

## 牛凍結精液の融解後の温度変化と精子生存性

誌名	長野県畜産試験場研究報告
ISSN	03893545
著者	大久保, 吉啓 供野, 潤也 渡辺, 晴彦 浅野, 元生 芹沢, 弘
巻/号	21号
掲載ページ	p. 21-26
発行年月	1987年3月

## 牛凍結精液の融解後の温度変化と精子生存性

大久保吉啓・供野潤也・渡辺晴彦・浅野元生・芹沢 弘

Interfering Factors on Sperm Viability after Thawing  
Bull Frozen Semen in Plastic Straw

Y. OKUBO, J. TOMONO, H. WATANABE, M. ASANO, H. SERIZAWA.

容量0.5 mlと0.25 mlのプラスチックストロー（以下各々0.5, 0.25という）を用いた牛凍結精液について、融解方法と融解精液の低温感作が精子生存性に及ぼす影響を検討した。

融解温度を5℃から50℃まで7段階に設定した場合、30℃以下では両ストローともに精子生存性は劣る傾向がみられた。この傾向は0.25で著しかった。35℃融解における融解時間について、融解直後に温湯から取り出す方法と温湯中に30秒浸漬する方法とでは、精子生存性に顕著な差異がみられなかった。

融解したストロー精液を5℃と-8℃の冷気に露出した場合、35℃・30秒融解のものでは特に0.25で精子生存性の低下が認められた。

融解精液が最も短時間にまた、外界の感作を受けずに雌生殖器に注入される方法として、凍結精液の腔内融解について検討したが、35℃融解と比べ精子生存性は劣る傾向がみられた。

以上の結果から、野外における牛凍結精液の融解は、35℃温湯を用いて融解直後にストローを温湯から取り出す方法が最も安全であり、融解から注入までの精子生存性の維持に有利であると考えられた。

キーワード：ウシ、凍結、精液、融解、生存性

プラスチックストローに充填した凍結精液を用いた牛の人工授精技術が普及した今日、融解方法は精液の雌生殖器内注入前の重要な手技であるが、融解温度、融解時間、融解精液の取り扱い等について技術者間にまだ若干の相違がある。また現在、優秀な種雄牛の一層の効率的利用という見地から、一部において0.25ストロー精液が供用されているが、前報<sup>1)</sup>に示したように従来のストローに比べて極めて外界温度に影響されやすい特徴を有している。

野外の牛人工授精における凍結精液の融解および取り扱い失宜の防止を図る目的で、良好な状態の融解精液を注入するために必要な凍結精液の基礎的融解条件を比較検討した。

## 材料および方法

種雄牛と供試精液を表1に示した。いずれの種雄牛も当場で撃養し、精液性状および精子耐凍性に異常が認められないものである。

人工腔を用いた横取り法により精液採取後、市販の希釈液（NF-3、武田薬品工業KK）を用いて希釈し、0.5および0.25プラスチックストロー（富士平工業KK）

に充填した。数時間のグリセリン平衡後、LNG簡易急速凍結器（富士平工業KK）を用いて凍結し、供試するまで液体窒素保管器中に保存した。

表1 種雄牛と供試精液

種雄牛名号	品 種	生年月日	原精液の生存率・活力
秀 和(H)	黒毛和種	53. 2.15	75 ~ 85 ++
新守秀(S)	"	55.11.25	75 ~ 85
奥 広(O)	"	52. 3.14	75 ~ 85
菊 峰(K)	"	57. 4.16	70 ~ 80

## 1. 融解温度と時間についての検討

0.5と0.25の凍結精液について、融解温度を5, 10, 30, 35, 40および50℃に設定し、融解速度および融解精液の精子生存性を検討した。融解速度については、精液温度の変化を熱電式自動温度記録計（千野製作所、ET 1200）を用いて測定するとともに、ストロー内の気泡上昇がみられるまでの時間を測定した。精子生存性については、融解直後（ストロー内気泡上昇）と、融解後38℃恒温水槽に30, 60および120分保存したものを各々比較した。

融解時間と精子生存性については、融解温度を35℃と50℃、融解時間を融解直後と30秒に設定し、融解から38℃、120分保存後までのものを比較した。

2. 融解精液の cold-shock についての検討

35℃の温湯と5℃の冷水を用いて融解したストロー精液を外気温5℃に5分、また-8℃に1分と5分露出して低温感作が精子生存性に与える影響を検討した。

融解時間については、35℃では融解直後(0.25, 0.5 各々13秒, 9秒)と30秒浸漬に分け、また5℃では各々70秒, 40秒とし、ストローを外気露出後38℃, 60分保存して低温感作の影響を検討した。

