

第3章 日本における豚人工授精の歩み（その2） （凍結精液研究の歩みと利用の現況）

1. 世界における豚凍結精液研究の歩み

豚精液の凍結保存に関する研究は、Polge & Rowson (1952) の牛凍結精液（ -79°C ）による受胎成功後、間もなく開始されているが、1950～1960年代は試行錯誤の状態、受胎例も少なかったが、1970年以後著るしく進歩した。

（1950年代）

1950年代の研究は、Roy (1955) に始まり、Polge (1956)、丹羽、瑞穂、副島 (1958)、Settergren (1958) らの主として凍害保護物質、グリセリン平衡時間、凍結速度などに関するものであった。唯この年代での注目すべき報告はHess (1957) がオハイオ州立大学農場の豚25頭に -95°C に1～19日間保存した凍結精液100mlずつを注入し、授精後20～60日で屠殺して調査した結果、7頭が受胎し、平均9.4頭の胎児を見たというもので、この報告が豚の凍結精液による受胎成功の最初のものであっただけに諸外国関係者の注目を集めた。筆者もこの分野の研究者の1人として、是非共この報告の詳細を知りたいと思い、1960年滞米中に同国の図書館等でその発表の原本を探し求めたが、この報告は普及関係の雑誌で、その事実が記載された簡単なもので、詳しい技術的内容の記述がなかったため残念ながらそれ以上の調査は諦めた経緯がある。

その後、1959年に至ってHoffmanが精液を遠心分離して得た精子を8-10%のグリセリンを含む卵黄ブドウ糖液で希釈し、 5°C から -79°C までの凍結速度を1分間に 1°C とした方法で処理した凍結精液を用い、11頭に授精して1頭が受胎し、9頭の子豚が生れたと発表しているが、これが豚の凍結精液による世界で最初の分娩例である。

（1960年代）

1960年代に入ってから希釈液、凍害保護物質（グリセリン、DMSO）や凍結速度についての報告が見られる（Iida & Tanaka 1961, Polge 1965, King & McPherson 1965, Kojima 1967など）ほか、Baier (1962)、和出、副島、柘田（博）(1969)らによって受胎例が報告されている。

また、丹羽、Gerrits & Graham (1962)は ①精巢上体尾部精子は射出精子に比べて格段に耐凍性が強く、凍結3カ月後においても50～70%の生存率を示し、とくに低倍率希釈（濃厚精液）において良好な生存率が認められたこと、②分離採取した濃厚精液を用いて各種条件下で凍結・保存した研究の結果を報告している。

（1970年以降）

1970年以降、豚精液の凍結保存に関する研究は急速に進歩し、受胎・成功例の報告も多くなった。そして、希釈液の組成、グリセリン濃度、凍結・融解の方法、注入精子数、注入回数、受胎率、産子数等に関する報告が増加し、技術の進歩が見られている（Pursel & Johnson (1971, 1975), Crabo & Einarsson (1971), Richter & Liedicke (1972), Salamon & Visser (1974), Richter ら (1975), Paquignon & Courot (1976), Larsson ら (1977), 丹羽ら (1981), その他)。

従来の報告から、豚精液の凍結保存法として研究されたのは (1) 錠剤化凍結法（ペレット法）、(2) ストロー法、(3) アルミパック法の3つであるが、現在実際に広く用いられているのは前2者であり、その詳細については後述するので、ここでは(3)のアルミパック法について簡単に紹介しておきたい。

(アルミパック法)

第2次希釈後の精液3~4mlをアルミパック（幅5.4cm、長さ16cm）内に入れ、シールした後、特製のアルミパック用ラック内に並列して収め、液体窒素によって凍結する方法で受胎例も得られている（和出ら、1977）。

2. わが国における豚凍結精液の研究と実用化

1) 岩手大学農学部家畜人工授精研究室での研究

昭和13年（1938年）農林省畜産試験場で豚人工授精の研究を開始して以来、筆者はその後信州大学農学部（昭和40年6月~同42年11月）、岩手大学農学部（昭和42年12月~同56年3月）、東京農業大学総合研究所（昭和56年4月~同61年3月）へと転動したが、この間昭和43年頃までは豚の人工授精に関する研究は液状精液を中心としてすすめてきた。

