牛 精 液 の 凍 結 保 存 技 術 に 関 す る 研 究

III. 錠剤形式による牛精液の凍結保存について

永 瀬 弘・丹羽太左衛門

(農林省畜産試験場)

現行の牛精液の凍結保存法が POLGE & ROWSON¹⁾によつて紹介されて以来 10 余年の歳月が経過し、すでに各国で実用に供されている。とくに強大な経済基盤を持つアメリカおよびカナダなどでは相当の普及を見ているが、一般的にはまだ従来の 4°C 保存法に比べるとその普及度には相当の懸隔があり、とくにわが国においては今後につまづき面がすこぶる多い。

今、その普及上の隘路となつている技術上の要因について考慮してみると次のようなことが考えられる。

(1) 凍結精液の製造、保管に高い経費を必要とすること、(2) 融解後の精子の受精力保持期間が短いこと、(3) “耐凍性” 不良の精子を持つ個体の存在すること、(4) 精液の処理、取り扱いが煩雑なこと。このほかドライアイス、液体窒素などの入手困難な地域のあることも考えられる。

以上のような障害の比較的に少ない長期保存法として、凍結乾燥の方法も考えられるが、根井および永瀬²⁾も報告したように、この方法で成功することは目下の段階ではきわめて困難である。

凍結乾燥以外に前記諸問題を解決する方法は 1, 2 考えられるが、ここに報告する精液の錠剤化による凍結保存法も、有力な解決策の一つであると思われる。

精液を錠剤化して凍結することにより得られる利点としては次の如きことがらが考えられる。

(1) 凍結の際、精液の温度勾配が一様であること。

小さい錠剤を使用すれば、凍結時の精液の温度勾配は非常に小さくなるから、1 頭分の精液を希望に近い速度で凍結でき、凍結の際精液内の温度勾配による精子活力の損耗が少なくなる。

(2) 現在よりも経済的な保管、輸送ができること。

現行の技術では、1 頭分の精液を 1 容器に入れて凍結、保管されており、その希釈倍率も 10 倍前後～数 10 倍が使用されている。このことは保存の目的である精子

は極く少量で、大部分は希釈液と容器、極言すれば水とガラスまたはプラスチックを高い経費のもとに凍結保管していることを意味している。

錠剤形式によれば、1 頭分の精液を 1 アンブルという従来の観念にとらわれることなく、必要であれば数頭分～数 10 頭分を自由に 1 つの容器に収納でき、それだけ容器の保管に要する無駄が省けることになる。とくに濃厚精液を利用すれば更に精液の保管能力は飛躍的に増大でき、その経済的な効果は相当大きいものと考えられる。

(3) 凍結用と融解用の液を区別することが容易であるから、精子活力の回復率および融解後の生存性を改善できる可能性があること。

前述のように、凍結精子は融解後の保存が困難で、この点が本法普及上の大きな障害となつている。これに対する改善策としては次のようなことが考えられる。すなわち、凍融過程における精子の障害を極力少なくするため、凍結用希釈液を改善するとともに、一方融解した精液に保存有効物質を加えて以後の精子生存の延長をはかることである。換言すれば、凍結用と融解(注入)用の液を区別して使用することである。凍結用希釈液についての考え方としては、さきに永瀬³⁾が報告したように、非電解質であるブドウ糖液と卵黄を混合した液の中で凍結する場合、従来の卵ク液のグリセリン適濃度である 7% の半量でも精子生存率には有意差がないこと、および O'DELL & ALMQUIST⁴⁾ が認めた超低温下の精子の代謝はきわめてわずかである事実などから、凍結用希釈液の構成物質としては、クエン酸ソーダなどの電解質緩衝剤よりもむしろブドウ糖類の使用が合理的であると考えられる。

また、4°C の液状保存では有効であるサルファ剤や CO₂ も凍融過程では精子の生存ならびに受精力を障害することも知られている。

これらのことから凍結用と融解用の液を区別すれば、凍結用の液には精子に障害度の少ない糖液を用い、融解用の液には液状保存に有効な物質を添加して使用できるので、精子活力の回復率および融解後の生存能力を改善

Studies on the deep-freezing technique for bull semen. III. Deep-freezing of bull semen in tablet form. NAGASE, H. & T. NIWA (Nat. Inst. of Anim. Indust., Chiba-shi) *Jap. J. Animal Reprod.* 9 (3).

