

豚液状精液における簡易冷蔵保存技術

山口昇一郎・村上徹哉

生産現場における豚液状精液の保存方法は、10～20の中温域で行うことが一般的であるが、その場合高価な恒温器が必要である。そこで、モデナ液で希釈した液状精液を家庭用冷蔵庫(以下冷蔵庫)内で保存する実用的な保存技術について検討した。

試験1では、恒温器を用いた15保存区(対照区)と冷蔵庫を用いた5保存区(試験区)について検討した結果、保存3日目の精子活力は、それぞれ82.5%と73.8%であり試験区の活力低下が認められた。

試験2では、中温域で保存するために、容量1.2L魔法瓶内に20の温水と希釈精液が入った精液ボトルを入れて冷蔵庫内で保存した。24時間保存後の魔法瓶内温度は、ほぼ10であった。3日間保存後の精子活力は、15保存区と差は認められず、活力の低下は認められなかった。

以上のことから、希釈精液を20で保温した魔法瓶内に入れ、冷蔵庫内で保存することにより少なくとも3日間は、活力が低下することなく保存できることが明らかとなった。

[キーワード：豚液状精液，人工授精，精子活力，冷蔵保存，魔法瓶]

Simple method of cooled storage for liquid boar semen. YAMAGUCHI Shoichiro and Tetsuya MURAKAMI (Fukuoka Agricultural Research Center, Fukuoka 818-8549, Japan) Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent. 27: 65 - 69 (2008)

The preservation of liquid boar semen in field conditions is normally accomplished by storing the samples at an intermediate temperature range (10-20), but this requires an expensive incubator. As an alternative, we examined the practicality of preserving liquid semen diluted in Modena solution in a home-type refrigerator.

Experiment 1 compares the preservation of samples maintained at 15 in an incubator (control group) and at 5 in the refrigerator (examination group). Sperm motility after 3 days of storage was 82.5% and 73.8%, respectively. Although not significantly, the examination group was lower than the control group.

Experiment 2 compared samples packed in vacuum bottles (1.2L) filled with warm water (20) stored in the refrigerator to keep them at the preferred intermediate temperature range and maintained at 15 . The temperature in the vacuum bottle after 24h was approximately 10 . Sperm motility after 3 days of storage showed no significant differences between treatment groups.

These results suggested that liquid semen packed in vacuum bottles filled with warm water (20) and held in refrigerators could maintain sperm motility for at least 3 days without degradation.

[Keywords: liquid boar semen, artificial insemination, sperm motility, cooled storage, vacuum bottle]

緒言

最近、養豚経営における生産コストの6割前後を占める飼料費が高騰しているため、農家の経営を圧迫しており、生産コスト低減に向けた取り組みが緊急の課題となっている。生産コスト低減の一つの方法として、人工授精(AI)の導入が考えられ、種雄豚の飼養頭数の削減や暑熱期における受胎率の向上等が期待できる。

近年、AIに用いる注入器に画期的な進展があり、1頭の射出精液から雌豚200頭分(通常は6頭)にAIできる技術が報告された⁶⁾⁷⁾。現在福岡県内で約500頭前後の種雄豚が飼養されている²⁾が、この技術を用いれば計算上、福岡県内の子取り用雌豚約7000頭規模では2頭の種雄豚がいれば、肉豚生産が可能となるため、生産農家は発情誘起用の雄豚以外は種雄豚を飼養する必要がなくなる可能性がある。今後は、この技術の普及とともに、すでにAI普及率がほぼ100%の牛と同様、全国の中から飼料要求率や増体量等で選抜された高能力雄豚の精液を活用し、AIを実施することができれば、種雄豚飼養費削減の効果と合わせ、大幅な生産コスト低減に繋がる可能性がある。しかし、現在のAI普及率は、全国養豚協会の調査によると30%程度と伸び悩んでいるのが現状である。この要因として、

