豚の凍結精液授精による受胎率及び 産子数に影響する要因

梶田博司・小栗紀彦¹・米村 功²・和泉屋公一³
遠藤健治⁴・保科和夫⁵・富塚常夫・小島敏之

農林水産省畜産試験場, 筑波農林研究団地 305

¹ 帯広畜産大学, 帯広市 080

² 鳥取県中小家畜試験場, 西伯郡 683-03

³ 神奈川県畜産試験場, 海老名市 243-04

⁴ 森永乳業(株), 東京 108

⁵ 長野県畜産試験場, 塩尻市 399-07

(1993 年 3 月 1 日受付)

要 約 豚凍結精液の授精による受胎率および産子数が, 液状精液の授精あるいは自然交配に比較して, 平均的に劣る原因を明確にすることを目的として実験を行い, 次の結果を得た。

1. 授精 5~8 日目回収卵の黄体数に対する受精卵率は凍結精液で 65.1%, 液状精液で 92.8% であった。受精後, 桑実期以上に発育していた胚の割合は前者で 78.2%, 後者で 74.4% であり, 両者間に著差はみられなかった。

2. 2 回目授精から半日以内に発情の終息した雌豚 30 頭は全て受精卵を保有しており, 受精率は 89% で, このうち桑実期以上に発育していた胚は 84.8% であった。これに対して, 2 回目授精から発情の終息まで 1 日以上に及んだ雌豚および 1 回目授精時に発情が終息しかかっていた雌豚の受精率及び発育胚率は著しく低かった。

3. 染色体異常胚の出現率は凍結精液区で 9.5% (2/21), 液状精液区で 6.7% (2/30) であり, 両者間に著差は認められなかった。

4. 授精後 25-70 日における胎子の損耗は 4.7% で, 損耗と授精時の精子活力との関連は見られなかった。

以上, 凍結精液の受胎成績を左右する主要因は受精卵数にあり, 異常胚の発生や胚の損耗割合には液状精液授精との差のないことが明らかとなった。

緒 言

1970 年から 1985 年までに世界各国で報告された豚凍結精液による受胎成績をまとめた JOHNSON の報告¹⁾に

よれば, 授精雌総数 5,759 頭, 受胎率 48.2%, 産子数平均 8.3 頭であった。わが国では農林水産省畜産局の事業として, 昭和 57 年から 59 年に豚凍結精液利用実用化促進事業²⁾及び昭和 60 年から 62 年に豚凍結精液実用化

Factors influencing conception rate and litter size in gilts inseminated with frozen boar semen
H. MASUDA, N. OGURI¹, I. YONEMURA², K. IZUMIYA³, K. ENDO⁴, K. HOSHINA⁵, T. TOMIZUKA and T. KOJIMA

National Institute of Animal Industry, Tsukuba Norinkenkyudanchi, Ibaraki, 305

¹ Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, 080

² Tottori Prefectural Swine and Poultry Experiment Station, Saihaku-gun, 683-03

³ Kanagawa Prefectural Livestock Experiment Station, Ebina-shi, 243-04

⁴ Morinaga Milk Industries Co. Ltd. Tokyo, 108

⁵ Nagano Prefectural Livestock Experiment Station, Shiojiri-shi, 399-07

確立事業³⁾が実施された。この6年間の事業における総授精頭数は5,319頭に及び、受胎率は18.4~80.0%, 平均51%, 産子数は1~17頭, 平均8.1頭であった。これらの成績は自然交配や液状精液の授精に比べて, 平均受胎率で20~30%ポイント低く, 平均産子数で1~3頭少なく⁴⁾, しかも変異が大きいことを示している。

凍結精液による受胎成績が劣る主な原因は, 受精の不成立にある⁵⁾と考えられている。更に, 受精不成立の要因には (a) 受精の場に到達する精子数が少ない。 (b) 精子の活力低下が早い。 (c) 正常頭帽精子率が少ない, などが挙げられている⁶⁾。

この実験は, 凍結精液による受胎成績の低下あるいは不安定の要因をより明確にすることによって, 凍結精液による受胎成績の向上と安定化に資することを目的として行われた。

