

豚人工授精技術の現状と関連新技術

河原崎 達 雄

(静岡県中小家畜試験場：〒439-0037 静岡県小笠郡菊川町西方2780)

Kawarasaki, T. (1999). Artificial insemination in pigs: present situation and new technologies. *Proc. Jpn. Pig Vet. Soc.* 35: 1-5

豚人工授精技術は、精液の保存および利用技術の改良により受胎率、産子数の向上、オーエスキー病をはじめとする慢性疾病に対する防疫意識の向上、輸送手段の発達により豚精液の流通などから、その有効性が再認識されている。豚精液は低温に対する耐性が弱く、そのため、野外では15~20℃前後の中温保存が利用されており、保存期間は7日間程度である。凍結保存は受胎率及び産子数が低下するが、優良遺伝子の長期保存や広範囲利用等に利用されている。一方、低温に対する新しい保護物質の開発やX、Y精子の判別や分離による産み分けなどの研究も進められている。今回は、豚精液の液状保存技術や関連する新技術について静岡県中小家畜試験場での試験成績を中心に紹介する。

1 精液内細菌と精液の保存性

精液内に混入した細菌の増殖は精液の保存性を著しく低下させる。したがって、精液の採取、検査、希釈などの操作時に、細菌の混入を極力防ぐとともに、精液内に混入する細菌に対して効力のある抗生物質を添加することが必要である。Sone et al.⁶⁾は精液内細菌の中で特に、腸内細菌が保存性に悪影響を与え、従来から使用してきた抗生物質は耐性菌が多く、精液内細菌に効力の高い抗生物質の添加が豚精液の保存性を著しく高めることを指摘している。我々も、精液内細菌に

効果の高いDibekasin、Amikacinを添加し、15℃での長期保存試験を実施したところ、保存10日目においても63.2%の受胎率を得た(1983)⁹⁾。また、長期保存時の受胎例と非受胎例を比較すると、精子活力には差がないものの頭帽正常率に差を認めた。このことから、精液性状を判定する場合には精子活力と同時に精子の頭帽正常性の検査も必要と思われる。

2 現在利用されている希釈液の性能

精液用保存液は精液量を増加させること、保存性を高めることの2つの作用を有しており、精液とはほぼ同じ浸透圧、pHを持つようにブドウ糖、緩衝剤などにより調整されている。豚精液の液状保存のための保存液のなかで、モデナ液は保存性が最も優れているものの1つであることが確認されている⁷⁾。また、モデナ液は組成が比較的単純であり、安価なため非常に利用しやすい保存液であり、我々も日常の人工授精業務にモデナ液を利用している。現在国内で市販されている豚精液保存用希釈液は非常に少ないが、モデナ系と思われる2種類の市販希釈液と自家調整したモデナ液を用いて保存試験を実施した。その結果、いずれの希釈液とも精子生存指数は保存7日後で80%、保存14日目で70%前後と高い値を示した(図1)。また、頭帽正常率は14日目で90%以上を示し(図1)、いずれの希釈液も

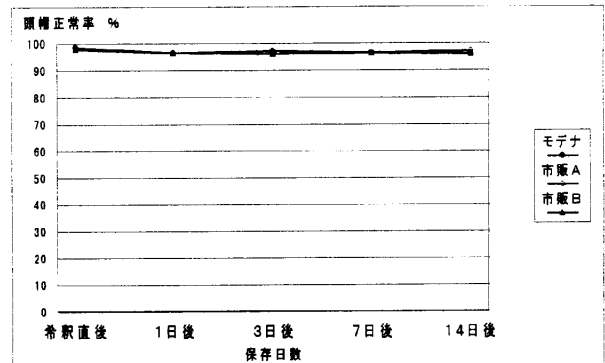
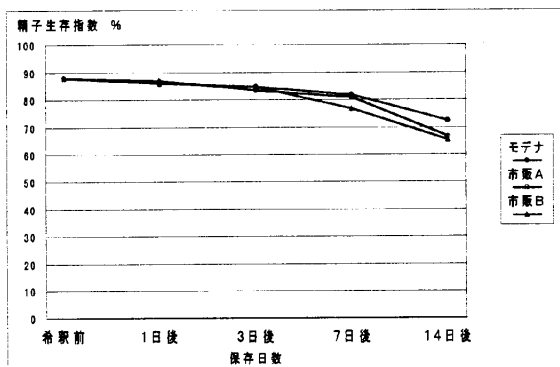


