

豚精巣上体精子の凍結保存時の精漿添加の影響

池田博司・岩永致悦・菊地和弘¹⁾
(佐賀県畜産試験場・¹⁾ 農業生物資源研究所)Hiroshi IKEDA, Muneyoshi IWANAGA and Kazuhiro KIKUCHI :
Effect of boar seminal plasma on freezing of epididymal spermatozoa

豚の凍結精液による人工授精は、自然交配や液状希釈保存精液に比べ受胎率や産子数が低い。したがって一部の優良種畜の保存や稀少品種の遺伝資源の保存には利用されているものの、生産現場段階ではほとんど普及していないのが現状である。豚精子は、他の畜種に比べ耐凍性が低く、種雄豚の個体差により耐凍性が違うことなどが問題とされている¹⁾。しかしながら、豚精子の凍結保存は上記目的のための長期保存として、簡便かつ有効な方法の一つである。豚精子の凍結保存は主に射出精液で行われているが、精巣上体精子の凍結保存は種雄豚の不慮の事故などの際に応用できる方法として有効である²⁾。精巣上体精子は射出精液に比べ低温ショックに対して抵抗性が強いことが報告されており³⁾、耐凍性の個体差の違いは精液の精漿中の精囊腺由来のタンパク質と関連性があると報告されている⁴⁾。一方で、精漿中には受精を誘起する因子が含まれており、精漿に感作された精子は受精とその後の発生にも影響を与えることが示唆されている⁵⁾。

そこで、本研究では精巣上体精子凍結保存の際の精漿添加の有効性を明らかにすることを目的とし、射出精液と精巣上体精子の凍結・融解後の比較および精巣上体精子の精漿添加による精子生存性への影響について、検討を行った。

1. 材料および方法

1) 供試豚および材料

ランドレース種雄豚の4頭(A, B, C, D)の射出精液および精巣上体精子を用いた。射出精液は、手圧法により濃厚部精液を約100ml採取した。精巣上体精子は、と畜体の精巣上体尾部より18G注射針を精管に挿入して前処理液もしくは精漿で押し出す精巣上体注出法で採取した。また、精巣上体精子に加えた精漿は、射出精液を遠心分離後の上澄みを用い、4頭の精漿を混合したものを用いた。

2) 凍結・融解方法

凍結・融解は、既報1, 2)より行った。ただし、ストローは0.5ml牛凍結精液用ストローを用い、凍結精子濃度は $5.0 \times 10^8 / \text{ml}$ とした。融解液はモテナ液(37℃)を用いた。

3) 処理区分

射出区：射出精液を同様に凍結した。前処理液区：各個体の右側の精巣上体精子を前処理液25mlを用い精巣上体尾部より注出し、さらに前処理液を25ml加えたものを凍結した。精漿添加-前処理液区：各個体の左側の精巣上体精子を精漿25mlを用い精巣上体尾部より注出し、前処理液を25ml加えたものを凍結した。

4) 調査項目

融解後は37℃の恒温槽内に保持し、融解直後(0分)から60分までは10分間隔で、その後90, 120および180分後に精子活力を調査し、それぞれ既報1, 2)に従い精子生存指数を算出した。

2. 結果および考察

濃厚部の射出精子数および精巣上体精子数は、それぞれ平均34.3および 21.0×10^9 で、精巣上体精子は1回の射出精液の約60%の精子数を採取することができた。また、採取直後の精子生存指数は、射出精液81.5、精巣上体精子75.0とほぼ同様な結果であった(第1表)。