できる可能性が生れてくる。

ここで報告する錠剤形式による精子の凍結保存方法は、上記利点のすべてを具備しているとはいえないが、操作が非常に簡単で、実用価値が高いと考えられるので、とりあえず現在までに得られた成績の概要を発表する。

錠剤化凍結の方法と錠剤化凍結精液の保管器具

1. 錠剤化凍結の要領

(1) 断熱した角型の凍結箱を用意する。この目的には主として従来用いられている冷却槽を使用した。

(2) 凍結箱の中に上面が平らなドライアイスのブロックを入れ、その上面を清潔なガーゼで清拭した後、赤熱した金属板をドライアイス上に当てる。この操作の目的はドライアイス上面を水平にすると同時に、細菌の汚染による影響を防ぐためである。

(3) 次にグリセリン平衡を終った希釈精液をツベルクリン用注射筒またはメスピペットにとり、ドライアイス上に一定量を静かに滴下する。滴下された精液は表面張力のためドライアイス上で球形を作り直ちに氷結が始める。

(4) このようにしてドライアイス上に一定間隔をおいて、滴下操作を繰り返し、全量を滴下した後冷却槽の蓋を閉じる。

(5) 滴下後 20～30 分して錠剤化した凍結精液をピンセットその他で保管容器に移し、凍結操作を終了する。

(6) これらの操作は 3～6℃ の恒温室内で行なうことが望ましい。

2. 錠剤化凍結精液の保管器具

各種の形式を検討中であるが、現在使用中のものは次の 4 種である (第 1 図参照)。

I 型……錠剤精液を入れるガラス製内筒およびアルコールの浸入を防ぐためのプラスチック製外筒からなる。内筒は外径 1.8～1.9 cm、長さ 10 cm の丸底ガラス管で、外筒は市販のストロー輸送用の中型プラスチックケースを使用した。この型は従来のストロー凍結保管用ケースを使用するのに便利である。

II 型……ガラス製の広口瓶で、2 重の蓋が接続する。この型は従来のアンプル保管用ケースに収容でき、また人工授精師の携帯用としてもそのまま使用できる。

以上の型はいずれも -79℃ のアルコール中に容器の全部を浸漬して保管する目的で考案したが、アルコールの浸入を防ぐためには外蓋内側または外筒の内側にワセリンその他を適量塗布しておき、これを予め超低温に冷却しておいた瓶または外筒の本体に接着するとワセリン

第 1 図 錠剤化凍結精液用保管器具

類が固化してアルコールの浸入を防ぎ、同時に蓋も固定できることになる。長期間の保存の場合、更にテープ類にワセリンを塗布し、外蓋の接着部位の外側を被覆しておくのも有効な方法である。

III 型……適量のアルコールを入れたプラスチックの円筒の上面に、適宜の間隔に穴を穿ち、これに前記 I 型における丸底ガラス筒を立て、この中に錠剤化精液を入れて保管する。この型は魔法瓶を用いて凍結保存を行なう場合に使用する目的で考案した。

IV 型……アルコールを使用せずドライアイス粉末中、または液体窒素で保管する際に使用する。アルコールの浸入を防ぐための外蓋は不要になる。

実験材料ならびに方法

1. 供試精液

ホルスタイン種 5 頭から原則として 2 回連続採取した精液を混合して使用した。供試した精液は精子数 8～20 億/ml、採取時の精子活力 65～80 卅～卅 のものであった。

