

家畜精子の保存に関する研究

I 豚精子の活力並に生存に及ぼす温度の影響

登内徳一郎*

Studies on the Preservation of Spermatozoa in Domestic Animals.

1. The Effects of Temperature on the Motility and Survival of Boar Spermatozoa.

Tokuichirou TONOUCHI

I 緒言

従来家畜人工授精を目的とする精子保存の適温に関する研究報告は数多く発表され、最近特に Polge 等 ('52) による抗凍結物質の発見以来益々盛んになつている。しかし原精液中の精子の温度に対する抵抗性を目的として行つた実験は比較的少なく、特に豚精子については McKenzie 等 ('39)、伊藤等 ('48) などによつて報告された保存適温に関する文献をあげ得るに過ぎない。また豚精子の保存温度については他の家畜と同じく高温は生存時間を短縮し、低温を良しとするも、前記二者等によれば、前者において $10^{\circ}\sim 12^{\circ}\text{C}$ 、後者において精子濃度に従つて $3^{\circ}\sim 10^{\circ}\text{C}$ 或は $15^{\circ}\sim 20^{\circ}\text{C}$ を適温としている。従つて牛などに比べ比較的高温度である故長期保存の可能性が少なく実用上困難が多い。よつて豚原精液及び2,3の稀釈精液(緩衝液)中での豚精子の生存し得る温度の限界、更に $0^{\circ}\sim 50^{\circ}\text{C}$ が豚精子の長期生存に及ぼす影響等につき実験し、豚精子保存の基礎的研究の一部として、精子の温度に対する諸性状を明らかにし、加えて低温保存の可能性をも検討せんとして本研究を行つた。

研究実施に際し終始御懇篤なる御指導を忝うしたる本学農博三村一教授、並に御援助を戴いた本学部附属農場の諸氏、材料の一部を恵与された西尾正二、桑沢章両豚人工授精師に対し深甚なる謝意を表する。

II 実験材料及び方法

この実験には、本学部附属農場繋養の種牡豚、及び本県西春近村西尾正二、箕輪町桑沢章両人工授精所繋養の種牡豚を精液採取の材料とし、5頭58例につき実験した。精液はすべて丹羽等 ('51) による畜試式人工腔を用いて採取し、精子数は1cc中 $1.4\sim 3.2$ 億の精液を用いた。精液検査方法は西川等の“馬精子の生存に及ぼす温度の影響” ('49) を参考にし、精子の活力表示の方法は西川 ('51) の一般に用いている方法を採用した。実験期間は1955年2月より1956年2月に亘つた。

(I) 精子の生存限界温度の測定

高温生存限界の測定には $50^{\circ}\sim 60^{\circ}\text{C}$ 、低温生存限界には $0^{\circ}\sim -20^{\circ}\text{C}$ の温度を用い、前者については5頭11例の原精液と3頭9例の卵黄緩衝液添加稀釈精液、後者については5頭12例の原精液と5頭16例の卵黄緩衝液添加稀釈精液につき、これ等を採取後2~3時間以内で精子が anabiosis に入る前に直径 $0.2\sim 0.25\text{mm}$ の硝子毛细管に吸入し、これを上記温度に1~10秒作用させ、その精液内精子の生存状態を鏡検した。なお低温生存限界の処理には氷及び食塩の寒剤を使用した。

(II) 中間温の試験

3頭10例について極端な高温と低温の中間に位する $0^{\circ}\sim 50^{\circ}\text{C}$ の範囲を 5°C 毎に9段階に区切り実験

* 信州大学農学部畜産学教室

した。試料は直径約 1cm の小試験管に入れ、所定温の魔法瓶或は恒温器の中に保存し、一定時間毎に精子の活力検査を行い、anabiosis については 30分~2時間の活力回復処置を採り、鏡検を行つた。この実験にも原精液 (O) の外に卵黄緩衝液を用いた。これは牛用の卵黄磷酸塩液 (P) 及び卵黄枸橼酸塩液 (C) とこれ等に 6% 葡萄糖液を等量添加せるもの (P-G 或いは C-G) 計 5 種を用い、抗菌性物質の添加は行はなかつた。

