

## 凍結精液作成上における技術的な諸問題についての検討

町田隆彦・青木晋平・西川義正\*

(農学部 畜産学研究室)

\*(京都大学農学部 畜産学研究室)

### Studies of Many Problems Awaiting Solution on the Freezing Methods of Bovine and Goat Spermatozoa

Takahiko MACHIDA, Shimpei AOKI and Yoshimasa NISHIKAWA\*

(Laboratory of Zootechnical Science, Faculty of Agriculture)

\*(Laboratory of Zootechnical Science, Faculty of Agriculture  
Kyoto University)

A series of experiments was conducted to develop the freezing methods for bull and goat semen.

Semen sample was collected in an artificial vagina from bulls and goats. We use in our experiments the semen washed with Ca free Krebs Ringer phosphate solution. Each washed semen sample was then extended at the rate of 1 part semen to 6-48 part of the egg yolk citrate diluter and SEMINAN diluter. The glycerol containing fraction of the secondary extender was added in four equal portion at 10 min. intervals at 5°C. After equilibration for 10-18 hr. at 5°C. the semen was hermetically sealed in 0.5 ml. and 1.0 ml. plastic straws and frozen in liquid nitrogen gases. Straws were thawed in ice water and an aliquot of semen placed on a glass slide previously warmed to 38°C for estimations of per cent progressively motile spermatozoa.

The results are summarized as follow: Experiment 1. The PROCAIN HCL (300mg/dl) was added to yolk-citrate glycerol and SEMINAN extender to determine effects on frozen sperm motility. Semen extender with 3 mg PROCAIN HCL per milliliter in greater sperm motility than extender without PROCAIN HCL after post thawing. Experiment 2. Frozen semen straws of the horizontal position resulted in passably greater sperm motility than vertical position. The frozen semen motility of small size straws (0.5 ml.) revealed no significant as compared with the large size straws (1.0 ml.) during from post thawing. Experiment 3. Observation on the secondary frozen semen samples showed high recovery of the proressive cells to primary frizen semen. (Recovery per cent of bovine semen was 83 % and goats semen was 84 %). Experiment 4. Examining the influence the lapse from the primary dilution to the secondary dilution to the freezing capacity of spermatozoa, we recognjzjed no fall of the capacity within 24 hr. as to bovine sperms and 12 hr. as to goat sperms. Experiment 5. Measurement on the allowed time of exposure in room temperature of frozen semen straws showed about 60 sec.

1951年イギリスの Polge ら<sup>(1)</sup> は精子にグリセロールを添加することによって-79°Cの起低温下でも精子の受精能力を低下させずに長期に亘り生存性を延長し得る可能性を示した。その後数多くの研究者によってこの凍結保存法が改良された結果、現在では液体窒素を用いた-196°Cでの凍結保存法が確立され、世界的に実用化されるに至った。この凍結精液の実用化によって精子の生存性は飛躍的に延長され、優良種雄畜の繁殖寿命の延長、受胎率の向上、家畜の改良区域の拡大など家畜の繁殖面で技術的、経済的に多大の貢献をもたらすようになった。本実験ではこの凍結精液を作成する上での技術的ないくつかの問題をとりあげ検討してみた。

#### 実験 1 凍結精子の生存性におよぼす塩酸プロカインの影響

筆者はこゝ数年来、代謝抑制物質である麻酔剤を液状精液に添加して、精子の代謝を抑制し細胞内の内在性エネルギーの損耗を少くして、精子の生存性を延長する試みを行ない、局所麻酔剤の塩酸プロカインにその効果のあることを認めた<sup>(2)</sup>。液状精液で生存延長の効果のあった塩酸プロカ

