

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，海老沢重雄，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, Sigeo EBISAWA, Yoshikazu SOMA

要 約

わが国の豚の人工授精(以下、AI)の普及率はあまり進んでいない。県内の養豚農家に対し意識調査を実施したところ、その原因として受胎率の低さ及び手技の煩雑さ等が挙げられた。しかし、実施率は48%と比較的高く、AIそのものに対しては高い関心を持っていることが分かった。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が、この保存温度を5℃にすれば、農家は家庭用冷蔵庫が利用でき、精液の保存は容易となる。本試験では、精子活力+++70%以上を10日間保持し、かつ受胎率の低下が少ない低温保存精液を製造し、豚のAIの普及向上に資するものとする。

試験成績から保存精液の5℃までの最適温度降下時間を38時間とし、さらに、抗酸化剤ブチルヒドロキソトルエン(BHT)の添加により、精子活力+++は保存7日目と保存10日目で、それぞれ75.0%及び68.3%となった。これらの方法で製造した低温保存精液を、当所に繋留する種雌豚17頭にAIし、受胎率と平均産子数を調査したところ、保存10日目までの精液で、それぞれ91.7%、10.6頭であった。さらに、実証試験として3戸の農家に低温宅配し、合計11頭の種雌豚にAIを実施したところ、受胎率は90.9%、平均産子数は9.2頭であった。

キーワード：人工授精，精液保存

緒 言

わ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、輸送方法を検討した。

材料および方法

1 農家意識調査

茨城県内の豚人工授精の実施状況を知るため、県内養豚農家92戸に、郵送によるアンケート調査を実施した。

2 低温保存精液の製造

(1)供試精液

精液は、当所飼養のランドレース(L)種4頭および大ヨークシャー(W)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、精子濃度が 2 億/ml、かつ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。保存溶液はモデナ溶液 (SGI 社)、保存精液の総量は 50ml とした。

(3) 温度降下時間の設定

P-1 から P-4 までの 4 パターンの温度降下時間 (図 1) を以下のとおり設定し、5°C 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 (FHK 社) を用いて行った。

- P-1: 室温から 10°C まで 8 時間, 10°C から 5°C まで 16 時間, 合計 24 時間
- P-2: 室温から 10°C まで 14 時間, 10°C から 5°C まで 12 時間, 合計 26 時間
- P-3: 室温から 10°C まで 20 時間, 10°C から 5°C まで 6 時間, 合計 26 時間
- P-4: 室温から 10°C まで 16 時間, 10°C から 5°C まで 22 時間, 合計 38 時間

(4) 添加剤の種類と濃度

①メチルヘスペリジン (MH: 最終濃度 0.1mM, 0.2mM, 0.4mM), ②ブチルヒドロキシトルエン (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) の 3 剤について検討した。添加剤を精液調整時に加え、最適温度降下時間を用いて温度降下し、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。

3 受胎率の確認

(1) 供試精液

本試験の方法で製造した低温精液は、AI に供試するまで冷蔵庫 (5°C) に保存した。

(2) 種雌豚

授精雌豚は当所に繋留している L 種 10 頭および W 種 7 頭の合計 17 頭を用いた。

(3) 人工授精

AI は常法に従い、1 発情 (自然発情) で 2 回実施。1 回目と 2 回目の間隔は 12 時間以上あけた。

4 農家実証試験

(1) 試験農家および供試精液

試験農家は 3 戸。延べ 11 頭分 (L 種 8, W 種 3) の精液を 7 回に分けて輸送した。

(2) 輸送方法の検討

農家への精液の輸送は温度設定可能な宅配便を利用した。

精液は、試験方法に従い発送前に 5°C に温度を

下げた場合と、添加剤等調整後、輸送中の 2 日間に 5°C に温度降下するよう保温材 (二重紙おむつ) を施した場合とで比較した。

(3) 人工授精

試験農家は、精液到着後直ちに家庭用冷蔵庫に入れ、AI に供試するまで保存した。AI は当所の方法に従うよう指示した。

結 果

1 農家意識調査

回収率は 55.4% (51 戸)。調査結果から、人工授精を実施している養豚農家は 48% であった (図 2)。実施していない養豚農家のうち、実施しない理由が多かったのは「受胎率が低い」(42%)、手間がかかる (29%)、経験がない (19%) であった (図 3)。

