様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２９　年　　５　月　２９　日現在

機関番号：１６１０１
研究種目：基盤研究(B)（海外学術調査）
研究期間：2013～2016
課題番号：２５３０４０３９

研究課題名（和文）モンゴルにおける交雑種ヤクに発生する不妊性の実態解明と交雑種オスからの産子作出

研究課題名（英文）Elucidation of male sterility occurred in cattle-yak hybrid and production of calf from the hybrid male in Mongolia

研究代表者
音井　威重（Otoi, Takeshige）

徳島大学・大学院生物資源産業学研究部・教授

研究者番号：３０３１１８１４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　10,600,000円

研究成果の概要（和文）：ヤクは、地球の高地で生息できる動物で、高地で生活する人々にとってヤクは欠かせない家畜であるが、ヤクと在来牛との交雑種はオスが不妊となる(雄性不妊）。本研究は、ヤクとの交雑種における精子形成およびヤク精液の凍結保存方法について検討した。雄性不妊は精細胞の細胞増殖能力には起因せず、細胞死能力の低下にあることが示唆され、精巣上体由来精子および射出精子とも凍結融解後の生存性は0.75%OEP添加により改善されることが判明した。

研究成果の概要（英文）：In Mongolia, Yak (Bos grunniens) live in the alpine area, and their products are indispensable resources for local people. Crossbreeding with cattle (Bos taurus) gives dominant trait. However, male hybrid shows infertility because of spermatogenetic arrest (male sterility). This study investigated spermatogenesis of cattle-yak hybrid and evaluated the effects of detergent Orvus ES Paste (OEP) on the post-thaw motility and viability of epididymal and ejaculated yak spermatozoa. Our findings indicate that the male sterility results from low ability of cell death but not from cell growth in the spermatid. Moreover, the addition of 0.75% OEP was effective for the preservation of yak spermatozoa.

研究分野：生殖工学

キーワード：繁殖　精子形成　不妊　交雑種　ヤク

１．研究開始当初の背景

ヤクは、地球の高地（海抜2000m以上）において１年を通じて放牧のみで生息できる極めて特異な動物である。寒冷で酸素の少ない厳しい環境下に晒されながら種を保存してきたウシ科動物で、モンゴル国で飼養されている牛の25%を占めるに至っている。高地で生活する人々にとってヤクは食用の蛋白源として、また現金収入を得る生産物として欠かせない家畜であるが、ヤクより体格が大きく、乳量増加が期待できる交雑種（ヤクと在来牛間）の育種が望まれている。しかし残念なことに、交雑種の 1～２代目オスはメスと交尾はできるが子供が生まれない不妊となる。これはオスだけにみられ（雄性不妊）、これまでに３代目以降の病態組織学的検討に関する報告はない。さらに、モンゴルにおいて、ヤクおよび交雑種オスからの凍結精液による人工授精は行われておらず、メス牛群中にオスを混在させる自然交配で交雑種子牛を得ていることから、交雑種が示す乳用および役用家畜としての高い資質（雑種強勢）が効率的に利用できず、モンゴルにおいてヤクの改良が進んでいない一因となっている。

２．研究の目的

本研究では、5 歳前後までの交雑種ヤクを対象に、造精構造の免疫組織学的観察および内分泌学的検査による機能評価を行い、精子形成の発現する年齢および交雑世代との関連性を調査することにより、精巣組織の正常化が回帰する年齢および世代を明らかにする。

また、モンゴル在来牛は季節繁殖性を示すことから、人工授精による産子作出のための発情同期化法を確立すると同時に、ヤクおよび交雑種オスからの精液を用いた凍結保存法を開発することにより、凍結精子からの産子作出を目指した。

３．研究の方法

（１）組織学的観察による精子形成機能の解明：モンゴルで採取したヤク雄（１６頭）とヤクと在来牛の交雑種F1雄（６頭）、F2雄（１０頭）、F3 雄（３頭）計３５頭　（１～５才）から精巣及び精巣上体を採取し、ホルマリン固定後切片を作成し、HE染色および各種免疫染色により発生段階による変化を観察し、ヤクと交雑種牛との相違について検討した。

