

## Short Report

## 暑熱ストレスがウシ凍結融解精子の機能性に及ぼす影響

横尾正樹<sup>1</sup>, 田村美穂<sup>1</sup>, 佐藤勝祥<sup>1</sup>, 伊藤謙<sup>1,2</sup>, 渡邊潤<sup>3</sup><sup>1</sup> 秋田県立大学生物資源科学部アグリビジネス学科<sup>2</sup> 岩手医科大学医学部病理学講座<sup>3</sup> 秋田県立大学アグリイノベーション教育研究センター

現在、ウシ人工授精技術の受胎率が低下しており、その原因の一つとして夏季の暑熱ストレスが挙げられている。そこで本研究では暑熱環境がウシ凍結融解精子の機能性に及ぼす影響を検討することを目的とした。処理開始から 20 時間後、暑熱区 (40.5°C, 41.5°C) のウシ精子の生存性は、対照区 (38.5°C) と比較して有意に低下し、さらに精子の運動活性の指標となる SMI (Sperm Motion Index) も有意に低下したことから、暑熱ストレスがウシ精子の生存性、運動性を著しく低下させることが明らかとなった。一方、処理開始 3 時間後では暑熱区の精子の運動性 (曲線速度、頭部振幅) が一時的に上昇することが観察された。そこで、暑熱処理直後のウシ精子のミトコンドリア機能 (酸素消費量、ミトコンドリア膜電位) を調査したところ、いずれも暑熱区で有意に高いことが明らかとなった。さらに、処理開始 6 時間後の精子の受精能を調査したところ、対照区よりも暑熱区の方が早く受精能を獲得することが示唆された。以上の結果から、暑熱環境下では、ウシ精子のミトコンドリア活性や受精能が時期尚早に誘起され、卵子と受精する時期までに運動性や機能性が著しく低下することが示唆され、暑熱によるこのような現象が夏季の人工授精の受胎率低下を引き起こす一因となると考えられた。

**キーワード:** ウシ, 精子, 人工授精, 暑熱ストレス, 繁殖性

現在の子牛生産技術としては、人工授精が主流であるが、近年、その受胎率は低下傾向にある (家畜改良事業団受胎率調査報告)。特に、夏季の高温期では受胎率の低下が顕著であり、年々深刻さを増している。近年、わが国の年平均気温は地球温暖化による上昇傾向が続いており、特に 1990 年代以降は高温となる年が頻出している (気象庁: 日本の年平均気温偏差の経年変化)。通年で安定的に子牛を生産するためにも、夏季の受胎率改善は急務である。

環境温度が繁殖性に及ぼす影響については、雌雄両側から問題が指摘されている。雌畜側の問題としては、暑熱によるホルモンバランスの乱れによる発情微弱化や無発情排卵がある。人工授精が主流となっているウシでは、発情が発見できなければ人工授

精が実施できないため、結果として繁殖性の低下を招くことに繋がっている。また、夏季に採取された卵子の品質は冬季に比べて低く、暑熱ストレスが受精後の発生遅延や発生率の低下、胚死滅を引き起こすことも報告されている (Gendelman. *et al.*, 2010 ; Sakatani *et al.*, 2014 ; Zeron *et al.*, 2001)。

一方、雄畜側の問題としては、暑熱ストレスによる種雄牛の造精機能の低下や精子品質の低下が報告されている (Argov *et al.*, 2007 ; Meyerhoeffler *et al.*, 1985) が、人工授精が主流となっている現在においては、このような原因による夏季の受胎率低下に及ぼす影響は比較的小さいと考えられる。しかし、夏季の高温期における雌牛では、体温や生殖器内の温度も上昇することから、人工授精で注入された精子

責任著者連絡先: 横尾正樹 〒010-0444 南秋田郡大潟村字南 2-2 秋田県立大学生物資源科学部アグリビジネス学科. E-mail: myokoo@akita-pu.ac.jp

