

豚精子の凍結保存に関する研究

—ペレット法とストロー法による凍結融解後の精子生存性の比較—

伊藤 米人 ・ 近藤 ゆり

Studies on Deep Freezing of Boar Spermatozoa

—Comparison of Motility of Frozen-thawed Boar Spermatozoa in Pellet and Straw—

Yoneto ITOH and Yuri KONDO

(要 旨)

豚精子の凍結方法として、ペレット法とストロー法について比較した。ペレット法は Pursel and Johnson (1975) の方法に準じ、ストロー法は Westendorf et al. (1975) の方法に準じて行った。供試精液は、ランドレース種 8 頭から採取した 47 のサンプルを用いた。結果は以下のように要約される。

- ① 凍結融解後の経時的な運動精子率の平均は、融解直後は変わらなかった。融解後 30 分ではペレット法がストロー法より高く ($P < 0.05$, $29.9 \pm 5.0\%$ 対 $26.2 \pm 6.6\%$)、120 分では逆にストロー法が高かった ($P < 0.01$, $15.5 \pm 6.5\%$ 対 $22.0 \pm 6.2\%$)。
- ② サンプル毎の比較では、凍結融解後 30 分における運動精子率 30% 以上のサンプル数の割合は、ペレット法がストロー法に比べて高かった (59.6% 対 29.8%)。しかし、120 分ではペレット法はストロー法に比べて低かった (0% 対 8.5%)。
- ③ ストロー法で高い運動精子率を示したサンプルはペレット法でも高かったが、ペレット法で高い運動精子率を示したサンプルは、ストロー法では必ずしも高くはなかった。

ま え が き

豚精子を凍結する方法として現在一般に用いられている方法は、ペレット法 (Pursel and Johnson, 1975)¹⁾ とストロー法 (Westendorf et al., 1975)²⁾ およびこれらに準じた方法である。ペレット法はドライアイス上の小さい穴で錠剤状に凍結する方法で、凍結方法そのものは長瀬と丹羽³⁾が開発した方法であり、Pursel and Johnson (1975)¹⁾ が豚精子を凍結融解する一連の方法を開発したものである。ストロー法は Westendorf et al. (1975)²⁾ が報告し、大型ストローを用いて液体チップで凍結する極めて簡便な方法である。

ペレット法とストロー法は、凍結方法、保存方法および融解方法が違っているので、豚精子を凍結する場合にはいずれの方法によるかその選択が問題となる。本研究においては、同一精液をペレット法とストロー法で凍結し、融解後の精子生存性を比較検討した。

材 料 と 方 法

供試精液は、ランドレース種 8 頭から 47 回採取した精

液の濃厚部を用いた。

凍結方法は、ペレット法は Pursel and Johnson (1975)¹⁾ の方法に準じて行い、ストロー法は Westendorf et al. (1975)²⁾ の方法に準じて行った。

ペレット法は、採取した精液の濃厚部をすみやかに精液と等量の前処理液で希釈し、室温中に 2 時間放置後遠心分離を行って精漿を除去し、一次希釈液 (GLR) で精子濃度が $10 \times 10^8 / \text{ml}$ になるように希釈した。一次希釈後の精液は 5℃ の恒温器内で約 2 時間かけて 5℃ まで低下させ、グリセリン 6% を含有する二次希釈液 (GLR) で 2 倍量に希釈し、ドライアイスの小穴上に 0.2 ml ずつ滴下し凍結した。凍結したペレットはペレットケーンに約 50 錠ずつ収容し液体チップ中に保存した。

ストロー法は、凍結前の処理はペレット法と同様であるが、希釈液はストロー法用の希釈液²⁾を用いた。二次希釈した精液は、大型ストローに 5 ml ずつ充填し、凍結は発泡スチロールの容器に液体チップを入れ、液面上 5 cm の位置にストローを 20 分間静置して凍結した。凍結したストローは、液体チップ中に保存した。

