山羊精液中の卵黄凝固酵素に関する研究

VIII. 電気刺激採取精液ならびに人工腔による半枯渇採取精液中の酵素量

入 谷 明・西 川 義 正

(京都大学農学部家畜繁殖学研究室)

精液の卵黄緩衝液に対する凝固作用の強さ(凝固強度)に影響を及ぼす要因はかなり多いと考えられるが、この実験では精液の採取条件によって凝固強度がどのように変わるかを検討するために次の2項目がとり上げられた。すなわち電気刺激法で分離採取した精液について人工腔法で採取した精液との凝固強度を比較検討し、また人工腔法で短時間内に精液を連続採取した際の凝固強度の変動の有無を測定した。いずれの実験でも凝固強度と同時に精液の一般性状ならびに2, 3の化学的性状も測定した。

A. 電気刺激による分離採取精液の凝固強度

I. 実験の材料および方法

1) 実験動物ならびに期間: 実験は3頭のザーネン種山羊を使用し、1961年9月~10月の繁殖季節中に行われた。

2) 精液採取法: 電気射精はプループ法により、山羊を台上に横臥させて保定し、第1表に示される通電方法により行われた。また電気射精を行う5日前に人工腔法による精液を採取し、電気射精液の成績と比較された。人工腔法は現在日本で広く採用されているものと同じである。

3) 一般性状の検査ならびに化学的分析法: 射出精液は直ちに精液量, pH, 精子活力を記録し、精子濃度算定のための材料採取後、氷冷水中に貯溜しできるだけ速かに遠心分離し精漿試料を採取した。ついで精漿につい

て蛋白は銅-FOLIN 法¹⁾、凝固強度は著者らの方法²⁾、果糖は ROE 法³⁾、クエン酸は NATELSON 法⁴⁾、乳酸は BARKER-SUMMERSON 法⁵⁾によつてそれぞれ測定した。また濾紙電気泳動は小林の方法に準じて行った。

II. 成績ならびに考察

1. 一般性状, 2, 3の化学的組成ならびに凝固強度

実験は電気射精(5~6分割)と人工腔法による採取(3回連続採取)を行つて、これを1実験とし、3頭3例計9回の実験を行い、電気射精液と人工腔法の精液につき比較検討したが、9回の実験結果はほぼ類似の結果を示したのでその1例を第1表に示した。

a) 一般性状

精液量は電気射精液(以下 E.S. とする)では、精子を含む場合の方が量が多く、ほぼ人工腔射精液(以下 A.V. とする)の1~2回目に匹敵する量であつた。pH (B.T.B.) は E.S. の方が A.V. の平均 6.43 に比して著しく高く 8.55 であつた。しかし両者の精子活力にはほとんど差はみられなかった。精子濃度は E.S. の全平均は $8.3 \times 10^8/\text{ml}$ で、A.V. の3回連続採取の平均値 $20.6 \times 10^8/\text{ml}$ よりはるかに低かつた。しかし E.S. の精子含有分割では $28.8 \times 10^8/\text{ml}$ で A.V. の1回目の射精液とはほぼ同程度か、むしろこの例では多いようであつた。

b) 蛋白, 果糖およびクエン酸

蛋白, 果糖およびクエン酸濃度は E.S. の場合 A.V. に比して全般に低く、E.S. の平均値はそれぞれ 0.95mg/0.1 ml, 74.89 mg/dl, 135.2 mg/dl であつて、これに対し A.V. の平均値はそれぞれ 6.74 mg/0.1 ml, 1159.15 mg/dl, 632.35 mg/dl であつた。また E.S. のこれら3成分の濃度は各分割の精子濃度に平行していた。すなわち精子濃度は分割 5, 2, 3, 4, 1 の順に高く、蛋白, 果糖およびクエン酸濃度もこの順に高かつた。以上のこ

Studies on the egg-yolk coagulating enzyme in goat semen. VIII. The enzyme activity of the semen collected by electrical stimulation and the semen depleted by the artificial vagina.

IRITANI A. & Y. NISHIKAWA (Lad. of Animal Reprod., Coll. of Agric., Kyoto Univ.) *Jap. J. Animal Reprod.* 10 (2), 1964.

