

Sperm-Egg Interaction法を用いた個々の雄アヒルの受精 能評価

誌名	大阪府立農林技術センター研究報告 = Bulletin of Osaka Prefectural Agricultural and Forestry Research Center
ISSN	03888592
巻/号	36
掲載ページ	p. 53-57
発行年月	2000年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



Sperm-Egg Interaction 法を用いた個々の 雄アヒルの受精能評価

笠井浩司・出雲章久

Evaluation of Fertilizing Ability of Semen from Individual Drake Using In Vitro Sperm-Egg Interaction Assay

Koji KASAI and Akihisa IZUMO

Summary

A new semen quality test "In Vitro Sperm-Egg Interaction Assay" was tested for its potential to compare the fertilizing ability of semen samples collected from individual drake.

The inner perivitelline layer (IPVL) separated from laid duck eggs was incubated with spermatozoa in vitro. The number of holes formed in IPVL in vitro by spermatozoa showed significant difference among the tested 6 males ($P < 0.05$). The number of holes in IPVL was highly correlated with fertility of the eggs laid by inseminated females ($r = 0.97, P < 0.01$). The relationship between above two parameters was logarithmic, which transformed the small difference in fertility of laid eggs into the large difference in the number of IPVL holes.

These results show that the in vitro sperm-egg interaction assay can describe the difference in the fertilizing ability among males more clearly than conventional fertility test does. The use of this new technique is considered to be of great advantage in the screening of drakes for breeding use.

I. はじめに

家畜・家きんの改良において、優良雄の選抜、不良雄の淘汰は、極めて大きな意義を持つ。雄に求められる遺伝形質は改良の目的によって多種多様であるが、共通する重要形質として繁殖能力の高さが挙げられる。雄の選抜の目的は、優秀な次世代の生産にあり、繁殖能力の優劣によって、次世代の生産効率、ひいては改良の速度が大きく左右されるからである。特に、家きんにおいては繁殖供用期間が短いため、いかに効率よく次世代を生産できるかは、雄の選抜基準の最も重要な点である。

家きんにおける雄の繁殖能力の評価には、雌との交配による直接評価法と、精子の様々な機能を指標とする間接評価法とがある。直接評価は単純であるが、多大な労力と時間、多くの雌を必要とする。間接評価法としては、精子の運動性^{12,14)}、代謝能^{4,14)}、膜透過性²⁾などを指標とする方法がニワトリやシチメンチョウにおいて報告さ

れているが、結果の信頼性、客観性を高めるには、高価な測定機器を必要とし、操作も極めて煩雑になる。

近年、ニワトリにおいて、受精時の精子と卵黄膜の相互反応 (Sperm-Egg Interaction) に関する研究が進み、卵胞卵子⁶⁾や排卵直後の卵子¹⁰⁾の卵黄膜内層には、精子を特異的に受容するレセプターが存在することが明らかになった。さらに、Robertsonら⁸⁾は、放卵後の卵から分離した卵黄膜内層にも同様の機能が存在することを示し、これを精子とともに体外で培養することによって膜上にできる孔(精子侵入痕)の数を指標に、精子の品質を評価する方法 (Sperm-Egg Interaction Assay : S-E法) を報告した。しかし、その評価結果と交配による実際の受精率との関係は明らかにされていない。

そこで本研究では、雄アヒルの選抜において、雄個体ごとの繁殖能力の評価を迅速かつ正確に行うことを目的として、S-E法による精子の卵黄膜侵入能と交配による受精成績との比較を行った。また、従来の間接評価指標

である精子運動性についてもあわせて検討した。

II. 材料および方法

1. 供試動物

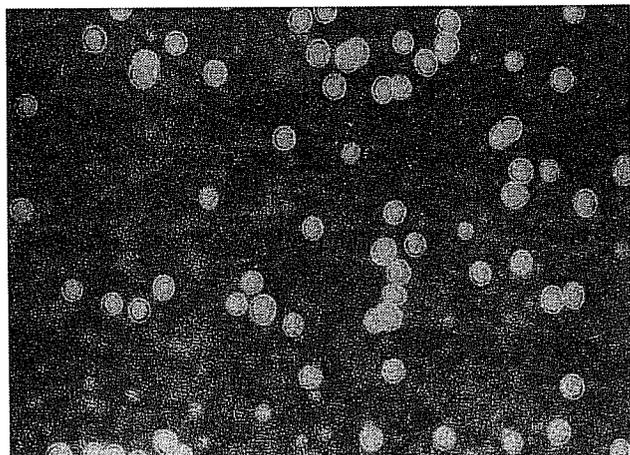
供試アヒルは、雌雄とも新大阪種 (30~34週齢) で、すべて個別ケージでの単飼とし、繁殖用配合飼料を不断給与した。