融解方法は、ペレット法ではペレット 5 錠をあらかじめ

め50℃に加熱した4 mlの融解液(TS-4)に投入し、渦巻き状に攪拌しながら融解した。ストロー法では、ストローを45℃の温湯中に50秒間浸漬して融解し、その1 mlを4 mlの融解液(TS-4)で希釈した。

精子活力の検査は、融解直後(0分)、融解後37℃でインキュベーションして30, 60, 90, 120および180分に行い、精子生存性は運動精子率で表した。

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

凍結融解後の経過時間に伴う運動精子率の平均を図1に示した。融解直後ではベレット法とストロー法に差は無く、融解後30分ではベレット法はストロー法より高い傾向であった($P < 0.05$, $29.9 \pm 5.0\%$ 対 $26.2 \pm 6.6\%$)。しかし、60分では差がなくなり、120分になると逆にストロー法の方がベレット法より高くなった($P < 0.01$)。

凍結融解した全サンプルを、運動精子率の階層別に分

表1 ベレット法とストロー法により凍結融解した豚精子の運動精子率の階層別の比較

凍 結 方 法	融解後30分の運動精子率(%)			融解後120分の運動精子率(%)		
	<25	25~30	30≧	<25	25~30	30≧
ベ レ ッ ト 法	12.8	27.6	59.6	95.7	4.3	0
ス ト ロ ー 法	27.6	42.6	29.8	55.3	36.2	8.5

1) 数値は8個体47サンプルの各階層の比率を表す。

類した結果を表1に示した。融解後30分では、運動精子率が25%未満の階層のサンプル数の比率は、ベレット法がストロー法より低く(12.8%対27.6%)、運動精子率が30%以上の階層では、ベレット法がストロー法より高かった(59.6%対29.8%)。融解後120分では、運動精子率が25%未満の階層ではベレット法が高く、25~30%と30%以上の階層ではストロー法の方が高かった。

全サンプルの凍結融解後30分の運動精子率を、図2にグラフで示した。ストロー法で運動精子率が20%以上が得られたサンプルでは、ベレット法においても20%以上が得られているが、ベレット法では運動精子率で20%以上が得られたサンプルであっても、ストロー法では20%以下のサンプルもあった。このことは、ベレット法はストロー法より安定した凍結精液が得られることを示している。

個体別の凍結融解後30分の、運動精子率の比較を図3に示した。ベレット法かストロー法より高い個体(Na 2, 4, 15)と、ベレット法とストロー法がほぼ等しい個体(Na 3, 5, 7, 9, 16)が認められた。融解後120分では、融解後30分でベレット法が高い個体であっても、同じか逆にストロー法の方が高くなった。

