

人工授精技術向上試験-豚精液の保存及び輸送技術向上試験-

須永静二，前田育子，坂代江，相馬由和

Experiment for improvement of Artificial Insemination Technique of Swine
-Experiment for improvement of Preservation and Transportation Technique of Boar Liquid Semen-

Seiji SUNAGA, Ikuko MAEDA, Norie SAKA, Yoshikazu SOMA

要 約

豚の液状精液の保存温度は従来から 15℃が最適とされているが、どこの農家にもある家庭用冷蔵庫(5℃保存)で、高い精子活力のまま 10 日間保持できることを目的とする。

平成 14 年度は、豚の人工授精に対する養豚農家の意識調査を実施するとともに、保存精液、保存溶液および精子濃度等について検討した。

本年度は、保存温度である 5℃に降下するまでに要する最適な温度降下時間と、高い精子活力を保持する添加剤について検討した。その結果、室温から 5℃までに 38 時間を要する温度降下時間が最も優れ、精子活力+++は保存 7 日目で 70.0%，10 日目で 60.0%を示し、15℃保存の場合と比較して高い値であった。さらに、抗酸化剤 BHT の添加により、保存 7 日目と保存 10 日目の精子活力+++がそれぞれ 75.0%および 68.3%となり、無添加の場合と比較して有意に高くなった(P<0.05)。以上のことから、豚精液が家庭用冷蔵庫で 10 日間保存できる技術が確立された。今後は、受胎率や産子数を確認する。

キーワード：人工授精，精液保存

緒 言

我が国における豚の人工授精は、1938 年に研究が始まり、その後農家への普及が図られてきた。しかし、その普及は大きな進展が見られず、多い年(1965 年)でも約 11 万頭、30 年後(1995 年)でも約 8 万頭に過ぎず、1995 年の豚人工授精の普及率はわずか 5.5%である¹⁾。2001 年の全国調査では、自然交配と人工授精を併用する農家も含めて、その実施率は 22.0%であった²⁾。

人工授精は、種雄豚の高度利用、種豚改良の促進、遺伝能力の早期判定、自然交配の不可能な種豚への応用、精液の遠距離輸送、種雄豚の飼養に要する経費の節減及び伝染性疾病の予防等、多くの利点がある。その反面、自然交配と比較して受胎率が低い、産子数が少ない、精液採取方法及び手技が煩雑である等の欠点もいくつか挙げられる。

とくに受胎率の低下や産子数の少なさ等、繁殖成績の低下は、養豚経営に大きな影響を及ぼすため普及する際の最大の障壁となっている。

そこで、豚の人工授精を普及向上させるため、受胎率等の繁殖成績が低下せず、農家が利用しやすい精液を製造するとともに、効果的な輸送方法を開発し、システム化を検討した。

材料および方法

1 供試精液

精液は、当所飼養のランドレス種 4 頭および大ヨークシャー種 3 頭から手圧法により採取した。

2 精液の希釈

精液はあらかじめ濃厚部と精漿部を分けて採取し、保存精液が最終的に保存溶液で 3 倍希釈となるよう調整した。保存溶液は SG1 溶液 (SGI 社)、保存精液の精子数は 2 億/m l，総量は 50m l とした。

3 温度降下時間

①P-1 (室温から 10℃まで 8 時間、10℃から 5℃まで 16 時間、合計 24 時間)、②P-2 (室温から 10℃まで 14 時間、10℃から 5℃まで 12 時間、合計 26

考 察

時間), ③P-3 (室温から 10℃まで 20 時間, 10℃から 5℃まで 6 時間, 合計 26 時間), ④P-4 (室温から 10℃まで 16 時間, 10℃から 5℃まで 22 時間, 合計 38 時間) の 4 パターンの温度降下時間 (図 1) を設定し, 5℃降下後, 10 日間の精子活力を観察した。温度降下はプログラムフリーザーを用いて行った。

