馬 精 液 の 凍 結 保 存 に 関 す る 研 究

III. 液体窒素で保存した錠剤化凍結精液による受胎成績

押田 等・三川・武・堀内精司・高橋裕郎

(福島県いわき家畜保健衛生所) (ホクレン北見支所)

富塚常夫・永瀬 弘

(農林省畜産試験場)

著者ら¹⁻³⁾は牛精液で得られた成績から、いわゆる錠剤化凍結法が馬精液にも適用できる可能性を認め、1963年馬の錠剤化凍結精液による受胎に成功して以来一連の試験研究を行ってきた^{4,5)}。

従来、著者らが行なった試験はドライアイスを使用したもので、その受胎率は33.3% (12.5~47.3%—1965年の成績)⁵⁾であった。

牛精液の凍結保存には、最近寒剤として液体窒素が広く使用されてきており、精液の取扱い、寒剤の補給、長期保存における生存成績などの点で有利であるとされている。

この試験は、馬の錠剤化凍結精液の保存に従来のドライアイスに代えて液体窒素を使用したさい、どの程度の受胎率が得られるかを知らため行なわれた。

従来液体窒素を利用した馬精液の凍結に関する正式な報告は皆無に近い状態である。

ただ、1965年のA.I. Digestの記事⁶⁾およびデンマークのWIBLING⁷⁾の成績があるのみである。WIBLINGの永瀬への私信によれば、1966年春、錠剤化凍結法を馬精液に試み、授精10頭中7頭に受胎を見た由である。この2つの成績は実施頭数が極く少数で、実験室的研究の域を出ていないと言える。

著者らが、1966年春に行なったこの試験は、9頭の雄馬の精液を野外のいわゆる routine work の条件下で、100頭に近い雌馬に授精したもので、この分野の研究資料の少ない現在かなり貴重な資料になるものと思われる。

この試験の間、精子の耐凍性などについても1,2の知見を得たが、ここではとりあえず受胎成績のみを取纏め速報の意味で発表する。

試験方法

1) 供用馬

雄馬は朝鮮馬、北海道在来馬各1、ペルシュロンおよびその雑種3、ブルトン種4の計9頭で、授精対象雌馬は試験地近傍の農馬で、とくに制約を設けず、発情の判定も外部徴候により、発情中の卵巣検査は北見地区の1名を除いて実施しなかった。

2) 実施地域、期間

福島県いわき市および北海道北見市を中心とする2つの地区で実施した。精液の採取、凍結は北見地区では3月中旬、福島地区では2~6月にわたり、雄馬を繋養している現地で行ない、そのまま液体窒素中に保存し4~7月の間授精に使用した。授精師数は北見地区4名、福島地区3名計7名である。

3) 精液の処理、凍結

精液の処理、凍結の要領は前報に準じ⁵⁾たが、保存に液体窒素を用いまた5°Cまでの冷却を下記のように変更した。すなわち、遠沈で濃縮後、希釈された精液を小試験管に移し、これを水を入れないビーカー中に立て、そのまま5°Cの恒温器中に静置して冷却した。また液体窒素中に保存するための錠剤精液の容器は、プラスチック製の小試験管(径1cm、長さ3~5cm)を用い、

Studies on the freezing storage of stallion semen. III. Freezing of pellet frozen semen preserved in liquid nitrogen.

OSHIDA, Hitoshi, Takeshi MIKAWA (Iwaki Livestock Hygien Service Center, Fukushima Prefecture), Seishi HORIUCHI, H. TAKAHASHI, (Hokuren, Kitami Division, Kitami, Hokkaido), Tsuneo TOMIZUKA & Hiroshi NAGASE (National Institute of Animal Industry, Chiba-shi)

Jap. J. Animal Reprod. 13 (4), 1967.

これに錠剤精液 5~20 錠を入れ、ゴム栓またはプラスチックフィルム加熱シールを行なった後、液体窒素中に保存した。

4) 授精

保存精液の農家までの運搬はドライアイス中で行ない授精は融解直後に実施した。

北見地区では錠剤精液の融解を特製のステンレススチールの試験管内で行なった後、融解液と混合した。

凍結精液の使用は原則として一発情のみに止め、以後の発情には自然交配を行なった。

一発情中の授精回数は 1~3 回で、結果の判定は直腸検査法によった。

結果ならびに考察

北見、福島両地区における雄馬別の受胎成績を表 1 に示した。

両地区の合計では、93 頭に授精して 43 頭に受胎が認められ、この内、結果の不明であった 1 頭を除くと受胎率は 46.7% (43/92) となった。これを昨年のドライアイスを用いた受胎成績 33.3% (14/42) と比較するとかなり良好であったが、この試験で行なった程度の保存期間で両者の受胎率に本質的な差があるかどうかは今後の厳密な比較に俟たなければならない。

