

ブタ精巢上体精子の凍結保存技術の確立と人工授精法の開発

岡崎 哲司・佐藤 邦雄・川部 太一

大分県農林水産研究指導センター畜産研究部・共同研究：広島大学大学院生物圏科学研究科

要約 これまで開発してきた射出精子における凍結融解処理法は、精巢上体精子においても有効であり、その若干の修正した方法（融解液に 15% (v/v) 精漿を添加）により、後代を獲得できる人工授精法を確立した。人工授精後の繁殖成績は受胎率 86%、平均総産子数 8.9 頭であった。

キーワード： 豚、凍結精液、人工授精、精巢上体精子

緒言

現在、大分県では繁殖・強健性に優れた「おおいエル07」と産肉性に富んだWで優秀な母豚を、増体・肉質が良いDを止め雄に県内生産者へ種苗供給している。さらに、多様な生産者ニーズを汲むため、一部特徴のある形質を有する遺伝資源を海外などから導入し、「タイプ別系統の造成」を大分県育種改良方針に従い行っている。これを遂行するためには、大規模ブリーダーの育種スピードと同程度にする必要があり、多数の雄個体を要する。しかし、当研究部では多数の雄個体を検定・選抜できる飼養スペースはなく、育種改良スピードは劣ってしまう。精巢上体精子は遺伝資源として利用可能であるため、通常出荷してしまう多数の雄個体の精巢上体精子を凍結保管することができれば、飼養スペースがなくとも多数の雄個体を繁殖することと同じこととなる。そこで、本県が開発してきた精子凍結技術¹⁾を精巢上体精子用に修正し、かつ、貴重な資源であるため、少ない凍結精子数でも高い受胎率を示す人工授精法を開発することを目的とする。

材料および方法

【凍結保存液の修正】

既存の豚精子凍結保存液は、浸透圧 300 mOsm/kg、グリセリン濃度 3% (既存液) であるが、当研究では、浸透圧を 400 mOsm/kg の高浸透圧に、グリセリン濃度を 2%へ低減させた保存液を開発

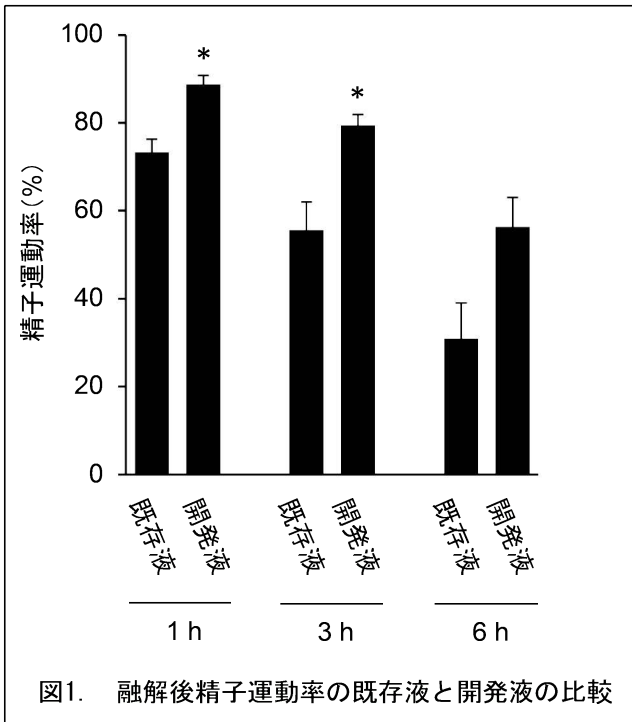
し（開発液）、射出精子の凍結に有効であることを報告した²⁾。本開発液が精巢上体精子の凍結にも有効であるかを検討した。融解後の精子運動率は、位相差顕微鏡 (x100) にて観察した。

【人工授精】

既報において凍結融解ストレスで生じる精巢上体精子の活性化現象（受精能獲得）を抑制させるため、融解液に添加する精漿濃度は 15% (v/v) が最適であることを明らかとしている³⁾。そこで、融解液への精漿無添加区をコントロールとして、精漿 15%含有区が人工授精後の繁殖成績に有効か否かを検討した。精巢上体精子は数に限りがあり、貴重であるため、50 億 sperm/ドーズを 2 回注入し、トータル 100 億 sperm/AI で実施した。一部の母豚は妊娠鑑定後、出荷し子宮内胎子着床率および頭数をカウントした。自然発情中の母豚に人工授精を実施した。

