

## 豚凍結精液による子宮内部注入法の精子数の検討

細野真司・松本千明・福島達哉\*・高橋圭二

Research on Number of Frozen Boar Spermatozoa Required for Intrauterine Insemination

Shinji HOSONO, Chiaki MATSUMOTO, Tatsuya FUKUSHIMA\* and Keiji TAKAHASHI

### 要 約

豚の凍結精液の利用を促進するため、子宮内部注入法と注入する精子数に着目し、受胎率および繁殖成績の改善を試みた。

凍結精液を用いた受胎試験では、注入総精子数を20億としても、受胎率は平均15.8%と低い値であった。そこで精子運動解析装置で運動率を測定し、総運動精子数で約20億に調整した精液を用いたところ、受胎率が平均73.3%で、子宮内に着床した豚胚は、一腹あたり11.0頭であり、改善が見られた。

凍結精液の利用率の向上のため、注入する運動精子数を半量として同様に受胎試験を行ったが、着床した豚胚は、一腹あたり10.6頭であったものの、受胎率が47.1%であり精液の有効利用には至らなかった。

子宮内部注入法による凍結精液を用いた人工授精は、総運動精子数で20億注入することが効率的であったが、液状精液で報告されている90%近い受胎率より大きく劣る結果であった。この原因として、精子生存率が運動率に比べ低いことが関与している可能性が考えられる。この問題を解決するためには、凍結融解後の精子性状を改善していく必要がある。

### 緒 言

我が国における豚の人工授精の普及率は、69.6%（自然交配との併用を含む）であり、牛に比べ低い。母豚500頭以上を飼養している生産者では93.6%が利用しており、飼養規模の拡大に伴い人工授精の利用は増加傾向にある（(一社)日本養豚協会2016）。

豚の人工授精には一般的に液状精液が利用されているが、牛で一般的な凍結精液については、豚精子の耐凍性が低く融解後の精子活力が低下し、受胎率および産子数に悪影響を及ぼすことから、多くの産子を得たい養豚の生産現場においては利用が少ない。

しかしながら、凍結精液は半永久的な保存が可能であり、種の保存や維持、排除困難な伝染病の清浄化を可能にするなど、液状精液にはない多くの利点が挙げられる。また、精子活性が低下する暑熱期においては、受胎率の改善が見込まれ、利用率を高めるために国内で研究が進められている。

凍結精液の人工授精方法に従来の子宮頸管法を利用

平成28年8月31日受付

\* 現 (公社)千葉県畜産協会

した場合、人工授精後に注入した精液の7割が漏出し、25%から45%の精子が膈へ逆流することが報告されており（Steerinkら1998）、大量の精子を注入する必要があると考えられる。本試験では、凍結精液の人工授精法として子宮内部注入法（Watsonら2001、Rozeboomら2004）に着目し、人工授精における精子の適切な注入量を明らかにするため、総精子数と運動精子数を基準とした場合の注入量の違いが、受胎率の改善、精子の利用効率に及ぼす影響について検討した。

### 材料および方法

#### 1. 子宮内部注入法

人工授精の方法として、市販の内筒付きカテーテルを用い、豚の人工授精では一般的な精液注入部位である子宮頸管からさらに内筒を挿入し、子宮体かまたは子宮角浅部に注入した。

本試験では、すべて2産目の繁殖雌豚を利用し、これらの豚の子宮体かまたは子宮角浅部に注入するため、内筒が外筒先端部からさらに挿入される長さを10cmから15cm間と統一した。

#### 2. 液状精液を用いた子宮内部注入法の注入総精子数の検討

子宮内部注入法による注入総精子数は、液状精液を用いた繁殖成績の知見では、20億 (Watsonら2001)、12億 (伊東ら2002) または10億 (中根ら2004) と差があり、本試験でもその水準について調査を行った。

すなわち、注入する総精子数により2つの試験区を設けた。Watsonら (2001) の報告に基づく注入総精子数が20億の液状20億区 (1度に10億/10ml×2度)、および中根らの報告に基づく液状10億区 (1度に5億/5ml×2度) を設定した。人工授精用精液は、当场で採取した大ヨークシャー種の射出精液をモデナ液で1億/mlに希釈したものをを用いた。

