

豚凍結精液作成時の耐凍剤に関する研究

| | |
|-------|--|
| 誌名 | 鳥取県中小家畜試験場研究報告 = Bulletin of Tottori Swine & Poultry Station |
| ISSN | 0918998X |
| 著者名 | 青萩, 芳幸 福間, 規夫 米村, 功 |
| 発行元 | 鳥取県中小家畜試験場 |
| 巻/号 | 55号 |
| 掲載ページ | p. 16-18 |
| 発行年月 | 2005年3月 |

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



豚凍結精液作成時の耐凍剤に関する研究

*青萩芳幸・**福岡規夫・***米村 功

(*現 (財)鳥取県食鳥肉衛生協会 **現 溝口家畜保健衛生所 ***現 畜産試験場)

The comparative research of frozen boar serum added 3 kinds of cryoprotectant

Yoshiyuki Aohagi, Norio Fukuma, Isao Yonemura

要 約

一般的に豚では凍結精液の耐凍剤としてグリセリンが使用されているが、牛等で利用されている他の耐凍剤を用いて豚凍結精液を作成し、比較検討を実施した。豚凍結精液作成時の第2次希釈液に加える耐凍剤には、グリセリン(G)、エチレングリコール(E)及びN-メチルアセトアミド(N)を使用し、凍結精液中の耐凍剤最終濃度を3%に調整した。凍結融解した精液はモデナ液で希釈し、38℃で30分間放置後、精子活力について検査したところ、精子生存指数はG36.1±10.5、E45.0±10.7、N16.1±6.3であり、Eが最も高い精子生存指数を示した。また豚凍結精液による種雌豚への交配試験を実施したところ、Gでは受胎率60.0%であったが、Eでは81.3%であった。

緒 言

豚の交配方法は自然交配の他に、人工授精技術が取り入れられ、繁殖面における省力化が行われている。しかし、現在、豚の人工授精に利用される精液は液状精液であるために、その保存期間は一週間程度が限界であり、その都度入手する必要がある。

一方、凍結精液であれば半永久的に保存することができるが、豚では牛におけるような実用化には至っていない。これは豚凍結精液の精子活力が液状精液よりかなり低く、また受胎率および産子数についても低いので¹⁾、実用的ではないためである。

今回、この豚凍結精液における精子活力の低下をできるだけ抑制する目的で、豚凍結精液の作成時に用いられる耐凍剤について検討を行った。

材料及び方法

1) 豚凍結精液の作成

鳥取県中小家畜試験場で飼養されているランドレース種及びデュロック種の種雄豚から精液を採取し、豚凍結精液利用技術マニュアル²⁾のストロー法による製造手順にほぼ準じて豚凍結精液を作成した。まずモデナ液で精液を約1.7倍に希釈し、これを均一に3つに分け、15℃の恒温槽内に24時間静置した。次に50mlの遠心管に希釈した精液を

分注後、遠心(2,000回転、10分間)し、その後上澄み液を除去して、沈査のみにした。この沈査を15℃に温度設定した作業ボックス内で精子濃度が1mlあたり20億個になるように1次希釈液(表1)で希釈後、4℃の恒温槽内に2時間静置して、精液温度が4℃になるまで冷却した。その後、同温等量の2次希釈液(1次希釈液925.2mlにOEP14.8ml及

表1 1次凍結用希釈液組成

| 1, 000ml 当たり | |
|---------------|-------|
| 蒸留水 | 710ml |
| ラクトース | 88ml |
| 抗生物質 | 2ml |
| (アミンとして200mg) | |
| 卵黄 | 200ml |

び耐凍剤60.0mlを添加(2次希釈液中の耐凍剤濃度は6%)で希釈した。今回、耐凍剤は、豚凍結精液利用技術マニュアルで用いられているグリセリンの他に、エチレングリコール及びN-メチルアセトアミドを使用した。その後、5ml凍結用ストローに5ml充填し、ストロー1本当たりの精子数は50億個とした。凍結方法については、液体窒素を入れた発泡スチロール容器内の架台にストローを20分間静置した後、発泡スチロール容器の液体窒素中へ2分間浸漬し、完全に凍結させた。その後、これ

らのストローは液体窒素を充填した凍結精液保存容器中に保存した。

2) 凍結精液の融解

凍結精液ストローを保存容器中から取り出し、40℃のウォーターバスに50秒間漬けて融解した。その後、融解した凍結精液を65mlのモデナ液と混合し、精子活力検査あるいは種雌豚への交配試験に供した。

