

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450428

研究課題名(和文) 犬精子の新規低温保存法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel cryopreservation method of canine sperm

研究代表者

菱沼 貢 (Hishinuma, Mitsugu)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：30183578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：精子運動解析装置(SMAS)を用いて、正常犬の精子運動性の検査法を確立し、精液性状が不良な犬の精子検査にも有用であることを証明した。犬精子の凍結保存については、凍結融解精子の運動性は単糖よりも二糖を凍結保存液に添加した場合に良好であること、二糖を構成する単糖の種類のみでなく単糖間の結合様式も融解後の精子性状に影響を与えることを明らかとした。さらに、犬精子の凍結保存が精子頭部の形態計測値に影響を及ぼすことを明らかにした。また、牛の冷蔵保存精液では、回転運動を示す精子亜集団の割合が増加し、低温保存が精子の運動様式に影響を及ぼすと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Sperm motility characteristics were examined by computer assisted sperm analysis system (SMAS) in fertile and infertile dogs. Motility parameters of frozen-thawed dog sperm were superior in the extender supplemented with disaccharide than monosaccharide. Type and binding mode of monosaccharide in disaccharide also affected motility parameters of frozen-thawed dog sperm. Cryopreservation of dog sperm affected morphometric findings of sperm head. In bovine semen, refrigeration affected sperm motility parameters.

研究分野：獣医繁殖学

キーワード：犬 精子 低温保存 運動性 精子運動解析装置

1. 研究開始当初の背景

(1) 犬の精子は耐凍性が低く、他の家畜の凍結精液に比べて融解後の精液性状、特に精子活力が低い。このことから犬においては凍結精液を用いた人工授精は広く普及しておらず、盲導犬をはじめとする補助犬の遺伝的改良の障害となっている。また動物の遺伝資源保存の観点からも、精子の凍結保存法の確立が望まれている。

(2) 哺乳動物の精子の検査として、運動性、生存性(細胞膜の正常性)および形態学的正常性(奇形の有無、頭部先体の正常性)が評価されている。しかし、運動精子のサブポピュレーション(亜集団)構成および精子頭部の形態計測値は、精子の処理や凍結保存によって変化することが報告されているが、一般検査としては実施されていない。

2. 研究の目的

(1) 精子運動解析装置による犬精子の運動性検査方法を確立するとともに、精液性状不良犬を対象として検査を実施し、獣医臨床への応用を試みる。

(2) 犬精子の凍結保存に最適な凍結保存液の開発を行うとともに、犬精子の凍結保存が精子頭部の形態計測値に及ぼす影響を調べる。

(3) 精子運動解析装置により犬精子で得られた運動性検査法を牛の精子に応用し、産業動物の保存精液作製過程における精子運動性の変化を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 成熟雄ビーグル犬から用手法により採取した新鮮精液を凍結保存し、融解・希釈後に 38.5 で 4 時間培養し、運動率を光学顕微鏡による目視検査および精子運動解析装置(SMAS 3、ディテクト製)により測定した。新鮮精液を前立腺液、ダルベッコ PBS(-) 溶液、0.9%生理食塩水、維持液(ソルデム 3A)、乳酸リンゲル液(ソルラクト輸液)、ブドウ糖加乳酸リンゲル液(ソルラクト D)および食塩加乳酸リンゲル液(ソルラクトに NaCl を添加し、ソルラクト D と等しい浸透圧 565 mOsm/kg に調整)を用いて精子濃度を 8×10^6 個/mL に希釈し、37 で 0、2 および 5 分間静置した後に SMAS により精子の運動パラメータを測定した。次に、新鮮精液から精漿を除去し、一次希釈および二次希釈後にグリセリン平衡を 4 で 0、15、30 および 60 分間行い(グリセリン最終濃度 8%)、凍結・融解・希釈後に 38.5 で 4 時間培養し、精子運動性、生存率、先体保有率および奇形率を検査した。

次に、成熟雄ビーグル犬 4 頭から射出精液を採取し、卵黄添加乳糖液(m-NSF-1)により射出精液を 8×10^6 個/mL に希釈した。測定用スライドは、製品名 - チャンバー数(個)

- チャンバーの深さ(μm)で表示し、Cell Vision-2-10、Cell Vision-2-20、Cell Vision-4-20、Leja-2-20、Leja-4-10 および MicroCell-2-20 の 6 種類を使用した。各チャンパーに希釈精液を充填し、充填時間(精液の流れが止まるまでの時間)、チャンパー内の測定視野に生じた気泡の数、SMAS による精子運動率とそのパラメータを比較した。

また、精子運動率の低下(51.3%)が見られた雄ビーグル犬 1 頭に対して、1 日 2 回(12 時間間隔)の頻回採精を行い、精液量、精子濃度および精子数を測定し、運動パラメータを調べた。

(2) 成熟雄ビーグル犬より採取した新鮮精液を、単糖であるグルコースおよびガラクトースにより浸透圧を調整した一次希釈液および二次希釈液を用いて希釈を行ない、凍結保存した。精子を融解・希釈後に 38.5 で 4 時間培養し、精子運動解析装置(SMAS)により精子運動性を調べ、生存率、先体保有率および奇形率を検査した。次に、二糖により浸透圧を調整した一次希釈液および二次希釈液を用いて凍結保存および精子検査を行なった。