Table 1 Some properties and coagulating enzyme activities in the semen collected by electrical stimulation (One example of 9 trials)

Date of expt.	Fract. No.	Conditions of stimulation				Semen volume (ml)	pH (B.T.B.)	Sperm motility	Sperm density ($\times 10^6$ /ml)	Protein ^a (mg/0.1ml seminal plasma)	Enzyme activity ^b		Fructose Citric Lactic acid acid		
		Volt	Amp.	On (sec.)	Off (sec.)						(/0.1ml seminal plasma)	(/mg protein)	(mg/dl seminal plasma)		
Oct. 2 (1961)	1	1	0.01	5	40	0.3	8.6	—	0	0.55	29.14	52.98	12.20	97.81	8.48
	2	3	0.02	5	40	0.3	8.6	—	7.36	1.30	33.97	26.13	203.71	191.84	35.16
	3	5	0.05	5	30	0.3	8.6	—	3.96	1.07	39.32	36.89	54.30	154.44	26.20
	4	7	0.15	5	50	0.6	8.4	—	1.28	0.88	36.42	41.48	29.36	96.88	22.84
	5	5	0.06	10		0.9	8.0	80	28.80	2.00	42.31	21.22	455.28	416.11	57.01
	Av. ^c	—				0.38	8.55	—	3.15	0.95	34.71	36.54	74.89	135.24	23.17
Oct. 7 (1961)	1	Artificial vagina				1.0	6.4	80	25.28	6.27	32.68	5.21	972.58	589.68	43.22
	2	(3 successive ejaculations)				0.8	6.5	75	22.24	7.79	27.72	3.56	1277.81	731.48	26.75
	3					0.4	6.4	75	14.40	6.15	29.29	4.77	1227.06	575.88	28.81
	Av.	—				0.73	6.43		20.64	6.74	29.90	4.43	1159.15	632.35	32.93

N. B. a) Protein content is shown as albumin equivalency.

b) Enzyme activity is shown as amounts of fatty acid produced.

c) Averages for sperm free fractions.

とからこれら 3 成分は精子の射出される場合に分泌され、精子を含めぬ分劃は pH が高くまた後述のごとく凝固強度の高いことから主として尿道球腺分泌液からなることが推定された。

c) 凝固強度

各分劃ごとの射出液中の凝固強度は第 1 表に示されている。精漿 0.1ml 当りの凝固強度では E.S. の方が A.V. よりも全般に高く、全体の平均値でそれぞれ 36.0 mg, 29.9 mg/0.1 ml であった。精漿中の蛋白 1 mg 当りの凝固強度すなわち比活性度⁷⁾で比較してみると E.S. の方が A.V. の約 8 倍程度も高かった。このように電気

刺激 (低電圧) で精子を含めぬ射出液分劃を集めることによって酵素純度の高い射出液のえられることが知られたが、これはおそらく精子を含めぬ分劃では、精の由来の蛋白濃度の高い分泌液の混入程度が少いことによるものと思われる。

d) 以上の成績は、山羊 No. 1 の 1 例につき示したものであるが、3 頭 9 例につき E.S. のうち精子をほとんど含めぬ分劃の全平均値を求め、これを A.V. の全平均値と比較のため一括して第 2 表に示した。これによると E.S. は A.V. に比して 1 射精当りの精液量は少く、pH は高く、精子濃度は 25 例の平均値で $3.4 \pm 2.7 \times 10^6$ /ml で

Table 2 Comparison of some properties and activity of egg-yolk-coagulating enzyme in electro-ejaculates with those of semen collected by artificial vagina

