

牛精子の受精能に関する研究

誌名	兵庫県立畜産試験場研究報告
ISSN	03883116
著者名	福島,護之 富永,敬一郎 太田,垣進 寺田,邦光 金子,史郎
発行元	兵庫県立畜産試験場
巻/号	22号
掲載ページ	p. 47-54
発行年月	1985年10月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



牛精子の受精能に関する研究 (第1報)

透明帯除去ハムスター卵子へのイオノホアA-23187 処理牛精子の侵入能について

福島護之・富永敬一郎・太田垣進
寺田邦光*・金子史郎*

緒 言

Yanagimachi et al. (1976)¹⁾ は人精子の受精能を透明帯除去ハムスター卵子を用いて間接的に判定できることを報告した。現在、この方法は通常の診断に利用されている。^{2,3)}

一方 Bousquet et al.⁴⁾ は高イオン強度 (以下 HIS) 液を用いた実験系で牛凍結精液の受精能を透明帯除去ハムスター卵子を用いて判定できることを報告している。しかし、Viriyapanich and Bedford⁵⁾ や Bondioli and Wright⁶⁾ は、高イオン強度液による処理のみでは先体反応の誘起が完全ではないことを報告している。

また、高橋と花田⁷⁾ は体外受精系における精子のイオノホア A-23187 処理効果の検討に透明帯除去ハムスター卵子への精子侵入率を受精能獲得および先体反応誘起の指標として利用している。

本試験では透明帯除去ハムスター卵子を用いた精子受精能判定を行うためにイオノホア A-23187 処理を中心とした精子受精能獲得および先体反応誘起の方法を検討し、さらに凍結融解処理、個体差、精液採取日などによる精子の条件が、透明帯除去ハムスター卵子への精子侵入率に与える影響について検討した。

材料および方法

1. 供試培養液

ハムスター卵子のための基礎培養液として牛血清アルブミン (以下 BSA: Sigma 社製 Fraction V) 20mg/ml を含む Brackett and Oliphant⁸⁾ の等

張液 (以下 BO(+) 液) を用いた。なお、透明帯除去の際には Dulbecco の PBS に BSA を 3mg/ml 添加した液を用いた。

精子処理には BSA 欠 BO 液 (以下 BO(-)) を基本に種々の濃度のカフェイン (Sigma 社製、安息香酸ナトリウムカフェイン中のカフェイン含量 50%) やイオノホア A-23187 (Calbiochem 社製、以下 I-A) を加えた培養液を用いた。

I-A を高橋と花田⁷⁾ の方法に準じてジメチルスルフォキシドとエタノール 3:1 混合液中に 10mM の保存液を作成し、遮光して -20°C に保存し、実験直前に蒸留水で希釈して使用した。

2. 供試卵

ゴールデンハムスターの成熟雌 (体重 110-180g) の発情後期腔粘液排出の認められた日に PMS を 25 i.u. さらに 50-53 時間後に hCG を 25 i.u. それぞれ筋肉注射した。hCG 注射の 17 時間後にハムスターを屠殺して、卵管から卵丘細胞に包まれた卵塊を回収した。卵塊を直ちに 0.1% ヒアルロニダーゼ (Sigma 社製) と 0.1% トリプシン (Sigma 社製) で処理し、それぞれの処理後数回 3mg/ml BSA 加 PBS で洗浄後 BO(+) で洗浄し、透明帯除去ハムスター卵子 (以下 ZF 卵) とした。予め 8 穴マルチプレート (LUX 社製, 26×33×8 穴) 内に用意した滅菌流動パラフィン (MERCK 社製) 下の BO(+) 液 40 μl 中に ZF 卵を 10-15 個ずつ配布して、30 分以内に媒精に供した。