ところが、幸いにも昭和46年度から文部省当局の格別なるご理解とご配慮により、岩手大学の筆者の家畜繁殖学研究室が「家畜人工授精研究室」として認められ、研究費の経常予算化と、3カ年にわたり特別設備費の交付をいただき、お陰をもって研究環境の整備が急速にすすんだので1970年~1980年の10年間、研究室をあげて凍結精液の研究に精力的にとり組むことができた。

この間、苦労の連続であったが、1980年までに錠剤化凍結法（ペレット法）で受胎に成功するまでの技術開発を行なうことができた。自らの体験を中心に記述することは、気がひけるが、後日のため正確な記録を残しておきたいと思う心境をご了解賜りたい。

以下、錠剤化凍結法の工程に従って研究経過と結果の概略を要約して記録する。その中のかんりの部分は現行のペレット法の基礎として役立っている。

錠剤化凍結精液法（ペレット法）

凍結前の処理を終った少量の精液（0.1～0.2 ml）をドライアイス上に作った小孔内に滴下して急速に凍結する方法で、もともと日本で牛精液の凍結について開発された方法（永瀬，丹羽 1963, Nagase & Niwa 1964）である。

（研究の材料と方法）

- ① 供試精液はランドレース種雄豚 9 頭から 7 日間隔で採取した精液の濃厚部を使用した。
- ② 第 1 次希釈液として Beltsville F5（BF5）を用い、これに凍害保護物質として終末濃度 1% のグリセリンを添加したものを第 2 次希釈液とした。
- ③ 凍結精液の融解液としては Beltsville Thawing Solution（BTS）を用いた。
- ④ 採取した濃厚部精液は室温で約 2 時間放置、この間に所要の精液検査を実施。また抗生物質として硫酸ストレプトマイシンを原精液 1 ml に対し 2,000 μg 加えた。
- ⑤ 精液温が室温に達したら、蓋付のポリ遠沈管（10 ml 容量）に分け、遠沈管 1 本当りの精子数が 60 億になるようにした。次いで精液を 1,500 r.p.m で 10 分間遠沈、上澄を除去した後に BF5 希釈液を加えて全量が 5 ml となるように希釈し駒込ピペットで攪拌した（第 1 次希釈）。
- ⑥ 第 1 次希釈した精液を室温の水 50 ml を入れたビーカーに遠沈管のまま移し、これを 5℃ の恒温器内に入れ徐々に冷却した。冷却開始後 2 時間で 2% のグリセリンを含む 5 ml の BF5 希釈液を加えて第 2 次希釈を行なった（第 2 次希釈後のグリセリン終末濃度は 1% となる）。
- ⑦ 希釈後、遠沈管を転倒しながら十分に混合した後、直ちに永瀬，丹羽の錠剤化法により、ドライアイス上の小孔に 0.1 ml づつの精液を滴下して錠剤化し、液体窒素（LN₂）中に保管した。
- ⑧ 当時錠剤化凍結精液を作るためにドライアイス上に小孔をあける方法としては、大型鉗子の先か、先細の金属棒をドライアイス上に押しつけて等間隔に小孔を作る原始的な方法で行っていたが、これでは時間がかかり過ぎて非能率的である。いろいろ考えた挙げ句、先細の金属コテを丈夫な木の棒にしばりつけて持ち易くし、その先をドライアイスの上面に押しつけて小孔を作る方法を案出し、前よりはかなり早く小孔を作ることができるようになった（図 12. 21）。しかし、これとても能率的に多数の小孔をあけるためにはかなりの力と時間を要し、適当な器具と言える代物ではなかった。
- ⑨ その後、試作と実験をくり返し、FHK 工場の協力を得て現在使用している錠剤化凍結精液製造用の型押器（図 12. 22）が出来上り、ペレット豚凍結精液の効率的な製造が出来るようになった。この型押器は筆者が岩手大学から東京農大へ移った頃にやっと完成し、昭和 57 年度から実施した全国的な「豚凍結精液利用実用化促進事業」（第 I 期試験）（後述）に間にあって好都合であった。

