

# 豚の排卵同期化・定時 1 回人工授精における凍結融解精子の活力および人工授精実施時間の違いが繁殖成績に及ぼす影響

山口昇一郎\*・村上徹哉

豚凍結精液を用いて、性腺刺激ホルモン投与後の一定時間後に人工授精(AI)を実施する排卵同期化・定時 1 回 AI 法の検討を行った。試験 1 では、凍結精液融解後の精子活力の違いが、試験 2 では、性腺刺激ホルモン投与後の AI 実施時間の違いが、繁殖成績に及ぼす影響を検討した。

試験 1：性腺刺激ホルモンを用いた排卵同期化プログラムに沿って、hCG 投与後 40 時間目に 1 回 AI(注入精子数 25 億)を福岡県農業総合試験場および生産農場で実施した。高活力精液(活力 73%)および中活力精液(48%)で、それぞれ、受胎率は 91.7%および 21.4%、分娩率は 66.7%および 21.4%、産子数は 8.4 および 5.7 頭であった。そのうち、生産農場では、高活力精液のみで実施し、受胎率は 87.5%、分娩率は 50.0%、産子数は 9.0 頭であった。

試験 2：排卵同期化プログラムにおける hCG 投与後、AI 時間が 40 時間目と 42 時間目との比較を行った。40 時間区および 42 時間区で、それぞれ、受胎率は、21.4%および 11.1%、分娩率は、21.4%および 11.1%、平均産子数は、5.7 頭および 14 頭であり、繁殖成績に有意差は認められなかった。

[キーワード：豚凍結精液、排卵同期化・定時 1 回 AI 法、子宮体部注入カテーテル、AI 実施時間]

Effect of frozen-thawed boar semen motility and artificial insemination time in ovulation synchronization/fixd time single artificial insemination on sow fertility. YAMAGUCHI Shoichiro, Tetsuya MURAKAMI (Fukuoka Agricultural Research Center, Fukuoka 818-8549, Japan) Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent. 26:65-68 (2007)

We examined the effect of ovulation synchronization/fixd time single artificial insemination with frozen-thawed boar semen. In Experiment 1, we examined effect of frozen-thawed semen motility on sow fertility. In Experiment 2, we examined effect of artificial insemination time after gonadotrophin administration on sow fertility.

Experiment 1: Sows were inseminated with frozen-thawed spermatozoa ( $25 \times 10^8$  cells per dose) once 40 h after hCG treatment in both experimental and field conditions. The resulting conception rate was 91.7% and 21.4%, the farrowing rate 66.7% and 21.4% and litter size 8.4 and 5.7 piglets for the high- and medium-motility sperm, respectively. In the field conditions the conception rate was 87.5%, farrowing rate 50% and litter size 9.0 piglets.

Experiment 2: Comparison of artificial insemination time of 40h and 42h after hCG treatment in an ovulation synchronization program was conducted. The resulting conception rate was 21.4% and 11.1%, the farrowing rate 21.4% and 11.1% and litter size 5.7 and 14 piglets for artificial insemination time of 40h and 42h, respectively.

[frozen-thawed boar semen, ovulation synchronization/fixd time single artificial insemination, artificial insemination time]

## 緒言

液状精液による豚の人工授精(AI)実施率は、全国養豚協会の調査によると平成 13 年度に 22%であったものが、平成 16 年度の調査では 29%と徐々に普及しつつある。今後、牛と同様に豚の AI 実施率をさらに拡大させるためには、長期間保存でき、種雄豚を飼養する必要のない凍結精液の実用化が期待されている。

現在、豚凍結精液の利用は、公的機関等での種豚生産に限定され、生産現場では実用化までには至っていない。凍結精液を用いた AI は、凍結融解後の精子生存性が短時間であるため、排卵直前に AI することが重要であり<sup>1)</sup>、日本家畜人工授精師協会発行の豚凍結精液利用マニュアル(1989)では発情開始の 24 時間目に 1 回目の AI を行い、その 6~12 時間後に 2 回目以降を行うとしている。しかし、生産現場においては、正確に発情開始を確認することが困難であるため、AI 適期を簡易に把握できる技術開

発が求められている。近年、スペインの Roca ら<sup>6)</sup>は、性腺刺激ホルモンを投与して、排卵を同期化後、凍結精液の定時 1 回 AI を行ったところ、液状精液による AI とほぼ同等の受胎率、産子数が得られることを報告した。この排卵同期化・定時 1 回 AI 法は、定められたプログラムに沿ってホルモン処置や AI を行えばよいため、生産現場にも適用できる技術である。また、豚凍結精液の場合、発情時には通常 2~3 回の AI を行っているが、繁殖成績を低下させずに AI 回数を少なくすることができれば、豚凍結精液の普及促進につながる。しかし、排卵同期化・定時 1 回 AI 法については、これまで Roca ら以外に報告した事例は見当たらず、凍結融解後の精子活力の影響や AI 実施時間等の解明すべき課題も多い。そこで、凍結融解後の精子活力の違いや hCG 投与後の AI 実施時間の違いが繁殖成績に及ぼす影響について検討した。