4 添加剤

3 で求められた最適温度降下時間を用いて, ①メチルスパーリン(MH) (最終濃度 0.1mM, 0.2mM, 0.4mM), ②ブチルヒドロキソールエン(BHT) (最終濃度 0.025mM, 0.05mM, 0.1mM, 0.2mM), ③L-システイン(最終濃度 0.5mM, 1mM, 2mM, 5mM) を, 保存溶液に添加後, 10 日間の精子活力を観察した。BHT の濃度調整は Bamba ら³⁾の方法に準じ, その他の添加剤についても同様に行った。

結 果

1 温度降下時間 (表 1)

P-4 の温度降下パターンでは, 保存 7 日目の精子活力+++の占める割合は 70.0%を示し, 保存 10 日目では 60.0%を示した。15℃保存と比較した場合, 7 日目で同じ値を示し, 10 日目では有意差はなかったもののより高い値を示した(図 2, c-d 間, $P=0.052$, Mann-Whitney's U Test)。P-2 のパターンでは保存 10 日目が 52.0%で, 15℃保存よりもやや高い精子活力を示したが, 7 日目の精子活力は 50.0%で, 15℃保存と比較した場合有意に低かった(図 1, a-b 間, $P<0.05$)。P-1 および P-3 のパターンでは, 保存期間のすべてにおいて 15℃保存の場合よりも低い精子活力を示した。

2 添加剤

①MH の添加(表 2) : すべての濃度で, 全保存期間において精子活力+++の占める割合が, 無添加の場合よりも低い値を示した。0.1mM と 0.2mM 濃度では, 保存 7 日目及び保存 10 日目が, 無添加よりも有意に低かった(図 2, a-b 間, c-d 間, $p<0.05$)。

②BHT の添加(表 3) : 0.025mM および 0.05mM の濃度では, 全保存期間において精子活力+++の占める割合が無添加の場合よりも高い値を示した。とくに, 0.05mM 濃度では保存 7 日目と保存 10 日目の精子活力+++が, それぞれ 75.0% および 68.3%で, どちらも無添加よりも有意に高かった(図 3, a-b 間, c-d 間, $P<0.05$)。

③L-システインの添加(表 4) : 5mM 濃度を除くすべての濃度で, 全保存期間において, 無添加の場合と同様の精子活力を示した。しかし, 1mM 濃度では, 保存 7 日目以降の精子活力+++の占める割合が, 無添加の場合と同等かやや高い傾向を示した。

豚の液状精液の保存温度は従来から 15℃が最適とされている⁴⁾。しかし, この温度を一定に保つには特別な機材が必要となるので養豚農家に新たな負担となる。そこで, 精液の保存温度を 5℃にまで下げられれば, 家庭用冷蔵庫が利用でき保存は容易となる。

当所では, 平成 14 年度から豚の人工授精技術向上試験の一環として液状精液の低温保存に取り組んでいる。初年度は, おもに保存精液および保存溶液等について検討した。その結果, 保存に最適な精液の採取方法, 精子数, 希釈方法, 保存溶液の知見が得られた⁵⁾。

本年度は, これらの成績をもとに 5℃保存精液に最適な温度降下時間を求め, さらに保存性を高めるための添加剤について検討した。

温度降下時間では, 保存温度 5℃までを, 室温から 10℃までと 10℃から 5℃までの 2 つの温度帯に分け, それぞれの降下時間について 4 つパターンで検討した。

