

## 豚精液の簡易精子数測定器用プログラムの開発

長谷川輝明・中根 崇

### Development of the Program for Simplicity Sperm Count Measuring Instrument of Pig Semen

Teruaki HASEGAWA and Takashi NAKANE

#### 要 約

3%クエン酸ナトリウム液を用いて様々な精子数濃度の豚の希釈精液を作成し、トーマの血球計算盤で精子数を算定した後、濁度計で透過率を求めた。これにより得られた精子数と透過率から標準曲線を作成し、求めた回帰式により簡易精子数測定プログラムを作成した。これを濁度計のメモリーに組み込んだものを簡易精子数測定器とした。さらに、本プログラムを用い精子数を低濃度範囲、高濃度範囲に分け、それぞれの標準曲線から回帰式を求めることで測定値の精度をあげてを試みた。その結果、低濃度範囲では回帰式 $y = -0.014x + 0.6811$ 、決定係数 $R^2 = 0.9538$ 、高濃度範囲では回帰式 $y = 0.0171x + 0.0826$ 、決定係数 $R^2 = 0.9388$ とそれぞれ高い相関関係が示された。

簡易精子数測定器を用いての精子数測定に最も適した希釈液は、3%クエン酸ナトリウム液であった。また、精液中の精漿濃度の違いが精子数濃度に与える影響はほとんど見られなかった。

開発したプログラムを組み込んだ測定器は動物用薬事認可を取得し、製品化されており、生産現場での活用が期待できるものとする。

#### 緒 言

日本における豚人工授精の普及率は年々高まり、2009年には43.7%となっている<sup>1)</sup>。人工授精の利点には、優良な種雄豚の精液の利用による枝肉品質の斉一化や受胎率の向上、精液の長距離輸送の可能などがあげられる。効率的な人工授精を実施するためには、精子数を迅速、簡便かつより正確に測定する必要がある。それにより、適正な精液の希釈倍率を決定し、必要な精子数を確保することは、限りある優良な精液の有効利用につながる。

従来、精子数を算定する基本的な方法として、トーマの血球計算盤を利用した方法がとられてきた。顕微鏡下で、実際に精子数を計測する方法では、時間と労力がかかるうえ、正確な値を得るまでに高度な熟練が必要となる。そのため、大手の流通精液を供給している人工授精所などでは、分光光度計や細胞数測定装置、自動血球計算機などの装置を用いて精子数を測定する方法を採用している<sup>2)</sup>。また、最近では、光源にLEDランプを取

り入れた比色計などで精子数を測定する装置も多く見られる。しかし、これらの分光光度計や比色計などを用いた測定法では、測定した透過率や吸光度の値を予め算出してある精子数算定表から精子数に換算する必要がある。また、血球計算盤や分光光度計、比色計などを用いて精子数を測定する場合は精液を希釈して使用しなければならない。以上のように、従来の精子数を測定する方法は、測定者に余分な労力、熟練度、複雑な操作が求められる。

そこで、本研究では精子数の簡易測定、測定値の精度向上を目的に、簡易に精子数を測定する測定器用プログラムの作成に取り組んだ。さらに、希釈液が精子数濃度に与える影響を調べるために、クエン酸ナトリウム液や塩化ナトリウム液など既存の精液希釈液を用いて本プログラムに適する希釈液の検討を行った。同時に、精液中の精漿濃度の違いが精子数濃度に与える影響についても検討した。

#### 材料及び方法

##### 1. 精子数濃度測定器

精子数濃度は富士平工業株式会社製のLEDを光源とする濁度計を用い、波長618nmで測定を行った(図1)。

平成22年8月31日受付



図1 濁度計の外観

## 2. 供試豚及び精液

当センターで飼養しているランドレース種2頭、中ヨークシャー種1頭、大ヨークシャー種3頭、デュロック種4頭の4品種の雄豚の精液を用いた。精液は手圧法で濃厚部を採取し、ガーゼを用いて膠様物を除去したものを使用した。