外国における受胎成績は、A. I. Digest の記事、

WIBLING とも 70% 台を示しており、著者らの成績とはかなりの差異が見られるが、これは恐らく授精対象の雌馬の選定基準の差によるものと考えられる。

福島、北見両地区の成績は、それぞれ 47.1, 46.3% でほぼ同じであった。北見地区は最初の試みで、人工授精センターの技術者、授精師とも凍結精液の取扱いは未経験であった事実を考慮すると、かなり良好な成績と言えると思う。

雄馬別の受胎成績を見ると 22.2% から 66.7% とかなり大きな差異が認められるが、この程度の授精頭数では雌馬の発情状態などがかなり影響を持っているものと思われる。

いま、精液性状の明らかな福島地区における受胎成績を個体別に示すと表 2~4 の通りで、受胎例における精液の保存日数の範囲は 1~110 日、同じく錠剤数 3~11, 精子生存率は 15~65%, 注入精子数は 3.63~31.24 × 10⁸) であった。

いま注入精子数と受胎率の関係をみると、精子数 3~4 億台で 50% (2/4), 5~6 億台で 50% (5/10), 7~8 億台で 76.4% (10/13), 9~10 億台では 50% (1/2), 13~14 億台で 42.8% (3/7) となり、7~8 億台の注入精子が最良の成績を示した。授精の例数が少ないので今後追試する必要があるのは勿論であるが、この数字は雌馬の発情、注入の条件が良好であれば、7~8 億台の精

Table 1. Fertility of pellet frozen stallion semen preserved in liquid nitrogen (Mar.~July, 1966)

Area	Breed	Name of stallion	No. of mares inseminated	No. of mares conceived	Conception rates
Fukushima	Percheron	G. K.	18	12	66.7%
	Pony	K. S.	10	4	40.0
		K. K.	23	8	34.8
	Total	3	51	24	47.1
Kitami	Percheron	O. S.	7	2	28.6
		E. R.	9	5	55.6
	Breton	R. Z.	8	5	62.5
		K. R.	8	4	57.1(4/7)*
		H. K.	9	2	22.2
		N. L.	1	1	100.0
	Total	6	42	19	46.3(19.41)*
Both areas	Total	9	93	43	46.7(43/92)*

* Except one mare which was not able to know the result.

Conception rates were indicated results on one-heat inseminations

Table 2. Semen conditions and the results in Fukushima trial

No. 1 G.K. (Percheron stallion)

Conception rates...66.7% (12/18) (one heat—inseminations)

No. of mares	Years of mare	Date		Storage (days)	No. of pellet inseminated	No. of sperm inseminated	Survival rates of the sperm	No. of living spm. inseminated*	Results**
		Freezing	Insemination						
1	10	16 Apr.	21, 23 Apr.	5 & 7	7 & 8	($\times 10^8$) 14,880	20 %	($\times 10^8$) 2,976	+
2	5	16 Apr.	27 Apr.	12	11	31,400	25	7,810	+ .
3	8	16 Apr.	31 May	46	10	28,400	25	7,100	+ .
4	7	12 Jun.	12 Jun.	1 >	8	8,192	60	4,915	+ .
5	10	12 Jun.	26 Jun.	14	7	7,168	60	4,301	+ .
6	10	16 Apr.	16 May	31	8	14,880	20	2,976	+ .
7	12	22 July	25, 26 July	4 & 4	7 & 7	23,226	15	3,484	+
8	13	12 Jun.	12 Jun.	1 >	8	8,192	60	4,915	+ .
9	7	22 July	23 July	1	8	19,840	25	4,960	+ .
10	8	11 Jun.	11 Jun.	1 >	7 & 7	5,634	65	3,662	+ .
11	19	11 Jun.	25 Jun.	14	6	5,568	65	3,619	+
12	11	12 Jun.	12 Jun.	1 >	8	8,192	60	4,915	+ .
13	11	11 Jun. 15 Apr.	26, 28 Jun.	15 & 75	8 & 6	20,808	45	9,364	—
14	3	16 Apr.	23 May	38	10	28,400	25	7,100	—
15	4	11 Jun.	11 Jun.	1 >	7	5,634	65	3,662	—
16	5	11 Jun. 15 Apr.	2, 3 July	22 & 80	8 & 8	27,744	45	12,485	— .
17	11	11 Jun.	14 Jun.	3	5	4,640	65	3,016	—
18	9	15 Apr.	23 Jun.	70	7	24,276	45	10,924	— .

*: Calculated from survival rates and numbers of spermatozoa inseminated.

