

Ⅲ．凍結精液技術

1．凍結精液作製に当たって

（１）凍結に対する精子の特性

凍結精液技術は、50 年前にグリセリンと卵黄の耐凍効果が認められ、牛では実用化に至っている。豚でも OEP（主成分は界面活性剤のラウリル硫酸ナトリウム）が加わると卵黄の耐凍効果を増大させることが認められ、技術はある程度確立しているが、個体によっても耐凍性に違いが見られるため、凍結精液よりも液状精液の方が広域利用の場合で利用されている。

鶏の場合は、グリセリンを最終濃度 7～8%程度にすると融解後の生存率は優れているが、希釈精液の中にグリセリンが 2%以上含まれていると受精率が極端に低下するため融解後に除去される。また希釈液に、卵黄を含んでいると精液は活発に運動するが受精率は逆に低くなることが知られている。グリセリンを含んだ液で希釈する際には、希釈によるショックを軽減させるため段階希釈を行う必要があり、特にグリセリンの除去に対して慎重に行う必要がある。ここで一気に希釈すると精子が希釈によるショックを受け、精子は運動していても受精能力が無くなってしまう。DMSO（ジメチルスルホキシド）やメチルアセトアミドの場合は、融解後の生存率は低いものの、ある程度の濃度であれば除去する必要はない。DMSO の場合では、新鮮な原精液であれば 7%濃度でも受精率は低下しないが、凍結融解精液では 7%濃度ではほとんど受精しない。そのため、DMSO の場合は、3～4.5%の最終濃度で行われる。

（２）凍結精液作製のための採精

雄は頻繁に採精されることによって、精子自体の耐凍性が増してくる。そのため、採精をしばらく行われていない雄から凍結精液を作製する時には、作製する 1～2 週間前から 1 日おき程度の頻度で採精を行う。

採精時に混入する透明液は、凍結に関して害に働くため出来るだけ入れないようにする。全く混入しないということは無理なので多少の混入は仕方がないが、無理に量を取ろうとすると透明液が多く入るので、量を取ろうとせずに濃い精液を取るようにする。

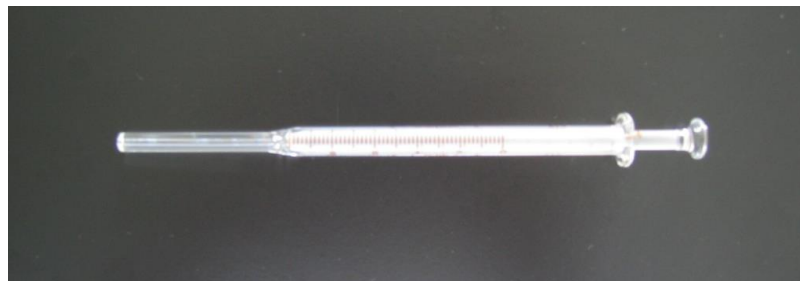
（３）膣深部注入

卵管膣部の浅い部分での注入では、多くの量を注入すると精液が逆流し外に出てしまう。そこで逆流を防ぐ方法として深部注入を行う。また、精子活力が弱い場合は深部注入すると受精率も上がる事が多いので、凍結融解精液の場合は膣深部注入を通常行う。

注入は保定者と注入者の２人で行うことが基本で、注入器の先が卵管に入ったら、保定者は雌鶏の両足を広げ腹部の圧迫をゆるめる。この時、卵管は元に戻った状態で注入器はまっすぐ突き当たるところまで入れ精液を注入する。保定者はしばらく雌鶏の足を広げたまま総排泄腔をやや上向きにし逆流の無いことを確認して静かにケージに戻す。



深部注入



鶏精液注入器（FHK 製）

深部注入を行うときの器具は、図のような注入器や、ガラス管をゴムやシリコンのチューブでシリンジに繋げて用いると良い。

協道コラム 凍結方法の種類

凍結は大きく、緩慢凍結、急速凍結、超急速凍結に分けられます。緩慢凍結は1分間に1℃ずつ下げていくなどのプログラムフリーザーを用いる方法と発泡スチロールの容器などに入れて-80℃の超低温フリーザーに入れてゆっくりと凍結させる方法で、哺乳類の受精卵や培養細胞など脱水させながら冷却する時に用いられます。発泡スチロール容器よりも使いやすい特殊な容器も市販されています（バイセルなど）。超急速凍結は、液体窒素の中へいきなり投入して凍結させる方法で、凍結保護物質を多量に含む溶液を用いるガラス化凍結法として知られています。この時は専用ストローを使用しないと液体窒素に投入しただけでストローは破裂します。急速凍結は、液体窒素蒸気で凍結させる急速ストロー法が有名で、ドライアイスで凍結させるペレット法もこれに分類されます。精子は水分が少なく凍結の際には特に脱水させる必要が無いため、種を問わず精液の凍結には急速凍結法が広く行われています。精子のガラス化凍結は、多量の凍結保護物質が精子に悪影響を及ぼすことと融解後の除去が更に複雑になることから行われていません。