## 材料および方法

### 1 供試豚

供試豚の品種は、大ヨークシャー種(W)およびパーク

\*連絡責任者(家畜部)

シャー種(B)であり、それぞれ純粋種間で凍結精液による AI を実施した。なお、種雄豚および種雌豚の繋養場所は、W が福岡県農業総合試験場(福岡農総試)、B が福岡県内の生産農家 2 戸である。

## 2 凍結保存および融解手順

凍結精液作製に当たっての前処理は、丹羽ら<sup>2)</sup>の変法に準じた。すなわち、精液濃厚部を採取後、その三分の二量のモデナ液で希釈し、一般検査を行い、活力が 80+++ 以上、正常精子が 85% 以上の精液を用いて以下の手順で凍結を行った。精子の分離は、希釈精液を 2 時間かけて 15°C へ温度を下げ、一晚静置させた後、800×g で 10 分間遠心分離した。その後、沈殿精子を 1 次希釈液(0.24M トレハロース、20% 卵黄、200μg/ml 硫酸アミカシン)で 20×10<sup>8</sup> 精子/ml となるように希釈し、2 時間かけて 5°C まで温度を降下させた。1 次希釈後の精液は、2 次希釈液(92.5% 1 次希釈液、1.5% OEP、6% グリセリン)で最終精子濃度 10×10<sup>8</sup> 精子/ml となるように調整した。2 次希釈後の精液は、0.5ml 凍結用ストローに充填した後、金属製のラックの上に乗せ液体窒素上面 4cm で 15 分の予備凍結を行った。予備凍結後、液体窒素中に浸漬し、完全に凍結させた。

融解手順は、凍結ストローを 38°C の温水中で融解した後、綿栓の反対側をストローカッターで切断し、針金で綿栓部分を押し出して融解液中に投入した。融解液(第 1 表、BCC 液)は、Matthijs ら<sup>4)</sup>に準じて作製した。

第 1 表 融解液(BCC 液)の組成

成分	配合量(1000ml 中)
グルコース	37.00g
クエン酸ナトリウム	6.00g
炭酸水素ナトリウム	1.25g
EDTA <sub>2</sub> ナトリウム	0.63g
塩化カリウム	0.75g
カフェイン	0.22g
塩化カルシウム・2 水和物	0.58g
硫酸アミカシン	200mg

-30°C の冷凍庫に保存し、1 ヶ月以内に使用

## 3 凍結融解精子の活力評価

凍結融解精液の活力判定は、融解した精液を BCC 液で 20 倍に希釈し、活発な前進運動(++)および著しく活発な前進運動(+++)を示している精子の割合をパーセントで示した。

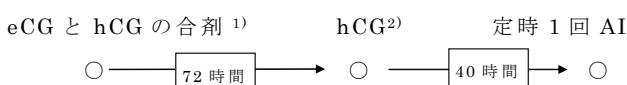


図 1. 排卵同期化プログラム

1) eCG400 単位と hCG200 単位との合剤 1 本を注射

2) hCG500 単位を注射

## 4 定時 1 回 AI 方法

AI 供試豚は、種付け後 40 日目までの妊娠初期の雌豚および離乳母豚を用いて発情の同期化<sup>1)・5)</sup>を行った。排卵同期化法は、第 1 図に示した。すべての供試豚にはウマ絨毛性性腺刺激ホルモン(eCG)とヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)の合剤である PG600 を投与し(妊娠初期豚の場合は、2 回目の PGF2α 投与時、離乳母豚の場合は離乳翌日)72 時間後に hCG を 500 単位投与した。AI は、hCG 投与後 24 時間以内に発情が誘起した試験豚のみに実施し、hCG 投与後 40 時間目に 1 回 AI を行った。また、注入器は、子宮体部注入カテーテルを用いた。総注入精子数は、ストロー 5 本分(25 億精子)とし、また、注入量は、50ml とした。受胎確認は、ノンリターン法とした。

