

豚凍結精液の多彩な利用方法

岡 崎 哲 司 (大分県農林水産研究指導センター畜産研究部)

Okazaki, T. (2012) Various Availability of the Cryopreserved Boar Semen.

All about SWINE 41, 37-41

【開発された豚精液凍結融解技術】

既存の凍結精液による人工授精は、融解後の精子運動率が30%以上あれば利用するという、精子の機能性から見れば非常に低いものであった。そのため、人工授精後の受胎率および産子数は50%、5頭程度と低く、商業ベースではなかった。受胎率と産子数を向上させるためには、融解後の精子の機能性を向上させることがファーストステップである。そこで、まず、採精後の精子処理法、凍結法を最適化した。融解後の精子が十分動くようになれば、次なるステップでは、子宮内で機能性を長時間保持させ、正常に受精させること、受精卵を正常に着床させることが重要となる。これらは、精子融解後の融解液（人工授精するための希釈液）の組成変更で解決させた。これらの新しい技術についての詳細は、本誌第36号2010年で報告しているため、ここでは簡単に解説する。

精子の凍結には、精子内の氷晶形成を抑制するため、glycerolを加える必要があるが、細胞毒性を持っており高濃度では使用できない。そこで、glycerol非依存的に、凍結前に精子細胞内の水分量を低減し、低濃度 glycerol 下で凍結する必要がある。凍結前に精子を高張液下で脱水するため、凍結希釈液の浸透圧を400mOsm/kgの高張条件

にし、それに伴い glycerol を2%へと減少させる新規凍結希釈液を開発した。この新規凍結希釈液を用いた凍結条件の最適化はブタ雄個体間の耐凍能の差異を解決するまでに至らなかった。私達はこの耐凍能を左右する要因が精漿（精液の液体部分）であること、精漿中の細菌性内毒素（LPS）がその因子であるという知見を得たことから、採精直後に精漿を完全に除去し、LPSの生物活性部位を不活化する polymyxin B 添加前処理液にて処理する方法を確立した。ここまでの技術で融解後の精子活力を60+++～95+++に高めることができた。次に、融解後の精子機能性維持には、融解という温度上昇ストレスに起因する精子細胞膜の損傷、それによる精子の超活性化を抑制する必要がある。この温度上昇ストレスを精漿は緩和すること、さらには、人工授精後に胚の着床を促進する作用があることを明らかとした。そこで、この精漿による作用を、Ca²⁺キレート剤であるEGTAと、着床促進因子としてcortisolに置き換えた完全合成融解液を開発した。以上の成果から、以下のようない新しい精液凍結融解法を考案した。①採精直後、精漿を除去し、PMBで処理後、新規希釈液で凍結する。②この条件で凍結した精液を完全合成希釈液で融解する。①、②の精子を用いた人工授精により、受胎率90%、産子数9頭（大分県

農林水産研究指導センター内での試験成績) という成績が得られたことから、凍結精液の人工授精は実用化レベルにまで高めることに成功した。

【生産現場での実証試験】

大分県では、平成23年4月より凍結精液の譲渡を行っている。価格は1セット(液状精液1ドーズ分、融解液込)1,480円であり、液状精液を毎週輸送するコストを考慮するとさほど液状と凍結で変わらない。現在(H24年7月現在)7戸の生産者が利用しているが、各生産者が様々な利用法を確立している。A農場では、自家育成豚を作出するため、LまたはWの雄を飼育していたが、これらの飼育をやめ、母豚作出用のみ凍結精液に切り替えた。母豚作出用のL、Wは少数飼育になりがちで、かつ、農場の母豚繁殖成績はその雄豚で決定されてしまう。そのため、繁殖能力が未知の雄豚を少数飼育すれば、リスク回避できない。凍結精液であれば、能力が既知で、かつ、多様な雄豚精液を自由に導入でき、母豚のレベルアップにつながる。B・C農場では、飼育していた肉豚生産用のDを少数精鋭にし、肉豚生産レベルで凍結精液を利用している。D農場では、優良種豚の保存と、夏場の受胎率低下を改善するため、早めに技術を導入し、農場内で技術確立に取り組んでいる。E農場では、A農場と同様で、母豚作出用に凍結精液を利用しているが、衛生的に遺伝子を農場に取り込みたいという要望のため、凍結精液で導入するという手法を採っている。

このように各生産者それぞれで利用法が異なる。凍結精液による繁殖成績は、A農場が72%(受胎率)、8.2頭(平均産子数)、B農場が82%、10.4頭、C農場が100%、11.7頭、D農場が74%、10.2頭、

