

凍結精液の実用化に関する試験

I 凍結精液の島嶼に対する輸送，ならびに授精試験

秋 永 達 雄 嶋 島 敏 男 荒 岡 昭 司
 浅 沼 二 郎 入 交 義 孝 鎌 川 登

1. まえがき

昭和42年度において、けい養種雄牛の耐凍性、保管方法ならびに野外授精の一連の試験を実施し、実用化についての一応の基礎資料を得たが、行政面からの要望もあり、島嶼における凍結精液の利用方式を確立するため、三宅島を対象に凍結精液を輸送し、液体窒素（以下 LN_2 という）の補給，ならびに野外授精による受胎性につき検討したので、その概要を報告する。

2. 試験材料ならびに方法

當場けい養の種雄牛，第4キングベツシークレストの精液を， LN_2 ガスによる急速凍結法により凍結を行なつた。使用した稀釈液は，凍結用セミナンで，供試精液の性状は，表-1のとおりである。

表-1

区分	凍 結 年 月 日	採 取 時				稀釈 倍率	G平衡 時 間	凍結前 活力	凍結直後 活力	60日目 活力
		採精量 $m\ell$	P.H	精子数 $\text{億}/m\ell$	活力					
A	43.7.1	6.5	5.9	13.0	775	10	18	70	40	40
B	43.7.25	9.0	6.4	12.7	70	10	18	70	45	45

精液は，43年10月4日に現地（東京都審試三宅分場）保管用の保管器（LR-35-9）を使用して輸送した。

LN_2 は，30L型補給容器（東理社製）を使用し，輸送中の事故を防ぐため木枠を作成し，これに収納して輸送した。

LN_2 の補給の方法は，発送の前日に工場（東洋酸素KK，都下国分寺市）で LN_2 を充填し，場から芝浦港までは，小型トラックで輸送（所要時間，約2時間）し，芝浦から三宅分場までは東海汽船に依託して輸送した。なお，補給の間隔は，現地における保管器の LN_2 の消耗を考慮し， LN_2 の残量が保管器全容量のおよむね $\frac{1}{3}$ ぐらいを限度として行なつた。

LN_2 の消耗量については，補給の回次毎に発送時と，現地到着時に LN_2 の量を計量すると同時に保管器への充填量を計量した。

保管器の消耗については、おゝむね10日毎にLN₂の残量を計量し、保管器収容の室内気温を毎日記録した。

現地保管精液による野外授精試験は、島内飼養の雌牛で、繁殖障害のない健康牛を対象に、分場職員が深部注入により授精した。融解の方法は、はじめ、サブ融解を行ない、農家までは、液状精液と同じく、携帯用保存器(+4°C)で携行の予定であつたが、対象牛が、分場周辺に集中したため、分場に牽付けたものが多く、従つて結果的には、庭先融解と同じとなつた。なお、授精試験の時期は、43年11月から44年3月までである。

3. 試験成績ならびに考察

(1) 野外授精による受胎率

野外授精による結果は、表-2のとおりで、延44頭に授精を行なつたが、うち18頭が受胎(直検法による)し、初回授精当たりの受胎率は、40.9%であつた。対照区における同期の液状精液の受胎率(60日~90日NR)は42.3%であり、従つて、NR法による受胎率の誤差を考慮すると、液状精液と比較しても、受胎率にほとんど差は認められない。

次に供試精液の凍結月日別で見ると、A区は25.0%、B区では46.9%で両区の間で21.9%の差があつたが、その原因が、凍結のテクニクによるものか、あるいは授精時期によるものかは、例数が少なく、明らかにすることはできなかつた。たゞ、今日の試験は、器具の整備等諸般の事情もあつて、凍結精液の作成を一般的に好ましくないとされている7月に実施せざるを得なかつたこともあり、今後、受胎率の向上を図るためには、凍結時期について考慮する必要があると思われる。

表-2

		授 精 数	受 胎 数	不 受 胎 数	受 胎 率
凍 結	A	12	3	9	25.0
	B	32	15	17	46.8
	計	44	18	26	40.9
液 状		52	22	30	42.3

(2) 冷媒(LN₂)の消耗

ア. 輸送および移し替えによる消耗

30L型補給容器を使用して、43年10月から44年3月までの間に、延6回にわたって、 LN_2 の補給を行なつたが、輸送中（本場発送より三宅分場着まで）における LN_2 の消耗は表-3のとおりである。すなわち、輸送所要時間の最高は238時間、最低は26時間、平均93時間であり、 LN_2 の消耗率の最高は44.3%（重量比）；最低は1.6%；平均は16.7%であつた。なお輸送に238時間を要した事例は、海上輸送の途中、台風に遭遇したことによるものである。

