

豚凍結精液の生産技術の改善試験

邨上 正幸、足立 広幸*¹

(*¹退職)

The Experiment of Frozen Boar Semen Improvement Technique Production

Masayuki MURAKAMI, Hiroyuki ADACHI

要 約

豚の凍結精液の受胎率及び産子数の向上を図るため、凍結方法並びに人工授精用カテーテルの検討を行ったところ、以下の成果が得られた。

- ①凍結方法の検討においては、精液を凍結用ストローに封入する際の温度を従来法の 5℃から 0℃に変更したところ、精子の運動性の向上、受胎率及び産子数が向上した。
- ②人工授精用カテーテルを子宮深部カテーテルに変更したところ、受胎率及び産子数の向上がみられた。
- ③農家実証試験においては、凍結精液による繁殖成績の向上がみられ、子宮深部カテーテルの実用性が確認された。

緒 言

現在、凍結精液による人工授精（以下 AI）は、牛においてはすでに技術が確立され、普及もなされているが、豚においては公的機関等での種豚生産や遺伝資源の保持等に限定され、農家等の生産現場での利用はほとんど行われていない。

豚凍結精液が生産現場で利用されていない要因として、凍結精液は受胎率や産子数が液状精液よりも低く、生産現場でのメリットが低いことが考えられる。

そこで、本研究では、凍結精液の作成方法の改良を図るとともに、人工授精用カテーテルの検討を行うことによる受胎率及び産子数の向上を目指した。

材料及び方法

1. 試験期間

平成 19 年 4 月～平成 24 年 3 月

2. 供試豚並びに精液採取法

当場で飼育しているデュロック種 7 頭、ランドレース種 2 頭、大ヨークシャー種 2 頭の種雄豚から精液を採取した。精液の採取は、ぎ牝台を用い、手掌圧迫法¹⁾により行った。

3. 精液希釈溶液並びに凍結溶液の組成

1) 精液希釈溶液：モテナ液

2) 凍結溶液

1 次希釈液：蒸留水 800ml にトレハロース 88g、ロミカシン 0.75g を添加後、卵黄を加え 1,000ml までメスアップし、遠心分離(3,000rpm、15 分間)を行い、上澄み液を 1 次希釈液とした。

2 次希釈液：1 次希釈液 957.2ml に、グリセリン 28ml、界面活性剤の Orvus Es Paste(OEP)14.8ml を混合したものを 2 次希釈液とした。

4. 凍結精液の作成方法

凍結精液の作成にあたっては、丹羽ら²⁾の手法に準じた。精液採取後、精子濃度が 1ml 当たり 1 億個となるように精液希釈溶液で希釈し、3 時間で 15℃まで冷却後、24 時間静置した。次に、15℃温度管理下のもと、50ml の遠心管に前述の精液を分注後、遠心分離(2,200rpm、10 分間)を行い、上澄みを除去して濃厚精液を作成した。これを、1ml 当たり 20 億個になるように凍結液

の1次希釈液を混合した後、従来法の5℃または0℃条件下の作業台上に静置し、1時間半で精液温度が5℃または0℃となるよう冷却した。冷却された精液と同温度の凍結液の2次希釈液を、1ml当たり10億個となるように添加し、5mlの凍結精液用ストローに5ml注入後、プログラムフリーザーに投入した。プログラムフリーザーで凍結後、液体窒素で保存した。

5. 凍結精液の解凍方法

液体窒素内にある凍結精液用ストローを保存容器から取り出し、37℃のウォーターストックに投入し、50秒間浸漬し融解した。これを37℃に暖めた45mlの精液希釈溶液と混合し、精子の活力検査並びに交配試験に供した。

6. 精子活力検査

精子の活力判定には精子生存指数を用いた。検査方法は、融解した凍結精液を精液希釈溶液と混合後、精液性状検査板に0.05ml滴下し、カバーガラスで滴下した精液を覆った後、37℃に温度設定した顕微鏡用加温板に静置し、30分後顕微鏡で測定した。

7. 2次希釈液混合温度の変更試験

5℃条件下または0℃条件下で凍結溶液の2次希釈液と混合した凍結精液の精子活力検査を行った。

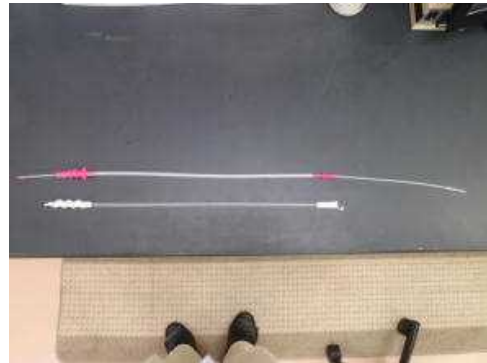
8. 交配試験1(2次希釈液混合温度の変更)

5℃条件下または0℃条件下で凍結溶液の2次希釈液と混合した凍結精液を、当場で飼育している種雌豚へAIを行い、繁殖成績を調査した。凍結精液用ストローは、AI1回当たり2本を90mlの希釈液と混合して使用し、発情開始日(離乳後5日目)から終了日(離乳後6~7日目)まで、毎日1回ずつAIを行った。

9. 交配試験2(子宮深部カテーテルの検討)

0℃条件下で凍結溶液の2次希釈液と混合した凍結精液を、当場で飼育している種雌豚へ、精液注入用カテーテルを変更したAIを行い、繁殖成績を調査した。精液注入用カテーテルは、一般的に使用されている子宮頸管に注入するもの(商品名:たねつけ棒、ミニチューブ社製)を対照区とし、試験区である子宮深部カテーテルとしてプラスチック内管式(商品名:ユニックカテーテル、フロンティアインターナショナル

