

豚精子の凍結保存に関する研究

ヒルセンベルグⅧ液による処理が凍結融解後の精子生存性に及ぼす影響

伊藤 米人・加藤 巳之吉*

Studies on Deep Freezing of Boar Spermatozoa
Effect of Treatment by Hulsenberg VIII Diluent
on Motility of Frozen-thawed Boar Spermatozoa

Yoneto ITOH and Minokichi KATO*

(要旨)

豚精子をペレット法で凍結する場合、採取精液をヒルセンベルグⅧ液で希釈し放置する方法が、凍結融解後の精子生存性およびアクロソームの形態に及ぼす影響について検討した。試験区は、採取精液を無処理で室温中に2時間放置する対照区、ヒルセンベルグⅧ液で希釈し室温中に2時間放置するHuR2区、希釈後15℃中に2時間放置するHu2区、希釈後15℃中に5時間放置するHu5区の4区を設定した。結果は以下のように要約される。

- ① 凍結融解後30分の運動精子率は、Hu2区とHu5区が対照区HuR2区より高い傾向にあった。60および120分の運動精子率も、同様の傾向であった。
- ② 凍結融解後30分の精子のアクロソーム正常率は、それぞれの試験区に差はなかった。アクロソーム異常率の内訳は、染色異常が最も多く、次いで欠損・その他で膨化は最も少なかった。
- ③ 凍結融解後の運動精子率は、採取精液をヒルセンベルグⅧ液で希釈し、15℃中に放置することにより高まる傾向が認められたが、アクロソーム正常率は変らなかった。

まえがき

豚精子を凍結する場合に、Purse! and Johnson(1975)¹⁾は、精液を採取後2時間室温に放置することにより耐凍性を高めている。しかし、この放置時間いわゆるホールディングタイム中に、精液により運動性が低下しその後の処理によっても運動性が回復しない場合がある。

一方Westendorf et al.(1975)²⁾は、採取した精液を直ちにヒルセンベルグⅧ液³⁾(表1)で希釈し、15℃中に6時間放置後、大型ストローで凍結して良好な結果を得ている。

本研究においては、ペレット法で凍結するに当たって採取精液をヒルセンベルグⅧ液で希釈し、放置する方法の影響について検討した。

材料と方法

供試精液は、ランドレース種5頭、大ヨークシャー種2頭およびデュロック種2頭から合計13回採取した精液

の濃厚部を用いた。精液の濃厚部は一般性状検査後、対照区の精液を除いて直ちにヒルセンベルグⅧ液(表1)で3倍に希釈し、次の試験区に割り当てた。

- 対照区： 採取精液をそのまま室温中に2時間放置
HuR2区： 希釈後室温中に2時間放置
Hu2区： 希釈後15℃中に2時間放置
Hu5区： 希釈後15℃中に5時間放置

前処理した精液は、遠心分離を行い精漿を除去し、一次希釈液(TF-1)⁴⁾で4倍に希釈した。一次希釈液で希釈した精液は5℃の恒温器内で約2時間で5℃に低下させ、グリセリン2%を含有する二次希釈液で2倍量に希釈し、ドライアイスの小穴上に0.2 mlづつ滴下してペレット凍結⁵⁾した。凍結したペレットはペレットケーンに約50錠づつ収容し液体チッソ中に保存した。

融解は、ペレット5錠をあらかじめ50℃に加温した4 mlの融解液(TS-4)に投入し、渦巻き状に攪拌する方法によった。融解した精液は、精子活力の検査とアクロソームの形態について検査した。精子活力の検査は、融解

表1. ヒルセンベルグⅧ液の組成

Table 1. Composition of Hulsenberg VIII diluent

Ingredient	Amount
Glucose anhydrous	57.5 g
Lactose	2.5 g
Sodium citrate dihydrate	4.5 g
Ethylene diaminetetra- acetic acid (E. D. T. A.)	3.5 g
Sodium bicarbonate	1.2 g
Potassium chloride	0.4 g
Sulfanilamido	1.0 g
Penicillin G potassium	1,000,000 IU
Streptomycin sulphate	1.0 g

pH was adjusted to 6.2 by 0.1N NaOH.

Ingredients dissolved and brought to 1000 ml
with distilled water.

Osmolarity 430 m Osm /kg

直後, 37°Cでインキュベーション後30, 60, 90, 120 および 180分に行い, 運動精子率で表した。

アクロソームの形態の検査は, 融解後30分の精液をスライドグラス上に塗抹し, ギムザ染色して光学顕微鏡により1,500倍で, 1サンプル当たり200個の精子について行った。アクロソームの形態は, 正常 (Normal, 写真1. a), 染色異常 (Unusual stainability, 写真1. b),

膨化 (loose, 写真1. c) および欠損 (loss of a part or all, 写真1. d) ・その他 (Others) に分類⁶⁾ した。

測定値は平均±標準偏差で表し, 統計処理はt検定を用いた。

結 果

凍結融解後の運動精子率の平均を表2に示した。融解後30分の運動精子率は, Hu2区とHu5区が対照区とHuR2区より良い傾向にあった。融解後60分および120分の運動精子率も, 融解後30分と同様の傾向であった。しかし, 融解後180分では, それぞれの試験区に差は認められなかった。

