

豚精液保存に関する試験

凍結精液の保存について

野島厚子 松井 孝 大城俊弘

I はじめに

現在、豚の交配は大部分が自然交配によって行われている。一部液状精液による人工授精が実施されているが、有効保存日数に限度があり、普及率が低く優良種雄豚が有効に利用されていない状況にある。そこで、豚精液の保存について検討し優良種雄豚を効率的に利用する技術の確率を図る必要がある。今回、凍結精液の製造方法が精子生存および活力に及ぼす影響について検討したので、報告する。

II 試験材料及び方法

1. 試験期間

1985～1987年

2. 供試精液

当场繁養の4品種、計7頭（L3頭、W2頭、H1頭、D1頭）の種雄豚から採取した精液を用いた。

3. 試験区及び製造方法

(1) 試験I 遠沈前処理液の効果について

i) 試験区分

対照区	遠沈前無処理
I 区	遠沈前処理液としてHulsenberg8液を使用
II 区	遠沈前処理液として※M18（豚精液希釈保存用）を使用

※液状保存用希釈で、市販のものを使用した。

ii) 製造方法

対照区の製造過程

- 1) 精液採取
- 2) 室温に2時間放置する。
- 3) 遠心分離（1500rpm～25～30分）
- 4) 精漿除去
- 5) 1次希釈
- 6) 2時間かけて5℃に冷却する。
- 7) 2次希釈（グリセリン最終濃度1%）

- 8) ドライアイス上で凍結する。(0.2ccのペレット状)
- 9) 液体窒素に投入し保管。

I・II区の製造過程

- 1) 精液採取
- 2) 遠心前処理液を2倍量加える。
- 3) 2～3時間かけて15℃へ下げる。
- 4) 遠心分離(1500rpm～15～20分)
- 5) 精漿・処理液除去
- 6) 1次希釈
- 7) 2時間かけて5℃に冷却する。
- 8) 2次希釈(グリセリン最終濃度1%)
- 9) ドライアイス上で凍結する。(0.2ccのペレット状)
- 10) 液体窒素に投入し保管。

iii) 希釈液

TF-1液の組成

Glucose	3.1 g
Tris	0.4 g
TES	1.2 g
SLS	0.16 g
蒸留水	80 g
卵黄	20 g
硫酸アミカシン	7.5mg
ペニシリンG	25000 I U

iv) 遠沈前処理液

Hulsenberg 8液の組成

Glucose	57.5 g
Lactose	2.5 g
Lactose	2.5 g
EDTA	3.5 g
NaHCO ₃	1.2 g
KCl	0.4 g
Sulfnilamid	1.0 g
蒸留水	1 l
ペニシリンG	100万 I U
ストマイ	1.0 g

(2) 試験II ペレット法とストロー法の比較試験

i) 試験区分

ペレット法-遠沈前無処理区

ペレット法-遠沈前処理液としてHulsenberg 8液試用区

ストロー法-遠沈前無処理区

ストロー法-遠沈前処理液としてHulsenberg 8液試用区

ii) 製造方法

ペレット法の製造過程は、試験Iの対照区、I区と同様である。

ストロー法の製造過程は採取から2次希釈までは、ペレット法と同様であるが、凍結は、川倉ら¹⁾の方法を参考にし、5ccのストローに精液を分注し行った。発泡スチロールの箱に液体窒素を入れ、液面より5cmの位置で蒸気により凍結し、20分放置後液体窒素に浸漬した。

希釈液、遠沈前処理液は、試験Iと同様である。

4. 融解液及び融解方法

(1) 融解液

TS4液の組成

Glucose	20.0 g
Sodium Citrate	6.0 g
Citric acid	0.5 g
CaCl ₂	0.06 g
MaCl ₂	0.9 g
KCl	1.2 g
NaCl	2.0 g
NaHCO ₃	0.5 g
Tris	0.6 g
Caffein	0.15 g
蒸留水	1 ℓ
アミカシン	75mg

