

# 豚精子の凍結保存に関する研究

## I 錠剤化豚凍結精液による受胎・分娩例

伊藤米人\*・加藤巳之吉\*・秋永達雄\*

## Studies on Deep Freezing Storage of Boar Spermatozoa

### I Conceptions and Farrowings by Pelleted Frozen Boar Semen

Yoneto ITOH, Minokichi KATO, Tatu AKINAGA

#### (要 旨)

1983年12月～1984年2月の間に当場飼養のランドレース種、デュロック種の種雄豚から精液を採取し、その濃厚部を希釈処理（グリセリンの終末濃度は1%）後ベレット法により0.2 mlづつドライアイス上で凍結し液体窒素中に保存した。79日～133日間保存した凍結精液を1産後自然に発情再起したランドレース種雌豚4頭に、ラスパイレス式豚用注入器を用い子宮頸管内に1発情について2～3回それぞれ人工授精した。授精に用いた凍結精液の融解後の活力は43～45%、1回の授精に用いた生存精子数は $14.4 \times 10^8 \sim 21.1 \times 10^8$ 、精液量は40～60 mlであった。

授精は、雌豚6523には59年4月14・15日、6557には4月15・16日、6677には4月24日、6655には4月26・27日に実施した。その結果、6523が8月7日に4頭、6655が8月22日に6頭の子豚を分娩した。子豚は全て正常であり順調に发育した。

以上のように、ベレット法で凍結した豚凍結精液により4頭の雌豚に人工授精した結果、2頭の受胎・分娩例を得た。

#### ま え が き

豚凍結精液を利用するメリットは、優良種雄豚を有効に利用できることにある。牛においては、POLGE & ROWSON (1952)<sup>1)</sup>が凍結精液によりはじめて受胎例を得て以来、現在では、凍結精液による人工授精は世界各国で実用化されている。

豚においては、1970年代に入り著るしく凍結処理技術が進歩し多くの受胎・分娩例が報告されているが、現在のところ実用化するにはまだいくつかの問題点を残している。

すなわち、1970年以前では、HESS, LUDWICK & MARTIG (1957)<sup>2)</sup>, HOFFMAN (1959), BAIER (1962)<sup>4)</sup>が受胎・分娩例を報告したが再現性にとぼしかった。わが国では、和出、副島、枘田 (1969)<sup>5)</sup>が薄層凍結精液により子宮頸管内への注入の方法で受胎・分娩例を得た。1970年代に入りPOLGE SALAMON & WILMUT (1970)<sup>6)</sup>が外科的に雌豚の卵管内に注入して

受精卵を得た。ひき続き、CRABO & EINARSSON (1971)<sup>7)</sup>, GRAHAMら (1971)<sup>8)</sup>, PURSEL & JOHNSON (1971)<sup>9)</sup>は、液状精液と同様に子宮頸管内へ注入する方法による受胎、分娩成績を報告し、以後多くの報告がされた。わが国においても、番場、飯田、小島 (1972)<sup>10)</sup>, 原島ら (1974)<sup>11)</sup>が薄層凍結精液による受胎・分娩例を報告した。

その後、PURSEL & JOHNSON (1975)<sup>12)</sup>は、ベレット法による新しい融解方法での受胎成績を報告し、WESTENDORFら (1975)<sup>3)</sup>は、大型ストローによる受胎・分娩成績を報告した。

今回、著者らは、ベレット法によりPURSEL & JOHNSON (1975)の方法（Beltsville法）に準じて凍結融解を行ない、受胎・分娩例を得たので報告する。

#### 材 料 と 方 法

##### 1. 供試精液

供試精液は、本場飼養のランドレース種3頭、デュロ

ック種1頭から採取した精液を用いた。精液の採取は、手圧法によって行ない、精液の濃厚部と希薄部とを分離採取し濃厚部のみを用いた。膠様物は、採取時に採取ビンの口にガーゼをかぶせ分離除去した。精液の検査は常法により行った。