表-3

	本場より発送 年 月 日 時	三宅分場到着 年 月 日 時	輸送所 要時間	発送時 充塲量	到着時 残 量	輸送中 消耗量	輸送中 消耗率
				Kg	Kg	Kg	%
1	43.10.18 10.00	43.10.28 8.00	238.00	24.4	13.6	10.8	44.3
2	43.11.1 9.00	43.11.31 11.30	50.30	23.6	20.9	2.7	11.4
3	43.11.29 9.00	43.11.30 11.20	26.20	24.2	23.8	0.4	1.6
4	43.12.24 9.00	43.12.26 9.00	48	24.2	22.2	2.0	8.3
5	44.1.23 9.00	44.1.28 8.10	120	24.2	19.2	5.0	20.7
6	44.3.1 10.00	44.3.4 14.30	76.30	21.1	18.1	3.0	14.2
平均						4.0	16.7

補給容器から精液保管器（LR-35-9）へ充塲する際の消耗は、表-4のとおりで1回当りの消耗率は最高が19.9%、最低は0.6%、平均8.8%で、かなりの差が認められたが、原因は充塲時のクライオセット（ LN_2 取出装置）操作の不馴れによるものと考えられる。

表-4

	移し替え 月 日	移し替え前 のLN ₂ 量	保管器えの 充 填 量	移し替えに よる消耗量	同 左 消 耗 率
1	43, 10, 28	13.6 Kg	10.9 Kg	2.7 Kg	19.9%
2	43, 11, 4	20.2	18.9	1.3	6.4
3	43, 11, 30	17.7	15.7	2.0	12.7
4	43, 12, 26	17.0	15.6	1.4	8.2
5	44, 1, 28	19.2	18.3	0.9	4.7
6	44, 3, 4	18.1	18.0	0.1	0.6
平均				1.4	8.8

1. 保管器の消耗

現地保管に使用した保管器(LR-35-9)のLN₂の消耗について、43年10月から44年4月まで、保管器を常温下に静置して調査した。

旬別の平均室温ならびに、1日平均開口回数および、1日平均LN₂消費量は表-5のとおりである。旬別の消費量をみると、最高が0.75Kg、最低は0.47Kg、平均0.607Kgであつたが、平均室温とLN₂の消費量との間には、特に関係は認められなかつた。また保管器の開口回数については、実用化した場合を想定して、特に一定にしなかつたが、開口回数とLN₂の消費量についても関係は認められなかつた。

表-5

月別 旬別	10			11			12		
	上	中	下	上	中	下	上	中	下
平均室温	20.9	19.0	18.1	19.8	16.2	18.0	17.2	15.2	13.2
1日平均 開口回数	0.14	0.20	0.09	0.50	0.30	0.30	0.50	1.09	0.91
1日平均 消費量(Kg)	0.571	0.630	0.527	0.700	0.590	0.650	0.590	0.590	0.631

1			2			3			4			計		
上	中	下	上	中	下	上	中	下	上	中	下	最高	最低	平均
9.6	10.6	14.2	12.3	13.8	10.5	11.2	12.4	16.0	15.1			20.9	9.6	14.9
0.70	0.70	0.18	—	0.20	—	0.20	0.20	0.09	0.10					
0.750	0.470	0.582	0.590	0.600	0.600	0.600	0.570	0.573	0.620			0.750	0.470	0.607

3. 要約

島嶼における凍結精液の実用化にそなえ、その利用方式確立の基礎資料を得るため、三宅島を対象に凍結精液を輸送し、現地保管の上、 LN_2 の補給ならびに受胎性について試験した結果、次の成績を得た。

- (1) 島内雌牛44頭を対象に野外授精を行ない、その初回当たりの受胎率は40.9%であつた。
- (2) 現地保管用の LN_2 の補給は、30L型補給容器を使用して行なつたが、輸送中の LN_2 の消耗は、平均26.7%であり、保管器への充填による消耗は、平均8.8%であつた。したがつて、輸送時の海上の気象条件にもよるが、 LN_2 の補給に当たつては、おゝむね26%程度のロスを見込む必要がある。
- (3) 期間中における保管器(LR-35-9)の LN_2 の1日当たり平均消耗量は、0.607kgであつたが、室温ならびに保管器の開口回数と LN_2 の消耗との間には、特に関係は認められなかつた。