各パターンのうち, 5℃到達時間がほぼ同じ P-1 と P-2 を比較した場合, P-1 の方が 10 日後の精子活力が低い値を示したのは, 10℃到達時間が短かったためと考えられる。しかし, P-3 は 4 パターンの中で 10℃到達時間が一番長かったにもかかわらず, 10 日後の精子活力が最も低い値を示している。これは 10℃から 5℃までの降下時間が 6 時間と最短であったためと考えられる。このことから, 液状精液の温度降下は, 2 つの温度帯にかかわらず, 一様に緩慢に温度降下させる必要があることが分かった。液状精液の温度降下時間について, 吉田ら⁶⁾は 20 時間以上必要としているが, どちらの温度帯でも緩慢に温度降下させた P-2 と P-4 を比較すると, P-2 の 26 時間より P-4 の 38 時間の方が成績は良く, 15℃保存と同等かそれ以上の成績であったことなどから, P-4 が最適な温度降下パターンであると考えられた。

近年, 豚の液状精液保存における活性酸素の影響が注目されている⁷⁾⁸⁾。活性酸素は精子自身からも生成され, 膜の機能低下や運動性および代謝機能の低下など不可逆的な損傷を与えている。これに対し, 精子には活性酸素に対する抗酸化作用を示す酵素類が含まれ, 活性酸素から精子自身を守っているが, 活性酸素はこの酵素類の活性も低下させている。従って, これら活性酸素の作用を抑制することにより, 精子活力の低下を抑えることが出来ると考えられている⁷⁾⁸⁾⁹⁾。そこで, 本試験では次の 3 種類の抗酸化剤について検討した。

MHはポリフェノールの一種で、可溶性ビタミンPとして、従来から使われている保存溶液 M-18 にも含まれている。本試験では、すべて濃度で、全保存期間中において無添加の場合よりも低い精子活力を示した。従って、MHはメチナ溶液を使った5℃保存には不適と考えられた。

BHTは豚精子細胞膜に関与している抗酸化剤として、精子の代謝機能低下を抑制する働きが報告されている¹⁰⁾。Bambaら³⁾は、0.1mM濃度で5℃、7日間保存時の精子運動率、頭帽正常率および体外受精率がいずれも高くなったと報告している。本試験では、0.05mM濃度で7日目と10日目の精子活力が無添加の場合と比較して有意に高くなり、供試した3つの抗酸化剤の中で最も優れた成績であった。しかし、0.1mMでは保存1日目から保存4日目の精子活力が有意に低く、この濃度での添加は不適であると考えられた。BHTの溶解方法はBambaら³⁾に準じたが、そのときの保存溶液はBTS溶液を使っており、本試験で用いたメチナ溶液との違いによるものかもしれない。

精子を低温におくと受精能獲得様機能変化が誘起され、そのため自発的な先体反応が起こり、結果的に精子の生存性を短縮させてしまうことが知られている。舟橋ら¹¹⁾は、メチナ溶液にシステインを添加することによりそれらの作用を抑制することが出来ると報告している。本試験では、舟橋ら¹¹⁾が報告した5mMの添加では7日目の精子活力は無添加の場合よりも有意に低かったが、1mMで7日目以降やや高い傾向にあった。しかし、それでも統計的に有意な上昇が見られたわけではなく、システインを最適な添加剤とは考え難い。しかし、先に述べた低温保存における精子の自発的機能変化を抑制するという意味では、他の抗酸化剤との併用が効果的と思われるので、今後、BHTとシステインの2剤添加も検討する。

