非繁殖季節に発情誘起された雌羊の分娩率に及ぼす 凍結精液の作成季節と雄羊の個体差の影響

田中久美子・林 智子・山田亜紀・田淵浩二郎・福井 豊

帯広畜産大学家畜育種増殖学講座・帯広市 080

(1994 年 7 月 19 日受理)

緒 言

めん羊は、秋から冬にかけて繁殖する短日性の季節繁殖動物である。特に、わが国で主に飼養されているサフォーク種は、繁殖季節が短く、通常 1 年 1 産が繁殖サイクルであり、このことは、めん羊の増産において大きな障害となっている。そこで、非繁殖季節にプロジェストジェンと PMSG の併用により、雌羊の発情・排卵を人為的に誘起して受胎させる、季節外繁殖が有効な手段として注目されるようになった^{1,2)}。

雌羊の発情誘起には、近年、New Zealand で開発された Controlled Internal Drug Release Device <<CIDR>>³⁾ が、1) 脱落が少ない、2) 除去時の悪臭が少ない、3) 発情発現が早く、かつ、集中して起こる^{4,5)}などの利点があり、また、非繁殖季節における CIDR と PMSG の併用により、高い受胎率が得られることから^{6,7)}、わが国でも膣内スポンジの代わりに応用されている⁸⁾。

季節外繁殖における受胎率は、通常の秋の自然発情の場合と比べて低い傾向にある。これは、雌羊だけでなく、雄羊の体調や精液性状も低下していることが大きな要因であるとされている。一般に、雄羊は雌羊ほど明瞭な繁殖季節を示さないが、精子生産や精液性状には季節的変化がみられ^{9,10)}、このような非繁殖季節における雄羊の精液性状の低下は、雌羊の受胎率に影響を及ぼすとされている¹¹⁾。

本実験では、CIDR と PMSG の併用により非繁殖季節に発情を誘起した雌羊を供試し、腹腔内視鏡を用いた定時人工授精において、凍結精液の作成季節が受胎率に及ぼす影響、および精液性状に及ぼす雄羊の個体差について検討した。

材料および方法

本実験は、1993 年 7 月 2 日から 7 月 14 日まで北海道士別市上士別町にある大和牧場で行った。

供試雌羊は、大和牧場で飼養管理されている 2～4 歳 (88 頭) および 4 歳以上 (31 頭) のサフォーク種成熟雌羊 119 頭である。

発情の誘起は、9% (300 mg) 天然黄体ホルモン含有シリコン製膣内挿入具 Controlled Internal Drug Release (EAZI-breed CIDR G : CARTER HOLT HARVEY PLASTIC PRODUCTS, New Zealand ; 以下 CIDR) を雌羊の膣深部に 9 日間挿入し、CIDR 除去 1 日前に PMSG600IU (セロトロピン : 帝国臓器製薬) を筋肉内注射することにより行った⁴⁾。

供試雌羊を 4 区 (雄羊 2 頭×精液採取季節) に分け、CIDR 除去後、42～50 時間内に腹腔内視鏡 (ドイツ、ストルツ社製) を用いて人工授精を行った。なお、9 日間の CIDR 挿入期間中に CIDR が脱落した雌羊および人工授精が不可能であった雌羊は実験群から除外した。

精液は、1992 年 9 月にアメリカ合衆国より輸入され、北海道士別市めん羊牧場で飼養管理されて

Jpn. J. Sheep Sci., 31 : 16-20. 1994

Effects of season for making frozen semen and individual rams on lambing rate of ewes induced estrus during the non breeding season.