インが凍結精液に対してどのような結果をもたらすかについて検討した。

### 材 料 お よ び 方 法

褐毛和種牛およびザーネン種山羊から人工陰法で採取した精液は精漿の影響をさけるためにリンゲル液で洗滌して用いた。この洗滌精子を30°Cの温湯中で卵黄クエン酸ソーダ稀釈液（以下 E. C. D. と略記）および凍結用セミンAN液で牛精子は3, 6, 12, 24倍, 山羊精子は5, 10, 15, 20倍になるように1次稀釈した。この1次稀釈液を毎分1°Cの割合で4°Cまで冷却し, 2時間放置したのち, 14%のグリセリンを含んだ E. C. D. およびセミンAN液で1次稀釈精液と等量に稀釈した。したがって精子の最終稀釈倍率は牛では6, 12, 24, 48倍, 山羊では10, 20, 30, 40倍となり, グリセリンの最終濃度は7%であった。2次稀釈液はグリセロールの稀釈衝撃をさけるために10分間隔で3回に分けて稀釈した。ついで16~20時間のグリセロール平衡を行なったのち, 精液をストローに分注し, 液体窒素ガスによる簡易急速凍結を行なった。なお凍結精液の融解は4°Cの氷水中で行ない, 38°Cの加温器上で検鏡した。

### 結 果

E. C. D. およびセミンAN液で稀釈した凍結精液に塩酸プロカインを添加した精子の生存性についての成績は第1表, 第2表の通りである。

#### (1) 塩酸プロカイン無添加区（対照区）の成績

本実験に供試した E. C. D. およびセミンAN液の比較では, 牛精液の場合, E. C. D. よりもセミンAN液で稀釈した試験区の方が良好な生存性を示した。山羊精液の成績は牛精液の場合と異り, E. C. D. とセミンAN液の間には凍結精子の生存性に有意な差は認められなかった。これは本実験

第1表 凍結牛精子の生存性におよぼす稀釈液, 稀釈倍率およびプロカインの影響

稀 釈 液	プロ カ イ ン mg/dl	稀 釈 倍 率	精 子 活 力 (生存指数)										
			グリ 衡 リ ン 後 セ 平	融 解 後 保 存 時 間 (時間) 4°C									
				0	1	2	3	4	5	6	7		
E. C. D.	0	6	80	58	58	53	50	48	45	40	36		
		12	80	53	53	48	48	45	43	34	34		
		24	78	53	50	43	40	38	29	23	16		
		48	75	48	48	40	37	33	24	18	14		
	300	6	83	65	65	63	60	58	55	53	53		
		12	80	63	60	60	58	55	55	53	53		
		24	78	58	55	55	53	48	43	40	35		
		48	75	55	55	48	43	40	35	30	28		
S E M I N A N	0	6	83	68	68	63	58	58	53	53	53		
		12	80	63	63	58	53	53	53	50	50		
		24	78	60	58	55	53	50	48	43	40		
		48	75	55	55	53	50	48	40	40	35		
	300	6	85	68	68	65	63	60	60	55	55		
		12	83	68	65	65	58	58	53	53	50		
		24	78	63	63	58	58	55	53	50	48		
		48	78	60	55	53	53	50	48	45	43		

第2表 凍結山羊精子の生存性におよぼす稀釈液, 稀釈倍率およびプロカインの影響

稀 釈 液	プロ カ イ ン	稀 釈 倍 率	活 力 (生存指数)						
			グリセリン 平 衡 後	融 解 後 保 存 時 間 (時間)					5
				0	1	2	3	4	
E. C. D.	(ml/dl) 0	10	70	40	35	35	35	30	30
		20	70	35	30	30	30	25	25
		30	70	30	22	22	15	15	15
		40	70	26	19	19	15	15	15
	300	10	70	40	40	40	40	35	35
		20	70	40	40	35	35	30	30
		30	70	35	35	35	30	25	25
		40	60	30	30	30	30	25	22
SEMINAN	0	10	70	40	40	35	35	35	35
		20	70	40	35	35	35	30	30
		30	70	35	30	30	26	22	22
		40	60	26	19	19	19	15	15
	300	10	70	45	40	40	40	40	40
		20	70	40	40	40	35	35	35
		30	70	40	35	35	35	30	30
		40	60	35	30	30	30	25	35