保存は液体窒素中で保存するのが一般的ですが、-130℃まで冷却できる超低温フリーザーでは液体窒素と同様に保存ができます。

2. 凍結精液作製法

(1) 家畜改良センター岡崎牧場の方法（メチルアセトアミド、急速ストロー法）

【凍結】

- ① マッサージ法により精液を試験管に受け、すぐに 5℃ に冷却した HS-2 液を精液と同量添加し、5℃ で 30 分間静置する。
- ② メチルアセトアミドを 15% 添加した HS-2 液を 2 次希釈液として、① の希釈精液に 1:1 の割合で混合し、0.5ml の凍結精液用ストローに希釈精液を充填して、ストローパウダーで栓をする。
- ③ 発泡スチロール容器にストロー架台のためのステンレス製の試験管立てを入れ、液体窒素をストローと液体窒素の液面との距離 4～4.5cm となるように液体窒素を入れる。
- ④ ストローをストロー架台に横向きに並べて凍結する。発泡スチロール容器の蓋をして 30 分静置した後、ストローを液体窒素中に投入し、しばらく静置したのち液体窒素保管容器に移し替えて保存する。

【融解】

- ① 凍結精液の融解は鶏舎内で行う。
- ② 5℃ の水にストローを浸漬し、ストローの周りについた氷を取り除き、融解したら試験管に精液を移す。一回に溶かす量は、ストロー 4～5 本とする。
- ③ 融解精液は膣深部に 0.3ml / 1 羽注入する。週 2 回（3～4 日おき）の注入で、6～8 割の受精率が得られる。

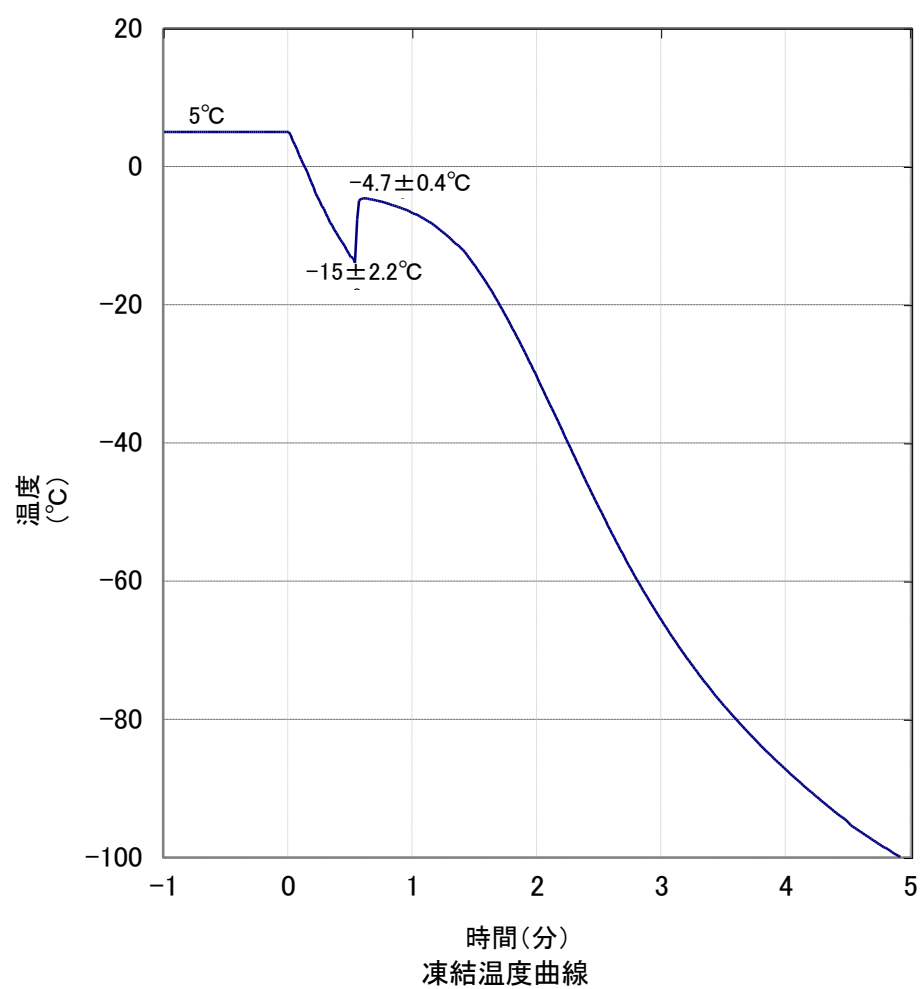
HS-2 液の組成表		g/DW100ml
グルコース		0.2
トレハロース・2H ₂ O		3.8
グルタミン酸 Na・H ₂ O		1.2
酢酸 K・無水		0.3
酢酸 Mg・4 H ₂ O		0.05
クエン酸三 K・H ₂ O		0.08
BES 注 1)		0.4
Bis-tris 注 2)		0.4
硫酸ゲンタマイシン		0.001
PH		6.8
浸透圧(mOsm/kg)		350