Kumiko TANAKA, Noriko HAYASHI, Aki YAMADA, Kojiro TABUCHI and Yutaka FUKUI

Laboratory of Animal Genetics and Reproduction, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro 080

いた2歳のサフォーク種雄羊2頭(A, B)から、繁殖季節である1992年11月26日(11月作成)と、非繁殖季節である1993年7月3日(7月作成)にそれぞれ人工膣を用いた横取り法により採取し、5倍希釈後、ペレット状に凍結し、液体窒素内(-196℃)で保管した。また精液は、精液量、精子活力、精子濃度、精子生存率および精子奇形率の5項目について性状検査を実施した。精液量は、採取した原精液を目盛り付き尖底試験管に移して測定した。精子活力は、スライドガラスに原精液を一滴おとし、光学顕微鏡下で雲霧様運動を観察し、前進運動を示す精子の割合をパーセントで示した。精子濃度は、赤血球用メランジュールと血球計算盤を用い光学顕微鏡下で4回算出し、その平均を記録した¹²⁾。精子生存率および精子奇形率は、コンゴレッド・ニグロシン生体染色を施した塗抹標本を、光学顕微鏡下でそれぞれ精子200個中の生存精子を3回、精子奇形率では、光学顕微鏡下で精子400個中の奇形精子を2回算出

してその平均を記録した⁸⁾。なお、精液量、精子活力は精液採取後に、精子濃度、精子生存率、精子奇形率においては、凍結・融解後に検査した。

統計分析は、精液性状の凍結精液作成季節による違いおよび雄羊の個体差について、SAS (Statistical Analysis System) のGLM処理による多重比較検定を行った。供試雌羊119頭中、CIDRが脱落した3頭および人工授精が不可能であった5頭は実験群から除外した。最終授精頭数111頭から、それぞれの区において分娩率(分娩頭数/人工授精頭数×100)および産子率(新生子羊頭数/分娩母羊頭数)を算出した。また、凍結精液作成季節および雄羊の個体が、分娩率および産子率に及ぼす影響は、SASのCATMOD処理による χ^2 検定を用いて分析した。

結 果

精液性状検査の結果を表1に示した。精液量は、繁殖季節が1.3mlと、非繁殖季節(0.6~0.8

表 1. 精液性状の検査結果

雄羊	月	精液量 ^a (ml)	精子活力 ^b (%)	精子濃度 ^c ($\times 10^8$ /ml)	精子生存率 (%)	精子奇形率 ^{bc} (%)
A	11	1.3 $\pm$ 0.1	86.7 $\pm$ 2.7	42.3 $\pm$ 2.8	51.6 $\pm$ 3.1	9.3 $\pm$ 0.3
	7	0.8 $\pm$ 0.1	82.0 $\pm$ 1.8	34.1 $\pm$ 1.1	47.6 $\pm$ 1.0	7.9 $\pm$ 0.8
B	11	1.3 $\pm$ 0.1	86.7 $\pm$ 2.7	29.5 $\pm$ 0.7	49.6 $\pm$ 3.8	6.0 $\pm$ 0.8
	7	0.6 $\pm$ 0.1	80.0 $\pm$ 0.0	29.1 $\pm$ 1.3	45.1 $\pm$ 0.6	3.9 $\pm$ 0.1

^a: 季節間に有意差あり (P<0.01)

^b: 季節間に有意差あり (P<0.05)

^c: 雄羊の個体間に有意差あり (P<0.01)

mean $\pm$ S.E.M.

表 2. 季節外繁殖における雌羊の分娩率および産子率に及ぼす凍結精液作成季節と雄羊の影響

		凍結精液作成季節		
雄羊		11月	7月	計
分娩率	A	57.1 (16/28)	60.7 (17/28)	58.9 (33/ 56)
	B	70.4 (19/27)	71.4 (20/28)	70.9 (39/ 55)
	計	63.6 (35/55)	66.1 (37/56)	64.9 (72/111)
産子率	A	1.69 (27/16)	1.64 (28/17)	1.67 (55/ 33)
	B	1.47 (28/19)	1.55 (31/20)	1.51 (59/ 39)
	計	1.57 (55/35)	1.59 (59/37)	1.58 (114/ 72)

分娩率(分娩頭数/人工授精頭数×100 ; %) 産子率(新生子羊頭数/分娩母羊頭数)

ml) に比べて有意に多かった ($P < 0.01$)。精子活力も、繁殖季節のほうが5~7%高く、その差は有意であった ($P < 0.05$)。精子濃度では、2頭の雄個体間に有意差が認められ ($P < 0.01$)、季節による差は認められなかった。精子生存率においては、季節および雄個体間のいずれにおいても有意差は認められず、50%前後の値であった。精子奇形率では、有意な個体差 ($P < 0.01$) が認められたが、いずれも繁殖季節に高い傾向を示した ($P < 0.05$)。