本年度の成績から、最適温度降下時間およびメチナ溶液に適した添加剤の知見が得られた。次年度は、今までに得られた試験室内の成績をもとに実際に

製造し、5℃で保存した精液の受胎率や産子数を確認する。養豚農家における実証試験では、低温宅配を利用した輸送試験もあわせて行う。

引用文献

- 1) 社団法人日本家畜人工授精師協会 (2000). 家畜人工授精講習会テキスト. 家畜人工授精編
- 2) 社団法人全国養豚協会 (2001). 養豚基礎調査全国集計結果.
- 3) Bamba, K. et al (1992). Effects of treatment with Butylated Hydroxytoluene on the susceptibility of boar spermatozoa to cold stress and dilution. *J. Reprod. Fert.*, 95: 69-77
- 4) 曾根 勝 (2003). 人工授精による繁殖成績向上のためのノウハウ. 畜産の研究, 57: 81-86
- 5) 須永静二ら (2003). 人工授精技術向上試験. 茨城畜研報, 35: 201-204
- 6) 吉田真二ら (1999). 豚液状精液の再保存温度の検討. 群馬畜試研報, 6: 31-34
- 7) 田内静花ら (1999). ブタ精漿中のSOD様活性および保存液中へのSODの添加が精子の運動性に及ぼす影響. 日豚会誌, 36: 42-46
- 8) 中務 胞ら (2000). 硫酸鉄とアスコルビン酸によって脂質過酸化誘起されたブタ精子の15℃液状保存後の精子生存指数. 日豚会誌, 37: 16-21
- 9) Maxwell, WM. et al (1996). Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reprod. Fertil. Dev.*, 8: 1013-1020
- 10) Bamba, K. et al (1988). Further studies on rapid dilution and warming of boar semen. *J. Reprod. Fert.*, 82: 509-518
- 11) 舟橋ら (2003). 10℃保存された豚精子の体外受精能と人工授精の成績. 豚の繁殖衛生セミナー通信, 30: 7-12