注 1) BES (ベス) : N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸

注 2) Bis-tris (ビストリス) : ビス(2-ヒドロキシエチル)イミノトリス(ヒドロキシメチル)メタン



液体窒素蒸気による凍結



【凍結精液作業】



① 5℃の水槽を準備し、鶏舎内で精液と同量の1次希釈液を入れて30分間静置する



② 2次希釈液を添加し、良く攪拌する。



③ ストローに充填する。図は、口で吸引する方法。必ず空気層を設けること。大量に作製するときは吸引ポンプを用いる。



④ 液体窒素の蒸気で凍結。中の架台は試験管立て。



⑤ 鶏舎内で融解。1回に溶かす量は4～5本程度。



⑥ 膣深部注入

(2) Lake の方法 (グリセリン、プログラムフリーザー法)

【凍結】

- ① 精液 0.15ml を、小試験管に入れる。
- ② 3～5℃で 5 分間静置する。
- ③ 凍結用のグリセリンを含むレーク液 0.45ml を加え良く攪拌する。
- ④ 1ml の凍結用アンプルに希釈精液 0.6ml を入れて蓋をしめる。
- ⑤ 5℃のアルコールバスにセットする。
- ⑥ アルコールバスを用いるプログラムフリーザーで-1℃/分で-35℃まで冷却する。
- ⑦ 液体窒素の中に投入し保存する。

【融解】

- ① 液体窒素から出したアンプルを 5℃以下の水で融解し、3～5 分間隔で 0.06、0.16、0.3、0.55、1.13、1.4ml の再希釈用のレーク液で希釈を行う。
- ② 冷却遠心機で 5℃、700g、15 分間遠心する。
- ③ 上清を除去したのち 0.1ml の再希釈用のレーク液を加え、原精液濃度に戻す。
- ④ 15 分以内に 0.15ml の精液を雌の卵管腔部の深部へ注入する。

レーク液の組成表		g/100ml DW
	凍結用	再希釈用 ¹⁾
グルタミン酸 Na・H ₂ O	1.92	1.92
グルコース ²⁾	0.8	0.6
酢酸 Na・無水		0.51
酢酸 K・無水	0.5	
酢酸 Mg・4 H ₂ O		0.08
クエン酸三 K・H ₂ O		0.128
ポリビニルピロリドン ³⁾	0.3	
グリセリン	13.64g (10.8ml)	
pH		7.23
浸透圧(mOsm/kg)		360

1) 凍結では再希釈用で用いるが、凍結しない場合でも通常の希釈液としても用いられる。

2) 1983 年以降の文献ではグルコース、それ以前ではフルクトースを用いている。

3) 水分を吸いやすく固まるため、デシケーターで保存する。

(3) Sexton の方法 (DMSO、プログラムフリーザー法)

【凍結】

- ① 25℃に保温した試験管で精液を採取する。
- ② 25℃のベルツビル家禽精液希釈液で精子数が 10 億/1ml になるように希釈する。
- ③ 希釈精液を 5℃で 2 時間静置する。
- ④ 2 時間の静置後 DMSO^{注1)} を最終濃度が 4%になるように添加し攪拌する。
- ⑤ 希釈精液を 0.5ml ストローに充填し封をする。
- ⑥ 5℃のアルコールバスにセットする。
- ⑦ アルコールバスを用いるプログラムフリーザーで-1℃/分で-20℃まで冷却する。
- ⑧ 液体窒素の蒸気で-80℃まで冷却した後、液体窒素中に投入し保存する。

【融解】

- ① 液体窒素から出したストローを氷水中で 4～5 分かけて溶かし試験管に移す。
- ② 雌 1 羽当たり精子数 3 億を注入する。

ベルツビル家禽精液希釈液 (BPSE) の組成表

g/100ml DW

グルタミン酸 Na・H ₂ O	0.867
フルクトース	0.5
酢酸 Na・3 H ₂ O	0.43
塩化 Mg・6 H ₂ O	0.034
クエン酸三 K・H ₂ O	0.064
リン酸水素二 K・3 H ₂ O	1.27
リン酸二水素 K・無水	0.035
TES ^{注2)}	0.195
pH	7.5
浸透圧(mOsm/kg)	333

注1) DMSO (ディムソー) : ジメチルスルホキシド (CH₃)₂SO₂

注2) TES (テス) : N-トリス (ヒドロキシメチル) メチル-2-アミノエタンスルホン酸

※ベルツビル家禽精液希釈液 (BPSE) 作製に当たっての注意点

リン酸水素二 K と塩化 Mg を混ぜると沈殿してしまい溶解しなくなる場合があるので、塩化 Mg とクエン酸三 K の混合溶液を別に溶解しておき、最後に他を全て溶かした液とを混合する。

(4) Terada の方法 (グリセリン、ペレット法)