■ 実験成績

(1) 高温生存限界として原精液及び稀釈精液の精子を 50°~60°C に瞬間的に 1~10 秒作用させ、その生存能力を検査した結果は、第 1、第 2 表及び第 3 表の通りである。但し第 3 表は 3 頭 3 例の例示である。

この結果より、精子は 50°C 以上の高温に対しては抵抗力弱く運動性及生存率共に著しく低下することを知つた。1~2 秒の殆んど瞬間的感作による精子生存の温度限界は 54°~56°C であり、原精液と稀釈精液との間に差異を認めがたい。なお精子の温度に対する抵抗性は個体、また同一個体においても採取の都度多少の相違のあることなどは西川等の馬精子 ('49) の場合と同様であつた。

(2) 低温生存限界として 0°~ -20°C に精子を瞬間的に 1~10 秒作用させた結果は、原精液において 0°C 以下に降る時、その生存率、活力共に極端に阻害され -2°C 以下では生存率 1% 以下となつた。稀釈精液では前者より抵抗力強く生存

第 1 表 原精液の高温生存限界

感作時間 (秒) 温度 (C)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
60										
59	0/1									
58	0/2									
57	0/8	0/1								
56	7/10	0/8	0/2	0/1	0/1					
55	8/10	4/10	2/6	0/5	0/1					
54	8/8	4/7	4/6	3/5	1/2	0/1	0/1		0/1	
53	6/6	4/4	6/6	3/6	2/5	2/3	1/1	2/2	1/2	1/1
52	8/8	1/1	2/2		2/2	1/1				7/7
51	3/3		2/2		3/3		2/2		2/2	2/2
50		1/1		2/2						

〔註〕 斜線の下欄は実験例数、上欄は生存例数を、太線は精子の生存限界を示す。

第 2 表 卵黄緩衝液稀釈精液の高温生存限界

感作時間 (秒) 温度 (C)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
60	0/2									
59	0/4									
58	0/1									
57	0/6	0/1								
56	4/8	0/6	0/4							
55	4/7	2/7	0/7	0/2						
54	7/7	5/7	3/7	2/5	0/3	0/2				
53	6/6	6/6	6/6	5/5	5/6	4/6	1/5	0/4		
52	6/6	6/6	6/6	5/5	6/6	5/5	2/2	4/5	3/4	3/4
51	5/5		3/3		4/4			4/4		4/4
50	2/2		3/3		3/3					4/4

第3表 50°~60°Cにおける原精液精子の活力, 生存率の例示

種名	胎号	長種 25-16			A星第5 ライブシ エルファイエオマン			長種 28-168 エスピー		
		2.94億			1.56億			2.52億		
精液性状	精子数 (cc)	92冊			90冊			90冊		
	精活 子力	92冊			90冊			90冊		
感作時間 (秒)		1	3	5	1	3	5	1	3	5
感作温度 (C)										
60										
59		0								
58		0								
57		0			0			0		
56		1±	0		0.01±			0		
55		10+	1±	0	15+	0		1+	0	
54		40+		1+	20+ 10冊	2±	0	5+	0	
53		45+	10+	7+	20+ 30冊	15+	0	10+ 40冊	5+	0
52		40+ 20冊			60冊	30冊				
51		65冊						60冊	40+	7+
50										
備考								50°C 4秒 60冊		

第4表 原精液の低温生存限界

感作時間 (秒)	温度 (C)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
-6	8/8	7/7	5/7	5/7	5/6	5/6	5/6	5/6	3/6	4/6
-7	10/11	7/9	5/9	5/7	3/6	4/5	4/4	3/4	2/4	0/3
-8	9/10	6/10	6/9	5/6	1/6	0/5	0/1			
-9	6/10	4/9	1/7	0/4	0/1					
-10	4/11	2/10	0/5	0/2						
-11	2/9	0/8	0/1							
-12	0/8	0/1								
-13	0/8	0/2								
-14	0/2									
-15	0/2									
-16	0/1									
-17	0/1									
-18	0/1									
-19	0/2									
-20	0/1									

