

メチルアセトアミドを凍結保護剤として用いたニワトリ精液の 凍結保存

誌名	日本家禽学会誌
ISSN	00290254
著者	榛澤, 章三 新實, 竜也 宮田, 透 筒井, 真理子 田島, 淳史
巻/号	47巻1号
掲載ページ	p. 27-32
発行年月	2010年4月

《技術報告》

メチルアセトアミドを凍結保護剤として用いたニワトリ精液の凍結保存

榛澤章三^{1,2}・新實竜也¹・宮田 透¹・筒井真理子¹・田島淳史³

¹ 独立行政法人家畜改良センター岡崎牧場, 愛知県岡崎市大柳町栗沢 1 444-3161

² 独立行政法人家畜改良センター兵庫牧場, 兵庫県たつの市揖西町土師 954-1 679-4017

³ 筑波大学農林技術センター, 茨城県つくば市天王台 1-1-1

ニワトリ精液の凍結保存法の改善を目的として, 凍結保護剤にメチルアセトアミド (MA), ジメチルホルムアミド (DMF), ジメチルアセトアミド (DMA) およびジメチルスルホキシド (DMSO) を用いてそれぞれ凍結精液を作製し, 1羽につき毎週1回の融解精液の注入を4週間続けて行い受精率を比較した(実験1)。また, MAとDMSOを凍結保護剤にそれぞれ用いた凍結融解精液によって毎週2回の人工授精を7週間続けて受精率を比較した(実験2)。凍結精液は凍結保護剤を含まない1次希釈液で2倍希釈し, 30分静置した後, 凍結保護剤を含む2次希釈液でさらに2倍希釈した。この希釈精液を0.5mLストローに充填して, 液体窒素液面上4~4.5cmで30分間静置後, 液体窒素中に投入し保存した。融解は5°C水中で行い融解後直ちに卵管腔部に融解精液0.3mL(精子数約3億)注入した。実験1による平均受精率は, MA区, DMF区, DMSO区, DMA区でそれぞれ60.8%, 47.6%, 41.3%, 32.9%であり, 凍結区の中ではMA区が最も高く他の凍結保護剤を用いた区との差はいずれも有意であった($P < 0.05$)。融解精液注入後からの日数の経過に伴う受精率の推移は, 新鮮精液を注入した場合と比較して, 日数の経過に伴い急激な下降を示した。実験2における平均受精率は, MA凍結区, DMSO凍結区でそれぞれ70.5%, 38.8%であり, 有意な差がみられた($P < 0.001$)。一方, 非凍結区は, 凍結保護剤の添加に関係なく高い受精率を示した。週ごとの受精率はMA凍結区において最高が81.3%, 最低が61.1%, 一方でDMSO凍結区において最高が54.0%, 最低が27.0%であり, 同じ凍結保護剤を用いた場合においても受精率に大きな変動がみられた。また, この受精率の変動は, 週の経過に伴い低下しなかった。以上により, MAはニワトリの凍結精液を作製する際に優れた凍結保護効果が認められ, 連続注入による悪影響も少ないことが示唆された。

キーワード: メチルアセトアミド, ニワトリ, 精液, 凍結保存

緒 言

凍結精液技術は, 育種において非常に有効な技術であるだけでなく, 他の生殖系列細胞の凍結保存と組み合わせることによって完全な個体復元が可能となるため, 遺伝資源保存のためにも非常に重要な技術である。凍結精液の技術は, ウシでいち早く実用化されたが, この成功にはグリセリンによる凍結保護効果の発見があり, 他の家畜においても利用されている。

ニワトリの凍結精液を作製にあたり, グリセリンは非常に優れた凍結保護効果を有しているが, 一方で受精阻害作用も認められており, Lake *et al.* (1980) は人工授精を実施する際にグリセリンの濃度を0.163_M以下まで低下させる必要があると報告している。そのため, グリセリンを凍結保護剤に用いた凍結精液は通常, 融解後に再希釈と遠心分離によってグリセリンを除去する必要がある。

