

# 琉球在来豚（アグー）の効率的繁殖技術の確立

## (4) 凍結精液希釈液へのアスコルビン酸- $\alpha$ -グルコシドの添加が融解後の精子性状に及ぼす影響

仲村敏 島袋宏俊 稲嶺修 吉元哲兵\*  
山内昌吾\* 建本秀樹\* 与古田稔

### I 要 約

琉球在来豚(アグー)精子に適した凍結保存技術の確立を目的に、アスコルビン酸より安定性、持続性に優れた抗酸化物質であるアスコルビン酸誘導体(アスコルビン酸- $\alpha$ -グルコシド; AA-2G)の凍結用希釈液への添加効果について検討した。

1. 凍結用希釈液へ添加した AA-2G 濃度は、0, 100, 200, 400, 800  $\mu$ M の 5 水準に区分し、融解後の精子性状を比較した。その結果、200  $\mu$ M 添加区では運動精子率(Motile)、前進運動精子率(Progressive)および精子細胞膜正常率が他の添加区に比べ有意に高い値を示した(P<0.05)。また、精子先体タンパク質酵素活性において 200  $\mu$ M 添加区で高い値を示す傾向にあった。

2. Malondialdehyde(MDA)生成量は、AA-2G無添加区に比べ200  $\mu$ M添加区は有意に減少した(P<0.05)。また、200  $\mu$ M AA-2G添加区におけるDNA正常性、細胞内ATP量および体外受精精子侵入率は無添加区に比べて有意に増加した(P<0.05)。

以上の結果、凍結用希釈液へAA-2Gの添加は200  $\mu$ Mが至適濃度であると推察された。またAA-2Gの添加は、脂質過酸化が抑制され、融解後の精子性状性が効果的に改善されることからアグー凍結精子を作製する上で有効な方法であると思われた。

### II 結 言

アグーは、近交退化の影響と考えられる繁殖能力の低下が認められる<sup>1)</sup>。雄では一般的な西洋品種(一般豚)と比較して精子性状が著しく劣り、アグーの繁殖効率を低下させる原因の一つとなっている<sup>2)</sup>。そのため、精液を効率良く広域的に利用し、アグーを増殖するためには、年間を通した安定的な精子供給が可能な精子凍結保存技術を確立する必要がある。

ブタ精子は精漿中の抗酸化作用が低いため、酸化ストレスに対して敏感であることが報告されている<sup>3)</sup>。そのため、近年、凍結用希釈液へ glutathion, hydroxytoluene, alpha tocopherol などの抗酸化剤を添加し、ブタの精子性状が著しく改善されることが報告されている<sup>4~6)</sup>。しかし、著者らがアグー精子を用いてこれらの抗酸化剤を添加して行った予備試験では期待された効果が得られなかった。また、生体の恒常性維持に重要な抗酸化作用を有するアスコルビン酸は、ブタ精子の凍結時に利用したという報告はほとんどなく、シカでは融解後の精子性状への効果は認められていない<sup>7)</sup>。これは、アスコルビン酸が極めて不安定で、酸化分解を受けやすく、容易にその生理活性を失うことに起因していると思われる。そこで著者らは生体移植の際に臓器保存剤として用いられている AA-2G に注目した。AA-2G は、アスコルビン酸にグルコースを結合させた物質で、アスコルビン酸より極めて安定した性質を有し、抗酸化作用も長時間持続する。

そこで、本試験ではアグー精子に適した凍結保存技術を確立するため、凍結用希釈液へのAA-2G添加効果について検討を行った。

### Ⅲ 材料および方法

#### 1. 試験設定

##### 1) 試験 1: アグー精子凍結用希釈液への AA-2G 添加濃度の検討

精子凍結用希釈液に添加する AA-2G 濃度は 0, 100, 200, 400, 800  $\mu\text{M}$  を添加した 5 水準の試験区を設け、融解後の精子性状を比較評価した。なお、精子性状は、運動性、細胞膜正常性、先体タンパク質分解酵素活性を指標として評価した。

##### 2) 試験 2: AA-2G 添加が精子性状へ与える効果

試験 1 の結果により得られた成績により至適濃度を決定し、AA-2G 処理区と無添加処理区の凍結融解精子における細胞膜脂質過酸化度、DNA 正常性、精子生存性、体外受精能について試験を行い、精子性状へ与える効果を確認した。

