

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24580412

研究課題名(和文) 琉球在来豚アグー精子における精漿成分による耐凍能低下の生理学的解明

研究課題名(英文) Study on the physiological protection of the reducing cryotolerance against seminal plasma prior to sperm cryopreservation in Okinawan native Agu pig

研究代表者

建本 秀樹 (Tatemoto, Hideki)

琉球大学・農学部・教授

研究者番号：70227114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：凍結前のアグー精子における精漿による耐凍能低下を抑制する凍結保存技術の改良を行った。その結果、精子が精漿に暴露されている間に、0.5%スキムミルクもしくはカゼインを精液懸濁液に加え、同時に水溶性tocopherol誘導体であるTroloxで処理することで、凍結融解後の精子性状は著しく改善した。特に、Troloxの効果は凍結処理までの精漿への精子暴露時に有効であった。そして、これら精子の体外受精による受精能力は著しく増加した。以上の結果から、凍結前に精漿に暴露される精子をTrolox存在下でスキムミルクかカゼインで処理すると良好なアグー凍結精子を作製出来ると云った有効な方法が見出された。

研究成果の概要(英文)： This study was conducted to elucidate the protective effect of skim milk (SM), casein and Trolox (TRO) added to the semen diluents on maintenance of sperm cryotolerance during semen standing incubation of Agu pig.

Treatment with 0.5% SM or casein during semen standing had the beneficial effects on post-thaw sperm motility and plasmalemma integrity. Likewise, treatment with SM plus TRO increased sperm motility, and the integrity of plasmalemma and mitochondria, and decreased the amount of lipoperoxidation, whereas these phenomena were not obviously found in sperm treated with TRO only during freezing procedure. Furthermore, higher sperm penetrability to matured oocytes in vitro was maintained in post-thaw sperm treated with SM plus TRO after the beginning of semen standing.

These findings indicate that treatment with SM or casein plus TRO during semen standing incubation improved the post-thaw qualities of Agu sperm by protection of cryotolerance prior to the freezing process.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：精子 精漿 凍結保存 細胞障害 スキムミルク 酸化ストレス アグー豚

1. 研究開始当初の背景

これまでの一般豚精子を用いた多くの研究者等の研究により、ブタ精子は他の家畜精子に比べて凍結に対する抵抗性(耐凍能)が劣っており、その結果、凍結融解後の精子性状の著しい低下が引き起こされる点が指摘されている。さらに、アグー精子の耐凍能は一般豚精子に比較してさらに劣る。そして現在我々は、アグー精子凍結保存に関する様々な研究を通して、一般豚精子の凍結処理時にはさほど問題視されてこなかった新たな課題に直面してきた。その一つが、「凍結処理前の精漿の存在が不可逆的にアグー精子の耐凍能低下を引き起こしている」と云った点である。一般豚精子では、射精時の精液中には高濃度に精子を含む濃厚部画分を有しており、その濃厚部精子を凍結に利用するため冷却・凍結処理前の精漿中での液状放置が慣例的に行われている。一方、以前、我々は、明確な濃厚部画分を有さないアグー精液の場合、採精後、直ちに遠心洗浄し精漿を除去した方が凍結融解後の精子性状が改善され、アグー精子の凍結処理法としては適していることを明らかにした(吉元等, 西日畜会報, 50, 35-42, 2007)。しかし、この技術ではフィールドに対する応用性は低い。

したがって、本研究では、実用的かつ現実的な技術として、フィールドで雄アグーから採取した精液を凍結処理施設まで輸送する際、精漿による負の要因である耐凍能低下を防ぎながら、高い活力を保持した状態の精子を維持させる精液輸送用懸濁液を検討する必要があると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、以下の4点に関する研究を通して、アグー精液の液状保存ならびに輸送時に耐凍能を低下させる精漿の悪影響を抑制した精液懸濁液を検討し、良好なアグー凍結精子の作製を目指した。