しかし, グリセリンの除去をおこなう場合, 希釈ショックを防ぐために段階希釈をおこなう必要があるが, この作業が非常に繁雑であるため, 鶏凍結精液技術の実用化を妨げる大きな要因になっている。Buss (1993) や Gill *et al.* (1996) は, 遠心分離の代わりに透析除去を行っているが, この場合は特殊な装置を必要とする。

一方, 融解後に除去の必要がない凍結保護剤を用いる方法も検討されている。Sexton (1980, 1983) がジメチルスルホキシド (DMSO) を, Lake and Ravie (1984) がジメチルアセトアミド (DMA) を, それぞれ用いた授精試験を報告した。その後, Van Voorst and Leenstra (1995) はDMSOを, Tselutin *et al.* (1995, 1999) はDMAを用いて, それぞれ80%を越える受精率を報告している。しかし, Donoghue and Wishart (2000) は, 凍結精液での受精率は研究者によって大きく異なることを指摘しており, Alexander *et al.* (1993) は, 精子の耐凍性には系統差が有ることを認めている。著者らも実用的な観点からDMSOやDMAを凍結保護剤としてこれまで検討してきたが, 80%を超える受精率を得るには至らなかった。

融解後に除去の必要が無く, DMSOやDMA以上に効果のある凍結保護剤を探るため, 凍結保護効果が期待されるメチル基を有する物質について検討を進めた結果, メチルアセトアミド

2009年9月11日受付, 2009年11月11日受理

連絡者: 榛澤章三

〒679-4017 兵庫県たつの市揖西町土師 954-1

独立行政法人家畜改良センター兵庫牧場

Tel: 0791-66-0801

Fax: 0791-66-0803

E-mail: s0hanzaw@nlbc.go.jp

(MA) に高い凍結保護効果が認められた。そこで、凍結保護剤に MA を用いた時の凍結保護効果が、これまでに凍結保護剤として用いられている凍結保護剤に比べても優れているのか、そして凍結融解精液を長期間人工授精した時に影響があるのかを検討した。

材料と方法

1. 供試鶏

凍結精液の作製には、横班プリマスロック (BP) の雄鶏 50 羽を供試した。これらの雄鶏は精子の耐凍性等で特に選抜せず、凍結精液を作製する約 2 週間前から 1~2 日おきに採精を行った。凍結精液は全て混合精液で作製した。凍結融解精液を注入する雌鶏は、コマーシャル鶏のイサホワイトを用いた。供試鶏の飼養管理条件は、ウインドウレス鶏舎のケージ飼育で、14 時間点灯下において CP17.5%, ME 2800 cal の飼料を給与した。また、供試鶏の月齢は、12~18 ヶ月齢であった。

2. 凍結精液の作製方法

① 精液はマッサージ法によって透明液を出来るだけ入れないように試験管に受けた。採取した精液を希釈し凍結を開始する直前までの作業環境温度は、5°C とした。1 次希釈は、5°C に冷却した 1 次希釈液 (HS-1, 表 1) を採取した精液に 1:1 の割合で混合し、30 分間静置した。

② 次に、2 次希釈液には HS-1 に最終濃度の 2 倍量となる凍結保護剤を添加したものをを用いた。2 次希釈は、1 次希釈した精液と 2 次希釈液を 1:1 の割合で混合した。

③ 2 次希釈した精液は、0.5 mL の凍結精液用ストロー (FHK 製) に充填後、ストローパウダー (FHK 製) で密閉した。

④ 凍結器として発泡スチロール製の容器にストロー架台を入れ、ストロー架台に乗せるストローの位置と液体窒素の液面との距離が 4~4.5 cm となるように液体窒素を入れた。

⑤ 希釈精液が充填されたストローをストロー架台に横向きに並べ (図 1)、発泡スチロール製の容器に蓋をして 30 分間静置後、

ストローを液体窒素中に投入して凍結を完了し、液体窒素が入っている液体窒素保管容器に移し替えて保管した。

3. 融解と注入方法

① 凍結精液は液体窒素に入れたまま鶏舎 (注入場所) に運び、融解作業は鶏舎内で実施した。

② 凍結精液の入ったストローを液体窒素中からピンセットを用いて取り出し、5°C の冷水を入れた水槽に浸漬することで融解した。一度に融解する凍結精液のストロー本数は 4~5 本とした。凍結融解した精液はストローカッター (FHK 製) でストローの端を切り落として 5°C の試験管に移しかえた。