人工授精は、発情当日に1度、24時間後に1度、合計2度の注入で1回の授精とした。

供試雌豚は、ランドレース種37頭を用い、液状20億区に29頭、液状10億区に8頭を配置した。雌豚の発情は、専用の測定器 (ブリードテスター PIT-1: 千代田電子工業(株)) を用い、豚膈内粘液電気抵抗値により判定した (山口ら2004)。

人工授精後に受胎しなかった個体は、再度人工授精を行った。そのため、受胎率は、受胎数を人工授精回数で除することで算出した。

また、一腹の産子数については、液状20億区は供試雌豚のうち7頭を分娩させ、その総産子数を調査した。液状10億区は、供試豚全8頭を屠畜後、子宮を採材し胚の着床数を調査した。

### 3. 豚凍結精液の作成および融解と希釈方法

豚凍結精液は、豚凍結精液利用技術マニュアルに従って作成と融解を実施した (丹羽ら1989)。すなわち、手圧法により採取した射出精液を35℃で保温された等量のモデナ液 (表1) で希釈し、恒温機 (AMVL-180A: SANYO) を用い約3時間かけて液中温度を15℃にした。液中温度を15℃に保ったまま800gで10分間遠心

(H-103N: KOKUSAN) し、上清を捨てた後、精子密度計豚用 (富士平工業(株)) を用い精子濃度が20億/mlになるように沈査を改良Niwa-Sakai Freezing Extender (NSF)-I (表2) で希釈し (以下、一次希釈という)、精液低温処理装置 (SSR-4、(株)三研) 内で約3時間かけて液中温度を5℃にした。精液低温処理装置内で液中温度を5℃に保ったまま、改良NSF-II (表2) で精子濃度が10億/mlになるよう希釈し (以下、二次希釈という)、ガラスシリンジと精液分注針を用い、ストロー管に0.5mlずつ分注した。分注後は、簡易急速凍結器 (西川式、富士平工業(株)) を用いて液体窒素蒸気で凍結した。なお凍結作業は、改良NSF-IIに含まれるグリセリンの細胞毒を考慮し、改良NSF-IIによる希釈から1時間以内に行った。凍結後は液体窒素保存容器 (SUPER2、MVE) に移し、液体窒素中に保管した。

融解は、35℃の温水を満した魔法瓶にストロー管を必要数入れ、1分間、ゆっくり攪拌した。融解後は、35℃のモデナ液で希釈し、人工授精に供した。

表1 モデナ液の組成

	モデナ液 (g/L)
D (+) グルコース	27.5
クエン酸Na3・H2O	6.9
炭酸水素Na	1.0
EDTA・2H2O	2.4
クエン酸・H2O	2.9
Tris アミノメタン	5.7
ゲンタマイシン	10 <sup>*1</sup>
アミカシン	100 <sup>*1</sup>

蒸留水で1Lにメスアップした

\*1 抗生物質の単位はmg力価

表2 改良NSF-I および改良NSF-IIの組成

	改NSF-I	改NSF-II
トレハロース	92.4 g/L	85.5 g/L
卵黄	200.0 ml/L	185.0 ml/L
OEP	—	0.7 ml/L
グリセリン	—	3.0 ml/L
アミカシン	100.0 mg/L	92.5 mg/L
硫酸ジベカシン	50.0 mg/L	46.3 mg/L
ペニシリンGカリウム	200,000 IU/L	185,040 IU/L

蒸留水で1Lにメスアップした

### 4. 凍結精液の検査

本試験で作成した凍結精液は、射出直後から凍結までの凍結精液作成時における工程ごとに精子運動率を調査した。

また、射出直後および凍結融解後については、さらに精子濃度、精子活性率および精子生存率を調査した。

精子運動率および精子濃度の調査には、精子運動解析装置 (Spam Motility Analyze System、以下SMAS: (株)DITECT) を用いた。SMASを設置した位相差顕微鏡 (ECLIPSE E100:Nikon) に37℃に設定したホットプレートを乗せ、予め検査用チャンパー (カウンティングチャンパー: Leja) を温めておいた。凍結精液10μL