2 温度降下時間の設定 (図 4)

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°C 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 (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°C 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°C 保存と比較した場合有意に低かった (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°C 保存の場合よりも低い精子活力を示した。

3 添加剤の種類と濃度

(1) MH (図 5): 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 (a-b 間, c-d 間; $p<0.05$)。

(2) BHT (図 6): 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 (a-b 間, c-d 間; $P<0.05$)。

(3) L-システイン (図 7): 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。

4 当所における受胎試験（表 1）

採精日を 0 日として保存 10 日目までの精液による AI 実施頭数は合計 12 頭、そのうち受胎した頭数は 11 頭で受胎率は 91.7%、平均産子数は 9.6 頭であった。

また、保存 12 日以降の精液については合計 5 頭の雌豚に AI を実施したが、受胎は認められなかった。

AI に供試した保存精液の平均精子活力+++は 10 日目までのものが 73.3%、12 日目以降が 54.0%であった。

5 農家における実証試験（表 2）

試験農家 3 戸に送付した精液の平均保存日数は 8.5 日で、11 頭中 10 頭が受胎し受胎率は 90.9%、平均産子数は 9.2 頭であった。

輸送方法では、あらかじめ温度を 5℃に降下させてから送付した場合と、輸送中に温度が降下するよう設定した場合とで比較したが、差は認められなかった。また、宅配業者による差も認められなかった。

考 察

豚の人工授精の実施率は、2001 年の全国調査では 22.0%であった¹⁾。今回調査した養豚農家のうち、その 48%が、毎回ではないが、実施したことがあると答えている。実施率は全国平均²⁾の 2 倍以上であり、今回調査した県内の養豚農家が人工授精に対し高い関心を持っていることが分かった。また、実施していない農家の理由は、「受胎率が低い」が多く、受胎率の低下が普及の障害になっていることが明確となった。

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。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が、一般に、豚の精液を低温化すると精子活力は下がり、受胎率が著しく下がってしまうことが知られている。ただでさえ受胎率の低下が AI 普及の障害になっているのに、利便性を良くしてもこれでは意味がない。本試験では、精子活力をあまり損なわず 10 日間保存でき、かつ受胎率の低下しない低温保存精液の製造を目標とした。

まず、最適な温度降下時間を設定するため、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⁹⁾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⁾⁹⁾。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⁾¹⁰⁾。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 はモデナ溶液を使った 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¹¹⁾。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、本試験で用いたモデ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¹²⁾は、モデナ溶液に L-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、システインが最適な添加剤とは考え難い。

本試験の方法で製造した低温保存精液の受胎率を知るために、まず、当所繋留の種雌豚で AI を実施した。10 日目までの保存精液では、受胎率は 91.7% であった。これは、7 日保存の精液で受胎しなかった 1 頭が認められたのみで、平均産子数も 9.6 頭とともに満足のいく成績であった。しかし、保存 9 日目以降の成績では、平均精子活力+++ はほとんど低下がないにもかかわらず、平均産子数は減少する傾向が見られた。

農家における実証試験では、当所での成績とほぼ同等の成績を示した。

試験では、精子活力をあまり損なわず 10 日間保存でき、かつ受胎率の低下しない低温保存精液の製造を目標とした。従来の研究でも液状精液の低温化は試みられているが、多くの報告が受胎率の確認あるいは農家での検証が不足している。本試験では、実際に養豚農家に使用してもらえ保存精液を製造することを目的としており、受胎率の確認および農家での実証等に重点をおいてきた。