E農場が61%、9.8頭であった。

ここまでの成績を見れば、A・D・E農場でさらなる改善が期待できる。逆を言えば、B・C農場の成績が凍結精液による人工授精でであることである。では、現場で凍結精液を利用する際に生じる問題とはどんなものがあるのだろうか? 問題点その1としては、融解時のスピードが遅い事であった。凍結精液は、-196℃の液体窒素中で保存されており、それを60℃のお湯に浸し、8秒間で溶かす。その後、素早くストローの両端を切って、精液を37℃に温めた融解液へ注入しないと、精子は低温に曝されたままで、ダメージを受けてしまう。問題点2は、精子の活力検査である。凍結融解精子の運動性ピークは融解後30~60分でむかえる。そのため、活力検査で時間を取ってしまい、精子の代謝が落ちた後に人工授精を行っていた点である。問題点3は、融解時のお湯は60℃であるが、現場で60℃のお湯を作るのに手間がかかることである。ガス給湯器があればよいが、ない農場も多い。そのため、融解時の温度を一定に保てない。問題点4は、融解後精子は37℃に保たないといけませんが、人工授精場へ移動する際に常温に低下しており、精子の機能性が低下していた点である。これらの問題を解決するため、以下の様な指導を行ってきた。融解スピードを上げるため、空のストローを用意し、何度もイメージトレーニングと実施を行った。また、37℃の恒温水槽内で一貫して精液を溶かせるように、37℃のお湯に60秒間浸漬する融解システムに変更した。この融解温度はこれまでの60℃、8秒間とほとんど変わらない融解後の精子運動率を示した(図1)。これによって、融解が非常に楽になった。融解した精液は、活力検査を行い60+++以上

あるなしに関わらず、即座に人工授精する。人工授精場への輸送は、温度変化を起こさないように魔法瓶で輸送するという温度管理を徹底した。活力検査は、融解後に1.5mLのエッペンに精液を取っておいて、37°Cで温め、人工授精終了後に再度60+++以上あるか再確認を行った。これによって、精子の代謝がピークの内に子宮内へ注入できるようになった。

このように現場での問題点や失敗例を多く得られ、解決策を導くことができたのも生産者と共に実証試験を行ってきた賜である。その結果、A農場では、100%、9.2頭、D農場では、89%、11.4頭、E農場では、81%、10.3頭にそれぞれ大きく改善されている。今後も、さらなる問題点をあえて出すことで繁殖成績の安定に寄与していきたいと考えている。

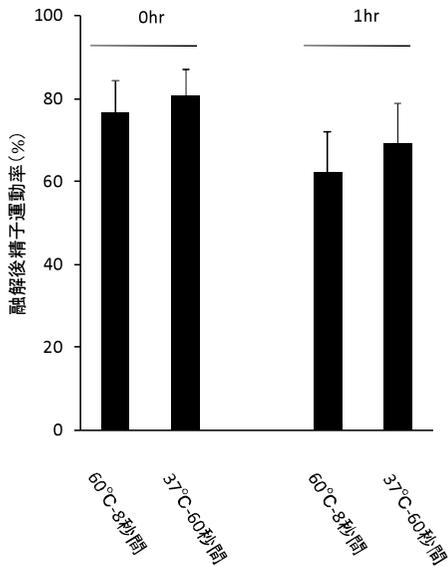


図1 融解温度の修正
37°Cのお湯に60秒間浸すことで簡単に融解できる

【受託凍結の必要性】

生産農場の種豚更新、育種は独自の手法で行われている。例えば、生体あるいは精液導入場所はそれぞれ異なるブリーダーから入手しているし、一方で、農場内で閉鎖的に育種し、ブランド豚を確立している農場も存在する。したがって、1箇所のブリーダー（例えば、大分県）が凍結精液配布技術を持っていても、広域的な普及にたどり着かないのは明瞭である。したがって、全ての農場がこの技術を利用していくためには、その農場が保有する雄豚精液を他機関が凍結保存し、販売するというシステム、つまり『受託凍結サービス』が必要となると考えた。詳細には、①受託機関が注文をうける、②発注農家に精液希釈液を送付する、③生産者は保存した雄豚から採精し、専用の希釈液で希釈し、発送する、④受託会社は精液を凍結保存あるいは管理し、生産者へバックする、という流れである（図2）。

【輸送液の開発】

今までにない『受託凍結サービス』を展開していくためには、精液を農場から受託機関へ精子のダメージがなく、凍結ができる条件で輸送しなくてはならない。そのため、専用の輸送液の開発の必要性があった。大きなポイントとしては、輸送時の温度ストレスである。精液は37°Cで採取され、その後15°Cの水が入った水筒で受託機関へ送付するが、遠方では到着するのに2日間かかってしまう。その間、精子は夏場では、温度上昇、冬場では温度低下を起こしてしまう。季節だけでなく、地域によっても温度は依存してしまう。温度変化は精子細胞内Ca²⁺動態を変化させ、機能性を低下させてしまう。そこで、融解液にも

