

高浸透圧凍結希釈液を用いたバークシャーおよびアグー精子の凍結保存におけるglycerol濃度の影響

誌名	日本養豚学会誌 = The Japanese journal of swine science
ISSN	0913882X
著者	知念, 司 生駒, エレナ 當眞, 嗣平 手島, 久智 岡崎, 哲司
巻/号	49巻3号
掲載ページ	p. 128-132
発行年月	2012年9月

短 報

高浸透圧凍結希釈液を用いたバークシャーおよび アグー精子の凍結保存における glycerol 濃度の影響

知念 司・生駒エレナ*・當眞嗣平・手島久智**・岡崎哲司**

沖縄県畜産研究センター, 沖縄県国頭郡今帰仁村字諸志 2009-5, 905-0426

*鹿児島県農業開発総合センター畜産試験場, 鹿児島県霧島市国分上之段 2440, 899-4461

**大分県農林水産研究指導センター畜産研究部, 大分県豊後大野市三重町赤嶺 2328-8, 879-7111

(2012年4月12日受付, 2012年7月5日受理)

緒 言

ブタ凍結精液は, 凍結時のダメージにより融解後の精子機能が損なわれ, 人工授精後の繁殖成績が低いことから生産現場ではほとんど使用されていない。これまでに, 凍結過程の急激な温度変化は精子の頭部, 中片部および尾部それぞれを損傷させる結果, 受精能に悪影響を与えることが知られている (CURRY, 2000)。精子は膜の単純拡散あるいは, 細胞膜に発現するタンパク質である Aquaporines により細胞内外の水分子の透過が行われているが (CALLIES ら, 2008), この細胞内自由水が急速凍結により氷晶を形成するため, 氷晶が細胞質, 細胞小器官, 細胞膜に対して物理的ダメージを与え, その結果, 精子の運動性の低下が起こると考えられている (WATSON, 2000; JOHNSON

ら, 2000; NISHIZONO ら, 2004)。精子凍結希釈液で一般的に使用される glycerol は細胞内氷晶形成を抑制することで凍結を可能とするが (LOVELOCK and POLGE, 1954), 一方で, 細胞毒性も合わせ持ち, 精子の代謝活性を阻害するなど, 精子の生存性に対して負に作用することも報告されている (JEYENDRAN ら, 1985; HAMMERSTEDT ら, 1990)。GILMORE ら (1998) は, ブタ精子は他の動物種のそれと比較して glycerol の細胞毒性に対する耐性が著しく低いことを報告しており, 実際に凍結希釈液への添加濃度を 4% 以上にすると人工授精後の受精率が低下する (WILMUT and POLGE, 1974)。したがって, ブタ精子においては, 低濃度の glycerol でも凍結可能とする凍結希釈液を開発する必要がある。

凍結希釈液を高浸透圧条件にしてウシ精子を処

The Effect of Glycerol on Cryopreservation of Berkshire or Agu Spermatozoa Using Hyperosmotic Freezing Extender

Tukasa TINEN, Erena IKOMA*, Shihei TOUMA, Hisanori TESHIMA** and Tetsuji OKAZAKI**

Okinawa Prefectural Livestock and Grassland Research Center, Nakijin, Okinawa 905-0426, Japan

*Livestock Research Institute, Kagoshima Prefectural Institute for Agricultural Development, Kirishima, Kagoshima 889-4461, Japan

**Smaller Livestock and Environment Section, Livestock Research Institute, Oita Prefectural Agriculture, Forestry and Fisheries Research Center, Bungo-ono, Oita 879-7111, Japan

Key words : freezing extender, frozen-thawed spermatozoa, glycerol, pig

連絡者 : 岡崎哲司 (E-mail : okazaki-tetsuji@pref.oita.lg.jp Tel. 0974-22-0673)

理すると、冷却および凍結過程で、精子内の脱水が生じ、結果的に細胞内氷晶形成を低減化することが可能となる (LIU and FOOTE, 1998)。また、我々は、ブタにおいて、凍結希釈液を高張条件 (400 mOsm/kg) にすることで、glycerol 濃度を 3% から 2% へと低減でき、融解後の精子細胞膜が保護できることを明らかにしてきた (OKAZAKI ら, 2009)。これらの結果から、凍結前に高浸透圧条件で処理することは、glycerol 非依存的に細胞内自由水を脱水でき、融解後の精子の機能性を向上できる有効な手法であると考えられる。