（２）人工授精による次世代の作出：モンゴル在来牛は季節繁殖性を示すことから、人工授精による産子作出のためには、計画的な発情誘起が必要である。ヤク、F1、F2 各５頭（３～１１才）の雌に膣内留置型プロジェステロン製剤（イージーブリード）を用いたオブシンクによる排卵同期化を試みた。また、同期化過程でのホルモン動態を検討するために採血し（イージーブリード抜去後の $PGF_2\alpha$ および GnRH 投与時の２回）Progesterone 濃度を測定した。さらに、同期化後に自然交配による妊否性について検討した。

ヤク精液を用いた効率的な凍結保存方法を開発する目的で、１０頭のヤク（２．５～５才）から精巣上体精液および射出精液を回収した。これら精液を凍結融解後、融解直後または３時間後の運動性および生存率に及ぼす凍結液への Orvus Es Paste（OEP）添加効果について調べた。また、一部のヤク凍結精液は、発情同期化した４頭の在来牛に人工授精し、その受胎性を検討した。

４．研究成果

（１）組織学的考察による精子形成機能の解明：ヤクと在来牛の交雑種Ｆ１～Ｆ３の精子形成段階を HE 染色により検討したところ、ヤクでは２才以降精子形成が見られたが、交雑種２才の F1,F2 では精子形成が見られず、F3 の半分の個体で精子形成が見られなかった。また、F3 では、３才、4 才でも精子が見られなかったことから、戻し交配による交雑種の不稔性回復は、ヤクの場合、F3 では不十分である事が考えられた。

次に、これらの精巣の精細胞の細胞増殖能について抗 PCNA 抗体を用いた免疫組織学的方法により検討したところ、ヤクでは、１才から２才になる段階で、細胞増殖能が有意に上昇しており、精原細胞の増殖能力は精子形成に伴っている様子が見られた。しかし、正常な精子形成を示す２才のヤクと精子形成異常を示す２才の交雑種 F1,F2,F3 の間には細胞増殖能に大きな違いは見られなかった。さらに、精巣の精細胞の細胞死について TUNEL 法により検討したところ、交雑種では、細胞死を示す精細管の割合が２才のヤクに比べて減少しており、また精細管一つあたりの細胞死率が低くなっていた。正常な精子形成には細胞増殖と細胞死の割合が正常である事が必要であることから、交雑種における精子形成異常の原因は精細胞の細胞増殖能力には起因せず、細胞死能力の低下にあることが一つの可能性として示唆された。

さらに、精子に受精能を付与し精子成熟を促進する精巣上体に着目し、その形態と細胞増殖能について HE 染色と抗 PCNA 抗体を用いた免疫組織学的方法により検討した。基底細胞の全体のサイズはヤクの１才では小さく２才以降有意に増大し、基底細胞の核の細胞全体のサイズに占める割合は、1 才から２才にかけて有意に減少した。一方、正常な精子形成を示す２才のヤクと精子形成異常を示す２才の交雑種 F1,F2,F3 の間には基底細胞サイズに大きな違いは見られなかったが、基底細胞の核の細胞全体のサイズに占める割合では、F1 がヤクより大きい傾向を示した。主細胞全体のサイズ及び基底細胞の核の細胞全体のサイズに占める割合はヤクで年齢による変化は見られなかった。しかし、正常な精子形成を示す２才のヤクより精子形成異常を示す２才の交雑種 F2 は主細胞のサイズが有意に大きく核のサイズも増大してい

た（図１）。これらのことは、交雑種では主細胞及び基底細胞の形態に変化が見られることを示している。細胞のサイズや細胞核の細胞における割合は細胞機能と深く関わっていることから、交雑種の精巣上体の機能に影響を及ぼしていることが考えられた。
　次に、精巣上体の基底細胞と主細胞の細胞増殖能を検討したところ、両細胞種ともヤクの年齢による変化はあまりみられず、基底細胞では２才のヤクより２才の交雑種の増殖能が上昇していることが明らかとなった。主細胞を支持する基底細胞の細胞数の変化は、交雑種における精巣上体全体の形態及び機