## 3. 試験方法

丹羽ら<sup>3)</sup>の方法に準じて試験を実施した。

### (1) 簡易精子数測定器用プログラムの作成

希釈液には3%クエン酸ナトリウム液を用いて、各品種豚の精液を2倍から40倍の範囲で段階希釈後、作成した43通りの希釈精液の精子数を血球計算盤で算定した。同時に、これら43通りの希釈精液を3%クエン酸ナトリウム液で、さらに10倍希釈したものを濁度計で測定して透過率を求めた。これにより得られた精子数と精子数に対応する透過率から標準曲線を作成して回帰式を求めた。この回帰式が精子数を測定するためのプログラムとなる。本プログラムでは、測定値の精度をあげるために精子数濃度を低いものと高いものに分類した。それぞれから標準曲線を作成して求めた回帰式が本研究で作成した簡易精子数測定器用プログラムであり、これを新たに濁度計のメモリーに組み込んだものを簡易精子数測定器とした。

### (2) 本プログラムにより測定した精子数と血球計算盤で算定した精子数との確認

供試豚から新たに採取した精液に3%クエン酸ナトリウム液を用いて、様々な精子数濃度の希釈精液を作成した。これら希釈精液を血球計算盤で精子数を算定した後、3%クエン酸ナトリウム液でさらに10倍希釈した希釈精液を簡易精子数測定器で精子数を測定した。血球計算盤で算定した精子数と簡易精子数測定器で測定した精子数から標準曲線を作成し、得られた回帰式から決定係数を求めることでその精度について確認を行った。

### (3) 希釈液及び精漿が精子数濃度に与える影響の検討

供試豚の内、ランドレース種、大ヨークシャー種、デュロック種から各1頭ずつ3品種の精液を用いた。

血球計算盤で精子数を算定する際の精液希釈液として使用している3%塩化ナトリウム液、3%クエン酸ナトリウム液、精液保存液として一般的に広く普及している希釈液であるモデナ液の3種の希釈液を用いた。採取した精液を血球計算盤で算定した精子数と、精液を希釈液で10倍希釈して簡易精子数測定器で測定した精子数との比較を行った。同時に、同精液を遠心分離機(3000rpm、10分間)にかけ、得られた精漿を濁度計で測定して透過率を求めた。

## 結 果

### 1. 簡易精子数測定器用プログラムの作成

43通りの精子数濃度の希釈液について、血球計算盤により算定した精子数とこれに対応する濁度計により測定した透過率との関係を表1に示し、図2でグラフ化したところ曲線状の関係が得られた。そこで、丹羽ら<sup>3)</sup>の方法に則して精子数と透過率の間に直線関係を得るため、精子数を対数に換算することで透過率との比較を行い図3を得た。図3では、透過率10%以上にプロットした点はほぼ直線状の関係が認められたことから、この範囲(血球計算盤による精子数で約3.5億以下を低濃度範囲とする)において標準曲線を作成し図4を得た。さらに、この標準曲線より回帰式及び決定係数を求めた結果、透過率10%以上の低濃度範囲においては、精子数を対数換算することで回帰式 $y = -0.014x + 0.6811$ が得られ、決定係数も $R^2 = 0.9538$ と高い相関関係が示された( $P < 0.001$ )。

また、図3で見られるように、低濃度範囲外については直線関係が認められなかった。そこで、精子数を逆数に換算することで透過率との比較を行い図5を得た。図5では、透過率20%以下のところでプロットした点はほぼ直線状の関係が認められたことから、この範囲(血球計算盤による精子数で約2.4億以上を高濃度範囲とする)において標準曲線を作成したところ図6を得た。さらに、この標準曲線より回帰式及び決定係数を求めた結果、透過率20%以下の高濃度範囲においては、精子数を逆数換算することで回帰式 $y = 0.0171x + 0.0826$ が得られ、決定係数も $R^2 = 0.9388$ と高い相関関係が示された( $P < 0.001$ )。

以上の結果より、得られた回帰式が簡易精子数測定器用プログラムであり、これを新たに濁度計に内蔵したものを簡易精子数測定器とした。なお、これらの回帰式をプログラムするだけでは、低濃度範囲と高濃度範囲の値で精子数が重複する部分が生じるため、それぞれの近似曲線が交わる箇所(透過率14.6%)を境界としてプログラムした。

### 2. 本プログラムにより測定した精子数とトーマの血球

長谷川ら：豚精液の簡易精子数測定器用プログラムの開発

計算盤で算定した精子数との確認

希釈精液が低濃度範囲では図7が得られ、回帰式  $y = 0.979x + 0.0506$  が求められ、決定係数も  $R^2 = 0.9733$  と高い相関関係が示された ( $P < 0.001$ )。希釈精液が高濃度範囲においては図8が得られ、回帰式  $y = 0.9632x + 0.2731$  が求められ、決定係数も  $R^2 = 0.9344$  と高い相関関係が示された ( $P < 0.001$ )。

