

豚精子の凍結保存に関する研究

希釈液中のグリセリン濃度が凍結融解後の精子生存性に及ぼす影響

伊藤 米人・近藤 ゆり

Studies on Deep Freezing of Boar Spermatozoa
Effect of Glycerol Concentration on Viability
of Frozen-thawed Boar Spermatozoa in Pellets

Yoneto ITOH and Yuri KONDO

(要 旨)

豚精子をペレット法で凍結する場合、希釈液中のグリセリン濃度が凍結融解後の精子生存性に及ぼす影響について検討した。試験区は、最終的な精液のグリセリン濃度が1.0, 1.5, 2.0, 2.5および3.0%の区を設定した。凍結融解方法は、Pursel and Johnsonの方法に準じて行った。

① 凍結融解後の運動精子率は、融解後30分についてみると1.0%区と比較して、1.5%区では差はないが2.0%区、2.5%区および3.0%区は高く($P < 0.05$, $P < 0.01$ および $P < 0.01$)、2.5%区と3.0%区では差がなかった。

② 授精試験では、3%のグリセリン濃度で凍結融解した精液で、6頭の自然発情した経産豚に授精した結果、3頭で受精卵が得られた。受精卵率は20.0~100%の範囲であった。

③ 以上の結果より、希釈液中のグリセリン濃度が2.5%および3.0%で凍結融解後の精子生存性が高く、3.0%でも受精能があることが確認された。

まえがき

グリセリンは、Polge (1949)¹⁾がニワトリ精子の耐凍剤として極めて有効であることを発見して以来、他の家畜精子の耐凍剤として一般に広く使用されている。グリセリンは耐凍剤として優れている反面、精子に有害に作用することも知られている²⁻⁴⁾。特に豚精子においては、高濃度のグリセリンは受精能に悪影響をおよぼすことが報告²⁾されている。そこで、Pursel and Johnson(1975)⁵⁾は、ペレット法で豚精子を凍結するに当たり、グリセリン濃度を1.0%と低くしている。しかし、グリセリン濃度を高めると凍結融解後の精子生存性は高まるので、受精能を保持し最も高い精子生存性が得られるグリセリン濃度について検討する必要がある。Aimlid and Johnson (1988)⁶⁾はストロー法において、グリセリン濃度別の凍結融解後の精子生存性について報告している。

本研究は、ペレット法について異なるグリセリン濃度の希釈液を用いて、Pursel and Johnson(1975)⁵⁾の方法に準じて凍結し、融解後の精子生存性および受精能について検討した。

材料と方法

供試精液は、ランドレース種4頭およびデュロック種2頭から10回採取した精液の濃厚部を用いた。凍結方法は、Pursel and Johnson(1975)⁵⁾の方法に準じて行った。すなわち、精液の濃厚部は一般性状検査後、室温中に2時間放置し500gで20分間遠心分離を行い精漿を除去した。精子は一次希釈液(TP-1)⁷⁾で4倍に希釈し、5℃の恒温器内で約2時間かけて5℃に低下させ、グリセリンを含む二次希釈液で2倍量に希釈した。二次希釈後の精液のグリセリン濃度は1.0、1.5、2.0、2.5および3.0%である。凍結は、ドライアイスの小穴上に0.2mlづつ滴下し、ペレット凍結した。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。

精子生存性の検査のための融解方法⁸⁾は、ペレット5錠を液体チッソ中から取り出し、発砲スチロールの容器に入れ2分間放置した後、あらかじめ50℃に加温した4mlの融解液(TS-4)に投入して、渦巻き状に攪拌しながら行った。

精子活力の検査は、融解後0分および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。

受精能の検査は、3%のグリセリン濃度で凍結した精子で授精試験を行った。授精試験には自然発情の経産豚(1産)6頭を用い、人工授精は1~3回行った。人工授精に用いた凍結精液は、ペレット50錠を予め40°Cに加温した融解液(NST)中に投入して融解した。

測定値は平均±標準偏差で表し、運動精子率はアークサイン変換後、Studentのt検定を用いて統計処理した。

結果および考察

グリセリン濃度を1.0、1.5、2.0、2.5および3.0%で凍結し、融解した精子の生存性を表1に示した。融解後0分の運動精子率は、1.0%区と比較して1.5%区は差はないが、2.0%区、2.5%区および3.0%区は高かった

($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ および $P < 0.01$)。融解後30分の運動精子率は、0分と同様に1.0%区と比較して1.5%区は差はないが、2.0%区、2.5%区および3.0%区は高かった($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ および $P < 0.01$)。また、2.5%区と3.0%区は1.5%区よりも高く($P < 0.05$)、2.5%区と3.0%区では差はなかった。融解後60分、120分および180分になると運動精子率は各々の試験区間の差が小さくなった。

グリセリン濃度3.0%で凍結し、融解した精子の、授精試験の結果を表2に示した。授精に供した雌豚から回収された卵子数は、8~17個の範囲であった。受精卵が得られた雌豚の頭数は3頭(50.0%)であり、この雌豚3頭における受精卵率は、1頭が20.0%、他の2頭が100%であった。

図1に授精試験で回収した胚または卵子を示した。胚の透明帯に付着している精子数は、液状精液で授精した

表1. 異なるグリセリン濃度で凍結融解した豚精子の精子生存性

Table1. Motility of frozen-thawed spermatozoa by different glycerol concentration in extender.