その使用法は、表面の平らなドライアイス・ブロック（ドライアイス・プレイナーを使うと



図 12.21 手製の「錠剤化凍結精液製造用
ドライアイス穿孔器具」

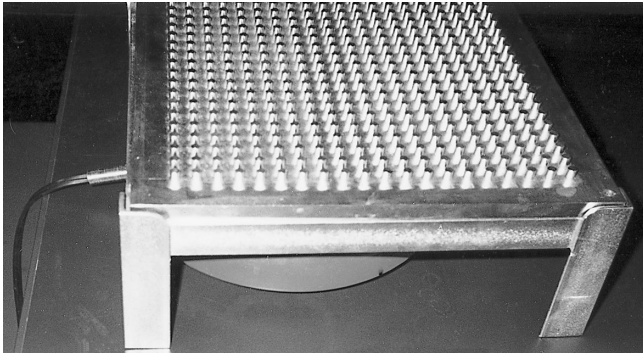


図 12.22 ペレット製造用の型押器 (丹羽)

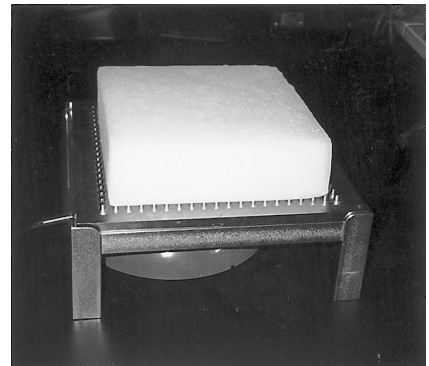


図 12.23 錠剤化凍結精液 (ペレット) 製造用の型押器の上に表面の平らなドライアイスブロックをのせて400個の小孔 (0.2 ml) を作っている様子

短時間で表面が平らになる) を型押器の上ののせると、ドライアイスの自重で一度に400個の小孔 (0.2 ml) が出来るので便利である (図 12.23)。これが現在使用されている器具である。

⑩ 融解の方法は、10 ml 相当の凍結ペレットを液体窒素中から取り出し、空の発泡スチロール容器 (内径: 長さ 105×幅 125×深さ 140 mm) に移し、室温で原則として3分間静置した (3分間室温に静置するという方法は、当時外国 (とくにアメリカ) の研究報告でもほぼ公認された方法であった)。静置後 50℃ の BTS 融解液 40 ml を入れた 250 ml 容量の広口びんに錠剤化凍結精液を投入し (図 12.29)、錠剤化凍結精液が完全に溶解するまで静かに攪拌した。

⑪ 精子の活力検査は常法に従って実施し、精子頭帽の形態検査は緩衝ゴムザ染色液による染色標本について行った。また精子頭部の微細構造は透過型電子顕微鏡 (TEM) によって観察した。

⑫ 凍結・融解精液を用いて授精試験を行った。

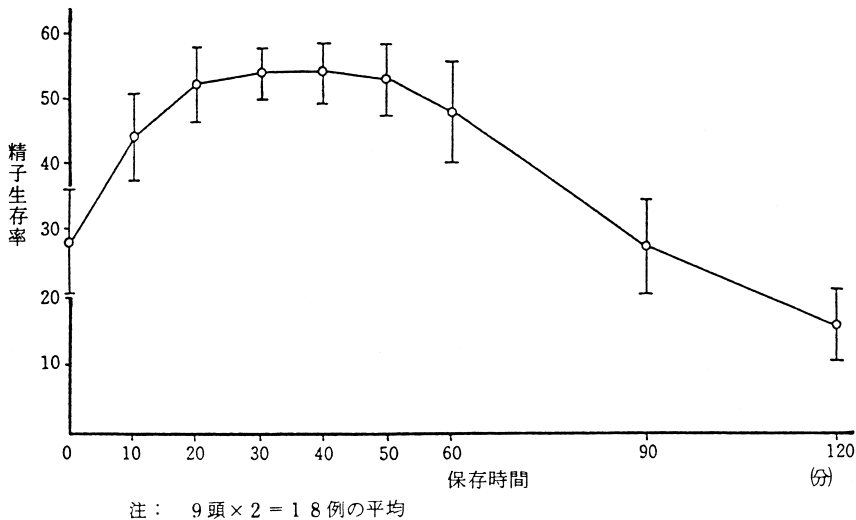


図 12.24 融解後 37°C に保存した場合の精子活力

(研究結果の概要)