## 2. 精液の処理と凍結方法

採取した精液は、20℃～24℃の室温中に約2時間放置後、500gで20分間遠沈し上澄液を除去した後、第1次希釈液を精子1に対して3の割合で加えて希釈し駒込ピペットで攪拌した。希釈した精液は室温の水を入れた合成樹脂製の500mlのビーカーに遠沈管又は試験管のまま移し、5℃の恒温器内に入れ約2時間を要して5～7℃に冷却した。冷却した精液にグリセリン2%を含む第2次希釈液を入れ混合した後、直ちにNAGASE & NIWA<sup>14)</sup>の方法によりペレット状に凍結した。ペレットの大きさは0.2mlとし、約50錠づつをペレットケーンに入れ液体窒素中に保存した。希釈液は、BTS<sup>12)</sup>を修正したTF-1<sup>15)</sup>を使用した。

## 3. 融解方法と人工授精

79～133日間保存した10ml相当の凍結精液(1ケーン)を液体窒素中から取出し、発泡スチロールの容器に移し室温で2～3分間静置した。静置後、50～55℃の融解液40mlを入れた250ml容量のビーカー中に錠剤を投入し完全に融解するまで静かに攪拌した。精子生存率は43～45%、注入精液量は40～60ml、注入した生存精子数は $14.4 \times 10^8 \sim 21.1 \times 10^8$ であった。

人工授精は、ラスパイレス式豚用注入器を用い、液状精液と同様に子宮頸管内に注入した。1発情当りの授精回数は2～3回であった。

## 4. 供試雌豚

供試した雌豚は、ランドレース種の1産後自然に発情再起した豚で、離乳日から授精までの日数は6523は12日、6557は18日、6677は27日、6655は26日であった。

Table 1. Motility of post-thawing boar spermatozoa used in conception trials (%)

Name of inseminated semen	Incubation period at 37°C (min.)						
	0	15	30	60	90	120	180
L58-83	35	40	45	40	30	23	15
L58-44	38	45	45	43	40	33	28
L58-26	34	38	44	41	35	32	19
D56-55	35	40	43	38	35	30	13

## 結果と考察

### 1. 結果

受胎・分娩成績は、table3に示した。6523は、離乳後、12日、13日目の59年4月14日、15日に3回授精したところ受胎を確認し、8月7日に4頭(雌4)分娩した。子豚の生時体重は、1.3kg～1.7kgで外見上異常は認められず、その後の生育も順調であった。6523の子豚数は1産目に4頭で、今回は4頭と少なかったが、この少ない原因が供試した雌側にあったか凍結精液側にあったかは不明である。

6557は、離乳後18日、19日目の59年4月15、16日に2回授精したが受胎しなかった。授精に用いた精液は、生存率45%で活力も比較的良好であった。6557は、その後の発情周期がはっきりせず 廃用と殺した。

6677は、離乳後27日目の4月24日の午前と午後授精したが5月14日再発情が認められ受胎しなかった。その後、6月24日に自然交配し8月22日に3頭の子豚を分娩した。

6655は、離乳後26日と27日目の4月26日と27日に授精したところ受胎し、8月22日6頭(雌5雄1)の子豚を分娩した。子豚は、生時体重1.4～1.6kgで外見上異常は認められず、その後の生育も順調に進んだ。

Table 2. Properties of post-thawing boar semen

Sows	Name of inseminated semen	Days of etorage at-196°C	Sperm motility (%) <sup>a)</sup>	Volume of semen inseminated (ml)		No. of motile sperm inseminated ( $\times 10^8$ )	
6523	L 58-83	120, 79, 80	45, 45, 45	50, 50, 40	18.0, 18.0, 14.4		
6557	L 58-44	97, 98	45, 45	50, 40	20.3, 16.2		
6677	L 58-26	89, 89	44, 44	50, 60	17.6, 21.1		
6655	D 56-5	132, 133	43, 43	50, 50	17.2, 17.2		

a) Motility of post-thawing spermatozoa incubated at 37°C for 30 minutes.