③ 試験管内に移した凍結融解した精液を鶏精液注入器 (FHK 製) で吸い取り、雌鶏の膣深部へ注入した。なお、注入は腹部の圧迫による精液の流出を防ぐため、雌鶏の両足を広げて行った。

4. 実験 1 凍結保護剤の種類による凍結保護効果

凍結保護剤として MA, ジメチルホルムアミド (DMF), DMA および DMSO をそれぞれ用いた凍結区と、耐凍剤を添加していない HS-1 で 4 倍希釈して凍結せずに授精した対照区の計 5 区を試験した。凍結保護剤を含む 2 次希釈液には、HS-1 に各凍結保護剤を添加したものをを用いた (表 2)。各区とも雌鶏 30 羽に対して注入試験をおこなった。1 羽あたり精子約 3 億を含む非凍結区あるいは凍結区の精液 0.3 mL を週 1 回注入し、これを 4 週間継続した。注入の 2 日後から採卵を開始し、7 日間貯蔵した卵を毎週 (計 4 回) 孵卵した。孵卵 10 日目に投光検査により、受精の判定をおこなった。

5. 実験 2 人工授精の繰り返しによる受精率への影響

凍結保護剤として MA と DMSO を用いた凍結区と非凍結区ならびに凍結保護剤を含まない希釈精液を凍結せずに授精した対照

表 1. 1 次希釈液 (HS-1) の組成表

成分	濃度 (g/DW 100 mL)
グルタミン酸ナトリウム・H ₂ O	1.2
酢酸カリウム・無水	0.3
トレハロース・2H ₂ O	3.8
グルコース・無水	0.2
BES ¹⁾	0.5
Bis-tris ²⁾	0.5
ゲンタマイシン硫酸塩	0.001
pH	6.8
浸透圧 (mOsm/kg)	360

1) N, N-ビス (2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸。 (HOCH₂CH₂)₂NCH₂CH₂SO₃H

2) ビス (2-ヒドロキシエチル) イミノトリス (ヒドロキシメチル) メタン。 (HOCH₂CH₂)₂NC (CH₂OH)₃



図 1. 液体窒素蒸気による凍結

発泡スチロール製の容器にストロー架台 (市販のステンレス製試験管立て) と、液体窒素を入れる。希釈精液を充填したストローをストロー架台に横向きに並べ (液体窒素の液面との距離 4~4.5 cm)、発泡スチロール製の容器に蓋をして 30 分間静置後、ストローを容器中の液体窒素に投入して凍結を完了する。

表 2. 2次希釈液の組成表

成分	試験区				
	MA区	DMF区	DMA区	DMSO区	対照区
HS-1 ¹⁾	85	85	82	91	100
メチルアセトアミド (MA)	15				
ジメチルホルムアミド (DMF)		15			
ジメチルアセトアミド (DMA)			18		
ジメチルスルホキシド (DMSO)				9	

1) HS-1の組成は表1を参照

表 3. 凍結保護剤の種類による凍結保護効果の比較

試験区		受精率% (受精卵個数/入卵個数)				平均±SD
		週				
		1	2	3	4	
MA区	凍結	49.4 (84/170)	66.2 (102/154)	64.0 (96/150)	63.1 (99/157)	60.8 ^b ± 7.6
DMF区	凍結	50.3 (80/159)	40.5 (62/153)	48.7 (74/152)	51.0 (79/155)	47.6 ^c ± 4.8
DMA区	凍結	24.8 (37/149)	40.6 (56/138)	33.8 (47/139)	33.1 (42/127)	32.9 ^d ± 6.5
DMSO区	凍結	29.9 (52/174)	40.9 (63/154)	46.0 (74/161)	49.1 (78/159)	41.3 ^{cd} ± 8.4
対照区	非凍結	91.3 (146/160)	93.1 (148/159)	93.7 (148/158)	92.8 (155/167)	92.7 ^a ± 1.0

平均値は各週の値によるアークサイン平均から算出
a-d 異符号間で有意差あり (P<0.05)