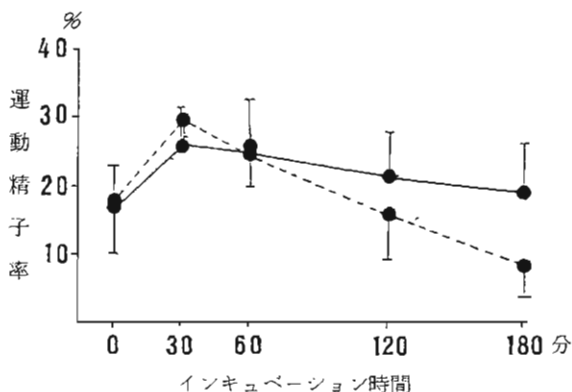


図1 ベレット法とストロー法による凍結融解後の精子生存性
n = 47
●.....● : ベレット法
●——● : ストロー法

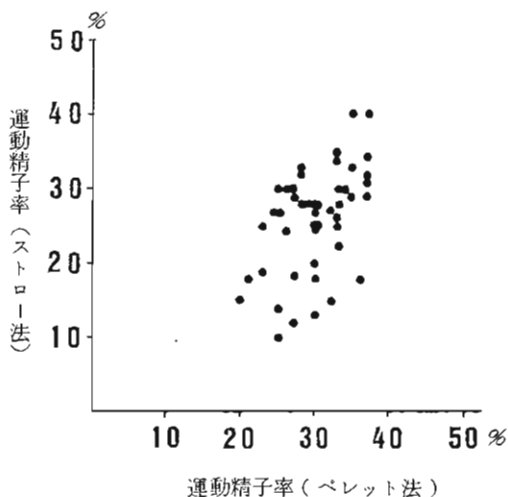


図2 ベレット法とストロー法による凍結融解後の精子生存性
n = 47 運動精子率は融解後30分の値を示す。

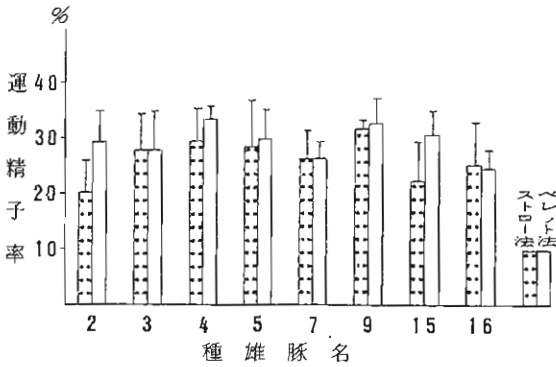


図3 ペレット法とストロー法による種雄豚別精子の凍結融解後の精子生存性
運動精子率は融解後30分の値を示す。

考 察

本試験の結果では、ストロー法はペレット法より凍結融解後30分では劣るが、120分または180分では優れていた。このことから、凍結融解後の精子の活力判定は現在15～30分後に実施するのが一般的であるが、凍結方法が異なる凍結精液の活力を判定する場合には、凍結融解後30分以外に120分または180分も検査する必要があると思われる。副島ら(1983)³⁾はペレット法とストロー法について比較し、凍結融解後30分および120分の精子生存指数はペレット法の方が良かったと報告しており、融解後30分では今回の結果と同様であったが、120分では逆の結果であった。しかし、この場合のストロー法は、今回用いた方法と違っていたので同一に比較することはできない。

ストロー法とペレット法の受胎試験の結果では、川倉ら(1984)⁴⁾が、ストロー法は凍結融解後の精子の活力では劣るが、受胎率では逆に良かったと報告している。しかし、Johnson(1985)⁵⁾は、1970年から1985年までに行われたストロー法とペレット法の受胎試験の結果では、両者に差がないと報告している。

ペレット法よりストロー法の方が、凍結融解後の運動精子率のバラツキが大きい原因としては、ペレット法はドライアイス上で0.2 mlの少量をほぼ同一条件で凍結できるのに対して、ストロー法は凍結容量が5 mlと多く、また液体チッソの液面上5 cmで凍結するので、凍結条件に差ができることが考えられる。

豚の凍結精液を製造する場合、ペレット法かストロー法かは迷うことである。ペレット法が優れている点は、融解の簡便さや取り扱い時の安全性があり、ストロー法が優れている点は、製造の簡便さ、衛生状態および保存容量がある。製造コストは、大きな違いはないと思われる。ペレット法とストロー法は一長一短があるので、どの点に重点をおくかによって決定することが必要である。判断の基準としては、受胎率と産子数を考慮することが

第一であるが、実用的には製造の簡便さ、保存容量、衛生状態、融解の簡便さ、コストおよび取り扱い時のストローの破裂の危険性を無視することはできない。本研究においては、凍結融解後の精子生存性について検討したが、更に受胎率と産子数について検討する必要がある。

文 献

- 1) PURSEL, V. G. and L. A. JOHNSON: 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. Tierrzt. Wschr., 82, 261-267, 1975.
- 3) 副島昭彦・榊田博司・和出 靖・松川善昌: 豚凍結精液におけるペレット凍結, 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.
- 4) 川倉一彦・副島昭彦・榊田博司: ストロー法による豚精子の凍結保存(予報). 人工授精研誌, 6(2), 61-63, 1984.
- 5) JOHNSON, L. A.: Fertility results using frozen boar spermatozoa; 1970 to 1985. In: L. A. JOHNSON and K. LARSSON(Eds), Deep Freezing of Boar Semen. Swedish Univ. Agric. Sci., Uppsala, Sweden, 199-222, 1985.