表1 透過率と精子数の関係

雄豚の品種	精子数 (億)	透過率 (%)
ランドレース種 (A)	3.930	8.6
	1.110	45.9
	0.627	65.6
ランドレース種 (B)	4.210	9.5
	2.110	23.4
	1.400	38.2
	1.050	46.6
	0.843	58.7
中ヨークシャー種 (A)	5.100	8.4
	1.080	50.5
	0.540	72.3
	6.270	3.9
	3.135	13.4
	2.090	23.3
大ヨークシャー種 (A)	1.568	32.6
	1.254	40.1
	3.180	11.1
	1.030	42.3
	0.514	61.9
大ヨークシャー種 (B)	8.200	2.4
	4.100	9.6
	2.733	17.4
	1.640	32.8
大ヨークシャー種 (C)	11.230	2.1
	5.620	5.6
	3.740	11.7
	2.810	18.3
デュロック種 (A)	2.250	27.3
	9.630	1.5
	1.000	47.0
	7.580	2.8
デュロック種 (B)	1.060	44.6
	3.050	12.9
	1.220	43.2
デュロック種 (C)	0.610	72.6
	19.270	0.8
	0.953	56.1
	0.477	73.8
デュロック種 (D)	3.000	12.5
	1.500	30.7
	1.000	46.0
	0.751	51.2
	0.601	57.0