- (1) 精液輸送用懸濁液(BTS)へのスキムミルク添加が精漿由来タンパク質によるアグー凍結精子の融解後の精子性状に対する改善効果が有るか否かを検討した。
- (2) スキムミルクに存在する全タンパク質の約80%を占め、精子細胞膜からのコレステロール流出を促進させる精漿中BSPタンパク質と結合することで精子細胞膜からのコレステロール流出を抑制するカゼインに注目し、アグー精液輸送用懸濁液へのカゼインナトリウム添加が凍結融解後の精子性状に及ぼす影響を調べた。
- (3) 精漿に暴露されている期間に酸化ストレスから精子を保護する目的で、水溶

性 tocopherol 誘導体である 50 μ M Trolox の BTS ならびに精子凍結用希釈液(BF5)への添加が、凍結融解後のアグー精子性状を改善するか否かについて検討した。

- (4) 精液輸送時のミトコンドリア障害を抑制させる目的で、精巢上体尾部液中に高濃度に含まれミトコンドリアに直接作用し機能を高めミトコンドリアを保護する作用が報告されている L-carnitine に着目し、アグー精液輸送用懸濁液への L-carnitine 処理による凍結融解後の精子性状に対する改善効果を追究した。

3. 研究の方法

- (1) 手圧法で採取したアグー射出精液を等量の精液懸濁液(BTS)で希釈し、30の状態の研究室に約1.5時間かけて持ち帰った。その希釈の際、スキムミルクを0, 0.25, 0.5, 1, および2%の終濃度になるように調整した。

研究室に持ち帰った後、常法に従い室温で精子を遠心洗浄した。そして、凍結用希釈液(BF5)には、精子を酸化ストレスから保護し、以前、アグー精子の酸化ストレスからの保護に対して有効性が認められた安定型アスコルビン酸誘導体(アスコルビン酸 2-O- α -グルコシド; AA-2G)を 100 μ M 添加し凍結処理を行い、 5.0×10^7 sperm/100 μ l の錠剤化法で凍結保存を行った。なお、融解精子の性状を以下の試験(5)により判定し、精液輸送時におけるスキムミルクのアグー凍結精子への効果を検証した。

- (2) (1)の研究結果から、精液輸送液へのスキムミルク添加が精漿による精子耐凍能低下を抑制する事が分かった。そこで、スキムミルクに存在する全タンパク質の約80%を占め、精子細胞膜からのコレステロール流出を促進させる精漿中BSPタンパク質と結合することで精子細胞膜からのコレステロール流出を抑制するカゼインに注目し、アグー精液輸送用懸濁液へのカゼインナトリウム添加が凍結融解後の精子性状に及ぼす影響を調べた。

精液輸送時のカゼインナトリウム処理濃度はスキムミルクと同じく0-2%に設定し、精液輸送、精子洗浄ならびに凍結処理方法は(1)と同様に行った。

- (3) これまでの結果から、BTSへの0.5%濃度のスキムミルクもしくはカゼインナトリウムの添加が輸送時の精漿による精子耐凍能低下作用を抑制する事が明らかとなった。しかし、未だに凍結融

解後の精子細胞膜正常性は 50%程の値であり、この要因として精液輸送時の精漿に暴露されている期間の細胞内外からの酸化ストレスによる細胞障害が予想された。そこで、水溶性 tocopherol 誘導体である 50 μ M Trolox の BTS および BF5 への添加が、凍結融解後のアグー精子性状を改善するか否かについて検討した。実験処理区としては Trolox 無処理区(無処理区), BTS にだけ Trolox 添加(BTS 区), BF5 にだけ Trolox を添加(BF5 区), ならびに BTS と BF5 に Trolox を添加(BTS + BF5 区)の計 4 区を設けた。なお、全ての処理区に終濃度 0.5%でスキムミルクを BTS に加えた。