【凍結】

- ① 採取した精液を 5℃で 15 分静置する。
- ② 9.33%にグリセリンを添加した H-D 液で精液を 4 倍希釈する。この時、グリセリンを添加した H-D 液の使用量を 10 等分し 1 分置きに 10 回の段階希釈を行う。
- ③ 希釈精液は 5℃で 10～15 分間静置する。
- ④ ドライアイスの表面に半田鋺等で幅と深さ各 1cm 程度の穴を必要数開ける。
- ⑤ 連続分注器で開けた穴に対して 0.2ml 落としペレット状に凍結させる。この時、連続分注器の先端を少し切って太くして行う。先端が細いと分注による勢いが強すぎるため、上手く穴に入らずにこぼれてしまう。
- ⑥ ⑤のドライアイスの上に別のドライアイスを上に被せて 30～60 分間静置する。
- ⑦ 発泡スチロール容器に液体窒素を入れて、凍結させた精液を液体窒素中に落とす。この時、発泡スチロールが白い場合はアルミホイルを底に敷くと凍結精液がどこに落ちたか見やすい。
- ⑧ 凍結したペレット状の精液をアンプルに移して、液体窒素中で保存する。

【融解】

- ① 50ml の遠沈管に凍結精液のペレットを移し、37℃のお湯で遠沈管を良く回しながら半融解させる。完全に溶けると精液の温度が上昇しすぎてしまうので良くない。
- ② 遠沈管を 5℃の水槽に移し、ここで精液を完全に溶かす。
- ③ 再希釈用の H-D 液で段階希釈による再希釈を行う。融解精液の 1/8 量を 5 回、融解精液の 2/8 量を 5 回、融解精液の 3/8 量を 5 回、融解精液の 4/8 量を 5 回、融解精液の 5/8 量を 5 回の順に 1 分間隔で計 25 回の段階希釈を行う。
- ④ 再希釈された融解精液を冷却遠心機で 5℃、700g、20 分間遠心し、上清を除去する。
- ⑤ 沈殿精子に 0.1～0.2ml の再希釈用の H-D 液を 1 分置きに加え、採取時の原精液濃度に戻し、雌 1 羽当たり 0.2ml を膣深部に注入する。

※ H-D 液

成分表は公開されていない。共立商事株式会社（東京）から市販されている。

(5) Hujihara の方法 (DMSO、急速ストロー法)

【凍結】

- ① 採取した精液を小試験管に入れ 2～3℃の氷水中に入れる。
- ② DMSO^{注1)} を 5%添加した GRH 液を精液の 2 倍量を添加し混合する。
- ③ 0.25ml の凍結用ストローに希釈精液を 0.15 ml 充填し封をする。
- ④ ストローホルダーを液体窒素の液面との距離を 1～2cm にセットして、1 分間液体窒素の蒸気で凍結させる。
- ⑤ 液体窒素中に投入して保存する。

【融解】

- ① 0℃の氷水で融解する。
- ② ストローをカットし、通常の人工授精と同じように出来るだけ早く注入する。

GRH 液の組成表		g/DW100ml
グルタミン酸 Na・H ₂ O		1.87
ラフィノース・5 H ₂ O		5.945
HEPES ^{注2)}		0.715

注1) DMSO (ディムソー) : ジメチルスルホキシド (CH₃)₂SO₂

注2) HEPES (ヘペス) : N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸

（６）農業生物資源研究所の方法（グリセリン、急速ストロー法）

【凍結】

- ① 凍結作業は鶏舎内で行う。鶏精子は採取後約 15 分間は寒冷衝撃に対する抵抗性があるため、精液採取からこの凍結まで 15 分以内に行う。
- ② 採取した精液は、5℃の凍結用 Lake 液で 5～10 倍希釈し、0.5ml の凍結用ストローに充填して氷水に投入する。
- ③ キムタオル等でストローに付いた水を拭き取りながら、液体窒素の入った発泡スチロール容器の試験管立てに横向きに並べる。この時のストローと液体窒素の液面との距離は 3～5cm にする（43 頁写真参照）。
- ④ 10 分間静置後、液体窒素中にストローを投入する。

【融解】

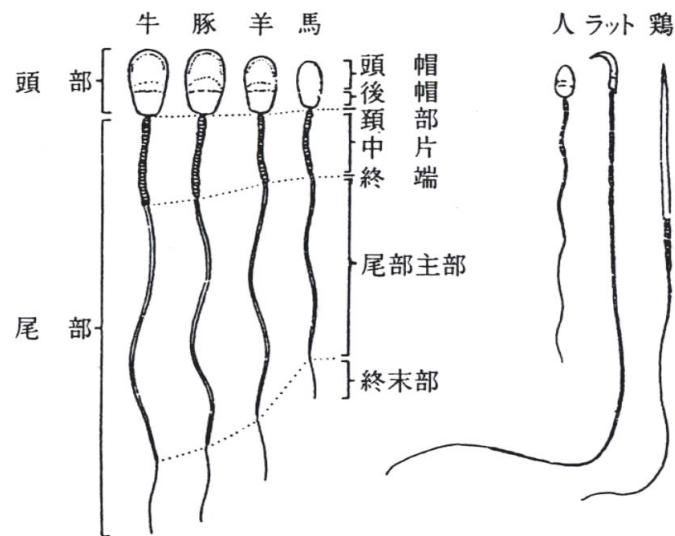
- ① 5℃の水で融解する。ストロー表面の氷は手で取り除く。
- ② 融解精液の 1/8、2/8、3/8、4/8、5/8 量のグリセリン不含 Lake 液を 1 分ごとにそれぞれ 5 回ずつ添加する。
- ③ 希釈した精液は、5℃、500g、10 分間の遠心分離を行い、上清を除去しながら精子濃度を 1～3 億／0.2ml に調整する。
- ④ 5℃に冷却保存しながら現場に運び、膣深部に 0.2ml／羽を注入する。

