

豚凍結精液の実用化技術の確立()

佐野 通・荒金知宏・森 尚之・松馬定子・奥田宏健

Establishment of practical techniques for boar frozen semen
(6 st report)

Tooru SANO・Tomohiro ARAKANE・Hisashi MORI・Sadako MATUBA and Kouken OKUDA

要 約

豚凍結精液の人工授精による注入精子数の削減と受胎率及び産子数の向上を目的に、グリセリン濃度が凍結融解後の精子性状及び精子の受精能に及ぼす影響を検討し、併せて凍結精液の子宮体への精液注入による受胎試験を実施した。

- 1 凍結精液融解後に正常先体を有する生存精子率(正常精子率)は、凍結時のグリセリン濃度が3%より7%で高かった。
- 2 精子侵入率は、融解後のグリセリン濃度を0.77%より0.33%に希釈した場合に有意に高かった。
- 3 パークシャー種凍結精液を用いた注入精子数50億/回での受胎試験では受胎率83.3%、平均産子数10.0頭と実用化可能な成績が得られ、注入精子数の削減が図れた。

キーワード： 豚凍結精液、正常精子数、精子侵入率、子宮体への精液注入、注入精子数

緒 言

豚凍結精液の研究は、Polge & Rowson¹⁾による牛精液の凍結保存の成功に端を発して開始され、Hess²⁾が-95の凍結保存精子で産子を得ることに成功したのが最初である。その後、Waide³⁾がアルミパック法を、本邦では副島^{4,5)}がペレット法を開発している。そして、昭和57~59年度には、家畜改良事業団の事業としてペレット法による実用化試験が実施された。さらに、昭和60~62年度には大型ストロー法へと改良が継続され⁶⁾、豚精液の凍結保存技術は確立されたと言われている⁷⁾。

しかし、豚精子は耐凍性に個体差が大きいこと、受胎率や産子数が自然交配に比べて劣ることなどから、一般農家で利用されるまでには至っていないのが現状である。

岡山県総合畜産センター(以下 当センター)では、これまでに凍結精液の融解後の精子の生存性を高めるため、凍結容器、希釈液に添加する糖、グリセリン濃度及び凍結方法について検討を行ってきた^{8,9,10)}。その結果、注入精子数100億/回、凍結時グリセリン濃度3%、注入時グリセリン濃度0.33%の設定で実用化可能な受胎成績が得られた^{11,12)}。しかし、注入精子数が多いため、凍結精液の使用量に対して製造効率が悪いこと、製造コストが高くなること、さらに、融解時操作が煩雑になることなどの問題が残された。

そこで、注入精子数の削減と受胎率及び産子数の向上を目的として、凍結時及び融解後のグリセリン濃度が、凍結精液融解後の精子性状及び精子の受精能に及ぼす影響を検討し、併せて子宮体への精液注入による受胎試験を実施した。

材料及び方法

精液採取方法、精液の凍結及び凍結精液の融解方法は前報¹³⁾に準じた。

1 試験区の設定

試験区は表1に示した。凍結時のグリセリン濃度は、これまでの当センターの試験では凍結融解後の精子に最活発な運動性をもたらすグリセリン濃度は7%であったため⁸⁾、7%とこれまでに行った受胎試験で良好な受胎成績が得られた3%に設定した^{11,12)}。そして、融解後のグリセリン濃度は0.77%と0.33%に調整した。なお、使用した精液は、当センターで飼養するデュロック種雄豚5頭から採取した7検体を供試した。

表1 試験区

区 分	試験区 1	試験区 2	対照区
凍結時グリセリン濃度 (%)	7	7	3
融解後グリセリン濃度 (%)	0.77	0.33	0.33

2 凍結時及び融解後のグリセリン濃度が精子性状に及ぼす影響

各試験区の凍結精液は、融解後にモデナ液で希釈して37℃で30分静置した後、精子性状を観察した。検査項目及び方法は、運動精子率は顕微鏡×200で肉眼判定、生存率及び先体反応率はPNA/PI蛍光染色で行った¹⁴⁾。

3 凍結時及び融解後のグリセリン濃度が精子の受精能に及ぼす影響

いずれの試験区も、融解後に正常精子率が高かった凍結精液4検体を体外受精に供した。融解後の精液は、37℃で30分間静置した後、体外受精に供し、媒精後10時間における卵子への精子侵入率を調査した。体外成熟豚卵子の準備及び体外受精方法は、舟橋等¹⁵⁾の既報に従った。