研究結果のうち、現在もお参考として利用し得るもの、および基礎的に興味ある知見と思われるもの若干について紹介する。

① 融解後 37°C に保存した場合の精子活力：凍結・融解した豚精子を 37°C（温水中）に保存した場合の精子活力を、融解直後から 120 分まで観察した結果を示すと図 12.24 によつて、10 分では精子活力の回復は充分でなく、約 20 分で良好となり、30 分において最も良好な状態を示すことが明らかとなった。このことは、豚凍結精液の融解後の精子活力検査は、37°C（温水中）に保存した場合、融解後 20～30 分後に観察するのが適当であることを示唆している。

② 凍結精子の活力回復率：凍結前の精子生存率に対する凍結・融解後の精子生存率の割合（精子活力回復率）は、雄豚の個体や、希釈液、融解液の種類等によって異なるが、9 頭の雄豚について同一条件で比較した成績では、平均 67.4%（61.5～74.4%）で、個体によって差があり、凍結に強いものと弱いものがある。

③ 凍結・融解後の精子頭帽の形態変化：凍結・融解によって生ずる精子頭帽の形態異常は、膨化、染色異常（とくに前縁部が濃染）、欠損の割合が高く、その割合は融解後の時間経過につれて増加した。

④ 電子顕微鏡による観察結果：凍結前の正常な精子頭部（図 12.25, (左)）に比べて、凍結・融解直後の精子頭部では細胞膜はかなりの膨化を示し（図 12.25, (右)）、さらに融解後の保存時間の経過につれて細胞膜の膨化が精子頭部全域にわたって認められ、細胞膜が剥離、消失したのも観察され、またアクロソームが空胞化したものなども見受けられた。このことから豚

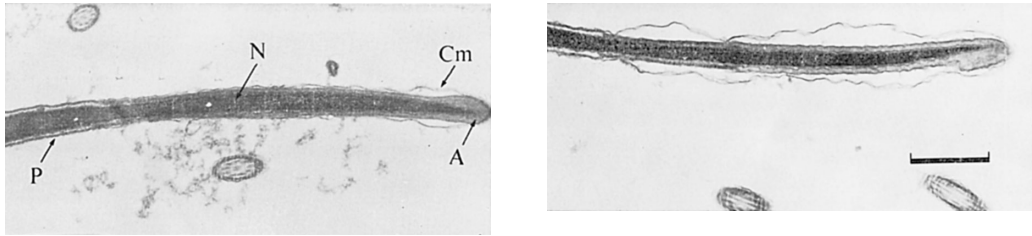


図 12.25 凍結・融解による精子頭部変化の電子顕微鏡的所見
(左) 凍結前の正常な精子頭部, (右) 融解直後の精子頭部, 細胞膜がジグザグ状に膨化している。

精子頭部は凍結・融解の過程においてかなりのダメージを受けることがうかがわれる。

⑤ 錠剤化凍結精液を液体窒素中から取り出し、5℃、15℃、25℃の室温に放置したときの錠剤化凍結精液の温度上昇の状態を熱電対温度記録計で測定した結果によれば、室温 5℃では 7.5 分放置して約 -30℃ に、室温 15℃では 6.0 分放置して約 -25℃ に、室温 25℃では 4.5 分放置して約 -25℃ にまで凍結ペレットの温度が上昇していた (図 12.26)。

⑥ 液体窒素中から取り出した錠剤化凍結精液を室温 (25℃) に 3 分間放置した後、50℃の BTS 融解液中で融解したときのペレットの温度上昇曲線は図 12.27 のようであった。