図1 現在利用されている豚液状希釈液の比較

豚精液をモデナ、市販されている2希釈液(市販A、市販B)で15℃保存し、精液性状を比較。Dibekacin 100 μg/ml 添加、例数は5。

優れた保存性を有することが確認された。

3 発泡スチロール容器内保管の低温に対する緩衝効果

豚精液は低温に対する抵抗性が弱く、液状保存においてもできるだけ緩慢な冷却が望ましいとされている。亀井ら³⁾は発泡スチロール容器の利用を含めた総合的な指導により農家の人工授精成績を改善したことを報告している。そこで、気密性の高い発泡スチロール製の容器を利用した温度コントロール効果について検討した。希釈した精液を各検体2本(各50ml)作成し、5℃あるいは15℃の冷蔵庫に、1本は精液の発泡スチロール容器内に入れ、もう1本は発泡スチロール容器に入れず、直接保存した。その結果、発泡スチロール容器内での保管は5℃、15℃ともに精液温度の下降速

度を緩徐にする効果が確認された(図2)。また、保存時の精液性状をみると、5℃保存では精子活力、頭帽正常率とも発泡スチロール容器内保管による改善効果が認められた(図3)。15℃保存では5℃ほどではないが、14日目の精子活力で発泡スチロール容器での保管による効果が認められた(図3)。

4 宅配便による輸送時の温度変化と精液性状

豚精液の流通は比較的遅れていたが、宅急便等の輸送手段の発達や保存技術の改良にとともに、最近になり十数社で豚精液の販売を手掛けるようになった。宅配便での輸送では輸送時に精液の保存には適さない高温やあるいは低温にさらされる可能性がある。そこで小型電子温度測定器を用いて輸送時の温度変化と精液の活力を調査した。試験は冬期の2月と夏期の8月、

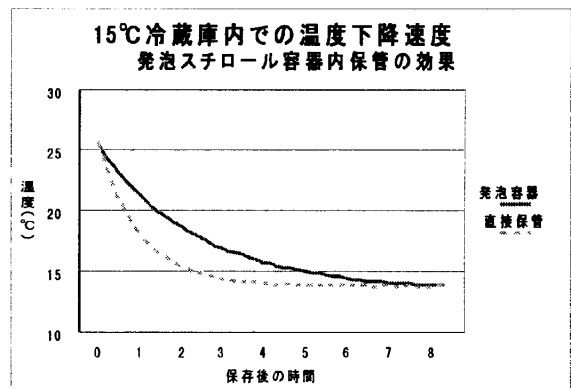
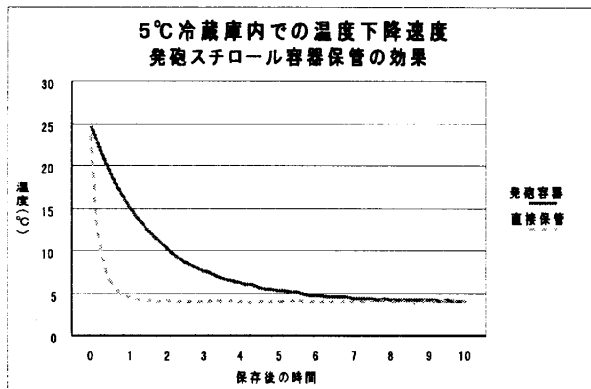


図2 発泡スチロール容器内での保管が保存精液の温度下降速度に及ぼす影響
モデナで希釈した豚精液50mlを発泡スチロール容器に入れ(発泡容器)、あるいは直接(直接保管)冷蔵庫で5℃あるいは15℃保存。精液内温度は小型電子温度計で測定。