2. 精液採取と処理

6羽の雄から、人工陰法¹¹⁾により個別に精液を採取し、pH6.5のBeltsville Poultry Semen Extender⁹⁾ (BPSE) で精子濃度を $2 \times 10^9/ml$ に調整した。その後、各精液サンプルごとに、精子の卵黄膜への侵入能および運動性を測定し、同時に雌への人工授精による受精試験に供した。

3. 精子の卵黄膜侵入能の測定

精子の卵黄膜侵入能の測定は、Robertsonら⁸⁾の方法を一部改変して用いた。放卵されたアヒル卵の胚盤以外部分から卵黄膜を切り取り、1.0% NaCl溶液中で洗浄して卵黄成分を除去した。実体顕微鏡下でピンセットを用いて卵黄膜内層と外層を分離し、内層を切断して8mm角の小片、約20枚を調製した。卵黄膜内層の小片を、ホールガラスのウェルに入れたEagle MEM培地 (MEM) 0.75mlの表面に浮遊させ、39℃で15分間前培養した。各精液サンプルの精子濃度をMEMを用いて $6 \sim 90 \times 10^6/ml$ に調整し、30℃で5分間加温した。その後、精液サンプル0.15mlをホールガラスのウェルに注入して最終精子濃度を $1 \sim 15 \times 10^6/ml$ とし、卵黄膜内層とともに39℃でさらに5分間培養した。培養終了後、卵黄膜内層を5℃の1.0% NaCl中で洗浄し、スライドガラス上に広げた。次いで、0.01%のホルマリン水溶液0.15mlを緩やかに滴下して固定し、シッフ液³⁾で染色した。光学顕微鏡



第1図 Sperm-Egg Interaction法における卵黄膜への精子侵入痕

下 ($\times 150$) で任意の5視野について観察し、精子の侵入によって膜上にできた孔 (第1図) の数を数えて 1 mm^2 当たりの数に換算した。

4. 精子運動性の測定

精子運動性の測定には、高倍率希釈した精液中における個々の精子の運動性を観察する方法を用いた。各精液サンプルを、0.1% ウシ血清アルブミンおよび20mM N-Tris [hydroxymethyl] -2-aminomethanesulfonic acid (TES) を含む1.0% NaCl溶液¹⁵⁾ で1,600倍に再希釈し、30℃で10分間加温した。その後、サンプルを血球計算盤のチャンパーに注入し、30℃に設定した加温板を用い、位相差顕微鏡下 ($\times 400$) で観察した。任意の5視野中の約200の精子について、前進運動を示すもの (A)、振り運動を示すもの (B)、静止しているもの (C) を数え、次式により指数化した。

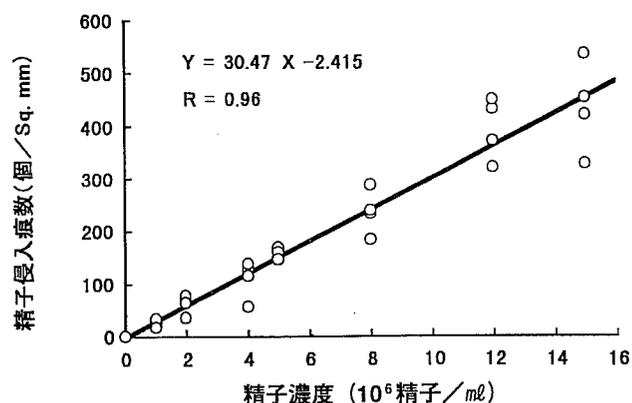
$$\text{精子運動指数} = 100 \times (A + 1/2 B) / (A + B + C)$$

