

還元系発色試薬を用いたブタ精液の評価法の開発

内倉健造¹⁾・田島茂行¹⁾・山本るみ子²⁾・豊島浩一¹⁾

摘要:本研究は、ブタ精子によるMTTの還元反応のための諸条件を検討するとともに、ブタ精液の簡便な評価法の開発をおこなった。まず、MTT還元反応に対する反応液の影響を検討するため、グルコースを多く含むモデナ液もしくはPBSを用いてMTT還元反応を行い還元指標として吸光度を測定したところ、モデナ液で吸光度が高いことが分かった。また反応温度についても30°Cと39°Cで比較したところ、39°Cにおいて吸光度と運動精子数に高い正の相関が確認された。簡易的な評価法の開発のために、ろ紙上で精子による5分間のMTT還元反応を起こし、運動精子数に対するろ紙の明度の回帰分析を行った。その結果、回帰係数が有意($P<0.001$)であり、運動精子数の客観的評価として有用だと分かった。

キーワード:ブタ精子、還元系発色試薬、還元反応、精子運動性、吸光度

緒言

近年、我が国の養豚産業では急速に人工授精(AI)の利用が進み、AIを取り入れている農場が70%を超えている。しかし、日本におけるAIは普及途上であると考えられ、半数の農場では自然交配も併用するなど、雄豚1頭あたりの飼養する繁殖母豚数(雄豚の利用効率)は先行して普及している欧州に比べて低いといわれている¹⁾。雄豚の利用効率が低いと、飼養しなければならない雄豚の頭数が増加し、養豚経営のコスト上昇を招く。1頭の雄から採取した精液をより多くの雌に活用するためには、安定した受胎率および産子数を得られる必要十分の運動精子濃度まで精液を希釈する必要がある。雄豚の利用効率が低い原因の一つとして、農場レベルにおいてブタの精液性状の正確な評価が難しく、適正な希釈が行われていないことが考えられる。精液中の運動精子数を計算するには通常精子活力(運動率)および精子数の2項目の測定を行わなければならない。さらに、顕微鏡下における運動率の検査には習熟が必要であるとともに、主観的な観測データとなるため検査員毎にデータがばらつく可能性がある。近年、運動率や精子数などをコンピューターで自動解析する精子運動解析(Computer Assisted Sperm Analysis, CASA)システムが開発され、試験研究機関や一部の種豚場への導入が進んでいる。しかし、CASAシステムは使用する機器が高価であるため、すべての農場で使用することが困難である。

3 [4, 5-dimethylthiazolyl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)は水溶性で黄色の試薬であり、細胞内の脱水素酵素

により還元され、不溶性の青色の1-[4,5-Dimethyl-2-thiazolyl]-3,5-diphenylformazan(ホルマザン)を生成する。様々な動物種の精子においてMTT還元反応は精子の生存性と関連しているといわれており、ブタ精子においてもMTTの還元反応が精子の生存性の評価に有効とする報告がある²⁾。近年、MTTを浸透させたクロマトグラフィーペーパー上で精子による還元反応を起こしたところ、クロマトグラフィーペーパーの平均明度と精子運動率が相関していたという報告³⁾や顕微鏡による観察でMTT還元能をもつ精子の判別が可能という報告⁴⁾がある。これらのことからMTTを用いて簡易な運動精子数評価法を開発できれば、ブタ精液性状の良否を判定できる方法をCASAシステムに変わり低コストで養豚農家へと提供できると考えられる。一方で、精子中の脱水素酵素の還元反応は反応液中の組成や反応温度によって異なると考えられ、その最適条件は報告されていない。

以上のことから、本研究では、ブタ精液の簡易的な評価方法の確立を目的とし、精子によるMTTの還元反応のための反応液および反応温度を検討するとともに、より簡便な評価法の開発を行った。

材料及び方法

1 精子のMTT還元反応に対する反応液および温度の影響調査

(1) MTT還元反応に与える反応液の影響

ブタ精液を10ヶ月齢の「ランドレース」種および「大ヨークシャー」種雄各2頭から雄ごとに4回採取した。顕微鏡下で精子

本研究は、「令和2年度公益財団法人伊藤記念財団研究助成事業」で実施した。

¹⁾畜産研究部 ²⁾畜産研究部(現研究戦略部)

(2022.9.7 受理)