#### 2. 期間および場所

試験は 2006 年 4 月から 2007 年 3 月に沖縄県畜産研究センターで実施した。

#### 3. 供試精液

精液は、当センターで飼養しているアグー種雄豚 3 頭(個体番号: A-1, A-2, A-3)から手圧法により全精液を採取し、試験に供した。

#### 4. 凍結精液の作製

凍結精液の作製は著者ら<sup>2)</sup>の方法により行った。精液を採取後、精漿を遠心除去した。その後、Beltsville thawing solution(BTS)で遠心洗浄を行い、Beltsville F5(BF5)で精子濃度が  $10 \times 10^8$  sperm/ml になるよう調製し、約 1 時間かけ 5°C まで冷却した。5°C で約 2.5 時間静置後、同温の 4% glycerol 加 BF5 を等量加え、ドライアイス上で 0.1ml づつ錠剤化凍結し、約 10 分後に液体窒素中に浸漬し保存した。

#### 5. 精子性状検査

##### 1) 精子運動性・精子細胞膜正常性・精子先体タンパク質酵素活性・精子体外受精能

検査は著者ら<sup>2)</sup>の方法により行った。精子運動性は、精子運動性解析装置 (Ceros Sperm Analyzer, Hamilton-Thorne Research) を用いて Motile および Progressive を測定し、これを指標として評価した。

精子細胞膜正常性は、CFDA/PI 蛍光染色により評価した。

精子先体タンパク質酵素活性は、固相化ゼラチンスライドに形成された光輪(halo)直径を精子アクロシン活性の指標として評価した。

精子体外受精能は、培養後の卵子をホールマウント標本し、卵細胞質内に精子頭部もしくは雄性前核ならびに尾部の両方が確認できる卵を精子侵入卵とし評価した。

##### 2) 細胞膜脂質過酸化度(MDA 生成量)

精子細胞膜の脂質過酸化は、Roca ら<sup>4)</sup>の方法に準じて、チオバルビツール酸(TBA)試験により MDA 生成量を指標として評価した。なお、MDA は生体機能の障害に深く関わっていると考えられている活性酸素による脂質の過酸化反応過程で生成される物質で脂質過酸化の評価として利用されている。

測定方法は、凍結精子を 39°C の PBS-PVA 中で融解し、700×g, 4 分間遠心洗浄し、4°C の 1mM 加 20% トリクロロ酢酸で精子濃度  $1.2 \times 10^9$  sperm/ml になるよう希釈した。そして 4°C, 10000×g, 10 分間遠心後、上清液 0.5ml を同量の 0.7% TBA 溶液に混和し、沸騰水槽内で 10 分間加温、発色反応させた。その後、冷水で室温まで冷却し、532nm の波長で吸光度を測定し、MDA 量に換算した。

##### 3) DNA 正常性(DNA 移動度)

精子の DNA 正常性は、コメット法<sup>5)</sup>により評価した。凍結精子を 39°C の PBS-PVA 中で融解し、700×g, 4 分間遠心洗浄を 2 回を行い、4°C の 2% 2-mercaptoethanol 加 PBS-PVA で精子濃度が  $1.0 \times 10^7$  sperm/ml になるよう希釈し、4°C で 1 時間放置した。そして、精子懸濁液 10  $\mu\text{l}$  を 1.5ml の 1% アガロース溶液に混和後、スライドガラス上に 40  $\mu\text{l}$  塗抹し、4°C で固相化させた。作製した固相化スライドは、lysing 溶液(34.1 mM N-lauroyl sarcosine sodium salt, 2.5 M NaCl, 1.0 M EDTA, 9.9 mM Tris (pH 10), 2% (v/v) Triton X-100, 20  $\mu\text{g/ml}$  proteinase K, and 40.2 mM dithiothreitol)に 1 時間浸漬させた後、中性電気泳動溶液(TBE)で満たした水平型電気泳動槽で 20 分間の平衡化を行い、

50V, 2.5 分間で電気泳動を行った。泳動後、固相化スライドを洗浄、脱色、風乾した後、SYBR Green I (TaKaRa バイオ) で蛍光染色し、100 個以上の精子を鏡検した。なお、精子原形質膜から DNA 尾端までの泳動層の長さ(移動度)を DNA 損傷の程度として計測し、DNA 正常性の指標とした。