に供試したセミン液が牛精液用で、卵黄凝固酵素抑制剤が添加されていないために、グリセリン平衡時に稀釈精液の凝固反応があらわれ、全般的に凍結能が低下したのではあるまいか。稀釈倍率と精子の生存性の関係についてみると、牛では24倍、山羊では20倍以上の高倍率稀釈になると融解保存後の活力の低下が著しくあらわれた。特に本実験で凍結能の低かった山羊精液およびE. C. D. 稀釈の牛精液においてこの傾向が強くと認められた。セミン液で稀釈した牛精子は48倍という高倍率にもかかわらず、融解後7時間保存した精子においても、凍結直後の64%の活力を維持し、E. C. D. の48倍区の29%に比べ、高い生存性を示した。

#### (2) 塩酸プロカイン添加区の結果

塩酸プロカインを添加したE. C. D. 稀釈の凍結牛精子の生存性は、無添加の対照区に比べ、高い生存性が保持された。特に生存性が急激に低下した対照区の高倍率稀釈区においても、塩酸プロカインの添加は精子の運動性を活発にし、融解後数時間経過した精子においても授精に供用出来る程度の活力が観察された。セミン液稀釈液を使用した試験区では、塩酸プロカイン添加の効果はE. C. D. 稀釈区ほど顕著には認められなかった。これはセミン液に含まれるトランキライザーとの競合による影響がプロカイン添加の効果を抑制したのではあるまいか。山羊精子の場合も牛精子の結果と近似した傾向を示し、塩酸プロカインは凍結後の精子生存性に好影響をもたらした。特に融解後経時的に添加の効果が増強された。また、牛精子の場合には目立った効果が認められなかったセミン液稀釈の精子においても、山羊精子においては活力が賦与された。

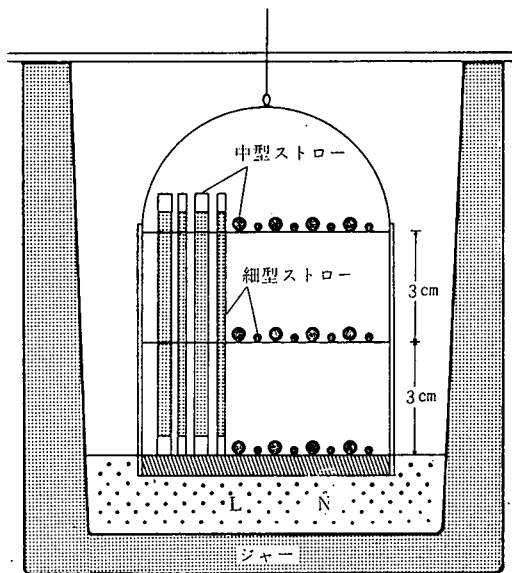
#### 実験2 垂直凍結法と水平凍結法で凍結した精子の生存性の比較

精子を凍結し、良好な生存性を維持させるには、精液ストローの温度下降速度が問題となる。現在は精液ストローをLN液面上に垂直に保持し、上層のLN<sub>2</sub>ガスで急速凍結している。西川らはこの場合ストローの中心部が約5分で-80°Cに達すると報告している。しかしながら垂直凍結の場合、ストローの上部と下部ではLN液面からの距離が異なるために、精液ストロー全体が均一な温度下降曲線が得られないので当然精子の生存性にも差が生じる。筆者らの実験においても、ストロー中心部の精子活力に比べ、上部および下部の活力が劣ることが明らかとなっている。この

点を解決するには、温度条件が均一となるように、精液ストローを水平に保持して凍結する方法が考えられる。本実験は上記の目的で垂直凍結法と水平凍結法で凍結した場合の凍結能の比較試験を行なうと共に、精子の生存に最適の温度下降速度となるようLN液面からストローまでの最適距離を検討してみた。また、0.5 ml 容の細型ストローと1.0 ml 容の大型ストローとの凍結能の比較も併せ行なった。この0.5 ml のストローは現行の1.0 ml のストローに比べ、径が細くなるために精子細胞にとって有害な $-15^{\circ}\text{C}$ から $-30^{\circ}\text{C}$ の温度範囲を通過する凍結時および融解時の下降、上昇速度が速くなり、物理的、化学的な障害が緩和され、凍結精子の生存に好結果をもたらすことが予想される。更に精液の必要量が半分が節減される上に、凍結保管器に収納出来るストロー本数が著しく増加して有利な点が多い。

