

凍結精液の実用化に関する試験

遠畑 亮、 栖島 敏男

荒岡 昭司

凍結精液については、従来のストロー法から錠剤化凍結精液、さらには分離ストロー法式へと技術は急速に進展し、一部の県では、すでに全面的に実用化に移行している。都においては人工受精組織の欠如、あるいは都市近郊酪農特有の改良繁殖にたいする軽視など、普及上多くの問題があるとして、凍結精液についての検討はおこなわれていなかった。

しかし、最近、更新牛の入手難から、酪農学の間には優良素牛を自家生産するものが増加し、繁殖への関心が高まってきたこと、あるいは島嶼における乳牛人工受精についての制度的検討の過程などから、凍結精液実用化の要請が提起された。そこで昭和41年度国の助成を受け、凍結保存器具一式も整備出来たので、昭和42年より凍結精液による人工受精の実用化に必要な一連の基礎的試験調査を実施することとした。

1. 調査項目

- (1) 繁養種雄牛精液の耐凍性の検討
- (2) 耐凍性良好種雌牛のグリセリン平衡適正時間の検討
- (3) 凍結精液の保存成績
- (4) 野外授精試験成績
- (4) 液体窒素消費量の調査

なお、この試験において稀釈液はすべて凍結用セミナンを使用した。

2. 成績

(1) 繁養種雄牛精液の耐凍性

42年4月、精液採取時に原精液を1ccづつ採取し、全繁養種雄牛について耐凍性を検査した。検査方法は、10倍稀釈、グリセリン平衡時間18時間、寒剤はドライアイス(以下DIという)を用い、一段階凍結とし、全牛について2回づつ実施した。

その結果表-1のように耐凍性の比較的良好と認められるものは22L・4K・A・p・10p号の4頭であった。しかし、A・p号は精液採取が安定しないのでA・p号以外の3頭について次の試験に移った。

表 1 凍結能検査成績

品 名	採取時活力	凍結後活力
バターボーイ トリスターミドリB・B	75 卍	15 卍
第22 ローモント フィマールホープ22L	70 卍	40 卍
第4 キングベッシー クレスト4K	75 卍	30 卍
アールチェ・ロベル ポッシュュバレードA・p	75 卍	40 卍
第3 バターボーイ トリスターミドリ3B	80 卍	5 +
第10 サブリリー ジェマイマ10p	65 卍	40 卍
第4 サーチレマック カストスKS	70 卍	15 卍

(2) グリセリンの平衡(以下G平衡という)適正時間の検討

上記3頭の種雄牛について、予備試験として原精液を10倍に稀釈し、B液添加完了後2、3、4、5、6、7、9、12、15、18、21の各時間にDIによる一段階凍結をおこない鏡検した、その結果5時間以前はすべて15卍以下であったので、6、9、12、15、18、21の各時間について、さらに本試験を実施した。なお、この際連続2回採取もおこない、1回採取精液と2回目採取精液とについて凍結後の活力の比較もおこなった。

表 2 G平均適正時間の検査成績

名号	区別	6時間	9時間	12時間	15時間	18時間	21時間
22L	1回目採取	30 卍	35 卍	40 卍	45 卍	50 卍	50 卍
	2 "	20	35	40	45	55	50

4K	1回目採取	20	35	30	30	40	45
	2 "	25	30	30	35	35	45

10p	1回目採取	20	25	30	30	25	35
	2 "	15	25	25	25	40	50

予備・本試験の結果から3頭の種雄牛のG平衡適正時間は15時間以降にあることが認められ、またこの場合連続2回目採取精液がとくに良好ということはみられなかった。

なお、以上の試験は寒剤としてDIを用いたのであるが、その後窒素ガス(以下LN₂とい

う)の入手が可能となったので LN_2 を用いて追試をおこなった。検査は8倍希釈、G平衡時間15、18、21、24時間の四段階において凍結した精液についておこなった。凍結はリンデン社製 NL_2 保存器 LR-10に約3.2kgの LN_2 を入れ、キャニスターが LN_2 にわずかに接触する程度にしておこなった。その成績は表3のとおりである。

このように22L・4K・10p号のそれぞれのG平衡適正時間は、21、15、18時間がわづかながよい結果をしめしていた。そこで、寒剤としてDIを用いた場合の成績も考慮し、それぞれの種雄牛のG平衡適正時間を表-4のように決定した。

表3 G平衡適正時間検査成績 (LN_2 ガス使用)