融解後の精子生存指数は、射出区と前処理液区を比べるとBおよびCで前処理液区が生存指数が同様あるいは高い傾向にあった(第2・3表)。Dは、採取時の精巣

上体精子数が少なく、生存指数が低いことにより融解後の生存指数が射出区より低かったものと考えられる。Dを除く3頭の精巣上体精子は射出精液とほぼ同様あるいは高い生存指数を示した結果となった。前処理液区と精漿添加-前処理液区を比べるとBおよびDで前処理液区が生存指数が高い傾向にあり、平均値においても精漿添加-前処理液区が低い傾向にあった。しかし、AおよびCの精巣上体精子は精漿添加の影響をほとんど受けない結果となった(第3・4表)。これは、精漿添加区において精漿で注出直後に前処理液を加えたため精子と精漿の感作時間が短かったこと、もしくは精漿中の何らかの物質が精子膜に影響を及ぼすと考えられているが、精子膜の透過性に個体差がある可能性などが考えられる。

以上の結果より、精巣上体精子の凍結保存は優良遺伝資源の長期保存法の一つとして有効であると考えられる。しかしながら、凍結・融解後の精子生存指数は、射出精子よりも精巣上体精子で、精巣上体精子でも精漿の添加により低くなる可能性が示唆された。今後は、凍結・融解後の射出精子の生存性が高い理由を検討するとともに、精巣上体精子を用いた体外受精や、人工授精後の繁殖成績について検討を行う必要がある。

引用文献

- 1) IKEDA et al : *Theirogenology* (in press)
- 2) KIKUCHI et al : *Theirogenology* 50, 615-626.
- 3) RATH and NIEMANN : *Theirogenology* 47, 785-793.
- 4) 中西喜彦・前園洋史・永井卓也・平 篤郎・後藤和文・小川清彦 : *日豚会誌* 28 (3), 205-210, 1991.
- 5) FUNAHASHI et al : *Biol Reprod* 63, 1157-1163, 2000.

第1表 採取時の精子数および精子生存指数

供試豚	精子数 ($\times 10^9$)		生存指数	
	射出精液	精巣上体	射出精液	精巣上体
A	39.5	16.6	85.0	75.0
B	28.0	39.2	83.0	85.0
C	31.7	20.3	83.0	85.0
D	38.0	7.9	75.0	55.0
平均	34.3	21.0	81.5	75.0

第2表 射出区の精子生存指数の推移

供試豚	経過時間 (分)									
	0	10	20	30	40	50	60	90	120	180
A	64.2	70.8	70.8	74.2	61.7	54.6	52.1	36.7	36.7	35.0
B	59.2	67.5	65.8	70.8	67.5	65.8	61.7	41.3	41.3	40.8
C	58.3	59.2	67.5	52.9	57.5	60.8	60.8	60.8	52.5	43.3
D	50.3	55.0	55.0	60.0	55.8	47.5	42.5	42.5	39.2	39.2
平均	58.1	63.1	64.8	64.5	60.6	57.2	54.3	45.3	42.4	39.6

第3表 前処理液区の精子生存指数の推移

供試豚	経過時間 (分)									
	0	10	20	30	40	50	60	90	120	180
A	39.2	39.2	40.0	49.2	50.8	59.2	50.0	39.2	27.5	5.0
B	66.7	66.7	76.7	76.7	76.7	67.5	61.7	48.3	49.2	48.3
C	39.2	57.5	58.3	58.3	68.3	62.5	63.3	60.3	51.7	40.8
D	16.3	30.0	30.0	31.7	32.5	32.1	29.6	22.5	21.7	13.8
平均	40.3	48.3	51.3	54.0	57.1	55.3	51.1	42.5	37.5	27.0

第4表 精漿添加-前処理液区の精子生存指数の推移

供試豚	経過時間 (分)									
	0	10	20	30	40	50	60	90	120	180
A	30.8	37.9	39.6	45.4	49.2	50.0	45.8	33.8	32.1	6.3
B	31.7	37.1	50.0	56.3	55.8	54.2	49.6	33.8	34.2	37.1
C	41.7	50.0	51.7	51.7	60.8	60.0	56.7	50.8	47.5	40.0
D	7.1	9.6	10.0	15.4	15.0	12.1	12.9	12.5	12.5	7.5
平均	27.8	33.6	37.8	42.2	45.2	44.1	41.3	32.7	31.6	22.7