雄羊および凍結精液作成季節の違いにおける分娩率・産子率を表2に示した。分娩率は、雄羊Aの精液で58.9%、雄羊Bの精液で70.9%と、雄羊Bで高い分娩率を得たが、雄個体間に有意差は認められなかった。凍結精液の作成季節別では、繁殖季節(11月)の精液で63.6%、非繁殖季節(7月)の精液で66.1%と、有意差は認められなかった。また、雄個体と季節との相互作用も認められなかった。産子率では、雄羊Aが1.67、雄羊Bが1.51、繁殖季節(11月)が1.57、非繁殖季節(7月)が1.59であり、それぞれにおいて有意差は認められなかった。

考 察

精液性状検査の結果、凍結精液の作成季節の変異によって影響を受けたのは、精液量・精子活力であった。これは、春から夏にかけての非繁殖期に精液性状が低下するという報告^{13,14)}と同様の結果であった。しかし、精子奇形率では、2頭とも繁殖季節(11月)に有意に高い傾向を示した。本実験で供試した雄羊2頭は、同年9月に輸入されたばかりであったため、輸送や飼養環境の変化に伴うストレスなどによって、その後のある期間は精子形成が円滑に行われなかったのではないと思われる。

凍結精液作成季節別の分娩率において、11月(63.6%)と7月(66.1%)の間に有意な差は認められなかった。4月~5月にかけての精子形成・精液性状の低下は、非繁殖季節における雌羊の受胎率を低下させるといわれている¹⁵⁾。また、同様の実験を秋と春に行った場合、春に採取した精液で秋に人工授精したときの受胎率(51.1%)は、秋に採取した精液を春に授精した時(57.5%)より

も低く、さらに、春に採取した精液で春に人工授精した場合、最も低い受胎率(41.0%)であったと報告されている¹⁶⁾。しかし、今回は、非繁殖季節の精液性状の低下に関係なく、良好な分娩率を得た(11月:63.6%, 7月:66.1%)。これは、実験時期が、繁殖期開始直前の7月であったためと思われる。

雄羊Aの精液では58.9%、雄羊Bの精液では70.9%の分娩率を得た。雄羊Bと比較して雄羊Aの精液では低い傾向を示したが、雄羊A、B間において有意差は認められなかった。本実験で用いた精液は、精子濃度の差異に関係なく、一律5倍希釈とした。めん羊の精子は、他の家畜に比べ著しく濃度が高く、解糖能力が高い。そのため、原精液のままで室温に放置することは、精子の代謝産物である乳糖を多量に蓄積させ、pHを著しく低下させて、精子生存に支障をきたすといわれている。よって、野外で行う実験において、採精後直ちに精子数を測定し、希釈倍率を変えることは困難である。そこで、本実験では、1つの指標として、凍結精液作成ペレット数に着目し、雄羊個体の繁殖能力を推測し、2頭を比較した。なお、授精精液量は、雌羊1頭あたり1ペレット(0.2ml)であった。1射精で作成されたペレット数×精子生存率×正常精子率という式から、1射精あたりの受胎可能雌羊頭数を雄羊の繁殖能力とすると、雄羊Aで11.9頭、雄羊Bで10.7頭であり、雄羊の個体間に差はみられなかった。

本実験における産子率は、繁殖季節における自然交配で得られる産子数1.64¹⁷⁾に匹敵するものであった。これは、PMSG投与による多排卵処置の効果によるものと思われる。

今回の実験では、非繁殖季節に発情を誘起された雌羊において、非繁殖季節(7月)に作成された凍結精液による人工授精でも良好な受胎率が得られることが示唆された。しかし、供試雄羊頭数が2頭と少なかったため、今回の結果を一般的な傾向と断定するには、さらに多くの雄羊を用いた研究が必要と思われる。また、受胎率は、雄羊の個体によっても影響されるため^{2,16,18)}、高い性欲・精液性状(特に奇形率の低い)を示す雄羊の選抜、精液性状の人為的な改善が重要となってくる。非繁殖季節において150 μ gの性腺刺激ホルモン放

