



# 連載

## 第3回

# 牛の人工授精：凍結精液

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

今回は凍結精液を適切に取扱い、融解していただくために、精液の凍結保存の原理と凍結精液の取扱い・融解の基本について説明します。

### 1. 精液の凍結保存の概要

種雄牛から採取した精液(射出精液)は、精子の数、運動性、形態などを検査した後、通常は以下の①～⑦の行程で凍結保存される(図1)。

- ① 保存液(1次希釀液)で希釀(予備希釀)
- ② 4～5℃までゆっくり冷却(緩慢冷却)
- ③ グリセリン添加保存液(2次希釀液)で希釀
- ④ ストローに分注・封入
- ⑤ -140℃まで冷却して凍結
- ⑥ 液体窒素(-196℃)に移して保存
- ⑦ ストローを温水に浸けて融解、授精

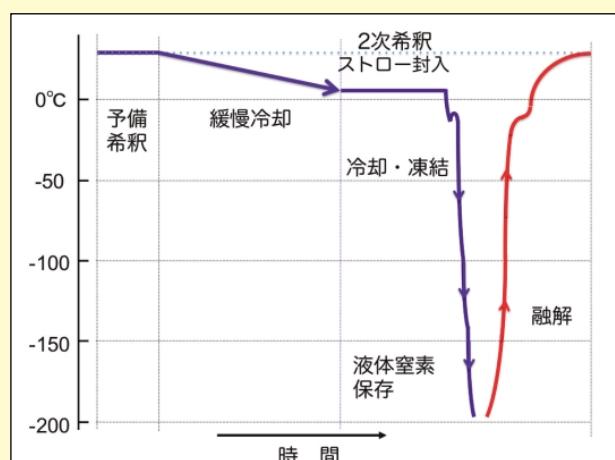


図1 精液の凍結・融解過程と温度変化

### 2. 凍結保存液(希釀液)

基本的な保存液(1次希釀液)には、浸透圧と電解質のバランスを維持するクエン酸あるいはクエン酸塩、pHの変動を防ぐ緩衝能を有するトリス・ヒドロキシメチルアミノメタン、4～5℃に冷却したときにみられる細胞膜の傷害(図2)を軽減する卵黄あるいは牛乳(全乳、脱脂乳)、栄養源および非細胞膜透過型凍害防止剤の働きをもつ糖類、

抗生物質が添加されている。また、2次希釀液には細胞膜透過型の凍害防止剤であるグリセリンが添加されている。

### 3. 予備希釀と冷却

精液を0～10℃に冷却(とくに20℃から5℃まで急冷)すると、精子は図2に示したような冷却傷害(重度の傷害はコールドショック)を受ける。そこで、1次希釀液で数倍に希釀してから、2時間前後の時間をかけてゆっくり4～5℃まで冷却する。

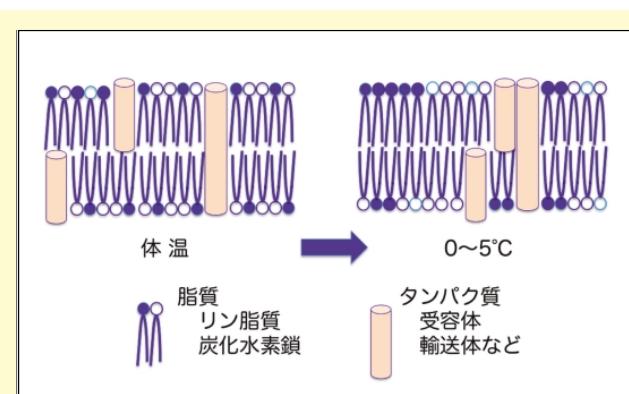


図2 冷却時の細胞膜の変化

細胞膜の主成分である種々のリン脂質は液体から半固形状態(ゲル)になる相転移温度が異なる。細胞が冷却されると相転移温度の高いものからゲルになり集団を形成、脂質は運動性を失う。また、細胞膜内のタンパク質も集団を形成、リン脂質とともに配列が変化する。融解後、もとの配列に戻らないと細胞膜の機能が損なわれる。

