, Yanagawa Yojiro, Katagiri Seiji, Nagano Masashi	4. 巻 2023
2. 論文標題 The Difference in Subpopulation Structures in Sex-Sorted and Non-Sorted Semen by Discriminant Analysis of Bull Sperm Motility Data Collected by a Computer-Assisted Sperm Analysis System	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Andrologia	6. 最初と最後の頁 1 ~ 7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2023/9944344	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 該当する

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 菅野智裕, 伊藤陽輔, 高橋健一
2. 発表標題 ホルスタイン種および黒毛和種由来凍結精液中の精子性状の比較
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 行田高弘, 宍戸里帆, 初倉茂朗, 大泉諭士, 新国大河, 工藤絢, 中神 丈浩, 三木貴史, 菅野智裕, 齋藤哲也
2. 発表標題 ホルスタイン種雌牛への追い移植時における非黄体側移植の実用性の検討
3. 学会等名 第77回北海道家畜人工授精技術研修大会 2021年10月15日
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菅野智裕
2. 発表標題 クラスター解析を用いた牛精子における運動様式評価 -精子運動性サブポピュレーションに着目した受胎性予測法の開発-
3. 学会等名 日本アンドロロジー学会第41回学術大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村田有加, 高橋芳幸, 早川宏之, 佐藤将伍, 前田洋佑, 高橋史昭, 菅野智裕
2. 発表標題 牛凍結精液中の精子運動性サブポピュレーション構成が人工授精受胎率に与える影響
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西尾千尋, 菊池元宏, 菅野智裕, 日下裕美, 三浦弘, 坂口実
2. 発表標題 犬凍結精液希釈液へのL-アラニルグルタミン添加が融解後の精液性状に及ぼす影響
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荒古江美紗, 柳川洋二郎, 前田洋佑, 高橋史昭, 佐藤将伍, 桃沢健二, 永野昌志, 菅野智裕
2. 発表標題 アルパカの分娩予測法確立に向けた妊娠雌個体における糞中プロジェステロン濃度および体温推移の検討
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松原里奈, 近藤香央, 小泉和生, 中村円香, 佐々木汐帆, 石戸谷和季, 田村慎之介, 小笠原英毅, 佐藤将伍, 前田洋佑, 菅野智裕, 高橋史昭
2. 発表標題 持続可能な畜産を目指した循環型畜産システムが日本短角種繁殖雌牛の消化管内細菌叢に与える影響
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荒古江美紗, 菅野智裕, 佐藤将伍, 前田洋佑, 高橋史昭, 桃沢健二, 永野昌志
2. 発表標題 日本におけるアルパカの分娩と新生子発育に関する回顧的調査
3. 学会等名 第71回東北畜産学会宮城大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 榑倉茂朗, 宍戸里帆, 大泉諭士, 秋山麗人, 河田亜胡, 中川健太郎, 中神丈浩, 三木貴史, 菅野智裕, 椋代公貴
2. 発表標題 授精作業時における受胎率低下の要因とは? ~授精師のストレス・自己評価編~
3. 学会等名 第78回北海道家畜人工授精技術研修大会
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			
韓国	Hanwoo Research Institute			