3. 腔内融解についての検討

1) 凍結精液の腔内挿入による温度変化

0.5と0.25の凍結精液について、液体窒素から取り出して10秒でステンレス製注入嘴管に装着し、15秒後に雌牛の腔内に陰門より10cm挿入して精液温度の変化を測定した。腔内挿入に際しては頸管鉗子で注入嘴管を把持し、嘴管が腔粘膜に密着して確実に挿入するように留意した。

2) 腔内融解と精子生存性

0.5と0.25の凍結精液について、液体窒素から取り出して可及的速やかに先端を切断して注入器に装着し、直ちに腔深部に挿入した。腔内に挿入して各々60, 90秒後に取り出して精子生存性を35℃融解のものと比較した。

結果および考察

1. 融解温度と時間についての検討

表2に0.5と0.25の融解温度別の融解速度を精液温度の到達時間で示した。凍結精液の融解は融解温度が高いほど早く、また0.25の方が0.5に比べて早かった。ストロー内気泡上昇時の精液温度は両ストローともに10℃融解までは5℃以下、30℃以上の融解温度では約10℃に達していた。また30℃以上の融解温度では、0.5の30℃融解を除いて精液温度が30秒以内に30℃以上に達していた。

0.5と0.25の融解温度別の精子生存性を各々図1, 2に示した。融解直後の精子生存性は0.5では不明瞭であるが、0.25では融解温度が高いほど優れていた。融解精液を38℃に保存した場合、融解温度が30℃以下ではいずれのストローにおいても精子生存性は劣る傾向を示し、120分を経過すると授精に供しえない程度に低下した。

表2 凍結精液の融解速度

融解温度	精液温度等				
	-5℃	5℃	10℃	30℃	気泡上昇
					(秒)
5℃	23/14	117/92	÷	÷	62/27
10	21/13	51/29	86/50	÷	35/21
20	10/7	18/12	23/14	÷	18/13
30	8/5	13/8	15/9	44/27	14/9
35	8/4	12/7	14/8	26/14	13/9
40	5/4	8/5	10/6	18/10	11/7
50	5/4	7/5	8/6	12/8	9/6

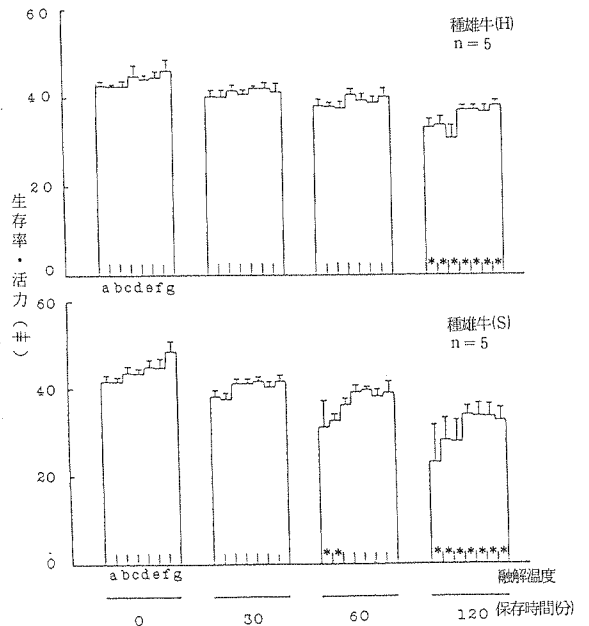


図1 0.5における融解温度別の精子生存性

注1 融解温度 a: 5 b: 10 c: 20  
d: 30 e: 35 f: 40 g: 50℃  
2 \* : 活力 (+ ~ ++)