試験成績から、本法により製造された低温保存精液は、10 日間保存で、精子活力、受胎率ともに良好な成績で、当初の目的は十分に達していると考えられた。

しかし、これらの技術を普及させるにあたっては、今回新たに明らかとなった、保存 9 日目以降の産子数減少の問題解決が必須である。15℃保存時の比較成績がなく明確ではないが、精液の低温化は精子の機能的変化をもたらすという報告⁷⁾⁸⁾¹²⁾を裏付けるものかもしれない。受胎率の低下もなく、活力では測れない精子の機能的変化。産子数低下の原因が、この精子の機能的変化によるものとするならば、その抑制には BHT のみの添加では不足であり、複数の抗酸化剤を組み合わせる等の検討が必要であると考えられる。

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. 茨城畜セ研報, 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). 10℃保存ブタ精子の運動性および受精能の変化. 日豚会誌, 36 : 36-41
- 8) 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
- 9) 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
- 10) Maxwell, WM. et al(1996). Liquid strage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reprod. Fert. Dev.*, 8 : 1013-1020
- 11) Bamba, K. et al(1988). Further studies on rapid dilution and warming of boar semen. *J. Reprod. Fert.*, 82 : 509-518
- 12) 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

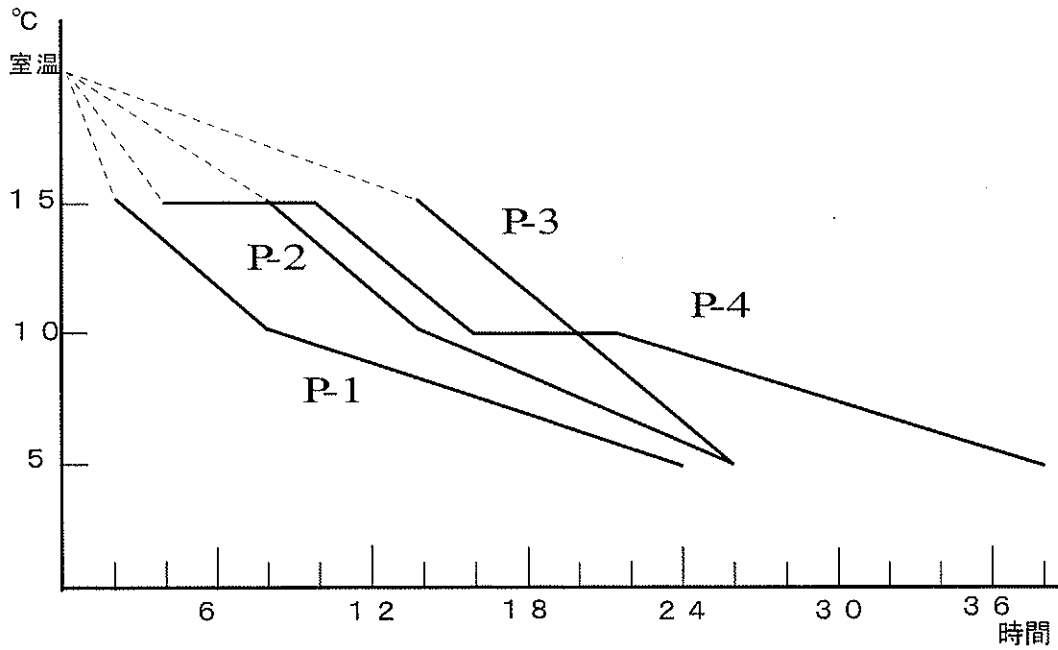