**: . With suckling foal, + Pregnant, — Non pregnant

Table 3. Semen conditions and the results in Fukushima trial

No. 2 K.S. (Pony stallion)

Conception rates...40.0% (4/10)

No. of mares	Years of mare	Date		Storage days	No. of pellets inseminated	No. of sperm inseminated	Survival rates of the sperm	No. of living spm. inseminated	Results
		Freezing	Insemination						
1	16	6 Apr.	4 May	28	3	9,168	65%	($\times 10^8$) 6,051	+
2	6	31 Mar.	23, 28 May	52 & 57	6 & 7	13,058	65	8,486	+ .
3	16	15 Feb.	5 Jun.	110	6				+
4	10	15 Feb.	3 Jun.	108	10				+
5	10	31 Mar.	27, 28 Apr.	27 & 28	7	15,232	65	9,901	—
6	11	3 Mar.	28 May	54	7				—
7	10	28 Mar.	31 May	64	7	13,776	55	7,577	—
8	7	28 Feb.	6 Jun.	99	7	13,776	55	7,577	— .
9	7	28 Feb.	4 Jun.	96	7	13,776	55	7,577	—
10	17	28 Mar.	28 Jun.	92	5		55		—

Table 4. Semen conditions and the results in Fukushima trial
No. 3 K.Z.

Conception rates...34.8% (8/23)

No. of mare	Years of mare	Date		Storage days	No. of pellets inseminated	No. of sperm inseminated	Survival rates of the sperm	No. of living spm. inseminated	Results
		Freezing	Insemination						
1	10	16 Apr.	2 Jun.	47	10	($\times 10^8$) 15,800	35%	($\times 10^8$) 5,530	+
2	10	12 Jun.	14 Jun.	2	7	6,384	65	4,150	+
3	12	12 Jun.	14 Jun.	2	7	6,384	65	4,150	+
4	8	22, 23 July	25, 26 July	3	7 & 7	20,720	15	3,108	+
5	8	11 Jun.	23 Jun.	12	7	6,580	35	2,308	+
6	8	11, 12 Jun.	28 Jun. 1 July	17 & 20	5 & 8	8,320	65	5,408	+
7	10	11 Jun.	30 Jun.	19	5	4,700	35	1,645	+
8	8	11 Jun.	30 Jun.	19	8	7,520	35	2,632	+
9	11	11 Jun.	12 July	30	7	2,576	55	1,417	-
10	8	16 Apr.	22, 23 Jun.	66 & 67	5 & 5	18,400	45	8,280	-
11	9	16 Apr.	2 Jun.	52	8	7,520	35	2,632	-
12	10	12 Jun.	14 Jun.	2	6	5,472	65	3,557	-
13	10	12 Jun.	14 Jun.	3	6	5,472	65	3,557	-
14	13	16 Apr.	2 Jun.	47	11	17,380	35	6,083	-
15	10	11 Jun.	12 July	31	8	2,944	55	1,619	-
16	6	16 Apr.	2 Jun.	47	5	18,400	45	8,280	-
17	6	11 Jun.	12 July	31	7	6,580	35	2,303	-
18	7	11 Jun.	14 Jun.	3	5	1,840	55	1,012	-
19	6	12 Jun.	14 Jun.	2	5	4,560	65	2,964	-
20	10	11 Jun.	21, 23 Jun.	10 & 12	5 & 5	18,400	45	8,280	-
21	4	11, 16 Jun.	21, 23 Jun.	10 & 18	6 & 5	18,400	45	8,280	-
22	9	11 Jun.	30 Jun.	19	10	9,400	35	3,290	-
23	5	12 Jun.	12 July	24	6	6,240	65	4,056	-

子の注入で十分であることを示していると思われる。

保存日数と受胎率の関係では、1~30日—56.2% (18/32), 31~60日—36.0% (9/25), 61~90日—35.2% (6/17), 91~110日—57.1% (4/7) の成績が得られた。また本試験では、従来受胎しがいと言われている哺乳中の、いわゆる子付の雌馬でも、かなりの受胎率が得られた。

摘 要

液体窒素で保存した馬の錠剤化凍結精液による授精試験を実施した。

1) 雄馬 9 頭 (重種 3, 中間種 4, ポニー 2) を用い、希釈精液の 0.2 ml をドライアイス上で錠剤化凍結を行なった後液体窒素中で保存した。農家までの凍結精液の運搬はドライアイス中で行ない、融解直後に注入した。対象の雌馬は特に制約を設けなかった。

2) 授精頭数は 93 頭で、この内 43 頭が受胎し、受

胎率は 46.7% (不明一頭を除く) であった。

3) 受胎例における精液性状の範囲は、精子数では、3.63~31.24 億で、精子生存率は 15~65%, 注入錠剤数は 3~11, 保存日数は 1~110 日であった。注入精子数と受胎率の関係では、7~8 億台の受胎率が 76.9% (10/13) で最も良好であった。