受胎率低下、技術的な不安および初期投資の必要性等があり、今後AI普及の技術開発はより一層重要になると考える。

豚液状精液の保存は、10～20の中温域(主流は15)で行うことが一般的であるため、通年行うためには、温度調整機能を持つ専用の恒温器が必要である。しかし、価格が高価なため、これからAIを試行しようとする農家には負担感が大きく、生産現場で実用可能な簡易保存方法の開発が要望されている。これまで、温度管理が容易な5前後(家庭用冷蔵庫内、以下冷蔵庫)の低温で保存する試み^{4,11)}が行われているが、精子活力への影響については結果が異なっており、十分な技術確立に至っていない。

そこで、専用の恒温器を用いることなく、簡易に豚液状精液を保存する技術の確立を目的として、試験1では、希釈精液を冷蔵庫内で保存し、冷蔵保存後の精子活力の影響について、試験2では、冷蔵庫内で中温域を維持するための手法として、希釈精液の輸送に一部用いられている日野らの方法³⁾を参考に、精液ボトルに入れた希釈精液を魔法瓶内で保存し、保存後の精子活力の影響について検討した。

材料および方法

* 連絡責任者(家畜部)

1 供試豚

供試豚は、大ヨークシャー種雄豚を用いた。試験1では2頭、試験2では、5頭を供試し、精液は、混合せずにそれぞれの雄1頭につき2～3回反復した。

2 精液調整

精液は、手圧法で採取を行い、採取後すぐに38 のモデナ液(第1表)で2倍希釈した。希釈精液は、活力が80+++以上かつ正常精子率が80%以上のものを試験供した。希釈後20分間室温に放置し、精子濃度0.8～1億精子/mlとなるようにモデナ液で最終希釈を行った。

第1表 希釈液(モデナ液)の組成

成分	配合量(1000ml 中)
グルコース	27.5g
クエン酸ナトリウム	6.9g
炭酸水素ナトリウム	1.0g
EDTA ₂ ナトリウム	2.4g
クエン酸	2.9g
トリスヒドロキシアミノメタン	5.7g
硫酸 アミカシン	100mg

3 精液保存方法

精液は、精液調整後50mlを精液ボトル(第2表)に入れ、試験1および2の対照区(15 保存区)では、15 の恒温器内に静置し、3日間保存した。また、1日1回沈澱精子を十分に攪拌させた。試験1では、緩慢に5 に降下させるため、冷蔵庫内に入る大きさの発泡スチロール(縦15cm、横25cm、高さ15cm)に38 のお湯を張り、その中に精液ボトルを投入し、蓋をして冷蔵庫内に静置した。24時間経過後、発泡スチロールから精液ボトルを取り出し、その後はそのまま冷蔵庫内に静置した。なお、対照区と同様1日1回精子を攪拌させ、3日間保存した。試験2では、1.2L魔法瓶(第2表)に精液ボトル4本と20 の水で満たし、冷蔵庫内に静置した。以後24時間ごとに20 の温水の入れ替えと沈澱した精子の攪拌を行った。なお、保存終了直後は、魔法瓶内が約10 となっているため、再度保存する場合には魔法瓶内の水温(20)が約1分間程度一定になるのを確認後に再保存を行った。

第2表 供試魔法瓶と精液ボトルの仕様



魔法瓶
外形寸法 幅 10cm
x 高さ28cm x 奥行 10cm
容量 1.2L
精液ボトル
外形寸法 幅 4cm
x 高さ14cm x 奥行 4cm
容量 80ml (ポリエチレン製)

4 精液検査方法

活力検査は、希釈精液を一部取り出し、38 の恒温槽で15分間加温した後、顕微鏡下で運動性+++を示す精子の割合を%で示し、試験1では、保存0および3日目、試験2では、保存0、1、2および3日目に実施した。

5 冷蔵庫内および魔法瓶内温度の調査(試験2)

