

# 牛凍結精液の生産性向上

## (2) 高倍率希釈凍結精液の製造利用の検討

棚原武毅 真喜志修 運天和彦 知念雅昭

### I 要 約

高倍率希釈凍結精液の製造利用の可能性を検討するため、0.5mlストロー内封入精子数5000万および2500万の凍結精液を作製し人工授精したところ、以下の結果であった。

1. 希釈倍率の違いによる凍結前、凍結融解直後および凍結融解後4時間の精子生存率への影響はなかった。
2. 受胎率は2500万区で74.1%、5000万区で47.1%となり、2500万区が優れている傾向にあった。

以上の結果より、1ストロー中の封入精子数を従来の5000万から2500万にしても十分実用可能であり、今後は2500万まで高倍率希釈が可能であることが示唆された。

### II 結 言

肉用牛経営において産肉性に優れた種雄牛精液を用いることは極めて重要であり、特定の種雄牛精液に人気が集まる傾向にある。そのため需要の高い種雄牛については凍結精液を効率的により多く生産する必要がある。

そこで本試験では、1ストロー中の封入精子数と受胎率の関係を調査し、高倍率希釈凍結精液製造利用の可能性を検討したので報告する。

### III 材料および方法

#### 1. 供試牛

供試牛は当場に繋養している黒毛和種種雄牛3頭を用い、その概要は表1に示した。

表1 供試牛の概要

区 分	生年月日	父の名号	母の父の名号
種雄牛A	1994. 7. 7	北 国 7 の 3	安 波 土 井
種雄牛B	1993. 8. 22	紋 次 郎	賢 晴
種雄牛C	1991. 4. 3	晴 姫	第 7 糸 桜

## 2. 試験方法

精液採取は人工膈法により行った。1種雄牛より1回採取した精液を2等分し、各々0.5mlストロー当たり精子数を5000万（5000万区）および2500万（2500万区）となるように卵黄クエン酸糖液にて希釈した。なお、5℃冷却および液体窒素による凍結は常法<sup>1)</sup>に従い実施した。

人工授精は直腸膈法にて行い、対象雌牛には県内H牧場にて繋養しているホルスタイン種および当場に繋養している黒毛和種を用いた。人工授精は1999年2月から2001年1月の期間に実施した。

## 3. 調査項目

### 1) 精液採取直後の精液性状

採取直後の精液性状をみるため、顕微鏡的検査法<sup>2)</sup>により活力+++の精子の割合を測定し、精子数の測定は精子数計測器（FHK;PC-607）を用い、pHの測定はブックpH試験紙によって行った。精子生存率は5%エオジン液にて、奇形率はゲンチアナバイオレット液にて染色し、測定した。

### 2) 凍結前および凍結融解後の精子生存率

希釈倍率の違いによる精子生存率への影響をみるため、各試験区間の凍結前、凍結融解直後および凍結融解後4時間の精子生存率を比較した。精子生存率は上記と同様に5%エオジン液にて染色し、測定した。なお、凍結融解後4時間は精子に対するグリセリンの影響を取り除くため精液を洗浄し、CO<sub>2</sub>インキュベータ内（CO<sub>2</sub>濃度5%、38℃）で媒精液<sup>3)</sup>にて保持したものをを用いた。

### 3) 受胎率

高倍率希釈による受胎率への影響をみるため、各試験区間の受胎率を比較した。また、受胎確認は60日ノンリターン法および胎膜触診法により実施した。

## IV 結果および考察

### 1. 精液採取直後の精液性状

採取直後の精液性状を表2に示した。活力は顕微鏡的検査法により測定し、活力+++の精子の割合は70～75%で正常範囲内<sup>2)</sup>にあった。1ml当たりの精子数において種雄牛Aが他の種雄牛に比較して少ないものの正常範囲内<sup>2)</sup>であり、その他の精液性状においても同様<sup>1, 4)</sup>であった。

表2 採取直後の精液性状

項 目	種雄牛A	種雄牛B	種雄牛C
活力+++の割合(%)	70	75	75
精 液 量(ml)	6.0	5.0	6.0
p H	6.4	6.2	6.4
精 子 数(億/ml)	11.4	20.4	19.6
精 子 生 存 率(%)	76.0	80.2	76.6
奇 形 率(%)	6.5	7.4	9.3

### 2. 凍結前および凍結融解後の精子生存率

凍結前および凍結融解後の精子生存率は表3のとおりであった。

凍結前、凍結融解直後および凍結融解後4時間の各種雄牛における両区の精子生存率に差は認められず、希釈による精子生存率への影響はなかった。

表3 凍結前および凍結融解後の精子生存率

単位：%

項 目	種雄牛A (n=6)		種雄牛B (n=6)		種雄牛C (n=6)	
	5000万区	2500万区	5000万区	2500万区	5000万区	2500万区
凍 結 前	73.1±3.1	74.9±2.9	81.7±2.4	81.4±2.6	71.8±2.8	69.0±4.3
融 解 直 後	52.0±2.9	51.0±2.0	50.7±3.2	49.5±2.5	50.6±2.7	53.1±3.8
融解後4時間	27.1±2.3	25.7±2.4	28.5±3.1	30.8±5.7	30.1±1.2	30.4±2.5

## 3. 受胎率

各試験区の受胎率は表4のとおりであった。

試験区別の受胎率は2500万区において74.1%と、5000万区の47.1%に比較して2500万区のほうが優れている傾向にあり、種雄牛別においても同様であった。

川辺ら<sup>5)</sup>は、1ストロー中封入精子数が6000、3000および2500万で、沢井ら<sup>6)</sup>も1ストロー中封入精子数が5000、2500および1500万において受胎率に差はないことを報告している。しかしながら、今回の試験では精子数の少ない2500万区において受胎率が高い傾向にあり、その原因については今後検討する必要があると考える。

これらのことから、0.5mlストロー内封入精子数を2500万としても従来の5000万と同等以上の受胎率が得られると推察され、今後は2500万まで高倍率希釈が可能なが示唆された。

表4 受胎率

単位：%

区 分	種雄牛A	種雄牛B	種雄牛C	平 均
5000万区	50.0(3/6)	33.3(2/6)	60.0(3/5)	47.1(8/17)
2500万区	85.7(12/14)	50.0(3/6)	71.4(5/7)	74.1(20/27)

注) ( ) 内の数字は受胎頭数/授精頭数

## V 引 用 文 献

- 1) 日本家畜人工授精師協会, 1999, 家畜人工授精師講習テキスト(平成10年版), 347-348
- 2) 日本家畜人工授精師協会, 1999, 家畜人工授精師講習テキスト(平成10年版), 310-331
- 3) 山城存, 1993, 牛の受精卵移植(7)TCM199培地を利用した牛精子処理の検討, 沖畜試研報, 31, 5-7
- 4) 内藤元男監修, 1989, 畜産大辞典, 350, 養賢堂
- 5) 川辺卓郎・伊藤雅之・足達八崇男・木本勝則, 1997, 精子濃度と受胎率についての検討(第3報), 大分畜試報告, 26, 1-6
- 6) 沢井利幸・藤山繁・平田浩一郎・田形弘・檜原高正・繁村右治, 1994, 牛精液の高希釈による凍結保存技術の開発, 山口県畜産試験場報告, 10, 32-37

研究補助：小濱健徳, 前田昌哉