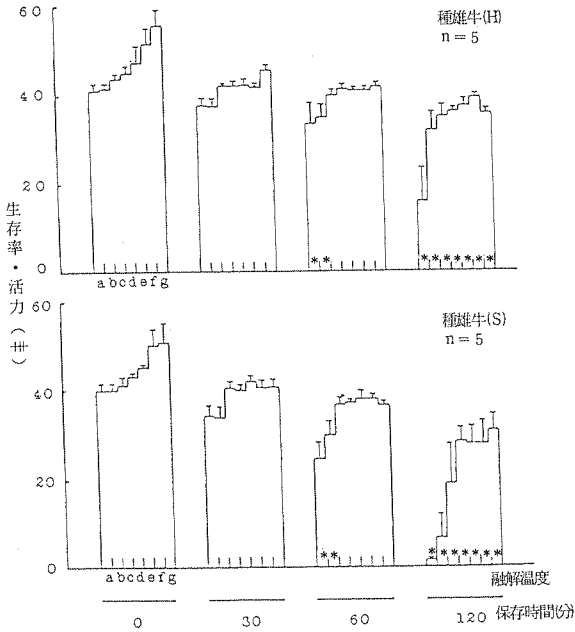


図2 0.25における融解温度別の精子生存性

注1 融解温度 a: 5 b: 10 c: 20  
d: 30 e: 35 f: 40 g: 50°C  
2 \*: 活力 (+~++)

融解温度を50°Cと35°C、融解時間を融解直後と30秒とした場合の精子生存性を図3と4に示した。0.5の35°C融解では両者に差異がみられなかったが、50°C融解では30秒融解の種雄牛Sに低下が認められ、120分後には極端な低下がみられた。0.25も35°C融解では両者に差異が認められなかったが、50°C融解では30秒融解が両種雄牛のいずれも劣り、120分後には著しい低下が認められた。

牛凍結精液の融解速度は早いものほど精子生存性が良好といわれているが、この傾向は0.25で顕著であった。一方、50°C、30秒融解では逆に生存性の低下が認められ、精液温度が過度に上昇して精子に障害を与えたものと考えられる。融解温度が30°C以上の場合には、融解後30分以降では生存性に大きな差異がないこと、また、高温融解ほど精液温度を過度に上昇させる危険が伴うことから、融解温度は35°C前後が野外実施上安全、有利と考えられる。

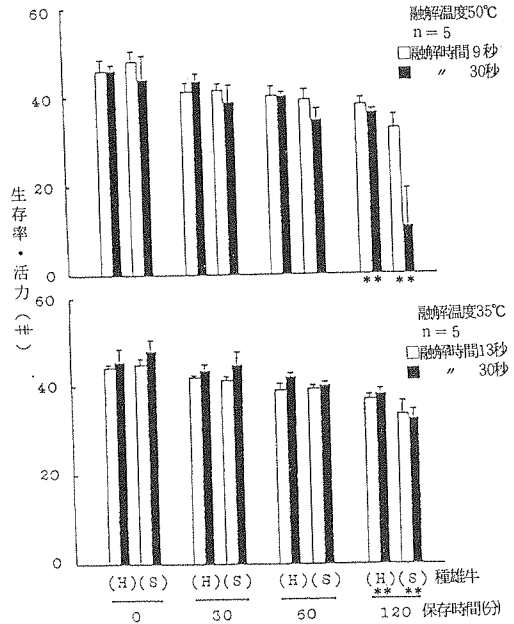


図3 0.5における融解時間と精子生存性

注 \*: 活力 (+~++)

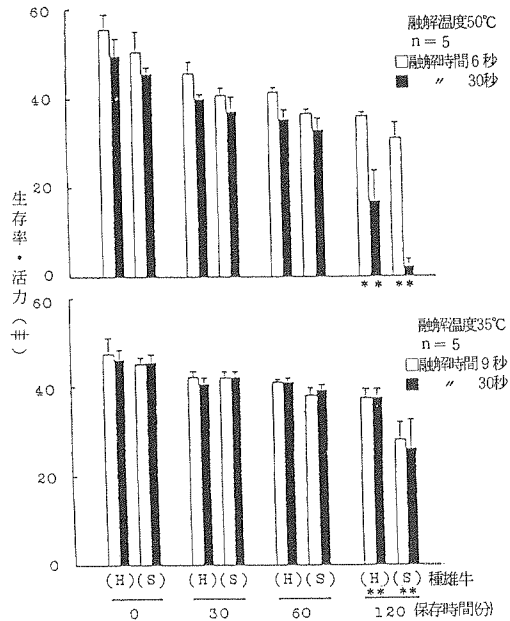


図4 0.25における融解時間と精子生存性

注 \*: 活力 (+~++)

2. 融解精液の cold-shock についての検討

融解したストロー精液を5℃の外気に5分露出した場合の精子生存性に与える影響を図5と6に示した。0.5では外気露出による生存性の大きな低下がいずれのストローにもみられなかった。0.25では35℃、9秒融解における露出の影響はみられなかったが、30秒融解において保存30分以降生存性は低下する傾向が認められた。5℃融解の場合には両ストローとも35℃融解のいずれのものよりも生存性は劣る傾向を示した。