名号 \ 時間	15時間	18時間	21時間	24時間
22L	35冊	35冊	45冊	40冊
4K	60	50	50	50
10p	35	50	45	35

表4 グリセリン平衡適正時間

名 号	G平衡適正時間帯
22L	18~21時間
4K	15~18 "
10p	18~21 "

(5) 凍結精液の生産および保存成績

凍結精液の採取時における性状その他は表5のとおりである。

表5 凍結保存精液の採取時性状、その他

名号	採月日	採取量	p. H	活力	精子数	最終倍率	G平衡時間	備 考
22L	⁴² 5.18	6.0	6.2	80冊	10.5億	8倍	18時間	連続2回目採取精液
22L	5.23	6.0	6.0	75冊	8.8	"	21 "	
4K	5.23	4.0	6.3	75冊	8.3	"	18 "	連続2回目採取精液
4K	5.26	7.0	6.2	80冊	13.1	"	18 "	
10p	5.15	10.0	6.0	80冊	10.6	"	18 "	連続2回目採取精液
10p	5.26	6.0	6.4	75冊	10.4	"	18 "	

この精液を凍結後、所定の日時に4℃水中で融解して鏡検した。現在までの成績は表6のとおりで凍結後20日の時点で、殆んど活力の低下はみられない。

表 6 凍結精液の保存成績

品名	採取月日	稀釈時活力	凍結直後活力	凍結3日後活力	7日	14日	20日	30日	60日	90日	120日	150日	200日	250日	365日
22L	42 5.18	80 ⁺⁺⁺	54	45	45	45	45	45	45	50	45	50	45		
22L	5.23	75 ⁺⁺⁺	50	50	50	50	55	55	45	50	50	40	40		
4K	5.23	75 ⁺⁺⁺	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40		
4K	5.26	80 ⁺⁺⁺	50	50	50	60	60	55	60	50	50	50	55		
10P	5.15	80 ⁺⁺⁺	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60		
10P	5.26	75 ⁺⁺⁺	60	60	60	55	60	60	60	60	60	50	55		

なお、サンプルにより多少の活力の変動はあるが、実用的には考慮しなくともよい程度の差であった。

(4) 野外受精試験成績

上記精液を凍結保存し、次の要領で野外受精試験を実施した。

試験の期間	昭和42年7月1日～9月30日
対象牝牛	場近在の民間牛で分娩後未交配のもので、かつ内診の上、特に異常をみとめないもの。
輸送および注入方法	DIで農家庭先まで輸送、4℃氷水中で融解後、子宮径管内注入をおこなった。
妊否の判定	直腸検査法による。

その成績は表7および表8のとおりである。なお、同時期におけるそれぞれの種雄牛の液状精液による受胎成績は表9のようになっている。

表 7 野 外 受 精 試 験 成 績

種付実頭数	種付延頭数	受胎頭数	内 訳					受 胎 率		
			1回目		2回目		3回目		実頭数に対する	延頭数に対する
			+	-	+	-	+	-		
67	87	40	32	35	6	10	2	2	59.7%	45.9%

表8 種雄牛、採取月日別授精試験成績

名 名	採 取 月 日	種 付 頭 数	受 胎 頭 数	不 妊 頭 数	受 胎 率
2 2.L	42 5. 18	1 4	8	6	57.1%
"	5. 23	1 5	8	7	60.0%
4. K	5. 23	1 6	6	10	37.5%
"	5. 26	1 7	9	8	52.9%
1 0. p	5. 15	1 4	4	10	28.5%
"	5. 26	1 1	5	6	45.4%
合 計 又 は 平 均		8 7	4 0	4 7	45.9%

凍結精液による受胎率は、従来の当
場における民間牛の受胎率と比較しや
まずぐれている。ただ、今回の試験は
逐別の一般の雌牛の受胎率の低下する
時期に実施したものであり、また、実
験数 67 頭のうち 13 頭は昨秋から本
年春にかけて、北海道より導入された
もので、飼養環境の急変と、暑熱の影

表9 場近在地区における液状精液の推定受胎率

名 号	調査例数	受 胎 頭 数	不 妊 頭 数	受 胎 率
2 2.L	1 5	4	1 1	26.6%
4 K	1 5	5	1 0	33.3%
1 0.p	1 5	7	8	46.6%

