

牛精子の受精能に関する研究(2)

誌名	兵庫県立畜産試験場研究報告
ISSN	03883116
著者	福島, 護之 富永, 敬一郎 太田, 垣進 山下, 弘昭 藤原, 義昭
巻/号	23号
掲載ページ	p. 60-64
発行年月	1986年10月

牛精子の受精能に関する研究（第2報）

牛精子受胎性とハムスターテスト

福島護之・富永敬一郎・太田垣進

山下弘昭・藤原義昭

緒 言

人では通常の男性不妊症の検査に透明帯除去ハムスター卵子への精子侵入試験を用いているが、Yanagimachi¹⁾、Rogers²⁾や井上³⁾らが述べているようにこのような精子侵入率だけではin vivoでの受精能を反映しないため、男性不妊症の決定には困難な場合が多く、一般の精液検査との併用によって検討する必要があると言われている。

牛においてはBrackettら⁴⁾や白井と花田⁵⁾が透明帯除去ハムスター卵子を用いて精子侵入能に個体差のあることを報告し、その後、凍結精液の受胎能を判定できるという報告⁶⁾もあるが、Bousquetら⁷⁾は透明帯除去ハムスター卵子を用いた精液検査（以下、ハムスターテストとする）で必ずしも受胎能判定に利用できないと述べている。ただ、ハムスターテストを種雄牛選抜システムに利用することによって牛精子の耐凍性、妊孕性の有無の早期判定に有効であると報告している。

著者らは、現在実施している精子活力検査に比較して客観的な精子受胎能の評価法の開発実験の1つとしてハムスターテストを利用することを考え、その基礎的条件として、前報⁸⁾において透明帯除去ハムスター卵への牛精子侵入のための条件について検討した。その結果、カフェイン10 mMを含む培養液で洗浄後、イオノホアA-23187、0.1 μ M、1分間処理された牛精子を用いた場合に、透明帯除去ハムスター卵子への牛精子侵入率が良好であったことを報告した。本実験においては、牛凍結精子の卵子への侵入能をハムスターテ

ストによって判定した後、実際の人工授精に供し、その受胎性を調べて、ハムスターテストの結果と受胎性との相互関係を明らかにしようとした。

材料および方法

1. ハムスターテスト

6頭の黒毛和種種雄牛から昭和59年度または60年度に採取された、計23ロットの凍結精液を用いた。0.5 mlストローの凍結精液を37°Cの温湯中に浸漬して融解した。直ちに10 mlの共栓付き遠心管に精液を入れ、10 mM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%）を添加したBlackett & Oliphant (1975)⁹⁾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。精子濃度を $10 \times 10^6 / ml$ に調整した精子浮遊液 1 mlにイオノホアA-23187（Calbiochem社製）を濃度が0.1 μ Mになるように添加し、暗くした37°Cの恒温槽内で1分間保温した。透明帯除去ハムスター卵子を前報に従って0.04 mlの牛血清アルブミン（Sigma社製、Fraction V）20 mg/mlを含みカフェインを含まないBlackett & Oliphant液中に10-15個入れて、滅菌パラフィン下で37°C、5%炭酸ガス、95%空気の気相下にあらかじめ用意し、イオノホアA-23187処理後、直ちに0.04 mlの精子浮遊液を卵子液中へ媒精した。媒精時の精子濃度は、 $5 \times 10^6 / ml$ とし、4時間培養した。培養後、卵子を常法に従って固定、染色して、微分干渉顕微鏡下で精子侵入の有無を観察した。（図1）