結果

豚精液の凍結保存において、既存の凍結保存液はグリセリンを 3%濃度で使用する。しかし、グリセリンの高濃度添加は、精子の運動性を維持するが、精子膜や先体膜の損傷を誘起してしまう。そこで、精子細胞内の自由水を脱水させるグリセリンの機能を補完する必要がある。そこで、浸透圧を上げることで、グリセリン濃度を低下できる希釈液を開発してきた²⁾。本保存液を精巢上体精子の凍結に応用したところ、融解後の精子運動率



は有意に向上することが明らかとなり (図 1) , 射出精子の場合と同様, 効果があることが分かった。

豚精子の凍結融解精子では, 融解直後に精子の活性化が生じてしまい, 長期間の運動が阻害される。活性化は卵と結合まで自然では生じず, 精漿がそれを抑制することが分かっている。したがって, 融解液へ精漿を 10% 添加することで, 活性化を抑制でき, 人工授精後の繁殖成績が向上することを明らかにしてきた^{4, 5)}。また, 精巢上体精子は, 射出精子とは異なり精漿に全く暴露されていないという特徴を有しているため, 15%の添加が適切であることも報告した³⁾。そこで, この精漿 15%含有融解液が精巢上体精子の人工授精に有効か否かを確認した。

コントロール区 (精漿無添加) では, 子宮内着床率 61%, 受胎率 57%, 分娩率 50%, 平均総産子数 3 頭であったが, 精漿 15%添加区のそれらは, 67%,

86%, 75%, 8.9 頭といずれも高い値を示した (表 1) 。これら繁殖成績の違いは, 精漿を人工授精前に精子に曝すことによる精子活性化の抑制と精漿による子宮内環境の制御という雄側, 雌側両面の作用であると考察している。

処理区	着床率 (%)	子宮内胎子数	受胎率 (%)	分娩率 (%)	平均総産子数	平均生存産子数
コントロール (精漿無添加)	61% (n=1)	11 (n=1)	57% (n=7)	50% (3/6)	3 (n=3)	2.7 (n=3)
精漿 15%	67% (n=2)	11 (n=2)	86% (n=22)	75% (15/20)	8.9 (n=15)	8.3 (n=15)

考 察

これまで射出精子の凍結融解で使用してきた高浸透圧・低グリセリン凍結保存液および精漿含有融解液 (15% (v/v)) は精巢上体精子の人工授精においても有効である。この技術を利用すれば, 多数の雄個体を直接検定し, その後, その検定結果を基に少数の雄個体を選抜する通常的手法とは異なり, 淘汰される予定の多数の雄個体の遺伝資源を保管・利用することが可能となる。近年では, 遺伝子マーカーを基に DNA 育種が進められてきている。このマーカーは兄弟豚でも異なることから, 表現型が劣っていても有効な遺伝子マーカーは優れている可能性もあり得る。つまり, 淘汰される側も貴重な遺伝子を有している可能性があるため, 凍結精子の保管は重要となる。さらに, このような貴重な雄個体の突然死の死後数十時間でも精巢上体内の精子は凍結可能であり, それを使った人工授精で後代を獲得できる (図 2) 。このように, 小規模の農場でも大規模同様の育種改良が可能になる。ただし, 食肉処理場での精巢上体回収後, 凍結した精子は病原体が混入している可能性があるため, 使用の際は, 疫学検査を実施しなければならない (例 ; PRRS, AD, PED 等) 。

- 5) 岡崎 哲司・秋好 禎一・菅 正和・手島 久智・島田 昌之. 2011. 精漿含有融解液を用いた豚凍結精液による人工授精試験. 日豚会誌 48:147-151.



引用文献

- 1) Okazaki T and Shimada M. New strategies of boar sperm cryopreservation: Development of novel freezing and thawing methods with a focus on the roles of seminal plasma. Anim. Sci. J. 2012. 83: 623-629.
- 2) Okazaki T, Abe S, Shimada M. Improved conception rates in sows inseminated with cryopreserved boar spermatozoa prepared with a more optimal combination of osmolality and glycerol in the freezing extender. Anim. Sci. J. 2009. 80: 121-129.
- 3) Okazaki T, Akiyoshi T, Kan M, Mori M, Teshima H, Shimada M. Artificial insemination with seminal plasma improves the reproductive performance of frozen-thawed boar epididymal spermatozoa. 2012. J. Androl. 33: 990-998.
- 4) Okazaki T, Abe S, Yoshida S, Shimada M. Seminal plasma damages sperm during cryopreservation, but its presence during thawing improves semen quality and conception rates in boars with poor post-thaw semen quality. 2009. Theriogenology 71: 491-498.