この試験を実施するに当たって格別のご援助を頂いた農林省畜産試験場繁殖部長細田達雄博士、日本軽種馬登録協会副会長早田伝之助氏、ホクレン参事守屋喜義氏、同訓子府家畜改良牧場長後藤美城氏ならびに授精を直接担当された福島県いわき家畜保健衛生所の相良, 星, 横井各技師、ホクレン北見支所管内、西川, 岡田, 松原, 大西の各氏に対し衷心より感謝の意を表する。

(1967. 6. 21 受付)

文 献

- 1) 永瀬 (弘)・丹羽 (太)・本誌, 9, 73, 1963. 2) 永瀬 (弘)・副島 (昭)・丹羽 (太)・押田 (等), 相良 (芳)・石崎 (信)・星 (栄)・本誌, 12, 48, 1966.
- NAGASE, H. & E.F. GRAHAM: Proceed. Vth Intern. Congr. Anim. Reprod. & A.I., 4, 387, 1964. 3) 永瀬 (弘)・副島 (昭)・富塚 (常)・押田 (等)・三川 (武)・相良 (芳)・星 (栄)・丹羽 (太)・本誌, 12, 52, 1966. 6) A.I. Digest, 13, (No. 11), 12, 1965.
- NAGASE, H., E.F. GRAHAM & T. NIWA: Proceed. Vth Intern. Congr. Anim. Reprod. & A.I., 4, 404, 1964. 7) WIBLING, H.: 永瀬への私信。

Summary

Fertility trials using pellet frozen stallion semen preserved in liquid nitrogen were conducted in 1966.

Semen, collected from 9 stallions (Percheron 3, Breton 4, Pony 2) with gel portion removed, was extended 1:1 with yolk (5 parts) —5% glucose (95 parts) solution and then centrifuged at 1,300g, 20 min. for concentrate of semen.

The concentrated semen had the supernatant removed and was extended again 1:2-3 with yolk-sugar-glycerol extender, which was composed of 10 parts of egg-yolk, 5.5 parts of glycerol and 84.5 parts of sugar media (glucose 1.8 gm, lactose 4.4 gm, raffinose 5.4 gm in 100 ml).

The extended semen was cooled to 5°C at semi-rapid rate by keeping it in small test tubes which were kept standing directly in 5°C cold air room. The 0.2 ml of the cooled semen was placed directly on a block of dry ice after 2-3 hours of glycerol equilibration.

Semen frozen in pellet form on dry ice was transferred into plastic tubes (diameter 1.2 cm, height 5.0 cm) which were made to stand in holes made in dry ice. Then the plastic tubes were sealed with plastic-aluminum film using the electric heat sealer. The small plastic tubes were stored in liquid nitrogen until use.

The frozen semen was carried to the mares owned by farmers in crushed dry ice by A. I. technicians.

Inseminations were carried out immediately after thawing, in which the 5-20 pellets of semen were added to 20 ml of the thawing media in ampoules kept at 30-35°C.

The thawing media were a mixture of following solutions and were stored at 4°C or at room temperature after heating repeatedly in ampoules. 1) Skim milk 100 ml. 2) Buffer solution 77.0 ml. Composed of; Sod. citrate 1.57 gm, Sod. carbonate 0.075 gm, Pot. carbonate 0.085 gm, Glucose 2.7 gm, P-aminomethylbenzensulfonamide 0.2 gm, Distilled water up to 100 ml. 3) Glycerol 3.0 ml. The pH of the mixed media...7.0 (adjusted by 5.5% citric acid solution).

The mares were inseminated 1-3 times per heat under conditions of the routine work and diagnoses to determine conceptions were performed by the rectal palpation. Inseminations to 93 mares, each of which was inseminated only during one heat, resulted in 43 conceptions. Fertility was 46.7 per cent, except one mare for which we could not know the result (Table 1).

Semen conditions in successful inseminations were as follows;

Storage period...1-110 days, Survival rates of sperm...15-65%, No. of pellets inseminated...3-11, No. of sperms inseminated...3.63-31.24 ($\times 10^8$).

Relationships of no. of spermatozoa inseminated and conceptions were as follows; 3-4 ($\times 10^8$)...50% (2/4), 5-6...50% (5/10), 7-8...76.9% (10/13), 9-10...50% (1/2), 13-14...42.8% (3/7).

Although the number of mares was too small and further observations should be needed, these results suggest that inseminations with 7-8 ($\times 10^8$) spermatozoa would be enough to get high fertility when mare heat condition and insemination technique are good.