

## Percoll密度勾配遠心法による豚精液の分離と性状

誌名	日本養豚学会誌 = The Japanese journal of swine science
ISSN	0913882X
著者	戸津川, 清 萱場, 猛夫 上野, 宏樹
巻/号	25巻1号
掲載ページ	p. 42-44
発行年月	1988年3月

## —短 報—

## Percoll 密度勾配遠心法による豚精液の分離と性状

戸津川 清・萱場猛夫\*・上野宏樹\*\*・須藤信也\*\*・富樫 稔\*\*

東北大学医学部, 仙台市 980

\*山形大学農学部, 鶴岡市 997

\*\*山形県養豚試験場, 酒田市 998

(1987年12月25日 受付)

家畜の雌雄産み分けの試みは, 種々の方法<sup>1)</sup>で行なわれてきたが, 発表者により結果がまちまちで, 未だ確かな結果は得られていない。

近年行なわれた主な方法は, アルブミンによる濃度勾配法<sup>2)</sup>, Ficoll<sup>3)</sup> や Percoll<sup>4)</sup> を用いた密度勾配遠心法, 電気泳動法<sup>5)</sup> および免疫学的手法<sup>6)</sup> 等である。しかし, これまでの研究は, ヒトおよび牛に関するものが主で, 豚に関するものはみられない。

そこで, 著者らは, ヒト精子の分離に用いられている修飾コロイド状シリカゲル (Percoll) を応用して, 豚精子の分離, 特に奇形精子や死滅精子等の分離の可能性について, さらに, 遠心分離後に人工授精に供与できる精子活力が得られるかについて比較検討した。

## 材料および方法

本研究には, 山形県養豚試験場において, 定期的に精液を採取している成雄豚 (デュロック種, 1頭, 250 kg) からの濃厚部精液を用いた。Percoll (ファルマシア社, スエーデン) を Kiev<sup>7)</sup> 液で希釈し, 7および9層 (比重: 1.06~1.12; 1.04~1.12) の密度勾配を作成した。各密度層は, 1.0 ml を重層した。(図1-I, II)。濃厚精液を凍結精液の保存に用いられている Hulsenberg 8<sup>8)</sup> 液で希釈, 1500 rpm, 10分間遠心分離することによ

り洗浄を行なった後, 精子濃度が3億/1 ml になるように調整した。1.0 ml の精子試料を密度勾配最上層に重層し, 1100 rpm, 20分間遠心した。遠心分離後, 各分画 (0.8 ml) を試験管に回収し, 鏡検後, 精子濃度を測定した。

## 結 果

濃厚精液を Hulsenberg 8 液で1回洗浄することにより, 85 # の精子活力の精子試料を得ることができ, 明らかな洗浄効果が認められた。

7層及び9層の密度勾配遠心法により豚精液を分離した結果, 遠心後の各分画は, 図1に示した通りである。7層による分離では, 遠心管管底を含め6つの分離バンドが得られた。また, 9層による分離においても同様の分離バンド数であった。

7層の分離についてみると, 精子濃度は, 第4分画から管底で濃く, 平均0.4~2.73億/ml で, 管底が最も高濃度であった。各分画について比較検討した結果が表1に示してある。浮遊物は上部第1~第3分画で多量に認められた。奇形精子は第2~3分画で認められたが, 極く少数であった。細胞質滴を頸部か中片部に付着する未熟精子は, 第2分画でだけ検出された。他方, 形態的には正常であるが死滅している精子は, 第1~5分画と広い範囲に分布した。また, 回転運動精子も上部1~3分画で認められた。さらに, 形態的に正常で活発な前進運動をしている精子は, 第3分画以下で検出され, 下部分画 (第6~管底) では, 大部分が活発な前進運動精子で占められていた。特に管底のものは, 85 # の極めて活力の良い精子であった。

次に, 9層による分離についてみると, 浮遊物は, 第1~7分画と非常に広い範囲で認められた。奇形精子および未熟精子は, それぞれ第2~6分画, 特に第4・第6

Separation and properties of boar semen using percoll density gradient centrifugation.

K. TOTSUKAWA, T. KAYABA\*, H. UENO\*\*, S. SUTŌ\*\* and M. TOGASHI\*\*

School of Medicine, Tohoku University, Sendai-shi, 980.

\* Faculty of Agriculture, Yamagata University, Tsuruoka-shi, 997.

\*\* Yamagata Prefectural Swine Experiment Station, Sakata-shi, 998.