の85%以上が前進運動を示すことを確認した後、ブタ精液実験に広く用いられている保存希釈液であるモデナ液⁹⁾で等倍希釈し、試験に用いるまで24~30時間、15°Cで保存した。保存した精液をさらにモデナ液で 1×10^8 個/mLになるように調整し、精子浮遊液を作成した。MTT還元反応液にはモデナ液もしくはリン酸緩衝液(PBS)を用いた。0.4 mg/mL MTT(Sigma-Aldrich、アメリカ合衆国)を溶解した各反応液900 μ Lに精子浮遊液100 μ Lを添加し、30分間反応させた。反応後、紫外可視分光光度計(UV-1800、株式会社島津製作所、京都府)を用いてMTT還元後の生成物であるホルマザン濃度測定のために波長570 nmを用いて吸光度を測定した。

(2) MTT還元反応に与える温度の影響

上記と同様に採取、保存した精液の一部について液体窒素で凍結し、ブタ体温に近い39°Cで融解する行程を2回繰り返し、精子を死滅させた後、通常の精液と精子を死滅させた精液とを10:0、8:2、6:4の3種類の混合割合で運動率の異なるサンプルを作成した。各精液は39°Cで5分間加熱し、精液分析装置(iSperm、株式会社ピアイシイ・バイオ、東京)により運動率を測定し、血球計算盤を用いて測定した精子数と合わせて運動精子数を計算した。運動精子数を測定した各精液100 μ Lを0.4 mg/mL MTTを含んだ900 μ Lのモデナ液に添加し、30もしくは39°Cで10、20および30分間反応させ、吸光度を測定して回帰分析を行った。

2 簡易的なMTT検査法の開発

直径2 cmの円形に切り取ったろ紙(No.2、ADVANTEC、東京都)に4 mg/mL MTTを含んだ蒸留水35 μ Lを浸透させ、遮光して5分間乾燥させた(以下「円形ろ紙」)。

「ランドレース」種2頭から採取した精液を30°Cに保温し、30分以内に実験室に運び試験に供した。精液は39°Cで5分間加熱後、精液分析装置による運動率計測及び血球計算盤を用いて運動精子数を計算し、以下の試験に供した。精液をモデナ液で2倍、2.5倍もしくは3.3倍希釈し、スライドグラス上に載せた円形ろ紙に35 μ L滴下し、39°Cで5分間反応させた(図1)。

反応後、円形ろ紙をデジタルスキャナー(PM-A920、EPSON、長野県)を用いて画像化した。記録した画像はパソコン上において、画像処理ソフト(GIMP)を用いて円形ろ紙上全体の平均明度をデータ化した。3種類の希釈倍率のデータをプールし、運動精子数を説明変数、ろ紙明度を従属変数として回帰分析を行った。

結果及び考察

MTT還元反応の指標として吸光度を測定した結果、PBSを反応液としたもの(0.30)に比較してモデナ液(0.39)で有意に高い吸光度がみられた(図2)。Matsuuraらは³⁾ブタ精子の解糖系を阻害すると運動性およびMTT還元能が低下することを報告している。このことからブタ精子内のMTT還元はグルコースを消費する解糖系によって主に起こっていると考えられる。モデナ液はグルコース濃度が27.5 mg/mLであり、精

子の解糖系の基質であるグルコースを多量に含むことから、今回の試験においては反応液内のグルコースがMTT還元反応を促進したことが考えられた。このことから反応液にはグルコースを含むモデナ液等が適していることが示唆された。一方で、どの程度のグルコース濃度が最適であるかは不明なため今後検討する必要がある。

MTT還元反応に対する反応温度の影響を調査するために30もしくは39°Cで精子によるMTT還元反応を行い、反応時間10、20および30分でそれぞれ説明変数を運動精子数、従属変数を吸光度として回帰分析を行ったところ、いずれの場合も回帰係数は有意であった($P < 0.05$ 、図3)。また決定係数は30°C10、20および30分間でそれぞれ0.45、0.65および0.50、39°C10分、20分および30分でそれぞれ0.83、0.84および0.71であり、39°Cで安定して高い値を示した。これは30°Cに比較して39°Cで解糖系が活発化し、MTT還元反応が早く進み、ホルマザンが十分に生成されたことにより吸光度が上昇したためと推察され、反応温度は39°Cが適していると考えられた。一方で反応時間によって決定係数は大きく変化しなかったことから、反応時間は10分間で十分と考えられた。

液体内でのMTT還元反応は吸光度計などの特別な機器を必要とすることからろ紙上でMTT還元反応を起こし、一般的なデジタルスキャナーを用いてろ紙の色の変化を調査した。上記の結果により反応時間10分でも十分なMTT還元反応が起こっていたことに加え、ろ紙上では5分程度で反応液が蒸発したため反応が停止したことから、反応時間を5分とした。運動精子数とろ紙明度の関係性は図4のとおりであり、運動精子数について、ろ紙画像の明度に対する回帰係数