材料および方法

1. 凍結精液の作成

L種2頭, W種3頭, D種1頭の計6頭の種雄豚から濃厚部精液のみを採取した。精液の希釈処理および凍結は, WESTENDORFら⁷⁾の方法に順じて行った。凍結後は授精試験に供するまで液体窒素中に保存した。

2. 凍結精液の融解と授精の条件

凍結保存精液は40℃の温水中で融解後, 融解用希釈液で10倍に希釈した。希釈後の精子活力が30#以上のものだけ授精試験に供した。1授精当りの精子数は約50億, 精液量は50~60 mlとした。

3. 雌豚の発情の観察および授精

発情の観察は毎朝9~10時の間に行い, 発情徴候が不明瞭な場合には雄豚を雌の房内に入れて許容の状態を観察した。必要に応じて, 夕方の観察も行った。授精は1発情当り2回を原則とし, 観察時の発情の状態によって, 第1回目の授精時刻を決定した。多くの場合, 雄許容確認後24時間前後に第1回目を, 更に6~8時間後に第2

回目の授精を行った。

受精成績のまとめでは, 授精時の雌豚の発情状態および授精時期の違いによって, 次の4つのグループに分けた。A: 雄許容の状態がきわめて良好で, 確実に適期授精が行われたと記録された個体。B: 雄を許容しないが外陰部徴候の変化を観察することで, 授精時期を判断して授精された個体。C: 雄許容時間が予測より長引いたために結果として早めの授精となった個体。D: 雄許容の状態が終息しかけた頃の遅めに授精された個体。

4. 胚の回収および染色体の検査

第1回目授精の日から主として5~8日目に開腹手術あるいは屠殺によって, 子宮内から胚を回収した。回収胚は, 直ちに実体顕微鏡下でその形態と发育段階を検査した。1部の個体の回収胚については, コルセミドを添加した培養液に移して38℃, 18~24時間培養後, 染色体標本を作成した。

5. 妊娠日齢別に見た着床後の胎子の状態

凍結精液授精後25~70日の期間で17頭の妊娠豚を屠殺して, 各個体の黄体数, 胎子数, 異常胎子数および胎盤変性の有無などを調べ, 着床後の胎子の生存状態を観察した。ただし, 供試した妊娠豚17頭中3頭については, PGF_{2α} 12 mgを1~2回注射することによって流産を誘起して, 流産子を観察した。

結 果

1. 凍結精液授精後5~8日目における胚の发育状況

結果は表1に示した。凍結精液を授精した55頭の雌豚から回収された卵子または胚の総数は594個で, 開腹時に確認された黄体数に基づく回収率は82% (594/725)であった。このうちの約20%が未分割卵であった。桑実胚および胚盤膜まで发育していた胚は回収卵の62.1%であった。これに対し, 液状精液を授精した雌豚では, 卵の回収率は98% (190/194), 未分割卵は5.3%であった。桑実胚以上に发育していた胚は134個で, 回

表 1. 凍結精液授精後5~8日目に回収した卵の发育状態

Table 1. Developmental stages of ova recovered on 5 to 8 days after insemination

Semen	No. of gilts inseminated	Total no. of ova recovered	Developmental stages						Degenerated
			Mono	2-3	4-8	16<	Molura	Blastocyst	
Frozen	55	594	122 (20.5)	32 (5.4)	23 (3.9)	14 (2.3)	67 (11.3)	302 (50.8)	34 (5.7)
Liquid	12	190	10 (5.3)	16 (8.6)	21 (11.3)	4 (2.1)	27 (14.2)	107 (56.3)	5 (2.6)

( ) Percentage of developing ova

収卵の約 71% が順調に発育していた。回収胚のうち 1 回以上分割した胚及び退行した胚は、受精過程を経たものとみなし、黄体数をもとに受胎率を求めたところ、凍結精液及び液状精液による授精でそれぞれ 65.1% 及び 92.8% であった。5~8 日目胚としては発育の遅れたあるいは停止したと思われる 2~16 細胞期胚および変性卵の全てが損耗胚に成ると仮定して、受精卵数に対する損耗率を算出すると、凍結で 22%, 液状で 26% と成り、両者間に著差は認められなかった。