#### 4) 精子生存性(細胞内 ATP 量)

細胞内 ATP 量は高速液体クロマトグラフィー(HPLC; Shimadzu)を用いて測定した<sup>6, 7)</sup>。錠剤化凍結精液 2 錠( $1 \times 10^8$  sperm)を 39°C の PBS 中で融解し、700×g, 4 分間の遠心洗浄を 3 回行った。遠心後、精子沈殿物を 20  $\mu$ l の 1 M HClO<sub>4</sub> 溶液で希釈し、ボルテックスにより細胞を溶解し、タンパク質を変性させた。その後、室温で 12000×g, 10 分間の遠心処理を行い、15  $\mu$ l の上清液を 19.2  $\mu$ l の 1M KHCO<sub>3</sub> 溶液と混合し攪拌した後、室温で 30 分間培養した。培養後、10000×g, 5 分間の遠心処理により得られた上清液を STR ODS-II カラム(Shimadzu, 40°C)で解析した。なお、移動相は 14 mM citric acid を含む 21mM diethylaminoethanol 溶液(pH 6.8)を使用し、流量を 0.7 ml/min とした。

#### 6. 統計処理

すべての試験区で計 4 回の追試を行い、統計処理は統計解析ソフト R を用いて行った。Shapiro-Wilk normality test で正規性を確認し分散分析を行った後、有意差の認められた試験区において Tukey-Kramer test で多重比較検定を行った。なお、パーセントデータはアークサインの角度変換を行った後、統計処理に用いた。

## IV 結 果

### 1. 試験 1 : アグー精子凍結用希釈液への AA-2G 添加濃度の検討

#### 1) 精子運動性(Motile, Progressive)

表 1 および表 2 に AA-2G の添加した各処理区における融解後の Motile と Progressive を示した。その結果、融解直後(0h)の Motile は、A-2 のアグー精子のみで 100 および 200  $\mu$ M 添加区で無添加区より有意に高い値を示した(P<0.05)。融解後 1 時間と 3 時間後においては 200  $\mu$ M 添加区のすべてのアグー精子で他の添加区より有意に高い Motile と Progressive を示した(P<0.05)。

表 1 AA-2G各添加濃度における運動精子率(Motile ; %)

個体番号	AA-2G ( $\mu$ M)	融解後の経過時間 (時間)		
		0	1	3
A-1	0	54.0 $\pm$ 1.4	46.0 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>	32.1 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>
	100	50.2 $\pm$ 1.5	47.8 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	33.3 $\pm$ 1.3 <sup>b</sup>
	200	55.9 $\pm$ 1.5	53.4 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>	41.9 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>
	400	52.3 $\pm$ 1.5	44.0 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>	31.7 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>
	800	51.6 $\pm$ 1.4	39.4 $\pm$ 1.3 <sup>c</sup>	24.5 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>
A-2	0	52.7 $\pm$ 1.6 <sup>b</sup>	49.5 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>	24.9 $\pm$ 1.3 <sup>b</sup>
	100	59.8 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	46.8 $\pm$ 1.5 <sup>bc</sup>	27.3 $\pm$ 1.3 <sup>b</sup>
	200	59.9 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	57.1 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	35.7 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>
	400	56.6 $\pm$ 1.4 <sup>ab</sup>	43.1 $\pm$ 1.5 <sup>c</sup>	23.8 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>
	800	55.3 $\pm$ 1.4 <sup>ab</sup>	42.6 $\pm$ 1.3 <sup>c</sup>	24.4 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>
A-3	0	56.5 $\pm$ 1.6	39.9 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	19.9 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>
	100	56.9 $\pm$ 1.3	44.4 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	21.5 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>
	200	55.7 $\pm$ 1.4	52.3 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	27.7 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>
	400	55.6 $\pm$ 1.4	40.1 $\pm$ 1.6 <sup>b</sup>	22.6 $\pm$ 1.3 <sup>b</sup>
	800	54.2 $\pm$ 1.5	40.0 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>	20.1 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>

注1) 平均 $\pm$ 標準誤差。

2) 同個体の縦列内で異符号間に有意差有り(P<0.05)。

表2 AA-2G各添加濃度における前進運動精子率(Progressive ; %)