凍結精子保存の利点として、遺伝資源の保存があり、現在、近交退化が懸念されているパークシャー (B) や沖縄在来豚アグー (A) は遺伝子の多様性を持たせるため、精子の凍結保存は急務である。上記に示した凍結希釈液 (OKAZAKI ら, 2009) はランドレース (L)、大ヨークシャー (W) およびデュロック (D) の精子凍結に利用可能であることを示したが (OKAZAKI ら, 2010)、B および A 精子凍結に有効かは検証されておらず、それらを確認し、遺伝子バンクを構築することが求められる。そこで、本研究では、B および A 精子の凍結希釈液の改良を行う目的で、まず、凍結希釈液の高張条件を設定するために各品種における精液の浸透圧を測定した。また、その高張条件下において glycerol 濃度が通常利用される濃度 (3%) から低減可能であるか、さらには、融解後の精子機能が改善されるか否かについて検討した。

材料および方法

凍結精液作製に用いた雄豚は、鹿児島県畜産試験場のパークシャーおよび沖縄県畜産研究センターで繁養しているアグーであり、各品種 3 頭を供試した。供試豚の月齢は B が 40~56 ヶ月齢、A が 17~76 ヶ月齢で、パドック付きの 3 m×5 m 以上の豚房において飼育した。飼料は、市販の種豚用配合飼料を 2.0~2.5 kg/日 で定量給与した。下記に示す精液浸透圧測定においてのみ L (9~30 ヶ月齢, n=5)、W (11~25 ヶ月齢, n=5) および D (8~36 ヶ月齢, n=5) を用いた。回収した精液は、既報にしたがって凍結融解し、その後、機

能性を解析した (OKAZAKI ら, 2009)。簡潔に述べると、採取した濃厚部精液を前処理液 (0.33 M グルコース, 12.8 mM クエン酸ナトリウム, 14.3 mM 重炭酸ナトリウム, 9.9 mM EDTA-2Na, 20 万単位/L ペニシリン G, 50 万単位/L Polymyxin B) で等倍希釈後、2 時間かけて 15°C へ冷却した。この時、アグーにおいては、濃厚部が明瞭でないため全量採取し、同様の処理を行った。その後、遠心分離後前処理液と精漿の混合液を水流アスピレーターにより除去し、各凍結希釈液 (従来液; 300 mOsm/kg, 最終 glycerol 濃度 3%, 高張液; 400 mOsm/kg, 最終 glycerol 濃度 2%) にて処理した。400 mOsm/kg の高張液 (修正 Niwa and Sasaki freezing extender (NSF)) は、2 倍濃度の卵黄無添加 NSF を作製し、超純水を加えて調整した。0.5 mL ストローに充填後 (精子濃度; 1×10^9 sperm/mL), 液体窒素蒸気中で凍結し、液体窒素中で保存した。融解時には、凍結精液ストローを 60°C の温湯に 8 秒間浸漬し、その後、38°C に保温した融解液へ注入した。融解した精液は 38°C の恒温水槽で 3 時間までインキュベートし、後述する精子機能性を解析した。

融解後精子運動率は 38°C で培養し、Computer-assisted sperm motility analysis (CASA) system を搭載した精子運動解析装置 (SMAS, DITECT, Tokyo, Japan) を用いて精子運動率を測定した。精子膜損傷の検出は、SYBR14-Propidium iodide (PI) (Sperm viability kit; Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) の二重蛍光染色法にて、また、先体膜の損傷は、FITC-labeled peanut agglutinin (PNA) (Sigma, St. Louis, MO, USA) と PI の二重蛍光染色法にて検出した (OKAZAKI ら, 2009)。精子膜および精子先体膜の検査は、1 サンプルあたり合計 200 個以上の精子をカウントした。

凍結希釈液および各品種の精漿の浸透圧は、超過冷却方式による氷点降下法を採用した浸透圧計 (OSMOSTAT, OM-6020, ARKRAY, Kyoto, Japan) により測定した。

【実験 1】凍結希釈液の高浸透圧条件を設定するために、各品種の精漿の浸透圧を測定したところ、B では 307.1 ± 2.4 mOsm/kg (n=7)、A では 297.0 ± 1.7 mOsm/kg (n=7) であり、一般豚 (ラ

表 1. 400mOsm/kg 条件下の Glycerol 濃度が融解後精子機能性に及ぼす影響

Table 1. The effect of glycerol concentration on post-thaw motility, membrane integrity and acrosomal integrity of sperm under 400 mOsm/kg condition

Breeding	Glycerol (%)	Total motility (%)	Membrane integrity (%)	Acrosomal integrity (%)
Berkshire	2	81.3±3.4	55.2±6.9	82.5±5.1*
	3	72.0±11.2	42.9±4.5	68.6±7.6
Agu	2	66.7±9.9	53.8±3.6	84.7±2.1**
	3	41.5±14.4	51.9±6.3	76.7±2.3

The values shown represent the means±SEM of 3 replicates. Frozen semen treated by each glycerol concentration was thawed and incubated by Modena solution up to 3hr. Significant differences (*; $P<0.05$, **; $P<0.01$) were detected between treatments (glycerol (%)) among same breed.

