

# 連載

## 第5回

# 牛の人工授精:凍結精液の融解

たかはし よしゆき  
高橋 芳幸

ジェネティクス北海道 顧問  
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

凍結精子の生存性・受精能の傷害をできるだけ少なくして高い受胎率を得るためには、前回述べた凍結精液の取扱いとともに適切な融解とその後の取扱いが欠かせません。そこで今回は、アメリカの人工授精所の団体が推奨する凍結精液の融解法と融解した精液の取扱いについて私見を含み説明します。

### 1. 推奨されている凍結精液の融解・取扱い

特殊な融解・取扱いも可能とする凍結精液以外は、①0.5ml凍結精液ストローは35~37℃の温水に40~45秒以上、0.25mlストローは25~30秒以上浸漬して急速に融解、②融解精液はできるだけ速く発情牛の子宮内に注入・授精、③複数のストローを融解して授精する時は、寒冷あるいは加熱傷害を受けないように管理、④10~15分以内(選別処理精液では5分以内)の授精が推奨されている。

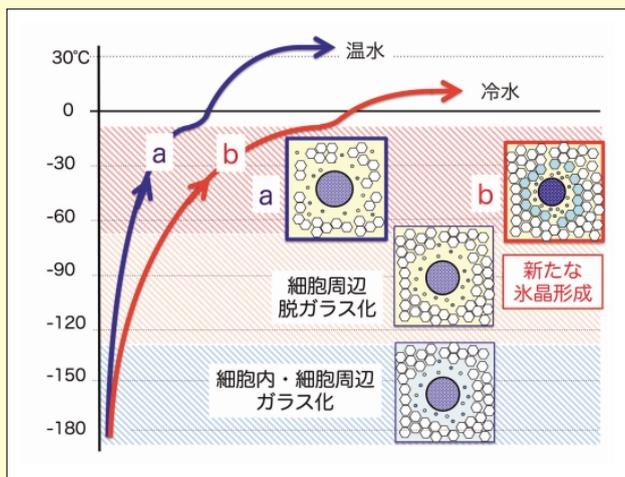


図1 凍結精液ストローを温水あるいは冷水に浸漬して融解した場合の精子周辺の氷晶の変化

(a) 温水(35℃前後)に浸けて急速融解すると精子周辺の保存液が脱ガラス化しても新たな氷晶は形成されない。(b) 冷水(0~10℃)に浸けてゆっくり融解すると脱ガラス化した保存液に新たな氷晶が形成され、精子は傷害を受ける。

#### 温水を用いた急速融解

通常の凍結精液は、連載第3回で述べたように細胞外液が-130℃以上に温められると、結晶構造のない固体(ガラス化)になっていた精子周辺の保存液が液体に変わる(脱

ガラス化)。凍結精液をゆっくり融解すると、脱ガラス化した精子周辺の保存液に新たな氷晶が形成され、溶質の濃度・浸透圧が高まり精子は傷害を受ける(図1)。また、-60~-80℃以上に温められると精子内も脱ガラス化して氷晶が形成される可能性もある。このような傷害を抑えるためには、凍結精液を急速に融解する必要がある。そこで、通常は35~37℃の温水に凍結精液ストローを浸漬して、急速に融解する。図2に示した例のように氷水(1~4℃)や水道水(10℃前後)のストローを浸けてゆっくり融解すると、傷害を受ける精子が増え、高い受胎率は望めない。