個体番号	AA-2G ( $\mu\text{M}$ )	融解後の経過時間(時間)		
		0	1	3
A-1	0	16.6 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	20.2 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>	15.7 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>
	100	11.9 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>	24.6 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	16.6 $\pm$ 1.0 <sup>ab</sup>
	200	15.2 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>	25.7 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	18.5 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>
	400	14.7 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>	19.9 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>	14.2 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>
	800	12.1 $\pm$ 0.9 <sup>ab</sup>	19.9 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>	10.3 $\pm$ 0.9 <sup>c</sup>
A-2	0	20.0 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	16.0 $\pm$ 1.0 <sup>bc</sup>	9.9 $\pm$ 0.9 <sup>bc</sup>
	100	20.2 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	19.2 $\pm$ 1.2 <sup>ab</sup>	13.5 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>
	200	18.9 $\pm$ 1.2 <sup>ab</sup>	22.9 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	14.4 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>
	400	15.4 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>	17.7 $\pm$ 1.2 <sup>bc</sup>	9.6 $\pm$ 0.8 <sup>c</sup>
	800	16.7 $\pm$ 1.0 <sup>ab</sup>	15.1 $\pm$ 1.0 <sup>c</sup>	9.9 $\pm$ 1.0 <sup>bc</sup>
A-3	0	18.8 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	22.2 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	9.2 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>
	100	14.8 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	22.4 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	10.1 $\pm$ 0.9 <sup>ab</sup>
	200	14.9 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	29.4 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	13.1 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>
	400	16.7 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	19.5 $\pm$ 1.3 <sup>bc</sup>	13.2 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>
	800	11.1 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>	16.6 $\pm$ 1.1 <sup>c</sup>	9.5 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>

注1) 平均 $\pm$ 標準誤差。

2) 同個体の縦列内で異符号間に有意差有り(P<0.05)。

## 2) 精子細胞膜正常性および精子先体タンパク質酵素活性

図1にAA-2Gの添加した各添加区における精子細胞膜正常性および精子先体タンパク質酵素活性を示した。精子細胞膜正常率は、精子運動性の結果と同様にすべてのアグー精子において200 $\mu\text{M}$ 区が他の添加区より有意に高い値を示した。一方、精子先体タンパク質分解酵素活性は各添加区間で有意な差は認められなかったが、すべてのアグー精子において200 $\mu\text{M}$ 区が他の添加区より高い値を示す傾向にあった。

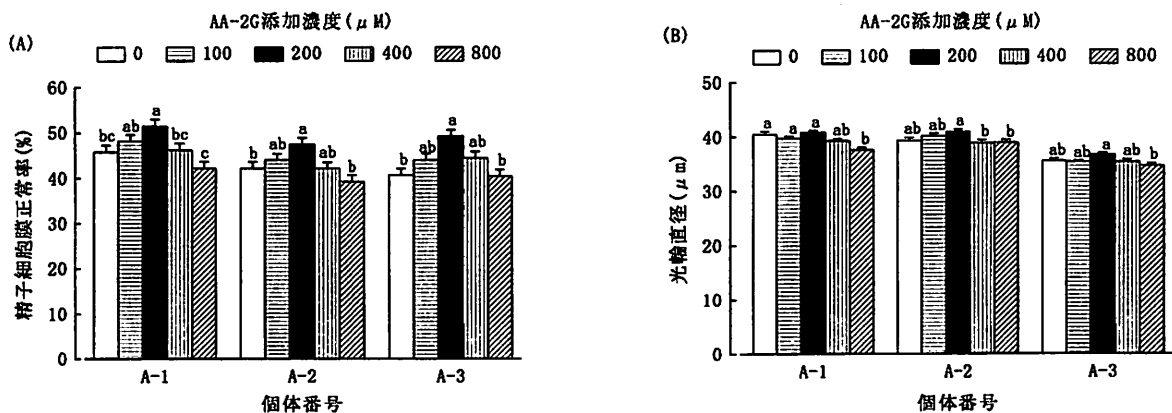


図1 AA-2G各添加区における精子細胞膜正常率(A)・精子先体タンパク質分解酵素活性(B)