活力共に優つた。以下一括表示すれば第4表及び第5表の通りである。

表により原精液にて1~2秒の低温感作による精子生存の温度限界は-6°~11°Cであることをみた。しかし稀釈精液では-13°~-16°Cが低温生存限界で、原精液と稀釈精液との間にかんがりの差異があつた。なお両者共高温生存限界測定の場合より個体或は同一個体において各採取毎の測定値の相違は著しかつた。

(3) 中間温の試験では極端な高温と低温の中間に位する0°~50°Cを採り、この間を9段階に分けて実験した結果は、50°Cにおいて精子は15分以内に全例死滅し45°Cでは3時間以内に同じく全例死滅した。原精液と各種稀釈精液との間には顕著な差異は認められなかつた。40°C以下の各温度における各液の精子生存の状態を図示すると第1図の通りである。

この結果から先ず精子の最長生存時間は、各液共に5°Cにおいて最高を示し、これに亞ぐは10°Cであつた。以下40°Cまで大体温度の上昇に伴つて遙減している。最適温5°Cに近き0°Cにおいて各液共俄に最長生存時間を短縮しているのは特異と云える。

原精液と稀釈精液とについてみるに、大体15°~40°

C造は原精液が優る。但し20°CにおけるP-G液の最長生存が原精液に等しい成績を示しているは異例と云うべく総合的にこれを見る時実験の誤差或は実験例数の不足と考えられ、これが検討は今後に残された。次に10°Cにて原精液はP液におとり、更に5°CにおいてはP液、P-G液、及びC液におとり、0°Cにてはすべての稀釈精液におとり、この時P-G液は著しく優れた結果となつた。また精子活力70 $\#$ についてみれば、結果は複雑であるが、各液の最適温度は、原精液にて15°C、

第5表 卵黄緩衝液稀釈精液低温生存限界

感作時間 (秒) 温度 (°C)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
-6										
-7										
-8										2/2
-9	10/10	4/4	4/4	4/4	7/7	4/4	4/4	4/4	4/4	8/8
-10	5/5	4/4	5/5	4/4	5/5	4/4	4/4	4/4	3/4	5/9
-11	14/14	10/10	10/10	9/10	9/10	7/9	5/9	4/7	4/5	4/4
-12	11/11	8/11	6/11	6/8	6/6	5/6	5/6	4/5	4/5	3/5
-13	14/14	8/13	7/11	6/7	6/7	3/6	3/6	2/3	1/3	3/5
-14	12/15	8/12	7/9	6/8	6/8	7/9	6/9	3/9	1/7	0/3
-15	10/15	10/14	5/11	1/11	0/5	0/1				
-16	8/14	0/14	0/10							
-17	0/11	0/5								
-18	0/4									
-19	0/4									
-20										

第1図 温度別の精子活力と生存

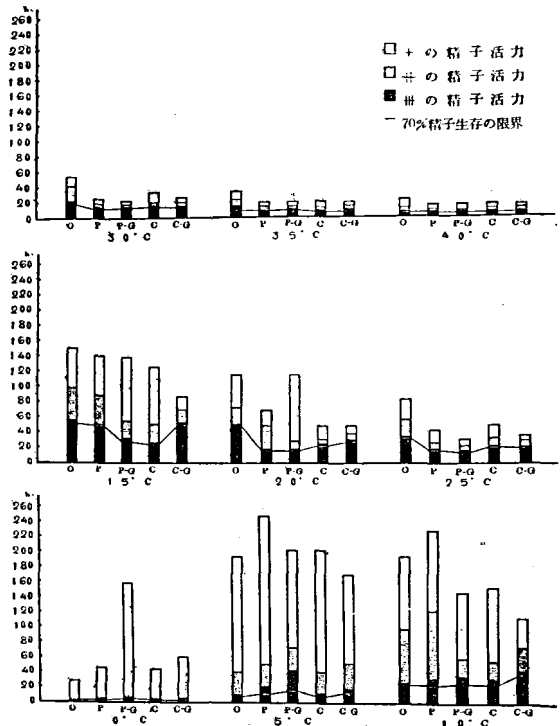
O; 原精液

P; 卵黄磷酸塩液稀釈精液

P-G; 卵黄磷酸塩液添加6%葡萄糖液
稀釈精液

C; 卵黄枸橼酸塩液稀釈精液

C-G; 卵黄枸橼酸塩液添加6%葡萄糖液
稀釈精液



これに亞ぐものとして20°C, 稀釈精液にては15°C, 次いで10°Cが最適であつて, 以下これ等温度から低下或は上昇するにしたがい活力は遞減している。なお10°C及び15°CにおけるC-G液の優位は目立つた。