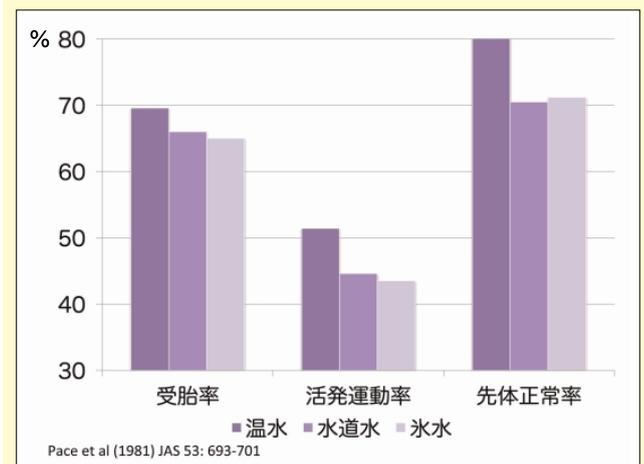


図2 融解温度と精子運動性・生存性および受胎率の関係

温水(35~37℃)に30秒以上、水道水(5~20℃)に1分以上あるいは氷水(1~4℃)に1分以上浸けて融解した凍結精液を15分以内に授精あるいは検査(Pace et al, 1981のデータを基に作成)

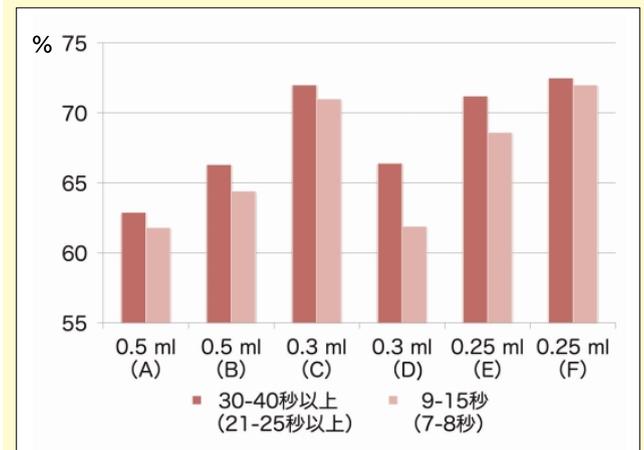


図3 凍結精液ストローの温水浸漬時間と受胎率の関係

0.5mlと0.3mlストローは温水(32~35℃)に30~40秒以上あるいは9~15秒間浸漬、0.25mlストローは21~25秒以上あるいは7~8秒間浸漬して融解・授精した6つの研究の成績(Gaillard & Kupferschmid, 1982を参考に作成)。

#### 温水融解におけるストロー浸漬時間

凍結精液ストローを35~37℃の温水に40~45秒以上浸けると精液の温度は35℃前後になる。ストローの浸漬時

間を10～15秒間に制限して精液の温度を4～5℃にとどめ、融解精子が寒冷傷害を受けにくくする融解法も検討された。しかし、35℃温水に12秒間浸けて融解した精液(約5℃)を30秒間5℃の冷水に保存した後、35℃の温水に浸けて温めると、精子は加温傷害を受ける(寒冷傷害と類似の傷害)。

温水に浸けて5℃まで温められた精子を子宮内に注入した場合の加温傷害の程度は明らかでないが、に示したように短時間温水に浸漬して融解した精液より、30～40秒以上温水に浸漬して融解した精液の受胎率が高かったという報告が多い。なお、0.5mlストローを15秒間温水(35～37℃)に漬けて融解すると精液の温度は20℃以上になり、融解後5～10℃に急冷されると精子は寒冷傷害を受ける。

## 2. 凍結精液融解の要点

### 凍結精液ストローの保管器からの取出し

凍結精液ストローは、に示した例のように、①キャニスターを保管器(液体窒素タンク)のフロストライン(霜の付着した部位)まで持ち上げ、革手袋をした指の間に挟んで固定、②融解する凍結精液が収納されているケインの種雄牛のID・略号を確認してピンセットで持ち上げ、指で保持、③ケインの中からストローを1本ずつピンセットで取り出し、融解器の温水に浸けて融解する。



図4 液体窒素タンクからの凍結精液ストローの取出し

キャニスターを持ち上げて指に挟んで保持(左)、ピンセットを用いてケインを持ち上げて指で把持、さらにケインの中からストローを取り出す(右)。

キャニスターを持ち上げてストローを取り出す時間は5秒以内、キャニスターを液体窒素タンク内に戻すまでの時間は10秒以内に止め、ケイン内の凍結精液の温度上昇を防ぐ。ストローの取出しに10秒以上かかりそうな場合は、一旦キャニスターを液体窒素中に戻し、20～30秒以上経過してから作業を再開する。1回の作業で融解できるストローの数は限られるが、5～10分以内に授精できる数のストローを融解することも重要である。