Glycerol concentration (%)	Motility (%) ¹⁾				
	Incubation period (min.)				
	0	30	60	120	180
1.0	21.9±3.7 ^a	27.8±5.3 ^a	25.1±6.8	16.8±8.6	11.0±7.9
1.5	24.1±3.7 ^A	30.7±5.2 ^A	27.1±7.9	18.9±10.2	11.5±8.3
2.0	27.0±2.0 ^b	33.5±6.1 ^b	29.6±8.1	18.4±9.9	10.7±9.1
2.5	27.5±1.7 ^{c^B}	35.7±4.1 ^{c^B}	31.2±6.0	20.4±9.6	12.5±9.7
3.0	27.4±2.3 ^c	35.1±4.0 ^{c^B}	31.5±6.9	21.3±9.1	13.3±10.5

¹⁾ Mean±SD for 10 replicates.

Values with different superscripts in the same column are significantly different (a, b: $p < 0.05$, A, B: $p < 0.05$).

表2. グリセリン濃度3%で凍結した豚精子の受精能

Table2. Fertilizing capacity of boar spermatozoa frozen with 3% glycerol.

Sows	Semen characteristics		No. of corpora lutea	No. of recovered eggs	Fertilization rate of recovered eggs (%)
	Motility (%)	Total no. of motile sperm ($\times 10^8$)			
1	33	35	12	10	20.0 (2/10)
2	35	35	17	17	0 (0/17)
3	35	45	15	14	0 (0/14)
4	45	32	16	10	100 (10/10)
5	40	30	14	13	100 (13/13)
6	43	23	10	8	0 (0/8)

胚(図1A、B)と比較すると同様の場合(図1D)もあるが多くの場合は少なく、極めて少ない場合(図1C)もあった。受精状況は、透明帯に付着している精子数が比較的多くても未受精卵の場合もあったが(図1E)、一般的には精子数が多い場合は受精卵であり、少ない場合は未受精卵(図1F)であった。

Polgeら(1949)¹⁾が初めてグリセリンがニワトリ精子の耐凍剤として優れていることを発見して以来、グリセリンは一般に家畜精子の耐凍剤として使われている。しかし、グリセリンは、豚精子に有害に作用することも知られている。Grahamら(1971)²⁾は、凍結しない場合の豚精液の受精能についてグリセリン濃度の影響を検討した。その結果、受胎率はグリセリン濃度2%では81.8%であるがグリセリン濃度5%では47.8%、グリセリン濃度7%では7.7%に低下したことを報告している。

Polge(1956)³⁾はグリセリン濃度4~8%で凍結した場合に融解後最も高い運動精子率が得られたが、受精能はなかったことを報告している。本試験においては、グリセリン濃度は3%であったが受精能は失われていなかった。Polge(1956)³⁾の報告との違いは、本試験ではオーバス・エス・ペースト(OEP)¹⁰⁾を希釈中に入れてあることであるので、OEPが受精能の保持に有効に作用していることが示唆される。Fiser(1991)¹¹⁾は、運動精子率はグリセリンが3%の時に最も高く、アクロソーム正常率はグリセリンが1%の時に最も高いと報告している。

凍結精液の場合でも胚の透明帯に付着している精子数が液状精液と同様の場合があることは、凍結精液の条件と雌豚の条件が良ければ、凍結精液も液状精液と同様な受胎率と産子数が得られることを示している。図1Cでは極めて精子数が少ないにもかかわらず胚盤胞期の胚が得られているが、この胚の得られた豚からは他に1個の同様の胚が得られた以外は全て未受精卵であった。これは、この2個の胚だけが精子と受精の機会に恵まれたためであると思われる。また、受精するためには、少数の精子でも可能であることが示唆される。

以上の結果より、グリセリンが2.5~3.0%で最も高い精子生存性が得られ、3.0%でも受精能が保持されていることが確認された。

文 献

1) POLGE, C., A. U. SMITH and A. S. PARKES(1949): Revival of spermatozoa after vitrification and

dehydration at low temperatures. *Nature*, 164, 666, London.