(2) 融解方法

i) ペレット法

発泡スチロールの箱にペレット状の凍結精液を取り出し、3分放置後、50℃の融解液にて直ちに融解希釈する。(5倍希釈)

ii) ストロー方法

ストロー凍結精液を55℃の温浴槽に30秒放置し、融解した精液を37℃の融解液に加えて希釈する。(10倍希釈)

5. 融解後の検査方法

融解液で希釈した精液を37℃の恒温槽で保持し、融解直後、30分、60分及び120分について経時的に精子活力を検査し、生存指数で示した。

Ⅲ 結果及び考察

1. 遠沈前処理液の効果について検討した試験 I では、精子生存指数は、I 区 (遠沈前処理液としてHulsenberg 8液使用、以下Hu18区と略する。) が最も良く、融解後30分では41.8、次いでII区 (遠沈前処理液としてM18使用、以下M18区と略する。) が34.3、対照区 (遠沈前無処理、以下無処理区と略する。) が28.8の順であった。無処理区とHu18区、無処理区とM18区の間には有意差 ($P < 0.01$ or $P < 0.05$) が認められた。

Hulsenberg 8液は、西ドイツのWestendorfらが開発し、川倉ら¹⁾、北爪ら²⁾も、Hulsenberg 8液で前処理すると、無処理よりも活力が優れていたと報告している。今回の成績も同様な結果であった。

M18については、液状保存用 (5~6℃) 希釈液であるが、前処理液として使用した場合、Hulsenberg 8液には劣るものの無処理よりも優れていた。

表-1 融解後の精子生存指数

	融解直後	30分	60分	120分
対照区	22.8±4.9 ^a	28.8±7.9 ^a	27.3±7.7 ^a	23.2±7.8 ^a
I区	36.9±2.6 ^{bc}	41.8±3.9 ^b	40.6±4.2 ^{bc}	36.4±6.4 ^b
II区	30.9±6.5 ^{bd}	34.3±5.5 ^b	33.9±5.5 ^{bd}	28.4±7.5 ^b

a,b間cd間に有意差あり(P<0.01 or P<0.05)

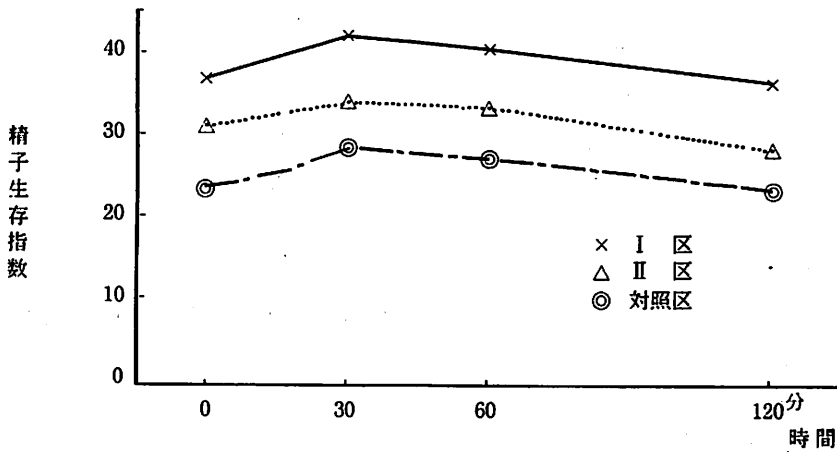


図-1 融解後の精子生存指数

2. ペレット法とストロー法の比較を検討した試験Ⅱでは、精子生存指数は、ペレット法-遠沈前処理液Hulsenberg 8液使用区(以下ペレットHu18と略する。)>ストロー法-遠沈前無処理区(以下ペレット無処理区と略する。)>ストロー法-遠沈前処理液Hulsenberg 8液使用区(以下ストローHul8区と略する。)<ストロー法-遠沈無処理区(以下ストロー無処理区と略する)の順に良く、融解後30分では、ペレットHu18区 42.1>ペレット無処理区 37.5>ストローHu18区 26.3>ストロー無処理区 21.5であった。

ペレット法で凍結した場合、試験Ⅰと同様な結果であり、Hulsenberg 8液を使用した方が精子生存指数は良い傾向にあった。また、ストロー法で凍結した場合を比較すると、ペレット法と同様な結果でありHulsenberg 8液の効果があるものと思われる。