3) 精子活力検査

精子活力検査は、8頭の種雄豚の精液から計11回採精して作成した凍結精液について行った。検査方法は融解後、モデナ液と混合した凍結精液を38℃のウォーターバス中に30分間静置した後に、適量を精液性状検査板に滴下し、その上にカバーグラスをのせ、38℃に温度設定した加温板上で鏡検した。精子の活力判定には精子生存指数を使用した。

4) 種雌豚への交配試験

グリセリンあるいはエチレングリコールを耐凍剤として作成したランドレース種の凍結精液を、鳥取県中小家畜試験場で飼養しているランドレース種雌豚へ交配し、繁殖成績を調査した。試験に使用した種雌豚は1産から7産の経産豚で、離乳の翌日に市販の性腺刺激ホルモン配合剤(PMSG400IU、hCG200IU)を頸部筋肉内に注射して発情誘起を行い、離乳5日目および6日目に各1回凍結精液による人工授精を実施した。

3. 結果

1) 精子活力検査

各種耐凍剤を使用した凍結精液の精子生存指数はグリセリン36.1±10.5、エチレングリコール45.0±10.7およびN-メチルアセトアミド16.1±6.3であり、エチレングリコールが最も高い精子生存指数を示した。

2) 種雌豚への交配試験(表2)

耐凍剤としてグリセリンを使用した凍結精液の成績は受胎率60%および平均産子数8.8頭であったが、エチレングリコールを使用した場合では受胎率81.3%および平均産子数9.9頭であった。

表2 豚凍結精液による交配試験成績

| 使用した耐凍剤名 | 供試種雌豚頭数 | 受胎頭数 (受胎率) | 平均産子数 (範囲) |
|-----------|---------|-------------|--------------|
| グリセリン | 10頭 | 6頭 (60.0%) | 8.8頭 (3~12頭) |
| エチレングリコール | 16頭 | 13頭 (81.3%) | 9.9頭 (5~17頭) |

4. 考察

耐凍剤は精子を凍結する際の損傷防止用の保護剤としての役目を担っている。豚では耐凍剤としてこれまでグリセリンが用いられてきた。これはWilmot and Polge(1977)³⁾が実施した試験では耐凍剤としてグリセリンが最も優れていたという報告に基づいている。一方、エチレングリコールについてもWilmot and Polgeは試験を行っているが、精子活力は低いという結果が得られている。

今回、耐凍剤としてグリセリンの他に、エチレングリコールおよびN-メチルアセトアミドを使用して凍結精液を作成したが、精子活力及び繁殖成績はともにエチレングリコールを使用した場合が最も優れていた。この結果はWilmot and Polgeの報告と異なっていたが、これはWilmot and Polgeが実施した豚精液凍結方法はペレット法であり、今回実施したストロー法と異なっていたことが大きな要因ではないかと考えられる。現在、豚凍結精液に関する研究はストロー法が主流で行われている。今回、このストロー法に用いられる耐凍剤としてエチレングリコールも有効であることが明らかにされたことから、今後の豚凍結精液の研究の発展が期待される。またエチレングリコールは牛凍結精液の耐凍剤として有力視されており⁴⁾、このことから凍結精液に利用される耐凍剤として優れているものと考えられる。

種雌豚への交配試験では、エチレングリコールを使用した場合の受胎率及び産子数がともにグリセリンを使用した場合より良好であった。これはエチレングリコールを使用した凍結精液の方がグリセリンの場合よりも精子活力が良好であったことが繁殖成績に反映したためと推測される。またエチレングリコールの繁殖成績の方が良好であったことから、豚凍結精液の耐凍剤としてエチレングリコールを使用しても、受胎への影響は少ないと考えられる。

参考文献

- 1) Johnson et. al. : J. Anim. Sci., 52, 1130-1136 (1981)
- 2) 日本家畜人工授精師協会 : 豚凍結精液利用技術
- 3) Wilmut and Polge : Cryobiology, 14, 471-478 (1977)
- 4) 坂井 隆宏ら : 佐賀畜試試験成績書, 4-6 (1999)

Summary

Frozen boar sperms added 3 kinds of cryoprotectant (glycerol, ethylene glycol and N-methylacetamide) were compared. After frozen boar sperms were thawed, sperms were incubated at 38 °C for 30 minutes. Then frozen-thawed boar sperms were examined for the motility index of spermatozoa. The motility index of spermatozoa of boar sperms added ethylene glycol was best at 45.0 ± 10.7 . The breeding examinations using these frozen boar sperms were done. Pregnancy rate of sow inseminated with frozen boar sperms added ethylene glycol was 81.3%. On the other hand, 60.0% was glycerol.