協道コラム 精子の低温ショック

精子を急速に低温（5℃）に曝すと細胞膜の半透性が失われ、運動性の低下や、精子頭部の形態異常が起こり受精能力は低下します。低温ショックに対する抵抗性は動物種によって大きく異なり、ヒトやニワトリの精子は強く、ウシやヒツジは弱く、ブタ精子は特に弱く、15℃以下では運動性が著しく低下します。精子頭部が平たくて大きいものほど低温ショックに弱い傾向があるようです。卵黄や脱脂粉乳などには温度衝撃を保護する効果があり、卵黄の成分の中性脂肪、リポタンパク（ β -リポビテリン）、リン脂質（レシチン）、糖タンパク（リベチン）に保護作用があるとされています。ニワトリ精子は元々低温ショックに強く、卵黄や脱脂粉乳が入ると受精率が低下するので希釈液には添加しません。

ニワトリ精子は低温ショックに強いのですが、特に精液採取後約 15 分間は温度の急激な変化にあっても低温ショックを受けにくい時期であり、この間に凍結まで行う方法もあります。一方、ウシ精子の実験で、5℃に長時間置くことによって精子の耐凍性が高まることが知られており、希釈液にもよりますがニワトリ精子においても5℃に長く置くことで耐凍性は高まっている様です。そのようなことから、岡崎牧場では精液採取後すぐに 5℃に落とし、30 分間 5℃で静置したのち凍結を行う方法をとっています。

各家畜の精子



家畜繁殖学誌より

3. 精液希釈液

(1) 必要成分

精液希釈液に最低含まれていなければならない物質は、代謝基質と緩衝剤で、凍結保存の場合では凍結保護物質が加わり、抗菌剤も加わっている方が良い。哺乳類精子の凍結保存では、塩害が気にされており凍結保存用としては Na や K を添加しない場合が多いが、鳥類の精子では気にする必要はない。ただし、Cl が多く入るほど頸曲がり精子を増加させるので、希釈液には添加しない方が好ましい。Na と K の比率や絶対量で精子の運動性が変わることはない。pH は、ほぼ中性であれば問題なく、ニワトリの場合は pH7.4 程度で最も活発に運動する。

(2) 代謝基質

単糖類のグルコースやフルクトースが一般的に利用され、ソルビトールも代謝基質として利用される。2 糖類や 3 糖類、5 炭糖は代謝基質にはならない。グルタミン酸や酢酸は緩衝剤としての効果と代謝基質としての役割がある。グルタミン酸は、頸曲がり精子の抑制に働くとされており、ニワトリ精液の希釈液には欠かせない。ただし、クエン酸ほどではないものの、グルタミン酸も量が多くなるほど精子の運動性を阻害する。グルコースのみの希釈液で保存すると乳酸がたまることにより pH は低下するが、グルタミン酸 Na のみの希釈液で保存するとグルタミン酸の消費によって pH は上昇する。酢酸 Na などでも同様であり、液状保存の場合には、糖類とグルタミン酸や酢酸の比率によって pH の変動が左右されることになる。酢酸は代謝基質として利用されるが濃度がある量を超えると異常な運動をする精子が増える。ニワトリ精子は体外で高い温度にすると活発に運動した後不動化を起こすが、酢酸イオンがあると不動化するまでの時間が延長する。

(3) 緩衝剤

pH は中性付近で不安定で酸性やアルカリ性のものが加わることで大きく変動してしまう。この変動を緩やかにするものを緩衝剤と呼んでおり、精液希釈液にはグルタミン酸や酢酸の他に、クエン酸やリン酸、Good バッファーが主に利用されている。

クエン酸は多く添加されるほど精子の運動性は低下する。リン酸水素二 K やリン酸水素二 Na は、ある程度入ると精子の運動性が活発になり液状保存したときの精子の寿命が延長するが、多く入りすぎると奇形精子が増加するので適量に抑える必要がある。リン酸水素二 K やリン酸水素二 Na はアルカリ性が強いので、リン酸二水素 K やリン酸二水素 Na などの酸性物質と併用する。Good バッファーは精子活力に大きく影響し、pH を 7.4 と一定にした場合の効果は BES>TES>HEPES の順で、BES が最も精子活力を高める。ただし、どの試薬もある程度の添加までは精子の運動を活発にするが、一定量を超えると運動性は逆に悪くなる。