2. 凍結精液授精時の発情状態および授精時期による受精成績の比較

授精時の雌豚の発情状態および授精時期の違いによって A から D の 4 グループに分け、それぞれに該当する雌豚の受精成績をまとめて表 2 に示した。グループ A の雌豚は 30 頭で、全ての個体が受精卵を保持しており、黄体数当り受精卵率は 88.8%, このうち桑実期以上に発育していた胚は 84.8% であった。グループ B の雌豚 10 頭のうち 9 頭は受精卵を保持していたが、黄体数当り受精卵率は 43.9% であった。また、桑実期以上に発育していた胚は 70% であった。グループ C の雌豚は 5 頭で、うち 2 頭から回収された 9 および 8 個の卵子から 1 個ずつの胚盤胞期胚が見出されたに過ぎなかった。グループ D の雌豚 4 頭は全て受精卵を保持していたが、黄体数当り受精卵率は 38.8% に過ぎなかった。このうち、桑実期以上に発育した胚は 57.9% であった。

3. 初期胚の染色体

凍結精液の授精により得られた 29 個の胚のうち、21 個が染色体検査可能であり、2 個の胚に異常が観察された。このうち 1 個の胚は $2n=39$, XY および 35, + 形態異常染色体 2 で X を欠く核板が観察された。他の 1 個の胚は $2n=41$ および 42 の数的異常であった。液状精液の授精により得られた 37 個の胚のうち、30 個が染色体検査可能であった。このうちの 2 個の胚に $2n=$

40, 41 および 45 の数的異常が観察された。

4. 凍結精液授精後 25~70 日目における胎子の生存状態

結果は表 3 に示した。17 腹のうちの 5 腹に胎子の発育異常や死亡によると思われる変性胎子が観察された。No. 2 では 14 頭中 2 頭の胎子の腹部が極端に小さく、尿膜もきわめて小さかった。No. 8 では 8 頭中 1 頭の胎子が極端に小さかった。No. 11, 12 および 13 では胎子が変性して吸収過程と思われる状況が観察された。これらの胎子の死亡は、いずれも 50 日以前に起きたものと推察される。No. 17 では下顎が異常に短い胎子が 1 頭観察された。これは先天異常と考えられるが、染色体の検査は行わなかった。これらの授精には 35 ㎍から 60 ㎍までの様々の活力の精子を供試したが、凍融後の活力がやや弱い精子で受精されたことによって異常胎子が出現し易いと云う現象は全く観察されなかった。

考 察

自然交配および液状精液授精による受精卵保持雌豚における受精率は 95% であった⁸⁾。これに対して、凍結精子授精では 60-85% であった^{9,10,11)}。この実験においても同様の傾向で、液状精子授精ではほぼ 93%, 凍結精子授精では約 65% の受精率であり、受精の段階ですでに両精子の差が認められた。凍結精子における受精率が劣る要因として、精子の活力低下が早い、正常頭帽精子率が低い、および卵管上部に到達する精子が少ないなどが挙げられる⁶⁾。この実験においても、卵子に附着していた精子数は凍結精子では新鮮精子よりはるかに少ないことを観察している。

授精に与った精子が凍結あるいは液状のいずれであれ、受精卵の 7~8 割が 5~8 日目には桑実期以上に発育していたことから、受精後の胚の損耗率は凍結精子と液状精子とで違いはないと考えられる。胚の損耗率に関するこ

表 2. 授精時期及び発情状態が受精率に及ぼす影響
Table 2. Effects of estrous states at insemination on fertility

Group	No. of gilts inseminated	Gilts with fertilized ova	% gilts with fertilized ova	No. of corpora lutea (a)	No. of fertilized ova (b)	Fertility (%; b/a×100)
A	30	30	100.0	402	357	88.8
B	10	9	90.0	114	50	43.9
C	5	2	40.0	63	2	3.2
D	4	4	100.0	49	19	38.8