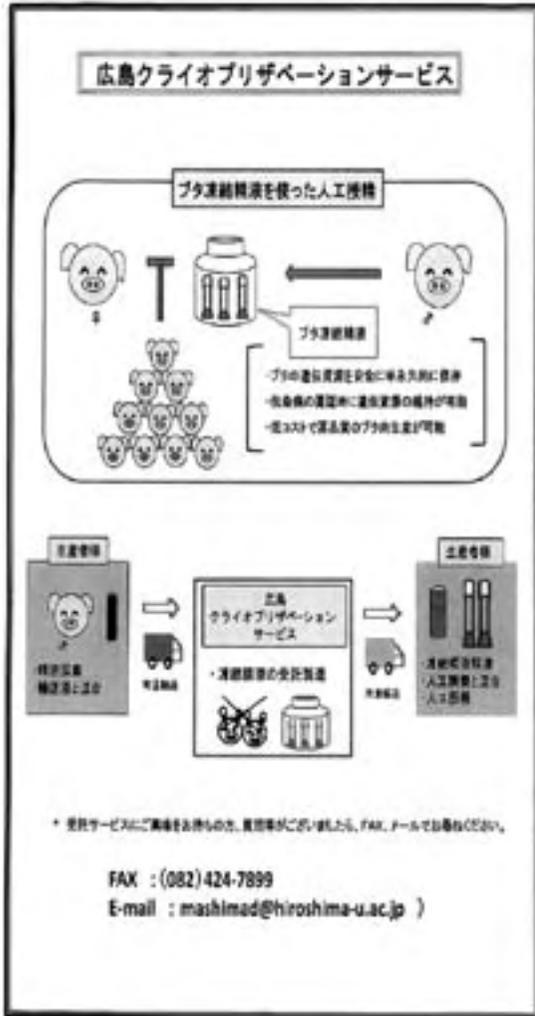


図2 株式会社広島クライオプリザベーションサービスの概要
 本会社で全国生産者を対象に受託業務を遂行する

用いたEGTAを輸送液に添加し、その効果を検討した。その結果、常温で2日間輸送した精液は、EGTAを添加した条件で高い融解後精子運動率を示した(図3)。私達は輸送されてきた精液の90%以上の凍結成功率(融解後の精子運動率60+++を成功の条件)を目指している。凍結成功率を安定して90%以上を保つためには、さらな

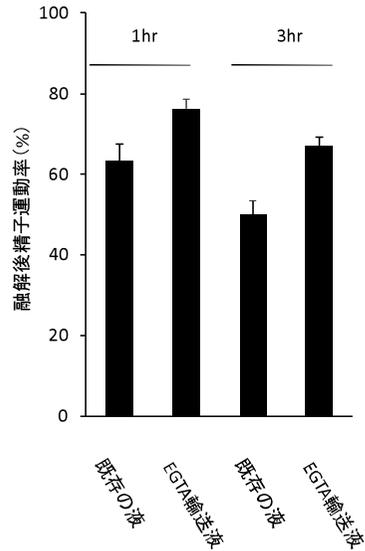


図3 EGTA 輸送液の有効性
 輸送液にEGTAを添加することで凍結成功率は向上する

る輸送液の品質向上が必要不可欠であり、現在、そのための研究を遂行している。

【受託凍結サービスの開始】

大分県農林水産研究指導センターでは、これまでに多くの雄豚の試験的な受託凍結を行ってきた。その結果、L, W, D, Bなどの一般的な雄豚精液だけでなく、合成豚や国外の豚でも、上述した手法を用いることで十分凍結できることが判明してきた。現在までの成功率は90%を超えている。平成24年1月より大分県では衛生面にも配慮した受託凍結業務を開始しており、1セット1,390円で販売している。本県の受託業務は本県の生産者を対象としているが、全国規模では、生研センターイノベーション創出基盤的研究推進事業で(株)広島クライオプリザベーションサービスを設立し、現在では試験的に事業展開している(図4)。



図4 ブタ凍結精液研究棟

大分県における受託凍結研究棟。内部は、衛生面を考慮し、清潔かつ、作業中も滅菌できるよう、ファン付きの紫外線の殺菌灯（図中の○）を設置。

受託凍結した精液を用いた人工受精成績については、今後、様々な場面で公表していきたいと考えている。大分県と㈱広島クライオプリザベーションサービスでより多くの例数を収集し、信頼性のある技術にしていきたい。今後、大分県のみでなく、多くのブリーダー、公的機関で凍結精液技術を利用し、さらには受託凍結で普及を拡大することで、養豚業の育種・衛生・種付け業務の革新による肉豚生産の安定化に貢献できれば幸いである。