

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 照 那 木 拉

題 目： 豚精液の長期液状保存に関する研究

### 論文要旨：

豚精液の保存法は液状保存が主な方法であり、人工授精には5-20℃（注流は15℃）の温域で5-7日間保存された精液が用いられている。これまでに、保存後の精子性状を改善するため精液希釈液について多くの研究がなされてきた。本研究では、5℃および15℃での保存期間の延長を目的に、低温ショックから豚精子を保護する添加物としてスキムミルクをモデナ修正液へ添加し、その効果を検討した。

研究1では、15℃での豚精液の液状保存におけるスキムミルクの最適濃度を検討した。モデナ修正液へスキムミルクを0（対照群）、7.5、15、30、50 mg/mL 添加し、最終濃度  $1.0 \times 10^8$ /mL となるように精子を調整した。試験1：調整後15℃で4週間保存し、精子運動性、生存率、細胞膜正常性および先体膜正常性を検査した。試験2：15℃で2週間保存した精子を用い体外成熟培養した豚卵母細胞と共に体外受精を行った。共培養後、卵母細胞を固定または染色により体外受精能および胚発育能について調べた。その結果、スキムミルク7.5mg/mL 添加群においてスキムミルク無添加群よりも有意に高い精子運動性が認められた。また、保存3週目以降で精子生存率も有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ )。細胞膜正常性および先体膜正常性においては無添加群との間に有意差はなかった。精子の受精能において、スキムミルク添加群に保存精子の総受精率は、新鮮精子に比較して有意に低い値を示した ( $P < 0.05$ )。また、保存精液において、スキムミルク7.5 mg/mL 添加群の総受精率は15 mg/mL 添加群より高い傾向 ( $P < 0.1$ ) を示したが、無添加の対照群と同等であった。胚盤胞形成率については、どの添加群間にも有意な差は認められなかった。本試験結果は、15℃における豚精液の液状保存は、7.5 mg/mL スキムミルク添加モデナ液が最適であり、保存2週間においても精子性状（精子運動性、生存性、細胞膜正常性、先体正常性）と体外受精能が保たれることが示唆された。

研究2では、簡易的な豚精液の保存方法として家庭用冷蔵庫を使用し、約5℃前後での保存期間の延長を目的に、モデナ修正液へのスキムミルクの添加効果を検討した。試験1：スキムミルクを0（対照群）、7.5、15、30、50 mg/mL で添加したモデナ修正

(別紙様式第3号)

液で精液(最終濃度  $1 \times 10^8$  精子/mL)を  $5^\circ\text{C}$  で4週間保存し、精子性状検査(運動性、生存性、細胞膜正常性、先体正常性)を4週目まで各週行った。試験2:無添加の対照群、7.5及び15 mg/mL スキムミルク添加群の精液を  $5^\circ\text{C}$  で2週間保存後、体外成熟培養した豚卵母細胞と共に体外受精を行った。共培養後、卵母細胞を固定または染色により体外受精能および胚発育能について調べた。さらに、スキムミルク7.5 mg/mL 添加  $5^\circ\text{C}$  で2週間保存した精液を用い人工授精を行い、受胎性を確認した。その結果、保存後3週間目まで、対照群と比較してスキムミルク7.5および15 mg/mL 添加群有意に高い運動性を示した ( $P < 0.05$ )。更に、スキムミルク7.5 mg/mL 添加群は4週間保存後の精子運動性を改善した。また、スキムミルク7.5 および15 mg/mL 添加群は保存1週間目において対照群に比べ有意に高い精子生存性を示した ( $P < 0.05$ )。しかし、精子細胞膜及び先体正常性においてスキムミルク添加効果は認められなかった。 $5^\circ\text{C}$  で2週間保存精子の総受精率は対照群と比較してスキムミルク7.5 および15 mg/mL 添加群が高い値 ( $P < 0.05$ ) を示した。胚盤胞発生率において、 $5^\circ\text{C}$  で2週間保存した精液は、対照群と比較してスキムミルク7.5 および15 mg/mL 添加群が有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ )。また、スキムミルク7.5 mg/mL 添加群の受精率及び胚盤胞発生率は、新鮮精液と比較して同等であった。4頭の雌豚に人工授精した結果、2頭が妊娠し、全体で8頭の正常な子豚が生まれた。しかし、その産仔数は、新鮮精液に比較して低い傾向であった。

本研究において、モデナ液へのスキムミルク添加は、 $5^\circ\text{C}$  および  $15^\circ\text{C}$  における豚精液の液状保存に効果的であり、その濃度は7.5 mg/mL であることを明らかにした。また、スキムミルク添加により液状保存後の精子運動性、生存性および受精能を改善することが示唆された。さらに  $5^\circ\text{C}$  で2週間保存した精液により産子が作出されたことから、これまで1週間が限度であった液状保存法において、家庭用冷蔵庫でも2週間の保存が可能となることが示された。

(和文2,000字又は英文800語程度)