### 融解精液の速やかな授精と温度管理

融解から授精までの時間が長くなるとに示したように受胎率は低下する。したがって、北米の多くの人工授精所は融解後10～15分以内(選別精液は5分以内)の授精を勧めている。

体温程度(35～37℃)あるいは20℃以上に温められた

融解精子は、10℃以下に急冷されると凍結過程における20℃から5℃への冷却過程にみられる寒冷傷害と同じ傷害を受ける()。したがって、冬季だけでなく、外気が10℃前後になる時は、あらかじめペーパータオルや手掌で温めた注入器に融解精液をセットする。精液をセットした注入器を授精時まで滅菌袋に納めて胸元や保温装置に入れて精液の温度を20℃以上に保つ。また、気温が20℃以下の環境では、融解精液を授精直前まで融解器の温水に浸け、速やかに授精することも推奨されている。

さらに、外気温が高くなると注入器内にセットした精子が加熱傷害をうける可能性もあるので、夏季においても速やかな授精が望まれる。

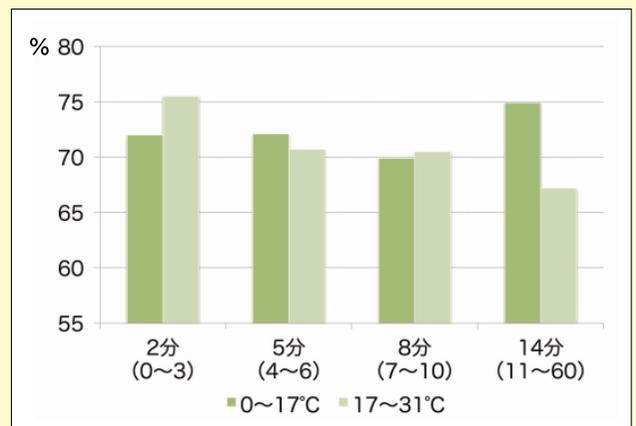


図5 融解精液の融解から授精までの時間と受胎率の関係

35℃の温水に1分間浸漬して融解した精液の授精までの時間を4群(0～3分、4～6分、7～10分、11～60分)に分け、外気温別(0～17℃、17～31℃)の受胎率(Shepard未発表データ: DeJarnette et al, 2002を基に作成)

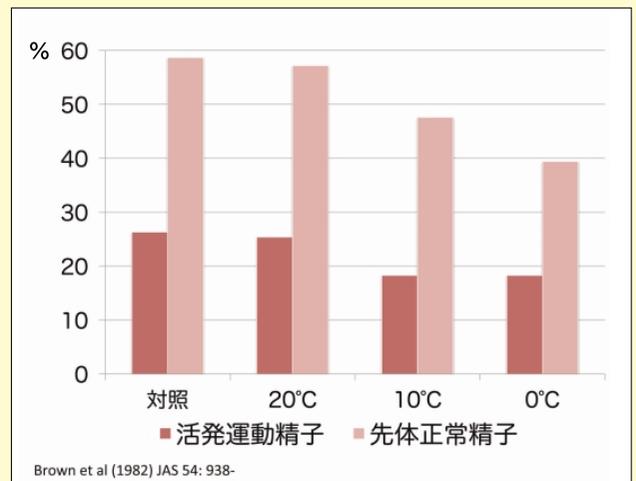


図6 融解精子の寒冷感作(低温暴露)による傷害

35℃の温水に1分間浸漬して融解した精液ストローを、35℃(対照)、20℃、10℃あるいは0℃の水に1分間浸けた後、38℃で4時間培養した場合の成績(Brown et al, 1982のデータを基に作成)

(補足)融解器の管理:融解器は、毎日洗浄して衛生的な水を補給し、35～37℃に保温設定する。また、正確な水銀温度計を用いて融解器に付属する簡易温度計の精度を定期的に確認することも大切です。