3. 供試精液

黒毛和種 5 頭 (JB1~5) およびホルスタイン

*: 農林水産部畜産課

種 5 頭 (H1~5) の種雄牛から人工腔法により 2~5 日間隔で精液を採取した。原精液を直ちに 20% 卵黄加トリス・クエン酸・精液 (トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン 141 mM, クエン酸 45 mM, ブドウ糖 5.5 mM, 結晶ペニシリン 1,000 i.u./ml, 硫酸ストレプトマイシン 1 mg/ml) で 3~4 倍希釈し、4℃ に 1~2 日間保存後、実験に供した (液状精液)。また、一部を常法により 0.5 ml ストローの凍結精液とし、実験直前に 4℃ の冷水中で融解後、直ちに実験に供した (凍結精液)。

4. 精子の前処理

供試精液 (液状および凍結精液) 1 ml を 10 ml の共栓付遠心管にとり、BO(-)液 3 ml で 2 回洗浄後 (750×G, 5 分間)、精子部に 1 ml の同液を加えて再浮遊させた。遠心管を 750×G, 5 分間の遠心分離によって、精子を管底部にパックした後、2 時間 37℃ で静置した。この静置中に運動良好な精子のみが上層へ再浮遊するので、静置後精子活力の良好な最上層部 0.1~0.5 ml を採取し、全量が 1 ml になるように BO(-)液を加えた。この時に精子濃度を $8-14 \times 10^6$ /ml に調整した。これら 1 ml の精子浮遊液に最終 I-A 濃度が 0.1 または 0.5 μM になるように調整された I-A を 5 μl 添加し、種々の時間 37℃ の暗くした恒温槽内で保温した。

5. 媒精

各処理精子の浮遊液を 40 μl ずつ分取し、直ちに ZF 卵を入れた BO(+)液中に入れ媒精した。媒精後 4 時間、CO₂培養器内で培養した。

6. ZF 卵の検査

培養後 ZF 卵を BO(+)液で洗浄し、ホールマウント標本にして中性ホルマリン液で固定後、ラクモイド染色を施し、微分干涉顕微鏡下で ZF 卵を観察した。精子尾部を伴った膨化精子頭部あるいは雄性前核の有無によって ZF 卵への精子侵入を判定した (図 1 および 2)。また、侵入率を Duncan's multiple range test⁹⁾ によって分析した。

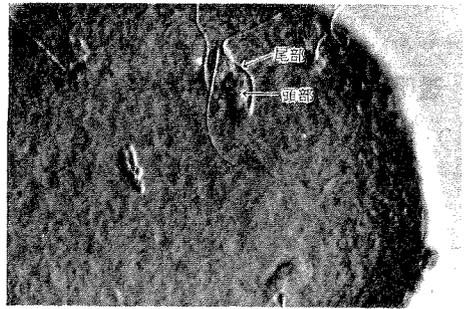


図 1 頭部膨化の初期像

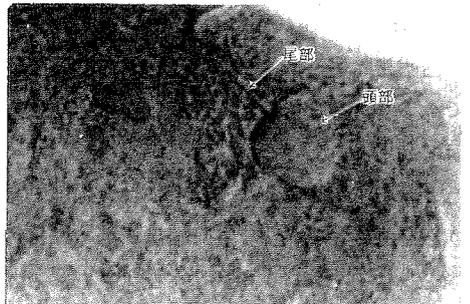


図 2 完全な頭部膨化

結 果

実験 1 I-A 処理条件の検討

精子前処理時培養液中のカフェイン濃度を 0, 2, 5, 10 および 20 mM とし、I-A 処理を 0.1 μM 1 分間とした時の ZF 卵への精子侵入率と侵入卵子中の平均精子数 (以下 PS 値) を表 1, 図 3 および 図 4 に示した。JB-1 および 2 の ZF 卵への精子侵入率は、カフェイン濃度の上昇と共に上昇した。