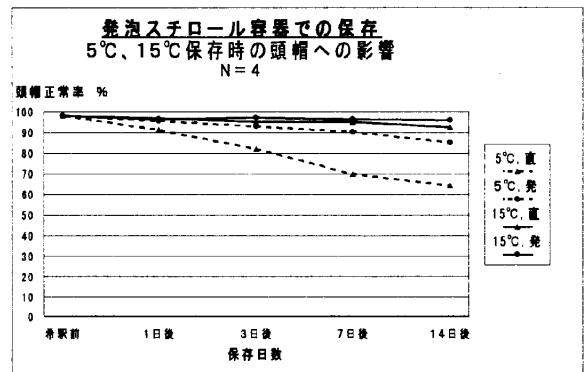
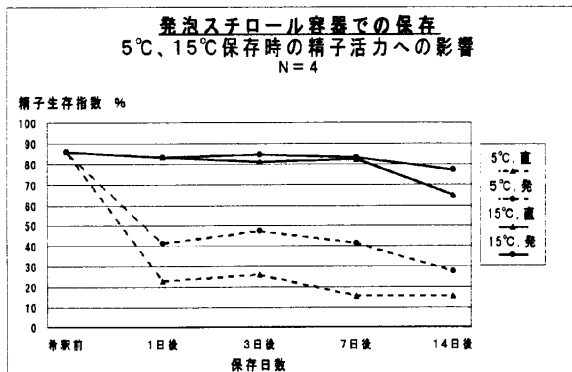


図3 発泡スチロール容器内での保管が保存精液の性状に及ぼす影響
モデナで希釈した豚精液50mlを発泡スチロール容器に入れ、あるいは直接、冷蔵庫で5℃あるいは15℃保存。例数は4。
5℃、直：直接5℃冷蔵庫に入れて保存。
5℃、発：発泡スチロール容器に入れ、5℃冷蔵庫に保存。
15℃、直：直接15℃冷蔵庫に入れて保存。
15℃、発：発泡スチロール容器に入れ、15℃冷蔵庫に保存。

容器は精液販売会社が利用している発泡スチロール2重包装を用いた。また、精液濃度は 0.5×10^8 、 1.0×10^8 の2種類を作り、その影響についても検討した。なお、本試験は豚新技術開発研究会のAI分科会の協定試験として実施した。精液は静岡県中小家畜試験場（静岡県小笠郡）で調整し、神奈川県畜産研究所（神奈川県海老名市）に宅配便により輸送した。輸送後の精液性状の検査は神奈川県畜産研究所の中沢慶紀氏により行われた。

外気温は、2月では最低7.6℃～最高25.3℃、高低差が17.7℃、8月では最低23.7℃～最高32.7℃、高低差が9.0℃あり、上昇あるいは下降速度は非常に急激であった（図4）。一方、庫内温度は、2月では最低14.5℃～最高21.2℃であり、精液保存適温帯である15～20℃を緩やかに推移した。8月では最低19.4℃～最高

21.0℃であり、輸送期間中ほぼ20℃前後で推移した（図4）。

精液性状では、2月および8月とも7日間保存後の精子生存指数はどの検体も80%前後と高く、保存性に輸送の悪影響は認められなかった。一方、精液濃度の違いでは、保存7日目頃まではほとんど差を認めなかったが、それ以降では 1.0×10^8 では徐々に低下したのに対し、 0.5×10^8 の検体では14日目でも80%前後の良好な精子生存指数を示した（図5）。

以上の結果から、今回の輸送方法は豚精液の輸送方法として十分に有効であることが確認された。一方、これまで、希釈精液の濃度は 1.0×10^8 が適正とされてきたが、長期保存ではより低い濃度の方が適していることが示唆された。今後、例数を増加して、適正な希釈濃度について検討することが必要と思われる。