冷蔵庫内の温度と24時間保存後の魔法瓶内の温度を5つの冷蔵庫を用いて、9月初旬～11月末にかけて調査を行った。冷蔵庫内の温度は、温度確認をする際の温度上昇を緩和するため水で濡らしたペーパータオルでアルコール式温度計の測定部分を巻き、庫内に静置した。計測場所は、冷蔵庫内の複数カ所で行った。また、冷蔵庫内及び魔法瓶内の経時的な温度変化も自記温度計(TANDD社製おんどり)で記録した。

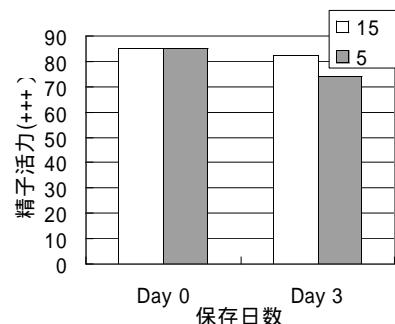
6 統計処理

精子活力の有意差検定は、活力(%)をアークサイン変換した後、t検定にて検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結果および考察

試験1：低温(5)保存が精子活力に及ぼす影響

低温保存後の精子活力の影響について第1図に示した。保存3日後の活力は、15 保存区では82.5%と良好な活力を示していたが、5 保存区の場合には73.8%となり、有意差は認められないものの15 保存区よりも活力の低下が認められた。吉田ら⁹⁾は、モデナ液を用いて希釈精液を緩慢に温度降下させた後に5 で保存すれば、保存3日間までは15 保存区との差は認められず、保存8日間目でもAIに必要な精子活力70%以上を維持できたことを報告しているが、本試験における5 保存区では、保科ら⁴⁾と同様3日間の保存で活力の低下が認められた。現場で利用する際に、精液採取時の活力が、70%未満の個体であった場合には、AI後不受胎となる可能性もあるため、本試験の結果からは、できる限り中温域で保存することが重要であると考えられる。Bambaら¹⁾は、希釈精液を5 で保存すると活力や精子頭部(先体)に悪影響があるが、抗酸化剤の一種で、食品の保存にも用いられるジブチルヒドロキシトルエン(BHT)を希釈精液内に添加するとその影響が改善されるという報告をしており、今後温度管理が容易な5 で保存するためには、



第1図 保存温度の違いによる精子活力

1) 15 区は、恒温器、5 区は家庭用冷蔵庫で保存した。
2) 雄2頭分のデータ。

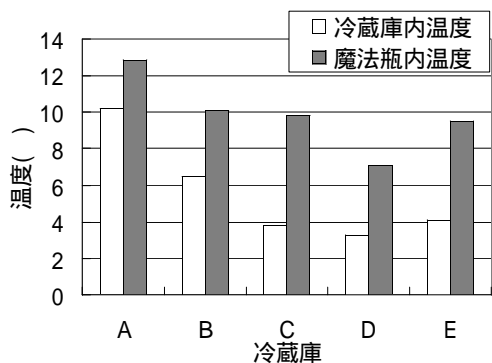
BHT等を新たに添加し、その影響を検討する必要があるものと考えられる。

試験2：魔法瓶を利用した中温保存が精子活力に及ぼす影響

各冷蔵庫の庫内温度と保存後の魔法瓶内温度を第2図に示した。冷蔵庫内温度は、各冷蔵庫とも大きなばらつきが認められたが、24時間保存後の魔法瓶内の平均温度は、冷蔵庫A：12.9℃、冷蔵庫B：10.1℃、冷蔵庫C：9.8℃、冷蔵庫D：7.1℃、冷蔵庫E：9.5℃であり、冷蔵庫Dを除いてほぼ10℃前後であった。また、経時的な温度変化は、第3図に示した。冷蔵庫内温度が24時間平均4.2℃の冷蔵庫Eで経時的に調査したところ、冷蔵庫内温度は、温度上昇と降下を繰り返していたが、魔法瓶内の温度は、徐々に温度が下がり、保存期間内では、20℃から8.8℃に推移していた。冷蔵庫3機種(A：最も温度が高い、D：最も温度が低い、E：中間)にそれぞれ魔法瓶を入れ、魔法瓶内で希釈精液を保存した結果を第4図～第6図に示した。3日間保存後の精子活力は、冷蔵庫Aでは、恒温器保存区vs試験区で、78%vs75%、冷蔵庫Dでは、78%vs77%、冷蔵庫Eでは、88%vs88%となり、恒温器保存区と試験区間の間に有意差は認められ