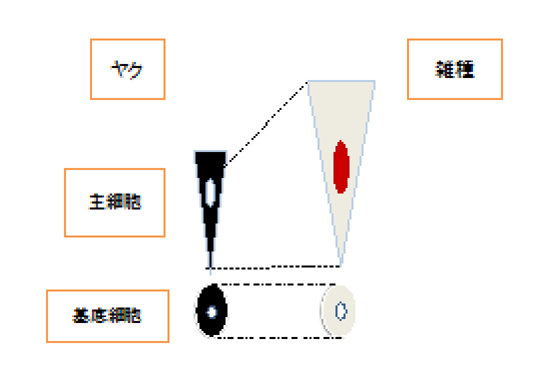

図１．ヤクと交雑種の精巣上体細胞サイズと機能
細胞サイズ、細胞質における SRD5A 発現及び核における AR 発現が異なる。

能に影響を及ぼしていることが考えられた。
　そこで、精巣上体の機能を調べるためアンドロゲン受容体(AR)と 5α リダクターゼ(SRD5A)に着目し、ヤクと交雑種の違いについて免疫組織化学的解析を行った。その結果、精巣上体の主細胞では、２才の交雑種 F2 はヤクと比較して AR 発現が上昇し、5α リダクターゼ発現が低下した。このことから、雄性不稔を示す交雑種の精巣上体では、精子成熟に必要な男性ホルモンが不足している可能性が示唆され、交雑種では、精子成熟を支える主細胞において、形態の変化とともに、機能の変化が起きていることが明らかとなった。

（２）人工授精による次世代の作出：ヤク、F1、F2 雌各々５頭にオブシンクによる排卵同期化を試み、同期化による自然交配後の妊娠率を検討した結果、初回の交配により、ヤク、F1、F2 それぞれ、60%（３/５）、60%（３/

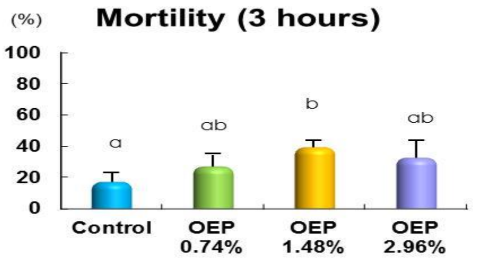

図２．精巣上体精子における融解３時間後の運動性に及ぼす Orvus Es Paste (OEP)添加効果

５)、20%（１/５）が妊娠した。１回目の不妊牛においても、２回目の自然発情で全てが妊娠した。一方、Progesterone 濃度は、F1 雌２頭において PGF$_2$α 投与後の Progesterone 濃度の低下が認められなかったが、その他雌１３頭は PGF$_2$α 投与への反応として Progesterone 濃度が低下した。
　精巣上体精液および射出精液における融解直後または３時間後の運動性および生存率に及ぼす Orvus Es Paste (OEP)添加効果について調べた結果、精巣上体由来精子および射出精子とも凍結融解後の生存性は最終濃度 0.75%OEP（添加濃度 1.48%）添加により改善されることが示唆された（図２）。また、４頭の在来牛に最終濃度 0.75%OEP 添加ヤク凍結精液を人工授精した結果、妊娠が確認されなかった。
　以上結果より、頭数は少ないものの、膣内留置型プロジェステロン製剤を用いた排卵同期化がヤク、および交雑種である F1、F2 いずれの雌においても効果的であることが判明した。さらに、ヤク精液の凍結保存方法として、0.75%OEP 添加により融解後の精子生存性が向上することが明らかになった。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計９件）