5. 受精試験

各精液サンプルに雌7羽を無作為に振り分け、1羽当たり約 75×10^6 精子を陰深部に注入した。授精日を0として2から8日に産まれた卵を集め、孵卵器に入れた。孵卵第7日目に透過光により胚の発育を判定し、生存胚の認められる卵の割合を受精率とした。

III. 結果

第2図にS-E法における、精子濃度と卵黄膜内層上の孔の数との関係を示した。孔の数は、精子濃度の上昇とともに直線的に増加し、これが精子の侵入によってあけられたものであることが証明された。精子濃度 $12 \times 10^6/ml$ 以上では、孔が重なり合って識別が困難になり、 $2 \times 10^6/ml$ 以下では、孔の数が少なく結果の信頼性が低下すると考えられた。したがって、以後の実験では、すべて精子濃度を $5 \times 10^6/ml$ とした。



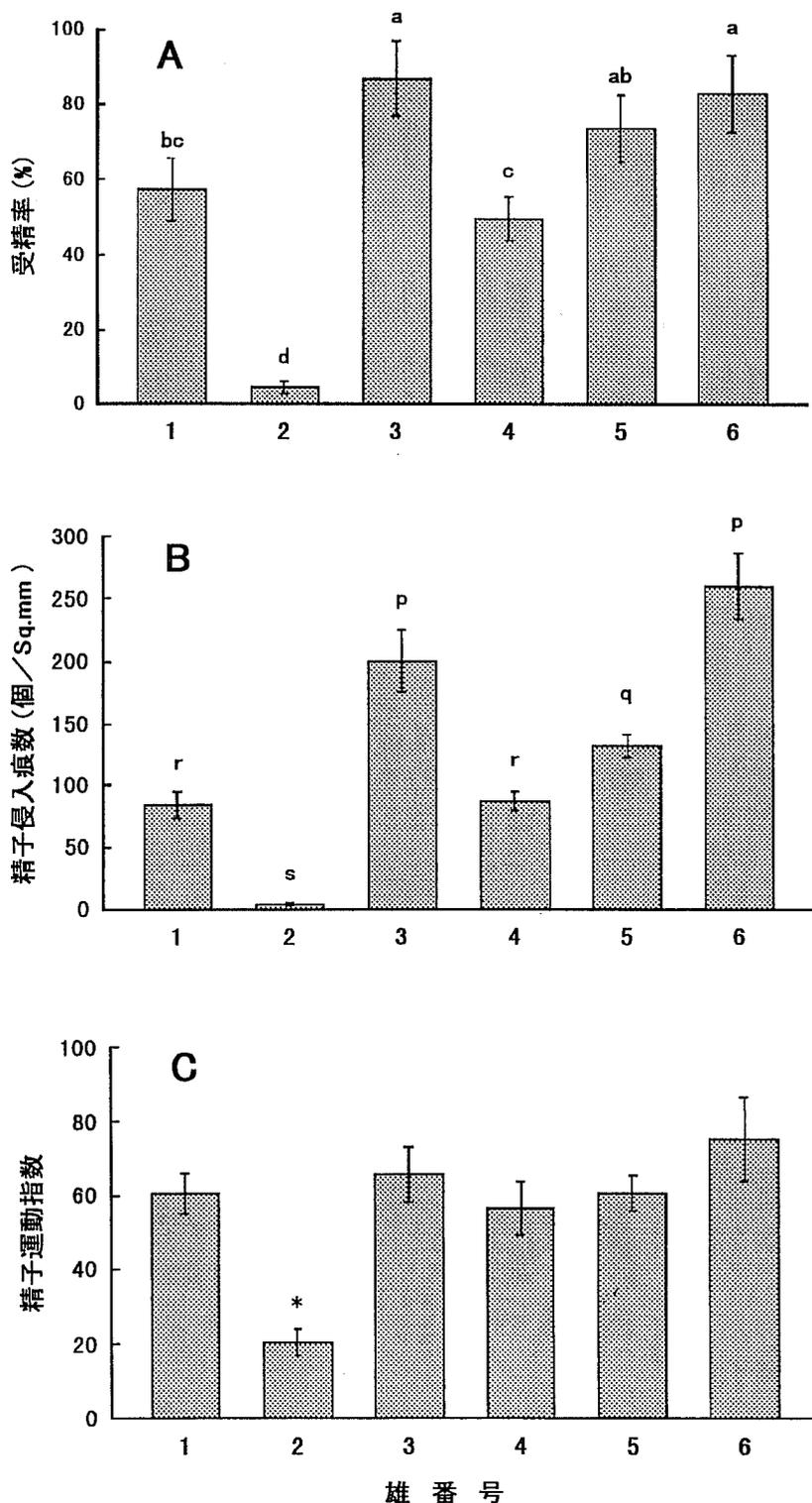
第2図 Sperm-Egg Interaction法における精子濃度と卵黄膜への精子侵入痕数の関係