2. 希 釈 液

次の基本液 (Basic solution) にグリセリンを精液希釈後の終末濃度が 1.75～10.0% (容量比) になるよう添加したものを用いた。

(1) 卵黄クエン酸ソーダ液 (卵ク液)……3% クエン酸ソーダ液 80 cc に新鮮卵黄 20 cc を添加したもの。

(2) 卵黄ブドウ糖液……5.5～10% ブドウ糖液に新鮮卵黄を上記卵ク液と同じ割合に添加したもの。

3. 凍結前の精液の処理

精液の希釈倍率は濃厚精液を使用するたてまえから 3 倍で行なった。

グリセリンの添加要領はさきに著者らが報告した方法に準じ、次の要領で実施した。

卵黄を含む希釈液……グリセリンの終末濃度が 7.0% のものでは、採取直後の第 1 次希釈で 10.5% のグリセリンを含む液を非常に緩徐に等量添加した。次いで精液を 4°C に冷却した後、同じ希釈液を最終希釈倍率である 3 倍になるよう添加する。グリセリンの終末濃度が 3.5%, 1.75% のものでは、それぞれ 5.25%, 2.625% のグリセリンを含む希釈液を採取直後の第 1 次希釈で最終倍率である 3 倍まで一度に添加した。

グリセリン平衡時間は、グリセリンの全量添加から起算して 9~12 時間とした。

4. 凍 結

錠剤化精液の凍結方法については前述の通りであるが、対照として LUYET & KEANE⁵⁾ および著者⁶⁾ が効果的な凍結方法であると認めている 2 段階凍結法を採用した。

すなわち、希釈精液の 0.2 cc を入れた小試験管 (径 1 cm, 長さ 10 cm) を 0°~4°C から -30°C のアルコール中に直接浸漬し、精液温が -30°C に達した直後、この試験管を -79°C のアルコール中に浸漬した。

なお、精液温の測定は熱電対に接続した電子管式自動平衡温度記録計で行なった。

5. 保 管

保管は主として前記Ⅲ型およびⅣ型、一部他の型も使用し、-79°C に保管した。

6. 融 解

38°~43°C に保った温湯中に小試験管を立てその中に凍結した精液の錠剤を入れて融解した。

7. 精子生存率・運動力の判定

常法に従い加温顕微鏡下で観察した。卵黄球が多数存在して観察が困難な場合は精液と同濃度のグリセリンを含む 3% クエン酸ソーダ液を少量添加して卵黄球を溶解した後観察し判定の正確を期した。

8. 実験期間

1961 年 10 月から、1962 年 5 月末の間に実施した。

実験成績

(1) 錠剤化凍結法における冷却速度

グリセリン 7% を含む卵黄ブドウ糖液で希釈した精液 0.2 cc を錠剤として凍結する場合の冷却速度を測定した結果は第 2 図のようである。すなわち、その冷却速度は平均毎分 18°C 前後で、冷却がはじまつてから 4~5 分で -79°C に達する。図では従来の凍結の際見られる過冷却および凍結直後の rebound は見られないが、果してこの現象がないのかまたは非常に少ないのかは測定に使用した装置が打点式なので断定でき

ないが、従来の方法に比べて非常に小さいものと考えられる。

(2) 錠剤化⁷⁾ 凍結精液におけるブドウ糖濃度と融解後の精子生存率

凍害保護効果の認められている卵黄ブドウ糖液で希釈して錠剤化した凍結精液の実験においてブドウ糖濃度と融解後の精子生存率との関係をしらべた結果は第 3 図のようである。すなわち、グリセリン無添加のものでも

第 2 図 錠剤化凍結法における冷却速度

第 3 図 ブドウ糖濃度と融解後の精子生存率。錠剤の大きさ 0.2 cc, 希釈倍率 3 倍, 希釈から凍結まで 8~10 時間, 棒の長さは範囲, 白帯は平均値を示す

