

# 連載

## 第4回

# 牛の人工授精:凍結精液の取扱い

ジェネティクス北海道 顧問 高橋 芳幸  
 たかはし よしうき  
 昭和50年 北海道大学大学院獣医学研究科修士課程修了、  
 農林省畜産局採用(農林技官)  
 昭和51年 農林省日高種畜牧場勤務  
 昭和58年 北海道大学獣医学部・助教授  
 昭和61年 獣医学博士(北海道大学)  
 平成10年 北海道大学大学院獣医学研究科・教授  
 平成24年 北海道大学特任教授、名誉教授  
 平成25年 現職

前回は、凍結精液の取扱いの要点だけを記述しましたが、今回は凍結精液ストローの外気暴露(露出)を中心に追加説明します。

## 1. ストローの外気暴露による精子傷害の機序

前回記述したように液体窒素中に凍結・保管されている凍結精子とその周辺の保存液は結晶構造のない固体になっている(ガラス化)。凍結精液ストローの融解、一時的な外気露出などによりストロー内精液の温度は上昇し、特定温度(-130°C前後)以上になると、図1に示したように、ガラス化していた精子周辺の保存液が液体に変わる(脱ガラス化)。

凍結精液ストローを温水に浸けて急速に融解した場合は、精子周辺の脱ガラス化に続いて、周囲の氷晶も徐々に溶けて液体に変わる。しかし、ストローを一時的に外気露出して液体窒素に戻す場合、脱ガラス化して液体になった精子周辺の保存液に新たな氷晶が形成され、保存液の濃度・浸透圧が高まるため、精子は傷害を受けると推察される。また、精液の温度が-60~-80°Cまで上昇すると精子内も脱ガラス化して氷晶が形成され、精子が致命的な傷害を受ける可能性もある。

したがって、ストローの確認、移し替えなど、一時的にストローを液体窒素から取出して外気に露出する時は、精子周辺が脱ガラス化を起こさない(精液温度が-130°C以上にならない)ように取り扱うことが重要になる。

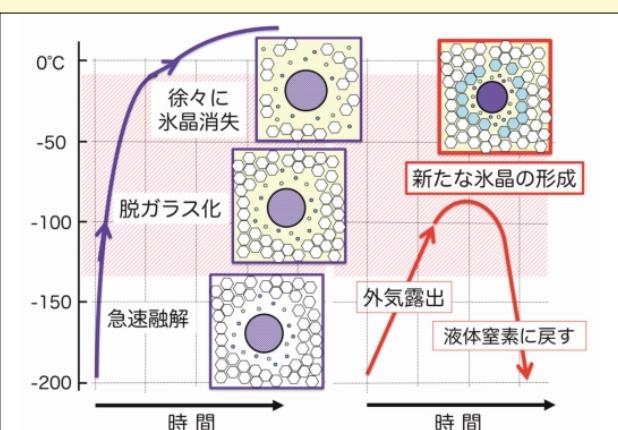


図1 凍結精液ストローの融解および短時間外気露出におけるストロー内温度と凍結状態の変化

## 2. ストローの外気暴露による精子傷害の実際

凍結精液ストローの温度上昇によって精子が傷害を受ける可能性のある外気露出時間は、凍結保存の条件(保存液組成、グリセリン濃度、冷却速度など)によって異なるかもしれません。しかし、一般的な凍結精液では、図2のように0.5mlストローでは5秒間の外気(25°C)露出を繰り返すと精子の生存性と活力は低下する。また、0.25mlストローは温度感作を受けやすいため、0.5mlストローと同じ外気露出時間・回数でも、より多くの精子が大きな傷害を受ける。