4 受胎試験

試験区分と供試豚頭数を表2に示した。従来豚の人工授精では、精液の注入部位は子宮頸管であるが、今回は、より深部の子宮体へ精液を注入した。注入器具は、スペイン・KUBUSU社製の新型注入器スナイパーを用いた。人工授精は、雌豚が雄の乗駕の許容を開始後24時間目に精液40mlを注入し、その6～12時間後に同じく40mlの2回目の注入を行った。また、凍結精液は融解後20分以内に雌豚への注入を行った。

表2 試験区及び供試豚頭数

凍結精液の品種	注入精子数 (億)	グリセリン濃度		注入液量 (ml)	供試品種	頭数	区分
		凍結時 (%)	注入時 (%)				
デュロック種	50	3	0.33	40	LW雑種	4	経産
					デュロック種	2	経産
パークシャー種	50	3	0.33	40	パークシャー種	6	経産

結果及び考察

1 凍結時及び融解後のグリセリン濃度が精子性状に及ぼす影響

凍結精液を融解し、37℃で30分静置した後の運動精子率を図1、生存率を図2、先体反応率を図3に示した。

運動精子率は、対照区と比較して試験区1及び試験区2で高くなり、対照区と試験区1の間に1%水準で有意差が認められた。生存率は、対照区と比較して試験区1及び試験区2で高くなり、対照区と両試験区の間には有意差が認められなかった。しかし、先体反応率には差がなかった。

したがって、凍結時のグリセリン濃度は、3%よりも7%にした時のほうが高い運動精子率及び生存率が得られた。そして、先体反応率には差が認められなかったことから、正常精子率も、凍結時のグリセリン濃度が3%よりも7%で高くなった。

2 グリセリン濃度が精子の受精能に及ぼす影響

体外受精による精子侵入率試験の成績を図4に示した。

精子侵入率は、試験区2及び対照区が試験区1より高くなり、試験区1と試験区2及び対照区の間には有意差が認められた。したがって、精子侵入率は、融解希釈後のグリセリン濃度を0.77%より0.33%に低下させた時のほうが良好な成績であった。