かなりの精子生存率を示しているが、グリセリンを加えたものの精子生存率は相当良好である。とくに従来適濃度とされている7% (対照) とその半量の3.5% でも精子生存率にはほとんど差がない。この事実はさきに2段階凍結で行なつた成績³⁾ とよく一致し、本凍結法の効果的であることを示している。

(3) 2段階凍結法との精子生存率の比較

錠剤化精液の精子生存性を2段階凍結法のものと比較するため、グリセリン7%を含む卵ク液および卵黄ブドウ糖液の2種を用いて比較試験を行なつた。結果は第4図に示す如く、卵ク液および卵黄ブドウ糖液の両凍結法の間に有意の差はなかつた。

卵ク液と卵黄ブドウ糖液との間の精子生存率の差は2段階凍結、錠剤化凍結ともに卵黄ブドウ糖液の生存率が優り、その差は統計的にも有意であつた。

(4) 錠剤化凍結精液の精子生存率に及ぼす錠剤の大きさ、グリセリン濃度およびブドウ糖濃度の影響

凍結後の精子生存率に影響すると考えられるグリセリ

第4図 錠剤化凍結精液と2段階凍結精液との精子生存率の比較 (16例平均、錠剤の大きさ 0.2 cc、グリセリン平衡時間 10 時間)

第5図 錠剤化凍結精液の精子生存率に及ぼす錠剤の大きさ、グリセリン濃度、ブドウ糖濃度の影響 (15例平均、●印は各個体につき3例の平均)

ン濃度およびブドウ糖濃度については、前項(2)で一部検討したが、その他の重要な要因として錠剤の大きさが考えられる。

これら3つの要因は互いに関連すると考えられるので、これを組合わせた実験を行なつて見た。

結果は第5図の如く錠剤の大きさの影響は卵ク液において著しく、また卵黄ブドウ糖液 (第5図の卵ク液以外のもの) ではブドウ糖が高濃度でグリセリンの低濃度の場合がその錠剤の大きさの影響が強く認められるようである。

またグリセリン 3.5~7.0% では本実験における錠剤の大きさの範囲では精液量の多いもの (0.1~0.2 cc) で生存率が概ね良好であるが、1.75% の場合は逆に錠剤の小さいもの (0.013~0.05 cc) において生存率が良好であつた。グリセリン濃度7%、ブドウ糖濃度7.5% の0.2 ccにおける精子の生存率を対照とし、各区で最良の生存率を示すものと比較すると、グリセリン7%の卵ク液は明らかに劣りその差は有意であつた。しかし、ブドウ糖の濃度5.5%で得られた生存率との間には有意差はなく、ブドウ糖液を基本液として使用する場合、グリセリンは相当低い濃度でも使用できることが明らかとなつた。

考 察

精液の凍結処理において最も重要視されている凍結速度については POLGE & ROWSON¹⁾ 以来多数の報告⁸⁻¹⁰⁾ があり、4~-15°C までは毎分 1~2°C、-15°C 以下 -35~-50°C までは毎分 3~5°C が適当とされているが、本実験ではその冷却速度が速く、しかも精子の生存率は相当良好で、従来の凍結法のものとの差がない成績が得られた。その原因について考察してみると、希釈液の

題のほか、従来の凍結法においては、精液をアンプル内に間入れて行なうので、比較的強い過冷却が認められるのに対し、本凍結法では相当高い温度で植氷されることが考えられ、従つて過冷却の程度が非常に弱いことも本凍結法の効果的な理由として考え得るかも知れない。

卵黄ブドウ糖液を基本液として使用する場合、添加するグリセリンの量が相当軽減できることはさきに著者ら¹⁶⁾ が2段階凍結で行なつた成績と一致しており、その理由としてブドウ糖自身の細胞に対する透過性および細胞外の相対的な電解質量の減少の2つが考えられる。これらの機序については今後検討する予定である。次にグリセリンが1.75%の場合高濃度のブドウ糖液では小さい錠剤の方が生存率が良好である事実