⑦ 長期保存した豚凍結精液の精子生存性: 液体窒素 (-196℃) 中に 0~4 年間保存した錠剤化豚凍結精液を同一条件で融解し、37℃に 360 分まで保存して経時的に精子生存性を比較観察した結果は図 12.28 のとおりであった。すなわち、保存 4 年目のものと保存 0 年目の精子生存性にはほとんど差がなく、凍結保管の条件がよければ、豚凍結精液は長期保存が可能であることが明らかとなった。

⑧ 授精試験成績

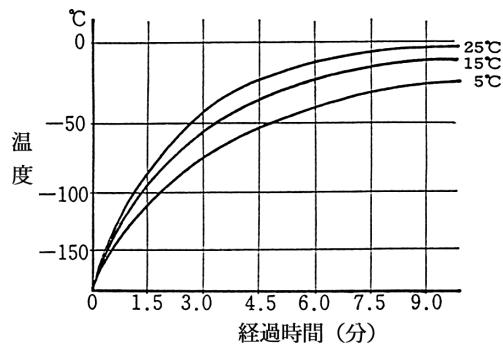


図 12.26 液体窒素中から取り出した錠剤化凍結精液を、5℃、15℃、25℃の室温に放置したときのペレットの温度変化

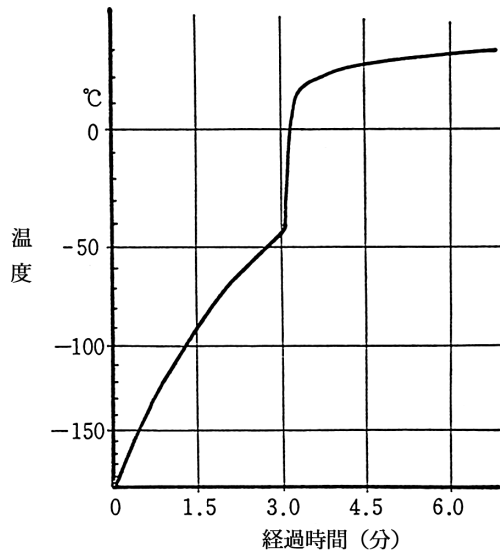


図 12.27 液体窒素中から取り出した錠剤化凍結精液を室温 (25°C) に3分間放置した後、50°CのBTS融解液中で融解したときのペレットの温度上昇曲線

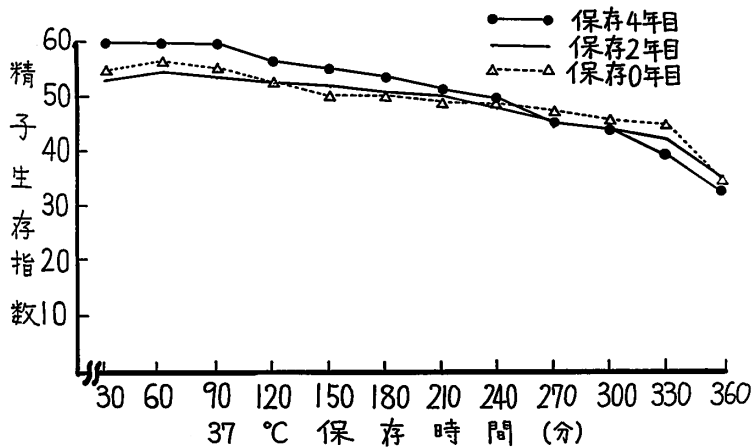


図 12.28 液体窒素 (-196°C) 中に0~4年間保存した豚凍結精液の融解後の精子生存性の比較

1) 錠剤化凍結精液の保存日数、精液注入条件と産子成績との関係は表 12.5 のようであった。

本実験で受胎・分娩に成功した凍結精液の最長保存日数は、1,363日 (1981年発表当時) であった。なお、本実験に用いた凍結精液のうち、初期に製造したものの若干は現在も保管中であるので、後日機会をみて長期保存凍結精液の保有エネルギー (代謝能)、精子の形態等をしらべると同時に、受胎試験を実施する予定である。