ンドレース・大ヨークシャー・デュロック; 299.6±1.5mOsm/kg (n=15) のそれとほとんど変化はなかったことから、凍結希釈液の浸透圧を 400 mOsm/kg の高張条件に設定した。この高張条件において、glycerol 濃度が精子運動率、精子膜および精子先体膜正常率に及ぼす影響を検討した。

【実験 2】実験 1 において、高張液では、glycerol 濃度を 2% に低減できることが明らかとなり、この新規凍結希釈液と従来液 (300 mOsm/kg+3% glycerol) を用いて比較検討を行った。

精子運動率、精子膜正常率および先体膜正常率は平均値±SEM で示した。統計処理に際してパーセントで示した値を、arc-sin で変換後、同一品種内において各処理区間 (実験 1; glycerol 濃度、実験 2; 凍結希釈液) を一次元 ANOVA にて検定した。

結 果

400 mOsm/kg の高張条件下において、glycerol 濃度を 2 および 3% で凍結処理した精子は融解後、いずれの品種においても運動率は高い値を示した (実験 1, 表 1)。また、融解後 3 時間培養後の精子膜は両処理間で有意な差は認められなかったが、一方で、glycerol 濃度 3% で凍結処理した両品種の精子は先体膜が有意に損傷していた (B;

$P<0.05$, A; $P<0.01$)。これらの結果から、400 mOsm/kg, 2% glycerol 濃度が有効な条件であると考え、実験 2 では、本凍結希釈液 (新規凍結希釈液) と従来液 (300 mOsm/kg+3% glycerol) を比較解析した。B において新規凍結希釈液にて処理した場合、融解後精子運動率および精子膜正常率に有意差は認められなかったが、先体膜には有意な効果が確認された (表 2, $P<0.05$)。A においては、新規希釈液を用いることで融解後の運動率を有意に改善した ($P<0.05$)。さらに先体膜においても正の効果が認められた ($P<0.05$)。

考 察

近年、CORCUERA ら (2007) は、lactose を 12% へと増加させた (浸透圧 360 mOsm/kg) 凍結希釈液でブタ精子を凍結すると、融解後の運動率が向上することを報告している。我々もまた、300, 400 および 500 mOsm/kg の凍結希釈液で精子を凍結した際、400 mOsm/kg が至適浸透圧であることを明らかとした (OKAZAKI ら, 2009)。本研究では、この条件下で glycerol 濃度を通常の 3% から 2% へと低減することで B および A 精子の融解後の精子機能性を向上させることができた。高濃度の glycerol は融解後の精子膜、先体膜およびミトコンドリア膜などの細胞膜損傷に関与してい

表 2. 融解後精子機能性における従来および新規凍結希釈液の比較解析
 Table 2. Comparative analysis of post-thaw sperm functions in conventional and novel freezing extender

Breeding	Treatment	Total motility (%)	Membrane integrity (%)	Acrosomal integrity (%)
Berkshire	Conventional extender	55.0±6.3	40.8±4.9	64.8±4.6
	Novel extender	72.2±5.7	54.2±5.4	82.1±2.6*
Agu	Conventional extender	32.2±3.5	42.0±3.8	68.3±4.1
	Novel extender	66.3±7.4*	54.3±2.8	83.4±2.0*

The values shown represent the means±SEM of 3 replicates. Collected semen was frozen by conventional (300 mOsm/kg+3% Glycerol) or novel (400 mOsm/kg+2% Glycerol) freezing extender. Thawed spermatozoa were incubated by Modena solution up to 3 hr. Significant differences (*; P<0.05) were detected between treatments among same breed.

る (CRISTER ら, 1988; GAO ら, 1995; BALL and VO, 2001)。これらは精子が高濃度の glycerol に暴露され, 細胞膜の脂質二重層の不安定化を起こし, その結果, 膜の細胞質側のリン脂質量が減少するためと考えられている (LOVELOCK, 1957)。これらの報告から, 本研究において glycerol 濃度を 2% へと低下させることで, 凍結時における glycerol 自身あるいはその Osmotic shock による精子膜や先体膜の損傷が緩和され, それに伴って融解後の高い運動率が維持されたと推察された。

希釈液中あるいは細胞中の水分子の透過性は, glycerol などの凍結保護剤 (CPAs; Cryoprotectant agents) 存在下では低下することから (GILMORE ら, 1995), glycerol を添加する前段階, すなわち, 15°C での第一次希釈時に凍結希釈液の高浸透圧条件で精子細胞内の水分子を流出させ, 次に, 5°C での第二次希釈時に既存より低濃度の glycerol を添加することで, glycerol による悪影響を最小限に緩和できるのではないかと考察した。