ペレット法とストロー法を比較すると、ペレット法がストロー法より、精子生存指数は良い傾向にあった。この結果は、川倉ら¹⁾、副島ら³⁾の報告と同様であった。ストロー法は、ペレット法に比べて融解後の運動精子率は劣るが、受胎成績は逆に優れていた。⁴⁾という報告もあり、また、J.G.Aalbertら⁵⁾によると、ストロー法とペレット法の凍結精液を比べると、活力、受胎率の間には、差がなかったと報告している。今回は精子の活力のみを調べ授精は行っていないので、

ストロー法とペレット法の受胎成績については判断できなかったが、今後、受胎試験を行うことにより、どの方法が良いのか確認できると思われる。

表-2 融解後の精子生存指数

		融解直後	30分	60分	120分
ペレット法	無処理区	22.3±7.5	37.5±9.9	37.5±11.3 ^a	21.3±9.4
	Hul 8 区	33.4±10.7	42.1±7.6 ^a	42.1±7.6 ^b	17.6±9.1
ストロー法	無処理区	15.9±7.5	21.5±7.6 ^b	16.5±5.7 ^a	8.4±6.1
	Hul 8 区	22.7±7.2	26.3±9.9	21.3±7.8 ^a	9.8±6.7

a,b間に有意差あり(P<0.05)

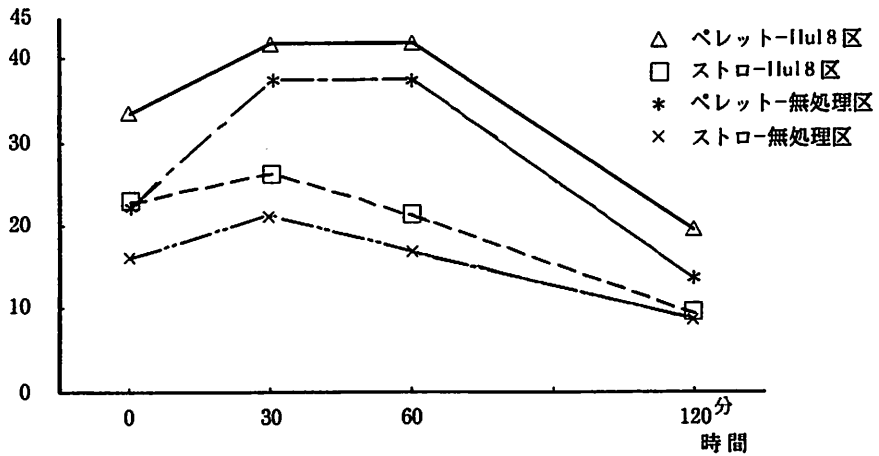


図-2 融解後の精子生存指数

IV 要 約

優良種雄豚を効率的に利用するため、豚精液の凍結保存について、今回は製造方法が精子活力に及ぼす影響について検討した。その概要は、つぎのとおりであった。

1. 遠沈前処理液として、Hulsenberg 8 液が凍結融解後の精子活力に有効であった。
2. ペレット法とストロー法について比較すると、ペレット法がストロー法より、精子生存指数は良い傾向にあった。

V 文 献

- 1) 川倉一彦他 2 名、ストロー法による豚精子の凍結保存、家畜人工授精研究会誌、6、2、61~63、1984
- 2) 北爪浩三他 3 名、豚凍結精液に関する研究、Hulsenberg 8 液の効果について、群馬農業研究、C 畜産 1、79~82、1984
- 3) 副島昭彦他 3 名、豚凍結精液におけるペレット凍結、アルミパック凍結およびストロー凍結の比較、家畜人工授精研究会誌、5、1、1~3、1983
- 4) 榊田博司、豚精子の凍結保存技術の進歩(3)、畜産の研究、38、3、13~19、1984
- 5) J.G.Aalbers, L.A.Johnson, J.H.M.Redmaker and J.H.A.teBrak, Motirity, acrosome morphorogy and fertilising capaicity of boar spermatozoa in pellets and straws, Fir st international Conference on deep freezing of boarsemen, 277~281、1985