



連載

第6回

牛凍結精液の取扱い(補遺)

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

通常のラック(2段式の通称ケインあるいはゴブレット)に収納されている凍結精液の取扱いに関する説明がもれていますので補足します。

液体窒素タンク内の凍結精液

通常、凍結精液は種雄牛別に2段式のケインあるいはゴブレットの上段・下段に、それぞれ5~6本ずつ収納されていますので、タンク内の液体窒素量が減ると、図1のようにラック上段のストローは液体窒素(-196°C)に浸かっていない状態になります。また、液体窒素タンク内の温度は、タンクの機種、容量、液体窒素残量によって異なりますが、一般的には少しでも液体窒素がタンク内に残っていれば、内槽の最上部は-180°C以下になっています。

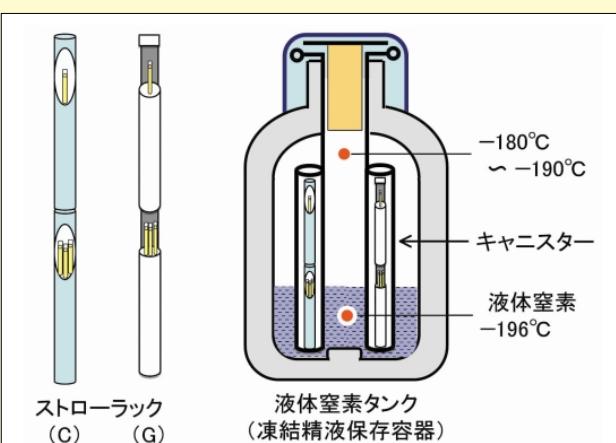


図1 凍結精液ストロー収納ラックと液体窒素タンク
ストローラック:(C)通称ケイン、(G)ゴブレット
タンク内温度:液体窒素残量が1/3~1/4の場合

ラック上段と下段の凍結精液

タンク内の液体窒素が少ないと、キャニスターやラックの操作(ストロー取り出し、ラック移動)によって、ラック上段の凍結精液は下段の精液より温度が上昇し、精子は傷害を受ける可能性が考えられます。しかし、通常管理のタンクと適切なキャニスター操作があれば、ラック上段と下段の凍結精液の性状に差異はないようです。

その根拠となる1つの調査を図2にまとめました。この調査では、多数の酪農家が自家授精用凍結精液のラックと調査用

凍結精液のラックと一緒に収納したキャニスターをタンクに入れ、日常の人工授精に2年間使用しています。6ヶ月毎に調査用ラックから精液を取り出して検査した結果、どの時点でも、精子性状(運動精子率、先体正常精子率)はゴブレットの上下で差がありません。また、常に液体窒素を満たしたタンクに保管した凍結精液(大学研究室の対照群)の性状とも差がみられません。

なお、この調査では60個のタンクのうち3個が故障、定期的なタンクの点検、液体窒素残量の測定が強調されています。

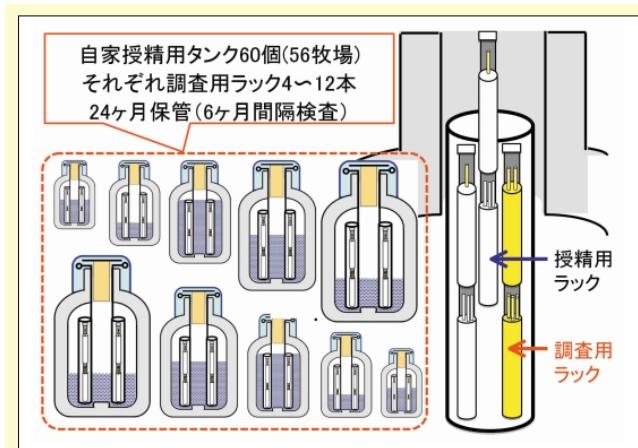


図2 液体窒素タンク内に長期保管した凍結精液の調査

自家授精用凍結精液のラックを収納したキャニスターに調査用ラック(各ラックの上下のゴブレットに0.5 mlストローを5本ずつ収納)を入れ2年間保管、6ヶ月毎に一部を融解して精液性状を検査(Senger et al, 1980)。

液体窒素の補充填

液体窒素は自然蒸発、キャニスターの操作、容器の移動などにより消耗しますので、専用のメジャーで定期的に(少なくとも1週間に1回)液体窒素の残量を測定して補充填が必要になります。一般的には、全容量の1/3~1/4に減った時(または残量が1週間分に減った時)に補充填するのが望ましいとされていますが、再充填期間を「取扱い説明書」で確認するとともに、日常のタンク開閉、キャニスター操作などによる液体窒素消耗量を記録・把握してください。

また、真空断熱効果の低下を示すタンク外面の露や霜の付着、ネットチューブの傷、氷の蓄積なども定期的に調べてください。

なお、液体窒素の充填・取扱いは、風通しの良い所で、顔面シールド(防眼ゴーグル)、緩めの断熱手袋(厚い革手袋)の着用も忘れないでください。

ケインの外気露出による精液温度の変化

タンク内に適度の液体窒素があり、キャニスター操作が適切であれば、ラック上段に収納されている精液でも悪影響を受けないようですが、キャニスターやラックの操作を



誤ると精液に悪影響を与える可能性があります。

そこで、液体窒素残量を約1/3(11~13 cm)にしたタンクを用いて、ケイン全体をタンクの外に出した時(ケインの移動を想定)の上段と下段の凍結精液の温度変化の違いを調べました。

図3のように、下段の精液温度はケインを5秒間外気に反復露出しても−180°C以上には上昇せず、キャニスターに納めてタンク内に戻せば短時間で液体窒素温度になりました。