出ホルモン (GnRH) を1週間隔で4回注射することにより、精子活力・精子奇形率は、繁殖季節の精液性状と変わらないまでに改善される¹⁹⁾。また、黄体形成ホルモン (LH)、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) などのホルモン投与や、人為的な日照時間の短縮処置なども受胎率の向上に有効とされている¹¹⁾。

今回の人工授精では、5倍希釈の凍結精液 (授精精子数 $29.5 \sim 43.0 \times 10^6 / 0.1 \text{ ml} / \text{子宮角}$) を用いたが、Maxwell¹⁸⁾ は、より少ない精子数 (20×10^6) を用いて50%以上の受胎率を得ている。今後、高倍率の希釈による最低授精精子数 (運動または生存精子数) の決定と受胎率の検討が必要である。

要 約

本実験は、人工授精に用いる凍結精液の作成季節および雄羊の個体が、非繁殖季節に発情誘起された雌羊の受胎率に及ぼす影響について検討した。

供試羊は、めん羊の非繁殖季節である1993年7月に北海道士別市の大和牧場で飼養管理されているサフォーク種成熟雌羊119頭を用いた。

雌羊は、発情同期化の方法により、天然黄体ホルモン含有シリコン製陰内挿入具: CIDRを陰内に9日間挿入し、CIDR除去1日前に妊馬血清性性腺刺激ホルモン: PMSG 600 IUを臀部に筋肉内注射して、発情および排卵を誘起した。さらに、CIDR除去後42~50時間目に腹腔内視鏡を用いて人工授精を行った。なお授精精液量は、両子宮角にそれぞれ0.1 mlとした。

人工授精に用いた精液は、1992年9月に輸入され、士別市めん羊牧場で飼養されているサフォーク種成熟雄羊2頭より、繁殖季節 (1992年11月) と、翌年の非繁殖季節 (1993年7月) に人工陰により採取した。採取した精液は、5倍希釈し、冷却後、ドライアイス上で錠剤化凍結し、液体窒素内 (-196°C) で浸漬保存した。さらに、精液量、精子活力、精子濃度、精子生存率、精子奇形率について精液性状検査を行った。精液性状検査の結果、精液量 ($P < 0.01$)・精子活力において非繁殖季節における低下が認められた ($P < 0.05$)。しかし、精子奇形率では、繁殖季節 (11月) が、非繁

殖季節 (7月) より有意に高い値を示した ($P < 0.05$)。また、精子濃度、精子奇形率において、2頭の雄羊個体間に有意差が認められ、ともに雄羊Aが雄羊Bより高かった ($P < 0.01$)。

分娩率は、繁殖季節 (11月) の精液で63.6%、非繁殖季節 (7月) の精液で66.1%であった。凍結精液の作成季節の違いにおいて有意差は認められなかった。さらに、雄羊個体別では、雄羊Aの精液で58.9%、雄羊Bの精液で70.9%と、雄羊Bの精液で高い傾向にあったが、有意差は認められなかった。

産子率では、繁殖季節 (11月) の1.57、非繁殖季節 (7月) の1.59、雄羊Aの1.67、雄羊Bの1.58と、精液性状の差異に関係なく有意差は認められなかった。