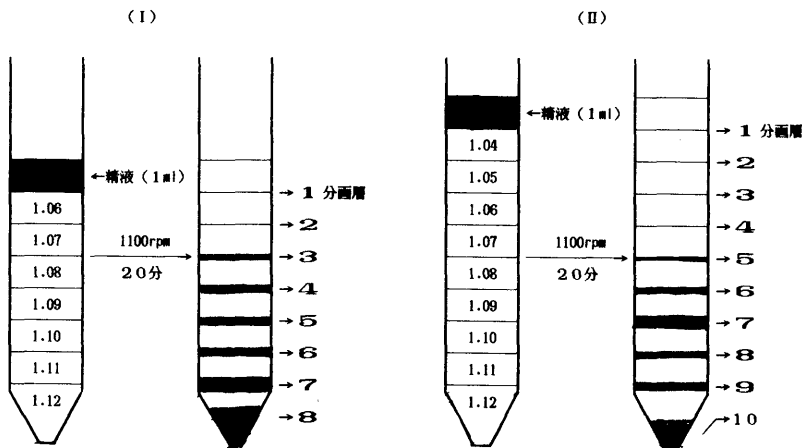


図 1 Percoll 密度勾配遠心法による豚精液の分離

表 1. 遠心分離後の精子分布と性状

分 画	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
浮遊物	++*	++	++	-	-	-	-	-	-	-
死滅精子	+	-	+	++	+	-	-	-	-	-
奇形精子	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
未熟精子	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
(I)7層 回転精子	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
前進運動精子	-	-	+	++	++	+++	+++	+++	-	-
精子濃度(億/ml)	-	-	0.14	0.40	0.49	0.47	0.72	2.73	-	-
精子活力(++)	0	0	15	55	73	75	83	85	-	-
浮遊物	++	++	++	++	+	+	+	-	-	-
死滅精子	++	+	+	+	+	+	+	+	-	-
奇形精子	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
未熟精子	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
(II)9層 回転精子	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
前進運動精子	-	-	+	+	+	+	++	++	+++	+++
精子濃度(億/ml)	-	-	-	-	0.13	0.40	0.72	0.56	0.60	1.64
精子活力(++)	-	-	-	10	20	65	75	80	80	85

注. \*分画中の割合  
 - 0%  
 + 1~25  
 ++ 26~50  
 +++ 51~75

分画で認められたが、その割合は2~3%であった。死滅精子は、第1~8分画までの範囲で検出され、特に第1分画でその割合は高かった。回転運動精子は、第3~6分画で認められたが数は少数であった。他方、形態的に

正常な前進運動精子は、第3分画から管底と広い範囲で検出され、管底に近づくにつれて濃度が高くなり、管底で1.64億/mlに達した。精子活力も同様に管底に近づくに従って高くなる傾向であった。

## 考 察

Percoll 密度勾配遠心法により、豚精子の分離が可能か否かを検討する手初めとして、Percoll 7層及び9層による分離パターンの差異、および分離後の精子活力等について比較検討した。その結果、主な分離バンド層は、Percoll 7層及び9層の両方法とも6つの分画層であり差は認められなかった。精子濃度は、試験管管底が最も濃く、ヒトの精子の分離実験<sup>4)</sup>からすると、この分画中の X 精子の割合が高いことになり、この点については、今後の検討が必要である。つまり、ヒト以外の哺乳動物では、蛍光小体 (F-body) に関して十分な研究が行なわれていないため、分離した分画中の X および Y 精子の割合を比較することが困難である。しかし、最近、尾川<sup>9)</sup>らにより、ウシやブタで F-body が観察されると言う報告がなされたが、これがヒトの F-body と同一か否か、Y 染色体由来かどうかは不明であり、今後の検討が期待される。

本実験で行なった分離方法では、浮遊物、死滅精子、奇形精子、未熟精子および回転運動精子は、上部分画に分布し、形態的に正常で前進運動をする精子は、下部分画に分布した。しかし、特定の精子が1つの分画にだけ集中することはなく、多くは複数の分画中に存在しており、このことはそれぞれの精子間の差が極めて小さく、それが移動の差として現れていることを示唆している。精子活力は、下部分画になるにつれて高くなる傾向が認められたが、これが何を意味するかについては不明であ

る。しかし、下部分画の精子活力は、80~85 # を示しており、これらの精子を使っての人工授精は十分期待される。

なお、現在各分画の精子をキナクリン・マスタードで染色し、F-body 様蛍光小体の割合について検討中である。

最後に、御指導・御援助下さいました東京大学名誉教授・西田司一先生に深くお礼申し上げます。

## 文 献

- 1) 西田司一：哺乳動物の性比と性支配，128-224，養賢堂，東京，1984。
- 2) BEERNIKK, F. J. and R.J. ERICSSON : Fertil. Steril., **38**, 493, 1982.
- 3) SHASTRY, P.R., U.C. HEGDE and S.S. RAO : Nature, **269**, 58-60, 1977.
- 4) 兼子 智・押尾 茂：細胞工学, **3**, 605-611, 1984.
- 5) 梶田博司・高橋政義・米内美晴・川倉一彦・副島昭彦：人工授精研誌, **8**, 10-13, 1986.
- 6) BENNETT, D. and E.A. BOYSE : Nature, **246**, 308-309, 1973.
- 7) WILLEMS, C.M. : Livest. Prod. Sci, **5**, 285-291, 1978.
- 8) LARSSON, K : World Rev. Anim. Prod, XIV, 59-64, 1978.
- 9) 尾川昭三・山川宏人・山井淳子・西田司一・竹島勉・松本徹郎・田内正賢・長嶋比呂志・加納康彦：家畜繁殖誌, **33**, 140-145, 1987.