(Note) A; standing to back pressure, B; no standing, only estrous signs of external genitalia, C; early insemination, D; late insemination (near the end of estrous)

表 3. 凍結精液授精後の妊娠中における胎児の損耗
Table 3. Loss of fetus during pregnancy after insemination of frozen semen

Sows	Days of pregnancy	No. of corpora lutea	No. of fetus	Abnormal fetus	Sperm motility at insemination
1	25	8	8	0	55#
2	26	14	14	2 (very small)	55#
3	30	12	6	0	35#
4	31	19	11	0	35#
5	31	—	12	0	—
6	32	11	9	0	55#
7	33	—	15	0	—
8	34	—	8	1 (very small)	—
9	45	15	15	0	35#
10	47	8	5	0	40#
11	49	11	4	1 (degenerating)	40#
12	50	12	9	1 (degenerating)	55#
13	55	9	8	1 (degenerating)	55#
14	66	12	8	0	35#
15	67	15	6	0	55#
16	68	9	3	0	60#
17	70	15	8	1 (short chin)	55#

(—) not recorded

れまでの報告では、黄体数に対する胎子あるいは産子の数で計算され、受精から分娩に至る間に20～45%の損耗が起こる¹²⁾。しかも胚損耗の多くは妊娠25日頃までに起こる^{13,14)}。本実験の不受精卵率および発育停止あるいは遅延の胚の割合の合計もこの範囲に有り、発生のごく初期に損耗が多いことが示された。

胚損耗の原因としては、遺伝的要因、受精時の異常、子宮内感染、熱ストレス、母体の栄養条件などが考えられる。豚の胚損耗に関しては染色体異常^{15,16,17)}、遅延受精¹⁸⁾あるいはホルモン処理¹⁹⁾による多精子受精などが報告されており、これらに原因する胚の損耗は10%前後である。この実験でも少数胚の検査にもかかわらず染色体異常が見い出されたことから、豚においては染色体異常や異常受精に起因する胚の損耗が比較的高率にあると考えられる。ただし、染色体異常胚の出現頻度については、凍結精液と液状精液との間に、差は無いと考えられる。

発情開始後の授精時期は受胎率や産子数に著しく影響する。自然交配および液状精液の授精の適期は、排卵前12時間附近である²⁰⁾と報告された。これに対し凍結精液の授精適期は排卵時刻附近である²¹⁾。豚の排卵は発情(雄許容)の開始後 31 ± 5.5 時間(25.0～36.5時間)で

行われ、発情持続時間の短いものにおいてはやや早く、長いものにおいてはやや遅れる傾向である²²⁾。これらの知見は、凍結精液では発情開始の翌日に授精した方が発情開始当日に授精するよりも高い受胎率が得られた²³⁾と云う成績を支持するものである。本実験では、2回目の授精を朝行った場合にはその日の夕方までに、夕方行った場合には翌朝までに発情徴候が終息した雌豚のみを適期授精が行われたものと判断した。したがって、この範囲から外れた例を早めの授精と遅めの授精に区分してみたが、発情の状態が思わしくなかった個体を含めることとなり、これらの2グループにおける著しく劣る受精成績は凍結精液のみに原因するものではないと考えるべきであろう。ただし、凍結精子は新鮮精子よりも早く雌生殖器官から排除されること⁶⁾、および排卵6時間前よりも早く授精を行った場合には受精卵保有雌豚率および受精卵率は明らかに低下したという報告^{21,23)}から考えれば、早めの授精は受精率低下の原因と成ることは明白である。逆に排卵後の授精においては、排卵後8時間までは高い受精率が得られ、少なくとも4～8細胞期まで正常に発育するが、排卵16～20時間後の受精率は著しく低下する¹⁸⁾。本実験では受精後から桑実胚あるいは胚盤胞まで発育した卵は約58%であり、受精後の損耗が