(4) 先の実験結果から、凍結処理までの精液輸送時に受ける酸化ストレスからの Trolox 処理による保護が良好なアグー凍結精子を作製する上において不可欠であるとの興味深い成果が得られた。すなわち、精子凍結時と同様に凍結前までの精液輸送時の抗酸化ストレス処理が重要である事が明らかとなった。しかしながら、Trolox で処理した精子であっても凍結融解後のミトコンドリア正常性は 50%程の値であり、融解後 3 時間以上の精子運動性の低下が未だ十分には改善されなかった。したがって、精巢上体尾部液中に高濃度に含まれミトコンドリアに直接作用し機能を高めミトコンドリアを保護する作用が報告されている L-carnitine に着目し、BTS への 0, 5, 10, 20 mM L-carnitine 処理(終濃度)が凍結融解後の精子性状を改善するか否かについて検討した。

(5) また、凍結・融解後の各精子性状は以下の試験により判定した。
 精子細胞膜正常： CFDA/PI による蛍光二重染色を行い、膜に障害を受けた精子を蛍光顕微鏡下で観察した。
 精子運動パラメーター： 精子運動解析装置を用い、融解精子の運動パラメータ(運動精子率と活性型前進運動精子率)を計測した。
 精子細胞内カスパーゼ活性： 蛍光染色法で精子細胞内の活性化型カスパーゼを検証した。
 精子 DNA 障害： コメットアッセイ法で細胞障害ならびにアポトーシスに伴った断片化 DNA を計測した。
 精子先体の正常性： ゼラチンスライド法で先体由来タンパク質分解酵素活性を測定し、先体の正常性を評価した。
 精子ミトコンドリアの正常性： MitoTracker による蛍光染色を行い、ミトコンドリア障害を受けた精子を蛍光顕微鏡下で観察した。
 細胞内 ATP 量の指標とした精子生存性：

ルシフェリン・ルシフェラーゼ反応による細胞内 ATP 量をルミノメータで測定し、精子生存性を評価した。
 脂質過酸化量の測定： 凍結融解後の精子脂質過酸化量を malondialdehyde (MDA)に換算して測定した。
 精子受精能力： 体外成熟卵との体外受精で凍結精子の受精能力を評価した。

4. 研究成果

(1) 精液輸送用懸濁液(BTS)に添加したスキムミルクによる精子保護効果を検証したところ、個体間に有意差が見られたものの、4 個体中 3 個体の 0.5%スキムミルク処理区で対照区に比較して正常な細胞膜(図 1)とミトコンドリアを有する精子の割合が有意に増加し、融解 3 時間後の運動精子率も顕著に改善された ($P < 0.05$)。さらに、スキムミルク処理によって融解後の精子性状に改善効果が見られた個体では、凍結処理時のミトコンドリア障害に伴ったカスパーゼ活性が抑制され(図 2), DNA 正常性も有意に増加した ($P < 0.05$)。そして、凍結障害に伴ったアポトーシス様細胞死が効果的

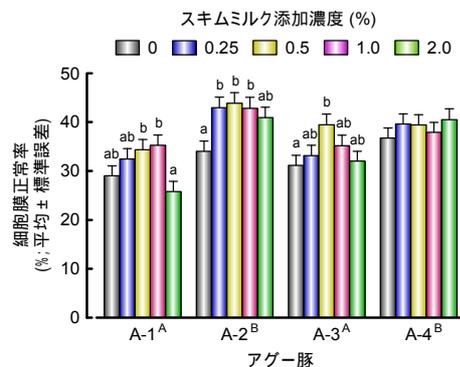


図 1. 精液輸送時のスキムミルク処理が凍結融解後のアグー精子の細胞膜正常性に及ぼす影響。

^{a,b} 同一個体間に有意差を認める ($P < 0.05$).

^{A,B} 個体間に有意差を認める ($P < 0.05$).

