

液状精液を活用した牛の受胎率向上技術の開発

佐藤邦雄、山岡達也、後藤雅昭、倉原貴美、滝澤亮、久々宮萌果
大分県農林水産研究指導センター畜産研究部

要 約 牛の液状精液を長期保存できる技術を開発するため、当研究部が開発した豚精液希釈液（HIRO-SWINE® B 液）と従来から豚の人工授精に使用されているモデナ液を活用し、牛の精液を希釈して保存性、受精能、生体での受胎確認の検討を行った。保存性では、液状精液希釈液を 15℃で 14～15 日保存すると精子運動率に大幅な低下が見られ、HB 液はモデナ液より有意に低かった。受精能において、モデナ液で 7 日保管した精子は体外受精試験で 70.6%，15 日保管した精子でも約 40%の受精率を示したことから、モデナ液は牛精子を長期間保存できる希釈液となることが示唆された。生体での受胎確認のための人工授精では、モデナ液での保管 8 日で 3 頭全て不受胎、15 日も 3 頭全て不受胎であったが、保管 1 日後は 3 頭中 1 頭受胎した。

（キーワード：HIRO-SWINE® B 液、モデナ液、SMAS、体外受精試験 体内受精試験）

緒 言

近年、遺伝的要因や飼養環境などの様々な要因により牛の受胎率が低下しており¹⁾、特に酪農家において生産性の低下による経営の悪化が深刻な問題となり、これまでも雄・雌の双方から様々なアプローチで受胎率向上のための対策が検討されている。乳用牛および肉用牛は、現在ほぼ 100%が液体窒素中で半永久的に保存可能な凍結精液を用いた人工授精（以下 AI）により生産されており、既存技術として確立されている。

しかし、凍結精液製造過程で耐凍剤として添加する高濃度グリセリンは、精子の細胞膜だけでなく先体膜の欠損を招き、融解後の精子の受精能を低下させることがわかっており、受胎率を更に向上するためには、より性状の良い精子を雌牛体内に注入することが必要であると考えられる。

一方、豚では凍結精液による AI 技術が実用レベルに達するまでに時間を要したこともあり、液状精液を用いた AI が主流となっている。液状精液は長期間の保存ができない欠点があるものの、より自然交配に近い授精であるため繁殖成績も良好で広く用いられている。2013 年度に当研究部では、豚において、高い繁殖成績を保持したまま精液を 15℃で約 1 週間保管可能とする新たな希釈液を開発し、株

式会社広島クライオプリザベーションサービスを通じて販売を開始し一定の評価を得ることができた。

そこで当研究部が開発した豚精液希釈液（HIRO-SWINE® B 液（以下 HB 液））と従来より豚の AI において使用されているモデナ液を応用し、牛において長期保存できる技術を開発するとともに AI 技術の選択肢を増やすことを目的とした。

材料および方法

試験 1：牛の液状精液希釈液（HB 液，モデナ液）の保存性比較検討

（1）供試種雄牛及び材料

供試種雄牛については当研究部で繋養している松吹雪他 6 頭を使用した。

材料は希釈液として HB 液，モデナ液を使用，供試牛（7 頭）の採精直後の新鮮な精液を用いて，それぞれの希釈液の倍率が 20 倍になるよう希釈，また pH6.5 で調整を行い，液状精液希釈液として計 28 本作成した（表 1）。

（2）測定方法

作成した液状精液希釈液を 15℃の設定した冷蔵保管庫中でそれぞれ保管，0～1，7～8，14～15 日保存後，精子運動解析装置（Sperm Motility Analysis System 以下 SMAS）により計測を行った。

(3) 調査項目

SMAS の解析項目中、精子の生存率、活力に関係が高い精子運動率 (%) について測定した。

表 1 供試した液状精液希釈液

種類	名号	製造日①	製造日②	P H	倍率	n	計
HB液	松吹雪	H30.6.28	—	6.5	20	2	28
	桜蔭福	H30.6.28	H30.7.26			4	
	大也 2 7	H30.6.28	H30.7.26			4	
	睦美幸	H30.7.12	—			1	
	美津久茂	H30.7.12	—			1	
	桜花久	H30.7.12	H30.7.26			4	
モデナ液	松吹雪	H30.7.5	—	6.5	20	2	28
	大也 2 7	H30.7.5	—			2	
	桜蔭福	H30.7.5	H30.7.19			4	
	茂藤竜	H30.7.19	—			2	
	桜花久	H30.7.19	H30.8.2			2	
	—	—	—			2	