いっぽう、ケイン上段の凍結精液は2回目の外気露出により、精子が傷害を受ける可能性のある−150°C以上になりましたが、外気露出時間を3秒にすると温度上昇が軽減されました。したがって、ケインの移動(保管タンクの入換え)はできるだけ速やか(3秒以内)に行い、液体窒素量の少ないタンク同士のケイン移動や反復移動は避けてください。

(注意) 風の当る所でのケインの外気露出は謹んでください
(はんしょくノート:連載第4回を参照)。

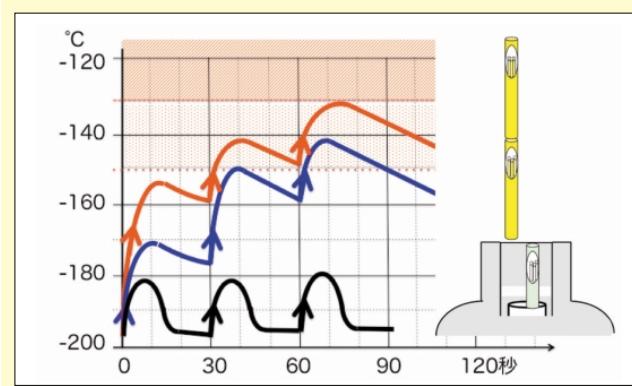


図3 ケインの外気露出に伴う凍結精液の温度変化

ケイン全体を5秒間外気露出したのちキャニスターに戻し、キャニスターもタンク内に下ろす操作を30秒間隔で3回反復した時のケイン上段(赤線)と下段(黒線)の精液温度。青線は3秒間外気露出時のケイン上段の精液温度。液体窒素残量が約1/3のタンク(容量11リットル)を使用。

ストロー取り出し操作に伴う凍結精液の温度変化

精液融解時のストロー取り出し操作を反復して、ケイン上段の凍結精液の温度も調べました。図4のように、一般的な操作(キャニスターをフロストライン付近に10秒間固定、この間にケインをタンク開口部まで持上げて精液を取り出し、5秒後にキャニスターに戻す操作。キャニスターを約30秒タンク内に保持してから操作を繰返す:図5参照)を3回反復すると、ケイン上段の凍結精液の温度は−150°C以上になりました。

また、操作時間が長くなる(フロストライン付近でのキャニスター固定15秒、タンク開口部でのケイン保持10秒)と、2回目の操作でも−140°C、3回目には−130°C以上に上昇しました。したがって、できるだけ速やかな取り出し操作と反復操作の制限(2回まで)が望されます。

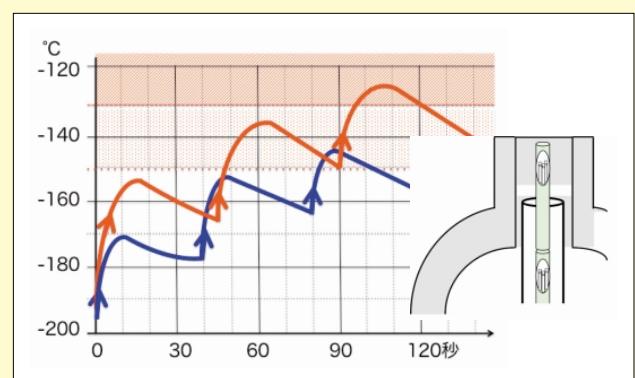


図4 ストロー取り出し操作に伴うケイン上段の凍結精液の温度変化

精液融解時の操作と同様に、キャニスターをフロストラインまで持上げて固定、ケインを液体窒素タンクの開口部直下まで引上げて5秒(青)あるいは10秒(赤)保持したのち、キャニスター内に戻した。キャニスターは、フロストラインまで持上げてから10秒あるいは15秒後にタンク内へ戻して30秒保持後、再び同様の操作を行った。液体窒素残量が約1/3のタンク(容量11リットル)を使用。

速やかなキャニスター・ケイン操作

通常、凍結精液の温度が−130°C以上に上昇すると精子が傷害を受けるといわれています。しかし、より低い温度でも傷害を受ける可能性もありますので、精液温度が−150°C以上に上昇しない速やかなケイン操作が望れます。

授精現場では、タンクに液体窒素を常に満たしておくことはできませんので、定期的に液体窒素を補充填するのが現状だと思います。そのような状況では、ケイン上段に収納した精液は下段の精液に比べるとリスクはありますが、速やかなキャニスター・ケイン操作を行えば、リスクを低減・回避できると考えます。

また、ケイン下段の精液でもタンクの液体窒素残量が少なければ、常にストロー全体が液体窒素に浸かった状態ではなくなり、上段の凍結精液に類似した温度環境になります。

今回述べた精液の温度変化などを参考に、速やかな操作・作業を行い、2段式のラック(ケインあるいはゴブレット)を有効に活用してください。



図5 ケイン収納凍結精液の取り出し操作

①キャニスターを液体窒素タンクのフロストライン(霜の付着した部位:左図)付近まで持ち上げ、革手袋をした指の間に挟んで固定(中央図)、②ケインをピンセットでタンク開口部まで持ち上げて指で保持、③ケインの中からストローを1本ずつピンセットで取出す(右図)。④ケインをキャニスターに戻し、⑤キャニスターもタンク内に下ろす。

①～⑤のキャニスター固定は10秒以内にとどめ、②～④のケイン操作は5秒以内に行い、ストローの取り出しに時間がかかりそうな場合は、一旦キャニスターをタンク内に戻し、30秒以上経過してから再度作業を行う。