次に各温度における原精液と稀釈精液とについて上記活力を比べると, 40°C及び35°Cにおいて両液の間に殆んど差異がなく, 以下30°C, 25°C, 20°C, 及び15°Cにおいて, 原精液は稀釈精液に優る成績を示した。10°CにおいてはP液を除き他の稀釈精液が優り, 5°C及び0°Cにおいても稀釈精液が多少原精液に優る結果となつた。

Ⅲ 考 察

精子の高温生存限界について考察するに, 動物の種類又同一個体において或は測定方法によつて多少の差異はあるが, これを他の家畜のそれと比較するに, 例へば牛精子にて, 小松('30) 52°C, 榊田, 平田('41) 54.5°C, 馬精子にて西川, 杉江('49) 54°~56°C, 山羊にてMöckel('37) 56°Cを高温生存限界としている。但し小松を除き他はいづれも瞬間的感作による生存限界温度である。したがつて著者の豚における実験結果の54°~56°Cなる値は, 測定方法を異にした小松の事例を除き牛, 馬及び山羊と略同一結果を示した。

実験成績(2)において, 原精液の精子低温生存限界として, -6°~-11°Cの値を得たが, 同様の実験を西川, 杉江('49)は馬の原精液にて行い, その限界温度として-17°~-18°Cを報告している。榊田, 平田('41)は牛にて同様-14.5°Cを報告している。著者の豚における成績はこれ等と一致せずはるかに高い値をとり, 且個体的な差異が多かつた。これを以つてすれば豚精子は牛及び馬精子よりも低温に対する抵抗性は低いものと思考される。なお高温生存限界においては原精液と稀釈精液との間に殆んど認むべき差異がなかつたが, 実験成績(2)における低温生存限界の結果では原精液と稀釈精液との間に著しい差異が表われ精子に対する卵黄緩衝液の保護作用が認められた。

次に実験成績(3)について考察するに, 伊藤等('48)は, 豚原精液の長期保存に有利な温度は15°~20°Cで最長生存温度は8°Cと云う, 著者の成績においても有利な保存温度は15°Cと認められ, 最長生存温度については10°C及び5°Cが該当する値にて, これ等は略伊藤等の結果と一致した。精子の最長生存時間について原精液と稀釈精液とを比べると15°C以上では前者が後者に優るけれど, 10°Cさらに5°Cを段階として0°Cにおいてはすべて稀釈精液が原精液に優る結果は(1)の実験において低温生存限界の決定に際し稀釈精液が原精液より低下した限界をもつという事実をさらに裏付けた事柄であつて, 低温における稀釈液の保護作用を證明したものと考ええる。なお実験成績(3)の稀釈精液にて10°~15°C以上に保存した試料には細菌の繁殖が甚だしく抗菌性物質の添加の必要性が考えられた。

丹羽('53)は牛用卵黄緩衝液に抗菌性物質を添加せるものを豚精液に応用し, その効果の確実なることを実験しているが, 各種温度段階についての追究は欠如している。

著者はこの実験において広範な温度段階を設け, 原精液と共に各種稀釈精液の豚精子に及ぼす影響を追究して以上の新知見を得たのであるが, 今後抗菌性物質の添加による精子の生存の状態, また更に温度下降における精子の温度感作即ちその抵抗性等を同様原精液及び濃厚精液について検討し本実験を整備したい。

Ⅴ 摘 要

(1) 種牡豚から人工墮法で採取した精液について, その精子の温度に対する抵抗性を実験した。なおその試料として原精液の外に卵黄磷酸塩液及び卵黄枸橼酸塩液で稀釈した精液を用いた。

(2) 原精液精子の高温及び低温生存限界はそれぞれ $54^{\circ}\sim 56^{\circ}\text{C}$ 及び $-6^{\circ}\sim -11^{\circ}\text{C}$ であり稀釈精液の場合は $54^{\circ}\sim 56^{\circ}\text{C}$ 及び $-13^{\circ}\sim -16^{\circ}\text{C}$ であった。