6羽の雄アヒルから個別に採取した精子を、それぞれ雌に人工授精して得た受精成績を第3図Aに示した。3回の反復試験における受精率の平均値は雄3および6において高く、雄1、2および4との間に有意差が認められた。雄2の精子による受精率は他のすべての雄のそれに対し有意に低かった。これと同一の精子サンプルの卵黄膜侵入能の比較は、第3図Bに示すとおり、概ね受精成績と同様の結果であったが、雄3および6は他のすべての雄に対し有意に高く、それ以外の雄との差が拡大する傾向がみられた。一方、同じ精子サンプルの運動性の比較結果は第3図Cに示すとおりで、雄2は、ここでも他のすべての雄に対して有意に低かったが、その他の雄間に有意差は認められなかった。

次に、各精子サンプルによる人工授精の受精成績と卵黄膜侵入能および精子運動性との関係を、それぞれ第4図AおよびBに示した。精子の卵黄膜侵入能と受精率との間には、極めて高い正の相関 ($r=0.97$, $P<0.01$) が認められたが、両者の関係は直線的ではなく、対数的相関、すなわち卵黄膜侵入痕数の対数値 (log) が受精率と直線的に相関する関係を示した。一方、精子運動性と受精率との関係は直線的で、相関係数0.84 ($P<0.05$) の正の相関が認められた。

IV. 考察

本研究の結果から、アヒル精子の卵黄膜侵入能は、雄個体間で大きく異なること、人工授精による受精成績と高い正の相関関係にあることが明らかになり、S-E法によってこれを調べることで、雄の繁殖能力を正確に評価できる可能性が示された。一方、精子運動性は、人工授精の受精率との間に正の相関を示すものの、雄個体間における差が小さいため、個体ごとの繁殖能力の評価には不利であると

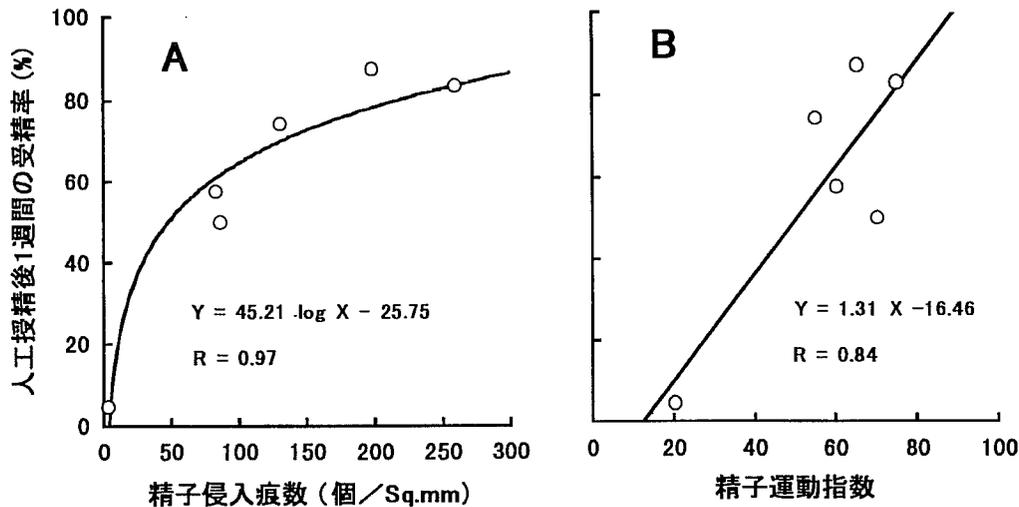


第3図 雄個別に採取したアヒル精子による人工授精の受精成績 (A)、精子の卵黄膜侵入能 (B) および運動性 (C)