(4) pH 調整剤

アルカリ性の強い試薬としては、水酸化 Na や水酸化 K があるが緩衝効果が無いため微調整は行いにくい。リン酸水素二 K やリン酸水素二 Na は緩衝効果もあるため調整しやすい。リン酸水素二 K は水に溶けやすいが、リン酸水素二 Na は水に溶けにくい。Good バッファーの中では tris と Bi-tris があるが、tris の方がアルカリ性が強い。酸性試薬としては、リン酸二水素 K やリン酸二水素 Na がある。BES や TES も酸性を示す。

(5) 凍結保護物質

凍結保護物質には細胞透過性と不透過性の 2 種類があるが、単に凍結保護物質と言った場合は、グリセリンや DMSO などの細胞透過性の凍結保護物質を指している場合が多い。ニワトリ精子には、グリセリンが最も効果的だが、1%以下の濃度に落とさないと低い受精率となるので融解後にはグリセリン除去を行う必要がある。DMSO は融解後に除去する必要が無いが、融解後には出来るだけ早く注入する必要がある。また濃度が 7%まで上げると、未凍結精液であれば通常の受精率が得られるが、融解精液であると受精率は極端に低くなる。エチレングリコールやプロパンジオールはニワトリ精子にはほとんど効果が無い。ブタントリオールはグリセリンの次に効果があるが、融解後にやはり除去する必要がある。ダイレクト注入が出来るものとしては、アミド類と DMSO があり、アミド類としては、メチルアセトアミド (MA) >ジメチルホルムアミド(DMF) >ジメチルアセトアミド(DMA)の順に効果が認められ、DMSO の効果は DMA と DMF の中間となる。液状の凍結保護物質は、重さで記載する場合が多いので容量へ変換する必要がある。変換は重さを比重で割って算出する。Lake 液の場合はグリセリン 13.64g を添加するので、 $13.64 \div 1.26 \div 10.8\text{ml}$ と換算できる。粘性が強いグリセリンの分注は、ディスポのシリンジを用いると行いやすい。

細胞不透過性の凍結保護剤としては、糖類の効果が認められている。中でも 2 糖類のトレハロースが最も優れており、その他の 2 糖類ではスクロースやラクトース、3 糖類ではラフィノースにも効果がある。単糖類の中では、グルコースが優れている。糖類は一般に溶けにくい特徴を持つが、トレハロースは非常に溶解しやすい。

耐凍剤の質量と比重

	分子量	比重 (20℃)
グリセリン (Gly)	92.09	1.260
ジメチルスルホキシド (DMSO)	78.14	1.103
ジメチルアセトアミド (DMA)	87.12	0.943
ジメチルホルムアミド (DMF)	73.09	0.950
メチルアセトアミド (MA)	73.09	0.957

（６）抗菌剤

衛生的な観点から、希釈液には抗菌剤を添加した方が良い。ただし添加量が多すぎると精子への悪影響もあるので添加量に注意が必要である。ニワトリ精液で、ペニシリン、ストレプトマイシン、アミカシン、ジベカシン、ゲンタマイシンの単体及び混合で調査した結果、ゲンタマイシンの単体 0.001% が精子への影響が無く抗菌性も優れていた。ゲンタマイシンは 10mg/1ml の溶液も市販されている。

（７）その他の成分

哺乳類精液の希釈液では卵黄が添加されるが、鳥類の場合、精子は活発に動くが受精率は低下するため添加しない。OEP などの界面活性剤も卵黄が加わった時に効果が増大するものなのでこれも添加の効果がない。ブタの精液希釈液に添加されるキレート剤の EDTA は、ニワトリ精液希釈液に添加すると精子の運動は停止する。カフェインはブタの精子の運動性を高めるがニワトリ精子には効果はない。ニワトリの精液希釈液にはタンパク質は添加しない方が良いが、ウシ血清アルブミン（BSA）の 0.1% 添加は、精子の体積が増加し、活発な精子の運動性が維持されると言われている。ただし、BSA の添加された希釈液は、泡が立ちやすいといった問題もある。BSA とラフィノースが加わった希釈液は、5℃で保存するとラフィノースが沈殿するので、両者を混合した希釈液は作らない。

（８）既存の精液希釈液の特徴

BPSE（ベルツビル家禽精液希釈液）は、液状保存に特に適しており BPSE で希釈すると希釈前では運動性の悪かった精子も運動を再開するものもある。また、希釈倍率を 5～6 倍にしても運動性は良い。液状保存の場合は、3 倍希釈で 5℃保存の条件で 1 日程度の保存が可能である。ただし、液状で保存する場合も凍結精液を作製するときと同様に透明液を出来るだけ入れないように注意する必要がある。また、この希釈液を作製する際には、リン酸と Mg を同時に溶解すると沈殿を起こして溶解しなくなる場合があるので、作製する際にはクエン酸と Mg を別に溶解しておき、残りの溶解液と最後に混ぜる様にする。