JB-1 ではカフェイン濃度 0 mM で ZF 卵への精子侵入例は認められず、10 mM の 8.7.9% まで有意に侵入率の上昇が認められたが、10 mM および 20 mM の間に有意差はみられなかった。PS 値も侵入率と同様にカフェイン濃度の上昇と共に増加し、10 mM で最高値 3.77 となった。JB-2 でも 0 mM で ZF 卵への精子侵入例はみられず、カフェイン濃度の上昇と共に侵入率、PS 値が上昇したが、両値とも 20 mM で最高値を示した。しかし、5 mM, 10 mM と 20 mM の侵入率に有意差はみられなかった。

次にカフェイン濃度を 10 mM で前処理後の I-A

表1. 前培養時カフェイン濃度とZF卵子への侵入率，PS値との関係

種雄牛	カフェイン濃度 (mM)	実験回数	供試卵数	精子侵入卵数 (%)	PS値
JB-1	0	3	31	0(0.00)d	0.00
	2	2	33	14(42.4)c	1.36
	5	2	33	22(66.7)b	1.91
	10	3	33	29(87.9)a	3.77
	20	2	34	30(88.2)a	3.70
JB-2	0	3	30	0(0.0)c	0.00
	2	3	30	5(16.7)b	1.80
	5	3	28	9(32.1)ab	1.78
	10	3	42	18(42.9)a	1.22
	20	3	25	13(52.0)a	4.31

a, b, c, d; 異符号間に有意差 (P<0.05)