多かった。この原因として、雌豚の生殖器管内の環境不良あるいは受精までの卵子の老化¹⁸⁾などが考えられる。

精液注入時の雌豚の状態を比較してみると、適期授精と判断された雌豚は背圧に対し直ちに反応して授精時にきわめて静かであったのに対し、早めあるいは遅めの授精では背圧反応も悪く、授精時も動きまわるといふ例が多かった。これは PAQUIGNON らの報告²⁴⁾と同様である。凍結精液における授精適期が発情開始後 30 時間前後であることはこれまでも報告^{18, 23, 25)}されているが、本実験の結果からもその時間帯が適当であることが暗示される。

着床後の胚は胎子として発育する途上においても損耗する。同腹の胎子でも他の胎子に比べて異常に小さな胎子が存在したが、それらが分娩されるまで生存し得るかは疑問である。妊娠 50 日前後に確認された変性した胎盤は、それ以前に胎子が死亡していたことを暗示する。1 例に見られた上顎異常の胎子は染色体異常と想像される。これに類似した骨格異常をともなった先天性異常の死産子の報告例²⁶⁾がある。異常胎子あるいは死亡胎子、胎盤変性などが観察された例の授精時の精子活力は良好であり、本実験に供された精子の活力の範囲内においては、活力の弱い精子の授精で異常胎子あるいは胎子死が生じ易いという現象は全く認められなかった。

以上のことから、次のことが結論される。

凍結精液の授精による受胎成績が液状精液に比べて平均的に劣る主な原因は、受精卵数に差が生ずることにある。適期授精が行われる限りにおいては、受精後の卵は液状精液授精の受精卵と同等に発育し、胚の損耗率に著差はない。但し、受精卵数が 2~3 個であった場合には妊娠が維持され難くなる現象があり²⁷⁾、これも受胎率を下げる原因と成る。

引用文献

- 1) JOHNSON, L.A.: Proc. First Int. Conf. Deep Freezing Boar Semen, Sweden, 199-222, 1985.
- 2) 豚凍結精液利用実用化促進事業 (昭和 57~59 年度) のまとめ, (社)家畜改良事業団 1986.
- 3) 豚凍結精液実用化確立事業 (昭和 60~62 年度) のまとめ, (社)家畜改良事業団, 1988.
- 4) JOHNSON, L.A., J.G. AALBERS, C.M.T. WILLEMS and W. SYBESMA: J. Anim. Sci. **52**, 1130-1136, 1981.
- 5) PURSEL, V.G.: Beltsville Symposia III. Animal Reproduction, Allanheld, Osmun and Co., Montclair, NJ, 145-157, 1979.
- 6) PURSEL, V.G., L.L. SCHULMAN and L.A. JOHNSON: Biol. Reprod. **19**, 69-76.
- 7) WESTENDORF, P., L. RICHTER and H. TREU: Dtsch. Tierarztl. Wschr. **82**, 261-300, 1975.
- 8) PURSEL, V.G., A. JOHNSON, and L.L. SCHULMAN: 7th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I., Munich, II, 1595-1600, 1972.
- 9) POLGE, C.: 8th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I., Cracow, IV, 1061-1064, 1976.
- 10) PURSEL, V.G., and L.A. JOHNSON: J. Anim. Sci. **40**, 99-102, 1975.
- 11) LARSSON, K., S. EINARSSON and A. BANE: 8th Int. Congr. Anim. Reprod, A.I., Cracow, IV, 1024-1026, 1976.
- 12) FLINT, A.P.F., P.T.K. SAUNDERS and A.J. ZIECIK: Control of Pig Reproduction (ed. COLE, D.J.A. and G.R. FOXCROFT), 253-254, Butterworth Scientific, London, 1982.
- 13) SCOFIELD, A.M., F.G. CLEGG and G.E. LAMMING: J. Reprod. Fert. **36**, 353-361, 1974.
- 14) PERRY, J.S. and I.W. ROWLANDS: J. Reprod. Fertil. **4**, 175-188, 1962.
- 15) AKESSON, A. and B. HENRICSON: Acta vet. scand. **13**, 151-160, 1872.
- 16) McFEELY, R.A.: J. Peprod, Fert. **13**, 579-581, 1967.
- 17) VOGT, D.W. D.T. ARAKAKI and C.C. BROOKS: Am. J. Vet. Res., **35**, 1127-1130, 1974.
- 18) HUNTER, R.H.E.: J. Reprod. Fert. **13**, 133-147, 1967.
- 19) DAY, B.N. and C. POLGE: J. Reprod. Fert. **17**, 227-230, 1968.
- 20) DZIUK, P.J.: J. Reprod. Fert. **22**, 277-282, 1970.
- 21) LARSSON, K.: Acta vet. scand. **17**, 63-73, 1976.
- 22) 丹羽太左衛門: 最新家畜の人工授精 (丹羽太左衛門, 梶田精一・西川義正・吉岡善三郎共著) pp. 330-331, 明文書房, 東京, 1974.
- 23) POLGE, C., S. SALAMON and I. WILMUT: Vet. Rec. **87**, 424-428, 1970.
- 24) PAQUIGNON, M., J. BUSSIÈRE, F. BARITEAU and M. COUROT: Theriogenology **14**, 217-226, 1980.
- 25) SALAMON, S. and D. VISSER: Aust. J. Biol. Sci. **27**, 499-504, 1974.
- 26) HANSEN-MELANDER, E. and Y. MELANDER: Hereditas, **64**, 199-202, 1970.
- 27) 小栗紀彦・小野寺道寛・藤野幸宏・遠藤健治・小島敏之・富塚常夫: 第 82 回日畜学会大会講演要旨, 26-05-07, 1989.