はブドウ糖が高濃度のために、低濃度のものに比し、比較的高い凍結温度で脱水が多く行なわれる結果とも考えられ、グリセリン 3.5% でこの傾向が顕著でない理由は、グリセリンのいわゆる“Colligative”な性状のため脱水の速度または程度が少ないためとも考えられる。

実用的な立場からの本凍結法の利点としては

1) 凍結の操作に必要な特別の器具が必要でなく、また労力、時間が節減できること。

2) 操作が簡単で熟練度もさほど必要でなく、個人差も少ないこと。

3) 冷却、保管に要するドライアイス量が従来の方法に比べて少なくて済み、経済的な凍結精液の利用ができること。

4) 精子活力の回復が良好であること。

などが挙げられ、牛精液の凍結保存上の隘路は本法の採用によつて相当改善でき、普及にも役立つところが少なくないと考えられる。また研究面においても精子の“耐凍性”の測定、グリセリン平衡時間の決定および凍害保護物質の検索、あるいは他動物精液の凍結保存などに応用価値があると考えられる。

要 約

濃厚な希釈精液をドライアイス上に直接滴下して凍結するいわゆる“錠剤化凍結法”を考案し、この方法によつて凍結した精液の精子生存率に及ぼす各種条件を検討して次の如き結果を得た。

1) 錠剤化凍結法では凍結速度が従来よりも相当速く 4~5 分で 3~4°C から -79°C に達するにも拘わらず、グリセリンを含まない卵黄ブドウ糖液中の精子でも生存する。

2) 錠剤化凍結法と 2 段階凍結法との精子生存率を比較した成績では、両凍結法に有意の差は認められない

が、同一凍結法でグリセリンを加えた卵黄液、卵黄ブドウ糖液の比較では卵黄ブドウ糖液の生存率が良好でその差は有意であつた。

3) 錠剤化凍結精液の精子生存率に及ぼすグリセリン濃度、ブドウ糖濃度、錠剤の大きさの影響を吟味した結果、凍結用希釈液として卵黄ブドウ糖液を使用した場合良好な精子生存率を示したのは、グリセリン 7%-ブドウ糖 7.5% 区、グリセリン 3.5%-ブドウ糖 5.5~8.25% 区、グリセリン 1.75%-ブドウ糖 5.5% の各区でこれらの間には有意差は認められず、添加するグリセリン量は相当軽減できることが判つた。

錠剤の大きさはグリセリン 3.5~7.0% では大きいもの（精液量 0.1~0.2 cc）において、1.75% の場合は小さいもの（0.013~0.05 cc）において精子生存率が良好であつた。

4) 本凍結法は多くの利点を持ち、今後牛精液の凍結保存技術の改良と普及ならびに他の動物精子の凍結保存にも貢献するところが相当大きいものと考えられる。

(1962. 12. 10 受付)

文 献

- 1) POLGE, C. & L. E. A. ROWSON: *Vet. Rec.*, **64**, 851, 1952. 2) 根井(外), 永瀬(弘): 低温科学生物編, **19**, 1961. 3) 永瀬(弘): 第 23 回日本不妊学会関東地方部会における発表, 1961. 4) O'DELL, W. T. & J. O. ALMQUIST: *Dairy Sci.*, **41**, 1792, 1958. 5) LUYET, B. & J. KEANE, JR: *Biodinamica*, **7**, 281, 1955. 6) 永瀬(弘), 丹羽(太), 副島(昭), 山下(清), 中山(二): 本誌 **9**, 31, 1963. 7) POLGE, C & M. A. SOTYLS: *Recent. Res. Freez. & Dry.*, Edit. by PARKES **87**, 1960. 8) VANDEMARK, N. L. & W. C. KINNEY: *J. Anim. Sci.*, **13**, 80, 1954. 9) ERICKSON, W. E. et. al.: *J. Dairy: Sci.*, **37**, 651, 1954. 10) O'DELL, W. T. et. al, *J. Dairy Sci.*, **41**, 79, 1958.