Collection method	No. of samples	Semen volume (ml)	pH (B.T.B.)	Sperm density ($\times 10^6$ /ml)	Protein (mg/0.1ml seminal plasma)	Enzyme activity (mg. fatty acid produced)		Fructose (mg/dl seminal plasma)	Citric acid (mg/dl seminal plasma)
						(/0.1ml seminal plasma)	(/mg protein)		
Averages for sperm free fractions by electro-ejaculation	25	(0.1~0.6)	(6.8~8.8)	(0~8.2)	(0.6~4.0)	(26~66)	(11~53)	(12~477)	(49~543)
		0.24 $\pm$ 0.12	7.9 $\pm$ 0.6	3.4 $\pm$ 2.7	1.8 $\pm$ 1.0	41.6 $\pm$ 10.0	29.3 $\pm$ 14.5	170.6 $\pm$ 145.7	246.1 $\pm$ 166.0
Averages for ejaculates by artificial vagina	18	(0.3~1.0)	(6.2~6.6)	(14.2~29.1)	(5.4~9.1)	(21~36)	(3~7)	(891~1502)	(540~1037)
		0.62 $\pm$ 0.19	6.3 $\pm$ 0.1	21.7 $\pm$ 5.3	7.1 $\pm$ 1.1	29.5 $\pm$ 4.3	4.6 $\pm$ 1.2	1242.7 $\pm$ 160.1	794.6 $\pm$ 15.33

N. B. Differences in figures resulted from the electro-ejaculation and the ejaculation by artificial vagina are all highly significant on each item.

あった。また蛋白は約 $\frac{1}{3}$, 果糖は約 $\frac{1}{3}$, クエン酸は約 $\frac{1}{3}$ であり, これに反して酵素の比活性度は 6~7 倍も高かった。こころみにこれらすべての項目ごとに E. S. と A. V. の両者の差について統計的処理を行ってみたところ, いずれの項目についてもきめて高い有意性がみとめられた。

2. 電気射精液精漿蛋白の濾紙電気泳動像

上述の結果から E. S. の精子を含め分割での酵素比活性度が著しく高く, また精子含有分割には精のう由来と思われる多量の蛋白が含まれることが推定されたので, 凝固酵素蛋白ならびにそれ以外の蛋白について濾紙電気泳動的性質を検討するためにこの実験を行った。第 1 図には 3 頭の山羊について, それぞれ 1 例ずつの泳動像を示し, 同時に濾紙光電光度計による測定値および比活性度 (S. A.) を図中に併記した。これによると山羊 No. 1 では分割 I, II の比活性度がきわめて高く, III, IV, V, VI では低かった。一方泳動図をみると泳動速度の遅い蛋白を含む分割の方が, 速いものよりも比活性の高いことがうかがわれる。山羊 No. 2 については分割 I, IV の比活性度が高く, この分割では泳動速度の遅い蛋白が大部分を占めている。また No. 3 についても同様な傾向がみられ, 比活性度の高い分割 I, III では泳動速度の遅い蛋白の割合が多い。これは第 V 報⁷⁾でのべたようにアセトン沈澱法によって精製された酵素蛋白の泳動状態とよく近似しており, 精製酵素蛋白の泳動速度の遅いことから, 電気刺激でえられた射出精液のうち精子を含め分割では酵素純度の高いことを示すものといえる。3 頭の例を通じてみると No. 1 の分割 VI, No. 2 の分割 V, No. 3 の分割 IV では泳動速度の速い蛋白がほとんど大部分を占めており, またこれらの分割の比活性度は低い。なおこれらの分割がえられた射出液中の果糖濃度はそれぞれ 518.5, 426.2, 639.3 mg/dl であっていずれも人工腔による採取精液の数値にかなり類似していた。このような精子や果糖をとまなう分割中の蛋白は, 凝固酵素とは無関係であつて主として精のうに由来することが推定された。すなわち電気刺激採取法を応用して低電圧で精子を含め分割を採取すれば高純度の凝固酵素がえられることが考えられ, 酵素の精製に役立つものと思われる。

B. 精液の半枯渇採取と精液の凝固強度

精液の採取条件と凝固強度との関係を検討するための一項目として, この実験では短時間内に精液を連続採取し, 採取回次によって精液の凝固強度がどのように変

Fig. 1 Paper-electrophoresis of seminal plasma protein in the semen collected by electrical stimulation

かをしらべた。なお本実験は第 VII 報⁸⁾に報告したように 3 回連続採取した多くの実験例で, 採取回次のすすむにつれて凝固強度の上昇することが知られているので, この上昇限度の有無をも明らかにしようと考えて行われた。また同時に精液の一般性状ならびに 2, 3 の化学的組成の変化もあわせて検討した。

