

新規細胞保護剤による凍結精液・受精卵の受胎率向上技術体系

試験研究計画名：新たな細胞保護技術の活用と高付加価値・優良産子の増殖による肉用牛・乳用牛生産基盤強化

地域戦略名：新たな細胞保護技術の活用と高付加価値・優良産子の増殖による肉用牛・乳用牛生産基盤強化

研究代表機関名：(国) 鹿児島大学

地域の競争力強化に向けた技術体系開発のねらい：

家畜の改良・増殖を効率的に行うためには繁殖成績の向上が不可欠で、これまで家畜の飼養管理や技術者の授精・移植技術の改善について多くの研究調査がなされてきました。しかし、乳用牛・肉用牛とも初回人工授精受胎率は年々低下しており（図 1a）、近年増加しつつある胚移植の受胎率も約 20 年もの間、約 50%にとどまっており大きな改善はみられていません（図 1b）。牛精液の凍結保存については 1950 年代に卵黄クエン酸液を基剤としてグリセリンを凍結保護剤とした凍結方法が半世紀以上経過した現在でも広く用いられています。牛胚の凍結保存でも同様にグリセリンを凍結保護材としたステップワイズ法がもちいられ、平成 4 年頃からエチレングリコールやプロパンダイオールを凍結保護剤としたダイレクト法が四半世紀経過した現在でも用いられています。つまり、人工授精や胚移植など人為的な繁殖について生産性の改善について牛側や人側の研究調査はなされてきましたが、精子や胚の生殖細胞側の生存性等の改善技術について長年おろそかになっていました。生産者にとっても、優良な形質を有する家畜の生殖細胞が不受精や不受胎で有効利用されないことによる損失は、その時間や手間、経費、家畜の健康への影響および分娩間隔の拡大による生産効率低下など多くの悪影響を招いています。個別の生産者の生産基盤強化のためにも生殖細胞のより効率的な利用を可能とする技術が強く求められています。

そこで、従来用いられてきた凍結保護材以外の新規の凍結保護について研究調査を実施しました。

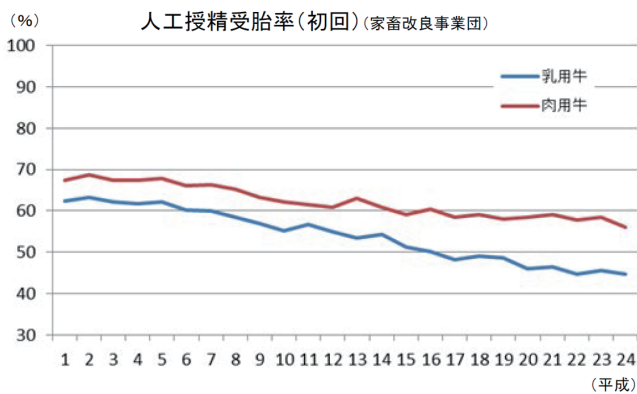


図 1a 人工授精受胎率の推移

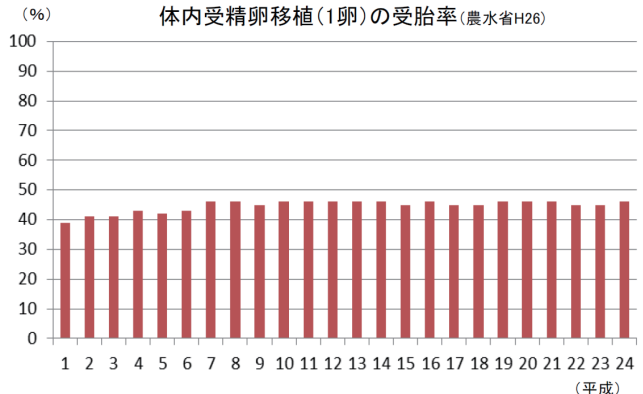


図 1b 受精卵移植医の受胎率の推移

技術体系の紹介：

1. ウシの精子の新規凍結保存法

凍結精子の保護材料として、新規保護剤の添加により、受胎率の向上を目的とした研究を行いました。従来資材であるグリセリンを50%低減し(3.25%)、新規保護剤であるカルボキシル化ポリリジン(cPLL)を0.5%で添加することで、精子の経時的な活性の低下を抑制できることが確認できました(図2)。実際に300頭近くの牛で行った実証試験でも10%以上の受胎率の向上を確認できました(表1)。

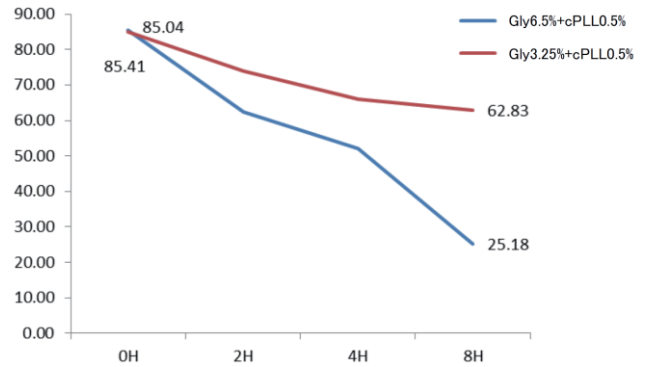


図2 活性A精子の比率の経時変化

本技術は、現在、広く使われている手法を大きく変えるものではありません。凍結精液では凍結保存剤に含まれる有害性のあるグリセリンを50%低減し、cPLLを0.5%加えるだけです。つまり、特殊な装置や技術は必要とせず、新規に取り入れやすい特徴があります。