Table 3. Results of conception trials with frozen-thawed boar semen

Sows	Name of inseminated semen	No. of inseminations	conception	Litter size
6523	L 58~83	3	+	4 (♀4)
6557	L 58~44	2	-	
6677	L 58~26	2	-	
6655	D 56-5	2	+	6 (♀5, ♂1)

このように、ペレット法で凍結した豚凍結精液を1産した雌豚4頭に人工授精したところ、2頭が受胎し分娩した。分娩した子豚は、それぞれ4頭と6頭で外見上異常は認められず出生後の発育も順調に進んだ。

## 2. 考 察

今回の報告の目的は、受胎・分娩例の報告であるので受胎成績としての考察は無理があるが、若干検討を加えると次のようである。

受胎結果と注入した精子生存性との関係では、4頭の雌豚に注入した精子の生存性がほぼ同じであったにもかかわらず2頭だけが受胎し、2頭は不受胎であった。不受胎であった雌豚の授精に供されたL 58~44は一番良好な精子生存性を示していた。したがって、今回の結果においては不受胎の原因を精子生存性以外の他の要因に求めるのが妥当であると思われる。

受胎結果と注入した生存精子数との関係では、授精した生存精子数は $14.4 \times 10^8 \sim 2.11 \times 10^8$ の範囲で、受胎した場合の精子数は、それぞれL 58~83が $14.4 \times 10^8 \sim 18.0 \times 10^8$ 、D 56~5が $17.2 \times 10^8$ であり、 $20 \times 10^8$ 程度あれば受胎は可能であった。ただし、産子数が4頭と6頭と少なく、この原因が精子数にあるか他の要因にあるかは検討の余地がある。受胎結果と授精回数との関係では、table 1のように一般的に凍結融解後の精子の生存時間は短いので、授精適期に授精したかどうかの意味において重要であろう。

今後、豚凍結精液による人工授精の実用化を図るためには、受胎率と産子数について検討する必要がある。現在までに、受胎率と産子数についての報告は多くされているが、その主な報告のいくつかは次のとおりである。

わが国では、和出・副島・柘田(1977)<sup>16)</sup>が薄層凍結精液により20頭授精し14頭(受胎率70%)が受胎し、平均8頭の産子数を得たと報告した。円羽・橋爪<sup>17)</sup>(1981)は、ペレット凍結精液により23頭に授精し13頭(56.5%)したがうち2頭が流産したため8頭(47.8%)が分娩し平均産子数は7.8頭(3~15頭)であったと報

告している。諸外国では、WESTENDORFら(1977)<sup>18)</sup>が大型ストロー凍結精液により126頭に授精し84頭(66.7%)が受胎し平均産子数は8.5頭であった。JOHNSONら(1981)<sup>19)</sup>は、ペレット凍結精液により202頭に授精し95頭(47%)が受胎し平均産子数は7.4頭であったと報告した。このように凍結精液の場合は、液状精液に比較して受胎率で約30%低く、産子数も平均3頭少ないようである。

以上、本試験において、当场飼養の種雄豚から製造した鈍剤豚凍結精液により2例の受胎・分娩例を得た。

今後は、ペレット法について受胎試験を重ねるとともに、凍結、融解の諸条件の検討、精子の耐凍性調査について実施し、更に、大型ストロー法についても検討したい。

稿を終るに当たり、御指導、御校閲を賜った東京農業大学丹羽太左衛門教授ならびに農林水産省畜産試験場繁殖部繁殖第1研究室柘田博司室長に深謝します。

## 参 考 文 献

- 1) Polge, C., & L. E. A. Rowson (1952): Fertilizing Capacity of Bull Spermatozoa After Freezing at  $-79^{\circ}\text{C}$ . *Nature*, 169: 626.
- 2) Hess, E. A., H. S. Teague, T. M. Ludwick & R. C. Martig (1957): Swine Can Be Bred with Frozen Semen. *Ohio Fm. & Home Res.*, 42: 100.  
(Dolge, C., S. Salamon, I. Wilmut (1970): *Vet. Rec.*, 87: 424. より引用)
- 3) Hoffman, H. H. (1959): Versuche Zur Frostkonservierung des Ebersamens. Die Methodik der Tiefkühlung von Ebersperma. *Vet-med. Dissertation, Tierärztl. Fak., Ludwig-Maximilian- Univ., Munich*. 45.  
(Palge, C., S. Salamon, I. Wilmut (1970): *Vet. Rec.*, 87: 424. より引用)
- 4) Baier, W. (1962): *Zootec. Vet.*, 17: 94. (Polge,