融解精液を-8℃の外気に1分および5分露出した場合の精子生存性に与える影響を図7と8に示した。0.5の35℃、13秒融解ではいずれの露出にも影響がみられなかったが、30秒融解では5分露出による生存性の低下が認められた。0.25の35℃、9秒融解では両露出による生存性の低下がわずかに認められる程度であったが、30秒融解ではいずれの露出でも生存性の低下がみられ、特に5分露出では露出直後から大きく低下する傾向が認められた。5℃融解の場合には露出による影響はみられなかったが、35℃、13秒あるいは9秒融解のいずれのものよりも生存性が劣っていた。

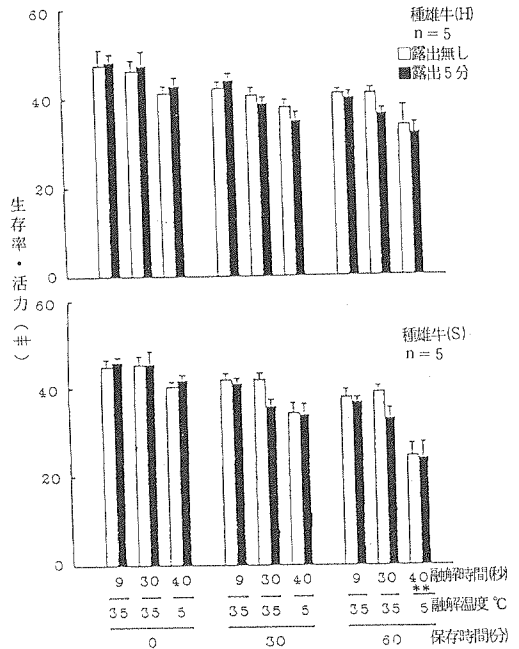


図6 0.25における融解精液の外気露出と精子生存性 (外気温5℃)

注 \* : 活力 (+ ~ ++)

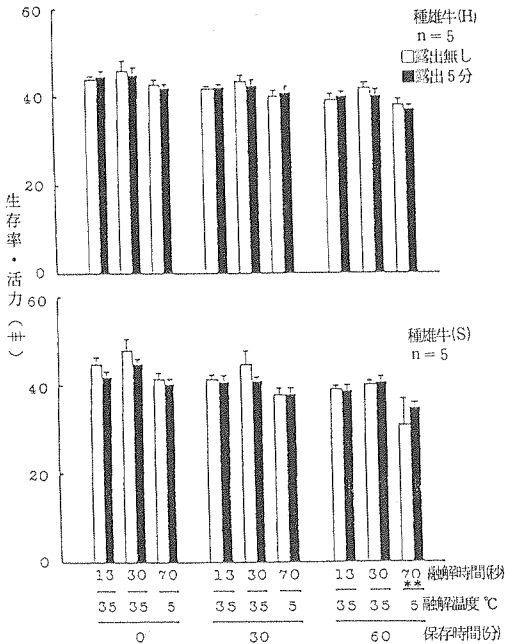


図5 0.5における融解精液の外気露出と精子生存性 (外気温5℃)

注 \* : 活力 (+ ~ ++)

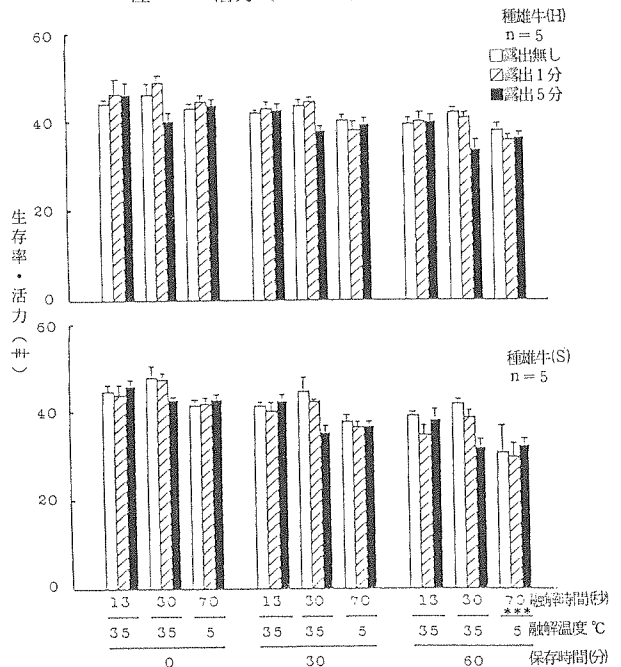


図7 0.5における融解精液の外気露出と精子生存性 (外気温-8℃)