## 5 統計処理

受胎率および分娩率は、 $\chi^2$  検定を行い、平均産子数については分散分析で行った。

## 6 試験内容

### 試験 1：凍結精液融解後の精子活力の違いが、繁殖成績に及ぼす影響

豚精子の耐凍性や融解後の精子活力は、種雄豚による個体差が大きい。そこで、試験 1 では、融解後の精子活力の違いが、排卵同期化・定時 1 回 AI 後の繁殖成績に及ぼす影響について検討を行った。供試凍結精液は、中活力精液(精子活力が 35% 以上 60% 未満：平均 48%、W 雄 2 頭)および高活力精液(60% 以上：平均 73%、B 雄 1 頭、W 雄 1 頭)に分類した。供試種雌豚頭数は、W 雌 19 頭、B 種雌 9 頭であった。

### 試験 2：hCG 投与後の AI 実施時間の違いが、繁殖成績に及ぼす影響

豚凍結精子は、融解後の生存時間が短く、排卵直前に授精適期とされているため、hCG 投与後 40 時間目に AI することが推奨されている<sup>6)</sup>。しかし、排卵時間にはある程度バラツキがあると考えられるため、AI 実施の時間についてはより詳細な検討が必要である。そこで、試験 2 では、AI 実施時間を hCG 投与後の 40 時間目と 42 時間目に設定して、AI 実施時間の違いが繁殖成績に及ぼす影響を検討した。供試凍結精液は、中活力精液(W 雄 3 頭)を用いた。また、供試種雌豚頭数は、W 雌 26 頭であった。

第 2 表 性腺刺激ホルモン投与による発情誘起率(試験 1)

試験地	処理頭数	発情誘起頭数	発情誘起率(%)
試験場	19	18	94.7
生産農場	9	8	88.9
合計	28	26	92.9

1) 発情誘起とは、hCG 投与後 24 時間以内に許容を開始した豚を示す

## 結果および考察

性腺刺激ホルモン投与による発情誘起率は、福岡農総試および生産農家の繋養豚でそれぞれ、94.7%および88.9%であった(第2表)。また、発情誘起された試験豚に定時1回AIを行った後の繁殖成績を第3表に示した。中活力精液でAIを行った場合の繁殖成績は、受胎率および分娩率とも低く、21.4%であった。平均産子数は、5.7頭であった。

第3表 凍結融解精子活力の違いが、定時1回AI後の繁殖成績に及ぼす影響

精子活力	供試頭数	受胎 <sup>1)</sup> 率(%)	分娩率(%)	平均産子数
中活力	14	21.4	21.4	5.7±1.5 <sup>2)</sup>
高活力	12	91.7	66.7	8.4±1.1

1)受胎：AI後25日以内に発情が来なかった試験豚

2)平均±標準偏差

一方、高活力精液でAIした場合には、受胎率が91.7%であったが、分娩率は66.7%に低下した。平均産子数は8.4頭であった。そのうち生産農場では、受胎率が87.5%(7/8)、分娩率が50.0%(4/8)、産子数が9.0頭であった。Rocaら<sup>6)</sup>は、hCG投与後42時間目に排卵が起こるように同期化処理を行い、hCG投与後40時間目に凍結精液の定時1回AIを子宮角深部注入カテーテルを用いて行ったところ、10億の注入精子数でも、分娩率が77.6%、産子数は9.3頭であり、本試験の注入精子数25億よりも大幅に少ない注入精子数でも優れた結果を示している。子宮角深部注入カテーテルを用いてAIした報告<sup>3)</sup>と本試験で用いた子宮体部注入カテーテルを用いてAIした報告<sup>7,12)</sup>とを比べた場合、子宮角深部注入カテーテルを用いてAIした方がより少ない注入精子数でも実用可能な成績が得られている。しかし、全長180cm(子宮体部注入カテーテルは約70cm)ほどある子宮角深部注入カテーテルは、取り扱いが難しく、生産現場での利用には適していない。現場で応用可能なAI法を確立するためには、取り扱いが容易な子宮体部注入カテーテルの利用が実用的であるため、本試験では子宮体部注入カテーテルを用いてAIの諸条件について検討した。試験1において、中活力精液では、実用可能な成績が得られなかった。佐野ら<sup>8)</sup>は、従来から用いられている子宮頸管注入カテーテルを用いて凍結精液の注入精子数を60億および100億として2回AIしたところ、100億区が優れ、実用可能な成績が得られたことを報告していることから、高い受胎率を得るためには、注入精子数を増加させるか2回AIを行う必要があるものと考えられる。今回、中活力精液では平均活力が48%であったため、注入精子数25億の内、有効精子数が12億程度となる。一方、高活力精液は平均活力が73%であったため、同様に有効精子数が18億程度となる。したがって、有効精子数が18億程度あれば、受胎率が9割程度は見込めると推察され、中活力精

液の場合、高活力精液と同程度の受胎率を見込むためには、1.5倍量の注入精子数が必要であると考えられた。また、高活力精液のAIにおいては、受胎率については実用可能と考えられる成績が得られたが、再起発情や流産のため分娩率が低くなり、その原因については明らかにすることができなかった。