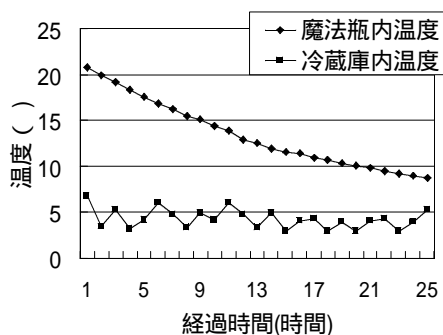
なかった。最も低い温度を示した冷蔵庫Dで保存しても、活力に影響は認められなかった。これは、試験1において、5℃で保存した場合には、保存3日目まで活力低下の影響は認められたのに対して、魔法瓶で保存した場合には、低温に曝されていた時間が極めて短時間で緩慢な温度変化だったため、影響が認められなかったものと推察された。

公文ら⁵⁾は、宅急便による輸送期間中の短期間保存法として2重の発泡スチロールと保冷剤を用いて18時間精子活力を維持できることを報告し、日野ら³⁾は、魔法瓶とクール宅急便を利用して精液輸送ができることを報告している。本試験では、これらの短期保存法を数日間の保存に応用できるかについて検討したところ、10～20℃内で、緩慢な温度変化であれば、一定温度を維持しなくても少なくとも3日間は精液を保存できることが明らかとなった。予備試験において、発泡スチロールを用いた場合には、24時間以内に冷蔵庫内と同温になったため、今回の試験では採用しなかったが、水の入れ替えを早めに行えば、十分利用可能と思われる。また、気温が20℃以下の場合には、冷蔵庫内に入れずに発泡スチロール内に入れておくことで、10～20℃を維持できると考える。



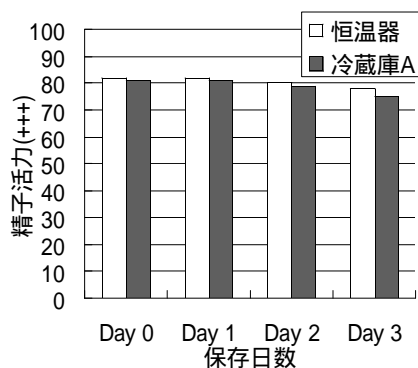
第2図 冷蔵庫内温度および24時間保存後の魔法瓶内温度

- 1) データは、それぞれ3回以上行った平均値。
- 2) 魔法瓶内温度は、魔法瓶内に20℃の温水と希釈精液を精液ボトルに入れ、冷蔵庫内で24時間保存後の温度を測定したもの。



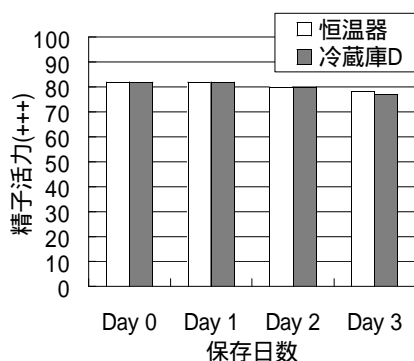
第3図 冷蔵庫内及び魔法瓶内の経時的な温度

- 1) 第3表の冷蔵庫Eを用いた。
- 2) 保存開始を0時間目として24時間計測。



第4図 魔法瓶内保存後の精子活力(冷蔵庫A)