融解後30分のアクロソームの形態を表3に示した。アクロソーム正常率は, 21.1±6.8% (Hu5区) から22.8±6.3% (Hu2区) の範囲で差はなかった。アクロソーム異常率の内訳では, 染色異常が最も多く, 次いで欠損・その他で, 膨化は最も少なかった。染色異常は対照区とHu5区が多く, HuR2区とHu2区は少なかった。膨化は7.7±4.6% (対照区) から9.3±2.8% (HuR2区) の範囲で差はなかった。欠損・その他はHuR2区がHu5区および対照区より多い傾向があった (32.1±9.6対26.6±8.4%, 27.1±6.4%)。

考 察

Westendorf et al. (1975)²⁾ は, 精液を採取後ヒルセンベルグⅧ液で希釈して6時間放置する方法を採っている。本研究においても, 融解後30分および60分の運動精子率は, Hu5区が最も高い値を示した。しかし, 5~6時間放置すると精液を採取してから凍結が終了するまで

表2. ヒルセンベルグⅧ液で処理して凍結融解した豚精子の精子生存性

Table 2. Motility of frozen-thawed spermatozoa by treatment with Hulsenberg VIII diluent

Treatment	Motility (%)				
	Incubation period (min.)				
	0	30	60	120	180
Control	23.5±4.9 ¹⁾	29.4±5.7	28.3±6.9	23.9±6.4	19.7±8.1
HuR 2 区	25.2±3.4	30.2±5.2	27.8±6.5	23.2±6.8	19.5±7.4
Hu 2 区	27.8±4.6	32.8±7.0	31.6±7.3	25.8±8.7	20.3±7.9
Hu 5 区	27.6±5.0	33.3±5.7	32.2±6.6	24.9±6.9	20.5±6.2

¹⁾ Mean±SD for 13 replicates.

表3. ヒルセンベルグⅧ液で処理して凍結融解した豚精子のアクロソームの形態
Table3. Acrosome morphology of frozen-thawed spermatozoa by treatment
with HulsebergⅧ diluent

Treatment	Normal (%)	Abnormal acrosome(%)		
		Unusual stainability	Loose	Loss of a part or all・Others
Control	22.2± 6.2 ¹⁾	43.0± 7.7	7.7±4.6	27.1± 6.4
HuR 2区	22.2± 5.4	36.4± 8.8	9.3±2.8	32.1± 9.6
Hu 2区	22.8± 6.3	38.9±10.6	8.7±3.8	29.6±10.7
Hu 5区	21.1± 6.8	43.9± 7.8	8.4±2.5	26.6± 8.4

¹⁾ Mean±SD for 10 replicates.

Evaluation after 30min. incubation at 37°C.

長時間を要することになり、実用的な利用のためにはこの時間の短縮が望まれる。本研究において凍結融解後30分の運動精子率は、Hu 2区とHu 5区が差がないことから、ヒルセンベルグⅧ液で希釈後の放置時間を短縮することが可能であると思われる。

ヒルセンベルグⅧ液は、浸透圧が430m Osm/kgと高く、pHは6.2と低い。ヒルセンベルグⅧ液で希釈した精液は、放置時間中の運動性が抑制される。この高い浸透圧と低いpHが、豚精子を生化学的または微細構造的に変化させ、耐凍性を高めるかも知れない。

アクロソームの形態については、アクロソームの前縁が濃染される染色異常精子が最も多く、アクロソームキャップが遊離する膨化精子は少なかった。丹羽ら⁸⁾はベレット法で凍結融解して、アクロソームの形態について検査しているが、染色異常精子の割合は今回の結果とほぼ同じであった。しかし、副島ら⁹⁾はストロー法で凍結融解して、膨化精子が最も多いことを報告しており本報告と違っていた。これらの違いは、凍結方法による違いであることが考えられるが明らかでない。膨化や欠損または崩壊した精子は、子宮頸管経由の通常の人工授精では受精能はないと判断される。しかし、前縁が濃染した染色異常精子は、別に検査した液状保存精子でも多く発生するので、受精能がある可能性はある。

謝 辞

本研究を実施するに当たり、ヒルセンベルグⅧ液の調製方法及び豚精子のアクロソームの形態検査の方法をご指導頂いた、農林水産省畜産試験場繁殖部第一研究室の榎田博司室長ならびに川倉一彦氏に感謝します。