注1) 平均 $\pm$ 標準誤差。

2) 同個体内の異符号間に有意差有り(P<0.05)。

## 2. 試験2：AA-2G添加が精子性状へ与える効果

図2にAA-2G添加におけるMDA生成量(A)・DNA移動度(B)・細胞内ATP量(C)・精子侵入率(D)を示した。その結果、すべてのアグー精子において、添加区が無添加区と比較して、MDA生成量が有意に低く( $P<0.05$ ) (図2A), DNA移動度も有意に低い値を示した( $P<0.05$ ) (図2B)。さらに、融解後の精子細胞内ATP量は、無添加区に比べて添加区の精子でATP量の有意な増加が認められ、精子生存性の向上が確認された( $P<0.05$ )。また、添加区の精子は体外受精試験においても無添加区と比較して有意に高い精子侵入率が観察された( $P<0.05$ )。

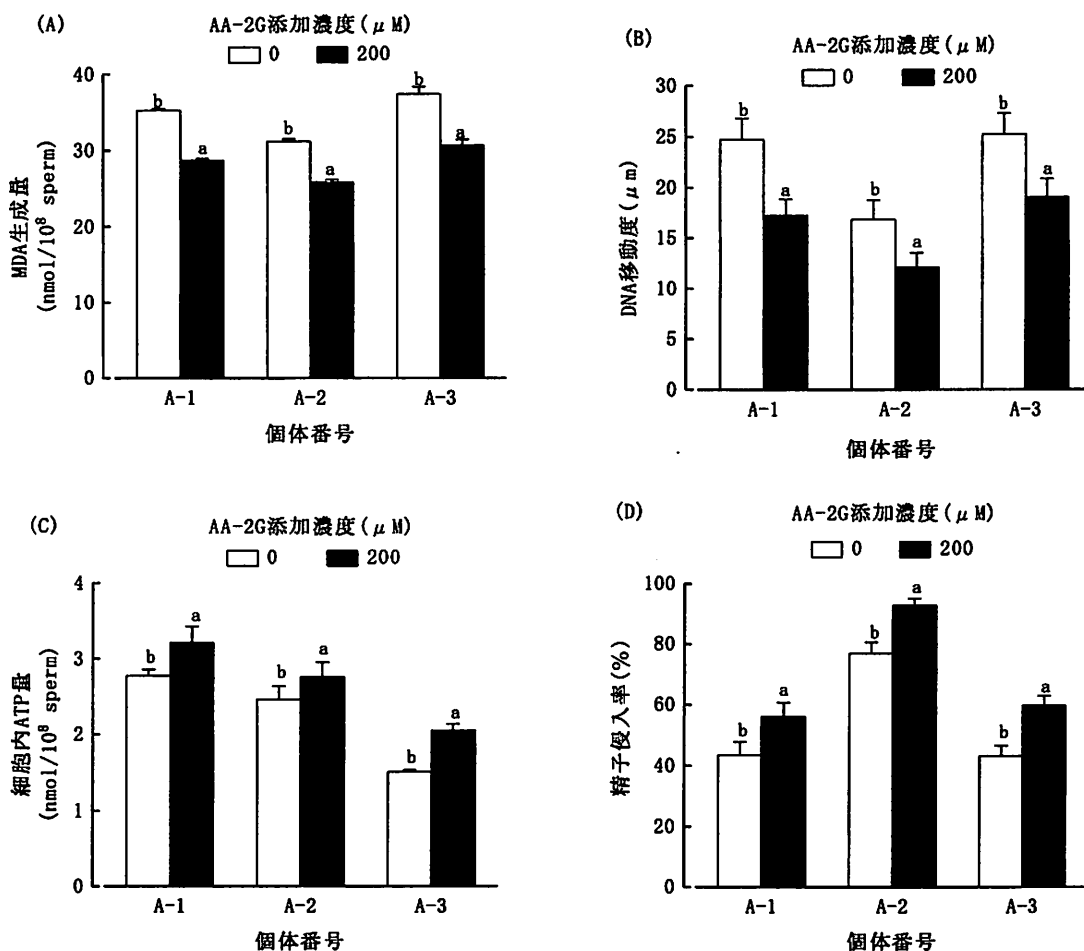


図2 AA-2G添加におけるMDA生成量(A)・DNA移動度(B)・細胞内ATP量(C)・精子侵入率(D)  
注1) 平均±標準誤差。

2) 同個体内の異符号間に有意差有り( $P<0.05$ )。

## V 考 察

試験1のアグー精子凍結用希釈液へのAA-2G添加濃度は、200  $\mu\text{M}$ 添加区が融解後1時間以降の精子運動性および精子細胞膜正常性の結果が良好で、精子先体タンパク質酵素活性も高い傾向を示しており、最も良い状態で精子性状が維持されていると評価した。その結果、AA-2Gの添加はアグー凍結精子を作製する上で有効な方法であることが示唆された。また、AA-2Gを200  $\mu\text{M}$ 以上の高濃度で添加した場合、精子性状への改善効果は認められなかったことから、抗酸化剤添加における至適濃度の検討は非常に重要であると思われる。