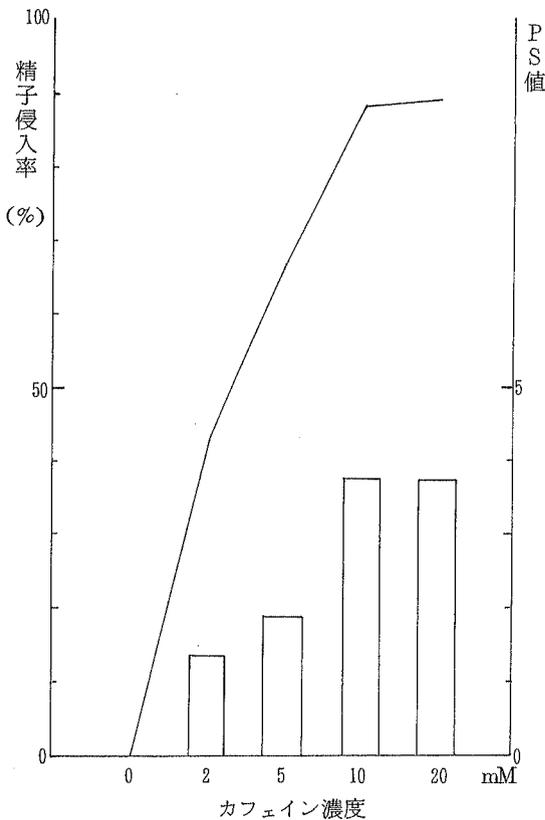


図3. JB-1の前処理時カフェイン濃度のZF卵への精子侵入率とPS値への影響

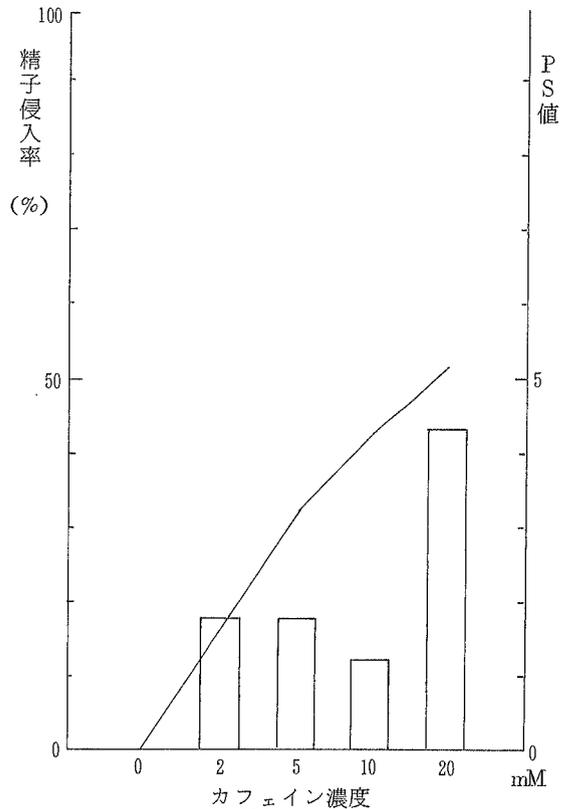


図4. JB-2の前処理時カフェイン濃度のZF卵への精子侵入率とPS値への影響

処理濃度を0.1および0.5 μM 、処理時間を1, 2および5分間とした場合のZF卵への精子侵入率とPS値を表2、図5および6に示した。JB-1, 2で同様の傾向を示し、I-A 0.1 μM 処理では処理時間による侵入率の差が認められなかったが、0.5 μM 処理では処理時間の延長によって侵入率が有意に低下した (P<0.05)。JB-1では0.1 μM 、1分間処理で87.9%、また0.5 μM 、1分間処理で90.3%とそれぞれの処理濃度における最高侵入率を示した。しかし、PS値は両濃度とも2分間処理で最高値5.38, 3.68を示した。JB-2では0.1 μM 、2分間処理で43.9%、0.5 μM 、1分間処理で47%とそれぞれの処理濃度における最高侵入率を示した。また、PS値は0.5 μM 、5分間処理の0を除くと同様の値であった。全体的にJB-1はJB-2と比較して侵入率およびPS値が高かった。

表 2. I-A 処理濃度, 処理時間と Z F 卵子への侵入率, P S 値との関係

種雄牛 %	I-A 処理濃度 (μ M)	I-A 処理時間 (分)	実験回数	供試卵数	精子侵入卵数 (%)	P S 値	
JB-1	0.1	1	2	33	29 (87.9) ^{ab}	3.77	
		2	2	29	21 (72.4) ^{ab}	5.38	
		5	2	32	26 (81.3) ^{ab}	2.81	
	0.5	1	2	31	28 (90.3) ^a	2.86	
		2	2	32	22 (68.8) ^b	3.68	
		5	2	33	3 (9.1) ^c	1.00	
	JB-2	0.1	1	3	42	18 (42.9) ^a	1.22
			2	3	41	18 (43.9) ^a	1.22
			5	3	38	13 (34.2) ^a	1.15
0.5		1	3	34	16 (47.0) ^a	1.00	
		2	3	37	13 (35.1) ^a	1.23	
		5	3	36	0 (0.0) ^b	0.00	

a, b, c; 異符号間に有意差 (P < 0.05)