注 \* : 活力 (+ ~ ++)

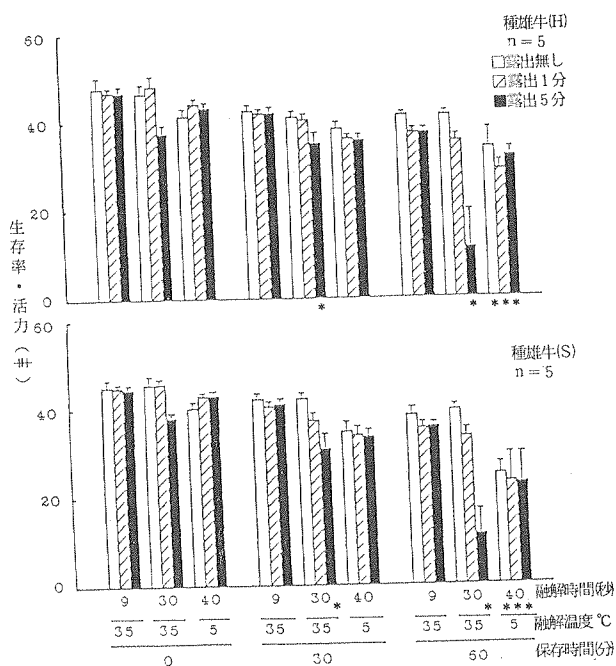


図8 0.25における融解精液の外気露出と精子生存性 (外気温-8℃)

注 \* : 活力 (+ ~ ++)

融解精液の外気感作による精子生存性の低下は0.25を用いた<sup>3)</sup> 柘田らの実験においても同様の報告がなされている。長野県下では冬季の厳寒期には外気温が氷点下になる状況が想定され、融解精液の注入に至るまでの性状低下を防止するためには、特に温湯中における精液温度の上昇に注意を払う必要があると考えられる。柘田らは30℃融解で融解時間を7秒とした場合、精液温度はほぼ5℃で、この融解精液に対する冷気の影響は小さかったと述べている。野外における凍結精液の融解操作のなかでは融解時間を厳密に測定するよりも、ストロー精液の気泡上昇を目安にする方が温度の上昇防止は容易で確実とおもわれる。今回、0.5と0.25の融解過程でストロー内の気泡上昇が明らかに観察された融解時間は30℃で14秒と9秒、35℃で13秒と9秒、その時の精液温度は10℃前後に達していた。しかしながら、35℃融解におけるこれらの精液は30℃融解との比較において、冷気露出による影響は殆んど無いか、極めて小さく、いずれも低温感作による精子生存性の低下、いわゆるcold-shockはほぼ防止されたものと考えられる。冷気露出による成績では0.25の方が0.5よりも低温感作の影響が大きく現われた。0.25は融解

速度に示されたように、容量が小さい分だけ精液温度の変化が著しいものと考えられ、その融解には一層の慎重な操作が必要とおもわれる。5℃融解はcold-shock防止には有利であるが、融解後の精子生存性が低いので外気温が低い状況でも実施しない方が良いと考えられる。

一方、凍結精液の融解時間と受胎率との関係で、融解時間を30秒とした方が高いという報告<sup>4)</sup>、また、融解時間を30秒以上15分以内とする技術解説書<sup>5)</sup>がある。融解時間と受胎率との関係については今後検討する必要があると考えられる。

### 3. 腔内融解についての検討

#### 1) 凍結精液の腔内挿入による温度変化

腔内融解における精液温度の変化を表3に示した。さきに示した表2の成績と比較した場合、-5℃到達はいずれも遅いが、融解が完全に終了すると考えられる5℃到達はいずれのストローも5および10℃融解のいずれのものよりも早かった。精液温度が-5℃から10℃まで上昇するに要した時間は0.5と0.25各々6秒、8秒であり、0.5の35℃融解と0.25の20℃融解とはほぼ同様の成績であった。また、5℃から30℃までの時間はいずれのストローも30℃融解の成績とほぼ同様であった。