図1 精液保存温度 5°Cまでの降下パターン

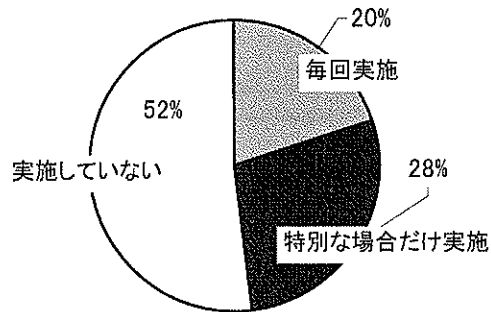


図2 豚の人工授精実施状況

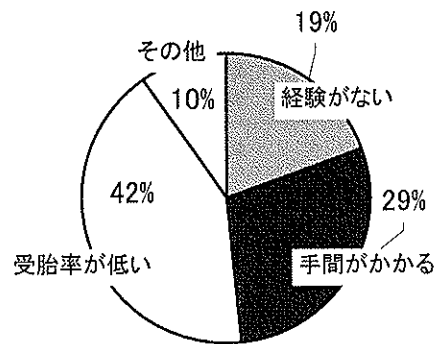


図3 人工授精を実施しない理由

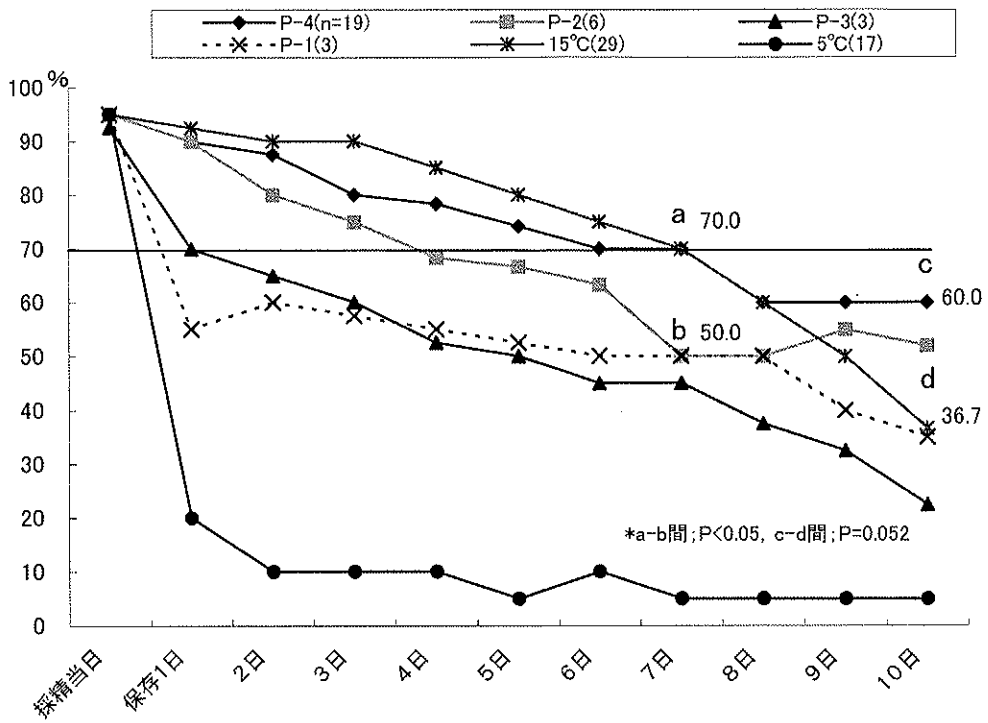


図4 温度降下パターン別の精子活力+++の占める割合

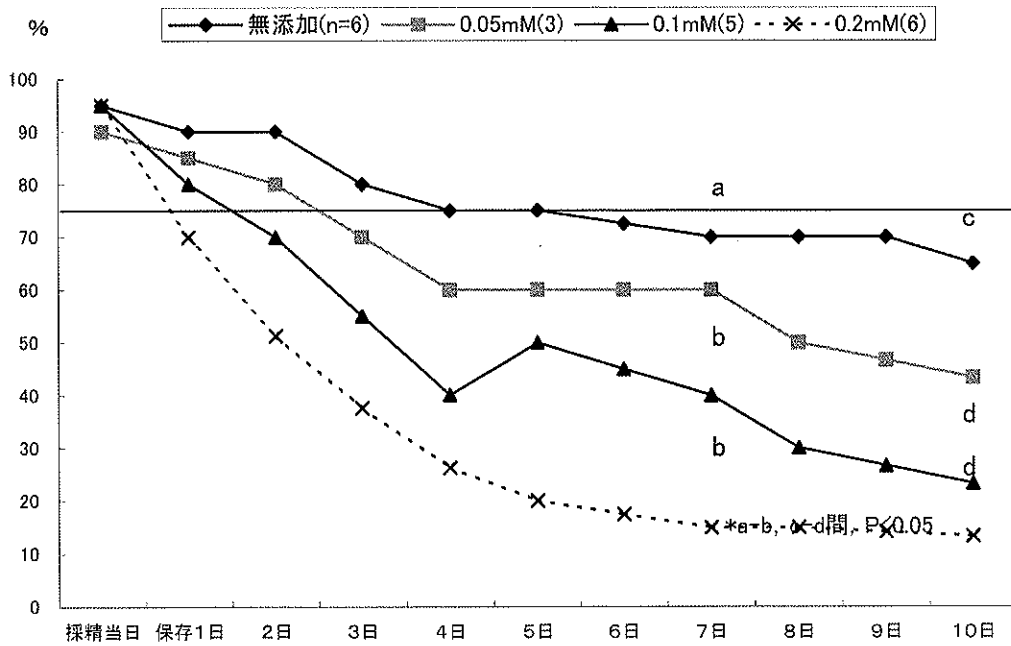


図5 メチルヘスペリジン (MH) 添加による精子活力+++の占める割合

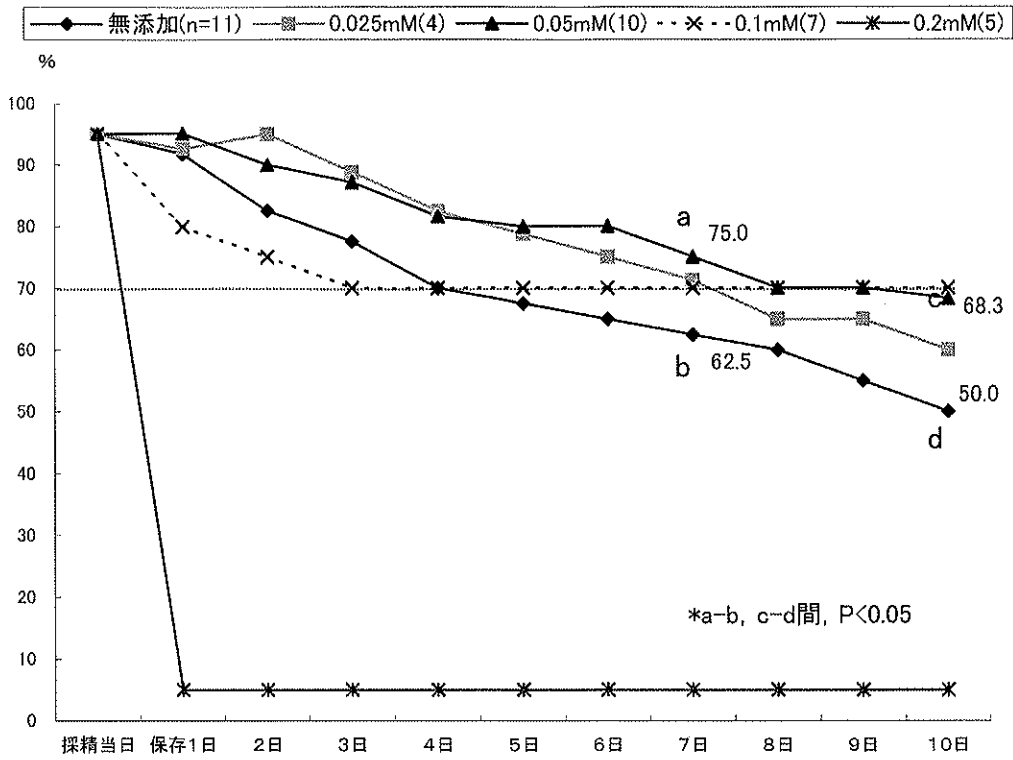


図6 プチルヒドロキシトルエン（BHT）添加による精子活力+++の占める割合

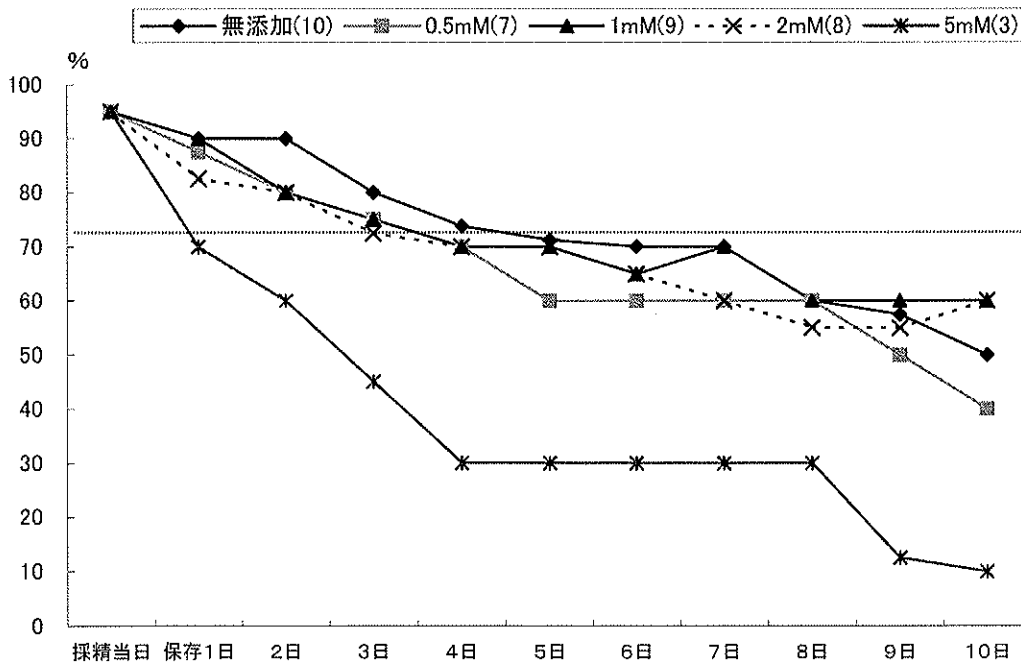


図7 L-システイン添加による精子活力+++の占める割合

表 1 当所における低温保存精液の受胎試験成績

保存日数*	授精頭数	受胎頭数	受胎率(%)	平均 産子数	平均 精子活力 (+++%)
7	4	3	75.0	10.0	77.5
8	2	2	100	11.0	70.0
9	5	5	100	9.4	72.0
10	1	1	100	7.0	70.0
12	2	0	0	-	60.0
13	2	0	0	-	45.0
14	1	0	0	-	60.0
10日目 までの成績	12	11	91.7	10.6±3.3**	73.3±8.9
12日目 以降の成績	5	0	0	-	54.0±13.4

*:採精日は0日, **:標準偏差

表 2 農家における実証試験成績

試験農家	授精頭数	受胎頭数	受胎率(%)	平均 産子数	平均 保存日数*
A	5	4	80.0	9.5±3.1	6.5±0.5**
B	3	3	100.0	11.7±1.2	8.0±0.0
C	3	3	100.0	11.7±5.5	10.0±3.6
合計	11	10	90.9	10.8±3.4	8.0±2.3

*:採精日は0日, **:標準偏差