### 材料および方法

ザーネン種山羊より採取した精液を2000 r. p. m で遠沈した洗滌精子を用いた。この洗滌精子の1次および2次稀釈は常法により稀釈し、6～10時間のグリセリン平衡を行なった後、1.0 ml と0.5



第1図 凍結装置

ml のストローに分注し、第1図のようなストロー保定枠に装着して急速凍結した。水平凍結法におけるストローの装着は、上 (LN面より6 cm)、中 (LN面より3 cm)、下 (LN面上) の3段階に分けて水平に配列した。凍結ストローの融解は、氷水中で行ない、経時的な精子活力の変化を $38^{\circ}\text{C}$ の加温顕微鏡下で観察した。

### 結 果

水平凍結法と垂直凍結法で凍結した精子の生存試験の結果は第3表の通りである。水平凍結法と垂直凍結法で凍結した精子の生存性を比較してみると、精液ストローを保定枠の中段および上段に装着した水平凍結の精子が、垂直凍結の精子よりも良好な活力を示した。特にストローをLN液面より約3 cm 離れた位置で水平凍結した精子の回復率は約70%であり、他の試験

第3表 凍結精液の生存性におよぼす凍結方法の影響

凍結方法	ストロー	ストロー設置位置	活 力 (5°C)						
			融 解 後 保 存 時 間 (時間)						
			0	1	2	3	4	5	6
水 平 凍 結	中 型	上 段	40 $\pm$	40 $\pm$	40 $\pm$	40 $\pm$	35 $\pm$ ~ $\pm$	35 $\pm$ ~ $\pm$	35 $\pm$ ~ $\pm$
		中 段	45 $\pm$	45 $\pm$	45 $\pm$	45 $\pm$	40 $\pm$ ~ $\pm$	40 $\pm$ ~ $\pm$	40 $\pm$ ~ $\pm$
		下 段	35 $\pm$	35 $\pm$	35 $\pm$	35 $\pm$	35 $\pm$ ~ $\pm$	30 $\pm$	30 $\pm$
	細 型	上 段	45 $\pm$	45 $\pm$	45 $\pm$	45 $\pm$	40 $\pm$ ~ $\pm$	35 $\pm$ ~ $\pm$	35 $\pm$ ~ $\pm$
		中 段	50 $\pm$	50 $\pm$	50 $\pm$	50 $\pm$	45 $\pm$	40 $\pm$	40 $\pm$
		下 段	40 $\pm$	40 $\pm$	40 $\pm$	40 $\pm$	30 $\pm$	25 $\pm$	25 $\pm$
垂 直 凍 結	中型ストロー	40 $\pm$	40 $\pm$	40 $\pm$	40 $\pm$	35 $\pm$ ~ $\pm$	30 $\pm$ ~ $\pm$	30 $\pm$ ~ $\pm$	
	細型ストロー	40 $\pm$	40 $\pm$	40 $\pm$	40 $\pm$	35 $\pm$	30 $\pm$ ~ $\pm$	30 $\pm$ ~ $\pm$	

区の50~60%に比べ良好な生存性を示した。水平凍結の下段の精子は、温度下降速度が急速であったために、最低の回復率となった。ストロー容量の比較では、水平凍結の場合において0.5mlストローが1.0mlストローよりも上回る成績を示したが、有意な差ではなかった。垂直凍結法では、ストローの大小による精子の生存性の差異は認められなかった。