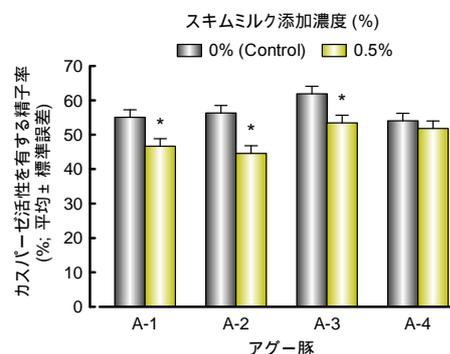


図 2. 精液輸送時のスキムミルク処理が凍結融解後のアグー精子のカスパーゼ活性に及ぼす影響。

* 同一個体間に有意差を認める ($P < 0.05$).

に抑制された結果、精子生存性(細胞内 ATP 量)、精子先体由来のタンパク質分解酵素活性を指標とした先体正常性ならびに IVF 精子侵入率も有意に改善された($P<0.05$)。

これらの結果から、精液輸送用懸濁液への 0.5%スキムミルク添加は、特に耐凍能の低いアグー個体に対して輸送時の精漿による精子耐凍能低下作用を抑制することが示された。しかし、スキムミルクにはタンパク質、糖類ならびに無機物など様々な因子が含まれており、精子保護に直接的に関与しない物質も存在している(Bergeron and Manjunath, 2006; Batellier et al., 1996)。したがって、より効果的な精液輸送用懸濁液の検討には、スキムミルク中の精子保護に直接的に関与する成分のみを添加する必要があると思われた。

- (2) そこで、スキムミルク中の主要なタンパク質であるカゼインを BTS に添加して凍結・融解後の精子性状に及ぼす影響を調べ、その精子保護作用機序の検証およびスキムミルク添加時との精子性状改善効果の比較を行った。その結果、カゼインナトリウムを精液輸送用懸濁液に添加した場合にも、スキムミルク添加時と同様に精子細胞膜正常性、ミトコンドリア正常性ならびに運動精子率の改善が認められた($P<0.05$)。さらに、カゼインによる精子保護作用機序を検証するために、精液輸送後の精子細胞内コレステロール量を測定した結果、0.5%カゼイン処理区における値が対照区に比較して有意に高くなった($P<0.05$) (図 3)。このことから、カゼインおよびスキムミルクによる精液輸送時の耐凍能維持効果は、精漿による精子細胞膜からのコレステロール流出の抑制に起因すると考えられた。

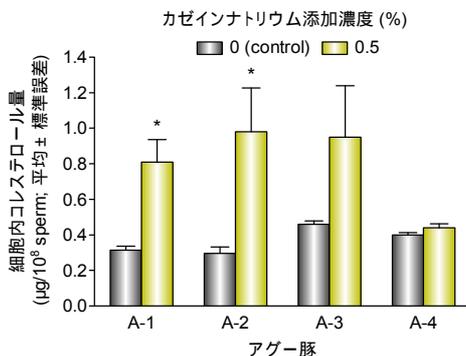


図 3. 精液輸送時のカゼインナトリウム処理が凍結前のアグー精子のコレステロール量に及ぼす影響。
同一個体間で有意差を認める($P<0.05$)。

さらに、詳細な精子性状のパラメーターを観察したところ、カスパーゼ活性化の抑制に伴って DNA 正常性が改善され

(図 4)、細胞内 ATP 量、精子先体由来のタンパク質分解酵素活性ならびに IVF 精子侵入率が増加した($P<0.05$)。最後に、スキムミルクおよびカゼインの BTS への添加による、凍結・融解後の精子性状の改善効果を比較すると、4 個体中 3 個体では両処理区で同程度の精子性状改善効果が認められた($P<0.05$)。一方で、1 個体のみにおいてはスキムミルク処理による改善が見られず、カゼイン処理区でのみ精子性状の向上が示された。以上の結果から、スキムミルクの BTS への添加による精液輸送時の精子耐凍能維持作用は、主にスキムミルクに含まれるカゼインによるものであり、カゼインは精子細胞膜からのコレステロール流出を抑制することで精子の細胞膜流動性を保持し耐凍能維持に関与していることが明らかになった。この結果は、他の哺乳類精子の液状保存においても、カゼインがミルク中の精子保護作用を有する主な因子だと云った報告と一致している (Batellier et al., 1997; 1998; Leboeuf et al., 2003; Pagl et al., 2006; Bergeron et al., 2007)。