また、犬精子を凍結保存し、融解直後、Tris buffer による希釈後(370 mOsm/kg)および 4 時間培養後に、精子の運動性、生存性、奇形率および Coomassie blue 染色による頭部形態計測値を調べた。

(3) 鳥取県畜産試験場で飼養されている雄牛 7 頭から採取した精液を実験に供試した。一次希釈後の精液(35 保存あるいは 4 に冷蔵後)を保管容器に入れて検査室に輸送し、精子運動解析装置(SMAS)および測定用スライド(MicroCell)を使用して、37 で精子運動パラメータ(運動率、前進運動率、直線速度 VSL、曲線速度 VCL、平均速度 VAP、直進性 LIN、直線性 STR、頭部振幅 ALH、頭部振動数 BCF)を測定した。VAP > 10 $\mu\text{m}/\text{秒}$ を運動精子、VAP > 50 $\mu\text{m}/\text{秒}$ かつ STR > 0.75 を前進運動精子とした。運動精子について、階層型 / 非階層型クラスター解析を実施し、運動精子のサブポピュレーション(亜集団)の構成を調べた。さらに、フローサイトメーターを使用して、PI/CFDA 染色精子の生存性を調べた。

4. 研究成果

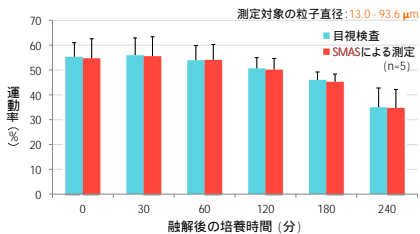
(1) 光学顕微鏡による目視検査値と精子運動解析装置(SMAS)による測定値に有意な差は認められなかった。前立腺液、PBS および維持液で希釈した犬新鮮精液において、他の希釈液よりも良好な精子運動性を示した。グリセリン平衡を 15、30 および 60 分間行った群において、融解後の精子運動性および先体保有率が良好であった。この結果から、SMAS を犬精子の運動性検査に使用することにより、評価の客観性が得られ、目視検査よりも

詳細な検査が可能となった。さらに、小動物診療施設において、SMASによる犬新鮮精液の運動性評価を行う際の希釈液として、維持液が有効であること、犬精子の凍結保存において二次希釈後のグリセリン平衡時間は15分に短縮が可能であることが明らかとなった。

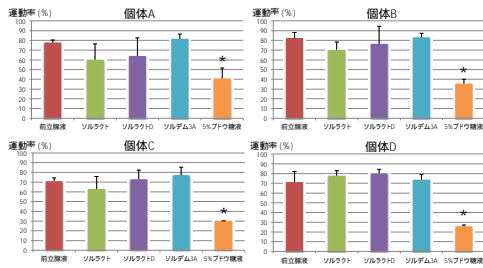
測定用スライドへの犬精液充填時間は、MicroCell-2-20で有意に短かった(12.2秒)。気泡は、チャンバーへの充填の際に精液で満たされない領域が生じることに起因したものであり、その数はLeja-4-10で有意に多かった。SMASにより測定した運動率および前進運動率は、スライド間に有意な差は認められなかった。このことから、SMASによって犬精子の運動性検査を行なう際に用いる測定用スライドはMicroCell-2-20が最も適していることが判明した。

精液性状不良犬に対して頻回採精を実施した結果、精液量は採精を重ねるごとに減少し、総精子数も 4×10^8 個から 1×10^8 個まで低下した。精子運動率は頻回採精によって上昇あるいは低下したが、50-80%の間を推移した。クラスター解析の結果、運動率が低い精液では、曲線運動と回転運動を示す精子亜集団の割合が高い傾向が認められた。

目視検査とSMASによる、犬凍結・融解精子の運動率の比較



SMASによる犬精子の運動率測定に適した希釈液(輸液剤)の検討

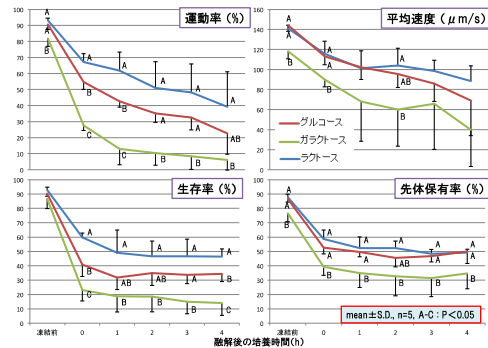


(2) 犬凍結・融解精子の運動性、生存率および先体保有率は、単糖ではガラクトースと比較してグルコースを用いた希釈液で高い値が得られたが、二糖のラクトースと比較して低値であった。二糖間で各精子性状に有意な差は認められなかったが、トレハロースにおける運動率、生存率および先体保有率は他の二糖よりも高い傾向が認められた。イソマルトース(グルコースとグルコースの-1 6グリコシド結合)は、構成する単糖が異なり

