

## ブタ凍結融解精子の性状と体外受精能

池田博司・菊池和弘<sup>1)</sup>・金子浩之<sup>1)</sup>・溝上 崇 (佐賀県畜産試験場<sup>1)</sup>・農林水産省農業生物資源研究所)Hiroshi IKEDA, Kazuhiro KIKUCHI, Hiroyuki KANEKO and Takashi MIZOKAMI :  
Viability and In vitro Fertilization Ability of Frozen-thawed boar ejaculated spermatozoa

現在ブタの農家生産段階における繁殖方法は、自然交配かもしくは、液状希釈精液による人工授精がほとんどである。凍結融解精子による人工授精は受胎率が低い、産子数が少ないなどの問題が報告されており、コマールベースではほとんど活用されていないのが現状である。しかし、ブタ胚の凍結保存法が確立されていない現状の中では、精子の凍結保存は遺伝資源の保存法として有効な手段の一つである。

今までのところ、凍結融解後の精子は、主に肉眼的な性状(生存率・活力)にて評価されており、実際に人工授精後に受胎するか否かで受精能を有するかどうかを判断されてきた。本研究では、凍結融解後の精子の受精能の評価が、体外受精法により可能かどうかを検討した。

## 1. 材料および方法

## (1) 射出精子の凍結

(1) 供試豚・頭数: ランドレース種(系統豚「サガL」)種雄豚9頭の射出精液

(2) 凍結方法: 「豚凍結精液利用技術マニュアル1989」のストロー法による

(3) 保存方法: 0.25mlのストローで保存し、凍結時の精子濃度は、 $5 \times 10^8$  / mlとした。

## 2) 精子先体の状態判定

Triple Stain法(Trypan Blue, Bismark BrownおよびRose Bengal染色)で染色を行い、精子の生存および先体の状態を判定した。

## 3) 体外受精

## (1) 卵子の成熟

屠場から持ち帰ったブタ卵巢より卵丘細胞が付着し、均一な細胞質を有する卵胞卵子を採取し、10%ウシ胎児血清、10%ブタ卵胞液、FSH 2.5ug/mlを加えた修正Waymouth液にて39.0°C、5% CO<sub>2</sub>、95%空気のインキュベーター内で46時間成熟培養を行った。

## (2) 凍結精液の融解および精子の前培養

凍結精液は、0.25mlのストローを37°Cの温水に浸した後、修正M199(pH7.8)液で希釈し、715×gで2分間遠沈後、上清部を捨て同液で再浮遊させた。そして、再浮遊液80ulをドロップにし( $1-2 \times 10^6$ /ml)、ミネラルオイルで覆い37.0°C、5% CO<sub>2</sub>、95%空気のインキュベーター内で30分間前培養を行った。

## (3) 媒精方法

成熟培養後の卵子をミネラルオイルで覆った修正BO液90ulのドロップに10個ずつ移した。そして、前培養した精子を最終濃度が約 $1 \times 10^6$ /mlとなるように希釈し

受精培地のドロップに10ul注入した。培養は、39.0°C、5% CO<sub>2</sub>、95%空気のインキュベーター内で行った。媒精5時間後に発生培養液BMO C II液に移し換えて継続培養を行った。

## (4) 受精および成熟検査

媒精10時間後に発生培養液より受精卵を取り出し、ホルマウント標本を作製しカルノア液にて固定した。そして、アセトオルセイン液で染色後、精子侵入並びに数、雌および雄性前核形成を観察した。

## 2. 結果および考察

雄①～⑨の精液性状(生存率・活力)、精子先体の状態および体外受精の結果を表1に示した。

射出精子の凍結については、採取直後の活力は大半の精液が良好であったが、第1次希釈液を加えて5°Cまで下降させた時の活力はかなり低下したもの(⑦および⑨)もみられた。凍結融解直後の活力において、採取直後と比べると④および⑧について大きな低下がみられ、それに対して③および⑤のように凍結融解後に低下が少ないなど、低温感受性に個体差がある可能性が示唆された。

体外受精の結果から、受精率の高い個体の精子では、先体が正常で生存している精子の割合が高い傾向にあった。⑦、⑧および⑨のように著しく性状の悪い精子を除けば生存率・活力と体外受精能力はしない傾向にあり、先体が正常である程度性状が良い精子(①～⑤)が体外受精することが示唆された。ブタの体外受精および培養において問題とされている多精子侵入は、今回の実験では受精率が低い精子が単精子侵入率が若干高い傾向がみられたものの、①のように受精率が高いものでも単精子侵入率が高い精子も認められた。

ブタの凍結融解精子による体外受精は、融解後の精子の受精能をある程度評価できると考えられた。今後、体外受精と人工授精による体内受精との関連を検討する必要があると思われる。

第1表 精液性状および体外受精

雄番号	精液性状			先体正常生存率 <sup>a)</sup> (%)	体外受精(%)	
	採取時	5°C時	融解時		受精率 <sup>b)</sup>	単精率
①	80++	80++	50++	34.8	58.8	60.0
②	80++	70++	50++	41.7	57.1	31.3
③	90++	90++	60++	34.2	33.3	52.9
④	80++	80++	40++	34.5	29.0	55.6
⑤	90++	80++	60++	32.4	9.8	60.0
⑥	80++	80++	50++	20.8	7.7	50.0
⑦	70++	30++	30++	9.6	4.8	100.0
⑧	80++	60++	30++	11.0	0.0	—
⑨	60++	20++	10++	13.8	0.0	—

注) <sup>a)</sup>先体が正常な生存精子のみを示した

<sup>b)</sup>第1および第2極体、雌性前核形成ならびに精子侵入がみられるものを受精とした