表1 従来法と新規法による凍結精液の人工授精受胎率

	凍結保護材		授精頭数	受胎頭数	受胎率
	Gly	cPLL			
従来法	6.50%	-	134	71	53.0%
新規法	3.25%	0.50%	161	103	64.0%

2. ウシの胚(受精卵)の新規凍結保存法

凍結精液の受胎率を向上させるcPLLの添加による効果を凍結牛胚移植でも確認できました。凍結精液ではcPLLは0.5%の添加が最適でしたが、凍結牛胚移植では、低い濃度を含む複数の濃度域で検討した結果、より高濃度の7%の添加が最適でした。凍結牛胚移植にcPLLの7%添加で胚融解後の生存率、脱出率の改善を認めました。この濃度は哺乳類細胞保護作用を示す報告と同様であり、運動性のない受精卵では凍結時の細胞外氷晶の成長抑制が重要で、融解後の生存性維持にも高濃度が有効であると考えられました。実際の受胎試験を新規添加剤cPLLの有無で比較した結果、黒毛和種で受胎率は、コントロール群で約30%、cPLL添加群で約50%でした。ホルスタイン種でも増加率は低いものの増加することが判明しました。従来の耐凍剤に7%のcPLLを加え、受胎率の改善が見られました。

表2 凍結ウシ胚の移植後の受胎率の改善成績(cPLL添加)

		cPLL	受精頭数	受胎頭数	受胎率
黒毛和種	従来法	-	31	9	29.0%
	新規法	7%	50	25	50.0%
ホルスタイン	従来法	-	18	6	33.3%
	新規法	7%	43	17	39.5%
合計	従来法	-	49	15	30.6%
	新規法	7%	93	42	45.2%

3. 牛の人工授精用液状精液の新規液状保存法

精子の冷蔵保存の保護材料として、新規保護剤の組成開発により、受胎率の向上を目的とした研究を行いました。従来の保存液に、抗酸化剤であるグルタチオントランスフェラーゼ(GSH)を添加することで、活力A精子を一週間以上維持できることが確認でき、運動性も維持できました(図4)。また、液状精液の最適な保存温度は17°Cであることも確認できました。上記の結果から、実証試験として、当初活力65%の低活力精液でもGSH 5mMの添加で、6日目でも授精にも成功しました。

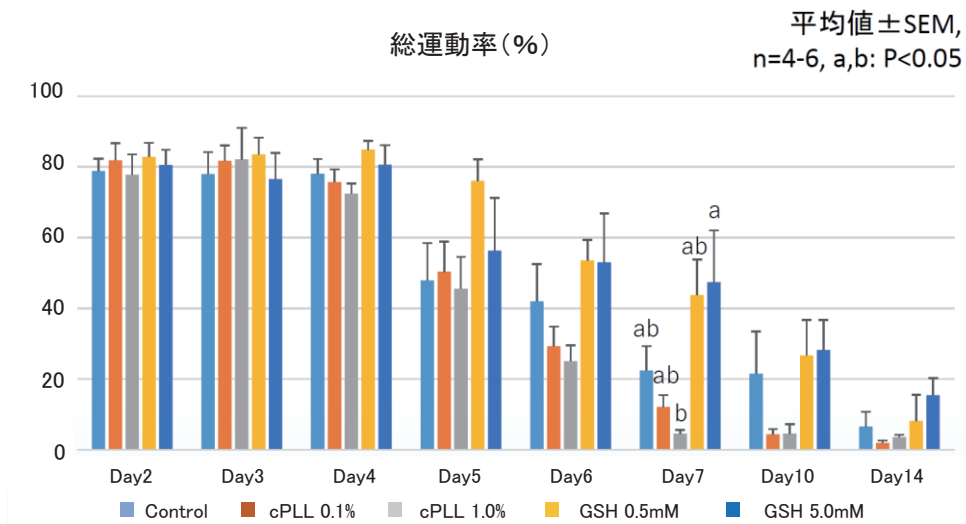


図4 GSH添加による精子の運動性の改善

4. 液状精液の輸送法

3の新規液状保存法の結果から、液状精液の最適保存温度は17°Cであることが判明しました。また、抗酸化剤GSHの添加で、1週間程度の生存を可能とすることも判明しました。そこで、これらの技術をより有効に利用するために液状精液の輸送法を検討しました。国内発送を想定した場合、2日間の輸送が必要です。移植臓器保存用のサーモスティックを利用することで、17°Cで48時間以上の温度管理が可能でした。