II. 凍結精液の融解後保存に関する試験

秋 永遠雄 楢島敏男 荒岡昭司

1. まえがき

凍結精液の精子活力は、融解後、急速に低下し、凍結精液の利用普及上の課題となつている。融解後の保存性については、分離ストロー法が開発され、従来のストロー法よりもすぐれていることが報告されているので、分離ストロー法の融解後の経過時間に伴う精子活力の変動ならびに受胎性について検討した。

2. 試験材料、および方法

(1) 試験期間

昭和43年4月～8月

(2) 供試精液、および試験方法

場けい養の種雄牛、第4キング ベツシー クレストを供試し、常法によつて採取した精液をそれぞれ2分し、ストロー区(セミナン)および分離ストロー区(BG-Milk)に分け、液体窒素ガスによる急速凍結(LNG使用)を行ない、液体窒素で保管した。

供試した精液の性状は表-1のとおりである。

表-1

採取年月日	採取量	P. H	精子数 億/ml	精子活力	き釈倍率	凍結方法	G平衡 時間	凍結前 活力	凍結直后 活力
43.4.18	5.0	6.2	14.0	卅75	10	ストロー	1.8	卅75	卅45
						分離ストロー	8	卅70	卅40
" 5. 7	5.0	3.4	11.2	卅75	10	ストロー	1.8	卅70	卅50
						分離ストロー	8	卅70	卅45
" 6. 5	8.0	5.3	16.0	卅75	10	ストロー	1.8	卅70	卅50
						分離ストロー	8	卅65	卅45

融解後の精子の保存性については、保管精液を4°Cで融解後、冷蔵庫(4°C)で保管し、経過時間毎(0時間、5時間、10時間、20時間、25時間)に精子の活力を検査した。また、融解後保存精液による授精は、場周辺地区(青梅市、瑞穂町、羽村町)に飼養の民間雌牛で、すでに3回以上種付されたものを除き、かつ生殖器疾患のないものを対象として、保管精液を4°Cで融解保管し、前記経過時間毎に液状精液と同様に扱って、農家の庭先まで輸送し、深部注入による授精を行なった。なお、妊否の判定は、すべて直検法によつた。

3. 成績ならびに考察

(1) 融解後保存時間と活力

融解後保存時間と精子の活力との関係は、表-2に示すとおりである。分離ストロー区においては、融解後20~25時間までほとんど活力の低下は認められなかつたが、ストロー区では、20~25時間で若干活力の低下がみられ20~25時間保存では、明らかに分離ストロー区がすぐれていた。

表-2

	凍結方法	融解後4°C保存期間		
		0	5~10	20~25
1	ストロー	卅45	卅45	卅35
	分離ストロー	卅40	卅40	卅40
2	ストロー	卅50	卅50	卅40
	分離ストロー	卅45	卅45	卅45
3	ストロー	卅50	卅50	卅50
	分離ストロー	卅45	卅45	卅45

② 融解後保存時間と受胎率

融解後保存時間と受胎率についての野外授精試験の結果は、表-3のとおりであつた。融解後保存時間別の受胎率は、0時間（融解直後）では、ストロー区が33.3%、分離ストロー区では36.4%と分離ストロー区がやゝよく、融解後5~10時間では、ストロー区が28.6%に対し、分離ストロー区は44.5%と明らかに分離ストロー区がすぐれていたが、20~25時間では両区ともそれぞれ33.8%で差はなかつた。また、凍結方式別でみた全体の受胎率では、ストロー区が32.0%、分離ストロー区は38.5%であつて、分離ストロー区の方が若干高い受胎率が得られた。

以上のような成績であつたが、今回の試験は、野外授精の例数も少なく、したがつて、融解後の使用可能の限界については明らかにできなかつたので、今後さらに追試が必要と思われる。

表-3

融 解 後 保 存 時 間	区 分	授 精 頭 数	受 胎 頭 数	不 受 胎 頭 数	受 胎 率
0	ストロー	12	4	8	33.3%
	分離ストロー	11	4	7	36.4
5~10	ストロー	7	2	5	28.6
	分離ストロー	9	4	5	44.5
20~25	ストロー	6	2	4	33.3
	分離ストロー	6	2	4	33.3
計	ストロー	25	8	17	32.0
	分離ストロー	26	10	16	38.5