Factors Influencing Conception Rate and Litter Size in Gilts Inseminated with Frozen Boar Semen

Hiroshi MASUDA, Norihiko OGURI¹, Isao YONEMURA²,
Koichi IZUMIYA³, Kenji ENDO⁴, Kazuo HOSHINA⁵,
Tsuneo TOMIZUKA and Toshiyuki KOJIMA

National Institute of Animal Industry, Tsukuba
Norinkenkyudanchi, Ibaraki, 305

¹ Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine,
Obihiro, 080

² Tottori Prefectural Swine and Poultry Experiment Station,
Saihaku-gun, 683-03

³ Kanagawa Prefectural Livestock Experiment Station, Ebina-shi, 243-04

⁴ Morinaga Milk Industries Co. Ltd. Tokyo, 108

⁵ Nagano Prefectural Livestock Experiment Station, Shiojiri-shi, 399-07

Generally, the conception rate and litter size for frozen boar semen are somewhat inferior to those expected for liquid semen. This experiment was performed to clarify the reason why the fertility resulted with frozen-thawed boar semen was inferior.

A total of 55 gilts were inseminated with frozen-thawed boar semen in 5 ml straws. As a rule, the 1st artificial insemination (AI) was given at 20-24 hr. after detection of estrous and the 2nd AI was given at 6-8 hr. after the 1st AI. The ova were recovered on 5-8 days after insemination and examined morphologically under the stereomicroscope. The results obtained are as follows ;

(1) The ratio of developing molura or blastocyst to the number of corpus luteum after 5-8 days of insemination was 65.1% for frozen-thawed semen and 92.8% for liquid semen. Of fertilized ova, 78.2% for frozen-thawed semen and 74.4% for liquid semen developed above molura stage.

(2) All of 30 gilts disappeared thier estrous signs in a half day after last insemination had fertilized ova. Of fertilized ova, 84.8% developed above molura stage.

(3) Gilts which exhibited the estrous sign over a day after last insemination and those lost the signs shortly after the 1st insemination showed a very low fertility and high embryonic mortality.

(4) The rates of chromosomal abnormalities of embryos were not different between frozen semen and liquid semen.

(5) The loss of fetus 25 to 70 days after insemination was 4.7% and not varied with the motility of sperm inseminated in this experiment.

From the above results, it is concluded that main cause of less farrowing rate and litter size in gilts inseminated with frozen-thawed boar semen is the fertilization failure of ovulated ova, but not the embryonic mortality.

Jpn. J. Swine Science, 30, 3 : 220-225

Key words : frozen boar semen, fertilization failure, embryonic mortality