を検査用チャンバーに滴下した。滴下後10分間放置し、SMASで精子運動率および精子濃度を測定した。精子活性率は、Eosin-Nigrosinを使用した活性試験(Björndahlら2003)により測定した。精子生存率は、低浸透圧膨化法による生存試験(Lechniakら2002)により測定した。

5. 子宮内部法による凍結精液の注入量の検討

凍結精液の注入量は、前項2で行った受胎試験結果から、総精子数を20億とした。

しかし、前項4の検査結果から、凍結精液は、一般的な液状精液に比べ、精子性状が悪く、液状精液と同等の受胎成績が見込めないことが予想されたため、生産現場でも検査可能な精子の運動率に着目し、精子運動率から換算した総運動精子数20億についても検討した。

また、精液の有効利用を図るため、半量の総運動精子数10億も設定した。

総精子数20億区の凍結精液では、1度分の人工授精の注入量をモデナ液9mlに凍結融解後の精液1mlを希釈することで作製し、精子濃度は1億/mlとした。

総運動精子数20億区および10億区では、1度分の人工授精の注入量をいずれもモデナ液9mlに凍結融解後の精液を希釈することで作成したが、精子運動率が融解した精液の作成ごとに異なるため、精子濃度は一定にはならなかった。

供試精液は、デュロック種を用いた。凍結精液の作成は、前述のとおり行った。

供試雌豚はすべてランドレース種と大ヨークシャー種の交雑種(LW)を用い、総精子数20億区には13頭、総運動精子数20億区には12頭、総運動精子数10億区には12頭、それぞれ配置した。

授精適期および人工授精の方法は、前項2に従って行った。各区について、授精回数、受胎数、受胎率、一腹の着床頭数を調査した。

結 果

液状精液を用いた子宮内部注入法の注入総精子数を検討したところ、液状20億区の受胎率は平均71.8%であるの対し、液状10億区は平均40.0%と低かった。液状20億区の一腹総産子数は、調査した7頭の平均が一腹あたり10.8頭であった。液状10億区は、子宮内壁に着床した胚(人工授精後3週)の一腹平均数であるが、供試豚8頭の平均が一腹あたり8.0頭と低かった(表3)。

射出直後から凍結までの精液作成工程と凍結後融解時の運動性を調査したところ、射出直後の運動率が平均85.1%であったのに対し、凍結融解後の運動率は平均35.0%であった(図1)。

表3 子宮内部法による人工授精の繁殖成績

供試精液の性状	注入総精子数	注入精液量	母豚の供試数(頭)	AI回数(回)	受胎数(頭)	受胎率 <sup>*1</sup>	胚の平均数(頭/腹)
液状	20億	20ml	29	39	28	71.8%	10.8 ± 1.7 <sup>*2</sup>
液状	10億	10ml	8	10	4	40.0%	8.0 ± 2.2

平均値±標準偏差

<sup>\*1</sup>受胎率(%) = 受胎数/AI回数

<sup>\*2</sup>分娩させ生存産子を数えた、他は屠畜後子宮を採材し胚を数えた

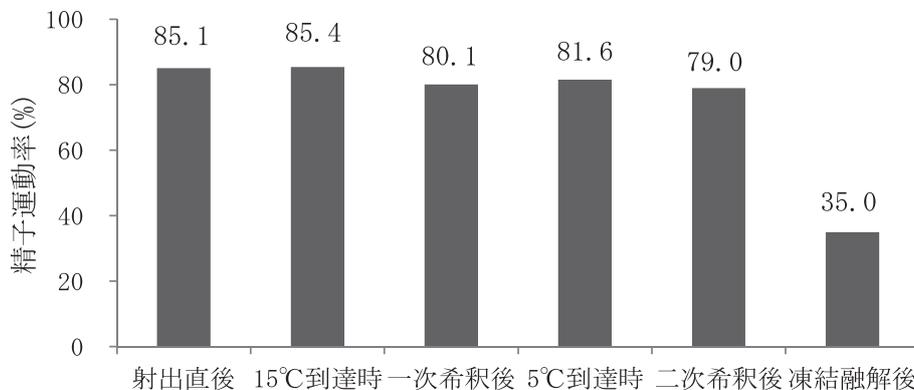


図1 凍結精液作成時における工程ごとの精子運動率

作成した凍結精液の精子性状を射出直後の精子と比較すると、凍結融解後の精子運動率、精子活性率および精子生存率のすべての項目で著しく低下しており、特に精子生存率が凍結融解後は21.4%であり、最低値であった(表4)。

