

トウキョウXの遺伝資源保存のための精液凍結技術の改良

[平成 23～25 年度]

鈴木亜由美・上原由史*・太田久由*²

(畜産技術科) *現農振事・*² 現農業振興課

【要 約】新たな作製法によるブタ凍結精液は、従来法よりも融解後の精子生存指数および精子運動率が高く、種雌豚の1発情期間中に1回の人工授精で受胎する。新法により、トウキョウX維持群17頭の凍結精液を作製・保存し、うち9頭は受精能力を確認した。

【目 的】

伝染病蔓延時などの対策として、また、遺伝子資源として、トウキョウX種雄豚の精液を凍結保存する。作製した凍結精液は種雌豚に人工授精し、受精能力を確認する。農家などにおける凍結精液の活用に向け、最適な人工授精器具や受胎可能な人工授精回数を検討し、産子数などのデータを収集する。

【成果の概要】

1. 作製法の違いによる精子生存性の比較

トウキョウX維持群の雄4頭から精液を採取し、既存の作製法（以下、従来法）と、大分県農林水産研究指導センターと広島大学が共同開発した新たな製法（以下、新法）で凍結精液を作製し、融解後の精子運動率および精子生存指数を比較する。

(1)凍結精液の使用目安である、融解後培養30分の運動精子率を比較すると、凍結方法の違いによる差はない（表1）。しかし精子生存指数は新法が高い値であり、凍結方法間での有意差がみられ、個体間の差はない（表1）。

(2)精子運動率は、融解後の時間経過により有意差が見られ（ $P<0.05$ ）、新法は従来法よりも高く推移する（図1）。精子生存指数についても同様であり、有意差が認められる（ $P<0.05$ ）（図2）。

(3)従来法の精子生存指数は、融解後30～120分間に大きく低下し、新法との有意差が認められる（ $P<0.01$ ）。新法は従来法よりも低下率が低く、受精能力が長時間維持されることが考えられる（図3）。

2. 新法による凍結精液の作製と受精能力の確認

トウキョウX種雄豚の精液を採取し、凍結精液を作製する。作製した凍結精液のうち、融解後の精子運動性が50+++以上のものは遺伝子資源として保存し、一部を種雌豚に人工授精して受精能力を確認する。

(1)トウキョウX維持群の全10系統（A～J）から各1頭以上、合計17頭の凍結精液を作製した。人工授精に使用したものを除き、1987本の凍結精液を遺伝子資源として保存した。自然発情した種雌豚のべ63頭に人工授精した結果、16頭が受胎し、種雄豚9頭の受精能力が確認された（表2）。うち14頭が分娩したが、産子数のばらつきが大きく、人工授精に用いたカテーテルにより、精子注入量に差が生じたためと考えられる（図4）。

3. 死精子の除去による凍結融解後の精子運動性向上

夏季など、精液性状が低下する時期でも、融解後の精子運動率が高い凍結精液を作製す

るため、パーコール法により生存精子のみを回収して凍結に用いる。

(1)パーコール：精液前処理液=1:1溶液に、採取した精液を重層して遠心分離した後、凍結処理した結果、採取した精液をそのまま処理した時よりも、融解後の精子運動率が10～25ポイント高くなる（表3）。

4. トウキョウXに適した人工授精方法の確立

試験開始当初、人工授精に用いたスポンジカテーテル（図4）では、精液の逆流が多発し、受胎率が低く、また受胎しても産子数が少なかったことから、子宮深部に精子を注入する人工授精方法を検討する。また、農家などでの凍結精液の活用に向け、誰でも簡単に実施できる、丹羽式豚精液注入器スパイラル型（以下、スパイラルカテーテル）を用いた精子注入による受胎性および産子数を調査する。

(1)子宮角深部注入カテーテル（以下、深部注入カテーテル、図4）を用いて、種雌豚のべ44頭に人工授精したところ、11頭が受胎・分娩した。うち、5頭は発情後期に1回のみ的人工授精である（表4）。新法で作製した凍結精液は、融解後の生存指数の低下が緩やかであり、活発に運動する精子が長時間存在すると推察されることから、1回の精子注入でも受胎可能と考えられる。