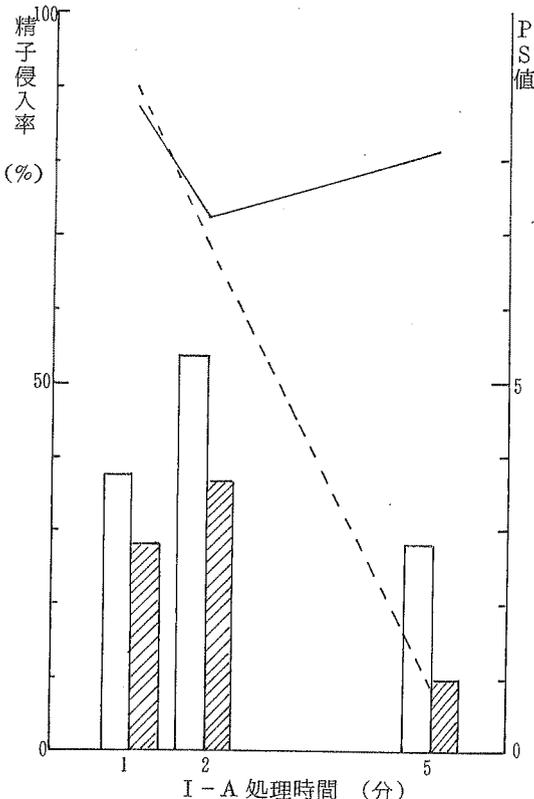


図 5. JB-1 の I-A 処理濃度 (—: 0.1 μM, ---: 0.5 μM) 処理時間と Z F 卵子への侵入率, P S 値との関係

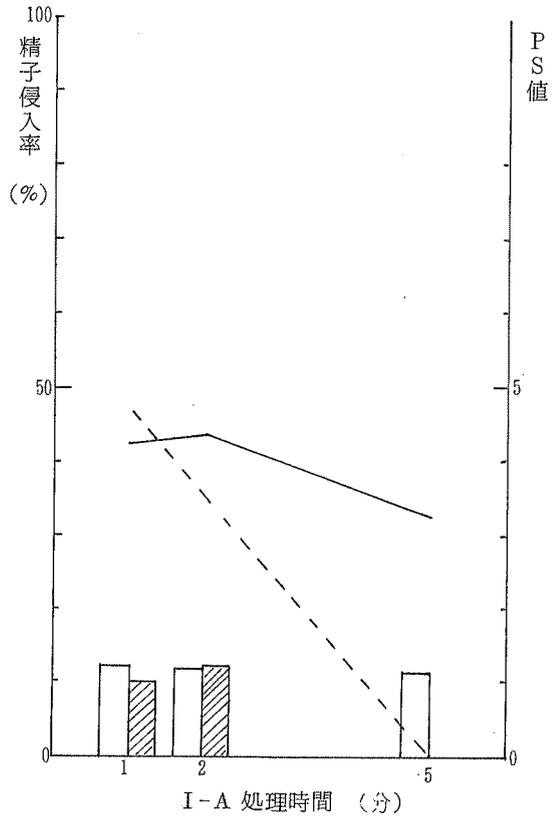


図 6. JB-2 の I-A 処理濃度 (—: 0.1 μM, ---: 0.5 μM) 処理時間と Z F 卵子への侵入率, P S 値との関係

実験 2 種々の条件下精子の Z F 卵への侵入

1) 精液の凍結能とその精子の侵入率との関係

黒毛和種、ホルスタイン種、各 5 頭の種雄牛から採取された液状精液および、凍結精液の Z F 卵への精子侵入率および P S 値を表 3 に示した。精子前処理時には 10 mM カフェインを添加し、I-A 処理を 0.1 μM、1 分間とした。凍結によって各種雄牛とも 10 ~ 56% の侵入率の低下がみられた。黒毛和種で最高の侵入率は JB-3 の液状精液での 100% であり、凍結融解後も 76.7% と最高値を示した。また、P S 値も凍結前後で 5.26 および 2.39 と高い値を示した。ホルスタイン種では H-3 が凍結前後で 84.6% および 65.7% の侵入率と 5.36 および 2.26 の高い P S 値を示した。一方、JB-1, H-2, H-5 では凍結前後で侵入率が 40-55% 低下し、凍結融解後の精

表 3. プレインキューベート後の上層部精子と下層部精子の Z F 卵子への精子侵入率および P S 値

種雄牛 No	精子区分	実験回数	供試卵数	精子侵入卵数(%)	PS値
JB-3	上層部精子	2	21	20(95.2)	2.80
	下層部精子	2	22	15(68.2)	1.80
JB-4	上層部精子	3	47	38(80.9)	2.66
	下層部精子	3	39	35(89.7)	2.63