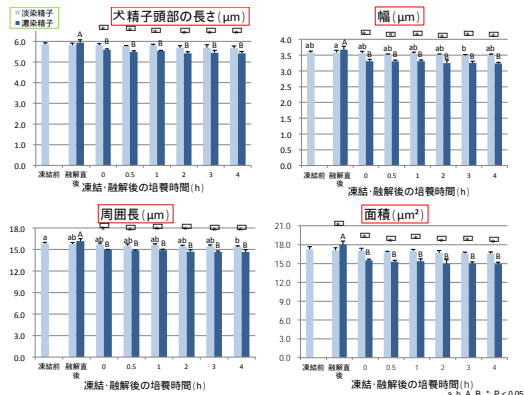
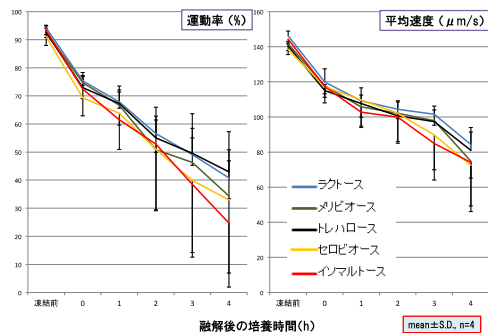
結合様式が同じであるメリビオース(グルコースとガラクトースの-1 6グリコシド結合)および結合様式が異なり単糖が同じであるトレハロース(グルコースとグルコースの-1 1グリコシド結合)と比較して運動率、生存率および先体保有率が低い傾向が認められた。以上の結果から、犬精子の凍結保存において、融解後の精子性状に良好な影響を及ぼすのは単糖よりも二糖であり、二糖を構成する単糖の種類のみでなく単糖間の結合様式も融解後性状に影響を及ぼすことが明らかとなった。

犬精子の凍結保存において、Coomassie blue染色により精子頭部の染色性に違いが見られ、新鮮精子と同様な淡染精子の他に濃染精子が出現した。濃染精子の割合は、融解後の培養に伴い増加した。淡染精子において、融解・希釈・培養後の頭部形態(頭部の長さ、面積、楕円度、凹凸度、伸長度および均整度)は、凍結処理前(新鮮精子)とほぼ同じであった。一方、濃染精子は、淡染精子と比較して頭部が小さく細長い形状を示した。

単糖(グルコースおよびガラクトース)が犬凍結精子の融解後性状に及ぼす影響

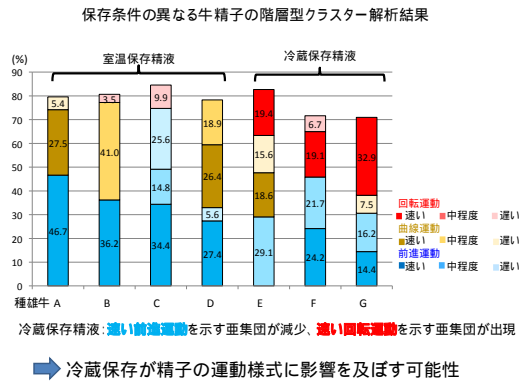


二糖が犬凍結精子の融解後性状に及ぼす影響



A, B, A-C, ** P < 0.05

(3) 牛精液の室温保存では、運動精子は主に前進運動を示す亜集団で構成された。冷蔵保存精液では、回転運動を示す精子亜集団の割合が増加した。このことから、牛精液の保存温度が精子の運動様式に影響を及ぼすと考えられた。精子の生存性については、保存温度による影響は認められなかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計4件)

清水 比紗子、守屋 ひか理、足立 直紀、西村 亮、菱沼 貢：精子運動率低下を示す雄犬 1 頭における頻回採精の試み、平成 28 年度 日本小動物獣医学会(中国地区)、2016 年 10 月 23 日、ホテルグランヴィア広島(広島県・広島市)

足立 直紀、住友 一馬、荻野 千尋、西村 亮、伊藤 典彦、菱沼 貢：精子運動解析装置とフローサイトメーターを用いた和牛精子の検査、平成 28 年度 日本産業動物獣医学会(中国地区)、2016 年 10 月 23 日、ホテルグランヴィア広島(広島県・広島市)

清水 比紗子、守屋 ひか理、西村 亮、菱沼 貢、伊藤典彦：精子無力症および奇形精子症を示す犬の 1 例、平成 27 年度 日本小動物獣医学会(中国地区)、2015 年 10 月 11 日、岡山コンベンションセンター(岡山県・岡山市)

木村 勇介、西村 亮、菱沼 貢：犬精子の運動率検査における精子運動解析装置の有効性、平成 26 年度 日本小動物獣医学会(中国地区)、2014 年 10 月 19 日、くにびきメッセ(島根県・松江市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菱沼 貢 (HISHINUMA, Mitsugu)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：30183578

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

木村 勇介 (KIMURA, Yusuke)

高島 伶 (TAKASHIMA, Rei)

清水 比紗子 (SHIMIZU, Hisako)

守屋 ひか理 (MORIYA, Hikari)

足立 直樹 (ADACHI, Naoki)

西村 亮 (NISHIMURA, Ryo)