〔注〕 42.7～9月における配付例数中 15 例を無作為抽出し 60 日 N R 法により算出

響を強く受けている等の条件があったので、一般的にいってなお、受胎率の向上は期待しうるものといえよう。また、個体別、採取時別の受胎率、あるいは、1 回採取精液と 2 回目採取精液との受胎率には若干の差異があったが、これらの有意性については、今回の試験では例数も少ないので、今後、例数を蓄積して検討したい。

(5) 液体窒素消費量の調査

1 輸送および移し替えによる損失

まず購入先の工場でつめた LN₂ 凍結精液保存器に所定量移し替えるまでに、どの程度損耗するかを調査した。LN₂ 40.8 kg (50 立) をサルフリアン社製 S-50 (内容 50 立) 輸送器を用い、小型トラックで輸送した。輸送所要時間は約 50 分である。輸送直後クライオジェットを用いて米田リンデ社製 LR-10 (内容 8.08 kg …… 10 立) および LR-35 (内容 28.3 kg …… 35 立) 保存器に移し替えた。購入 LN₂ (13 回工場渡し時、初回 80.8 kg 以後 40.4 kg) の輸送および分注による LN₂ の損耗は表 10 のとおりである。

このように 40.4 kg 購入しても、保存器に移し凍結に使用できる LN₂ は平均 27.5 kg 程度しか見込むことができない。

表 10 輸送および移し替えによる LN_2 損耗の記録

購 入 日	購 入 量 kg	損 耗 量 kg	損 耗 率	説 說	明	備 考
42 5. 10	80.8	11.5	14.2%	赤冷却LR35 3本 } に入れる " 10 3本 }		
5. 24	40.4	6.09	15.1		既冷却NR35 3本 } 入れる " " 3本 }	
6. 19	40.4	6.8	16.8		既冷却NR35 3本 } 入れる " 15 2本 }	
7. 8	40.4	5.55	13.7		既冷却NR35 3本 } に入れる	
7. 28	40.4	8.0	19.8		全 上	都合により午後もつ てきた
8. 19	40.4	7.25	17.9		全 上	
9. 16	40.4	5.65	14.0		既冷却NR35 2本 } に入れる	
0. 5	40.4	6.95	17.2		全 上	
0. 31	40.4	7.55	18.7		全 上	
1. 14	40.4	6.8	16.8		全 上	
1. 24	40.4	3.65	9.0		既冷却LR10 1本 } に入れる 赤冷却LR10 1本 } に入れる	
2. 21	40.4	9.45	20.9		既冷却NR35 2本 } に入れる " NR10 2本 } に入れる 既冷却NR35 2本 } に入れる " NR10 2本 } に入れる	
43 1. 12	40.4	6.15	15.2		既冷却LR35 2本 } に入れる	
計又は平均	565.6kg	90.39kg	16.0%			

(40.4 kg = 50 立)

最高最低損耗率

最 高	最 低	平 均
20.9%	9.0%	16.0%

さらに輸送距離・時間・あるいは輸送手段によっては20%程度の損耗を見込む必要がある。

ii 保存器における LN_2 の消耗

保存器内に入れた LN_2 の消耗については、LR-35、LR-10 保存器について5月11日～11月30日までの間、それぞれ室温および4℃恒温室内に置いて調査した。開口は1日1回おこなない、キャニスターはストローが取り出せる程度にあげた。また、今後のナブセンターにおける実際の使用を考えて、授精試験用精液を保存するLR-35 保存器を室温におき、この保存器の中の LN_2 の消耗量も測定した。したがってこの保存器については開口頻度は他に比べて多くなっている。旬別の室温および LN_2 平均消耗量は表11～12のとおりであった。

旬別の平均室温と LN_2 消耗量とをみると、特に関係があるようにみられないが、4℃恒温室と室温に保管した場合とでは、明らかに4℃に保管した方が消耗が少なかった。また、同じ室温で保管した場合でも、開口頻度の多い授精試験用精液保存器の方が LN_2 の消耗量が多く、しかもその差は前の4℃恒温室保管と室温保管との差よりも大きく、精液取り出しなどにもなっておこなり開口頻度が室温差(5℃～10℃)より LN_2 の消耗に大きな影響を与えているよりであった。

したがって、今後は、キャニスター取り出し操作に習熟するとともに1日1回の精液取り出しを励行すれば、保存器を室温においてもかなり LN_2 の消耗を少なくすることが可能と思われる。