### 4. 2次希釀とストロー内封入

4～5℃まで冷却した精液は、まず1次希釀液を添加して最終濃度の2倍に希釀する。ついで、グリセリンを含む2次希釀液を加えて最終濃度に調整する。2次希釀液を一度に加えると精子は浸透圧傷害をうけるので、通常は数回に分けて添加・希釀する。2次希釀が終了した精液は、種雄牛名号、精液採取日が印字されたプラスチック・ストローに分注・封入して凍結過程に入る。

### 5. 冷却と凍結

図3のように保存液を凝固点(氷点)まで冷却すると細胞外に氷晶が形成され、保存液の成分の濃度(浸透圧)が高くなるため、細胞は脱水されて小さくなる。適度の速度で冷却を続けると、細胞内に氷晶が形成されず、細胞内外のグリセリン濃度も高まり、細胞は適度に脱水される。冷却速度が速すぎると脱水不足による細胞内氷晶形成(あるいは融解過程での浸透圧傷害)を招く。一方、冷却速度が遅すぎると細胞は浸透圧傷害\*を受け、細胞膜機能が損なわれる。精子は、-15℃～-60℃で浸透圧傷害を受けやすいため急速に冷却する。[\*この傷害は冷却過程だけでなく、融解過程でも起こる。]



通常、精液は4~5°Cから-10°C付近まで比較的ゆっくり(5°C/分前後)冷却して細胞外の氷晶形成を促し、-10°Cから-100~-140°Cまで急速(30~50°C/分)に冷却したのち、液体窒素内に移して凍結保存する(図1参照)。

希釈液の組成、グリセリン濃度、冷却速度により違いはあるが、-60~-80°Cに冷却すると精子とその周辺はガラス化される(結晶構造のない固体になる:図4)。

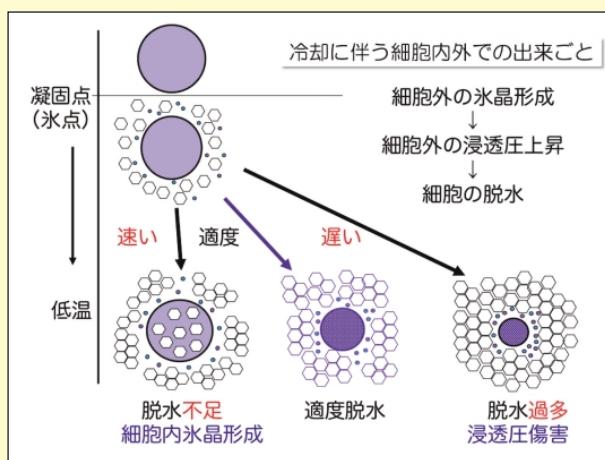


図3 凍結過程における冷却速度と細胞傷害

凝固点以下に冷却されると細胞外に氷晶が形成され、細胞外液の浸透圧が高まるため、細胞は徐々に脱水される。冷却速度が速すぎると脱水が不十分で細胞内に氷晶が形成されたり融解過程で浸透圧傷害をうける(左)。適度な速度で冷却すれば細胞は徐々に脱水され、液体窒素中に移しても細胞とその周辺は氷晶が形成されずにガラス化される(中央)。冷却速度が遅すぎると(最終的にガラス化されても)長時間にわたり浸透圧傷害を受ける(右)。

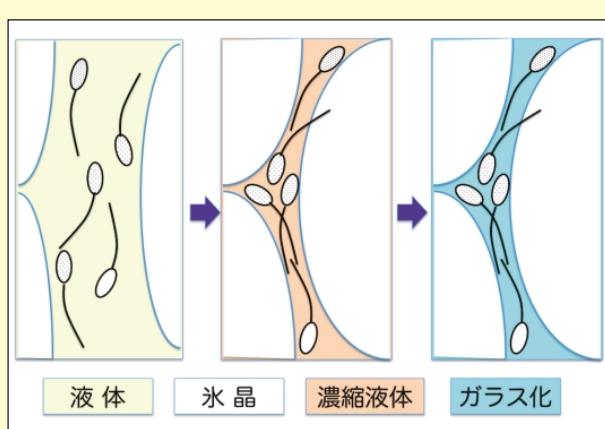


図4 冷却・凍結過程における氷晶形成とガラス化

氷晶形成により保存液(希釈液)の成分の濃度と精子内の物質の濃度は高くなり、-60~-80°Cまで冷却されると、精子とその周辺の保存液は氷晶構造のない固体になる(ガラス化)。