ただし本実験の場合, 完全な枯渇状態に達していない

と思われたが、約 1 時間内に 7~8 回連続採取すると乗駕欲が極端に低下し、それ以上の採取は不可能であった。

I. 実験の材料、方法および期間

実験には 2 頭のザーネン種山羊を使用し、精液採取は 1962 年の繁殖季節中すなわち 11 月~12 月にわたって行い、連続採取の前 4~5 日間は精液採取を休止した。精液採取に際しては台雌、台雄をとりかえ、できる限り激励して 50~70 分間に 6~8 回の連続採取を完了するようにした。採取精液はその都度精液量を記録し、精子濃度算定用の試料採取後直ちに氷冷水中に浸し、また採取時間が長くなるので凝固強度や化学的成分の変動をさけるために連続採取の途中で 2 回逐次遠心分離して精子と精漿を分離し、精漿材料は氷室に保存した。凝固強度ならびに果糖、クエン酸、蛋白濃度の測定は A 項と同様の方法で行った。

II. 成績ならびに考察

山羊 No. 1 および No. 3 についてそれぞれ 3 回の実験成績の平均値をもとめ第 2 図、第 3 図に示した。

a) 精液の一般性状

山羊 No. 1 では、精液量と精子濃度は採取回次のすすむにつれて平行して低下し、とくに精子濃度は 4 回目まで急激に低下し、その後 7 回目まで徐々に低下して約 $9.03 \times 10^6/\text{ml}$ になった。山羊 No. 3 でもほぼ同様な傾向がみとめられた。この山羊では精液量の低下は比較的徐々であったが、精子濃度は 4 回目で $10 \times 10^6/\text{ml}$ 、7 回目、8 回目にはそれぞれ 3.15 、 $0.80 \times 10^6/\text{ml}$ と極端に低下した。

b) 凝固強度

第 2 図に示されるように山羊 No. 1 では、1, 2, 3 回と次第に凝固強度は上昇し、さらに 4 回目になると急激に増加し、第 1 回目の凝固強度の約 4 倍、 $40 \text{ mg}/0.1 \text{ ml}$ 精漿、前後になってほぼ定値を示し、以後 7 回目まで低下せずむしろ幾分上昇するようであった。山羊 No. 3 では 5 回目まではほぼ直線的に増加し第 1 回目の凝固強度の約 5 倍程度になって以後 8 回目まではほぼ定値を示した。

c) 果糖、クエン酸および蛋白の濃度

山羊 No. 1 では果糖、クエン酸、蛋白ともに 1, 2, 3 回目まではほとんど変化しないかまたは幾分上昇し、その後わずかに減少して 7 回目には果糖、クエン酸は 1 回目の約 $\frac{1}{2}$ 程度になった。また山羊 No. 3 では果糖および蛋白は 4 回目まで幾分上昇し、その後 7 回目まで徐々に低下した。クエン酸は 1 回目から 8 回目まで大きな変

Fig. 2 Effects of depleted semen collection on the egg-yolk coagulating activity in goat No. 1. (Av. for 3 trials)

Fig. 3 Effects of depleted semen collection on the egg-yolk coagulating activity in goat No. 3. (Av. for 3 trials)

化はみられず、これら 3 成分については最終回の 8 回目でも 1 回目とくらべて大きな低下はみられず、果糖は 8 回目の方がむしろ幾分高いようであった。

上述の一般性状、凝固強度、果糖、クエン酸および蛋白などについての成績から、個体差はあるが、精液量、

精子濃度は 7~8 回の連続採取でかなり低下し、とくに山羊 No. 3 の精子濃度は著しく低下した。また精のう分泌物の成分と考えられる果糖、クエン酸、蛋白などは、山羊 No. 3 ではあまり低下しなかつたが、山羊 No. 1 では 8 回目にはほぼ半分になり、これらに反してひとり凝固強度のみは 2 頭の山羊についていづれも 4~5 倍に上昇したままで少くとも 7~8 回目の採取まで低下しなかつた。このことから精のうと尿道球腺ではその分泌様相がかなり異なることも推察された。