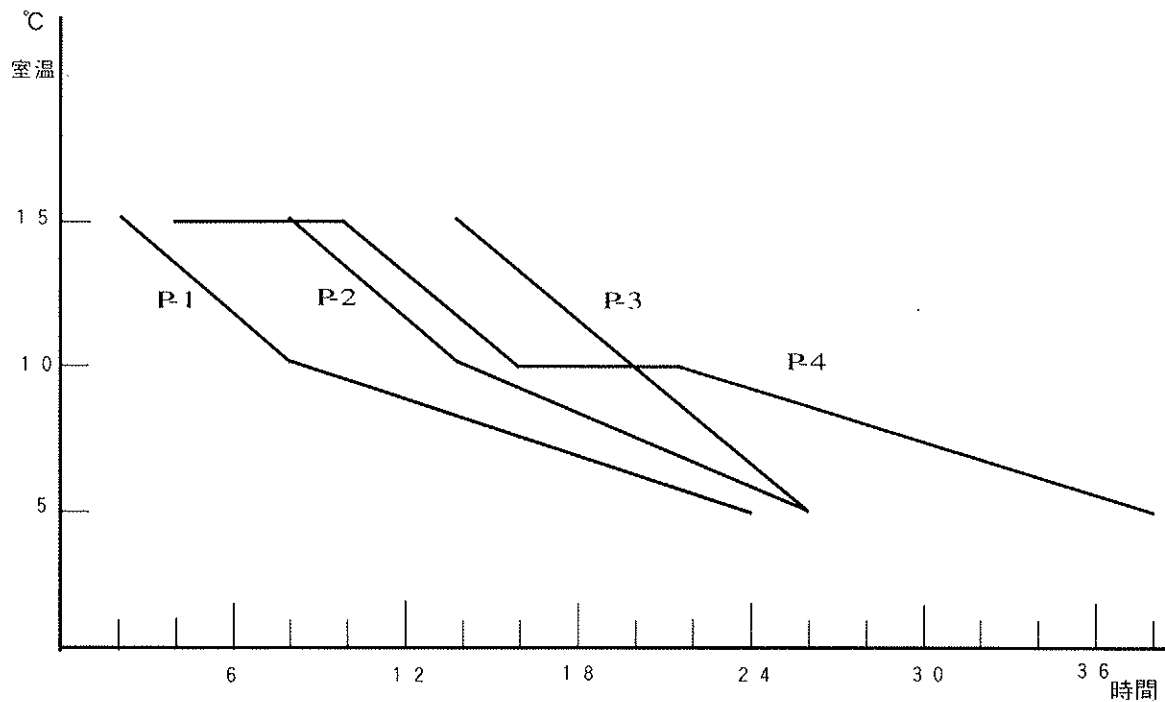


図1 精液保存温度 5°C までの温度降下時間

表1 温度降下パターンによる精子活力+++の占める割合

温度降下パターン	採精当日	保存1日	2日	3日	4日	5日	6日	7日	8日	9日	10日
P-4(n=19)	95.0%	90.0	87.5	80.0	78.3	74.2	70.0	70.0	60.0	60.0	c 60.0
P-2(n=6)	95.0	90.0	80.0	75.0	68.3	66.7	63.3	a 50.0	50.0	55.0	52.0
P-3(n=3)	92.5	70.0	65.0	60.0	52.5	50.0	45.0	45.0	37.5	32.5	22.5
P-1(n=3)	95.0	55.0	60.0	57.5	55.0	52.5	50.0	50.0	50.0	40.0	35.0
15°C(n=29)	95.0	92.5	90.0	90.0	85.0	80.0	75.0	b 70.0	60.0	50.0	d 36.0
5°C(n=17)	95.0	20.0	10.0	10.0	10.0	5.0	10.0	5.0	5.0	5.0	5.0

* 数値は中央値。a-b間P<0.05, c-d間P=0.052, Mann-Whitney's U-test。

表2 対ルハスリン(MH)添加による精子活力+++の占める割合

MH濃度	採精当日	保存1日	2日	3日	4日	5日	6日	7日	8日	9日	10日
0.05mM(n=3)	90.0%	85.0	80.0	70.0	60.0	60.0	60.0	60.0	50.0	46.7	43.3
0.1mM(n=5)	95.0	80.0	70.0	55.0	40.0	50.0	45.0	a 40.0	30.0	26.7	c 23.3
0.2mM(n=6)	95.0	70.0	51.3	37.5	26.3	20.0	17.5	a 15.0	15.0	14.2	c 13.3
無添加(n=6)	95.0	90.0	90.0	80.0	75.0	75.0	72.5	b 70.0	70.0	70.0	d 65.0

* 数値は中央値。a-b間P<0.05, c-d間P<0.05, Mann-Whitney's U-test。

表3 ブルヒドキシトルエノ(BHT)添加による精子活力+++の占める割合

BHT濃度	採精当日	保存1日	2日	3日	4日	5日	6日	7日	8日	9日	10日
0.025mM(n=4)	95.0%	92.5	95.0	88.8	82.5	78.8	75.0	71.3	65.0	65.0	60.0
0.05mM(n=10)	95.0	95.0	90.0	87.1	81.7	80.0	80.0	c 75.0	70.0	70.0	e 68.3
0.1mM(n=7)	95.0	a 80.0	75.0	70.0	70.0	70.0	70.0	70.0	70.0	70.0	70.0
0.2mM(n=5)	95.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
無添加(n=11)	95.0	b 91.7	82.5	77.5	70.0	67.5	65.0	d 62.5	60.0	55.0	f 50.0

* 数値は中央値。a-b, c-d, e-f間, $P < 0.05$, Mann-Whitney's U-test。

表4 L-システイン添加による精子活力+++の占める割合

L-システイン濃度	採精当日	保存1日	2日	3日	4日	5日	6日	7日	8日	9日	10日
0.5mM(n=7)	95.0%	87.5	80.0	75.0	70.0	60.0	60.0	60.0	60.0	50.0	40.0
1mM(n=9)	95.0	90.0	80.0	75.0	70.0	70.0	65.0	70.0	60.0	60.0	60.0
2mM(n=8)	95.0	82.5	80.0	72.5	70.0	70.0	65.0	60.0	55.0	55.0	60.0
5mM(n=3)	95.0	70.0	60.0	45.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	12.5	10.0
無添加(n=10)	95.0	90.0	90.0	80.0	73.8	71.3	70.0	70.0	60.0	57.5	50.0

* 数値は中央値