文 献

- 1) PURSEL, V. G., and L. A. JOHNSON(1975): Freezing of boar spermatozoa. Fertilizing capacity with concentrated semen and new thawing procedure. J. Anim. Sci., 40, 99-102, 1975.
- 2) WESTENDORF, P., L. RICHTER., & H. TREU: Zur Tiefgefrierung von Ebersperma. Labor- und Besamungsergebnisse mit dem Hulsenberger Paillette-Verfahren. Dtsch. Tierrztl. Wschr., 82, 261-267, 1975.
- 3) RICHTER, Von., E. ROMENY, K. Y. WEITZE and F. ZIMMERMANN: Zur Tiefgefrierung Von ebersperma. VII. Mitteilung: Weitere Labor-und Besamungsversuche mit dem Verdunner Hulsenberg VIII. Dtsch. Tierarztl. Wschr., 82, 137-180.
- 4) 副島昭彦・榎田博司・和出 靖・松川善昌：豚凍結精液におけるベレット凍結，アルミバック凍結およびストロー凍結の比較。人工授精研誌，5，6-8，1983.
- 5) 長瀬 弘・丹羽太左衛門：牛精液の凍結保存技術に関する研究 III. 錠剤形式による牛精液の凍結保存について。家畜繁殖誌，9，73-77，1963.
- 6) 大沼秀男：家畜精子の acrosomic system の研究VI. 牛および豚の射出精子の acrosomic system の形態ならびにその保存と温度衝撃による形態的变化。畜試研報，3，105-119，1963.
- 7) PURSEL, V. G., L. A. JOHNSON and G. B. RAMPACEK : Acrosome morpholgy of boar spermatozoa incubated before cold shock. J. Anim. Sci., 34, 278-

283, 1972.

- 8) 丹羽太左衛門・伊藤和雄・呂 連心・橋爪 力：錠劑化法による豚精子の凍結保存に関する研究 I 凍結および融解の方法について。岩手大農・人工授精

研報, 1, 66-84, 1981.

- 9) 副島昭彦・川倉一彦・栢田博司：ストロー法による豚凍結精子の生存性, アクロソームの形態および受精能力・人工授精研誌, 7(2), 42-45, 1985.

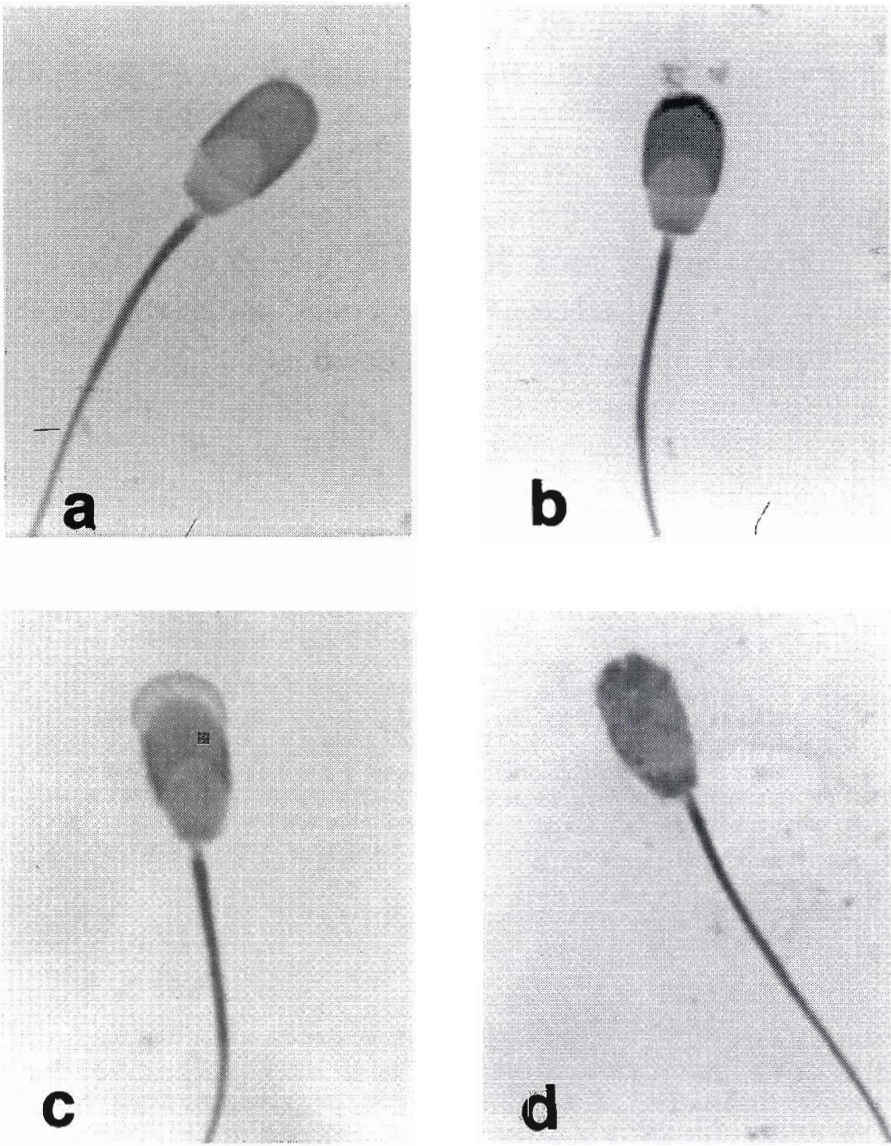


写真1. 凍結融解後におけるアクロソームの形態により分類した豚精子の顕微鏡写真

Figure 1. Photomicrographs of frozen-thawed boar spermatozoa classified according to acrosome morphology.

All figures $\times 670$

- a. Normal
- b. Unusual stainability
- c. Loose
- d. Loss of a part or all or Others