子侵入率も 40.5%, 24.2%, 13.9% と低率であった。また、P S 値も JB-1 を除いて 1.57 および 1.20 と低率を示した。

2) 同一個体の試料ごとの精子侵入率の変化

JB-3 について 2 月～6 月までに採取された 6 回の凍結精液の Z F 卵子への精子侵入率および P S 値を表 4 に示した。採取日ごとに有意差が認められた。特に 4 月 8 日に採取された精液の侵入率および P S 値は、2 月 25 日、3 月 28 日および 6 月 20 日に採取された精液の約 1/2 であった。

表 4. 凍結前後の Z F 卵子への精子侵入率, P S 値

種雄牛 No	凍 結 前			凍 結 後			
	供試卵数	精子侵入卵数(%)	PS値	供試卵数	精子侵入卵数(%)	PS値	
JB-1	32	31(96.9)	5.16	37	15(40.5)	2.20	
	2	35	21(60.0)	1.95	33	14(42.4)	1.36
	3	31	31(100.0)	5.26	30	23(76.7)	2.39
	4	47	38(80.9)	2.66	32	23(71.9)	2.43
	5	35	25(71.4)	3.64	24	10(41.7)	1.40
H-1	40	26(65.0)	1.46	40	21(52.5)	1.57	
	2	37	28(75.7)	2.71	33	8(24.2)	1.00
	3	39	33(84.6)	5.36	35	23(65.7)	2.26
	4	40	30(75.0)	1.70	36	20(55.6)	1.85
	5	41	21(51.2)	1.52	36	5(13.9)	1.20

表 5. 精液採取回次ごとの Z F 卵子への精子侵入

月 日	実験回数	供試卵数	精子侵入卵数(%)	PS値
2.25	3	44	33(75.0) ^a	2.70
3.28	3	42	37(88.1) ^a	2.84
4.1	3	26	14(53.8) ^{b, c}	1.57
4.8	3	42	14(33.3) ^c	1.50
4.30	3	46	25(54.3) ^{b, c}	1.76
6.20	3	30	23(71.9) ^{a, b}	2.43

a, b, c; 異符号間に有意差 (P < 0.05)

考 察

カフェインの添加は、ハムスター卵子への精子侵入に対する精子の I-A 処理効果を著しく助長することが明らかとなった。カフェインが I-A 処理効果を増進させることは高橋と花田⁷⁾によって報告されている。彼らは 2mM のカフェイン添加が I-A 処理時間の短縮および I-A 処理濃度の低下に有効であると報告した。今回のカフェイン 10 mM を精子前処理用培養液に添加した成績において、I-A 処理 0.1 μM では、1 分間の処理、0.5 μM でも 1 分間処理でも良好であることが示され、彼らの I-A 処理条件 (0.5 μM, 2.5 分間処理) より低濃度、短時間処理によって十分な精子侵入率のみならず高い P S 値が得られたため、カフェインの添加が I-A 処理効果を助長したことが考えられる。すなわち、I-A の効果はそれによる細胞内 Ca²⁺ 増加がアデニルサイクラーゼ作用を活性化してサイクリック AMP を上昇させる¹⁰⁾ ためであると示されているが、カフェインの作用によりサイクリックヌクレオチド・ホスホ・ジ・エステラーゼ作用が抑制された結果として細胞内サイクリック AMP 量の増加¹¹⁾ と低濃度、短時間の I-A 処理が精子への I-A の悪影響を軽減したことが最高の効果を導いたものと思われる。Hyne and Garbers¹²⁾ は guinea pig で、細胞内サイクリック AMP 量の増加によって先体反応誘起を間接的に誘起されることを報告しており、同様の機構によって牛精子による先体反応が誘起されてい

ることが考えられる。しかし、今回の実験では、媒精 4 時間後の観察からしか侵入率を検討しておらず、今後、媒精直後からの経時的な観察による精子の侵入経過、侵入精子の形態の変化や雌性核の動態などから、精子の前処理の効果に対する意義付けが必要と思われる。