試験 2：液状精液を用いた体外受精試験

(1) 供試種雄牛及び材料

供試種雄牛については当研究部で繋養している大也 27 (H27.7.28 生) を使用した。

材料は試験 1 の結果から液状精液希釈液として長期保存しても精子運動率低下が比較的少ないモデナ液を主に使用し、比較対象のため HB 液と凍結精液を用いた。

(2) 供試卵子

と畜場から採取した交雑種 (F1) 卵巢から卵子を吸引し供試した。

(3) 体外受精試験

供試卵子を成熟培養後に液状精液または凍結精液を用いて 6 時間媒精した。その後 48 時間発生培養を行い分割の有無の割合により受精率を判定した。

(4) 調査項目

SMAS の解析項目中、精子運動率 (%) 及び直線速度分布 A クラス (%) ²⁾ 並びに受精率 (%) を測定した(表 2)。

表 2 液状精液及び凍結精液の性状と受精率

番号	種類	経過日数	基本	精子運動率 (%)	直線速度分布	受精率 (%)	n
①	液状精液	6	モデナ	41.1	6.0	68.9	1
②		7		39.7	5.5	70.6	1
③④		8		43.5	2.3	57.5	2
⑤⑥		13		26.6	1.2	46.6	2
⑦⑧⑨		15		29.2±3.6	2.0±0.4	36.8±3.8	3
⑩⑪		8		HB	43.9	12.0	72.8
⑫⑬⑭	凍結精液	—	凍結	67.9±0.0	55.8±0.0	84.7±3.0	3

試験 3：液状精液を用いた人工授精試験

(1) 供試種雄牛及び材料

供試種雄牛は当研究部で繋養している夢吹雪 (H25.3.30 生) を供試した。

人工授精する雌牛は当研究部で飼養している黒毛和種繁殖雌牛 7 頭を供試し (表 3)、モデナ液で希

釈した液状精液を 8, 15, 1 日の保管後、発情同期化した 3 頭に 3 回 (延べ 9 頭) 人工授精を試みた。

また、人工授精部位と方法については、シリンジに装着したシース管先端を外子宮口の縁にあて精液量 5ml (精子数 5 億) を射出した (図 1)。

(2) 調査方法

直腸検査法及び超音波診断装置により受胎の有無を判定した。

表 3 受精した繁殖雌牛一覧

番号	名号	生年月日	父	祖父	祖祖父	A1日
①	すえふじ 1	H21.11.3	寿恵福	藤平茂	福鶴土井	H30.12.14
②	ひらつる 8	H22.2.14	勝福平	福鶴 57	糸福	H30.12.14
③	しげふく 5	H24.9.21	隆茂 3 8	寿恵福	安福	H30.12.14
④	けい 2 0	H24.6.1	大之国	福桜 (宮崎)	安平	H30.12.21
⑤	ふくやす 1	H25.5.5	寿恵福	安福 165 の 9	金幸	H30.12.21
⑥	けん 8 6 5	H25.7.19	第 2 福鶴	平茂勝	糸福	H30.12.21
⑦	けい 2 0	H24.6.1	大之国	福桜 (宮崎)	安平	H31.1.11
⑧	ふくやす 1	H25.5.5	寿恵福	安福 165 の 9	金幸	H31.1.11
⑨	うえ 8 1 3	H24.9.25	寿恵福	糸福	福鶴 5 7	H31.1.11

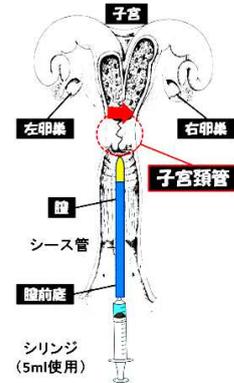


図 1 受精部位と方法

結果

試験 1：牛の液状精液希釈液 (HB 液、モデナ液) の保存性比較検討

HB 液とモデナ液の保存性については、精子運動率は日数の経過より両液ともに大幅な低下 (図 2) がみられ、特に HB 液とモデナ液の平均を比較すると HB 液が 14 ~ 15 日において有意に低い結果となった。

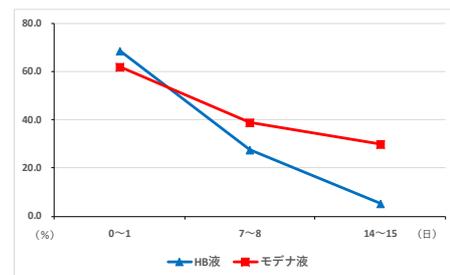


図 2 精子運動率と保存日数 (希釈液別)

試験 2：液状精液を用いた体外受精試験

液状精液を用いた体外受精試験では、全ての検体において受精が認められた。また、7 日保管したモデナ液希釈精子は 70.6 %，8 日保管した HB 希釈精子は 72.8 % の高い受精率を示した（表 4）。