子宮内部注入法による凍結精液の注入量を検討したと

ころ、各区の受胎率は、総精子数20億区が15.8%、総運動精子数20億区が73.3%、総運動精子数10億区が47.1%であり、総運動精子数20億区が最も高かった。胚の平均数は、総精子数20億区が6.0頭、総運動精子数20億区が11.0頭、総運動精子数10億区が10.6頭であり、これも総運動精子数20億区が最も高かった(表5)。

表4 供試した豚精液の射出直後および凍結融解後の精子性状

		射出直後		凍結融解後	
精子濃度*1	(億/ml)	7.4	± 1.6	10.1	± 1.2
精子運動率*1	(%)	85.1	± 6.2	35.0	± 6.3
精子活性率*2	(%)	86.0	± 7.7	32.1	± 18.5
精子生存率*3	(%)	87.1	± 8.2	21.4	± 4.4

平均値±標準偏差

\*1 SMAS (DITECT製) によって算出

\*2 Eosin-Nigrosinを使用した活性試験によって算出

\*3 低浸透圧膨化法による生存試験によって算出

表5 子宮内部注入法による人工授精の繁殖成績

供試精液の性状	注入総精子数	注入精液量	母豚の供試数(頭)	AI回数(回)	受胎数(頭)	受胎率*1	胚の平均数(頭/腹)
凍結	20億 (総精子数)	20ml	13	19	3	15.8%	6.0 ± 3.6
凍結	20億 (総運動精子数)	約24 ~ 26ml	12	15	11	73.3%	11.0 ± 1.9
凍結	10億 (総運動精子数)	約12 ~ 15ml	12	17	8	47.1%	10.6 ± 3.1

平均値±標準偏差

\*1 受胎率(%)= 受胎数/AI回数

## 考 察

本試験では、豚の凍結精液の利用を促進するため、子宮内部注入法と注入する精子数に着目し受胎率および繁殖成績の改善を試みた。

液状精液を用いた受胎試験では、注入する総精子数を20億とした液状20億区は、液状10億区に比べ、受胎率が高く、産子数も10.8頭と良好であった。Watsonら(2002)は注入総精子数16億で受胎率が92.6%、伊東ら(2002)は12億で受胎率が90%から100%、産子数も良好であったと報告しており、十分な受胎成績が得られる注入総精子数の最小値は、供試する豚群にもよるが、12億程度と推察される。

しかしながら、凍結精液を用いた受胎試験では、注入総精子数を20億としても、受胎率は、平均15.8%と低い値であった。改善のため、総運動精子数で10億とした受胎試験では受胎率が平均47.1%であり、総運動精子数20億区の受胎率は平均73.3%であった。

佐野ら(2002)は、パークシャー種を用い、凍結精液の試験で注入総精子数を25億、50億および100億に分け、受胎試験を行ったところ、受胎率は25億で40.0%、50億で63.6%、100億で100%であったと報告している。本試験に

おける総運動精子数20億は、総精子数約57億、その半量区は約29億に相当し、この報告に近い結果であった(表5)。

さらなる受胎率向上のため、注入する精子数を増加させることが考えられるが、邨上ら(2013)が、子宮内部注入法による凍結精液を用いた受胎試験を生産現場にて技術習得者が行ったところ、凍結融解精子を100億注入し、受胎率76.9%であったと報告しており、注入総精子数の増加が結果を改善させる要因には、必ずしもならないことが示唆される。

また、1度の人工授精に使用する精子数が増加するほど利用効率が悪化することになり、凍結精液の作成の作業量や保存のための液体窒素や専用ポンプの費用を考慮すると、経済性に欠けることが懸念される。