区を試験した。各区とも雌鶏 30 羽に対して注入試験をおこなった。1羽あたり精子約 3 億を含む非凍結区あるいは凍結区の精液 0.3 mL を週 2 回の頻度で注入し、これを 7 週間継続した。注入の 2 日後から採卵を開始し、7 日間貯蔵した卵を毎週 (計 7 回) 孵卵した。孵卵 10 日目に投光検査により、受精の判定をおこなった。

6. 受精率の算出及び統計処理

投光検査により確認された受精卵の個数と孵卵個数から各区における受精率を算出した。各区における 1 週間ごとの受精率をアークサイン変換し、分散分析および Tukey の HSD 検定により解析した。統計ソフトには、STATISTICA (StatSoft, Inc., 2000) を使用した。

結 果

実験 1 における平均受精率は、MA 区 60.8%、DMF 区 47.6%、DMSO 区 41.3%、DMA 区 32.9% であり、凍結区の中では MA 区が最も高く、他の凍結保護剤を用いた区との差はどれも有意であった (P<0.05) (表 3)。DMSO 区と DMA 区の受精率を比較した場合、DMSO 区がやや高い値を示したが、有意な差は認められなかった。注入 2 日後以降の日数経過に伴う受精率の推移は、非凍結区では高い値で安定していたのに対し、凍結区ではどの区に

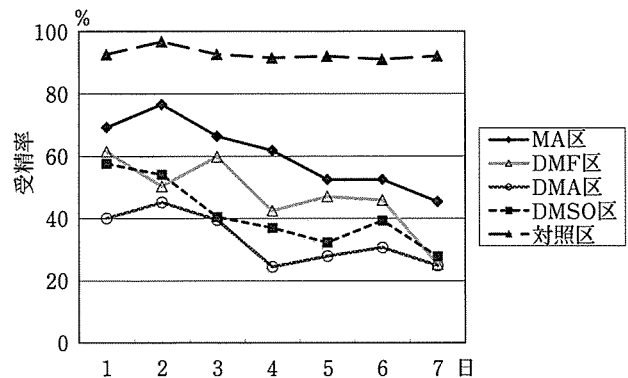


図 2. 凍結保護剤の種類による日数の経過に伴う受精率

においても値は急激に低下した (図 2)。

実験 2 における平均受精率は、MA 凍結区で 70.5%、DMSO 凍結区では 38.8% であり、有意な差が認められた (P<0.001)。一方、非凍結区は、凍結保護物質の添加の有無に関係なく高い受精率を示した。週ごとの受精率は MA 凍結区において最高値が 81.3%、最低値が 61.1% であり、一方で DMSO 凍結区において最高

表 4. 週 2 回の人工授精の継続が受精率に及ぼす影響

試験区	受精率% (受精卵個数/入卵個数)								平均±SD
	週								
	1	2	3	4	5	6	7		
MA 凍結	81.3	79.9	68.3	62.4	67.4	70.7	61.1	70.5 ^b ±7.9	
	(135/166)	(139/174)	(123/180)	(116/186)	(118/175)	(116/164)	(99/162)		
DMSO 凍結	41.3	27.0	32.9	31.4	37.4	54.0	48.7	38.8 ^c ±9.7	
	(57/138)	(44/163)	(49/149)	(48/153)	(58/155)	(81/150)	(77/158)		
MA 非凍結	97.1	98.9	98.3	98.9	97.7	97.7	97.1	98.0 ^a ±0.8	
	(168/173)	(177/179)	(175/178)	(178/180)	(171/175)	(173/177)	(168/173)		
DMSO 非凍結	98.2	97.6	96.3	97.0	95.0	99.4	94.4	97.1 ^a ±1.8	
	(162/165)	(164/168)	(154/160)	(159/164)	(151/159)	(157/158)	(151/160)		
対照区 非凍結	97.9	96.1	99.3	98.6	98.6	99.2	94.3	98.0 ^a ±1.9	
	(140/143)	(148/154)	(143/144)	(142/144)	(137/139)	(124/125)	(115/122)		

平均値は各週の値によるアークサイン平均から算出

^{a-c} 異符号間で有意差あり (P<0.001)