Lake 液は、5 倍希釈まですると精子の運動性は落ちてしまうので、最大で 4 倍希釈までとする。液状保存では Lake 液は BPSE よりも劣っているが、凍結保存する場合は Lake 液の方が優れている。Lake 液は液状保存には不向きで、3 倍希釈 5℃で 1 日程度保存すると精子の運動は停止する。また、凍結用と液状保存用（再希釈用）の 2 種類があるが、液状保存用に耐凍剤を加えれば凍結の場合でも使用できる。リン酸を含まないので、作製の時はどのように融解しても沈殿を起こすことは無い。

MnA（ミネソタ A）は、ミネソタ州立大学で開発された希釈液。緩衝剤が複雑に含まれているためか運動性は非常によい。添加する試薬が多いことと水酸化 K が入るなど作製しにくい。

GRH 液は、Hujihara が凍結精液で使用した希釈液である。添加するグルタミン酸 Na、ラフィノース、HEPES の頭文字を取った名前となっている。融解後の精子活力は非常に悪いが、正常精子が多い特徴がある。

Wilcox のリン酸緩衝液は、非常に古くから用いられている希釈液であるが現在ではあまり用いられていない。この希釈液は代謝基質を含まないため、単体では運動持続性が良くないため、6%グルコース液を 10%添加した希釈液などが使用される。また、リン酸 Na は水に溶けにくいといった欠点もある。

(9) 新希釈液の試作法

これと言った決まった方法が有るわけではないが、ここでは比較的簡単に作製できる方法として、目標の浸透圧に近い溶液をいくつか作製しておき、それを混合して作製する方法を紹介する。

まず、添加したい試薬を用いて最終的に作製したい浸透圧に近い単体での溶解液を作製する。次に、それらの混合割合を変えた溶液を何種類も作製し、精液を実際に希釈してみて適量範囲を調査する。希釈液の基本は代謝基質と緩衝剤なので、初めは、代謝基質として利用される糖類の溶液と緩衝作用のある物質の溶液を作製し、2つの溶液の混合割合を変えたもので精子を実際に希釈して、精子生存率、精子活力、運動持続性を、希釈直後から時間の経過に伴う変化を見ながら適量範囲を調査する。

糖類の割合が決定したら糖類溶液の割合を一定にして、種類の異なる緩衝剤について割合を変えて同様に適量範囲を調査する。試薬によっては、溶液を混合することで浸透圧が大きく低下する場合があるので、混合した場合は浸透圧の測定を行い確認する。また、試薬によっても pH が異なるので、強酸性や強アルカリ性の物質は最終的な目標に近い値になるように混合した溶液を作製しておく。ここで、pH を一定にしないと試薬の濃度の影響よりも pH の影響が大きく出てしまう。凍結用の場合は、DMSO など凍結保護効果の小さい物質を加えて、融解後の生存率や精子活力を調査するが、この場合の浸透圧の測定は、DMSO などの凍結保護物質を含まない溶液で測定する。

鶏精子の希釈液としては、浸透圧が 330~380mOsm/kg 程度が望ましく、液状保存としては低めが、凍結用としては高めの浸透圧が良いとも言われる。グルコースは 6.0%で約 355mOsm/kg となり、金属イオンを含まない試薬であれば同じモル濃度で浸透圧もほぼ等しくなる。グルタミン酸 Na であれば 3.5%溶液で約 350mOsm/kg で、グルタミン酸 Na の様に 1 価の金属イオンの場合であれば同じモル濃度で浸透圧もほぼ等しくなる。クエン酸三 Na であれば 3.7%溶液で約 350mOsm/kg となるが、Mg イオンが加わると浸透圧が低下するので、Mg イオンを加えたい場合は、Mg とクエン酸の混合の等張液を作製しておく。リン酸 Na やリン酸 K は強いアルカリ性や酸性を示すので、ほぼ中性の混合溶液を作製しておく。グルタミン酸 Na、クエン酸 K、酢酸 Na などはほぼ中性を示す。糖類は弱酸性だが緩衝効果が無いので中性と見なして良い。HEPES はほぼ中性、TES は弱酸性、BES は TES よりも酸性を示す。

最後に、混合液の浸透圧と pH を測定し、理想に近いように試薬を添加したり、蒸留水を加えるなどを行い pH や浸透圧の調整を行う。また、作製する側に立ち出来るだけ容易に作製できる様に添加割合を可能な範囲で修正する。ポリビニルピロリドン (PVP) や牛血清アルブミン(BSA)など分子量が 10000 以上といった高分子化合物は、浸透圧への影響が少ないため、添加したい場合は等張液を作製する必要はなく、作製した希釈液にそのまま添加すればよい。

鶏精液の場合、3 倍希釈であれば、実はかなり単純な希釈液でも使える。希釈してすぐに受精する場合であれば、グルコースやグルタミン酸 Na の単体溶液でもかまわない。しかし、より高い受精率を求めたり、希釈して時間が経過したり、希釈倍率を大きくしたりするとなかなか良いものは出来ない。また、液状保存と凍結保存の兼用希釈液は、おそらく良いものは作製できないので用途にあわせて作製した方がよい。