は生殖器内で暑熱ストレスに曝露されている可能性が高い。暑熱ストレスを受けたウシ精子は生存性や運動性が低下することや膜損傷を引き起こすなど、数時間の暑熱処理でも悪影響を及ぼすことが報告されている (Gong *et al.*, 2017 ; Monterroso *et al.*, 1995 ; Sakatani *et al.*, 2014) . そこで本研究では、これら先行研究の暑熱処理時間や温度を参考にし、改めて暑熱ストレスがウシ凍結融解精子の機能性に与える影響を調査することを目的とした。

## 材料・方法

### 精子濃度調整

ウシ凍結精液 (黒毛和種 ; 茂晴国) を液体窒素タンクから取り出し、38°Cの温湯に 20 秒間浸漬して融解した。融解後、媒精液 (IVF100 ; 機能性ペプチド研究所) で 2 度遠心洗浄し (38°C, 600×g, 5 分間) の条件で遠心し、IVF100 で  $3 \times 10^7$  精子/mL に精子濃度を調整した。

### 暑熱処理

夏季高温時における腔内温度 (鍋西ら, 2010) を参考にし、暑熱区として 40.5°C および 41.5°C の温度条件に CO<sub>2</sub> インキュベータを設定した。対照区は、ウシの通常体温を想定した 38.5°C とした。時間条件は 3 時間, 6 時間, 20 時間処理区の計 3 つとした。濃度を調整した精子を 1.5 mL チューブに入れ、CO<sub>2</sub> インキュベータ内に静置することで、暑熱処理を行った。

### 精子運動解析

精子の運動性解析には精子運動解析システム (Sperm Motility Analysis System ; ディテクト社) を用いた。暑熱処理後の精子 (10  $\mu$ L) を精子検査用チャンバー (ニューロサイエンス社) に移し、精子の生存率 (%) および運動性の評価として、直線速度 ( $\mu$ m/s), 曲線速度 ( $\mu$ m/s), 頭部振動数 (Hz), 直進性, 頭部振幅 ( $\mu$ m) を解析した。試験区ごとに 3 回ずつ測定し、3 回の精子運動率および運動性の平均値を算出した。また、Nagata ら (2018) の方法を参考にし、精子の運動様式や活力の指標である

Sperm Motion Index (SMI ; 直線速度×曲線速度/頭部振動数) を算出した。

### 酸素消費量の測定

ウシ精子の酸素消費量の測定は MitoXpress Xtra 酸素消費アッセイキット (Agilent Technologies 社) を用いた。96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに、濃度調整したウシ精液 90  $\mu$ L および測定試薬を 10  $\mu$ L 添加した後、ミネラルオイルを 2 滴滴下して密封した。各暑熱条件に設定したマイクロプレートリーダー (ARVOx4 ; パーキンエルマー社) で、30 分間の吸光度の変化を Dual read TR-F モードで測定し、得られた吸光度から各サンプルの Lifetime 値 ( $\mu$ s) を算出した。各サンプルの Lifetime 値から精液を添加せずに測定したブランクの Lifetime 値を差し引いた値の経時的変化をグラフにプロットし、その傾きから酸素消費量を算出した。

### ミトコンドリア膜電位解析

ウシ精子のミトコンドリア膜電位は MitoTracker Red (Invitrogen 社) で解析した。濃度を調整したウシ精液に染色液を 1,000 倍希釈で添加し、各温度条件下で 30 分間染色を行った。染色後、3.7%ホルマリン溶液中で 15 分間固定し、培地で数回遠心洗浄した (300g, 5 分)。各試験区の精子を 30 個ずつ倒立蛍光顕微鏡 (Ts2-FL ; Nikon) で撮影し、精子中片部の蛍光強度を画像解析ソフト Image J で数値化した。