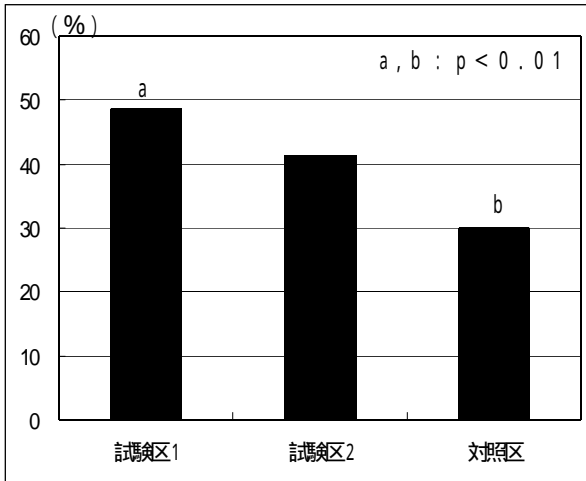


図1 凍結精液融解30分後の運動精子率

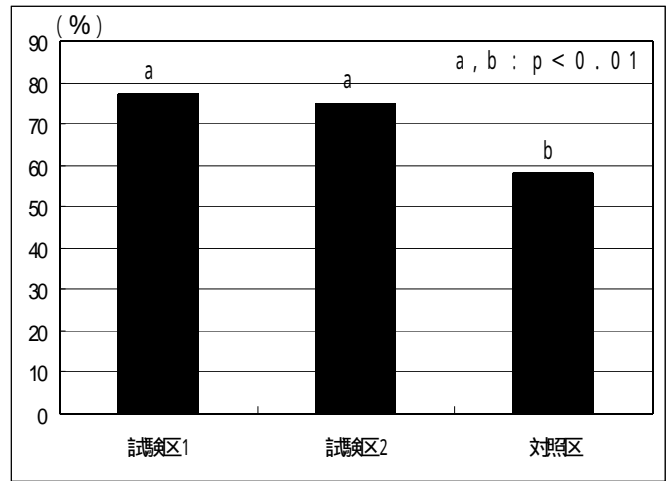


図2 凍結精液融解30分後の生存率

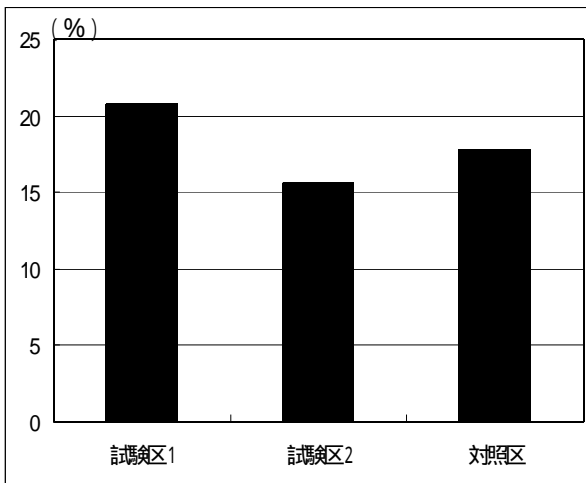


図3 凍結精液融解30分後の先体反応率

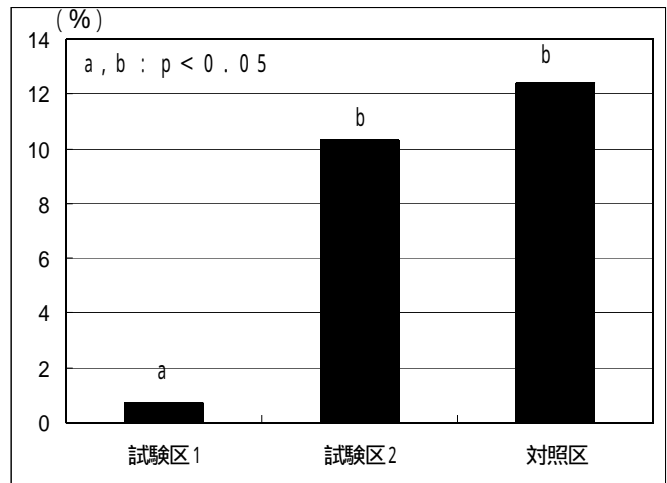


図4 凍結精液融解30分後の精子侵入率

3 受胎試験

受胎率及び平均産子数は表3のとおりであった。デュロック種凍結精液を用いた受胎試験成績では受胎率50%であり、液状精液による人工授精と比較すると成績は劣ることから、実用化には更なる検討が必要であると考えられた。平均産子数は、繁殖雌豚により異なる成績となり、LW雑種では13頭と良好な成績であったが、デュロック種では7頭に止まり、参考指標として養豚ハンドブックによる平均産子数10.0頭と比較すると少ない産子数であった¹⁷⁾。

次に、パークシャー種凍結精液を用いた受胎試験成績は、受胎率及び産子数共に優れた成績であった。受胎率83.3%は実用化可能な成績であり、また、平均産子数10頭は当センターで分娩したパークシャー種の自然交配による平均産子数8.5頭、参考指標として養豚ハンドブックによる平均産子数8～9頭¹⁷⁾と比較しても良好な成績であった。したがって、パークシャー種凍結精液を用いた人工授精では、注入精子数50億/回を子宮体へ精液注入を行うことで実用化可能な成績であった。

表3 受胎試験成績

凍結精液の品種	注入精子数 (億)	グリリノ濃度		受胎率 (%)	平均産子数 (頭)
		凍結時 (%)	注入時 (%)		
デュロック種	50	3	0.33	50.0 (3/6)	7.0 (デュロック種) ^{注1)} 13.0 (LW雑種)
パークシャー種	50	3	0.33	83.3 (5/6)	10.0 ^{注2)}

注1) 胎児数をと畜場にてカウント、()内は繁殖雌豚の品種

注2) 2腹：自然分娩、2腹：胎児数をと畜場でカウント

1腹：人工流産による胎児数をカウント

今回の試験成績から次のことが考えられた。7%のグリセリン濃度で凍結した正常精子率の高い精液を用いて受精能を検査したが、融解後のグリセリン濃度を下げないと精子侵入率は有意に低下することが判明した。すなわち、精子侵入率を向上させるためには、融解後のグリセリン濃度を下げることが重要であると考えられた。また、正常精子率は試験区2が対照区より高かったにもかかわらず精子侵入率に差が認められなかったことから、7%の高濃度のグリセリンにより精子が何らかの傷害を受けている可能性が考えられた。Polgeらは、グリセリン濃度4~6%の存在下で精液を凍結すると生存率及び活力は非常に良く維持されるが、精子の頭帽は著しく損傷されるので、そのまま人工授精すると受胎は成立しないと報告している¹⁶⁾。しかし、今回の精子侵入率試験の成績からは、高いグリセリン濃度で凍結された精子でも、融解後のグリセリン濃度を調節すれば、受精能が維持される可能性が示唆されたが、精子侵入率試験において最も優れた成績が得られたのは対照区であった。しかしながら、対照区のデュロック種凍結精液を用いて受胎試験を行った成績では、十分な成績は得られなかった。この原因としては、精子侵入率試験の成績では、対照区の精子侵入率が試験区1及び試験区2より高かったが、12.6%と低い成績であったことが原因と考えられた。したがって、このような精子侵入率の低い凍結精液を人工授精に用いる場合、注入精子数100億/回以上の注入が必要であり、注入精子数の削減は困難であると考えられた。しかし、同条件でパークシャー種凍結精液を用いた受胎試験では、実用化可能な成績が得られたことは、デュロック種凍結精液の融解後活力は、パークシャー種に比べて劣るとの報告もあることから、品種による精子の耐凍能には差があると考えられた¹³⁾。