I-A 処理後、受精用培養液に添加直後の精子活力は $0.5 \mu\text{M}$ 処理では処理時間を 5 分間以上にする半と半数近くが運動を静止したように、I-A 処理濃度、処理時間によって影響を受けたが、生存精子においては、そのほとんどが弱いながらも鞭打つ様な特異的な運動を示した。 $0.1 \mu\text{M}$ 処理および $0.5 \mu\text{M}$ 、1, 2 分間処理では、処理時間によって活力に影響がみられなかったが、全体的に前進または前進運動を失って回転しながら鞭打ち様の特異的な運動を示した。このような鞭打ち様運動はハムスターの受精能獲得精子において特異的に見られることが報告されている。¹³⁾ 今回の I-A 処理によって誘起された特異的な運動が、受精能獲得の結果によるものであるかどうかは、明らかではないが、今後検討すべき運動形態であると考えられる。

実験 2 の結果から個体によって ZF 卵への精子侵入率、PS 値が異なることが示された。また、凍結による侵入率および PS 値の低下の割合にも個体差がみられ、耐凍能が個体によって異なることが示された。凍結によって侵入率、PS 値の低下が著しかった、JB-1, H-1 および H-5 のうち JB-1 は老齢 (14 才) により、また、後 2 者は本来の凍結能が低いものと考えられる。住吉¹⁴⁾ は当場で 13 年以上供用された種雄牛の凍結能について検討したところ、すべての種雄牛で 11 才以後に凍結融解後の精子生存性が低下することを示しており、今回の JB-1 も同様の傾向を示したものと考えられる。H-2 および 5 については、凍結能不良牛¹⁴⁾ (採取時生存性 80% 前後で凍結融解後の平均生存性 30% 以下、回復率 40% 以下で凍結融解後の生存性が 35% 以上となる回数が 40% 以下のもの) であった。この

ことは、ZF 卵を用いた精子侵入率および PS 値の検討によってもこれら凍結能不良牛の精子を選別できることを示している。

また、採取日ごとに ZF 卵への侵入率、PS 値に有意差が認められたが、人においても Rogers²⁾ が同様の結果を示している。その成績では 90% 以上の精子侵入率を採取回数 6 の 5.9% で示す高侵入精子の人でも 50% 以下の精子侵入率を示すことが 7.3% あり、90% 以上の精子侵入率を採取回数 1 の 8.2% で示す中侵入精子の人でも 50% 以下の侵入率を示すことが 33.3% あると報告している。以上のことから、牛凍結精液についても採取ロットにより差があり、受胎率の変化する可能性が示唆された。

Bousquet et al.¹⁵⁾ は牛精子の HIS 処理後の ZF 卵への侵入成績と受胎成績を比較したが、受胎率に 4% 程度差しか存在せず ZF 卵への侵入率でこの差を論じ得ないと報告している。Yanagimachi et al.¹⁾ の報告以後、人では男性不妊症の診断の一つに ZF 卵への精子侵入成績を用いているが、この場合、侵入率では判定が困難であることが報告され^{2,3,16)}、総侵入精子数を総 ZF 卵数で除した fertilizing index³⁾ や侵入精子数により binding Score という考え方を導入する研究者¹⁷⁾ もいる。今回、総侵入精子数を侵入を受けた ZF 卵数で除した PS 値を示したが、受胎率判定にどの値が有効であるかは、今後受胎率との相関によって検討して判断すべきである。しかし、少なくとも PS 値の高くなるような精子に対する処理が、精子の受精能判定の確立を高くすることが想像される。また、人においては受胎性の有無の判定に ZF 卵への侵入成績を利用しているが、牛においては受胎性のある牛のうちから受胎性の高いものを判定するために利用するので、ZF 卵への侵入率が実際の受胎性の基準としてどれだけの精度を持つかを検討する必要がある。また、Bousquet et al.¹⁵⁾ は ZF 卵を利用したシステムを種雄牛選抜システムに取り入れ、精子耐凍性、受胎性を早期に判定できるのではないかと