値が 54.0%, 最低値が 27.0% であり, 凍結区ではどちらにおいても大きなばらつきがみられた (表 4)。しかしながら, 受精率の低下は週の経過 (授精回数) に伴って低下しなかった。

考 察

本実験により, ニワトリ精子に対する MA の凍結保護剤としての高い効果が認められた。これまで, MA を凍結保護剤に用いた例として, Surai and Wishart (1996) がロシアでの成績を報告している。しかし, 凍結融解後の精子生存率は DMF よりも MA が劣るとして MA による受精試験は行われていない。一方, DMF を凍結保護剤に用いた受精試験は, Chalah *et al.* (1999) や Lukaszewicz (2001) によって報告されている。本研究においておこなった凍結精液の受精成績では MA と DMF 双方とも DMSO と比較して高い凍結保護効果が認められたが, MA を用いた場合, その効果は特に優れていた。

凍結保護剤の効果には, 凍結方法や凍結保護剤の濃度によっても影響を受ける。本研究は簡易な急速ストロー凍結法における融解精子の活力と受精率の向上を目的とし, 希釈液, 希釈方法, 融解方法ならびに注入方法を開発した。そのため, 我々の開発した急速ストロー凍結法の凍結保護剤として MA が最適である可能性が示唆された。凍結保護剤の濃度は各凍結保護剤によってそれぞれ適正な濃度が存在するため, 予備試験によって最終濃度を決定した。DMSO の場合では, 最終濃度を 7.5% にすると凍結融解精液は 1% 以下の受精率しか得られなかった。一方で DMSO の濃度が 7.5% の非凍結区における受精率は, 凍結保護剤を含まず凍結しなかった対照区の受精率と比較した場合, 差は認められなかった。この結果より, 高濃度の DMSO を含む場合, 凍結過程において精子に与える損傷が大きい可能性が示唆された。そこで, 本研究では凍結融解した精液の授精試験の結果を考慮に入れて DMSO の濃度を 4.5% に設定した。DMSO を用いたニワトリ凍結精液の報告の多くにおいても 4~4.5% の濃度で実施されている。同様に, 本研究では DMA の最終濃度を 9% に設定したが,

Lake (1984) や Tai *et al.* (2001) の報告においても同程度の濃度で試験が実施された。凍結保護剤の比較試験を実施する場合は, 凍結保護剤によって適正濃度が異なるため, 凍結保護剤各種の適正添加濃度を予め調査しておくことが重要と思われる。

なお, MA が凍結精液作製の凍結保護剤として用いられなかった理由として, MA を用いた凍結精液では 5°C で融解した場合, すぐに精子の運動が再開しないことも要因の一つであると考えられる。著者らは融解後すぐに 30°C 保温下で精子の運動性を観察したが, MA を凍結保護剤に用いた凍結融解精子は保温開始後ただちに運動を再開せず, 30 秒を経過した頃より運動を再開し, 約 1 分で運動が停止した。加温しない場合, 活発な運動性を示さないことや, 凍結精液が空気との接触がない場合, 十分な運動性を示さないという特徴があることから, 凍結融解精液の観察方法の違いによってこれまで MA の凍結保護効果が見落とされていた可能性もある。さらに, MA が常温において固体であり, 希釈液を作製する際に予め恒温器で融解する必要があり, 常温において液体である DMF より利用性が低いことも耐凍剤としての使用が敬遠されてきた要因の一つであると考えられる。

凍結保護剤としての効果を比較した報告として Tselutin *et al.* (1999) が凍結融解後の精子の運動性では DMA が DMSO より優れていると報告した。また, Tajima *et al.* (1990) は凍結融解後の精子の受精率では DMSO が DMA よりも有意な差は認められないものの, やや優れていると報告している。一方で Tai *et al.* (2001) はガチョウの凍結精液では DMA の方が DMSO より優れていると報告した。これらのことから, DMSO と DMA の凍結保護剤としての効果の比較試験は, 研究者や動物種によって異なる可能性が示唆される。Donoghue and Wishart (2000) は凍結融解した精液における受精成績が研究者によって大きなばらつきがみられることを指摘おり, 技術的な問題が大きく影響すると考察している。