第12編 豚人工授精の歩み

表 12.5 凍結精液の保存日数，精液注入条件と産子成績（丹羽，橋爪，1981）

雌豚 ※は 未経産	雄豚 品種 番号	精液 保存 日数	精子生存指数		アクロソーム 異常率 (%)	注入精液量 (ml)		注入精子数 (億)		産子数 (頭)
			第1回	第2回		第1回	第2回	第1回	第2回	
1	L-1	293日	55	50	22.3	55	60	82.5	88.8	5
2	L-2	1258	65	—	24.7	60	—	28.2	—	4
3	W-1	188	55	45	56.8	50	60	90.0	48.0	3
4※	L-2	1360	60	60	24.7	50	50	33.5	20.5	7
5※	L-7	8	40	35	22.3	55	47	34.1	45.6	Abort. ^a
6	H-1	55	55	55	—	60	60	—	—	15
7	L-3	171	50	50	33.4	45	60	—	—	11
8	L-4	635	60	65	35.4	11	7	14.3	9.8	3
9	L-2	1359	60	60	24.7	40	40	56.0	60.0	12
10	L-2	1363	50	50	24.7	38	35	53.2	49.0	15
11	L-5	684	60	55	42.6	20	22	28.0	24.2	6
12	L-5	693	60	60	42.6	40	13	48.0	15.6	5
13	L-4	630	55	60	35.4	50	44	75.0	66.0	Abort. ^b

注：1) 凍結精液の保存は液体窒素精液保管器（-196℃）

2) 精子生存指数は融解後37℃に30分保存後の検査

3) 受胎試験1から5は岩手大学，6～7は沖縄県畜試（空輸），8～13は山形県立豚試（陸路輸送）での成績

4) a. 妊娠30日，b. 妊娠65日で流産

2) 輸送凍結精液による授精試験成績

錠剤化凍結精液を液体窒素精液保管器（-196℃）で沖縄県，山形県へ輸送し，現地で授精試験を実施していただいた結果は表12.6のようであった。

表 12.6 輸送錠剤化凍結精液（ペレット）による授精試験成績（1981）

県名	受胎率	分娩率	産子数
岩手県	5/7 (71.4%)	4/7 (57.1%)	4.8 (3~7)
岩手県→沖縄県	2/5 (40.0%)	2/5 (40.0%)	13.0 (11~15)
岩手県→山形県	6/11 (54.5%)	5/11 (45.5%)	8.2 (3~15)
計または平均	13/23 (56.5%)	11/23 (47.8%)	7.8 (3~15)

注：岩手大学・家畜人工授精研究室にて製造した凍結精液（ペレット）を液体窒素精液保管器（-196℃）で，沖縄県へは空路，山形県へは陸路輸送して授精試験を実施していただいた成績。岩手県の成績は同一凍結精液の授精による対照。

上記の10カ年（1971～1981）にわたる研究成果は筆者の定年時（昭和56年3月）に岩手大学農学部家畜人工授精研究室報告第1号（122頁，1981年1月），第2号（108頁，1981年3月），第3号（49頁，1981年3月）にとりまとめ，研究を支援していただいた文部省に報告書を提出すると同時に，農水省，各都道府県の関係試験場所，各大学関係学科等に贈呈した。

2) 農水省主導による「豚凍結精液利用実用化促進事業（昭和57～59年度）」および「豚凍結精液実用化確立事業（昭和60～62年度）」の実施とその成果

農水省畜産局家畜生産課では、上記10カ年の試験研究によって豚凍結精液の利用に一応の見通しがついたとの判断で、これを広く全国的レベルで推進、検討し、わが国の豚の改良増殖に役立てるため実用化促進事業としてとり上げていただけることになった。筆者は、この事業の採択、実施に理解を示され、その実現に大変努力して下さった当時の農水省畜産局家畜生産課の豚・めん羊係長（のち、畜産専門指導官）永田克幸氏（現在、川口市居住）および（社）家畜改良事業団専務理事、故大久保 瑛氏の熱心なお取計いを忘れることはできない。もちろん、当時の農水省畜産局家畜生産課長、肉畜馬産班長、（社）家畜改良事業団理事長、同家畜改良技術センター等関係各位のご高配にも深謝している。（当時の忘れ得ない思い出話として、永田克幸氏が関係部局の上司に対する事業の説明に、凍結精液の実物を見せたいので持ってきてほしいとの依頼があって、液体窒素凍結精液保管器に収納した錠剤化豚凍結精液（ペレット）を農水省に届けた。いざ説明というときに保管器をあけたらケーンの中に収納してあった粒状のペレット精液が液体窒素中にとび出していてピンセットで集めるのに大変苦労し、冷汗をかいたが、それがかえって印象的で効果があったようだと言田氏が思い出話をされていたことを思い出す）。