本実験の結果より、凍結精液は、作成季節に関係なく周年繁殖に用いることが可能であり、そのとき凍結精液による人工授精で60%以上の分娩率が期待できるものと思われる。

文 献

- 1) 小林正之・福井 豊・手塚雅文・小野 斉. 非繁殖季節におけるめん羊の発情誘起と分娩率におよぼすPMSG注射時期と雄羊導入時期の効果. 家畜繁殖誌, **32**: 32-35, 1986
- 2) FUKUI, Y., M. TSUBAKI, M. KOBAYASHI and H. ONO, Mating behavior of ram on ewes at induced estrus during the non-breeding season. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, **32**: 195-201, 1986
- 3) WHEATON, J.E., K.M. CARLSON, H.F. WINDELS and L.J. JOHNSTON, CIDR: A new progesterone-releasing intravaginal device for induction of estrus and cycle control in sheep and goats. *Anim. Reprod. Sci.*, **33**: 127-141, 1993
- 4) 平井秀邦, 非繁殖季節におけるめん羊の凍結精液による定時人工授精に関する研究—MAP スポンジとCIDRの効果と最適授精時間の検討. 帯広畜産大学卒業論文, 1992
- 5) THOMPSON, J.G.E., A.C. SIMPSON, R.W. JAMES and H.R. TERTVIT, The application of progesterone containing CIDR devices to superovulated ewes. *Theriogenology*, **33**: 1298-1305, 1990
- 6) SMITH, J.F., G.F. CRUICKSHANK, L.T. MCGOWAN, J. PARR and B.J. MORTIMER, Seasonal changes in

- estrus, ovulation and conception of Coopworth ewes treated with CIDRS and PMSG. *Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod.*, **48** : 99-102, 1988
- 7) FUKUI, Y., H. HIRAI, K. HONDA and K. HAYASHI, Lambing rate by fixed-time intrauterine insemination with frozen-thawed semen in seasonally anestrous ewes treated with a progestogen-impregnated sponge or a CIDR device. *J. Reprod. Dev.*, **39** : 1-5, 1993
 - 8) MAXWELL, W.M.C. and D.R. BARNES, Induction of oestrus in ewes using a controlled internal drug release device and PMSG. *J. Agric. Sci. Camb.*, **106** : 201-203, 1986
 - 9) CUPPS, P.T., B. MCGOWAN, D.F. RAHLMANN, A.R. REDDON and W.C. WEIR, Seasonal changes in the semen of rams. *J. Anim. Sci.*, **19** : 208-213, 1960
 - 10) 福井 豊・阪本克彦・大崎和栄・小野 斉, 雄羊の精液性状と血漿中テストステロン値の季節的变化. 日緬研会誌, **28** : 5-11, 1991
 - 11) FUKUI, Y., M. KOBAYASHI and H. ONO, Effects of injection time of pregnant mare's serum gonadotropin and individual rams on fertility of ewes in a trial of out-of-season breeding. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, **31** : 16-24, 1985
 - 12) 福井 豊, めん羊の繁殖技術. 東京農業大学出版会, 1989
 - 13) BOLAND, M.P., A.A. ALKAMALI, T.F. CROSBY, N.B. HAYNES, C.W. HOWLES, D.L. KELLEHER and I. GORDON, The influence of breeding season and photoperiod on semen characteristics, testicular size, libido and plasma hormone concentration in rams. *Anim. Reprod. Sci.*, **9** : 241-252, 1985
 - 14) 小島義夫, 哺乳動物の精子. 212-217. 学窓社, 1972
 - 15) BARRELL, G.K. and K.R. LAPWOOD, Seasonality of semen production and plasma luteinizing hormone, testosterone and prolactin levels in Romney, Merino and Polled Dorset rams. *Anim. Reprod. Sci.*, **1** : 213-228, 1978/1979
 - 16) COLAS, G., G. BRICE and Y. GUERIN, Seasonal variations of the fertilizing capacity of the deep-frozen ram semen. *Proc. 8th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I., Krakow.*, **4** : 977-980, 1976
 - 17) 福井 豊・合田修三・片岡史知・小野 斉, 北海道におけるブルーラ・ドーセット種雌羊の繁殖性について. 日緬研会誌, **28** : 1-4, 1991
 - 18) Maxwell. W.M.C., Artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen at a synchronised oestrus. 2. Effect. of time of onset of oestrus, ovulation and insemination on fertility. *Anim. Reprod. Sci.*, **10** : 309-316, 1986
 - 19) 福井 豊・上田博行・赤池政彦・安西 浩・小野 斉, 非繁殖季節における雄羊の精液性状に対する GnRH 注射の効果. 日緬研会誌, **25** : 13-17, 1988