

# 牛凍結精液の生産性向上

## (1) 牛凍結精液の希釈液の検討

棚原武毅 真喜志修 千葉好夫

### I 要 約

牛凍結精液の安定的な生産と品質向上を目的として、トリスアミノメタン、ラクトース、クエン酸を含む溶液に卵黄を20%加えた希釈液（希釈液Ⅰ）とその他にフルクトース、ラフィノースを加えた希釈液（希釈液Ⅱ）、また、希釈液Ⅰおよび希釈液Ⅱを1:1に混合した希釈液（希釈液Ⅲ）を用いて、沖縄県畜産試験場で繋養している黒毛和種種雄牛3頭の凍結精液を作成し、凍結融解後の精子生存率を経時的に比較検討した結果は以下のとおりであった。

1. 凍結前の各種雄牛の精子生存率について、各希釈液には差が認められなかった。
2. 凍結融解直後の精子生存率について、希釈液Ⅲは希釈液Ⅱに比べて有意 ( $P < 0.05$ ) に優れており、希釈液Ⅰに比べ優れている傾向が認められた。
3. 融解後4時間の精子生存率について、希釈液Ⅲが優れている傾向が認められ、希釈液Ⅰおよび希釈液Ⅱと比べそれぞれ5.1%、5.6%優れていた。

### II 結 言

牛凍結精液の希釈液の主要成分は卵黄、糖類および緩衝剤であり、当場はトリス緩衝液を用いた卵黄緩衝糖液を使用している。その効果としては精液の増量、寒冷衝撃からの凍害防止効果、精子のエネルギー源などであるが<sup>1)</sup>、構成する成分の種類と濃度の違いにより凍結融解後の精子の生存性は変化することが報告されている<sup>2, 3)</sup>。そこで、3種類の希釈液を用い、牛凍結精液の生産性向上を目的として凍結融解後の精液性状に及ぼす影響を検討したので報告する。

### III 材料および方法

#### 1. 試験期間

1999年11月1日から11月15日まで行い、精液採取は週1回の割合で合計3回実施した。

#### 2. 供試牛および供試精液

##### 1) 供試牛

当場に繋養されている黒毛和種種雄牛3頭を供試した。供試牛の概要は表1に示した。

表1 供試牛の概要

区分	生年月日	父の名号	母の父の名号
種雄牛A	1997. 10. 7	北 国 7 の 8	糸 富 士
種雄牛B	1997. 12. 22	安 福 1 6 5 の 9	安 波 土 井
種雄牛C	1998. 3. 24	安 波 土 井	篤 郎

## 2) 供試精液

供試精液の精液性状を表2に示した。活力は85+++から90+++で正常範囲内にあり<sup>4)</sup>、その他の精液性状においても同様<sup>4, 5)</sup>であった。

表2 供試精液の精液性状

精液性状	種雄牛A(n=3)	種雄牛B(n=3)	種雄牛C(n=3)
活力	85+++	90+++	90+++
精液量(ml)	7.5	4.8	5.5
pH	6.4	6.7	6.4
精子数(億/ml)	12.1	11.3	10.8
生存率(%)	81.2	87.4	87.1
奇形率(%)	3.5	2.8	2.1

## 3. 希釈液の組成

1次希釈液の組成は表3のとおりである。希釈液はトリス緩衝液を用いた卵黄緩衝糖液であり、希釈液Ⅱはフルクトース、ラフィノースが含まれている。希釈液Ⅲは希釈液Ⅰと希釈液Ⅱを1:1に混合したものである。

2次希釈液は1次希釈液にグリセリンを14%濃度になるように添加したものである。

表3 1次希釈液の組成

成分名	希釈液Ⅰ	希釈液Ⅱ	希釈液Ⅲ
トリアミノメタン(g)	24.20	13.63	18.92
クエン酸(g)	13.56	7.62	10.59
ラクトース(g)	20.00	15.00	17.50
フルクトース(g)	—	3.75	1.88
ラフィノース(g)	—	27.00	13.50
ペニシリン(万単位)	333	100	217
ストレプトマイシン(g力価)	0.23	1.00	0.62
卵黄(ml)	200	200	200

注) 上記成分に蒸留水を加え、1000mlに調整

## 4. 試験方法

供試精液は人工膾法により採取した。各種雄牛より採取した精液を3等分し、各々0.5mlストロー当たり精子数5000万となるように各希釈液の1次希釈液および2次希釈液で希釈した。なお、5℃冷却および液体窒素による凍結は常法<sup>6)</sup>に従い実施した。

作成した希釈精液の凍結前と凍結融解(35℃水)直後および恒温水槽内(35℃水)で4時間保持した精子を5%エオジン液にて染色して精子生存率を比較し、一元配置法による有意差検定を行った。また、精子数の測定は精子数計測器(FHK;PC-607)を用い、pHの測定はブックpH試験紙によって行い、その他の精液性状検査は常法<sup>4)</sup>に従い実施した。

#### IV 結果および考察

##### 凍結前、凍結融解後の精子生存率

凍結前、凍結融解後の精子生存率は表4のとおりであった。

凍結前の各希釈液の精子生存率は、希釈液Ⅰが82.8%、希釈液Ⅱおよび希釈液Ⅲはそれぞれ81.6%、82.0%と各希釈液とも差は認められなかった。

凍結融解直後の精子生存率は、希釈液Ⅲが72.7%、希釈液Ⅱが68.0%と希釈液Ⅲが希釈液Ⅱと比べ有意 ( $P < 0.05$ ) に高かった。

融解後4時間の精子生存率について、希釈液Ⅲは希釈液Ⅱおよび希釈液Ⅰに比べそれぞれ5.1%、5.6%優れていた。

凍結融解直後および凍結融解後4時間の精子生存性において希釈液Ⅲが最もよく、逆に希釈液Ⅱは最も低かった。このことは各希釈液の組成の割合の違いが融解後の精子の生存性に影響を与えたものと考えられ、今後は、希釈液組成の検討が必要と思われる。

今後は凍結精液の生産性向上を図る目的で亜熱帯性気象条件下での種雄牛の個体別、年齢別及び季節的要因による精液性状の検討をする必要があると考える。

項 目	希釈液Ⅰ	希釈液Ⅱ	希釈液Ⅲ
凍 結 前 精 子 生 存 率	82.8 ± 7.3	81.6 ± 7.4	82.0 ± 9.4
融 解 直 後 精 子 生 存 率	70.2 ± 9.8 <sup>ab</sup>	68.0 ± 9.8 <sup>b</sup>	72.7 ± 9.7 <sup>a</sup>
融 解 後 4 時 間 精 子 生 存 率	36.8 ± 14.3	36.3 ± 13.9	41.9 ± 12.8

注) 異符号間に有意差あり、 $P < 0.05$

#### V 引 用 文 献

- 1) 内藤元男監修、1989、畜産大辞典、353、養賢堂
- 2) 坂井隆宏・永渕成樹・宮島恒晴、1997、Ⅱ. 牛精液有効利用のための凍結技術の開発、佐賀県畜産試験場試験研究成績書、34、4～6
- 3) 沢井利幸・藤山繁・平田浩一郎・田形弘・樫原高正・繁村右治、1994、牛精液の高希釈による凍結保存技術の開発、山口県畜産試験場報告、10、32～37
- 4) 家畜人工授精師講習テキスト(平成10年版)、1999、310～331
- 5) 内藤元男監修、1989、畜産大辞典、350、養賢堂
- 6) 家畜人工授精師講習テキスト(平成10年版)、1999、347～348

研究補助員：仲程正巳、宮城広明