図1 MTT還元反応により青染した円形ろ紙 (左:精子浮遊液滴下前、右:滴下後)

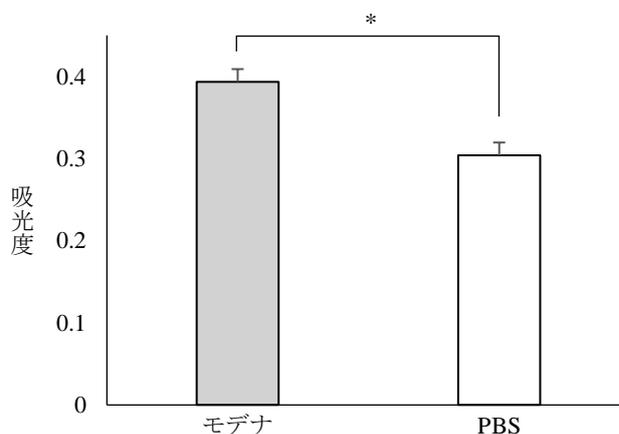


図2 MTT反応液が吸光度に与える影響 *: $P < 0.05$

は非常に高い有意性があった ($P < 0.001$)。回帰式は $y = -0.0746x + 94.0$ であり決定係数は 0.64 であった。このことからスキャナーを用いることで本研究における条件下では運動精子数の推定が可能であることが分かった。

MTTを用いることで農場内での運動精子数の客観的評価が可能であることが分かった。一方で、今後養豚現場へと普及させるためにはより推定精度を向上させるとともに、より簡便な方法を検討する必要があると考えられる。