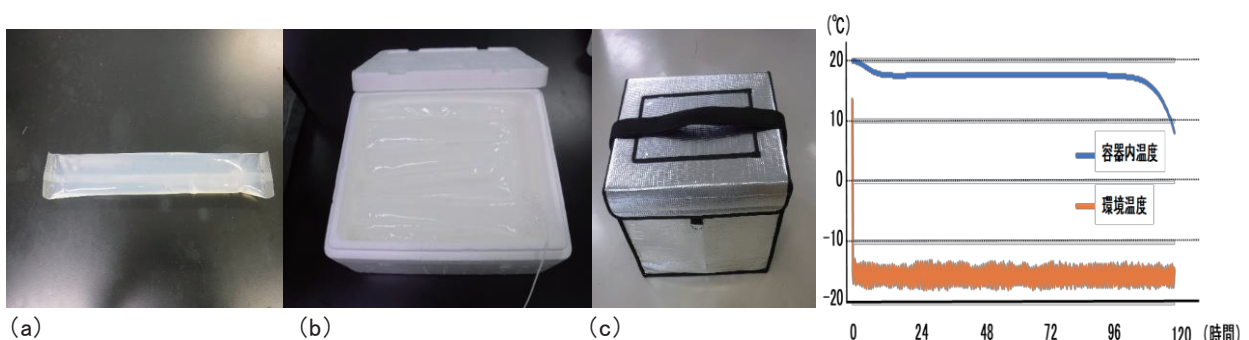


写真 輸送用のサーモスティック(a)、保温容器(b)、輸送時の保温BOX(c)

図5 輸送時の保温容器内の温度

写真のサーモスティックを17°Cの保温庫で数日間平衡しておき(写真a)、輸送時は写真のbのように容器内にサーモスティックを充填します。精液ストローは充填したサーモスティックの中心に保管し、輸送は耐熱性の保温BOXで行います。図5では輸送時の外気温と保温BOXの容器内の温度を示していますが、一定に保たれているのが分かります。夏場の外気が高温時も、冬季の外気が低温時も同様に一定に保たれました。

技術体系の経済性は：

経営改善効果

本技術は、従来の精液や受精卵の保存液に新規の保護剤を添加するのみの非常に単純なものです。

凍結精液と受精卵に対しては、cPLL を添加するのみ（現在、cPLL は製品化され、すぐに使用できる形で販売）で、優れた効果が得られます。液状精液に関しては、抗酸化剤を加えることで、従来よりも長期的に精子生存期間が延長できることで、受精率の向上が期待できます。

一例で示すと、今回の結果で示すような 10% の受胎率の向上が行えた場合の経済効果に関しては、次のように説明が可能です。受胎率 10% 向上で、受胎に必要な精液ストローが現在の平均 1.6 本から 1.45 本に減少しますので、胎率の向上で授精に必要な精液本数が減らせます。同時に、受胎率 10% 向上で、分娩間隔も短縮でき、結果として年間の産子数が増加し、販売頭数も上昇します。つまり、受胎率 10% 向上で、使用されるストローの軽減、分娩間隔の短縮等が生産農家に直接の利益となります。

経済的な波及効果

地域戦略のターゲットであった【鹿児島地区】で、114,000 頭の繁殖雌牛が存在するとして、年間 755 頭の生産向上があり、年間約 5,700 万円の経済効果が見込めます。添加する cPLL は溶液の 0.5% 程度で良く、技術導入に係る追加の経費は非常に軽微です。この点は、導入経費の低位なことから新規方法は導入が容易で、その効果も大きいです。新規方法が導入しやすいことを示すものであり、波及効果は大きいです。また、牛の人工授精液状精液の新規保存法では、凍結を避けたい貴重精液などに応用可能な技術です。従来授精がかなわなかった種雄牛へと応用できれば高い経済効果を示します。

こんな経営、こんな地域におすすめ：

本技術は肉用牛生産農家、乳用牛生産農家へ直接の経済効果があります。また、人工授精師、受精卵移植を行う技術者が導入する技術と考えられます。同時に貴重精液や受精卵等へも応用が可能であり、広く畜産繁殖業界がターゲットとなります。また、牛の人工授精液状精液の新規保存法では、低活力精液など従来授精がかなわなかった種雄牛へと応用できる可能性があります。

技術導入にあたっての留意点：

本技術は、特に新規の機材の導入は必要としません。新規細胞保護液の作製時にも従来の、凍結精液、凍結受精卵の機材が利用できます。本技術は、単純な方法であり従来の人工授精や胚移植技術を有する技術者には特に問題となる留意点はないと思われます。添加濃度を大きく間違えてしまうと、予想される繁殖成績が得られないことがあるので、濃度には留意してください。

研究担当機関名：(国) 鹿児島大学、鹿児島県肉用牛改良研究所、(独) 家畜改良センター本所・鳥取牧場、(株) バイオベルデ、鹿児島県きもつき農業協同組合

お問い合わせは：(国) 鹿児島大学

電話 099-285-8750 E-mail vethos1@kuas.kagoshima-u.ac.jp

執筆分担 ((国) 鹿児島大学 三浦直樹、窪田力)