

### 牛精液有効利用のための凍結技術の開発

磯野 優・坂井隆宏・長友邦夫  
(佐賀県畜産試験場)

Yutaka ISONO, Takahiro SAKAI and Kunio NAGATOMO :  
Development of the Freezing Methods for Efficient Utilization of Bovine Semen

牛肉の輸入自由化、繁殖牛農家の減少など、近年の肉用牛生産農家をめぐる状況は非常に厳しいものとなっている。肉用牛繁殖農家にとっては、子牛の生産性をさらに高めていく必要があり、そのためには、優秀な種雄牛の精液は有効に利用されなければならない。現在、牛の精液は希釈後、液体窒素により凍結保存するのが主流であるが、凍結すれば優良な精液でも凍結前に比べて2～3割は精子の活力が低下するという問題がある。そこで、凍結精液を効率的に生産するために、精液の凍結融解後の活力低下防止技術について検討した。

#### 1. 材料および方法

1) 供試精液:佐賀県畜産試験場飼養の種雄牛より、人工膣法により採取した精液。

2) 希釈および分注方法:精液を採取、検査後直ちに一次希釈液で等量希釈し、4℃まで徐々に冷却した。その後、一次希釈で最終希釈倍率の1/2まで一次希釈液を加え、4℃に冷却したまま約18時間保存した。次に、二次希釈では、一次希釈液にグリセリンを加えた二次希釈液を最終希釈倍率になるまで加えた。この後、約4時間グリセリン平衡を行い、ストローに分注した。

3) 凍結方法:ストローを横式架台に入れ、凍結器により凍結した。

#### 4) 試験内容

(1)実験Ⅰ:1頭につき1日に2回精液を採取し、1回目の精液と2回目の精液をそれぞれ凍結した。その凍結ストローを35℃の温水に30秒浸漬して融解し、37℃に加熱した精液性状検査板上で、鏡検により精子生存率を調査した。

(2)実験Ⅱ:一次希釈まで行った精液を2区に分け、1区は24時間後に2次希釈を行いグリセリン平衡を4時間、他の1区は4時間後に2次希釈を行い、グリセリン平衡を24時間行った後、凍結し、実験Ⅰと同様の方法で融解後の精子生存率を調査した。

(3)実験Ⅲ:佐賀県畜産試験場で使用している希釈液に、耐凍剤としてグリセリン(G)およびエチレングリコール(EG)を濃度別に6区に分けて加え(第1表)、この希釈液により精液を凍結した。それぞれ、実験Ⅰと同様に融解し、35℃に保って融解後30秒(融解直後)から0.5時間、1時間、その後、1時間毎に8時間まで経時的に精子活力と生存率を調査し、精子生存指数によって比較した。精子生存指数は、次式により計算した。

$$\text{精子生存指数} = \{(\text{活力}++\text{の生存率} \times 100) + (\text{活力}+\text{の生存率} \times 75) + (\text{活力} \times 50) + (\text{活力} \pm \text{の生存率} \times 25)\} / 100$$

第1表 希釈液の組成

	G7%	EG0.25M	EG0.50M	EG0.75M	EG1.00M	EG1.25M	EG1.50M
トリアミノメタン (g)				1.3625			
クエン酸 (g)				0.7615			
フルクトース (g)				0.375			
ラクトース (g)				1.5			
ラフィノース (g)				2.7			
明炭 (m l)				20			
蒸留水				残量			
一次希釈液 (100ml中)							
グリセリン (m l)	86	97.22	94.44	91.64	88.86	86.06	83.28
エチレングリコール (m l)	14	-	-	-	-	-	-
二次希釈液 (100ml中)							
グリセリン (m l)	-	2.78	5.56	8.36	11.14	13.94	16.72

## 2. 結果

実験Ⅰ:1回目に採取した精液、2回目に採取した精液の、凍結前、凍結後の精子生存率を第2表に示した。凍結前の生存率は、1回目、2回目で有意な差はみられなかったが、凍結後は、2回目のほうが1回目より有意に高い値を示した。

実験Ⅱ:グリセリン平衡を4時間、および24時間行った精液の、凍結前、凍結後の精子生存率を第3表に示した。凍結前の生存率は、グリセリン平衡4時間区と24時間区で有意な差はみられなかった。一方、凍結後は、有意差とはならないものの、4時間区のほうがやや高い生存率を示した。また、グリセリン平衡24時間区のうち2検体では、凍結後の生存率が極端に悪かった。

実験Ⅲ:耐凍剤として加えたGとEGを濃度別に分けて凍結した精液の、融解後の精子生存指数の経時変化を第1図に示した。各区を比較すると、融解後30秒から4時間では、G7%区が最も精子生存指数が高く、特に、0.5から1時間では有意に高い値を示した。ただし、融解後30秒に限っては、EG0.75M区はG7%区に近い精子生存指数を示しており、これらの値に有意な差はみられなかった。EGの各区について比較すると、1.50M区が融解後30秒から5時間で有意に低い値となったほかは、各区に有意な差はみられなかった。

## 3. 今後の課題

佐賀県畜産試験場では、以上の結果を踏まえ、凍結保存には2回目に採取した精液を用いている。また、耐凍剤はグリセリンを用い、グリセリン平衡は4時間行っている。しかし、融解後活力が著しく低下するものも、しばしばみうけられ、これを防ぐためには、よりよい耐凍剤の開発が必要である。そこで、今後の試験ではグリセリンとDMSOの比較、また、ラクトース、ラフィノースとトレハロースの比較を行う予定である。

第2表 1回目と2回目の牛射出精液における凍結前後の精子生存率

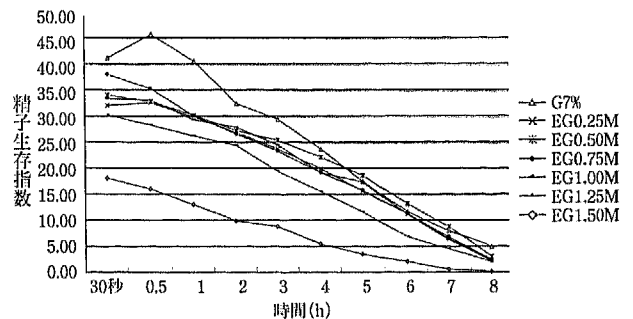
1回目 n=18		2回目 n=18	
凍結前(二次希釈後)	凍結後	凍結前(一次希釈後)	凍結後
75	35	80	55
80	72.5	85	80
80	60	85	75
60	30	75	40
85	65	75	55
65	46.15	70	52.5
75	30	80	65
80	55	85	65
85	55	90	65
70	50	75	65
85	60	65	65
80	67.5	85	67.5
55	30	70	50
85	52.5	85	62.5
80	45	85	70
80	65	70	60
60	40	80	70
85	60	80	72.5

(74.7±9.8) (64.5±13.0) \* (78.9±7.0) (61.2±9.5)  
注) \*: P<0.05で有意差あり(平均±S.D.)

第3表 グリセリン平衡時間の違いによる精子生存率

4時間 n=18		24時間 n=18	
凍結前(二次希釈後)	凍結後	凍結前(一次希釈後)	凍結後
75	45	75	55
85	75	85	70
80	55	70	55
80	70	80	70
75	40	75	10
70	60	70	10
85	52.5	80	42.5
85	62.5	85	70

(79.1±5.6) (62.2±11.9) \* (77.5±6.0) (61.2±9.5)  
注) (平均±S.D.) \*: n=0,17



第1図 耐凍剤の種類、濃度別精子生存指数の経時変化