## 6. 凍結精液の取扱い

凍結精液のストローはプラスチック・ケインあるいはゴブレットに入れ、液体窒素を満たした保管器の中のキャニスターに納めて保管する。

凍結精液の温度が-130°C以上に上昇すると、ガラス化している精子周辺の細胞外液が脱ガラス化(結晶構造のない固体から液体に変化)して氷晶が形成され、細胞外液の浸透圧・塩類濃度が高まり、精子は傷害を受ける(図5)。

したがって、凍結精液保管器内の液体窒素量を少なく

とも1/3以上に保ち、キャニスターを持ち上げる場合は上面が保管器開口部から10cm下の位置にとどめ、10秒以内に液体窒素の中に戻し、再び持ち上げる場合は20~30秒間液体窒素内に維持した後に行う。

また、凍結精液は、風、太陽光、暖房器具の熱があたらぬ場所で取扱い、他の保管器への移替えはケインあるいはゴブレットごと移動し、個々のストローの取扱いは避ける。ストローの仕分け作業は、液体窒素を満たした魔法瓶や発砲スチロール箱の中にケインあるいはゴブレットを移して行う。個々のストローはピンセットあるいは鉗子を用いて取扱い、外気への露出は突然の風を考慮して2~3秒以内(0.25mlストローは1秒以内)にとどめる。

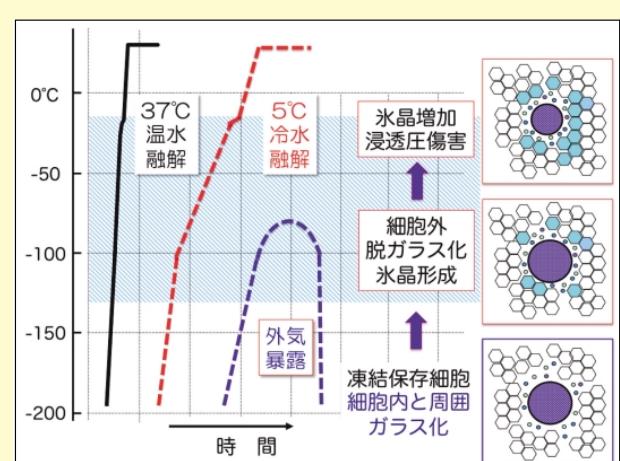


図5 融解とストローの外気暴露における温度と細胞内外の氷晶の変化

冷水融解や外気暴露によりストロー内温度が-130°C以上になると細胞周辺の保存液が液体に戻り(脱ガラス化)、徐々に氷晶が形成される。氷晶が増加すると浸透圧が高まり、精子は浸透圧傷害を受ける。

## 7. 凍結精液の融解

通常の凍結精液は、前述のように細胞外液が脱ガラス化する-130°C以上の温度域、とくに、-60°C以上の温度域は、脱ガラス化した細胞外液で氷晶が形成されて浸透圧傷害をうけるため、急速融解が必要である(図5参照)。したがって、凍結精液のストローは1本ずつピンセットを用いて保管器から取出して、35~37°Cの温水中に45秒以上(0.25 mlストローは30秒以上)浸けて急速に融解する。

融解精子の機能は徐々に低下するため、融解したストローは速やかに人工授精器(精液注入器)にセットして、融解後15分以内(選別精液は5分以内)に授精する。

また、前述の「予備希釈精液の冷却」と同様、融解精液を5~10°Cに急冷すると精子は冷却傷害を受けるので、寒い季節(秋~冬~春)には予め精液注入器を温め、ストローをセットした注入器は滅菌袋に納めて胸元あるいはヒーター付き保温装置に入れて保温するなど、精液の温度を20°C以上に保つことが大切である。

具体的な精液の取扱いと融解については、稿を改めて説明します(ホームページでも紹介します)。