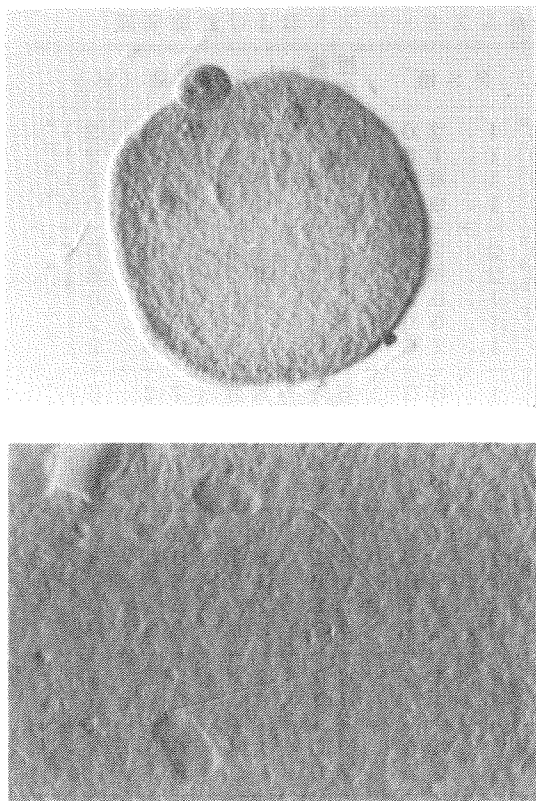


図1 透明帯除去ハムスター卵内で膨化した
牛侵入精子(上図 ×125, 下図 ×250)

2. 受胎率調査

ハムスターテストを実施した後、同じロットの凍結精液を授精試験に用いた。授精期間は、昭和60年10月から昭和61年3月までであった。実施場所は、兵庫県津名郡畜産管内の一般農家で、複数の人工授精師によって人工授精された。受胎の判定は、90日ノンリターン法によって行い、採取ロットごとに受胎率を算出した。

結 果

表1は、6頭の種雄牛のロットごとのハムスターテストの結果および臨床の人工授精による受胎率を示している。ハムスターテストの結果は、白井と花田⁵⁾や前報³⁾でも示したように種雄牛毎に、また、採取ロットごとに変動した。種雄牛Aでは

ハムスターテストでの侵入率は、40~52%で有意差は認められなかった。種雄牛Bでは、精子侵入率が、33.3~88.1%と変動しており、5%水準で有意な差が認められた。また、PS値も侵入率と同様に1.5~2.84と変動していた。種雄牛Cでも59.3~87.5%と変動し、5%水準で有意差がみとめられ、種雄牛Bと同様にPS値も1.5~3.32と大きな差がみられた。種雄牛Dにおいては、種雄牛Aと同様で、侵入率は、29.6~57.7%と変動していたが、有意差は認められなかった。種雄牛E、Fにおいても2ロットずつではあるが、侵入率に有意差は認められなかった。一方、受胎率については種雄牛Aで、65.2~69.2%、種雄牛Bで、65.2~76.5%、種雄牛Cで、69.6~81.1%、種雄牛Dで、62.5~80%、種雄牛Eで57.4~80.5%、そして、種雄牛Fで、65~65.2%と採取日ごとに変動していたが、種雄牛Eを除いて各種雄牛とも採取ロット間に有意な差は認められなかった。また、ハムスターテストの侵入率と受胎率との単相関係数は、0.44 ($t=2.23 > t(21, 0.05) = 2.08$) となり、有意な正の相関が認められた。

考 察

Bousquet & Brakett⁶⁾はその緒言の中で、これまでの精液検査が主観的な活力検査のみであり、1970年以後Acrosomeの形態による評価も併用されるようになったが、受胎性を正確に予想できるパラメーターが確立していないと述べている。著者らもハムスターテストが客観的な精子受胎性判定に利用できるかについて検討した。

種雄牛毎にハムスターテストの成績にはばらつきが認められ、種雄牛B、Cで5%水準で有意差が認められた。この有意差は採取日ごとの精子のイオノホアA-23187に対する感受性を示しているものと思われる。イオノホアA-23187によって強制的に先体反応を誘起される程度が、精液の採取ロットごとに異なり、その結果、透明帯除去

