

山羊液状精液における簡易な調製法の検討

(1) 豚用希釈液の応用

守川信夫 山城存 大竹里佳

I 要 約

山羊液状精液の簡易な調製法を確立するため、山羊用希釈液と豚用希釈液2種を用いてその生存率と保存日数について検討をおこなったところ、その結果は次のとおりであった。

1. 対照区の山羊用希釈液と同等の生存率を示したことから、豚用希釈液が代替可能である。
2. 冷蔵庫内保存日数は、4日間までの利用が適当と考えられる。

II 緒 言

農家現場において、発育良好な山羊の存在が報告¹⁾されている。その遺伝資源を地域で活用できる方法として液状精液を利用した交配がある。液状精液の利用については、(独)家畜改良センター茨城牧場長野支場が山羊用希釈液によるザーネン種およびシバ山羊の液状精液の配布を実施している例がみられる。いっぽう山羊用希釈液²⁾の調製は、種々の薬品が必要なことや微量な秤量が可能な計量装置が必要なことから、農家現場での自家調製が困難なことが推察される。地域における優良な遺伝資源を液状精液により活用するためには、資材等の入手が容易なことや簡易に調製できることが求められることから、市販豚用希釈液を用いた山羊液状精液への応用について検討したので、その結果を報告する。

III 材料および方法

1. 供試山羊

ボア系雑種雄山羊2歳(生年月日2017年3月15日)および同2歳(生年月日2017年4月3日)の2頭を用いた。なおこれら供試山羊の父系統は、2009年度に沖縄県がニュージーランドより導入した山羊により造成されたものである。

2. 試験期間および試験場所

試験期間は、夏期として2019年8月19日から9月16日の間に、秋冬期として2019年11月11日から12月16日の間にそれぞれ4反復実施した。試験場所は、沖縄県畜産研究センターにおいて実施した。

3. 試験方法

1) 区の設定

精液採取後の希釈液として対照区を山羊用希釈液(以下山羊用区)とし、試験区として豚用希釈液のH液(以下H区)およびZ液(以下Z区)を設定した。

2) 採取方法および希釈法

山羊精液は、人工臍による横取り法により採取した後、3つの区に分注した。最終保存の希釈倍率を10倍とし、希釈液添加によるダメージを低減するため以下のような方法により希釈をおこなった。

(1) 分注した精液量に対して、半量の希釈液を加えたのち(例: 精液0.5mlとすると希釈液0.25ml加え計0.75mlとする。)5分間静置する。

(2) (1)と同様に精液量に対して、半量の希釈液を加えたのち(例: 既希釈精液0.75mlに対して希釈液0.25ml加え計1mlとする。)5分間静置する。

(3) 既希釈精液に等量の希釈液を加えたのち(例: 既希釈精液1mlに対して希釈液1ml加え計2mlとする。)5分間静置する。

(4) 既希釈精液に等量の希釈液を加えたのち(例: 既希釈精液2mlに希釈液2ml加え計4mlとする。)5分

間静置する。

(5) 最終希釈量になるよう希釈液を加えたのち（例：既希釈精液4mlに対し希釈液1ml加える。計5mlとする。）5分間静置する。

3) 希釈液

各希釈液の組成を表1に示す。なお対照区の山羊用希釈液は、家畜改良センター茨城牧場長野支場の方法²⁾を利用した。希釈後、液状精液入り試験管を室温水の入ったビーカーに移し、市販冷蔵庫(4℃)で保管した。

表1 希釈液の内容

山羊用		H液	Z液
組成	100ml中	使用薬品	使用薬品
トリスアミノメタン	0.005g	グルコース	ブドウ糖
クエン酸三ナトリウム	2.0g	ラクトース	クエン酸三ナトリウム
ブドウ糖	2.0g	クエン酸三ナトリウム	トリスアミノメタン
炭酸水素ナトリウム	0.1g	炭酸水素ナトリウム	クエン酸
リン酸水素二ナトリウム	0.1g	トリス	EDTA・2Na
卵黄パウダー	3.0g	EDTA・2Na	炭酸水素ナトリウム
		水酸化ナトリウム	L (+) グルタミン酸 ナトリウム
		乳酸	
		グリシン	
スルファニルアミド	0.15g	} 同左添加	} 同左添加
硫酸ストレプトマイシン	0.1g		
ペニシリンGカリウム	10万IU		

注) 豚用市販希釈液は、薬品名のみ。

4) 調査および生存率判定の方法

採取した翌日を1日目とし、1日目、3日目、4日目、7日目に調査した。冷蔵庫から取り出した10倍希釈液状精液から、生存率検査のためのサンプルをとり希釈液を加えて200倍希釈にする時、希釈液は温度差がないよう希釈液も同温冷蔵庫で保管したものをを用いた。顕鏡用に200倍希釈にした液状精液を、31℃のウォーターバスで5分間温め、10μlループ&ニードルにより精子活力検査板に移した後、38℃の加温プレート付き顕微鏡200倍率で顕鏡した。生存率は、焦点の合う上下深度2カ所それぞれの精子割合と活力+++を示す生存率を目視により判定³⁾した。なお、統計処理は公開統計ソフト「R」を用い、有意差の検定はTukey法を用いた。