ニワトリの凍結精液の場合, プログラムフリーザーを用いる方法とドライアイスによるペレット法が主流である。しかしなが

ら、著者らは実用的な観点から急速ストロー凍結法を採用した。急速ストロー凍結法については、Fujihara and Ohboshi (1991) が DMSO を、Alexander *et al.* (1993) がグリセリンを凍結保護剤として用いた報告をおこなった。急速ストロー凍結法では、ストローの太さや液体窒素液面との距離によって凍結速度が変化するという問題がある。しかし、一方でこの方法は高価な装置が不要であり、個体識別も比較的容易であるうえ、ペレット法のように精液が直接液体窒素に接することも無いので衛生的でもある。本試験では実用性を重視するためにストロー架台として市販の試験管立てを用いた試験をおこなった。また、凍結保護剤の種類によって凍結融解後の精子の生存性へ悪影響を及ぼす物質があることから、1次希釈において精子へ栄養を与えると共に冷却し、凍結保護剤を含む希釈液で2次希釈をおこなった後、可能な限り早急に凍結する方法を用いた。希釈液として用いた HS-1 は凍結融解後の精子活力の向上を目的に開発したため、今後は更なる改良を図りたいと考えている。

実験1での凍結区は、どの区も日数の経過に伴い受精率は急激な下降を示した。このことは、凍結融解精子の運動持続性は非凍結精液と比較して非常に弱いことに関係していると思われる。安定した受精率を得るには、1週間に数回授精することが必要であり、これによる弊害があれば実用化において問題となり得る。実験2においては、MA凍結区とDMSO凍結区で明確な受精率の差が見られたものの、両区とも週の経過に伴った変化ではないことから、人工授精の繰り返しによる受精率の低下である可能性は低いと推察された。

今回の試験において、MAはニワトリの凍結精液の作製における凍結保護剤として、精子の凍結保護効果と融解精液の連続注入の両面から有効な物質であることが示された。また、非常に簡易な急速ストロー凍結法を用いたことから実用レベルに近づいたと思われる。しかしながら、ニワトリ凍結精液技術の実用化に向けては依然として問題も多く、受精率の変動が大きいため更なる改良を検討する必要がある。

謝 辞

本稿は、平成19年度日本家禽学会技術賞受賞課題である「簡易で実用的なニワトリ凍結精液作製手法の開発」の内容の一部をまとめたものです。本稿の執筆の機会を与えて頂きました日本家禽学会事務局、技術賞選考委員会、並びに編集委員会の諸先生方に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、急速ストロー凍結法をはじめ精液の凍結保存に関して御指導していただいた榊田博司先生に心から謝意を表します。そして、終始実験に協力いただいた家畜改良センター岡崎牧場の職員一同に感謝いたします。