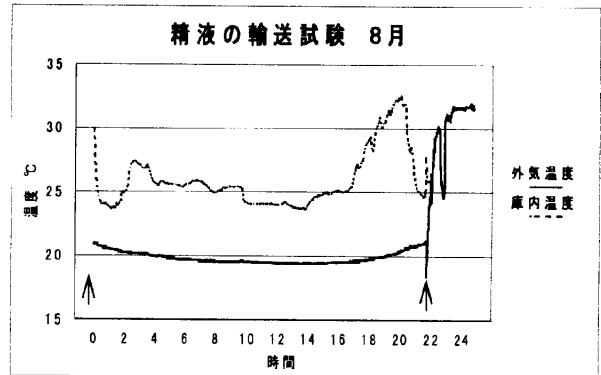
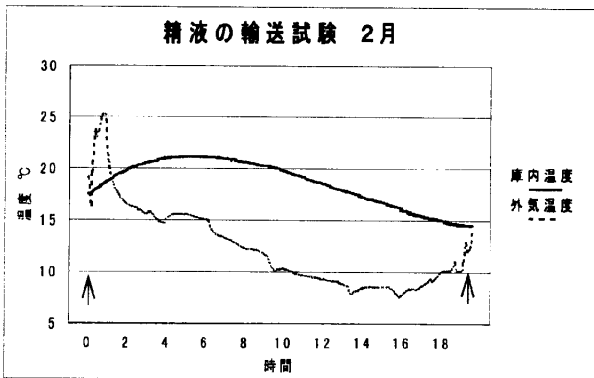


図4 宅配便による精液輸送時の温度変化

発泡スチロール2重包装容器に入れ、静岡県中小家畜試験場（静岡県小笠郡）から神奈川県畜産研究所（神奈川県海老名市）に送付。小型電子温度計により容器の外側（外気温度）、および容器内温度（庫内温度）を測定。矢印（↑）は輸送開始及び終了時点を示す。

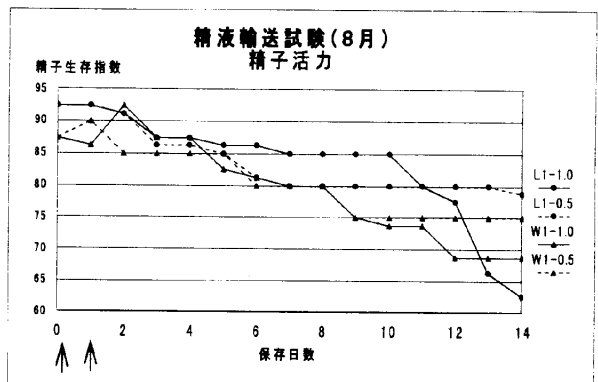
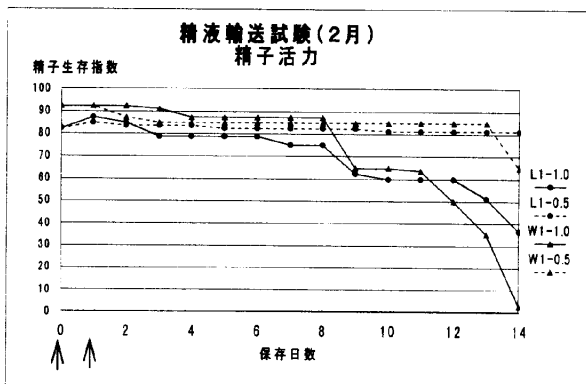


図5 宅配便による輸送精液の活力

発泡スチロール2重包装容器に入れ、静岡県中小家畜試験場（静岡県小笠郡）から神奈川県畜産研究所（神奈川県海老名市）に送付。矢印（↑）は輸送開始及び終了時点を示す。精子濃度： 0.5×10^8 (L1-0.5, W1-0.5), 1.0×10^8 (L1-1.0, W1-1.0)。

5 X、Y精子の分離による産み分け技術

(1) X、Y精子の判別

雌雄を産み分ける技術の研究開発を行うためには実験室内での雌雄の判別やX、Y精子の判別技術を確立させることがまず重要である。ヒトではキナクリンマスタード染色によりY染色体を検出することができ、精子では核内の蛍光小体 (F-body) を検出することによりY精子の判定が可能であり、ヒトではこの方法を利用してX、Y精子分離技術の研究が進められてきた。しかし、このF-body検出方法は、家畜においては利用できないことが確認されている。キナクリンマスタード染色を改良し、家畜精子からのF-body検出の試みもあるが確実なY精子判定法とはなっていない。このため家畜のX、Y精子の判別は、体外受精による染色体解析や産子で確認することにより行われており、膨大な労力、時間および経費が必要とされていた。最近、遺伝子の解析技術が進歩し、DNA解析技術を応用したX、Y精子判別の試みが報告されるようになった。我々はDNA解析技術の1つであるin situハイブリダイゼーション法 (同じ配列のDNA同士が結合する反応を利用し組織の中のDNA配列を検出する方法) を応用することにより、豚X、Y精子の判別を可能とした³⁾。