① Ono, T., Isobe, T., Morita, Y., Do, T.K.L., Tanihara, F., Taniguchi, M., Takagi, M. and Otoi, T. Effects of parity and season on pregnancy rates after the transfer of embryos to repeat-breeder Japanese Black beef cattle. Arch. Anim. Breed. 59, 45-49, (2016). 査読有
http://www.arch-anim-breed.net/59/45/2016/
② Shimazaki, M., Sambuu, R., Sato, Y., Do, T.K.L., Tanihara, F., Taniguchi, M. and Otoi, T. Effects of Orvus ES Paste on the motility and viability of yak (*Bos grunniens*) epididymal and ejaculated spermatozoa after freezing and thawing. CryoLetters, 36, 264-269, (2015). 査読有
http://www.ingentaconnect.com/content/cryo/cryo/2015/00000036/00000004/art00005
③ Morita, Y., Karja, N.W.K., Do, T.K.L., Tanihara, F., Taniguchi, M. and Otoi, T. Formation of an antral follicle-like structure by bovine cumulus–oocyte complexes embedded with fragmin/protamine microparticles. Anim. Biotech. 26, 273-275, (2015). 査読有
doi: 10.1080/10495398.2015.1015681.
④ Ono, T., Takaoka, A., Morita, Y., Do, T.K.L., Tanihara, F., Taniguchi, M. and Otoi, T. Effects of dibutyryl-cyclic adenosine monophosphate and human chorionic gonadotropin on the formation of antral follicle-like structure by bovine cumulus–oocyte complexes. Acta Vet. Hung. 63, 485-498, (2015). 査読有

doi: 10.1556/004.2015.045.
⑤ Isobe, T., Ikebata, Y., Do, T.K.L., Tanihara, F., Taniguchi, M. and Otoi, T. In vitro development of OPU-derived bovine embryos cultured either individually or in groups with the silk protein sericin and the viability of frozen-thawed embryos after transfer. Anim. Sci. J., 86, 661-665, (2015). 査読有
doi: 10.1111/asj.12341.
⑥ Taniguchi, M. and Otoi, T. Influence of large follicles on oestrus induction and ovulation after embryo collection in superovulated Japanese Black Cows. J. Reprod. Engineer. 17, 1-5 (2015). 査読有
http://sreprod.jp/Contents/Vol_17(1)/17(1)-1_Taniguchi&Otoi.pdf
⑦ He, Z.X., Sato, Y., Zhang, J.C., Huang, B.Z., Wittayarat, M., Taniguchi, M., Suzuki, T. and Otoi, T. Superovulatory response and pregnancies after interspecies transfer of embryos in semi-wild Dulong (*Bos frontalis*). Vet. Arhiv. 84, 183-188, (2014). 査読有
http://www-staro.vef.unizg.hr/vetarhiv/index.php?p1=item&p2=2014&p3=84&p4=2&p5=&p6=8
⑧ Luu, V.V., Namula, Z., Do, T.K.L., Sato, Y., Taniguchi, M., Karja, N.W.K. and Otoi, T. Nuclear status and DNA fragmentation of oocytes from porcine, bovine and feline ovaries stored at 4°C for 5 days. CryoLetters, 35, 48-53, (2014). 査読有
http://www.ingentaconnect.com/content/cryo/cryo/2014/00000035/00000001/art00007
⑨ Isobe, T., Ikebata, Y., Onitsuka, T., Do, T.K.L., Sato, Y., Taniguchi, M. and Otoi, T. Cryopreservation for bovine embryos in serum-free freezing medium containing silk protein sericin. Cryobiology 67, 184-187, (2013). 査読有
doi: 10.1016/j.cryobiol.2013.06.010.

〔学会発表〕(計 2 件)

① 谷口雅康、森永浩太、川名健司、遠藤健治、音井威重 黒毛和種供胚牛に及ぼす季節的要因. 第 21 回日本胚移植研究会大会 2014 年 9 月 11 日、岡山大学(岡山県岡山市)
② 高岡亜沙子、Luu Viet Vien, 照那木拉、Do Thi Kim Lanh, 谷口雅康、音井威重 ウシ卵丘卵母細胞複合体からの卵胞様形態構築における培養液の検討 第 156 回日本獣医学会 2013 年 9 月 22 日、岐阜大学(岐阜県岐阜市)

６．研究組織

(1)研究代表者
音井 威重 (OTOI, Takeshige)
徳島大学・大学院生物資源産業学研究部・教授
研究者番号：30311814

(2)研究分担者
佐藤 陽子 (SATO, Yoko)
東亜大学・医療学部・教授
研究者番号： 50398963