第4表 hCG投与後のAI実施時間違いが繁殖成績に及ぼす影響

AI時間	供試頭数	受胎 <sup>1)</sup> 率(%)	分娩率(%)	平均産子数
40	14	21.4	21.4	5.7±1.5 <sup>2)</sup>
42	9	11.1	11.1	14

1)受胎：AI後25日以内に発情が来なかった試験豚

2)平均±標準偏差

hCG投与後のAI実施時間の違いによる繁殖成績を第4表に示した。AI実施時間を40時間と42時間で比較した結果、40時間区で受胎率、分娩率とも21.4%、平均産子数は、5.7頭、42時間区で受胎率、分娩率とも11.1%、平均産子数は14頭であり、試験区間で有意差は認められなかった。Soedeら<sup>9)</sup>は、排卵同期化処理による排卵時間をhCG投与後の38~44時間としているが、hCG投与後39~49時間とする報告<sup>10)</sup>もあり、報告者によって異なっている。また、凍結精液で高い受胎率を得るためには、精子の生存時間が極めて短いことを考慮し、排卵の0~4時間前にAIを実施する必要があることが報告<sup>11)</sup>されている。このように、hCG投与後のAI実施時間は、受胎率等の繁殖成績を左右する要因と考えられることから、試験2では、hCG投与後40時間目と42時間目でAIを行ったが、繁殖成績には有意差は認められなかった。本試験では排卵が遅れる可能性を考え、排卵時間がhCG投与後44時間前後になると予想したが、実際には38~40時間前後に排卵が起こっていたのではないかと推察された。したがって、今後は、hCG投与後40時間よりも早い時間でAI実施を検討するとともに、排卵時間のばらつきに対応するため複数回のAIや精子が長時間受精能を保持できるような凍結・融解方法および融解液を検討することが重要であると考えられる。

以上の結果より、豚凍結精液の排卵同期化・定時1回AI法により、中活力精液を用いた場合には、繁殖成績は実用可能な成績は得られず、さらなる検討が必要であるが、高活力精液を用いた場合には、高い受胎率が得られることが明らかとなった。

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、数々のご助言を頂いた岡山大学舟橋助教授および麻布大学伊東助教授に深謝いたします。

## 引用文献

- 1) De Rensis F., S. Benedetti, P. Silva, RN. Kirkwood(2003) Fertility of sows following artificial insemination at a gonadotrophin-induced estrus coincident with weaning. *Anim Reprod Sci.* 15; 76(3-4):245-250.
- 2) 丹羽太左右衛門監修(1989)豚凍結精液利用技術マニユアル, 日本家畜人工授精師協会発行, 34-38.
- 3) Martinez EA, JM. Vazquez, J. Roca, X. Lucas (2002) Minimum number of spermatozoa required for normal fertility after deep intrauterine insemination in non-sedated sows. *Reproduction* 123:163-70.
- 4) Matthijs A., B. Engel, H. Woelders (2003) Neutrophil recruitment and phagocytosis of boar spermatozoa after artificial insemination of sows, and the effects of inseminate volume, sperm dose and specific additives in the extender. *Reproduction* 125:357-367.
- 5) 三角浩司, 鈴木美佐枝(2003)豚における胚移植を育種素材の導入, 独立法人家畜改良センター, 12-13.
- 6) Roca J., G. Carvajal, X. Lucas, JM. Vazquez, EA. Martinez EA (2003) Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa *Theriogenology* 60(1):77-87.
- 7) Rozeboom KJ., DL. Reicks, ME., Wilson (2004) The reproductive performance and factors affecting on-farm application of low-dose intrauterine deposit of semen in sows. *J Anim Sci.* 82(7):2164-2168.
- 8) 佐野 通, 原田 護, 伊藤述史, 河原宏一(2003)豚凍結精液の実用化技術の確立(V), 岡山県総合畜産センター研報, 13;1-6.
- 9) Soede NM, EG. Bouwman, B. Kemp (1998) Seminal plasma does not advance ovulation in hCG-treated sows. *Anim Reprod Sci.* 1; 54(1):23-29.
- 10) Soede NM, B. Kemp (1993) In synchronized pigs, the duration of ovulation is not affected by insemination and is not a determinant for early embryonic diversity. *Theriogenology.* 39(5):1043-1053.
- 11) Waberski D, KF. Weitze, T. Gleumes, M. Schwarz, T Willmen, R Petzoldt (1994) Effect of time of insemination relative to ovulation on fertility with liquid and frozen boar semen. *Theriogenology.* 42(5):831-840.
- 12) Watson PF., JR. Behan (2002) Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: results of a commercially based field trial. *Theriogenology* 57:1683-1693.