社製)を使用した(写真1)。凍結精液用ストローは、AI1回当たり2本を90mlの希釈液と混合して使用し、発情開始日(離乳後5日目)から終了日(離乳後6~7日目)まで、毎日1回ずつ行った。



(写真1) 精液注入用カテーテル
上: 子宮深部カテーテル
下: 一般的なカテーテル

10. 農家実証試験

0℃条件下で凍結溶液の2次希釈液と混合した凍結精液を、液体窒素内で保存した状態のまま農家まで輸送し、農家の農場内で解凍後、希釈液と混合し、農家または研究員がAIを行った。

種雌豚の発情確認は農家が最初に行った後、AIの前にAI担当者が再度確認し、発情があると認められた種雌豚にAIを行った。凍結精液用ストローは、AI1回当たり2本を90mlの希釈液と混合して使用し、発情開始日(離乳後5日目)から終了日(離乳後6日目)まで、毎日1回ずつ行った。

結 果

1. 2次希釈液混合温度の変更試験

凍結溶液の2次希釈液と混合する際の温度変更による凍結精液の精子生存指数は、5℃条件下では 47.0 ± 11.6 だったが、0℃条件下では 53.0 ± 10.1 であり、0℃条件下での精子生存指数のほうが高かった。

2. 交配試験1(2次希釈液混合温度の変更)

交配試験の結果を表1に示す。2次希釈液との混合温度が5℃の場合、受胎率は73.7%、産子数は8.5頭であったが、0℃の場合では受胎率が89.5%、産子数8.6頭であり、0℃のほうがともに成績は良好であった。

表1 2次希釈液混合温度変更・交配試験成績

区分	対照区 (5℃条件下)	試験区 (0℃条件下)
試験(交配)期間	H19年11月～H21年5月	
交配頭数(頭)	19	19
受胎頭数(頭)	14	17
受胎率(%)	73.7%	89.5%
平均産子数(頭)	8.5	8.6

3. 交配試験2(子宮深部カテーテルの検討)

子宮深部カテーテルによる交配試験の結果を表2に示す。一般的なカテーテルの場合、受胎率は69.2%、産子数7.0頭であったが、子宮深部カテーテルは受胎率76.9%、産子数9.5頭であり、子宮深部カテーテルのほうが成績は良かった。

表2 子宮深部カテーテル検討・交配試験成績

区分	対照区 (一般的なカテーテル)	試験区 (子宮深部カテーテル)
試験(交配)期間	H22年11月～H23年1月	
交配頭数(頭)	13	13
受胎頭数(頭)	9	10
受胎率(%)	69.2%	76.9%
平均産子数(頭)	7.0	9.5

4. 農家実証試験

農家実証試験の結果を表3に示す。農家Aは、農家がAIを担当し、一般的なカテーテルで交配を行ったところ、受胎率50.0%、平均産子数4.5頭であった。農家Bでは、研究員がAIを担当し、子宮深部カテーテルで交配を行ったところ、受胎率66.7%、平均産子数12.6頭となり、農家Bのほうが良好な成績を収めることができた。

表3 農家実証試験・試験結果

区分	農家A	農家B
融解～交配担当者	農家主体	研究員
使用カテーテル	一般的なカテーテル	子宮深部カテーテル
試験期間	H22年1月～4月	H23年6月～8月
交配頭数(頭)	4	6
受胎頭数(頭)	2	4
受胎率(%)	50.0%	66.7%
平均産子数(頭)	4.5	12.6

考察及び今後の課題

今回の試験では、まず凍結精液の作成手法に組み込まれている2次希釈液との混合時の温度に着目した。2次希釈液には耐凍剤であるグリセリンが含まれており、精子を凍結するには必要不可欠な物質であるが、一方で、耐凍剤は豚精子に対する毒性を有している⁴⁾ことから、毒性を緩和する手法として混合温度の低温化を試みた。

その結果、0℃条件下での混合が豚凍結精子の活性能力を保持するうえで重要である事が分かり、受胎率及び産子数の向上も確認された。門脇ら³⁾は、豚凍結精液の融解後の精子生存率が高いと受胎率並びに産子数が改善される可能性があるとして報告しており、当試験においても同様の結果が示された。

さらに、豚凍結精液の受胎率や産子数の改善を図るため、子宮深部カテーテルによる人工授精を行った。その結果、受胎率並びに産子数の向上がみられたことで、豚凍結精液の農家サイドでの利用へ方向性を指し示すことができた。

しかし、農家での利用には、使用カテーテルの違いはあるものの、実証試験の結果からも明らかのように、農家が主体となって行った結果は良好とはいえない。これは、農家自身が凍結精液の解凍に不慣れであった事も考えられるが、解凍時の手法に課題があると思われるため、農家への普及を目指すには、今後手技の簡略化を検討する必要がある。

参考文献

- 1) 加藤浩、星修三、西川義正編：新家畜繁殖講座Ⅱ、1973
- 2) 丹羽太左右衛門監修、日本家畜人工授精師協会発行：豚凍結精液利用技術マニュアル、1989
- 3) 門脇宏、鈴木啓一、日野正浩：ブタ凍結精液の融解後精子生存率が受胎率及び胎子数に及ぼす影響、日豚会誌、38、20-24、2001
- 4) E. S. E. HAFEZ 編、西川義正訳：家畜・家禽繁殖学増訂改版、1970