表3 腔内融解における融解速度(外気温25~27℃)

精液温度 ストロー	精液温度			
	-5℃	5℃	10℃	30℃
0.5	35	39	41	59
0.25	20	27	28	41

秒

この成績から腔内融解における凍結精液の融解速度自体は10℃融解程度であるが、融解した精液の温度上昇は30℃融解と同程度と考えられる。

#### 2) 腔内融解と精子生存性

腔内融解後の精子生存性を35℃融解のものと比較して図9と10にした。図9に示したように腔内融解直後の生存性は種雄牛によって若干の差異はあるが、異なった外気温の条件下においても35℃融解と比べて著しく低いという傾向はみられなかった。一方、融解後の生存性については図10に示したように、60分保存後の生存性低下が著しく、また、融解したストローによるバラツキが大きくなる傾向がいずれのストローにも認められた。

凍結精液の腔内融解は融解した精液の低温感作がなく、注入操作が短時間で済み、融解器具等の準備も必要としない。しかしながら、融解後に精子生存性低下の傾向がみられること、また、ストローによるバラツキの大きさから操作失宜による生存性低下の危険が大きいためとされることから、野外において積極的に実施すべき有利な融解手段ではないと考えられる。

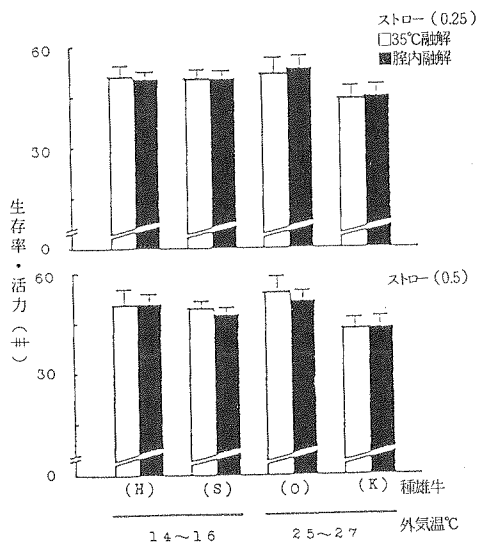


図9 35℃融解と腔内融解における融解直後の精子生存性  
注 (H)と(S) n = 5, (O)と(K) n = 10

### 引用文献

- 1) 大久保吉啓・百瀬久美子・渡辺晴彦・浅野元生・芹沢弘(1983) 0.25 mlストローによる牛精液の取り扱い. 長野県畜試研報, 19:6-9
- 2) 西川義正・宮本元・入谷明(1970) 凍結ストローにおける2, 3の取扱い条件と精子の生存性. 凍結精液研報, 31:7-9
- 3) 栢田博司・和出靖(1982) 0.25 mlストローによる牛凍結精液の取り扱い技術の検討  
II 融解方法及び融解後の外気露出が精子の生存性に及ぼす影響. 家畜人工授精研誌, 4:41-44
- 4) J.O.Almquist, J.L.Rosenberger, and R. J.Branas (1979) Effect of Thawing Time in Warm Water on Fertility of Bovine Spermatozoa in Plastic Straws. J.Dairy Sci., 62:772-775.
- 5) Steven J.Yaun (1983) A.I.Management Manual, 50-54, American Breeders Service, Wisconsin.

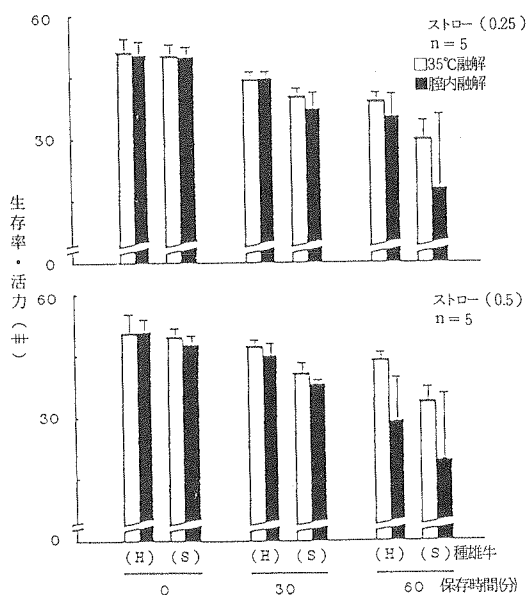


図10 35℃融解と腔内融解における融解後の精子生存性