### 受精能解析

ウシ精子の受精能解析は、Kuroda ら (2007) の方法を参考に CTC 解析法により調査した。暑熱処理後のウシ精子 45  $\mu$ L に CTC 溶液 (750  $\mu$ M CTC, 5 mM cysteine, 130 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7.8) 45  $\mu$ L を添加し、30 秒間染色した。その後、固定液 (12.5% paraformaldehyde/0.5 mM Tris-HCl, pH 7.4) を 8  $\mu$ L 加え、スライドガラスに 5  $\mu$ L 乗せ、封入剤 (0.22 M DABCO/グリセロール:PBS (9:1)) を 5  $\mu$ L 加えてからカバーガラスで封入した。各試験区、200 個前後の精子を倒立蛍光顕微鏡で観察し、精子頭部の染色様式から次の 3 パターンに分類した。F パターンは、頭部全体が均等に蛍光染色されている精子とし

表 1 ウシ精子の生存性・運動性に及ぼす暑熱の影響

処理時間	処理温度 (°C)	生存率 (%)	直線速度 ( $\mu\text{m/s}$ )	曲線速度 ( $\mu\text{m/s}$ )	頭部振動数 (Hz)	直進性	頭部振幅 ( $\mu\text{m}$ )	SMI
3時間	38.5	22.8±1.6	27.9±1.6	54.1±2.9 <sup>a</sup>	15.2±0.3	0.5±0.0 <sup>a</sup>	1.4±0.1 <sup>a</sup>	99.0±7.3
	40.5	29.4±2.8	25.7±1.0	69.8±5.0 <sup>a</sup>	15.7±0.8	0.4±0.0 <sup>ab</sup>	1.6±0.2 <sup>ab</sup>	114.1±7.9
	41.5	33.3±3.3	25.7±3.1	86.3±2.1 <sup>b</sup>	15.7±0.2	0.4±0.0 <sup>b</sup>	2.2±0.2 <sup>b</sup>	141.3±17.5
6時間	38.5	29.8±3.4	31.7±1.1 <sup>a</sup>	66.0±5.1	15.5±0.3	0.5±0.0	1.5±0.2 <sup>a</sup>	136.5±13.9
	40.5	26.7±2.7	30.1±2.5 <sup>a</sup>	72.0±4.3	15.6±0.2	0.4±0.0	2.3±0.2 <sup>b</sup>	138.9±13.8
	41.5	31.6±2.5	21.6±2.7 <sup>b</sup>	70.2±4.4	16.2±0.4	0.4±0.0	2.4±0.2 <sup>b</sup>	96.7±96.7
20時間	38.5	21.5±2.4 <sup>a</sup>	27.2±1.2 <sup>a</sup>	53.6±5.5 <sup>a</sup>	16.7±0.2	0.7±0.0	1.4±0.1	88.1±11.7 <sup>a</sup>
	40.5	10.0±1.9 <sup>b</sup>	15.8±2.9 <sup>ab</sup>	27.4±6.1 <sup>ab</sup>	14.0±2.2	0.6±0.1	0.8±0.1	31.4±8.6 <sup>b</sup>
	41.5	6.2±2.6 <sup>b</sup>	11.5±3.7 <sup>b</sup>	17.3±6.4 <sup>b</sup>	11.0±2.9	0.5±0.1	0.6±0.4	18.6±7.4 <sup>b</sup>

データは全て平均値±標準誤差 (a-b: P<0.05)  
SMI: Sperm Motion Index

た(受精能未獲得精子)。Bパターンは頭部後方の蛍光が暗く、先体部が明るく蛍光染色されている精子とした(受精能獲得精子)。ARパターンは頭部がほとんど染色されておらず、赤道部に薄い蛍光バンドが観察される精子とした(先体反応精子)。

### 統計解析

精子の生存率はアークサイン変換し、一元配置の分散分析後、ボンフェローニの多重比較検定を行った。受精能解析における精子の割合の解析はカイ二乗検定を行った。その他のデータは一元配置の分散分析後、ボンフェローニの多重比較検定を行った。全て、危険差5%で有意と判定した。

## 結果・考察

### 精子運動解析

ウシ精子の生存性、運動性に及ぼす暑熱処理の影響を表1に示した。処理開始から3時間および6時間が経過した精子の生存性は、暑熱条件下でも高く推移することが明らかとなった。しかし、処理開始後20時間が経過した精子では、対照区では比較的生存性が維持されていたものの、暑熱区では有意な低下が観察された。Gongら(2017)の報告においても、暑熱ストレスによるウシ精子の生存率の低下は3~6時間の短時間培養による解析で明らかにされてい