III. 要 約

山羊精液中の卵黄凝固酵素の凝固強度に影響を及ぼす諸条件のうち精液の採取条件として、電気刺激採取精液について人工陰法によるものと比較された。また精液を人工陰法によって約 1 時間内に 7~8 回連続採取した際の凝固強度の変動を検討した。なお、これら両者の実験では凝固強度以外に精液の一般性状、ならびに精漿中の果糖、クエン酸、蛋白濃度も同時に測定し結果の検討に参照された。

前者の実験には 3 頭、後者には 2 頭のそれぞれ正常なザーネン種山羊を使用し、両実験ともに 1961~1962 年の繁殖季節中に行われた。主なる結果はつぎのごとくであった。

A. 電気刺激採取精液の性状と凝固強度

電気刺激採取精液のうち精子をほとんど含まないか、きわめて精子濃度の低い分劃 25 例（精子濃度 $0 \sim 8.2 \times 10^8/\text{ml}$ 、平均 $3.4 \pm 2.7 \times 10^8/\text{ml}$ ）と人工陰法による採取精液 18 例について比較された。

1. 電気射精液の pH は濾紙法 (B. T. B.) で 6.8~8.8、平均 7.9 ± 0.6 で人工陰法精液の 6.3 ± 0.1 よりもかなり高かった。

2. 電気射精液精漿中の蛋白、果糖、クエン酸濃度はそれぞれ $1.8 \pm 1.0 \text{ mg}/0.1 \text{ ml}$ 、 $170.6 \pm 145.7 \text{ mg}/\text{dl}$ 、 $246.1 \pm 166.0 \text{ mg}/\text{dl}$ で、これに対し人工陰法精液ではそれぞれ $7.1 \pm 1.1 \text{ mg}/0.1 \text{ ml}$ 、 $1242.7 \pm 16.0 \text{ mg}/\text{dl}$ 、 $794.6 \pm 153.3 \text{ mg}/\text{dl}$ であって電気射精液の方がいずれの成分についても著しく低濃度であった。

3. 電気射精液精漿の凝固強度は $41.6 \pm 10.0 \text{ mg}/0.1 \text{ ml}$ で、人工陰法精液精漿の凝固強度 $29.5 \pm 4.3 \text{ mg}/0.1 \text{ ml}$ にくらべてかなり高く、また比活性度で比較すると、それぞれ $29.3 \pm 14.5 \text{ mg}/\text{mg}$ 蛋白、 $4.6 \pm 1.2 \text{ mg}/\text{mg}$ 蛋白となり、電気射精液の方が約 6 倍程度も高かった。

4. 電気射精液精漿の濾紙電気泳動像から、比活性度

の高い精漿では低いものにおけるよりも移動度の遅い蛋白の占める割合がはるかに大きく、また比活性度の高い精漿を射出した分劃では精子、果糖、クエン酸、蛋白などの濃度が著しく低かった。

以上の結果から低電圧で射出される精子をほとんど含まない分劃では精のう液成分は少く、尿道球腺液が多く含まれ、凝固酵素の純度の高いことが知られた。

B. 連続採取精液（1 時間内 7~8 回採取）の性状と凝固強度

1. 第 1 回目の採取精液と 7~8 回目の採取精液についてそれぞれ 4~6 例の平均値で比較してみると、精液量はそれぞれ 0.91 ml 、 0.31 ml 、精子濃度は $34.8 \times 10^8/\text{ml}$ 、 $6.2 \times 10^8/\text{ml}$ であって両者ともに 7~8 回目では著しく減少した。

2. 主として精のう成分を考えられる果糖、クエン酸および蛋白の濃度を 1 回目と 7~8 回目の精液について比較してみると果糖は 3~4 回目までわずかに上昇し、その後 1 頭の例では漸減して最初の約 $1/2$ になり、他の例では大きな低下はみられなかった。クエン酸は 1 頭の例ではかなり減少したが、他の例ではほとんど変化はみられなかった。蛋白は 2 頭ともに 4~5 回目以降にわずかに低下した。

3. 尿道球腺の分泌液に由来する凝固酵素の凝固強度は 1 回目の射精液で平均 $11.60 \text{ mg}/0.1 \text{ ml}$ であって、4~5 回目まで急激に直線的に増大し、その後はほぼ一定値を示し 7~8 回目の採取精液でも $51.43 \text{ mg}/0.1 \text{ ml}$ であった。