表1 各種雄牛による採取日ごとのハムスターテストおよび受胎成績

種雄牛	採取日	供試回数	供試卵数	精子侵入卵数(%)	PS値*	授精頭数	受胎頭数(%)
A	3. 4	3	30	15 (50.0) ^a	1.20	52	36 (69.2) ^a
	3. 7	3	25	13 (52.0) ^a	1.15	60	39 (65.2) ^a
	4. 11	3	32	16 (50.0) ^a	1.88	119	80 (67.2) ^a
	4. 15	3	30	12 (40.0) ^a	1.08	71	49 (69.0) ^a
B	2. 25	3	44	33 (75.0) ^a	2.70	17	13 (76.5) ^a
	3. 28	3	42	37 (88.1) ^a	2.84	32	22 (68.8) ^a
	4. 1	3	26	14 (53.8) ^{bc}	1.57	29	20 (69.0) ^a
	4. 8	3	42	14 (33.3) ^c	1.50	21	16 (76.2) ^a
	4. 30	3	46	25 (54.3) ^{bc}	1.76	23	15 (65.2) ^a
C	2. 7	3	27	16 (59.3) ^b	1.69	51	38 (74.5) ^a
	2. 14	3	30	26 (86.7) ^a	3.12	53	40 (75.5) ^a
	2. 21	3	32	28 (87.5) ^a	3.32	53	43 (81.1) ^a
	2. 28	3	26	18 (69.2) ^{ab}	1.50	44	33 (75.0) ^a
	3. 7	2	26	16 (61.5) ^b	1.81	56	39 (69.6) ^a
D	2. 7	3	32	10 (31.3) ^a	1.10	72	45 (62.5) ^a
	2. 14	3	27	8 (29.6) ^a	1.13	42	27 (64.3) ^a
	2. 21	2	21	9 (42.9) ^a	1.78	48	32 (66.7) ^a
	2. 28	3	23	13 (56.5) ^a	1.07	25	20 (80.0) ^a
	3. 7	3	26	15 (57.7) ^a	1.27	47	31 (66.0) ^a
E	4. 25	3	29	6 (20.7) ^a	1.00	47	27 (57.4) ^b
	4. 30	3	30	12 (40.0) ^a	1.17	41	33 (80.5) ^a
F	5. 21	3	30	23 (76.7) ^a	1.48	23	15 (65.2) ^a
	6. 28	3	39	22 (56.4) ^a	1.23	20	13 (65.0) ^a

a,b,c : 同種雄牛において異符号間に有意差 (P < 0.05)
 * : 精子侵入卵子中の平均精子数

ハムスター卵子の原形質膜への精子の付着率や融合能の差がハムスター卵子への侵入率の差となつてあらわれたことを示している。受胎率では、種雄牛Eにおいてのみ採取ロット間に5%水準で有意差が認められたが、他の種雄牛では、採取ロット間に有意差は認められなかった。また、ハムスターテストと受胎率の間に正の相関が認められたけれども、相関係数は0.44と低い値であった。これまでに白井と花田⁵⁾やBousquetら⁴⁾が、透明帯除去ハムスター卵子への精子侵入能に個体差があることを示しその個体差は精子固有の受精能の差を示す可能性を示唆した。その後、Bousquet & Brackett⁶⁾が、透明帯除去ハムスター卵子への精子侵入率と、受胎率との間に相関関係があるという結果から受胎能の予知が可能であることを示した。しかし、家兎を用いた報告では同じ

グループによって透明帯除去ハムスター卵子ではなく同種卵子透明帯を用いた検査が有効であったと報告している¹⁰⁾。本研究で得られた受胎率はハムスターテストの結果を反映しないことから、イオノホアA-23187に対する感受性と精子固有の受精能とは、相互に関係しないようであり、ハムスターテストによる精子侵入率の採取日ごとの変異が精子の受胎率に直接関係しなかったことも充分理解できる。また、花田¹¹⁾は、イオノホアA-23187処理の原理について、Ca²⁺塩含有培地内の浮遊精子に化学的に先体反応を誘起させるものであるとし、このように誘起される先体反応が精子の受精能獲得を経由する変化であるかは、明確でないと述べている。これらのことから透明帯除去ハムスター卵子への侵入率から牛凍結精液の受胎能判定をすることは困難であることが考えら