また、今回、凍結精液の融解後における1%未満の低濃度のグリセリンでも、精子侵入率を著しく低下させたことから、凍結精液を融解後、なるべく低いグリセリン濃度に調節し、速やかに人工授精を行う必要があると考えられた。そして、凍結精液の融解方法については、今後更なる検討が必要であると考えられた。

謝 辞

本試験を実施するに当たり、体外受精にご協力くださいました岡山大学農学部 舟橋助教授に深謝いたします。

引用文献

- 1) Polge C and Rowson L E A (1952) : Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at -79 . Nature, Lond. 169,626-627.
- 2) Hess E A, Ludwick T M and Teague H S (1960) : Motility of boar spermatozoa as influenced by semen freezing procedures. J Anim Sci.19,926-931.
- 3) Waide Y (1975) : Fertility and survival of frozen boar spermatozoa stored in aluminum packaging containers. J. Agric. Res. Quart. 9, 115-119.
- 4) 副島昭彦・榎田博司・川倉一彦・中山崇・足利忠敬(1983) : 液体窒素冷媒による豚精液ペレット凍結について . 人工授精研誌 5 , 63-65.
- 5) 副島昭彦・川倉一彦・榎田博司(1985) : ストロー法による豚凍結精子の生存性 , アクロソームの形態および受精能力 . 人工授精研誌 7 , 42-45.
- 6) 豚凍結精液実用化確立事業 (昭和60~62年度) のまとめ (1988) 家畜改良事業団発行 .
- 7) 豚凍結精液利用技術マニュアル (1989) 丹羽太左右 衛門監修 日本家畜人工授精師協会発行 .
- 8) 野上與志郎・原田 護・関 哲生・日野靖興・田邊武彦 (1998) : 豚凍結精液の実用化技術の確立 (第1報) . 岡山県総合畜産センター研究報告第9号 1- 5
- 9) 吉岡圭輔・飯田照彦 (1995) : 豚の改良増殖管理技術に関する試験 1 優良遺伝資源確保に関する試験 . 平成6年度茨城県養豚試験場年報 17-20.
- 10) 深澤映生・石田昌弘・田口貞紀・本田幸和 (1998) : ハイテクによる人工授精の新技術の開発 . 山梨県畜産試験場研究報告Vol.44 5-8
- 11) 河原宏一・原田 護・石川和人・小田頼政・野上與志郎・辻 誠之 (2000) : 豚凍結精液の実用化技術の確立 () . 岡山県総合畜産センター研究報告第11号 53~57
- 12) 河原宏一・原田 護・石川和人・小田頼政・野上與志郎・伊藤述史 (2001) : 豚凍結精液の実用化技術の確立 () . 岡山県総合畜産センター研究報告第12号 35~40
- 13) 佐野 通・原田 護・伊藤述史・河原宏一 (2002) : 豚凍結精液の実用化技術の確立 () . 岡山県総合畜産センター研究報告第13号 1~6
- 14) Frits M.Flesch,Wim F.Voorhout,Ben Colenbrander,LambertM.G.van Golde,and Barend M.Gadel-

- Ia(1998):Use of Lectins to Characterize Plasma Membrane Preparations from Boar Spermatozoa :A Novel Technique for Monitoring Membrane Purity and Quantity.BIOLOGY OF REPRODUCTION. 59,1530-1539
- 15)Funahashi H,Cantley TC,Day BN(1997):Synchronization of meiosis in porcine oocytes by exposure to dibutyryl cyclic adenosine monophosphate improves developmental competence following in vitro fertilization.BIOLOGY OF REPRODUCTION.57(1),49-53
- 16)Polge C,Salamon S,Wilmot I(1970):Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insenination.Vet Rec.87(15):424-429
- 17)養豚ハンドブック(1994)第1版2章品種,10-19