試験2のAA-2G添加による精子性状への効果は、供試した全てのアグー精子において、200  $\mu\text{M}$ 添

加区が無添加区より MDA 生成量が有意に低く、膜の脂質過酸化が抑制された。また DNA 移動度も有意に低く、ATP 量の有意な増加も認められたことから、DNA にダメージを受けた割合が軽減され、精子生存性も効果的に維持されていると推察された。さらに精子体外受精能の有意な向上も確認された。

射出精子は、高い呼吸活性を維持し、活発な運動や代謝により多くの活性酸素を発生している。その結果、過剰な活性酸素の作用により精子の老化や死滅が促進されると共に、物理的障害も受けやすくなっている<sup>4, 8-10)</sup>。したがって、凍結用希釈液への AA-2G の添加は凍結処理過程で発生する活性酸素を恒常的に消去したと推察され、AA-2G の抗酸化作用により、酸化ストレスによる様々な細胞障害が軽減された結果、融解後の精子性状が効果的に改善されたと考えられた。

前報で著者ら<sup>2)</sup>がアグーの精子は、採精後素早く精漿を精子処理液に置き換え、直ちに冷却・凍結処理を行った方が融解後の精子性状が良好であると報告した。この成績についてもアグーの精子は脂質過酸化に対する感受性が一般豚に比べて高いため、迅速な凍結処理により精子代謝活性が低下し、ラジカル発生量が減少した結果ではないかと思われた。

## VI 引用文献

- 1) 大城まどか・仲村敏・鈴木直人・太田克之・渡久地政康(2003)琉球在来豚(アグー)を活用した銘柄豚の確立(2)アグーの繁殖性および哺育・育成成績への近親交配による影響, 沖縄畜試研報, 41, 67-70
- 2) 仲村敏・大城まどか・稲嶺修・鈴木直人・吉元哲兵・建本秀樹・渡慶次功・玉代勢秀正(2005)琉球在来豚(アグー)の効率的繁殖技術の確立(1)ブタ凍結精液作製時の室温放置に用いる精子処理液と放置時間の検討, 沖縄畜研セ研報, 43, 12-20
- 3) Brezezinska Slebodzińska E, Slebodziński AB, Pietras B, Wieczorek G(1995) Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma, *Biological Trace Element Research*, 47, 69-74
- 4) Roca J, Gil MA, Hernandez M, Parrilla I, Vazquez JM, Martinez EA(2004) Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene, *Journal of Andrology*, 25, 397-405
- 5) Frazer L, Strzeek J(2005) Effects of freezing-thawing on DNA integrity of boar spermatozoa assessed by the neutral comet assay, *Reprod Domest Anim*, 41, 530-536
- 6) Kobara M, Tatdumi T, Matoba S, Yamahara Y, Nakagawa C, Ohta B, Matsumoto T, Inoue D, Asayama J, Nakagawa M(1996) Effect of ischemic preconditioning on mitochondrial oxidative phosphorylation and high energy phosphates in rat hearts, *J Mol Cell Cardiol*, 28, 417-428.
- 7) Suter M, Riek U, Tuerk R, Schlattner U, Wallimann T, Neumann D(2006) Dissecting the role of 5' -AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase, *J Biol Chem*, 281, 32207-32216.
- 8) Breininger E, Beorlegui NB, O' Flaherty CM, Beconi MT(2005) Alpha tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen, *Theriogenology*, 63, 2126-2135
- 9) Gadea J, Garcia Vazquez F, Matás C, Gardón JC, Cánovas S, Gumbao D(2005) Cooling and freezing of boar spermatozoa: supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function, *Journal of Andrology*, 26, 396-404
- 10) Fernández Santos MR, Martínez Pastor F, García Macías V, Estesó MC, Soler AJ, Paz P, Anel L, Garde JJ(2007) Sperm characteristics and DNA integrity of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa frozen in the presence of enzymatic and nonenzymatic antioxidants, *Journal of Andrology*, 28, 294-305