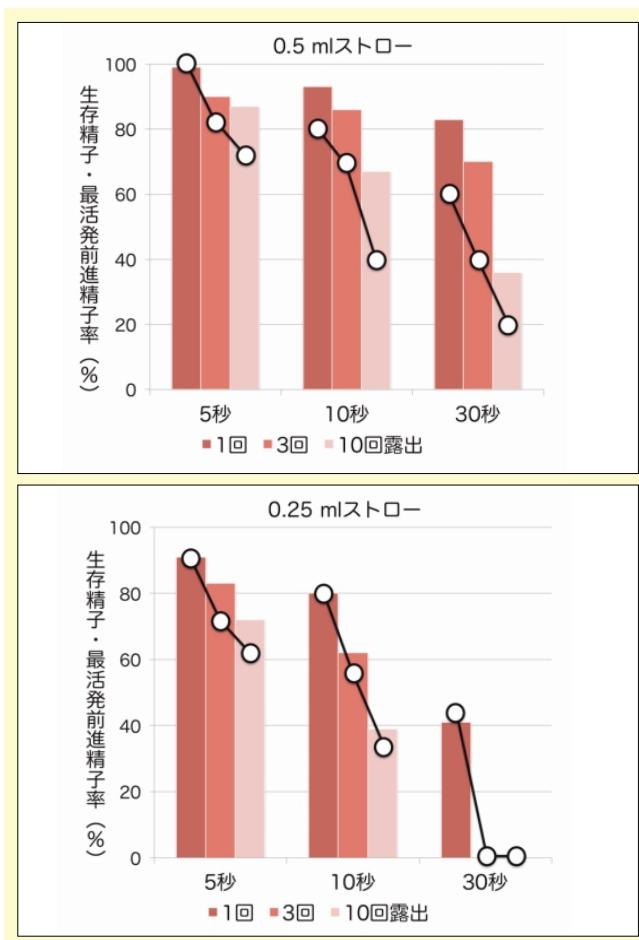


図2 0.5mlおよび0.25ml凍結精液ストローの反復外気露出が精子生存性に及ぼす影響

ストローを25°Cの外気(25°C)に1~10回反復露出後に融解した井下孝雄ら(1978)のデータを基に作成。生存精子(棒グラフ)と最活発前進精子(折れ線グラフ)の割合は、対照群(露出なし)の値を100%として算出した。

風のある状況でストローを液体窒素から取出して外気に露出すると、ストロー内精液の温度は短時間で脱ガラス化温度に達するので、無風では傷害がみられない短時間露出でも精子が傷害を受ける。例えば、図3に示したように、0.5mlストローの凍結精液を軽風(風力2:顔に感じる程度の風)のある外気に3秒間露出すると、正常精子率・活力は顕著に低下する。



0.25mlストローを風のある外気に露出した時の精液性状に関する手持ちのデータはないが、図4に示したように軽風下の2秒間外気露出でストロー内精液温度は脱ガラス化が起こる温度(-100°C前後)に上昇する。また、この温度変化のデータから、僅か1秒の外気露出でも精子が傷害を受ける可能性も示唆される。

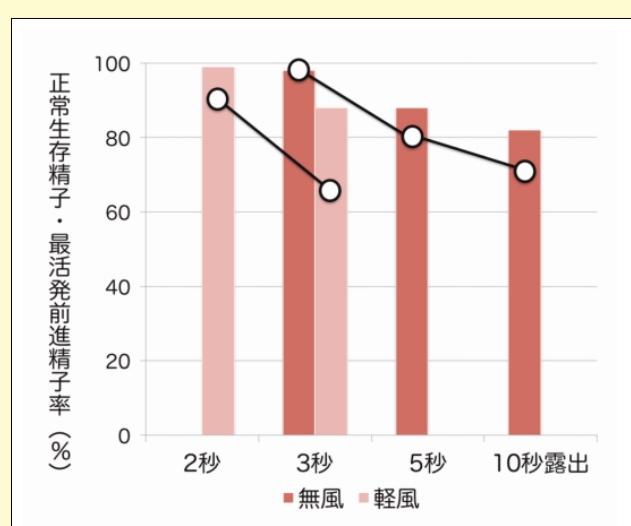


図3: 軽風下での凍結精液ストローの外気露出の影響

凍結精液ストローを無風あるいは軽風下で液体窒素から取り出し、外気(30°C)に5回反復露出。融解後の先体正常・生存精子(棒グラフ)と最活発前進精子(折れ線グラフ)の割合は対照群(外気露出なし)の値を100%として算出(岡村、2012のデータを基に作成)。