（1）豚凍結精液利用実用化促進事業

（第Ⅰ期試験，昭和57～59年度）

この第Ⅰ期試験（3年間）は錠剤化凍結精液法（ペレット法）について行ない、（社）家畜改良事業団・家畜改良技術センターを中心に、山形県立養豚試験場、茨城県養豚試験場、群馬県畜産試験場、千葉県畜産センター養豚試験場、鹿児島県畜産試験場の5県試験場が参加した。

（事業の仕組み）

1) 家畜改良事業団・家畜改良技術センターは下記の事業を行なう。

（1）凍結精液用の希釈液，融解液を事業実施県の試験場へ配付する。

（2）事業実施県等の技術担当者を招集して，凍結精液の製造，保管，融解，注入等に関する技術研究会を開催する。

（3）県等で実施した種付け結果についてその成績を取りまとめるとともに，今後の課題等について検討するための研究会を開催する。

2) 事業実施県は，家畜改良事業団・家畜改良技術センターと緊密な連携の下に下記の事業を行なう。

（1）凍結精液の製造保管：県試験場で耐凍能を有する優良な種雄豚を選抜し，凍結精液の製造，保管を行なう。

(2) 凍結精液による種付けと調査：県試験場で製造された凍結精液を農家の種雌豚に種付けするとともに受胎成績、産子数等の調査を行なう。

(3) 凍結精液利用体制の整備：ア) 人工授精講習会の開催。県試験場で、本事業において授精を担当する家畜人工授精師に対して人工授精方法等について技術講習を行なう。イ) 凍結精液実用化推進協議会の開催。農協等の職員、対象農家を招集して、事業の推進方法及び凍結精液利用推進等についての協議会を開催する。

3) 本事業における豚凍結精液の製造、保管、輸送、融解、注入等の技術は丹羽らの研究結果に基づく方法（錠剤化、ペレット法）によって実施する。

（なお、丹羽は当時東京農業大学教授の職にあったが、本事業（第Ⅰ期および第Ⅱ期）実施中（昭和57～62年度）は（社）家畜改良事業団顧問に委嘱されて技術の指導に当たった）。

（事業の経過と成果の総括）

1) 本事業の開催に先だち、昭和56年度は準備年度とし、昭和57年2月26日、東京において関係者の打合せ会を開催した。

2) 各年度に関係者、実施5県の担当者等が家畜改良技術センターに集合して打合せ会議と技術研究会（研修、実習、結果の報告および検討会）が開催された。

昭和57年度：（出席者）第1回（27名）、第2回（28名）、第3回（21名）

昭和58年度：第1回（22名）、第2回（27名）、

昭和59年度：第1回（27名）、第2回（26名）、第3回（31名）

3) 上記の（事業の仕組み）に則り、各機関、実施各県はそれぞれの任務遂行に真剣な努力をなされ、その成果は年度毎に向上した。

4) 技術センターから試験場（5県）へ配付した希釈液および融解液の合計配付量は次のとおりであった。

年 度	希 釈 液		融 解 液	
	配付回数	配付量	配付回数	配付量
昭和57年	87回	68,780 ml	22回	114,500 ml
58	204回	121,150	30回	213,320
59	153回	93,200	28回	250,500
計	444回	283,130	80回	578,320

なお、5県試験場のうち、山形、鹿児島両県への輸送は空路、茨城、千葉、群馬県への輸送は陸路とした。

5) 試験場における凍結精液の製造（5県合計）および凍結前後の精子活力は次のとおりであった。