山口ら(2007)は、注入する精子の活力を、活発な前進運動(++)および著しく活発な前進運動(+++)を示している精子の割合をパーセントで測定し、35%以上60%未満は中活力、60%以上は高活力と2つに分け、注入する総精子数を25億として受胎試験を行ったところ、受胎率は中活力で21.4%、高活力で91.7%であったと報告している。本試験で用いた凍結精液の運動率は平均35.0%であり、総精子数20億以下の受胎率が15.8%であったことから、凍結融解後の精子運動率の改善が、利用効率の向上につなが

ると考えられる(表5)。

これらのことから、子宮内部注入法による凍結精液を用いた人工授精では、総運動精子数で20億注入することが効率的であると考えられる。ただしその場合でも本試験における凍結精液の受胎率は平均73.3%であり、液状精液で報告されている90%近い受胎率より大きく劣る。これは本試験で行った精子生存率が、運動率に比べ低いことが関与している可能性が考えられる。この問題を解決するためには、凍結融解後の精子性状を改善していく必要がある。

また本試験では、一般の生産現場でも利用されている子宮内部注入法を選択したが、他に少量の精子数で良好な繁殖成績を得る方法として、子宮角深部に精液を注入する子宮角深部注入法がある。この方法により注入総精子数が5億程度でも十分な受胎成績が得られると報告されている(Watsonら2001、伊東ら2002、Martinezら2002、中根ら2004)。今後、生産現場における子宮角深部注入法の利用拡大が望まれる。

## 引用文献

- Björndahl L, Söderlund I, Kvist U and 2003, Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment, *Hum. Reprod.* 18 (4) : 813-816.
- 伊東正吾・石崎芳彦・岩村祥吉・保科和夫、2002、深部カテーテルを用いた豚の人工授精による受胎性と産子状況、*日豚会誌*39 (4) : 310-311
- Lechniak D, Kedzierski A and Stanislawski D、2002、The use of HOS test to evaluate membrane functionality of boar sperm capacitated in vitro、*Reprod. Domest. Anim.* 37 (6) : 379-380
- Martinez EA, Vazquez JM, Roca J, Lucas X, Gil MA, Parrilla I, Vazquez JL and Day BN、2002、Minimum number of spermatozoa required for normal fertility after deep intrauterine insemination in non-sedated sows、*Reproduction*123 : 163-170
- 邨上正幸・足立広幸、2013、豚凍結精液の生産技術の改善試験、*鳥取畜試研報* 57 : 1-3
- 中根崇・山口倫子・牛島仁・高橋圭二・江森格、2004、豚の子宮角深部注入(DIUI)による人工授精と従来法の比較、*千葉畜セ研報* 4 : 5-8
- 一般社団法人日本養豚協会、2016、平成27年度養豚農業実態調査全国集計結果 : 12
- 丹羽太左衛門・加藤一雄・伊原和美・伊東正吾・佐々木捷彦・荒木昭雄・東正利・小林博行・野村亀二郎、1989、豚凍結精液利用マニュアル、3月発行、社団法人日本家畜人工授精師協会 : 19-38
- Rozeboom KJ, Reicks DL and Wilson ME、2004、The reproductive performance and factors affecting on-farm application of low-dose intrauterine deposit of semen in sows、*J. Anim. Sci.*82 (7) : 2164-2168
- 佐野通・原田護・伊藤述史・河原宏一、2002、豚凍結精液の実用化技術の確立(V)、*岡山総畜セ研報* 13 : 1-6
- Steverink DW, Soede NM, Bouwman EG and Kemp B、1998、Semen backflow after insemination and its effects on fertilization results in sows、*Anim. Reprod. Sci.* 54 : 109-119
- Watson PF, Behan J, Decuadro-Hansen G and Cassou B、2001、Deep insemination of sows reduced sperm numbers does not compromise fertility. A commercial based field trial、Sixth International Conference on Pig Reproduction、University of Missouri Columbia : 135
- Watson PF and Behan JR、2002、Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers. results of a commercially based field trial、*Theriogenology*57 : 1683-1693
- 山口昇一郎・村上徹哉、2007、豚の排卵同期化・定時1回人工授精における凍結融解精子の活力および人工授精実施時間の違いが繁殖成績に及ぼす影響、*福岡農総試研報* 26 : 65-68
- 山口倫子・高橋圭二、2004、電気抵抗値を用いた豚の発情確認と早期妊娠診断、*千葉畜セ研報* 4 : 1-4