平均値±標準誤差 (n=3)
a-b, p-s, * : 異符号間に有意差あり (P<0.05)

考えられた。

受精の成立には、精子の持つ複数の機能が関与している。運動性は、雌の生殖器道内における精子の移動¹¹⁾、精子貯蔵腺への貯留¹³⁾ や卵黄膜への侵入¹³⁾ に不可欠な



第4図 雄個体別に採取したアヒル精子による人工授精の受精成績と精子の卵黄膜侵入能(A)および運動性(B)との関係

機能であるが、それだけで高い受精成績を保証するものではない。受精に関与する他の重要な要素として、精子表面の糖タンパクと精子頭部のアクロゾームに内在する酵素の正常性があげられる。精子表面の糖タンパクは、精子貯蔵腺⁵⁾や卵黄膜上の精子レセプター¹³⁾において精子が認識されるために重要な物質であり、アクロゾームの酵素は精子が卵黄膜を溶解して侵入する際に不可欠である^{7,13)}。本試験のS-E法は、精子の卵黄膜への侵入過程を体外で再現したものであり、上記の複数の精子機能がすべて正常に保たれてはじめて成立する現象を評価の指標としているため、より正確に実際の受精成績を反映することができたものと考えられる。これに対し、今回用いた運動性をはじめ、従来の精子受精能の推定法は、すべて精子の単一の機能を指標とするもので、他の機能の損傷による影響は反映されない。本試験では、採取直後の新鮮精液を用いたため、精子運動指数の受精率に対する相関は比較的高かったが、精子機能に様々な劣化がおこる保存精液においては、単一機能を指標とした方法は、精子の受精能を過大評価してしまうことが指摘されている¹³⁾。

本試験における精子の卵黄膜侵入能と人工授精の受精成績との関係において、最も注目すべきは、両者の関係が直線相関ではなく対数的相関を示す点である(第4図A)。この関係は、卵黄膜侵入痕数を指標として個々の雄の精子の質を比較する上で、極めて有利であると考えられる。なぜなら、第3図AとBの比較からも明らかのように、受精率のわずかな差が、卵黄膜侵入痕数では大きな差に拡大されて表されるからである。従来、最も信頼性が高いとされてきた交配による受精能判定は、一定期間に産まれた個々の卵が受精しているか、いないかの

割合のみを示すものであり、個々の卵子が受精に至ったプロセスについては何の情報ももたらさない。言い換えれば、受精に関与した精子の状態が各精液サンプル間で異なっても、胚の発育が確認された卵には、すべて同じ「受精」という判定が下される。そのため、個々の雄の持つ受精能力の差が、必ずしも目に見えるかたちで表されない可能性がある。それに対し、卵黄膜侵入能力は、ほぼ同等の受精成績を示す精子サンプルにおいても大きく異なり、その差が侵入痕の数の差として明確に示されるため、雄個体間の能力比較には、極めて有効な判断材料をもたらすものと考えられる。

さらに、この手法の利点として、雌の影響を完全に排除できる点があげられる。人工授精による受精試験においては、雌側の精子受容能力の個体差が大きく影響するため、これを抑えるには、供試雌の数、実験の繰り返し数を増やさねばならない。しかし、S-E法においては、1個の卵から採取した卵黄膜内層を数十枚に切断して使えるので、複数の精子サンプルの比較を均一な条件下で行うことが可能となる。また、S-E法は通常の恒温器と光学顕微鏡以外に特別な測定機器を必要とせず、判定に要する時間も数十分程度と短いことから極めて実用性の高い技術と考えられる。

以上のことから、S-E法による精子の卵黄膜侵入能の測定は、アヒル精子の受精能を正確かつ簡便に評価できる手法であることが明らかになり、これを応用することで、従来、多くの時間と労力を要した雄の繁殖能力の判定の効率化が図れるものと考えられる。また、この手法は、精子の様々なダメージを鋭敏に反映することから、今後、精液の保存条件を検討する手段としても高い利用価値を持つものと考えられる。

V. 摘要

雄アヒルの繁殖能力の新しい評価法として、体外培養における精子の卵黄膜への侵入痕数を指標とする手法 (Sperm-Egg Interaction法：S-E法) を試み、精子運動性および人工授精による受精試験との間で結果を比較した。