### 実験3 凍結精子の生存におよぼす2回凍結処理の影響

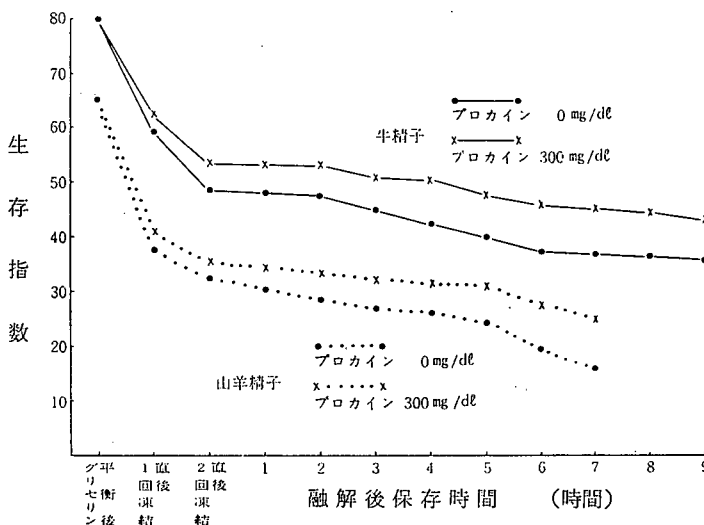
凍結精液は1度融解すると液状精液に比べ、精子の活力は著るしく低下し、融解後数時間で供用出来ないまでになる。したがって凍結精液を融解した後に、種付適期を逸した場合その精液は数時間で使用不能となり、廃棄しなければならなくなる。この1度融解した精液を再凍結して利用することが出来れば精液の損失が減少する。この観点から本実験は、2回の凍結処理をした精子の回復率について調べ、1度融解した凍結精子の再利用について検討した。

#### 材料および方法

褐毛和種牛およびザーネン種山羊の精液を凍結用セミナンで牛は7倍、山羊は10倍になるように稀釈し、常法により急速凍結した。凍結ストローは4°Cの氷水中で融解し、ストロー上部をカットして、その精子を検鏡して活力を検査した後、残りのストローをゼラチンで閉封してキャニスターに入れ、凍結保管器に挿入し再凍結した。再凍結の精子は4°C融解を行ない、融解後の活力を経時的に観察して、2回凍結精子の活力回復率を測定した。

#### 結果

精子を2回凍結することによって活力がどの程度低下するか、また融解後の経時的な活力の低下が1回凍結の精子に比較してどのような推移を示すかを図示したのが第2図である。塩酸プロカイン無添加の牛精子の2回凍結後における生存指数は49.2で、回復率は1回凍結精子(59.2)の83%を示し活力の低下は17%にすぎなかった。融解後4°C保存精子の経時的活力も急激な低下はみられず保存後の9時間においても34という凍結精液では比較的良好な生存指数を示した。塩酸プロカインを添加することによって、2回凍結後の回復率は無添加区精子の生存指数49.2に比べて55に向



第2図 精子の生存性におよぼす2回凍結の影響

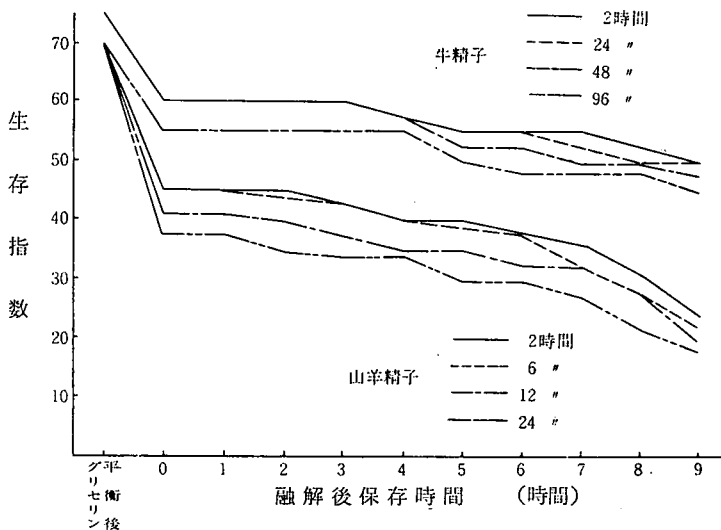
上した。特に融解保存後、数時間の精子においてもかなり良好な活力が保持された。塩酸プロカイン無添加の山羊精子の2回凍結においては、本実験に供試した山羊原精液の性状が悪く、凍結前の平均活力が65卅と生存率の低い精液を使用したために凍結処理による悪感作が強く現れ、1回凍結においてすでに38という低い生存指数にまで低下した。したがって2回凍結によって32まで低下したが、1回凍結精子に対する2回凍結精子の回復率は84%で、回復率においては牛よりもむしろ高い数値を示した。良好な性状を有する山羊原精液を使用すれば、牛精子以上の生存率が得られるものと推測される。塩酸プロカイン 300 mg/dl の添加は山羊精子の場合も無添加精子よりもかなり良好な活力を維持した。特に融解保存後の後期において塩酸プロカイン添加の効果が大きく現れた。以上の結果から1度融解した凍結精液も2回凍結までの時間が短時間であれば2回凍結しても良好な活力を維持することができ、再利用することも可能であろう。また、塩酸プロカインは2回凍結の精子に対しても活力を賦与することが明らかとなった。