(2) フローサイトメトリーによる豚X、Y精子の分離

米国農務省農業研究所のJohnson博士らのグループは、フローサイトメトリー法により家畜精子のX、Y精子の分離およびその精子を利用しての雌雄産み分けに成功している⁴⁾。哺乳動物の精子にはX精子とY精子があり、それぞれX染色体とY染色体を持っており、X精子が受精すると雌、Y精子が受精すると雄が生まれる。X染色体はY染色体よりも大きく、X精子のDNA量はY精子に比較して僅かに多く、豚の精子ではその差は3.6%である。フローサイトメトリー法はこのX精子とY精子の僅かなDNA量の違いを利用してX、Y精子を分離する方法である。精子を軽く蛍光染色し、精子にレーザー光線を照射して、精子のDNA量を測定し、精子を緩衝液の少ドロップに封入、X精子のドロップをプラス、Y精子のドロップをマイナスに電荷し、XとY精子を別々の容器に採取するというものである。

我々は、Johnsonらと共同研究を行い、フローサイトメトリーで分離した豚X、Y精子を我々の開発した豚X、Y精子判別法により、フローサイトメトリーの分

離制度を評価した⁴⁾。USDAの研究所で繋留されている雄豚4頭から精液を採取し、X、Y精子の分離試験をおこない、in situハイブリダイゼーション法により、それぞれの分離精液にたいして約500個の精子を検査したところ、X精子の分離率は87.4%、Y精子の分離率は85.9%と非常に高かった (写真1、2、表1)。

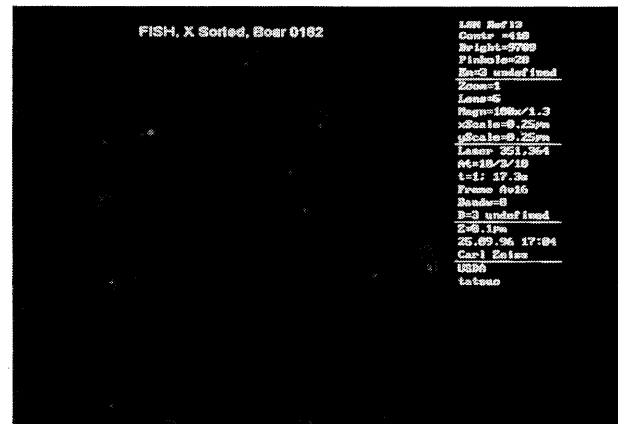


写真1. フローサイトメトリーにより分離されたX精子分画の共焦点顕微鏡像。Yおよび1番染色体特異的DNAプローブを用いた迅速FISH法によりX、Y精子の分離精度を検査したところ、一部の精子ではY染色体特異的FITCシグナル (黄緑色) が検出され、Y精子と判定されたが、大多数の精子では1番染色体特異的テキサスレッドシグナル (赤色) のみが検出され、X精子と判定された。

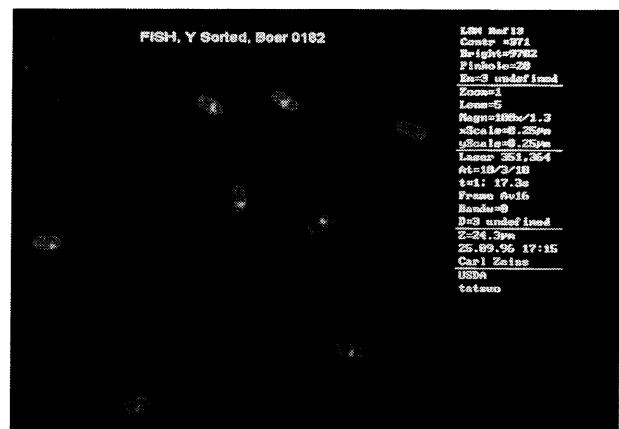


写真2. フローサイトメトリーにより分離されたY精子分画の共焦点顕微鏡像。Yおよび1番染色体特異的DNAプローブを用いた迅速FISH法によりX、Y精子の分離精度を検査したところ、一部の精子では1番染色体特異的テキサスレッドシグナル (赤色) のみが検出され、X精子と判定されたが、大多数の精子ではY染色体特異的FITCシグナル (黄緑色) と1番染色体特異的テキサスレッドシグナル (赤色) の両方が検出され、Y精子と判定された。