るが、20時間という長期の暑熱ストレスにおいて、精子の生存性はより顕著に低下することが本研究によって明らかにすることができた。さらに、精子の運動性においても、処理20時間後では、直線速度、曲線速度、SMIが有意に低下することが明らかとなったことから、生存している精子の活性も暑熱ストレスによって低下することが示唆された。本研究で設定した20時間という処理時間は、人工授精時に注入された精子が卵管膨大部で卵子と遭遇するまでの時間を想定している。したがって、暑熱環境下での人工授精は、卵子と遭遇するまでに生存精子や活力のある精子が大幅に減少していることが推察され、そのことが夏季の人工授精率の低下をもたらしている可能性が示唆された。

一方、処理3時間後の精子の運動性について着目すると、対照区の精子よりも暑熱区の精子の方が曲線速度や頭部振幅が有意に増加しており、さらに、有意差は認められないもののSMIも上昇傾向が認められた。精子の活性が上昇すると、曲線速度や頭部振幅が増加すること(Hyakutake *et al.*, 2018)、SMIが高くなること(Nagata *et al.*, 2018)が報告されていることから、暑熱ストレスを受けた精子は、長期的にはその活性を顕著に低下させるものの、ストレスを受けた直後は運動性や活力を一時的に上昇させていることが明らかとなった。

### ミトコンドリア機能解析

精子の運動性は、中片部に存在するミトコンドリアで産生されるエネルギーに起因するため、暑熱処理直後（30 分後）の精子の酸素消費量（図 1）およびミトコンドリア膜電位解析（図 2）を行った。その結果、いずれの調査項目においても、対照区の精子と比較して、暑熱区の精子において、有意に高いことが明らかとなった。精子は高温処理でミトコンドリア膜にダメージが蓄積すると、ミトコンドリア膜のプロトン勾配の維持のため、より多くの ATP を産生し、この際に、酸素消費量が増加するため、連鎖的に精子の活性化が起こることが報告されている（Garrett *et al.*, 2008）。本研究の精子運動解析において、暑熱ストレスが処理後一時的に精子の運動性を上昇させることが観察されたが、暑熱ストレスによる精子のミトコンドリア機能の過活動によって引き起こされた可能性が考えられた。