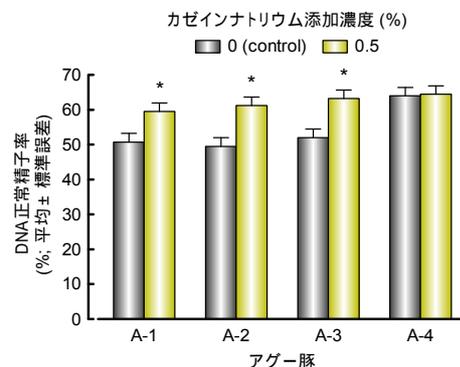


図 4. 精液輸送時のカゼインナトリウム処理が凍結融解後のアグー精子の DNA 正常性に及ぼす影響。
同一個体間で有意差を認める($P<0.05$)。

したがって、スキムミルクに含まれる精子保護成分であるカゼインを添加した BTS は、良好なアグー凍結精子を製作する点において非常に有効であると結論された。また、本研究により精液輸送用懸濁液の改良がアグー精子の耐凍能維持に大きく貢献することが示された。

ただし、個体や精液採取日によっては、カゼインナトリウム処理区の場合、精漿成分とカゼインが反応し粘性を有する白濁の沈殿を生じる場合があり、その為に負の結果が得られる事もあった。この点については、今後の検討課題であり、普及を念頭に置き扱いやすさの点を考慮すると、現時点ではスキムミルクの方が実用化に適していると思われた。

- (3) 次に、水溶性 tocopherol 誘導体である

50 μ M Trolox の BTS ならびに精子凍結用希釈液(BF5)への添加が、凍結融解後のアグー精子性状を改善するか否かについて検討した。

まず始めに、アグー精液輸送時における精漿液の抗酸化能を測定した。その結果、 O_2^- 除去活性に関しては研究に供した全ての 4 個体で比較的高い値(73-91%)が示された。しかしながら、DPPH ラジカル除去活性は 3-38%と個体間に大きな差が認められ($P < 0.05$)、精漿液中のラジカル除去活性能は個体によっては極めて低い状態であった。このことから、採精直後の精液輸送の時点から、精子はラジカルによる酸化ストレスの影響を受けていると云った事実が確認された。

そこで、BTS と BF5 の両液へ Trolox を添加(BTS + BF5 区)したところ、凍結融解後の原形質膜の脂質過酸化量は減少し、正常な細胞膜を有する精子の割合、ならびに、個体差があるもののカスパーゼ活性の抑制と正常な DNA を有する精子の割合がそれぞれ有意に増加した($P < 0.05$)。さらに、Trolox による BTS + BF5 区の 4 個体の運動精子率には、融解 3 時間後に 7-16%、活性化型前進運動精子率には、融解 1 時間後で 5-15%もの差が対照区との間に認められた。また、Trolox 処理は、本研究で使用した全個体で凍結融解後の精子先体の正常性を改善し、特に、その現象は BTS + BF5 区で顕著であった。そして、同処理区の凍結精子を用いて体外受精を行ったところ、無処理区に比較して 15-25%の精子侵入率の増加が観察され、精子受精能力の維持が確認された($P < 0.05$, 図 5)。一方、精液輸送時もしくは凍結処理時のみ Trolox 処理を行った BTS 区や BF5 区では、精子原形質膜における脂質過酸化の抑制作用が弱く、その結果、DNA 障害や精子運動性の明確な改善効果は示されなかった。

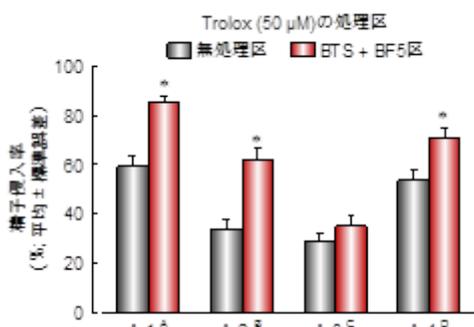


図 5. BTS ならびに BF5 への 50 μ M Trolox 添加が凍結融解後のアグー精子の受精能力に及ぼす影響。

* 同一個体間で有意差を認める($P < 0.05$).