表1. In situ ハイブリダイゼーション法およびフローサイトメトリー再解析法によるフローサイトメトリーの豚X、Y精子分離精度の評価

Boar ejaculates	Sperm population before sorting (control)				Sperm population sorted for X chromosome				Sperm population sorted for Y chromosome				
	FISH analysis				FISH analysis				Flow cytometric reanalysis	FISH analysis			Flow cytometric reanalysis
	No. of spermatozoa		Un-detected Y-signal and		No. of spermatozoa		Un-detected Y-signal and			No. of spermatozoa		Un-detected Y-signal and	
	No. of	Detected Y and 1-signal	Detected 1-signal	% of Y-bearing spermatozoa	Detected Y and 1-signal	Detected 1-signal	% of X-bearing spermatozoa	Detected Y and 1-signal	Detected 1-signal	% of Y-bearing spermatozoa			
A	2	560	481	53.8	123	953	88.6	85.0	902	178	83.5	85.5	
B	2	586	509	53.5	132	939	87.7	87.0	919	144	86.5	85.5	
C	2	567	480	54.2	183	1,021	86.2	90.0	922	155	85.6	87.5	
D	2	536	517	50.9	139	954	87.3	86.0	915	121	88.3	80.5	
Total mean	8	2,249	1,987	53.1	557	3,867	87.4	87.0	3,658	598	85.9	84.8	

このX、Y精子の分離率は畜産において用いるのには十分な精度であり、種豚農場でこの効率で希望する性の子豚を生産することができれば、生産効率は倍増すると思われる。しかし、問題点は分離速度にあり、今回の装置での分離精子数は1時間あたり約300,000個であった。豚の人工授精において1回の交配に必要なとされる精子数は30~50億個であり、これまでどおりのテクニックでは野外での応用は困難と思われる。野外応用を可能とするためには分離速度をより早めるように機械を改良することが必要である。また、顕微授精などで少ない精子で受精できる方法を検討することも必要と思われる。

おわりに

豚の人工授精技術は希釈液の改良、利用技術の改良、宅配便等の輸送システムの整備による精液の流通などから、現在大変利用しやすいものとなってきている。しかし、豚精液は依然として低温に対する抵抗性が弱いなど克服されていない性質も有している。豚人工授精を成功させるためには、これらの豚精液の特性を十分に理解した上で、上手に活用していくことが重要と思われる。

参考文献

- 1) Johnson LA, Flook JP, Hawk HW (1989). Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. *Biol Reprod*, 41:199-203.
- 2) 亀井勝浩、牧野敬、田中嘉州、柏木聡、穴倉日和子、小山田洋志 (1998)。豚の人工授精指導における取り組みと成果。豚の繁殖衛生セミナー通信 24: 7-10.
- 3) Kawarasaki T, Sone M, Yoshida M, Bamba K (1996). Rapid and simultaneous detection of chromosome Y- and 1-bearing porcine spermatozoa by fluorescence in situ hybridization. *Mol Reprod Dev*, 43: 548-553.
- 4) Kawarasaki T, Welch GR, Long CR, Yoshida M, Johnson LA (1998). Verification of flow cytometrically-sorted X- and Y-bearing porcine spermatozoa and reanalysis of spermatozoa for DNA content using the fluorescence in situ hybridization (FISH) technique. *Theriogenology*, 50: 625-635.
- 5) 河原崎達雄、曾根勝、野口博道、小杉弥一 (1983)。豚精液の15℃保存と受胎試験。静岡県養豚試験場報告 31: 17-22.
- 6) Sone M, Ohmura K, Bamba K, (1982). Effect of various antibiotics on the control of bacteria in boar semen. *Vet. Rec.*, 111: 11-14.
- 7) 曾根勝、知久幹夫、吉田光敏、番場公雄、小笠晃 (1992)。各種保存液を用いた豚液状精液の長期保存試験。日豚会誌 29: 41-49.