

抗 LPS-IgY 抗体を用いたブタ液状精液保存法の開発

大分県農林水産研究指導センター畜産研究部・研究員 岡崎 哲司

■ 目的

ブタの種付けは、母豚の規模拡大に伴い新鮮精液(液状精液)による人工授精(AI; artificial insemination)が約 50%程度と増加している。したがって今後、精子の機能を長期間保持しつつ、安全に利用することが求められる。およそ 9 割の個体の精液から何らかの細菌が検出され、そのエンドトキシン(LPS)も精液中へ放出される。LPS 不活化抗生剤である polymyxin B(PMB)は LPS による負の影響を緩和できるが、医薬品であるため、使用に制限があり、代替できる技術が望まれている。近年、鶏卵抗体(IgY 抗体)は様々な疾病に対して効果があることが分かっており、LPS においても抗体が作出できる報告がある。そこで本研究では、菌体の破砕抗原を免疫した鶏から鶏卵を回収し、その卵黄成分が精液中の LPS 活性を中和させ、精子機能性を保持したまま保存可能か否かについて検討する。

■ 方法

抗 LPS 卵黄抗体の作出においては、*Aeromonas salmonicida* (A.S)、ブタ大腸菌由来(F18 および O141)の菌体の破砕抗原を鶏に免疫し、得られた卵黄または全卵の乾燥粉末をサンプルとした(株式会社イダブルニュートリション・ジャパン)。抗体抽出においては、サンプルを、使用する精液希釈剤モデナ液で 10 倍希釈後の上澄み、または、クロロホルムにて水溶性タンパク質画分を分離、回収した。

雄豚から採取した精液を、モデナ液(コントロール)、免疫していない卵抗体(卵抗体におけるコントロール)、および各種(A.S、F18、O141)卵抗体を含有させた希釈液にて希釈精液を作製し、15°C環境下で最大 7 日間保管した。各処理区の精子は、運動パラメーターを位相差顕微鏡での観察(x100)または CASA 搭載運動解析装置、細胞膜および先体膜正常性は PI-SYBR14 および FITC-PNA 免疫蛍光染色にて測定した。希釈後の精液の LPS 活性は、WAKO トキシノメーターにて測定した。

■ 結果および考察

A.S 卵粉末抗体をモデナ液で抽出し、その水溶性 IgY を希釈剤に添加した実験では、短期的および長期的な培養において、卵抗体そのものが精子機能に悪影響を及ぼさないことが明らかとなった。しかし、このような粗い抽出法では、培養中に精子凝集が観察された。一方で、クロロホルム抽出法では、凝集は観察されず、1% (v/v) 卵抗体(コントロール卵抗体、A.S、F18、O141)添加区は無添加区と比較して 7 日間保管後の精子直進速度が改善された($P<0.01$)。また、AI 試験を母豚 31 頭に実施したところ、無添加区では、受胎率 75%、総産子数 11.4 頭、生存産子数 11.2 頭であったのに対し、F18 卵抗体 1% 添加希釈液で AI した母豚群のそれは、100%、13.7 頭、12.2 頭であった(受胎率; $P=0.0702$)。卵抗体の LPS 中和活性は、無添加と比べ、有意差はなかったことから、卵抗体液に含まれる水溶性タンパク質が何らかの正の効果を発揮していると考えられるが、本実験で得られた卵抗体の中和活性は、有意差はないにしても、無視はできない抑制能であったことから、LPS 中和による可能性は否定できない。

繁殖成績においても受胎率・産子数共に有意な差は認められないが、総産子数で両試験区において 2.3 頭の差があった。養豚農家において農場全体の産子数が 0.5 頭増加するだけでも多大な経済効果をもたらすことから、今後、AI 頭数を増頭し、効果を確認する必要がある。

■ 結語

- LPS 卵抗体(A.S、豚大腸菌由来)は精子に対して悪影響を及ぼさない。
- LPS 卵抗体を 1% (v/v) で精液希釈剤に添加すれば、保管期間中の精子直進速度を向上できる。
- AI 溶液へ F18 卵抗体を 1% 添加し、AI すると、統計的な有意な差はないが、繁殖成績において、一定の上昇が認められる。