と報告している。

ハムスター未受精卵子の低温での短期保存¹⁸⁾および凍結保存¹⁹⁾が可能であることは報告もあるがZF卵子を利用した検査を普及していくには、この方面での検討も必要と思われる。今後、経験的な活力検査以外の方法として、客観的な受精能判定にZF卵を利用することが可能であることが示唆された。

要 約

黒毛和種、ホルスタイン種各5頭、計10頭の種雄牛から採取した精液をBO液(Brackett and Oliphant, 1975)にカフェインを添加した培養液で洗浄し、2時間静置した後、イオノホアA23187(I-A)で処理して透明帯除去ハムスター卵子(ZF卵)への精子侵入率、侵入卵中の平均精子数(PS値)を検討して以下の結果を得た。

1. カフェイン添加によりI-A処理後のZF卵への精子侵入率、PS値は有意に上昇し、10mM以上の添加で良好な成績であった。
2. I-A処理は0.1 μ M、1分間処理で高い侵入率を得た。I-A、0.5 μ Mでは5分間処理で精子生存率が低下し、侵入率、PS値とも有意に低かった。
3. 個体により精子侵入率、PS値に差がみられたが、凍結融解によっても、それらに個体差があり、耐凍性の低い牛の精子では、それらの低下が著しかった。
4. 同一個体で、6回の採取日ごとの精子侵入率、PS値に有意差が認められた。

最後に、本稿のご校閲を載しました京都大学農学部、内海恭三助教授に深甚の謝意を表す。

引 用 文 献

- 1) Yanagimachi, R., H. Yanagimachi and B. J. Rogers: *Biol. Reprod.*, 15, 471-476 (1976)
- 2) Yanagimachi, R.: *Gamete Research*, 10, 187-232 (1984)
- 3) Rogers, B. J.: *Fertil. Steril.*, 43, 821-840 (1985)
- 4) Bousquet, D. and B. G. Brackett: *Theriogenology*, 17, 199-213 (1982)
- 5) Viriyapanich, P. and J. M. Bedford: *J. Exp. Zool.*, 216, 169-174 (1981)
- 6) Bondioli, K. R. and R. W. Wright, Jr.: *J. Anim. Sci.*, 57, 1001-1005 (1983)
- 7) 高橋芳幸, 花田 章: *家畜繁殖誌*, 30, 30-39 (1984)
- 8) Brackett, B. G. and Oliphant: *Biol. Reprod.* 12, 260-274 (1975)
- 9) Steel, R. G. D. and J. H. Torrie: in *Principles and procedures of statistics*. McGraw-Hill Book Co. New York (1960)
- 10) Hyne, R. V. and D. L. Garbers: *Biol. Reprod.* 21, 1135-1142 (1979)
- 11) Garbers, D. L., W. D. Lust, N. L. First and H. A. Lardy: *Biochemistry*, 10, 1825-1831 (1971)
- 12) Hyne, R. V. and Garbers, D. L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 5699-5703 (1979)
- 13) Yanagimachi, R.: *J. Reprod. Fert.* 23, 193-196 (1970)
- 14) 住吉健也: 学位論文 (1982)
- 15) Bousquet, D., B. G. Brackett, M. A. Dressel and C. H. Allen: *Theriogenology*, 20, 601-613 (1983)
- 16) 井上正人, 小林善宗, 本田育子, 金子みつ恵, 藤井明和: *哺乳卵研誌*, 2, 33-36 (1985)
- 17) Cohen, J., P. Felten and G. H. Zeilma-ker: *Fertil. Steril.* 36, 356-362 (1981)
- 18) Syms, J. A., A. R. Johnson, L. I. Lipshu-

ltz and R.G. Smith : Fertil. Steril.

43, 766-772 (1985)

19) Tsunoda, Y., T.A. Parkening and M.

C. Chang: *Experientia*, 32, 223-224

(1976)