- 2) GRAHAM, E. F., A. H. F. Rajamannan, M. K. L. SCHMCHL, M. MAKI-LAURILA and R. E. BOWER(1971): Preliminary reports on procedure and rationale for freezing boar semen. *A. I. Digest* 19, 12-14.
- 3) WILMUT, I. and C. POLGE(1974): The fertilizing capacity fo boar semen stored in the presence of glycerol at 20, 5 and -79 °C. *J. Reprod. Fertl.*, 38, 105-113.
- 4) WILMUT, I. S. Salamon and C. Polge(1973): Deep freezing of boar semen. II. Effects of dilution, glycerol concentration, and time of semen glycerol contact on survival on spermatozoa *Aust. j. Biol. Sci.*, 26, 231-237.
- 5) 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.
- 6) ALMLID, T. and L. A. JOHNSON(1988): Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. *J. Anim. Sci.*, 66, 2899-2905.
- 7) 副島昭彦・栢田博司・和出 靖・松川善昌(1983): 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.
- 8) PURSEL, V. G. and L. A. JOHNSON(1975): Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawint procedure. *J. Anim. Sci.*, 40, 99-102.
- 9) POLGE, C.(1956): Artificial insemination in pigs. *Vet. Rec.*, 68, 62.
- 10) PURSEL, V. G., L. L. SCHULMAN and L. A. JOHNSON (1978): Effect of Orvus ES Paste on acrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen-thawed boar sperm. *J. Anim. Sci.*, 47, 198-202.
- 11) FISER, P. S.(1991): Interactions of cooling velocity, warming velocity and glycerol concentration on the survival of frozen-thawed boar sperm. In: L. A. JOHNSON and D. RATH(Eds), *Preservation of boar semen*. 123-137.

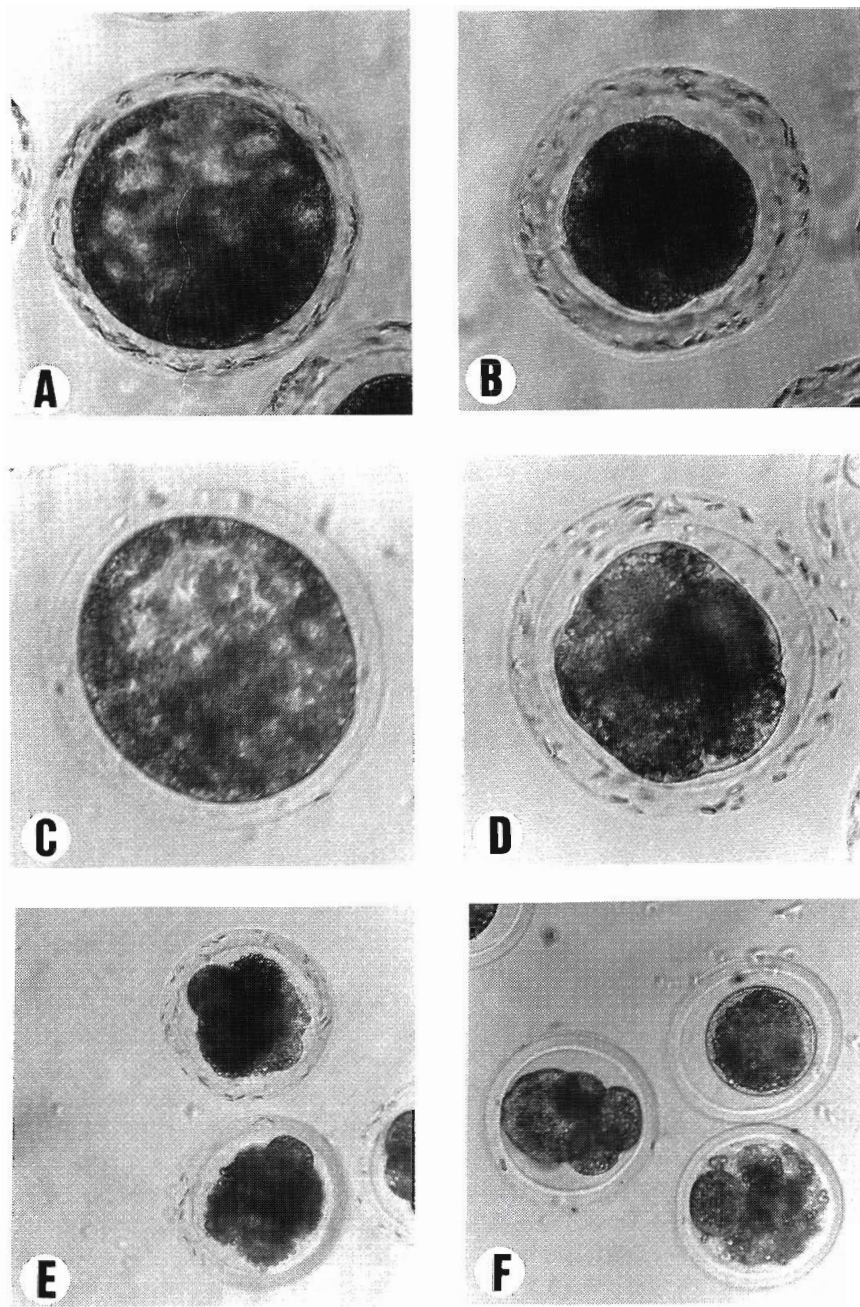


図1. 凍結精液または液状精液で授精後回収した胚と卵子

Figure 1. Embryos and eggs after artificial insemination with frozen boar semen or liquid boar semen.

A : Blastocyst; Liquid boar semen.

B : Morula; Liquid boar semen.

C : Blastocyst; Frozen boar semen.

D : Morula; Frozen boar semen.

E : Unfertilized ova; Frozen boar semen.

F : Unfertilized ova; Frozen boar semen.