(2)スパイラルカテーテル（図4）を用いて人工授精したところ、精液の逆流はほとんどなく、受胎・分娩が確認された（表4）。

(3)精子注入に用いたカテーテル別に産子数を比較したところ、深部注入カテーテルおよびスパイラルカテーテルを用いて人工授精した時は、自然交配により受胎・分娩したトウキョウX維持群と遜色がなく、実用性が高い（図5）。

【成果の活用・留意点】

凍結精液の作製および利用は、大分県と広島大学が共同開発した「受胎率および産子数向上凍結精子およびその製法（特許2007-325313）」を、特許実施許諾契約の上で実施している。

【具体的データ】

表1 個体ごとの運動精子率及び精子生存指数（融解後培養30分、平均値±標準偏差）

\種雄豚	A		B		C		D		P値	
	新法	従来法	新法	従来法	新法	従来法	新法	従来法	凍結法	個体間
運動精子率 (%)	51.3 ±13.1	53.8 ±4.8	66.3 ±4.8	67.5 ±2.9	64.0 ±2.2	50.0 ±7.9	63.8 ±4.8	61.3 ±4.8	0.128	0.002
精子生存 指数 ^a	62.9 ±4.4	56.7 ±13.0	66.3 ±3.5	65.0 ±3.5	64.3 ±5.6	57.3 ±9.9	66.3 ±3.5	57.5 ±1.8	0.049	0.623