6羽の雄から個別別に得た精液による人工授精の受精率、精子の卵黄膜侵入痕数および精子運動性には、いずれも個体間に有意差が認められたが、個体間の差異は、卵黄膜侵入痕数において最も大きく、精子運動性で最も小さかった。

各精子サンプルによる人工授精の受精率は、卵黄膜侵入痕数の対数 (log) との間に高い正の相関 ($r=0.97$, $P<0.01$) を示し、受精率のわずかな差が、卵黄膜侵入痕数では、より大きく拡大されて表されることがわかった。

以上の結果から、S-E法による精子の卵黄膜侵入能の測定は、アヒル精子の受精能を正確かつ簡便に評価できる手法であることが明らかになり、従来、多くの時間と労力を要した雄の繁殖能力の判定の効率化に応用できるものと考えられた。

VI. 謝辞

本研究の遂行にあたり、多くのご助言を賜った、大阪府立大学農学部獣医臨床繁殖学講座 澤田 勉教授、稲葉俊夫助教授に深くお礼申し上げます。

VII. 引用文献

- 1) Bakst, M. R., Wishart, G. J., and Brillard, J. P. (1994). Oviducal sperm selection, transport and storage in poultry. *Poult. Sci. Rev.* 5:117-143.
- 2) Bilgili, S. F. and Rendon, J. A. (1984). Fluorimetric determination of avian spermatozoa viability and concentration. *Poultry. Sci.* 63:2275-2277.
- 3) Bramwell, R. K. and Howarth, J. R. (1992). Preferential attachment of cock spermatozoa to the perivitelline layer directly over the germinal disk of the hen's ovum. *Biol. Reprod.* 47:1113-1117.
- 4) Chaudhuri, D. and Wishart, G. J. (1988). Predicting the fertilizing ability of avian semen: the development of an objective colorimetric method for assessing the metabolic activity of fowl spermatozoa. *Br. Poult. Sci.* 29:837-845.
- 5) Froman, D. P. and Thurston, R. J. (1984). Decreased fertility resulting from treatment of fowl spermatozoa with neuraminidase or phospholipase C. *Poultry. Sci.* 63:2479-2482.
- 6) Howarth, B. (1990). Avian sperm-egg interaction: Perivitelline layer possesses receptor activity for spermatozoa. *Poultry. Sci.* 69:1012-1015.
- 7) Koyanagi, F., Masuda, S., and Nishiyama, H. (1988). Acrosome reaction of cock spermatozoa incubated with the perivitelline layer of the hen's ovum. *Poultry. Sci.* 67:1770-1774.
- 8) Robertson, L., Brown, H. L., Stines, H. J., and Wisart, G. J. (1997). Characterization and application of an avian in vitro spermatozoa-egg interaction assay using the inner perivitelline layer from laid chicken eggs. *J. Reprod. Fertil.* 110:205-211.
- 9) Sexton, T. J., and Giesen, A. F. (1982). Beltsville Poultry Semen Extender. 6. Holding turkey semen for six hours at 15 C. *Poultry. Sci.* 61:1202-1208.
- 10) Steele, M.G., Meldrum, W., Brillard, J.P., and Wishart, G.J. (1994). The interaction of avian spermatozoa with the perivitelline layer in vitro and in vivo. *J. Reprod. Fertil.* 101:599-603.
- 11) Tan, N.S. (1980). The training of drakes for semen collection. *Annales de Zootechnie.* 29:93-103.
- 12) Wilson, H. R., Piesco, N. P., Miller, E. R., and Nesbeth, W.G. (1977). Prediction of the fertility potential of broiler breeder males. *World's Poult. Sci. J.* 35:95-118.
- 13) Wishart, G. J. (1995). New approaches to evaluating male and female fertility. *Proc. the first international symposium on the artificial insemination of poultry. Poultry science association Savoy IL.* PP. 207-223.
- 14) Wishart, G. J., and Palmer, F.H. (1986). Correlation of the fertilizing ability of semen from individual male fowl with sperm motility and ATP content. *Br. Poult. Sci.* 27:97-102.
- 15) Wishart, G.J., and Ross, F.H. (1985). Characterization of a spectrophotometric technique for the estimation of fowl and turkey sperm motility. *Gamete. Res.* 11:169-178.