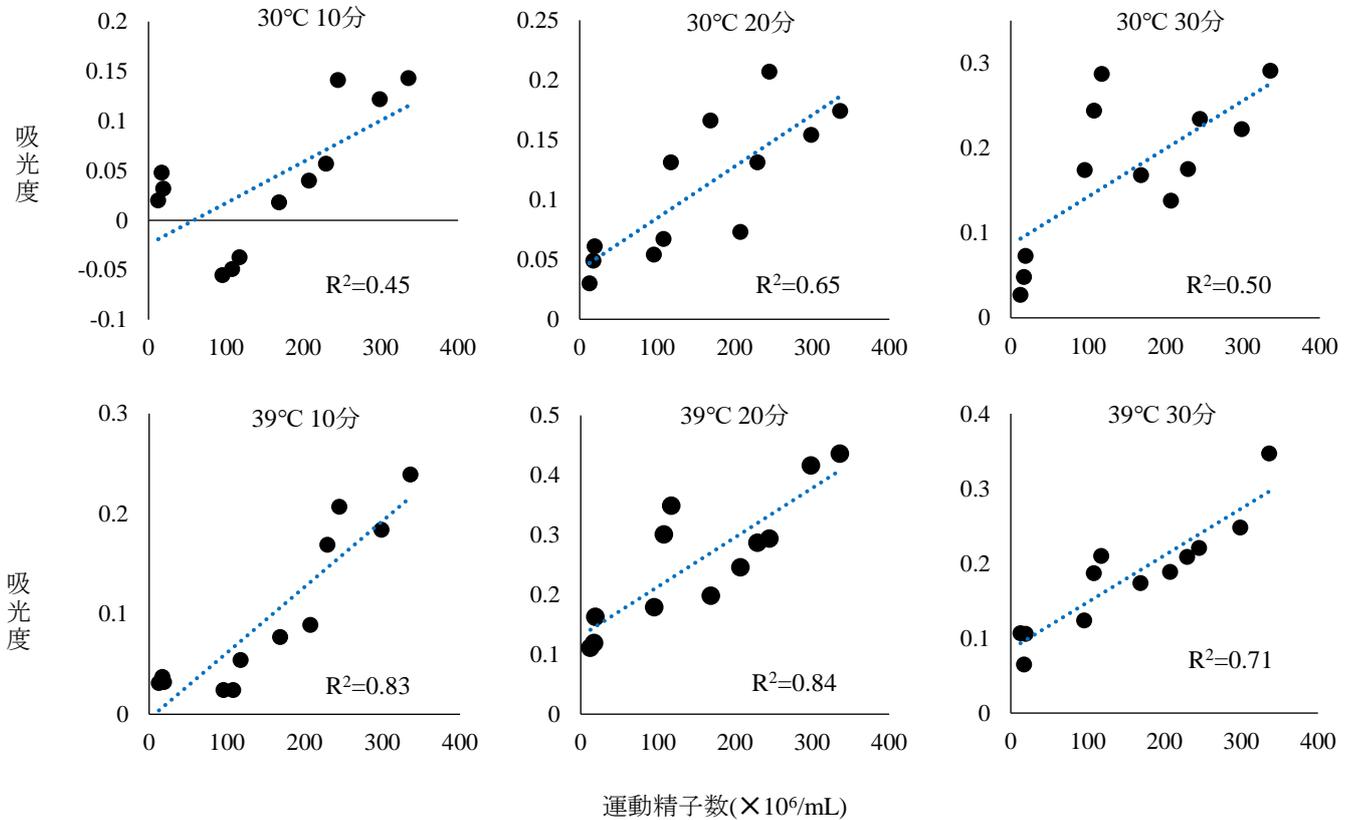


図3 異なる反応温度および反応時間における運動精子数と吸光度の関係

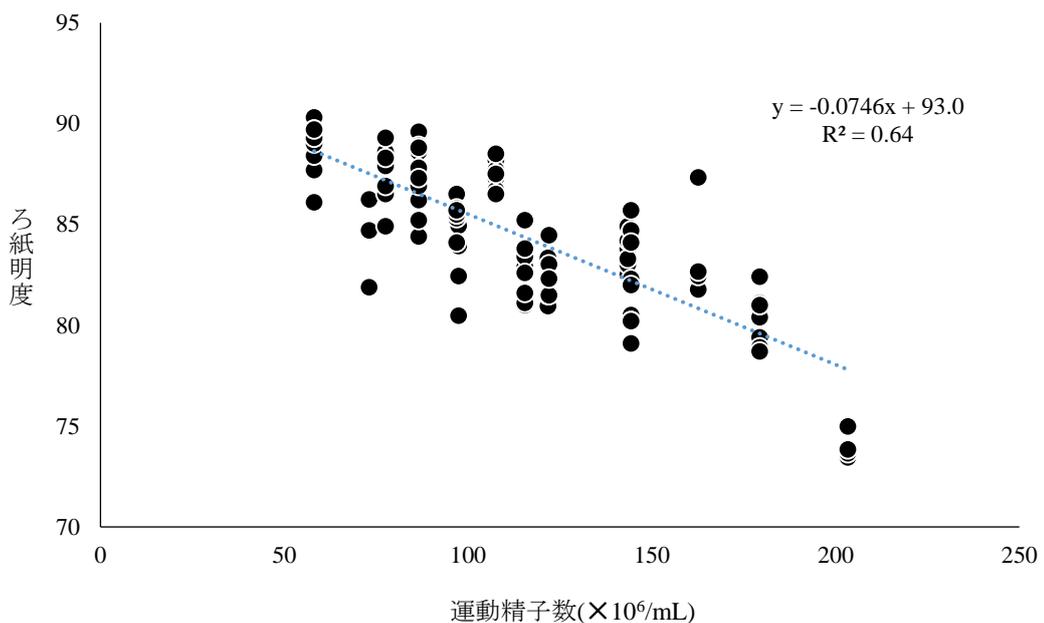


図4 運動精子数と MTT 還元反応後のろ紙明度との関係

引用文献

1. 河原崎達雄, 片岡岳志. 日本におけるブタ人工授精技術に関する実態調査. 日本養豚学会誌. 56, 106-118(2019)
2. Byun J. W., Choo, S. H., Kim, H. H., Kim, Y. J., Hwang, Y. J. and Kim D. Y. Evaluation of boar sperm viability by mtt reduction assay in beltsville thawing solution extender. Asian-Australas Journal of Animal Science 21, 494-498(2008)
3. Matsuura, K., Huang, H. W., Chen, M. C., Chen, Y. and Cheng, C. M. Relationship between Porcine Sperm Motility and Sperm Enzymatic Activity using Paper-based Devices. Scientific Reports. 7, 46213(2017)
4. van den Berg, B. M. The MTT assay application to measure the viability of spermatozoa: A variety of the assay protocols. Open Veterinary Journal. 5, 58-63(2015)
5. 曾根勝, 知久幹夫, 吉田光敏, 番場公雄, 小笠晃. 各種希釈保存液を用いた豚液状精液の長期保存試験. 日本養豚学会誌. 29, 41-50(1992)