(3) 即ち高温においては原精液と稀釈精液の間に差異を認めなかつたが、低温においては両者の間に差異を認めた。なお精子の活力は 50°C 以上或は 0°C 以下では著しく阻害される。

(4) 豚精子は牛及び馬精子よりも低温に対する抵抗性は低いものと考えられた。

(5) 原精液及び稀釈液で精子保存の最適温度は 15°C であるが精子の最長生存に有効な温度は $5^{\circ}\sim 10^{\circ}\text{C}$ であり、これを中心に生存時間は短縮される。

(6) 精子の最長生存時間は、 40°C から 15°C 迄は原精液が稀釈精液に優る成績を示した。しかし 45°C 以上の高温では原精液と稀釈精液とにおいて精子生存最長時間に殆んど差異がなかつた。

(7) 5°C 以下の低温の場合に稀釈液は精子の最長生存に有効な結果となり稀釈液の保護作用を認めた。

参 考 文 献

1. 伊藤祐之, 丹羽太左 \neq 門, 工藤篤, 瑞穂当 (1948) 豚の人工授精に関する研究 II, 精液についての観察と保存に関する実験, 畜産試験場報告, 第2号
2. 小松伊三郎 (1930) 牛の精虫に就ての生理学的研究, 宮崎高農学術報告, 第2号
3. 榊田精一, 平田齊 (1941) 牛の人工授精殊に精子と温度との関係, 日本畜産学会報, 第14巻, 第1号
4. McKenzie, F. F., J. F. Lasley, & R. W. Phillips. (1939) The storage of horse and swine semen. Mo. Agric. Expt. Sta. Jonr. Ser. 567.
5. Möckel, H. (1937) Zur Physiologie des Ziegenbockspermas (im Hinblick auf die kuenstliche Besamung). Dissert. Univ. Leipzig, 47.
6. 西川義正, 杉江信 (1949) 馬精虫の抵抗力に関する研究 II, 馬精虫の生存に及ぼす温度の影響, 日本畜産学会報, 第20巻, 第4号
7. 西川義正 (1951) 家畜人工授精法 Pp. 339~355. 養賢堂
8. 丹羽太左 \neq 門 (1951) 家畜人工授精の技術, Pp. 233~259 産業図書
9. 丹羽太左 \neq 門 (1953) 家畜精液の取扱いと検査, 畜産の研究, 第7巻, 第12号
10. Polge, C., & A. S. Parks. (1952) Possibilities of Long-Term Storage of Spermatozoa at Low Temperature. Anim. Breed. Abstr., Vol. 20, Pp. 1~5.

Summary

A study was made of the effects of temperature in semen upon the livability of boar spermatozoa. The method of obtaining semen from a boar was the use of artificial vagina. The experiment was designed to compare 3 lots of semen; original semen, egg yolk-phosphate and egg yolk-citrate diluters.

The highest and lowest temperatures at which the spermatozoa in original semen survived for a momentary were $54^{\circ}\sim 56^{\circ}\text{C}$. and $-6^{\circ}\sim -11^{\circ}\text{C}$. and in the cases of two diluters they were $54^{\circ}\sim 56^{\circ}\text{C}$. and $-13^{\circ}\sim -16^{\circ}\text{C}$., respectively. There was no difference as compared with original semen and diluted semens at a high temperature, however, differences

between them were much at a low temperature. Motility of spermatozoa was remarkably obstructed at above 50°C. and sub-zero temperature.

It was indicated that the livability of boar spermatozoa at a low temperature was less than that of cattle and horse spermatozoa. The optimum storage temperature for boar spermatozoa in original semen as well as diluted semen was 15°C. Maximum survival length of time of spermatozoa in original semen was longer than that in diluted semen at a temperature of 15°~40°C., and at a high temperature which was above 45°C. found no differences between original semen and diluted one. At a low temperature which was below 5°C. in diluted semen showed efficient results for the maximum survival length of time of spermatozoa, and it has been determined that boar spermatozoa were more resistant to lower temperature when the semen diluted with egg yolk diluter than when it cooled undiluted, and found buffer effects of diluted semen.