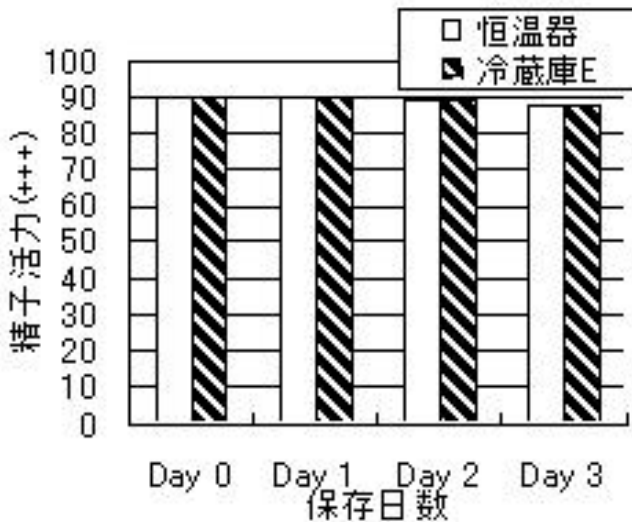
- 1) 雄2頭のデータ。



第5図 魔法瓶内保存後の精子活力(冷蔵庫D)

- 1) 雄3頭のデータ。

本試験の結果、専用の恒温器を用いることなく、冷蔵庫内に魔法瓶を入れ、その中で希釈精液を保存することにより少なくとも3日間は、保存可能であることが明らかとなった。本試験では、AIを試行しようとする農家や突発的に精液を保存する必要がある場合を想定して試験を実施したが、継続的に行う場合には、三浦ら⁸⁾の報告のように、冷蔵庫内に水槽とサーモスタット付き熱帯魚用ヒーターを入れ、水温を15℃に維持し精液を保存するという簡易法の採用も考えられる。今後は、実際生産現場で利用した場合の活力への影響や受胎性について検討する必要があるものと考えられる。



第6図 魔法瓶内保存後の精子活力(冷蔵庫 E)
1)雄 2頭のデータ。

引用文献

- 1) Bamba K, Cran DG(1992) Effects of treatment with butylated hydroxytoluene on the susceptibility of boar spermatozoa to cold stress and dilution, J Reprod Fertil, 95 ;69-77.
- 2) 福岡県農政畜産課(2006) 家畜飼養頭羽数: 20-21.
- 3) 日野靖興, 関 哲生, 田辺武彦(1996)豚液状精液の広域利用実用化試験, 岡山県畜産総合研究センター研報, 7 ; 85-86.
- 4) 保科和夫, 伊東正吾, 田中章人, 江塚善三(1999)豚液状精液の宅配輸送及び簡易保存法の検討, 長野県畜産試験場研報, 26 ; 12-16.
- 5) 公文喜一, 松岡哲也(2002)豚精液の広域利用実用化試験, 高知県畜産試験場研報, 18 ; 47-49.
- 6) Martinez EA, Vazquez JM, Roca J, Lucas X, Gil MA, Parrilla I, Vazquez JL, Day BN(2001)Successful non-surgical deep intrauterine insemination with small numbers of spermatozoa in sows, Reproduction, 122 ; 289 - 296.
- 7) Martinez EA, Vazquez JM, Roca J, Lucas X, Gil MA, Parrilla I, Vazquez JL, Day BN(2002) Minimum number of spermatozoa required for normal fertility after deep intrauterine insemination in non-sedated sows, Reproduction, 123 ; 163-170.
- 8) 三浦泰忠, 米村 功, 清水登(1996)豚液状精液の簡易保存器具と輸送技術の検討, 鳥取県中小家畜試験場研報, 51 ; 11-13
- 9) 園原邦治, 斉藤庸二郎, 宮原 強(1994)豚液状精液の長期保存, 千葉県畜産センター研報, 18 ; 33-38.
- 10) 田内静花, 酒井幹子, 山内伸彦, 下司雅也, 永井 卓, 橋爪 力, 榎田博司(1999) 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.
- 11) 吉田真二, 片野良平, 松原英二(1999)豚液状精液の再保存温度の検討, 群馬県畜産試験場研報, 6 ; 31-34.