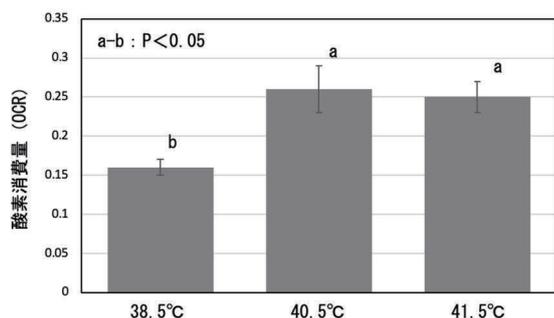


図 1 ウシ精子の酸素消費機能に及ぼす暑熱の影響

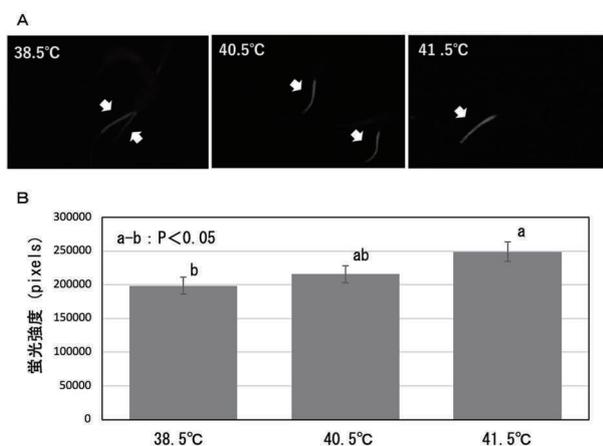


図 2 ウシ精子のミトコンドリア膜電位に及ぼす暑熱の影響

- A. MitoTracker Red 染色像（写真中の矢印は精子中片部）  
 B. 中片部の蛍光強度測定の結果

### 受精能解析

暑熱処理がウシ精子の受精能に及ぼす影響を調査するため、CTC 解析法で評価した（図 3）。なお、処理 20 時間後は生存精子が少なかったため、本研究では処理 6 時間での評価を行った。その結果、受精能を獲得していない精子（F パターン）の割合は、処理温度が高いほど低下することが認められた。受精能獲得精子（B パターン）および先体反応精子（AR パターン）の割合は、対照区と比較して、暑熱区（41.5°C）で有意に高くなり、暑熱環境下の精子の方が受精能を早期に獲得することが示唆された。運動性解析においても、処理後 3～6 時間の早い段階では、精子の直線速度の低下や曲線速度の上昇、SMI の上昇が認められており、これらの運動様式の変化は、精子のハイパーアクチベーションの運動様式と似ている（Hyakutake *et al.*, 2018）。その点を踏まえて考えると、暑熱ストレスを受けた精子は、時期尚早に受精能を獲得している可能性が考えられた。

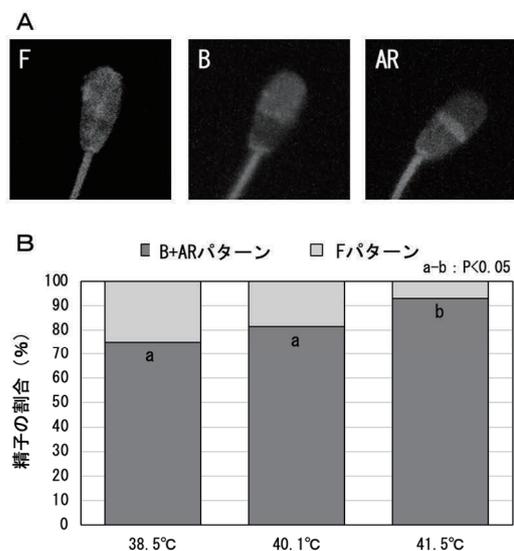


図 3 ウシ精子の受精能に及ぼす暑熱の影響

- A. CTC 染色像（F, B, AR パターン）  
 B. 処理 6 時間後の受精能獲得精子の割合

### まとめ

本研究の結果から、暑熱環境下では、ウシ精子のミトコンドリア機能や受精能が時期尚早に誘起されており、それが原因で、卵子と受精するタイミング

までに精子の運動性や機能が著しく低下することが示唆された。本研究の結果は、夏季の高温期における人工授精の受胎率低下を理解するための新しい知見を提供するものである。夏季の人工授精を成功させるためには、精子が受精に適切なタイミングで受精能力を発現する必要があるため、本研究の結果を踏まえれば、暑熱環境下の人工授精では、発情から人工授精までの時間を長くするなどの対策も考えられる。しかし、夏季の受胎率低下の要因としては、精子だけの問題ではなく、卵子や受精卵の発生への影響も大きいことから、今後は、精子のみならず、卵子や受精卵を暑熱ストレスから保護する対策も検討していくことで、夏季の人工授精の受胎率の改善に繋がると考えられる。