受精率と液状精液性状の各項目との相関関係については精子運動率とは相関は見られなかったものの、経過日数では強い負の相関となり直線速度分布 A クラスでは比較的強い正の相関が認められた（図 3，4，5）。また、HB 液は 8 日保管後において豚精子と同様な精子の直進運動を多く示した（図 6）。

表 4 液状精液及び凍結精液の性状と受精率

番号	種類	経過日数	基本	精子運動率 (%)	直線速度分布	受精率 (%)	n
①	液状精液	6	モデナ	41.1	6.0	68.9	1
②		7		39.7	5.5	70.6	1
③④		8		43.5	2.3	57.5	2
⑤⑥		13		26.6	1.2	46.6	2
⑦⑧⑨		15		29.2±3.6	2.0±0.4	36.8±3.8	3
⑩⑪	8		HB	43.9	12.0	72.8	2
⑫⑬⑭	凍結精液	-	凍結	67.9±0.0	55.8±0.0	84.7±3.0	3

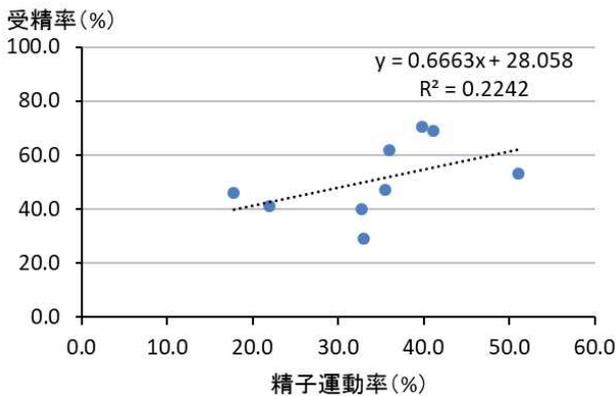


図 3 受精率と精子運動率と受精率

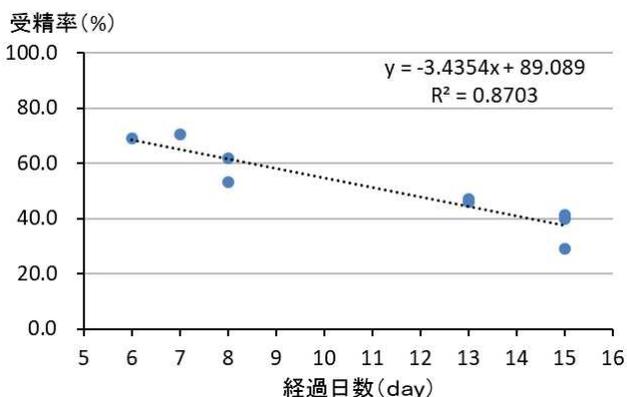


図 4 受精率と経過日数

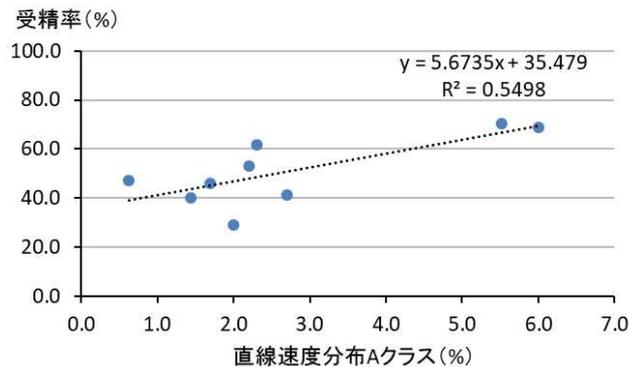


図 5 受精率と直線速度分布 A クラス

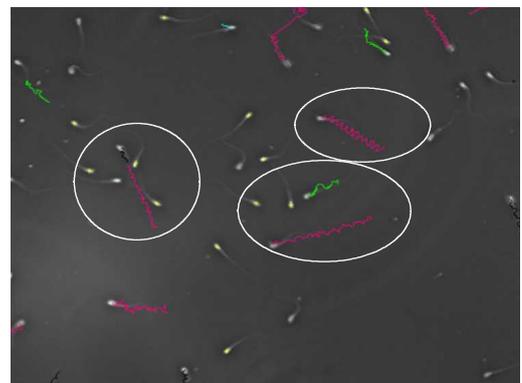


図 6 精子の軌道 HB 液希釈 (8 日後)

試験 3：液状精液を用いた人工授精試験

生体での受精について、使用した液状精液の運動率は、保管 8 日 27.0 %，15 日 16.2 %，1 日 68.5 % であった。受胎成績は 9 頭中 8 頭で不受胎で 1 頭は受胎した（表 5）。