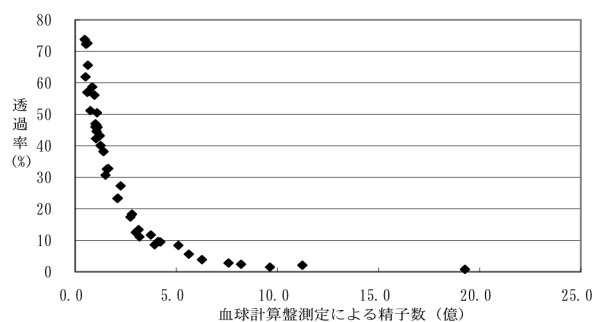


図2 透過率と精子数の関係

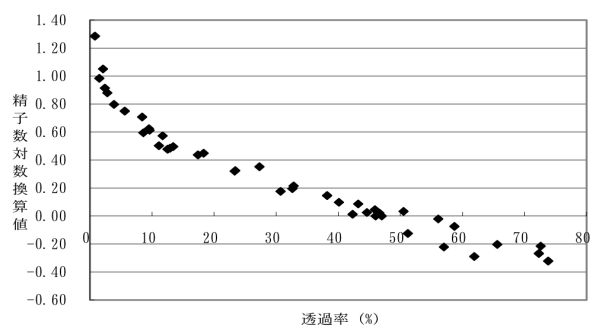


図3 精子数の対数換算値と透過率の関係

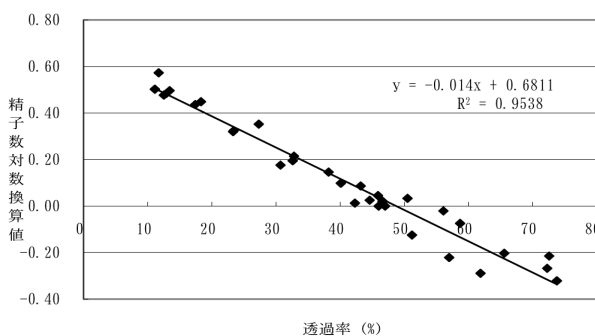


図4 低濃度範囲での精子数の対数換算値と透過率の関係

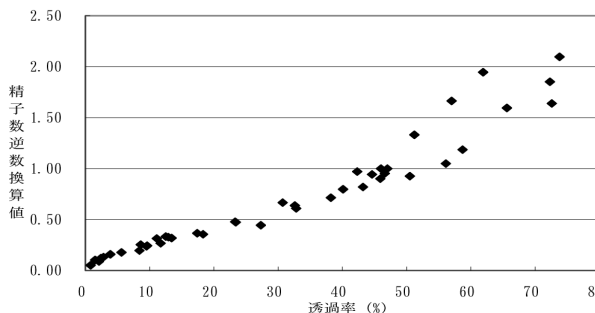


図5 精子数の逆数換算値と透過率の関係

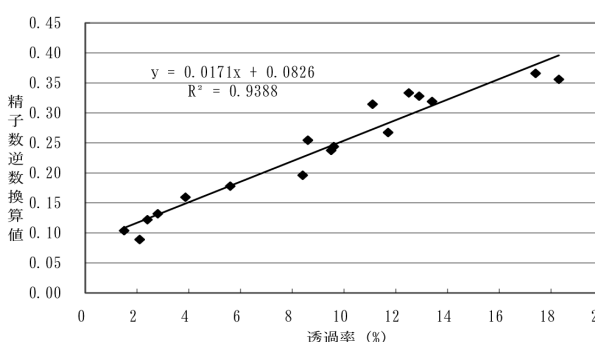


図6 高濃度範囲での精子数の逆数換算値と透過率の関係

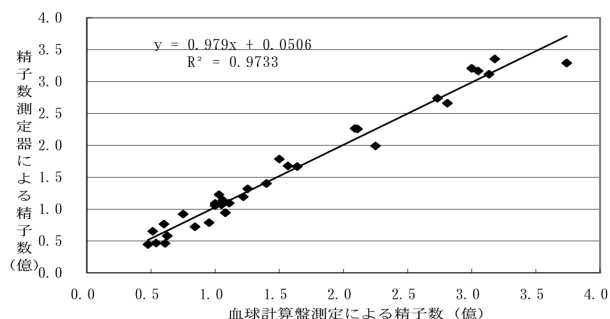


図7 低濃度範囲での精子数測定器と血球計算盤の精子数の関係

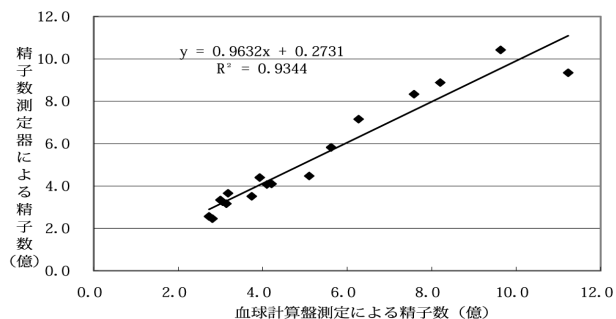


図8 高濃度範囲での精子数測定器と血球計算盤の精子数の関係

### 3. 希釈液及び精漿が精子数濃度に与える影響の検討

3%塩化ナトリウム液、3%クエン酸ナトリウム液、モデナ液の希釈液3種を使用して、血球計算盤で算定した精子数と簡易精子数測定器で測定した精子数を比較した結果を表2に示した。3%クエン酸ナトリウム液が血

球計算盤で算定した精子数と最も適することが窺えた。また、精漿が精子数濃度に与える影響は、精漿濃度に限らず、血球計算盤で算定した精子数と簡易精子数測定器で測定した精子数で大きな差は見られなかった。

表2 希釈液別に測定した精子数と精漿の透過率

豚精液種類	測定方法	希釈液	精子数(億)	血球計算盤との適合性(%)	精漿の透過率(%)
ランドレース	血球計算盤	3%クエン酸ナトリウム液	1.74	—	74.9
	簡易精子数測定器	モデナ液	1.66	96	
		3%塩化ナトリウム液	2.11	121	
		3%クエン酸ナトリウム液	1.76	101	
大ヨークシャー	血球計算盤	3%クエン酸ナトリウム液	3.38	—	3.3
	簡易精子数測定器	モデナ液	2.76	82	
		3%塩化ナトリウム液	2.98	88	
		3%クエン酸ナトリウム液	3.06	91	
デュロック	血球計算盤	3%クエン酸ナトリウム液	3.36	—	2.5
	簡易精子数測定器	モデナ液	3.70	110	
		3%塩化ナトリウム液	3.22	96	
		3%クエン酸ナトリウム液	3.56	106	

## 考 察

血球計算盤により算定した精子数と、比色計や分光光度計など光電装置を用いて測定した精液の透明度(透過率や吸光度など)との関係についてはこれまで多くの報告<sup>3~6)</sup>がされてきた。とくに、丹羽ら<sup>3)</sup>は、豚精液について分光光度計により測定した透過率と血球計算盤によって算定した精子数との間には、精子数の少ない低濃度範囲では精子数の対数を取ることで、また精子数の多い高濃度範囲では精子数の逆数を取ることで、両者に直線関係を得ることができ、それぞれ高い相関関係があることを報告している。