- C., S. Salamon, I. Wilmut (1970): *Vet. Rec.*, 87: 424. より引用)
- 5) 和出(靖), 副島(昭), 栢田(博) (1969): 豚精液の凍結保存に関する研究 1. 急速凍結精液の精子生存性について. 日畜会報 (Supple.), 39: 142.
- 6) Polge, C., S. Salamon, I. Wilmut (1970): Fertilizing Capacity of Frozen Boar Semen Following Surgical Insemination. *Vet. Rec.*, 87: 424.
- 7) Crabo, B. & S. Einarsson (1971): Fertility of Deep frozen Boar Spermatozoa. *Acta Vet. Scand.*, 12: 125.
- 8) Graham, E. F., A. H. J. Rajammanan, M. K. L. Schmell, M. Marki - Laurila & P. E. Bower (1971b): Fertility Studies with Frozen Boar Spermatozoa. *A. I. Dig.*, 19 (6): 6.
- 9) Pursel, V. G. & L. A. Johnson (1971): Fertility with Frozen Boar Spermatozoa. *J. Anim. Sci.* 265.
- 10) 番場(公), 飯田(勲), 小島(義) (1972): 豚凍結精液による受胎例について. 家畜繁殖誌 18 (1): 37.
- 11) 原島(昇), 森山(則), 上坂(建), 剣持(計) (1974): 豚凍結精液による1受胎分娩例について. 凍結精液研究会報, 42: 14.
- 12) Pursel, V. G. & L. A. Johnson (1975): Freezing of Boar Spermatozoa - Fertilizing Capacity with Concentrated Semen and a New Thawing Procedure. *J. Anim. Sci.* 40: 99.
- 13) Westendorf, P., L. Richter und H. Treu (1975): Zur Tiefgefrierung von Ebersperma - Labor - und Besamungsergebnisse mit dem Hülsenberger Pailletten - Verfahren. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 82: 261.
- 14) Nagase, H. & T. Niwa (1964): Deep Freezing Bull Semen in Concentrated Pellet Form. 1. - Factors Affecting Survival of Spermatozoa. *Vth Int. Cong. Anim. Reprod. and A. I.*, Trento, 4: 410.
- 15) 副島(昭), 栢田(博), 和出(靖), 松川(善) (1983): 豚凍結精液におけるペレット凍結, アルミパック凍結およびストロー凍結の比較. 人工授精研誌, 5 (1): 6.
- 16) 和出(靖), 副島(昭), 栢田(博), 原島(昇) (1977): 家畜精液の液体及び凍結保存に関する研究 (II. 豚凍結精子の生存性及び受胎力). 家畜繁殖誌 23 (3): 105.
- 17) 円羽(太), 橋爪(力) (1981): 錠剤化法による豚精液の凍結保存に関する研究. V. 受胎試験成績について. 岩手大農, 家畜人工授精研報 3: 24.
- 18) Westendorf, P., L. Richter, H. Treu, F. - W. Heidecke und F. Zimmermann (1977): Zur Tiefgefrierung Von Ebersperma (Besamungsergebnisse mit dem Hülsenberger Pailletten - Verfahren). *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 84: 41.
- 19) Johnson, L. A., J. G. Aalbers, C. M. T. Willems & W. Sybesma (1981): Use of Boar Spermatozoa for Artificial Insemination. - 1. Fertilizing Capacity of Fresh and Frozen Spermatozoa in Sows on 36 Farms. *J. Anim. Sci.*, 52: 1130.