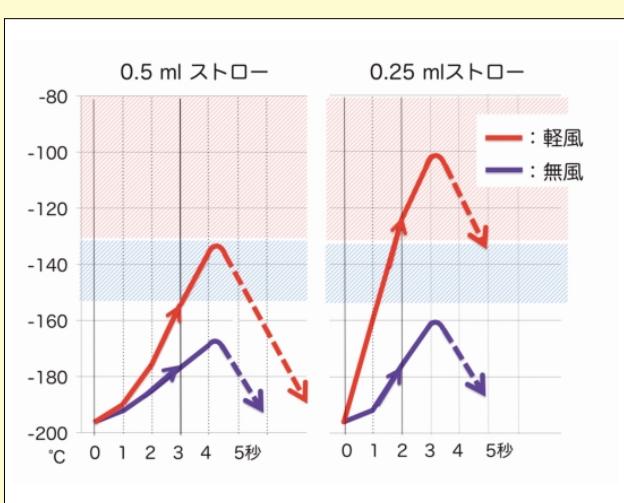


図4 凍結精液ストローを外気露出した時の精液温度の変化

0.5mlと0.25mlのストローに封入した凍結精液を無風あるいは軽風(風力2)の外気(30°C)に、それぞれ3秒と2秒間露出したのち、液体窒素中に戻した時の精液温度を測定した記録の模式図(高橋ら、2008;岡村、2012)。

### 3. 凍結精液ストロー取扱いのポイント

① 通常、凍結精液ストローは雄牛ごとにIDタグの付いたプラスチック・ケースあるいはゴブレットに収納されているので、そのまま液体窒素保存容器の中のキャニスターに入れて保管する。多数のストローを収納したケースを軽風の外気に5秒間露出しても、その中のストローの温度は、0.25mlストローで-160°C以下、0.5mlストローで180°C前後である。ただし、ケース内のストロー数が少ない場合、

ストロー上層部の温度は短時間で上昇する。したがって、ストローを収納したケース(ゴブレット)を別の保存容器に移す時は、2つの保存容器を側に付け、5秒以内に別の保存容器のキャニスター内に移して液体窒素中に戻す。

② 凍結精液ストローの確認・移替えは、液体窒素を満たしたステンレス製液体窒素容器、あるいは図5のように肉厚で横長の発砲スチローボックスを準備、その中の液体窒素にキャニスターから取出したケース(ゴブレット)全体を浸ける。ストローは外気に露出しないように、ピンセットを用いて液体窒素の中で新たなケースに移す。

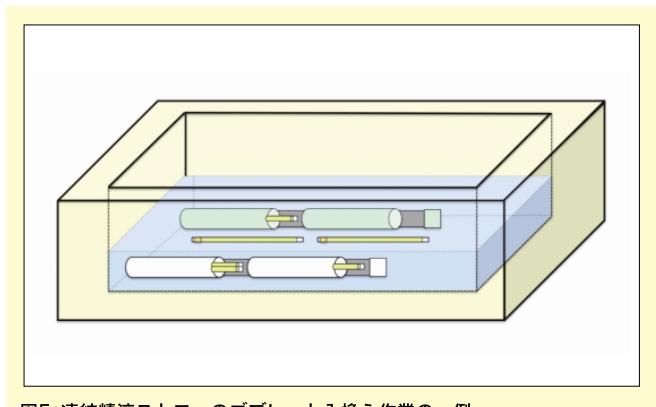


図5: 凍結精液ストローのゴブレット入換え作業の一例

③ 0.5mlストローを外気に露出する場合は、突然の窓・ドアの開閉等による風を考慮して、2~3秒以内に液体窒素中に戻す。ストローを指で摘んだり、雄牛名を確認するために擦ったりすると、精液の温度は数秒で-100°C以上になる。必ず、ピンセットや鉗子を用いて取り扱う。なお、0.25mlストローは前述のとおり温度感作を受け易いので、融解時以外、外気に暴露しない。

### 4. 液体窒素の取扱いにおける注意点

液体窒素は、凍傷を起こしたり、容器が破裂したり、酸欠を招くなどの危険性があるので、以下の点に注意ください(北海道大学「安全の手引き」より抜粋)。

- ① 液体窒素容器は、日光が直射しない風通しのよい場所に置き、部屋の換気をよくする。
  - ② 液体窒素が直接皮膚、目、手足などに触れないように、必ず保護服、保護面、保護メガネ、断熱性革手袋などを着用、軍手は使用しない。
  - ③ 液体窒素を密閉容器に入れない。必ず気化ガスの逃げ口を作る。
  - ④ 液体窒素が皮膚に付いたらすぐに水で洗い落とす。また、衣服に染み込んだときは直ちに衣服を脱ぐ。
  - ⑤ 凍傷がひどいときには専門医にみせる。
- 補足:**濡れた手で冷えた金属を触らない。ストローの破裂、綿栓の飛び出しもあるので、保護面・保護メガネを使用し、顔を容器・ストローに近づけない。