a)精子生存指数=((活力+++×100)+(活力++×75)+(活力+×50)+(活力±×25)+(活力-×0))/100

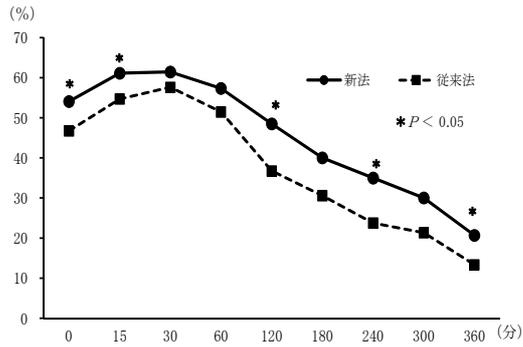


図1 運動精子率の推移

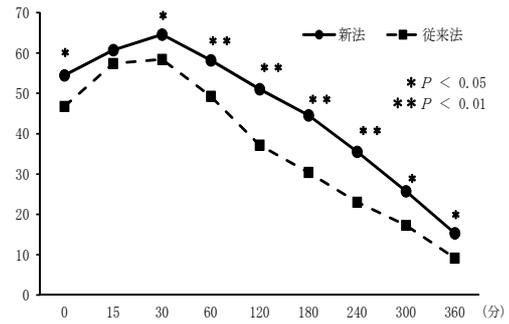


図2 精子生存指数の推移

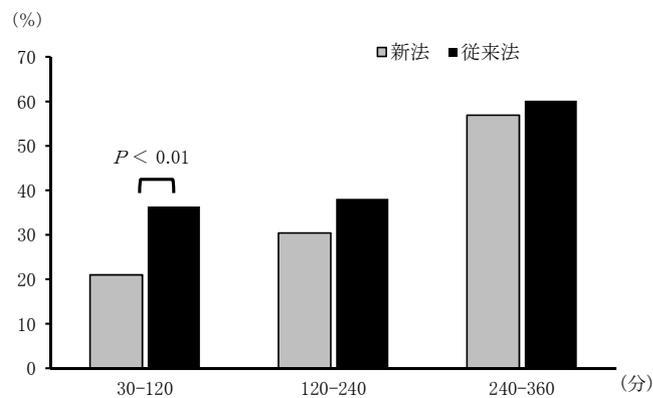


図3 精子生存指数の低下率の比較

表2 凍結保存したトウキョウX種雄豚精子と人工授精結果

種雄豚No.	世代	血統	保存数 (本)	融解後 活力	受胎頭数*
6644	8	A	39	70+++	
7943	9	A	206	50+++	1
6229	8	B	56	50+++	
6751	8	C	43	50+++	
3003	8	C	58	60+++	(確認中)
3645	8	D	248	80+++	4
3258	8	E	83	70+++	1
3857	8	E	9	50+++	(確認中)
5179	7	F	8	50+++	
3682	7	F	42	60+++	
7795	9	G	199	65+++	2
7393	9	G	71	70+++	3
7988	10	H	196	75+++	1
6844	9	H	141	70+++	1
2923	9	H	178	60+++	
7311	8	I	247	70+++	1
6127	9	J	163	70+++	2

*(2013年11月末までの成績)

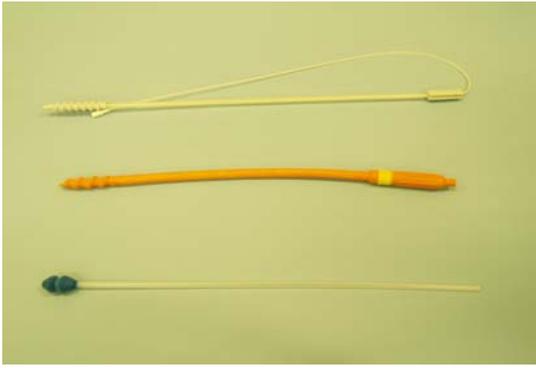


図4 人工授精に用いたカテーテル
(上から深部注入カテーテル,スパイラルカテーテル,
スポンジカテーテル)

表3 パーコール処理による運動性向上

種雄豚No.	パーコール 処理なし	パーコール 処理あり
7988	50+++	75+++
6127	60+++	70+++
6844	60+++	70+++

表4 人工授精に用いたカテーテルの違いによる受胎率の比較*

精子注入方法	実施頭数	受胎母豚 頭数	受胎率 (%)	分娩母豚 頭数
スポンジカテーテル	13	2	15.4	2
スパイラルカテーテル	6	3	50.0	1
深部注入カテーテル 1回注入	21	5	23.8	5
深部注入カテーテル 2~3回注入	23	6	26.1	6

*(2013年11月末までの実績)

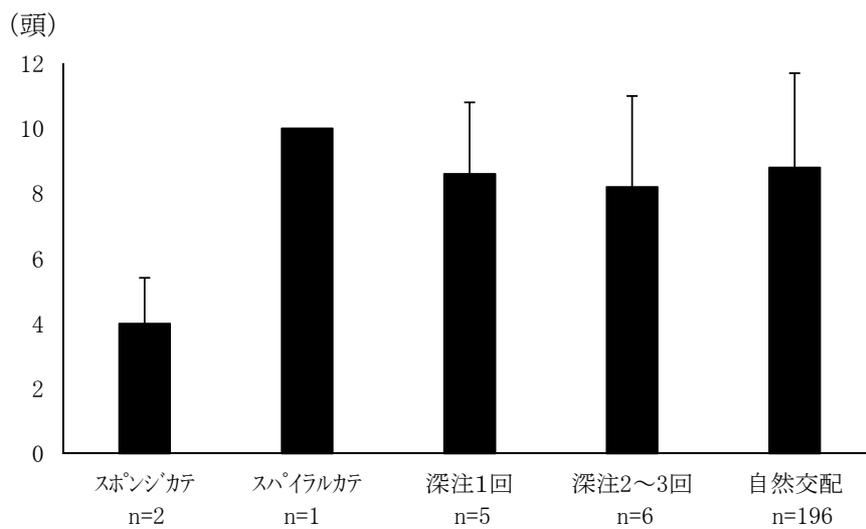


図5 異なるカテーテルによる人工授精および自然交配による産子数の比較