^{A,B} 個体間に有意差を認める($P < 0.05$).

以上の結果から、精子凍結時のみなら

ず凍結処理までの精液輸送時に受ける酸化ストレスの抑制が、良好なアグー凍結精子を作製する上において不可欠であるとの重要な結果が得られた。すなわち、採精直後から凍結処理に至るまでの BTS と BF5 の両液への Trolox 添加は、凍結融解後のアグー精子性状の改善に有効であると結論された。

- (4) 先の研究結果から、Trolox で処理した精子であっても凍結融解後のミトコンドリア正常性は 50%程の値であり、融解後 3 時間以上の精子運動性の低下が未だ十分には改善されなかった。そこで、精巢上体尾部液中に高濃度に含まれミトコンドリアに直接作用し機能を高め、ミトコンドリアを保護する作用が報告されている L-carnitine に着目し、アグー精液輸送用懸濁液への L-carnitine 処理が凍結融解後の精子性状を改善するか否かについて検討した。

その結果、4 個体中 3 個体の 10 mM L-carnitine 処理区で無処理区に比較して正常な細胞膜を有する精子率が有意に増加した($P < 0.05$)。しかし、期待されたミトコンドリア正常性に関して、L-carnitine 処理による改善効果は全く確認されず、同様に、カスパーゼ活性抑制作用と融解 1 時間後の運動精子率においても 10 mM L-carnitine 処理による有意な改善効果はなかった。また、L-carnitine 処理が精液輸送中の活性酸素やラジカルを有意に消去すると云った結果も得られなかった。

以上の結果から、アグー精液輸送用懸濁液への L-carnitine 処理は凍結融解後の精子細胞膜の正常性を高めるものの、その作用が如何なる作用機序によるものかを今後の研究で明らかにする必要があると思われた。

- (5) 本研究結果から、凍結前までの精液輸送時に精漿に暴露される精子を Trolox 存在下でラジカルによる酸化ストレスから保護すると共に、スキムミルクもしくはカゼインで精漿による精子細胞膜からのコレステロール流出を抑制すると耐凍能の低下を阻害し、その結果、良好なアグー凍結精子を作製出来ると云った有効な方法が見出された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)

Tatemoto H, Oshiro R, Shimada H, Konno T, Yamanaka K, Ashizawa K. Addition of casein to the diluents during semen

transportation improves the post-thaw qualities of Okinawan native Agu pig spermatozoa. *Journal of Warm Regional Society of Animal Science, Japan*, 査読有り, 58 (1), 2015, 75-86, <http://doi.org/10.11461/jwaras.58.75>.

Ashizawa K, Kawaji N, Tanaka A, Nagase D, Matsumoto Y, Tatemoto H, Tsuzuki Y. Population Fluctuation and Habitat Preference of Ijima's Copper Pheasant *Symnaticus soemmerringii ijimae*: an Endemic, 'Near Threatened' Japanese Subspecies. *Ornithological Science*, 査読有り, 13 (2), 2014, 77-81, doi: <http://dx.doi.org/10.2326/osj.13.77>.

Narumi K, Ashizawa K, Fujiishi Y, Tochinal R, Okada E, Tsuzuki Y, Tatemoto H, Hamada S, Kaneko K, Ohyama W. Persistence and accumulation of micronucleated hepatocytes in liver of rats after repeated administration of diethylnitrosamine. *Mutation Research*, 査読有り, 755 (2), 2013, 100-107, DOI: 10.1016/j.mrgentox.2013.03.012.