5) 液状精液による受胎確認

豚用希釈Z液で調製した液状精液を用いて、6頭の雌山羊に人工授精を実施し受胎確認をおこなった。受胎確認はノンリターン法にて行った。注入器具は、牛用シース管を30cm長に切断し5mlシリンジにセットしたものをを用いた。授精の際は、10倍希釈した液状精液をシース管内に2ml吸引し、人工授精に供した。

IV 結果および考察

1. 希釈液別の生存率の比較

表2に夏期における各区の生存率を示した。それぞれの区間で有意な差は見られなかったが、採取後4日目まで生存率50%以上を示したのは、山羊用区とZ区であった。7日目後では、どの区も50%以下となり、ばらつきも大きくなった。なお生存率の目安として、牛凍結精液融解時に+++35以上が適⁴⁾や山羊新鮮精液で生存率50%以下は不適⁵⁾などの報告がある。

表3に秋冬期における生存率を示した。採取後1日目、3日目、4日目において山羊用区とH区間およ

びH区とZ区間に、5%水準の有意差がみられH区の生存率が低かった。秋冬期において山羊用区とZ区は同程度の生存率が示された。Z区が7日目においても51.3%の生存率を示したが、ばらつきが大きいことから、保存7日目利用は不安定であると考えられた。

表2 夏期における希釈液別生存率 (%)

	1日目		3日目		4日目		7日目	
	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
山羊用区	88.5	± 3.5	79.5	± 3.5	73.3	± 8.5	42.1	± 19.1
H区	65.8	± 12.9	53.0	± 12.5	38.8	± 18.7	25.3	± 20.9
Z区	76.0	± 3.5	65.6	± 22.9	52.9	± 27.4	30.8	± 24.7

注) 有意差なし。

表3 秋冬期における希釈液別生存率 (%)

	1日目		3日目		4日目		7日目	
	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
山羊用区	73.0	± 8.9 ^a	66.8	± 13.7 ^a	61.0	± 13.8 ^a	31.0	± 24.9
H区	44.1	± 12.9 ^b	38.4	± 11.1 ^b	22.5	± 13.4 ^b	9.0	± 9.3
Z区	69.5	± 8.7 ^a	67.5	± 12.1 ^a	60.9	± 15.0 ^a	51.3	± 13.8

注) 調査日行列内において、異符号間に $P < 0.05$ の有意差

2. 液状精液による受胎確認

生存性が良好であった豚用希釈Z液を用いた受胎結果を表4に示した。雌山羊6頭について6回の人工授精を実施したところ、2020年12月時点において6頭中4頭が受胎し8頭の子ヤギを分娩した。

表4 液状精液による受胎確認

2020年12月時点

山羊個体	種付月日	注入部位	精液保存日数	結果
No1	2019年9月30日	頸管深部	当日	2020年2月28日分娩(双子)
No2	2019年9月30日	子宮外口部	当日	2020年2月28日分娩(双子)
No3	2019年10月30日	頸管浅部	2日目	2020年3月28日分娩(三つ子)
No4	2019年10月30日	子宮外口部	2日目	不受胎
No5	2019年11月14日	子宮外口部	3日目	2020年4月13日分娩(単子)
No6	2019年12月13日	子宮外口部	3日目	不受胎

以上のことから、山羊液状精液の簡易な調製法として、豚用希釈Z液が山羊用希釈液と同程度の精子生存率を示したことから代替が可能であると考えられた。また保存日数としては、市販冷蔵庫において4日間程度保存できると考えられた。

なお簡便な希釈法として牛乳を用いる方法⁶⁾が紹介されており、今回別途に市販牛乳および加工牛

乳を希釈液として試みたところ、含まれる脂肪分や増粘物質により精子の動きが低下する様子が観察されたことから、試験から除外した。

受胎確認について、今回の注入量は2ml（精子数およそ4億）と凍結精液0.5ml（精子数およそ1億）に比較して多めであるが、注入部位を問わず妊娠できたことは技術の簡易化につながると考えられた。

V 引用文献

- 1) 照屋陽子・具志尚子・千葉好夫(2014)肉用山羊の発育基準曲線策定へ向けた取り組み, 第41回家畜保健衛生業績発表会集録, 56-59
- 2) (独)家畜改良センター長野牧場 (2007) 山羊の繁殖マニュアル, 41
- 3) (独)家畜改良センター長野牧場 (2007) 山羊の繁殖マニュアル, 16
- 4) (社)日本人工授精師協会(2015)家畜人工授精講習会テキスト(家畜人工授精編), 288-289
- 5) (社)畜産技術協会(2004)牛の人工授精マニュアル, 65
- 6) (独)家畜改良センター長野牧場 (2007) 山羊の繁殖マニュアル, 21

研究補助：仲宗根安利