

通し番号	5106
------	------

分類番号	R03-67-21-09
------	--------------

豚液状精液の低温保存には、モデナ液へのケンフェロールの添加および16時間かけて緩徐に冷却する冷却プログラムが有効

[要約] 豚液状精液の低温保存技術を検討するため、冷却プログラムおよび細胞保護物質を添加した新規保存液を検討した。液状精液を38℃から4℃に下げるときの冷却プログラムは、精子生存指数の低下を緩和し、精子生存率に影響を及ぼさない16時間が適しており、保存液に添加する細胞保護物質は精子生存指数の低下を緩和するケンフェロールの有効性が示唆された。以上の結果から、ケンフェロールを添加したモデナ液により液状精液を調整し、16時間かけて38℃から4℃まで緩徐に冷却した液状精液は、モデナ液で調整して15℃保存する慣行法の液状精液と比較して、精子生存指数と精子生存率、体外受精率は同等であった。

畜産技術センター・企画指導部・企画研究課

連絡先 046-238-4056

[背景・ねらい]

豚液状精液の低温保存技術を開発するため、細胞保護物質を添加したモデナ液で調整した液状精液を緩徐に冷却する技術の有効性について調査する。

[成果の内容・特徴]

- 1 冷却プログラムの検討は、15℃保存する精液を対照区とした。38℃から4℃への冷却時間を2時間（2h区）、9時間（9h区）、16時間（16h区）に設定し、各保存温度における保存9日目までの精子生存指数および精子生存率を比較したところ、16h区は対照区と同等であった（表1）。
- 2 細胞保護物質を用いた新規保存液の検討は、モデナ液で4℃保存したものを対照区とした。細胞保護物質と添加量により、8つの試験区を設定し、9時間かけて4℃に保存し、1日経過後の精子生存指数を比較したところ、モデナ液にDMSO1%およびケンフェロール50μg/mLを添加したDK50区は対照区に比較して高い値を示したが、有意な差はなかった（表2）。
- 3 DK50区と同様に調整した液状精液を16時間かけて緩徐に冷却する技術（DK16h区）の有効性の検証では、モデナ液で調整し15℃保存する液状精液を対照区とした。精子生存指数および精子生存率は保存5日目まで対照区と変わらず、精子の直進性はDK16h区が有意に高かった。また、3日間保存したDK16h区の体外受精後の受精率は対照区と同等であった（表3）。
- 4 以上のことから、ケンフェロールを添加したモデナ液で精液を調整し、16時間かけて緩徐に冷却する技術は、豚液状精液の低温保存に有効であることが示唆される。

[成果の活用面・留意点]

- 1 供試精液は全てランドレース種雄豚から採取された。
- 2 供試卵子は、と場採材した卵巣から採取した。

[具体的データ]

表1 冷却プログラムが精子生存指数及び精子生存率に及ぼす影響

項目	試験区分	調整直後	保存日数				
			1日目	3日目	5日目	7日目	9日目
精子生存指数	対照区	78.5	62.3 ^a	59.2 ^a	55.6 ^a	16.8 ^a	11.7 ^a
	2 h 区	73.0	9.5 ^b	2.1 ^c	1.9 ^c	1.0 ^b	1.4 ^c
	9 h 区	78.5	19.6 ^b	18.9 ^{bc}	16.6 ^{bc}	5.4 ^{ab}	5.2 ^{bc}
	16 h 区	75.9	44.2 ^a	35.1 ^b	33.1 ^{ab}	13.6 ^{ab}	10.9 ^{ab}
精子生存率 (%)	対照区	83.7	88.0 ^a	83.5 ^a	82.4 ^a	67.6 ^a	76.0 ^a
	2 h 区	80.1	43.4 ^b	47.2 ^b	36.2 ^b	38.8 ^b	34.1 ^b
	9 h 区	83.7	78.0 ^a	75.4 ^a	85.0 ^a	63.4 ^a	75.7 ^a
	16 h 区	82.7	84.0 ^a	82.1 ^a	78.1 ^a	73.9 ^a	73.2 ^a

*対照区：15°C保存 *2 h～16 h区：4°C保存 *平均値 *4 ≤ n ≤ 20 *項目内同列異符号間に有意差(Tukey法、p<0.05)

表2 細胞保護物質が精子生存指数に及ぼす影響

試験区分	保存液の内容	精子生存指数
対照区	モデナ液	16.6 ^{abc}
T50%区	モデナ液中のグルコース半量をトレハロースに代替	17.5 ^{abc}
T100%区	モデナ液中のグルコース全量をトレハロースに代替	9.9 ^{bc}
A10区	モデナ液+不凍タンパク質10μg/mL量	15.5 ^{abc}
A100区	モデナ液+不凍タンパク質100μg/mL量	19.9 ^{abc}
D区	モデナ液+DMSO 1%量	16.3 ^{abc}
DQ10区	モデナ液+DMSO 1%量+ケルセチン10μg/mL量	22.1 ^{ab}
DQ50区	モデナ液+DMSO 1%量+ケルセチン50μg/mL量	6.0 ^c
DK50区	モデナ液+DMSO 1%量+ケンフェロール50μg/mL量	28.1 ^a

*平均値 *8 ≤ n ≤ 25 *DMSO：ケルセチン、ケンフェロールの溶解に利用 *異符号間に有意差(Tukey法、p<0.05)

表3 ケンフェロールと冷却プログラムの組合せが精子に及ぼす影響

項目	試験区分	保存日数		
		1日目	3日目	5日目
精子生存指数	対照区	68.0 ^a	53.9 ^a	36.0 ^a
	2 h 区	6.3 ^b	2.9 ^c	2.2 ^b
	16 h 区	51.5 ^a	36.9 ^b	26.9 ^a
	DK16 h 区	59.8 ^a	41.5 ^{ab}	29.2 ^a
精子生存率 (%)	対照区	90.8 ^a	85.2 ^a	81.9 ^a
	2 h 区	46.6 ^b	45.1 ^b	34.5 ^b
	16 h 区	88.7 ^a	90.7 ^a	83.6 ^a
	DK16 h 区	85.0 ^a	89.3 ^a	85.3 ^a
精子直進性 (%)	対照区	28.4 ^b	28.0 ^b	30.1 ^b
	2 h 区	30.8 ^b	33.1 ^{ab}	30.4 ^b
	16 h 区	34.1 ^b	38.1 ^{ab}	33.9 ^b
	DK16 h 区	49.4 ^a	43.2 ^a	46.3 ^a
体外受精後の受精率 (%)	対照区	-	42.9	-
	16 h 区	-	37.0	-
	DK16 h 区	-	50.0	-

*平均値 *n = 6 *精子直進性は精子運動性解析装置で測定 *項目内同列異符号間に有意差(Tukey法、p<0.05)

[資料名]

令和3年度試験研究成績書

[研究課題名]

(4) 豚液状精液の低温保存技術の検討

[研究内容名] ア

豚液状精液の低温保存に適した新規保存液及び冷却プログラムの検討

[研究期間]

令和3～4年度

[研究者担当名]

中原祐輔、白石葉子