引用文献

- Alexander A, Graham JK, Hammerstedt RH and Barbatto GF. Effects of genotype and cryopreservation of avian semen on fertility and number of perivitelline spermatozoa. *British Poultry Science*, 34 : 757-764. 1993.
- Buss EG. Cryopreservation of rooster semen. *Poultry Science*, 72 : 944-954. 1993.
- Chalah T, Seignerin F, Blesbois E and Brillard JP. In vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo. *Cryobiology*, 39 : 185-191. 1999.
- Donoghue AM and Wishart GJ. Storage of poultry semen. *Animal Reproduction Science*, 62 : 213-232. 2000.
- Fujihara N and Ohboshi S. Simple and rapid cryopreservation of rooster spermatozoa. *Journal of Low Temperature Medicine*, 17 : 128-131. 1991.
- Gill SP, Buss EG and Mallis RJ. Cryopreservation of rooster semen in thirteen and sixteen percent glycerol. *Poultry Science*, 75 : 254-256. 1996.
- Lake PE, Buckland RB and Ravie O. Effect of glycerol on the viability of fowl spermatozoa-implications for its use when freezing semen. *Cryoletters*, 1 : 301-306. 1980.
- Lake PE and Ravie O. An exploration of cryoprotective compounds for fowl spermatozoa. *British Poultry Science*, 25 : 145-150. 1984.
- Lukaszewicz E. DMF effects on frozen gander semen. *British Poultry Science*, 42 : 308-314. 2001.
- Sexton TJ. Optimal rates for cooling chicken semen from +5 to -196°C. *Poultry Science*, 59 : 2765-2770. 1980.
- Sexton TJ. Effect of prefreeze treatments on the fertilizing capacity of unfrozen and frozen chicken semen: Extender characteristics and dilution method. *Poultry Science*, 62 : 2255-2260. 1983.
- StatSoft, Inc. STATISTICA for Windows. Version 5.5. StatSoft, Inc., Tulsa, OK. 2000.
- Surai PF and Wishart GJ. Poultry artificial insemination technology in the countries of the former USSR. *World's Poultry Science Journal*, 52 : 27-43. 1996.
- Tai JJ, Chen C, Wu KC, Wang SD and Tai C. Cryopreservation of gander semen. *British Poultry Science*, 42 : 384-388. 2001.
- Tajima A, Graham EF, Shoffner RN, Otis JS and Hawkins DM. Cryopreservation of semen from unique lines of chicken germ plasm. *Poultry Science*, 69 : 999-1002. 1990.
- Tselutin K, Narubina L, Mavrodina T and Tur B. Cryopreservation of poultry semen. *British Poultry Science*, 36 : 805-811. 1995.
- Tselutin K, Seigneurin F and Blesbois E. Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. *Poultry Science*, 78 : 586-590. 1999.
- Van Voorst A and Leenstra FR. Fertility rate of daily collected and cryopreserved fowl semen. *Poultry Science*, 74 : 136-140. 1995.

Cryopreservation of Chicken Semen Using N-methylacetamide as Cryoprotective Agent

Shozo Hanzawa^{1,2}, Tatsuya Niinomi¹, To-oru Miyata¹, Mariko Tsutsui¹ and Atsushi Tajima³

¹ Okazaki Station, National Livestock Breeding Center, Okazaki, Aichi 444-3161

² Hyogo Station, National Livestock Breeding Center, Tatsuno, Hyogo 679-4017

³ Graduate School of Life and Environmental Science, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305-8572

A novel method has been developed to freeze chicken semen using N-methylacetamide (MA) as cryoprotective agent. Pooled semen collected from 50 Barred Plymouth Rock roosters was subjected to primary dilution by mixing equal amount of pooled semen with HS-1 extender at 5°C. After primary dilution, semen sample was maintained at 5°C for 30 minutes and secondary dilution was performed by mixing one part diluted semen with one part HS-1 extender containing either 7.5%MA, 7.5%N,N-dimethylformamide(DMF), 9.0%N,N-dimethylacetamide(DMA) or 4.5%dimethylsulfoxide(DMSO) at final concentration (Experiment 1). After filling diluted semen into 0.5 mL plastic straw, samples were frozen by exposing to liquid nitrogen vapor at 4 to 4.5 cm above liquid nitrogen surface for 30 minutes. Straws containing frozen semen were then plunged into liquid nitrogen. Semen was thawed by placing plastic straw into water at 5°C. After thawing, 0.3 mL of diluted semen, which contains approximately 300×10^6 sperm cells, was artificially inseminated intravaginally into 30 hens per treatment. Artificial insemination was conducted once a week for four consecutive weeks and weekly fertility was examined by candling eggs at 10 days after incubation. The average weekly fertility of frozen-thawed semen in MA group was significantly higher than that in DMF, DMA, DMSO ($P < 0.05$). In experiment 2, semen sample frozen in the presence of 7.5% MA or 4.5% DMSO (final concentration) was prepared to examine the effect of repeated insemination on fertility. After thawing, 0.3 mL of diluted semen was inseminated intravaginally twice a week, by alternating 3 days and 4 days intervals, for 7 weeks. The average weekly fertility of frozen-thawed semen in MA group was significantly higher than that in DMSO group (70.5% vs. 38.8%) ($P < 0.001$). No adverse effect on fertility was observed by inseminating twice a week for 7 weeks. In conclusion, this study showed that high fertility of frozen-thawed chicken semen can be obtained by freezing semen using MA as a cryoprotective agent.

(Japanese Journal of Poultry Science, 47 : J27-J32, 2010)

Key words : N-methylacetamide, chicken, semen, cryopreservation