## 学位論文審査の結果の要旨

氏 名	照那木 拉
審 査 委 員	主 査：山口大学 教授 音井 威重
	副 査：山口大学 教授 和田 直己
	副 査：山口大学 教授 佐藤 宏
	副 査：農業生物資源研究所 上級研究員 菊地 和弘
	副 査：鹿児島大学 准教授 高木 光博
題 目	豚精液の長期液状保存に関する研究

## 審査結果の要旨：

申請者は、既存の豚精液処理・希釈液よりも活力保持時間が長く、しかも 5℃および 15℃のいずれの保存温度においても利用可能な豚精液保存用希釈液の開発を試みた。その手法として、低温ショックから豚精子を保護する添加物としてスキムミルクをモデナ修正液へ添加し、保存方法を確立することにより、通常の前液保存日数（7 日間程度）の 2 倍にあたる 14 日間以上保存可能な液状精子保存技術を開発した。

研究 1 では、15℃での豚精液の液状保存におけるスキムミルクの最適濃度を検討した。モデナ修正液へスキムミルクを 0（対照群）、7.5、15、30、50 mg/mL 添加し、最終濃度  $1.0 \times 10^8$ /mL となるよう精子を調整した。調整後 15℃で 4 週間保存し、精子運動性、生存率、細胞膜正常性および先体膜正常性を検査した。また、15℃で 2 週間保存した精子を用い体外成熟培養した豚卵母細胞と共に体外受精を行い、体外受精能および胚発育能について調べた。その結果、スキムミルク 7.5mg/mL 添加群においてスキムミルク無添加群よりも有意に高い精子運動性が認められ、保存 3 週目以降で精子生存率も有意に高い値を示した。さらに、精子の受精能において、スキムミルク添加区の保存精子の総受精率は、新鮮精子に比較して有意に低い値であったが、保存精液において、スキムミルク 7.5 mg/mL 添加区の総受精率は 15 mg/mL 添加区より高い傾向を示した。胚盤胞形成率については、どの添加群間にも有意な差は認められなかった。本試験結果から、15℃における豚精液の液状保存は、7.5mg/mL スキムミルク添加モデナ液が最適であり、保存 2 週間においても精子性状（精子運動性、生存性、細胞膜正常性、先体正常性）と体外受精能が保たれることが示唆された。

研究 2 では、簡易的な豚精液の保存方法として家庭用冷蔵庫を使用し、約 5℃前後での保存期間の延長を目的に、モデナ修正液へのスキムミルクの添加効果を検討した。まず、スキムミ

ルクを 0 (対照群)、7.5、15、30、50 mg/mL で添加したモデナ修正液で精液 (最終濃度  $1 \times 10^8$  精子/mL) を 5°C で 4 週間保存し、精子性状を評価した。さらに、無添加の対照群、7.5 及び 15 mg/mL スキムミルク添加群の精液を 5°C で 2 週間保存後、体外成熟培養した豚卵母細胞と共に体外受精を行い、体外受精能および胚発育能について調べた。また、スキムミルク 7.5 mg/mL 添加 5°C で 2 週間保存した精液を用い人工授精を行い受胎性を確認した。その結果、保存後 3 週間目まで、対照群と比較してスキムミルク 7.5 および 15 mg/mL 添加群が有意に高い運動性を示した。更に、スキムミルク 7.5 mg/mL 添加群は 4 週間保存後の精子運動性を改善した。また、スキムミルク 7.5 および 15 mg/mL 添加群は保存 1 週間目において対照群に比べ有意に高い精子生存性を示したが、精子細胞膜及び先体正常性においてスキムミルク添加効果は認められなかった。5°C で 2 週間保存精子の総受精率は対照群と比較してスキムミルク 7.5 および 15 mg/mL 添加区が高い値を示し、胚盤胞発生率においても、5°C で 2 週間保存した精液は、対照群と比較してスキムミルク 7.5 および 15 mg/mL 添加群が有意に高い値を示した。スキムミルク 7.5 mg/mL 添加区の受精率及び胚盤胞発生率は、新鮮精液と比較して同等であった。さらに、4 頭の雌豚に人工授精した結果、2 頭が妊娠し、全体で 8 頭の正常な子豚が生まれた。しかし、その産仔数は、新鮮精液と比較して低い傾向であった。

本研究は、モデナ液へのスキムミルク添加が、5°C および 15°C における豚精液の液状保存に効果的であり、その濃度は 7.5 mg/mL であることを明らかにした。また、スキムミルク添加により液状保存後の精子運動性、生存性および受精能を改善することが示唆され、5°C で 2 週間保存した精液により産子が作出されたことから、これまで 1 週間が限度であった液状保存法において、家庭用冷蔵庫でも 2 週間の保存が可能となることが示された。

これら成果は、国際的にも十分に評価されており、養豚農家で実際に使用されている人工授精技術の改良に貢献するものと考えられた。以上により、本論文は博士 (獣医学) の学位を授与するにふさわしいと判断された。