単体溶液での濃度、浸透圧、pH

	濃度 (g/100ml)	浸透圧 (mOsm/kg)	pH
グルコース・無水	6.0	355	5.5
グルタミン酸 Na・H ₂ O	3.5	350	6.8
クエン酸三 Na・H ₂ O	3.7	350	7.4

- ・ 他の糖類などの非電解質や、HEPES、Tris などの緩衝剤は、グルコースと同じモル濃度で同じ浸透圧となる。
- ・ 酢酸 Na、酢酸 K、塩化 Na などの 1 価の金属イオンのものは、グルタミン酸 Na と同じモル濃度で同じ浸透圧となる。
- ・ クエン酸三 K など、3 価の金属イオンのものは、クエン酸三 Na と同じモル濃度で同じ浸透圧となる。
- ・ 糖類は酸性を示すが、緩衝効果が無いので緩衝剤が加わるとそれに左右されるので、pH は気にしなくて良い。

2 種類の試薬の混合溶液での濃度、浸透圧、pH

	濃度 (g/100ml)	浸透圧 (mOsm/kg)	pH
酢酸 Mg・4 H ₂ O	1.25	340	7.0
クエン酸三 K・H ₂ O	2.0		
リン酸水素二 K・3 H ₂ O	3.0	360	7.1
リン酸二水素 K・無水	0.5		

- ・ Mg とクエン酸の等張液を混合すると浸透圧が低下するため、あらかじめ混合の等張液を作製しておく。
- ・ リン酸水素二 K は強いアルカリ性、リン酸二水素 K は強い酸性なのであらかじめほぼ中性にした混合溶液を作製しておく。

鶏精液希釈液の組成表

	g/100ml DW					
	HS-2	Lake	BPSE	MnA	GRH	Wilcox
グルコース・無水	0.2	0.6	—	1.0	—	—
フルクトース・無水	—	—	0.5	—	—	—
トレハロース・2H ₂ O	3.8	—	—	—	—	—
ラフィノース・5H ₂ O	—	—	—	—	5.945	—
ソルビトール・無水	—	—	—	0.07	—	—
グルタミン酸 Na ・H ₂ O	1.2	1.92	0.867	0.21	1.87	—
グルタミン酸 K ・H ₂ O	—	—	—	0.6	—	—
酢酸 Na ・無水	—	0.51	—	0.25	—	—
酢酸 Na ・3H ₂ O	—	—	0.43	—	—	—
酢酸 K ・無水	0.3	—	—	0.21	—	—
クエン酸三 K ・H ₂ O	0.08	0.128	0.064	0.05	—	—
酢酸 Mg ・4H ₂ O	0.05	0.08	—	—	—	—
塩化 Mg ・6H ₂ O	—	—	0.034	—	—	—
硫酸 Mg ・7H ₂ O	—	—	—	0.035	—	—
リン酸水素二 K ・3H ₂ O	—	—	1.27	0.7	—	—
リン酸二水素 K ・無水	—	—	0.035	0.16	—	—
リン酸水素二 Na ・12H ₂ O	—	—	—	0.08	—	—
リン酸水素二 Na ・無水	—	—	—	—	—	1.634
リン酸二水素 Na ・H ₂ O	—	—	—	—	—	0.516
水酸化 K	—	—	—	0.1	—	—
HEPES	—	—	—	0.4	0.715	—
TES	—	—	0.195	0.4	—	—
BES	0.4	—	—	0.3	—	—
Bis-tris	0.4	—	—	—	—	—
硫酸ゲンタマイシン	0.001	—	—	—	—	—
pH	6.8	7.23	7.5	7.1		7.2
mOsm/kg	350	360	333	370		

家畜各種の精液希釈液

		g/100ml DW				
家畜名 (希釈液名)		ウシ	ウマ	ヒツジ・ヤギ	ブタ	
		(材料名)	(HGH・27)	(材料名)	(ホルミオン)	(モナ)
卵黄	(v/v %)	20.00	7.00	—	—	—
白色卵黄粉		—	—	4.00	—	—
脱脂粉乳		—	—	—	3.00	—
クエン酸 Na		1.80	(0.25)	1.80	—	0.69
重炭酸 Na		—	—	0.10	0.24	0.10
リン酸水素二 Na		0.04	—	0.10	—	—
クエン酸 K		0.04	—	0.05	—	—
塩化 K		—	0.025	—	—	—
グルコース		0.97	5.00	1.00	9.00	2.75
グリシン		0.48	0.70	0.10	—	—
クエン酸		—	—	—	—	0.29
EDTA・2Na		—	—	—	—	0.235
トリス		—	—	—	—	0.565
ゼラチン		0.02	0.10	0.05	—	—
グリセリン		0.24	—	0.70	—	—
スルファメサジン Na		—	—	0.05	0.40	—
ホモズルファミン		0.10	—	0.10	0.20	—
ペニシリン	(U/ml)	900	500～700	—	—	—
ストレプトマイシン	(mg/ml)	900	500～700	—	—	—
クロール・ロマジン・S・オキサド		0.008	0.01	0.03	—	—
CO ₂		飽和	—	適量	—	—