以上の結果から本研究において, 凍結希釈液を 400 mOsm/kg の高張条件にし, それに伴い glyc-

erol 濃度を 3% から 2% へと減少させることは精子膜および先体膜の保護に重要であり, 本凍結希釈液は一般豚以外にもパークシャーやアグーなど他の品種でも有効であり, ブタ遺伝子バンク構築に貢献すると期待される。

謝 辞

今回の試験遂行にあたり, 豚の飼養管理および精液採取に御協力頂いた小波津明彦氏に感謝申し上げます。なお, 本成果は, 新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業 (課題番号 22086) により行われたものである。

文 献

- BALL, B.A. and A. VO : 2001, Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential, *J. Androl.*, **22**, 1061-1069.
- CALLIES, C., T.G. COOPER and C.H. YEUNG : 2008, Channels for water efflux and influx involved in volume regulation of murine spermatozoa, *Reproduction*, **136**, 401-410.

- CORCUERA, B.D., P. MARIGORTA, A. SAGUES, F. SAIZ-CIDONCHA and J.F. PEREZ-GUTIERREZ : 2007, Effect of lactose and glycerol on the motility, normal apical ridge, chromatin condensation and chromatin stability of frozen boar spermatozoa, *Theriogenology*, **67**, 1150-1157.
- CRISTER, J.K., A.R. HUSE-BENDA, D.V. AAKER, B.W. ARNESON and G.D. BALL : 1988, Cryopreservation of human spermatozoa. III. The effect of cryoprotectants on motility, *Fertil. Steril.*, **50**, 314-320.
- CURRY, M. R : 2000, Cryopreservation of semen from domestic livestock, *Rev. Reprod.*, **5**, 46-52.
- GAO, D.Y., J. LIU, C. LIU, L.E. MCGANN, P.F. WATSON, F.W. KLEINHANS, P. MAZUR, E.S. CRISTER and J.K. CRISTER : 1995, Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol, *Hum. Reprod.*, **10**, 1109-1122.
- GILMORE, J.A., J. LIU, A.T. PETER and J.K. CRISTER : 1998, Determination of plasma membrane characteristics of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation, *Biol. Reprod.*, **58**, 28-36.
- GILMORE, J.A., L.E. MCGANN, J. LIU, D.Y. GAO, A.T. PETER, F.W. KLEINHANS and J.K. CRISTER : 1995, Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa, *Biol. Reprod.*, **53**, 985-995.
- HAMMERSTEDT, R.H., J.K. GRAHAM and J.P. NOLAN : 1990, Cryopreservation of mammalian sperm : what we ask them to survive, *J. Androl.*, **11**, 73-88.
- JEYENDRAN, R.S., H.H. VAN DER VEN, M. PEREZ-PELAEZ and L.J. ZANEVELD : 1985, Nonbeneficial effects of glycerol on the oocyte penetrating capacity of cryopreserved and incubated human spermatozoa, *Cryobiology*, **22**, 434-437.
- JOHNSON, L. A., K.F. WEITZE, P. FISER and W.M. MAXWELL : 2000, Storage of boar semen, *Anim. Reprod. Sci.*, **62**, 143-172.
- LIU, Z. and R.H. FOOTE : 1998, Bull sperm motility and membrane integrity in media varying in osmolality, *J. Dairy. Sci.*, **81**, 1868-1873.
- LOVELOCK, J.E. and C. POLGE : 1954, The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol, *Biochem. J.*, **58**, 618-622.
- LOVELOCK, J.E. : 1957, The denaturation of lipid-protein complexes as a cause of damage by freezing, *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **147**, 427-433.
- NISHIZONO, H., M. SHIODA, T. TAKEO, T. IRIE and N. NAKAGATA : 2004, Decrease of fertilizing ability of mouse spermatozoa after freezing and thawing is related to cellular injury, *Biol. Reprod.*, **71**, 973-978.
- OKAZAKI, T., S. ABE and M. SHIMADA : 2009, Improved conception rates in sows inseminated with cryopreserved boar spermatozoa prepared with a more optimal combination of osmolality and glycerol in the freezing extender, *Anim. Sci. J.*, **80**, 121-129.
- OKAZAKI, T., T. MIHARA, Y. FUJITA, S. YOSHIDA, H. TESHIMA and M. SHIMADA : 2010, Polymyxin B neutralizes bacteria-released endotoxin and improves the quality of boar sperm during liquid storage and cryopreservation, *Theriogenology*, **74**, 1691-1700.
- WATSON, P.F. : 2000, The causes of reduced fertility with cryopreserved semen, *Anim. Reprod. Sci.*, **60-61**, 481-492.
- WILMUT, I. and C. POLGE : 1974, The fertilizing capacity of boar semen stored in the presence of glycerol at 20, 5 and -79 degrees C, *J. Reprod. Fertil.*, **38**, 105-113.