#### 実験4 1次稀釈から2次稀釈までの時間の経過が凍結精子の生存性におよぼす影響について

凍結精液の作成には凍結設備ならびに液体窒素を必要とする上に、精液処理の上で時間的な制約があり、凍結設備をもたない辺地の優良種雄畜の精液を凍結して利用するには技術的、経済的な困難を伴う。この場合辺地の種雄畜の精液を凍結処理前の1次稀釈の段階で精液を輸送し、精液センターで凍結して良好な精子の生存性が得られれば、経済的に優良種雄畜を広域から求められる利点が考えられる。そこで本実験は、1次稀釈精液を2次稀釈するまでの時間の経過が凍結精子の生存性にかかるとおぼすかについて調べ、次のような知見を得た。

#### 材料および方法

褐毛和種牛および山羊の精液を30°Cでセミナンを用いて1次稀釈後、毎分1°Cの割合で4°Cまで下降し、牛では精液採取後2, 24, 48, 96時間、山羊では2, 6, 12, 24時間の保存後2次稀釈を行なった。2次稀釈後の精液は各試験区とも10時間のグリセリン平衡後、LN<sub>2</sub>によって急速凍結した。凍結精子の融解は4°Cの氷水中で行ない、融解後9時間まで経時的に精子活力を測定した。



第3図 1次稀釈から2次稀釈までの時間の経過が凍結能におよぼす影響

#### 結 果

従来の精液凍結の操作では1次稀釈から2次稀釈までの最適時間は2時間程度とされていたが、本実験における牛精子の場合、1次稀釈後24時間経過したのちに2次稀釈を行なった精子においても、凍結後の生存性は2時間区と大差ない結果を示した。(第3図)

1次稀釈後96時間保存した精子は、稀釈後若干の生存率の低下が認められたが、有意な差ではな

かった。山羊精子の場合は、24時間保存の試験区において凍結能が低下し始めたが、12時間までの保存では対照区（2時間保存区）と差が認められなかった。山羊精子は牛精子に比べて1次稀釈後生存率が低下しているのは、採取直後の精液性状が悪化していたことと、凍結用稀釈液に牛用セミンランを使用したために、山羊精漿中の卵黄凝固酵素が保存中に作用して、1次稀釈後の精子が生理的な影響を受けたためであろう。以上の結果から、1次稀釈から2次稀釈までの保存時間が本実験に供試した牛精子では24時間、山羊精子では12時間程度までは、凍結後の精子の活力に影響なく保存できることが明らかとなった。