表 5 妊娠鑑定成績

番号	名号	保管日数	精子運動率 (%)	直線速度分布 (%)	AI日	妊娠鑑定
①	すえふじ1	8	27.0	7.5	H30.12.14	—
②	ひらつる8					—
③	しげふく5					—
④	けい20	15	16.2	0.2	H30.12.21	—
⑤	ふくやす1					—
⑥	けん865					—
⑦	けい20	1	68.5	40.2	H31.1.11	—
⑧	ふくやす1					—
⑨	うえ813					+

考 察

使用した希釈液については、過去の試験より最適と思われた 20 倍で希釈し pH 調整を 6.5，保管温度を 15℃とした。

試験 1 より、HB 液、モデナ液の保存性を比較検

討したところ、精子運動率は 7～8 日迄は大きな差なく低下したが、14～15 日においては大幅な低下がみられ、その影響は HB 液で大きかった。この HB 液での低下の要因については、エネルギーになるグルコース含量をモデナ液の 2 割程に調整して解糖系を抑えていることから、保管中は精子が休眠状態になっており、(広島クライオプリザベーション HP 参照) 運動性チェックの際に十分保温する時間(最大 60 分)をとる必要があるものの、今回の試験 1 では 15℃の保管庫で保存した精子を 38℃で 10 分程度しか保温できなかったため、HB 液中の精子の運動性が増加する前に解析した可能性が考えられた。

試験 2 では、試験 1 の結果より長期間保存しても精子運動率低下が比較的少ないモデナ液を主に使用して精液の受精能の有無の確認のため体外受精を試みた。その結果、モデナ液で 7 日保管した精子は 70.6%、HB 液で 8 日保管した精子も 72.8%の受精率を示し、一般的に体外受精率が高い凍結融解精子の 84.7%と遜色のない高い受精能を示した。

さらにモデナ液で 15 日保管した精子でも約 40%の受精率を示したことから、モデナ液は牛精子を長期間保存できる希釈液となることが示唆された。

一方で HB 液は 14～15 日の運動率及は低いものの、7～8 日後において精子の直進運動の軌跡を多く示していた。この精子の軌跡は豚精子希釈時でも同様に HB 液は直線運動、モデナ液は回転運動が多く見られることから、モデナ液はややエネルギー過多であることが示唆され、今後はラクトース組成割合を調整することが必要と思われた。

試験 3 については生体内での受精能の有無について検証した。使用した液状精液は試験 2 で供試した種雄牛精液より運動率、直線速度分布共にやや低く、運動率では 8 日後 27.0%、15 日後 16.2%であった。また直線速度分布 A クラスは 7.5%、0.2%であり、厳しい受精結果が予想された。そのなかで妊娠鑑定の結果は保管 8 日で 3 頭全て不受胎で 15 日も全て不受胎であったが、1 日後は 3 頭中 1 頭受胎した。この 1 頭受胎の要因は保管 1 日の運動率

68.5%、直線速度分布 A クラスが 40.2%と高かったことと精子中に含まれる精漿の影響を考慮して膣部(外子宮口付近)で射出したことが受胎に貢献したと思われる。

精液に含まれる精漿は、化学成分は緩衝作用やエネルギー源供給の役目を果たし、精子の運動能、受精能の維持などに関わる。また受精能獲得抑制因子を持っており、受精能獲得後も精子を精漿にさらすと受精能を失う³⁾ことが知られている。凍結精液製造過程では精漿を分離しないが、それは希釈割合が高い(約 100～300 倍希釈)ので子宮に注入されても殆ど影響のない量であり、また凍結融解刺激が解凍後の精子に作用して注入後直ちに受精能獲得を誘発すると考えられている³⁾。しかし、精漿の入った液状精液をそのまま子宮に注入しても EGF(上皮成長因子)発現は見られず免疫作用の働かないことが確認されている⁴⁾。また体外受精試験においては受精に使用する精液を遠心することにより必ず精漿を分離している。

これらのことから精漿を含んだ液状精液での人工授精については、射出場所は膣部、また運動率、直線速度分布 A クラス割合の高い精液で受精することが受胎率向上に重要と思われた。

文 献

- 1) 千葉県農業共済組合連合会/中央家畜診療所。乳牛における夏季の受胎率向上に向けた胚移植の検討。LIAJ News, No.164
- 2) 小野淑子。精子運動機解析装置 SMAS を用いた新たな精子機能評価検討。日産婦誌, 60 巻 2 号
- 3) 高橋芳幸。2015.家畜人工授精講習会テキスト(家畜人工授精編)
- 4) 片桐成二。精漿成分による牛の子宮機能調整。日本胚移植学雑誌, 35(1)。21-24(2013-01)