本実験においては、濁度計を使用したのが、それにより測定した透過率と血球計算盤により算定した精子数との間にも曲線状の関係が得られた。さらに、精子数が低濃度範囲では精子数の対数を、精子数が高濃度範囲では精子数の逆数を取ることで、直線関係も得ることができ、それぞれ両者には高い相関関係が認められ、その回帰式は有意なものであった(P<0.001)。

ただし、回帰式が1次回帰のため、高濃度範囲の回帰式において透過率0%を代入しても精子数は12億までしか伸びず、また低濃度範囲の回帰式に透過率100%を代入しても2千万ほどの精子数が表示されることとなる。これに関しては、丹羽ら<sup>3)</sup>の作成した精子数簡易算定標準表においても、透過率は高濃度範囲で2%、低濃度範囲では80%までしか示しておらず、それ以下もしくは超える値については精度の確保が難しいと推測される。そのため、この方法で精子数を算定する場合においては、各濃度範囲の回帰式を増やすことが必要であり、それによって高範囲な精子数の表示が可能かと考えられた。

光電装置を用いた精子数濃度の測定には、正確な測定を阻む要因として精漿や希釈液の問題があげられている。精漿においては、丹羽ら<sup>3)</sup>、Weber & Müller<sup>6)</sup>は実験結果から、光電装置による豚精子数濃度の測定には精漿による影響はほとんど見られないと報告している。また、希釈液についても多くの報告があるが、いずれも精子への影響が少なく、精漿を透明化するのに有効である点を満たしていればどの希釈液を使用しても良いと考えられ、丹羽ら<sup>3)</sup>の実験においても3%クエン酸ナト

リウム液の使用に関しては、とくに支障はないとしている。

本実験においても、希釈液及び精漿が精子数濃度に与える影響について検討した。その結果、異なる希釈液にて測定した精子数では、血球計算盤との適合性が3%クエン酸ナトリウム液で最も良好であったことより、希釈液は3%クエン酸ナトリウム液の使用が望ましいと考えられた。また、精漿濃度が濃い精液ほど簡易精子数測定器で測定した場合、実際の精子数より多くなることが懸念されたが、精漿濃度に係らず、血球計算盤で算定した精子数と簡易精子数測定器で測定した精子数に大きな差は見られなかった。さらに、品種間において精漿の透過率はランドレース種でかなり高い値を示したが、豚では個体毎で精漿の状態は異なる<sup>7)</sup>ことから個体差によるものと考えられた。

今回作成した本プログラムを内蔵した簡易精子数測定器は、生産現場での活用を考慮して取り組んできた。簡易に精子数を測定できることはもちろん、光源にLEDランプを用いたことで小型化、軽量化を図ることができた。さらに、本測定器は動物用薬事認可を取得、製品化されており、多くの現場に導入されていることから生産現場での活用が期待できるものとする。

国内の人工授精の発展と普及において、精子数を簡単に、短時間に、なおかつ正確に算定することは欠かすことのできない技術といえる。とくに、生産現場での作業の手間を大きく省くためにも、採取した精液を原液の状態ですぐに精子数を測定できるような装置への取り組みの

期待は大きい。今後、本測定器をはじめ、前記のようにさらに測定器を改良したものが人工授精普及の一翼を担うことを期待する。

最後に、本研究を行うにあたりご協力下さいました富士平工業株式会社の渡辺高秀部長、中野貞雄開発推進役に深く感謝します。

## 引用文献

- 1) 社団法人日本養豚協会 (2009)、養豚基礎調査全国集計結果：5
- 2) 社団法人畜産技術協会 (2004)、牛の人工授精マニュアル：39-69
- 3) 丹羽太左衛門・橋爪 力・柴田道明 (1981)、分光光度計による豚精液の精子数簡易急速算定法について、岩手大学農学部家畜人工授精研究室報告：66-78
- 4) C. R. Bradley, R. H. Dutt (1967), Progr. Rep. Ky Agric. Exp. Stn. 170：58
- 5) 旦野勇吉・丹羽太左衛門・瑞穂 当 (1965)、日豚研誌2：11
- 6) A. Weber, E. Müller (1978), Wien. Tierärztl. Mschr. 65：346
- 7) 島田昌之・岡崎哲司 (2010)、豚凍結精液を用いた人工授精における精漿の作用と人工精漿の開発、日本SPF豚研究会誌36：10-15