Ahammad MU, Nishino C, Tatemoto H, Okura N, Okamoto S, Kawamoto Y, Nakada T. Pumping fluid added to storage medium increases (2-fold) the functional life-span of fowl sperm in vitro at 4 °C. *British Poultry Science*, 査読有り, 54 (2), 2013, 270-280, DOI: 10.1080/00071668.2013.778956.

Ahammad MU, Nishino C, Tatemoto H, Okura N, Okamoto S, Kawamoto Y, Nakada T. Acrosome reaction of fowl sperm: evidence for shedding of acrosomal cap in intact form to release acrosomal enzyme. *Poultry Science*, 査読有り, 92 (3), 2013, 798-803, DOI: 10.3382/ps.2012-02523.

Ashizawa K, Oyama N, Katayama S, Narumi K, Tatemoto H, Tsuzuki Y. Regulation of fowl sperm motility: Evidence for the indirect, but not direct, involvement of dynein-ATPase activity on the reversible temperature-dependent immobilization. *Theriogenology*, 査読有り, 79 (3), 2013, 558-565, DOI: 10.1016/j.theriogenology.2012.11.010.

Ahammad MU, Miyazato T, Nishino C, Tatemoto H, Okura N, Okamoto S, Kawamoto Y, Nakada T. Effects of fluid secreted from the uterus on duration of fertile egg production in hens, and survivability and penetrability of fowl sperm in vitro. *The Journal of poultry Science*, 査読有り, 50 (1), 2013, 74-82, DOI: 10.2141/jpsa.0120045.

Lay KM, Nakada T, Tatemoto H. The involvement of N-glycosylation of zona glycoproteins during meiotic maturation in

sperm-zona pellucida interactions of porcine denuded oocytes. *Animal Science Journal*, 査読有り, 84 (1), 2013, 8-14, DOI: 10.1111/j.1740-0929.2012.01027.x.

Shimokawa K, Oshiro R, Yamanaka K, Ashizawa K, Ohta S, Tatemoto H. Improvement of the post-thaw qualities of Okinawan native Agu pig sperm frozen in an extender supplemented with antiapoptotic PTD-FNK protein. *Theriogenology*, 査読有り, 78 (7), 2012, 1446-1455, DOI: 10.1016/j.theriogenology.2012.06.005.

Narumi K, Ashizawa K, Takashima R, Takasawa H, Katayama S, Tsuzuki Y, Tatemoto H, Morita T, Hayashi M, Hamada S. Development of a repeated-dose liver micronucleus assay using adult rats: an investigation of diethylnitrosamine and 2,4-diaminotoluene. *Mutation Research*, 査読有り, 747 (2), 2012, 234-239, DOI: 10.1016/j.mrgentox.2012.05.012.

[学会発表](計4件)

Tatemoto H, Mitsube R, Tokeshi I, Uehara M, Sadoyama Y, Funabiki M, Konno T. Improvement in the post-thaw qualities of Okinawan native Agu pig spermatozoa treated with skim milk and Trolox prior to cryopreservation. The 17th AAAP Animal Science Congress, 2016, 8/22-25, Kyushu Sangyo University.

建本秀樹, 島田晴加, 金野俊洋. 精液輸送ならびに精子凍結時の Trolox 処理が沖縄在来豚アグー精子の融解後の性状改善に及ぼす効果. 第8回日本暖地畜産学会熊本大会, 2015年10月24~25日, 東海大学熊本キャンパス.

建本秀樹. 安定した美味しいアグー豚肉の生産に向けて. JA おきなわ銘柄豚推進協議会定期総会, 2015年9月7日, JA おきなわ南風原支店 会議室, 招待講演. 大城柳子, 上地成美, 建本秀樹. 琉球在来豚アグーにおける精液輸送用懸濁液へのカゼイン添加が凍結融解後の精子性状に及ぼす影響. 第105回日本繁殖生物学会大会, The Journal of Reproduction and Development 58 (Supple), j127, 2012年9月5日~8日, 筑波大学大会館.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

建本 秀樹 (TATEMOTO, Hideki)

琉球大学・農学部・教授

研究者番号: 70227114