つぎにLR-10 保存器は小型(LN_2 充填時重量14 kg)で輸送用に用いられるべきものであるが、表12から単位当りの消耗率を算出してみると表13のとおりでさって、LR-35 保存器に比して LN_2 の消耗率はかなり高くなっている。

以上の結果からLR-35(分注時の保管 LN_2 実量28.3 kg)を使用して保管する場合、凍結保管に必要な最低 LN_2 量を8 kgとすると、次の LN_2 補給時までの許容消耗量は $28.3 \text{ kg} - 8 \text{ kg} = 20.3 \text{ kg}$ となるので、表12の1日当りの消耗量から計算して27日～36日 平均30日毎に LN_2 の補給をおこなえばよいことになる。

表 1 1 室 温 の 変 動

単位 kg

	5 月		6 月		7 月		8 月		9 月		1 0 月		1 1 月		
	上	下	上	下	上	下	上	下	上	下	上	下	上	下	
最 高	26	27	28	28	31	32	33	33	33	30	30	25	23	20	21
最 低	17	18	19	21	22	23	24	26	26	27	25	15	14	13	6
平 均	210	229	234	242	249	261	277	294	281	304	290	190	190	179	181
									262	250	225				143

表 1 2 保 存 器 ; 温 度 別 L N₂ 消 耗 成 績 (1 日 当 り)

単位 kg

	5 月		6 月		7 月		8 月		9 月		1 0 月		1 1 月		計		備 考	
	上	下	上	下	上	下	上	下	上	下	上	下	上	下	最 高	最 低		平 均
4 ℃	0.49	0.40	0.51	0.53	0.48	0.51	0.49	0.45	0.48	0.48	0.51	0.46	0.54	0.50	0.58	0.40	0.49	
LR-35 保 存 器	0.54	0.54	0.56	0.54	0.54	0.59	0.55	0.57	0.56						0.60	0.54	0.56	
室 温	0.56	0.56	0.66	0.72	0.70	0.69	0.64	0.96	0.75	0.70	0.71	0.70	0.66	0.73	0.73	0.56	0.68	
4 ℃	0.23	0.21	0.27	0.22	0.22	0.23									0.23	0.21	0.22	
LR-10 保 存 器	0.26	0.23	0.22	0.27	0.24	0.26									0.27	0.22	0.25	

(注) ・ は 授 精 試 験 使 用 精 液 を 保 存

表 13 保存器別 LN₂ 単位当り消耗率

		LN ₂ 内 容 量 kg	1 日 当 り 平 均 消 耗 量 kg	単 位 当 り 消 耗 率
LR-35	4 °C	28.3 kg	0.49 kg	1.73 %
保 存 室	室 温	"	0.56 kg	1.98 %
LR-10	4 °C	8.1 kg	0.22 kg	2.71 %
保 存 室	室 温	"	0.25 kg	3.09 %

2. 要 約

凍結精液による人工授精の実用化に必要な基礎資料を得るため、(1)種雄牛の耐凍性、(2)グリセリン平衡適正時間、(3)保存成績、(4)授胎率、(5)LN₂消費量、の検討をおこなったが、これを要約すると次のとおりである。

- (1) 場繁養種雄牛7頭のうち、凍結後活力30卍以上の耐凍性良好なものは4頭であった。
- (2) G平衡適正時間は15～21時間の間にあった。
- (3) 保存成績は凍結後200日の時点であるが、殆んど活力の低下はみられない。
- (4) 野外授精試験においては、実頭数に対して59.7%、延頭数に対して45.9%の受胎率であった。
- (5) LN₂の輸送、移し替えによる損耗量は40.4 kg(50立)のLN₂を輸送し、LR-50およびLR-10保存器に分庄するのに約6.5 kg(8立)であって、16%にあたる。また、保存器における消耗は4°C恒温室保存の方が室温保存の方が室温保存に比し、明らかに消耗が少なく、LR-35では4°Cで1日平均0.49 kg(0.6立)、室温で0.56 kg(0.69立)、またLR-10では4°Cで1日平均0.22 kg(0.27立)、室温で0.25 kg(0.3立)であった。
- (6) LR-35を使用した。開口頻度の多い実際の利用状況における消耗は1日平均0.68 kg(0.84立)であった。
- (7) 保管器の開口頻度、キャニスター操作術技の優劣がLN₂消費を大きく左右するとみられるが、LR-35を室温におき精液を凍結保管する場合、LN₂の補給はおおよそ27日～36日とみておけばよい。