### 謝辞

本研究で実施した精子運動解析は、秋田県畜産試験場において実施しました。ここに深謝いたします。

### 文献

- Argov N, Sklan D, Zeron Y, Roth Z. (2007) Association between seasonal changes in fatty-acid composition, expression of VLDL receptor and bovine sperm quality. *Theriogenology* 67: 878-885.
- Garrett LJA, Revell SG, Leese HJ. (2008) Adenosine triphosphate production by bovine spermatozoa and its relationship to semen fertilizing ability. *Journal of Andrology* 29: 449-58.
- Gendelman M, Aroyo A, Yavin S, Roth Z. (2010) Seasonal effects on gene expression cleavage timing and developmental competence of bovine preimplantation embryos. *Reproduction* 140: 73-82.
- Gong Y, Guo H, Zhang Z, Zhou H, Zhao R, He B. (2017) Heat stress reduces sperm motility via activation of glycogen synthase kinase-3 $\alpha$  and inhibition of mitochondrial Protein Import. *Frontiers in Physiology* 8: Article 718.
- Hyakutake T, Mori K, Sato K. (2018) Effects of surrounding fluid on motility of hyperactivated bovine sperm. *Journal of Biomechanics* 71: 183-189.
- Kuroda K, Fukushima M, Harayama H. (2007) Premature capacitation of frozen-thawed spermatozoa from subfertile Japanese black cattle. *Journal of Reproduction and Development* 53: 1079-1086.
- Meyerhoeffer DC, Wettemann RP, Coleman SW, Wells ME. (1985) Reproductive criteria of beef bulls during and after exposure to increased ambient temperature. *Journal of Animal Science* 60: 352-357.
- Monterroso VH, Drury KC, Ealy AD, Edwards JL, Hansen PL. (1995) Effect of heat shock on function of frozen/thawed bull spermatozoa. *Theriogenology* 44: 947-961.
- Nagata MPB, Endo K, Ogata K, Yamanaka K, Egashira J, Katafuchi N, Yamanouchi T, Matsuda H, Goto Y, Sakatani M, Hojo T, Nishizono H, Yotsushima K, Takenouchi N, Hashiyada Y, Yamashita K. (2018) Live births from artificial insemination of microfluidic-sorted bovine spermatozoa characterized by trajectories correlated with fertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115: E3087-E3096.
- Sakatani M, Yamanaka K, Balboula AZ, Takenouchi N, Takahashi M. (2014) Heat stress during in vitro fertilization decreases fertilization success by disrupting anti-polyspermy systems of the oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 82: 36-47.

Zeron Y, Ocheretny A, Kedar O, Borochoy A, Sklan D,  
Arav A. (2001) Seasonal changes in bovine fertility:  
relation to developmental competence of oocytes,  
membrane properties and fatty acid composition of  
follicles. *Reproduction* 121: 447-454.

鍋西久, 大田洋, 西元俊文 (2010) 「暑熱期におけ  
るホルスタイン種搾乳牛の膣内温度変化」『九  
州沖縄農業研究成果情報』25 : 147-148.

〔 令和 4 年 6 月 30 日受付 〕  
〔 令和 4 年 8 月 22 日受理 〕

## Effects of Heat Stress on Functions of Frozen–Thawed Bovine Sperm

Masaki Yokoo<sup>1</sup>, Miho Tamura<sup>1</sup>, Katsuyoshi Sato<sup>1</sup>, Ken Ito<sup>1,2</sup>, Jun Watanabe<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Agribusiness, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University

<sup>2</sup> Department of Pathology, Faculty of Basic Medicine, Iwate Medical University

<sup>3</sup> Agri-Innovation Education and Research Center, Akita Prefectural University

In Japan, summer heat stress has long been recognized to reduce the reproductive efficiency of cattle managed under artificial insemination. Here, we investigated heat stress effect on the function of frozen–thawed bovine sperm using an *in vitro* model. Notably, the sperm motility and viability percentages after incubation at 40.5°C or 41.5°C for 20 h significantly reduced compared with the spermatozoa incubated at 38.5°C (control). However, the sperm motility (curvilinear velocity and amplitude lateral head displacement) after incubation at 40.5°C or 41.5°C for 3 h significantly increased compared with the control. Moreover, the mitochondrial activities and capacitation rates of the sperm rapidly incubated at 40.5°C or 41.5°C were higher than those of the control sperm. Summarily, our results proposed that heat stress induces the premature activation of mitochondrial and capacitation of frozen–thawed bovine sperm, and that sperm activity cannot be maintained alive for long periods until fertilization. Therefore, our results will provide novel insights into understanding the reduced reproductive efficiency during summer.

**Keywords:** artificial insemination, bovine, heat stress, reproductive efficiency, sperm