れた。今回利用したカフェイン存在下でのイオノホアA-23187処理は前報でも報告したように著者らが検討した透明帯除去ハムスター卵子へ牛凍結精子を侵入させる唯一の方法であった。その後、精子前培養での培養液中のCa²⁺濃度を1.5~2倍量にすることも低率ではあるが精子侵入例を得ている¹²⁾。また、小林と花田¹³⁾は、カフェイン又はテオフィリンとイオノホアA-23187を併用することによって高い精子侵入例を得ている。しかし、同種、例えば体外培養された牛卵胞卵子との体外受精の際は、必ずしもカフェイン、イオノホアA-23187を併用した精子処理が必要でなく、一般の合成培養液の利用によっても、精子侵入例が多数報告されている¹⁴⁻¹⁸⁾。このことは、合成培養液による洗浄や前培養及び同種卵胞由来の卵子を含む細胞や、物質によって精子受精能獲得及び先体反応の誘起が可能であることを示唆するものである。これらのことから考えれば、子宮や卵管因子を含む生理的に近い条件によって、受精能獲得や先体反応を誘起させた精子を使ったハムスターテストや同種の牛卵胞卵子の体外受精の成績が精子固有の受精能を反映し、精子の受胎性の予知に貢献することも予測される。

以上の結果からハムスターテストを利用することにより、凍結精液の採取ロット間の受胎性を予知することは不可能であることが推察された。

要 約

ハムスターテストによる精子侵入率から、凍結精液のロットごとの受胎能の予知の可能性について検討したところ、次のような結果を得た。

1. 種雄牛によりハムスターテストのロット差にばらつきがみられ、種雄牛B、Cでは、5%水準で有意差が認められた。

2. 受胎率では、種雄牛Eで採取ロット間に5%水準で有意差が認められたが、他の種雄牛では認められなかった。

3. ハムスターテストと人工授精による受胎率の間には相関関係が認められなかった。

終りに、授精試験にあたりご協力いただきました、津名郡畜連の人工授精師の方々、ならびに本稿のご校閲をいただき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る。

参 考 文 献

- 1) Yanagimachi R. : Gamete Res., 10, 187-232 (1984)
- 2) Rogers, B. J. : Fertil. Steril., 43, 821-840 (1985)
- 3) 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)
- 4) Brackett, B. G., M. A. Cofone, M. L. Boice and D. Bousquet : Gamete Res. 5, 217-227 (1982)
- 5) 白井健康、花田章：日本畜産学会第74回大会講演要旨，73 (1983)
- 6) Bousquet, D. and B. G. Brackett : Theriogenology, 17, 199-213 (1982)
- 7) Bousquet, D., B. G. Brackett, M. A. Dressel and C. H. Allen : Theriogenology, 20, 601-613 (1983)
- 8) 福島護之、富永敬一郎、太田垣進、寺田邦光、金子史郎：兵庫畜試研報，22，47-54 (1985)
- 9) Brackett, B. G. and Oliphant, G. : Biol. Reprod., 12, 260-274 (1975)
- 10) Fayrer-Hosken, R. A., L. M. Brown and B. G. Brackett : Theriogenology, 25, 153 (Abstr.) (1986)
- 11) 花田章：家畜繁殖誌，31，21P-26P (1985)
- 12) 福島護之ら（未発表）
- 13) 小林仁、花田章：日本畜産学会第77回大会講演要旨，77 (1985)
- 14) Iritani, A., M. Kasai, K. Niwa and

H. B. Song : J. Reprod. Fertil. 70, 487
—492 (1984)

15) Fukui, Y., M. Fukushima and H.

Ono : Theriogenology, 20, 651—660 (1984)

16) Parrish, J. J., J. L. Susko—

Parrish and N. L. First : Theriogenology,
24, 537—549 (1985)

17) Parrish, J. J., J. L. Susko—

Parrish, M. L. Leibfried—Rutledge, E.
S. Critser, W. H. Eystone and N. L.

First : Theriogenology, 25, 591—600 (1986)

18) Ball, G. D., M. L. Liebfried, R.

WLenz, R. L. Ax, B. D. Bavister and

N. L. First : Biol. Reorod., 28, 717 — 725
(1983)