#### 実験5 凍結精液ストローの室温中における露出許容時間について

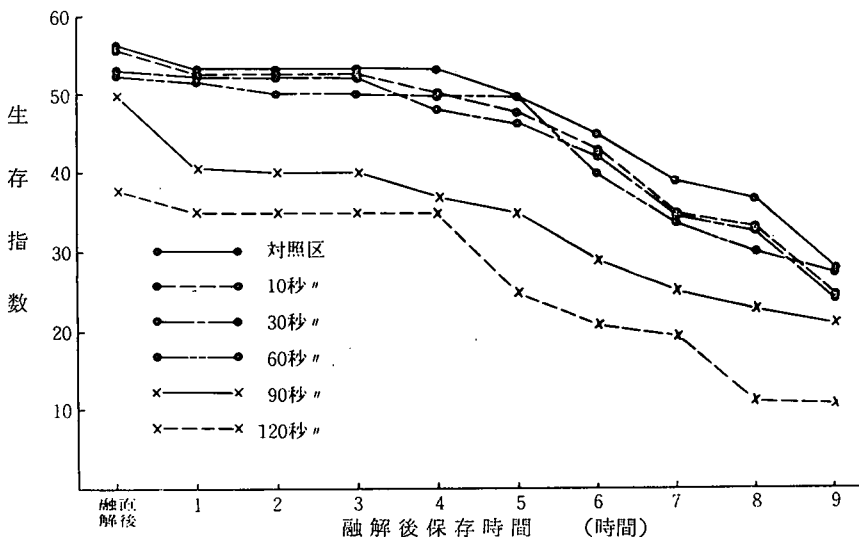
凍結が終了した精液ストローを凍結器から保管器に移し換える場合、また精液センター保管の精液ストローをサブセンターに配布する場合、数度にわたり保管器から輸送器に移しかえられる必要が生じてくる。この際精液ストローは一度空気中に露出され、精液ストローの外面は $-196^{\circ}\text{C}$ から室温まで $200^{\circ}\text{C}$ 以上の急激な温度変化を受けることになる。この露出時間が長くなり、ストロー内の精液温度が一時的にしる高くなれば当然精子の生存性に悪影響をおよぼすことが考えられる。しかしながら日常業務として凍結精液のストローを取り扱う場合、保管器内のストローの種類や本数が多いために識別や操作に神経を使い、空気中の露出時間を短縮することに配慮するあまり、誤りを生じやすい。本実験は精液ストローの取扱いを確実に遂行するために精子の生存性に影響をおよぼさない範囲で、精液ストローを室温中に露出する許容時間について検討してみた。

#### 材料および方法

セミンランで稀釈した牛精子を急速凍結し、そのストローを精液保管器より0, 30, 60, 90, 120秒室温中に露出した後、再びLN中に浸漬し、その後 $4^{\circ}\text{C}$ で融解して、精子の活力検査を行ない露出許容時間を決定した。

#### 結果

凍結ストローを室温中に露出させ、融解精子の活力におよぼす影響について図示したのが第4図



第4図 凍結精液ストローの室温中での露出許容時間

である。凍結精液ストローを室温中に露出させた時間が60秒までは、対照の0秒区と大差ない生存性が維持されたが、90秒以上になると急激に活力が低下しはじめ、120秒区では対照区の67%にまで低下した。本実験に供試した牛の凍結精液を室温中で処理する場合の許容時間は60秒以内であり、この範囲内の時間であれば精子の生存性に悪影響をもたらさないことが判明した。

### 要 約

凍結精液を作成する上での技術的な問題点のいくつかをあげ再検討してみた。

実験1. 稀釈液に塩酸プロカインを300 mg/dlの濃度で添加した牛および山羊の凍結精子は無添加の精子に比べて融解後良好な生存性、運動性を維持した。

実験2. 垂直凍結法と水平凍結法の比較では、LN液面より3 cm程度離れた位置で水平凍結した精子が、垂直凍結法に比べて良好で、かつ安定した精子の生存性が得られた。太型ストローと細型ストローを用いて凍結した精子の生存性は、両者の間に有意な差は認められなかった。

実験3. 1度融解した凍結精液の再利用を考え、2回の凍結処理をした精子の凍結能を調べた。2回凍結精子の回復率は牛では1回凍結精子の83%、山羊では84%を示した。

実験4. 1次稀釈から2次稀釈までの時間の経過が精子の凍結能におよぼす影響について検討したが、本実験の牛精子では24時間、山羊精子では12時間以内であれば凍結能の低下は認められなかった。

実験5. 凍結精子の生存性に影響のない範囲でストローを室温中に露出させることの出来る許容時間は約60秒であった。

### 参 考 文 献

- (1) Polge, C., & L. E. A. Rowson (1953) Vet. Record, 65: 766
- (2) 町田隆彦・西川義正 (1963) 高知大学学術研究報告 第12巻, 自然科学II, 第8号

(昭和45年9月30日受理)