以上のことから精液を短時間内に連続採取した場合、精のうと尿道球腺では分泌の様相がかなり異なることが知られる。

(1963. 9. 25 受付)

文 献

- 1) LOWRY, O. H., N. J. ROSENBOUGH, A. L. FORR & R. T. RANDALL: *J. Biol. Chem.* 193, 265, 1951. 2) 入谷 (明)・西川 (義): 京大畜産学研究室創設 25 年記念論文集 97, 1961. 3) REO, J. H.: *J. Biol. Chem.* 107, 15, 1934. 4) NATELSON S., J. K. LUGOVOY & J. B. PINCUS: *J. Biol. Chem.* 170, 597, 1947. 5) BARKER, J. B. & W. H. SUMMERSON: *J. Biol. Chem.* 138, 535, 1947. 6) 小林 (茂): 臨床検査 2, 75, 139, 1958. 7) 入谷 (明)・西川 (義): 本誌 8, 118, 1963. 8) 入谷 (明)・西川 (義)・長沢 (成): 本誌 10, 56, 1963.

Summary

Methods of the semen collection may be a factor influencing the activity of the egg-yolk coagulating enzyme in goat semen. In this experiment, enzyme activity of the semen collected by the electrical stimulation (E. S.) was compared with the activity of the semen collected by the artificial vagina (A. V.). And the other experiment was carried out to examine the changes in the enzyme activity of the semen collected by the artificial vagina 7 to 8 times successively in about an hour until most of the sperm was depleted.

The general properties and some seminal constituents such as fructose, citric acid and protein were examined in both experiments mentioned above.

These two experiments were carried out using three male Saanen goats in the breeding season of 1960 to 1962.

Principal results obtained are as follows.

A. General properties and the enzyme activity of the ejaculate collected by E. S.

The data from 25 sperm free ejaculates obtained by E. S. and the one from 18 semen samples collected by A. V. were compared.

1. The pH value of the E. S. ejaculates, 7.9 ± 0.6 was markedly higher than that of the A. V. semen, 6.3 ± 0.1 .

2. Concentrations of fructose, citric acid and protein in the seminal plasma of the E. S. ejaculate were 1.8 ± 1.0 g/dl, 170.6 ± 145.7 mg/dl, 246.1 ± 166.0 mg/dl respectively, and these were markedly lower than those of the A. V. semen, 7.1 ± 1.1 g/dl, 1242.7 ± 16.0 mg/dl, 794.6 ± 153.3 mg/dl.

3. Enzyme activity of the seminal plasma of the E. S. ejaculate and of the A. V. semen was 41.6 ± 10.0 mg/0.1 ml, 29.5 ± 4.3 mg/0.1 ml respectively. Specific activity of the enzyme (activity per mg of protein) of the E. S. ejaculate was about 6 times higher than that of the A. V. semen.

4. It was found from the results of the paperelectrophoretic studies that the seminal plasma protein which has a higher specific activity showed lower mobility.

These results mentioned above suggest that the sperm free fractions collected by E. S. contained seminal vesicle constituents only in small amounts but much of the Cowper's gland secretion which may be rich in the enzyme.

B. General properties and the enzyme activity of the semen collected 7-8 times successively in about an hour.

1. Comparing the 1st collection with the 7-8th collection, it is found that semen volume was reduced from 0.91 ml to 0.31 ml, and the sperm density was decreased from 34.8×10^6 /ml to 6.2×10^6 /ml.

2. Concentrations of the seminal fructose, citric acid and protein that may be secreted from the seminal vesicle were not markedly decreased in a degree of depleted condition of this experiment. Fructose concentration tended to increase slightly up to the 3rd collection.

3. Activity of the egg-yolk coagulating enzyme secreted from the Cowper's gland was 11.60 mg/0.1 ml in the 1st collection, and was markedly increased up to the 5th collection, the increased activity, 51.43 mg/0.1 ml, being maintained up to the 8th collection.

From the above results it was suggested that the secretory functions of the seminal vesicle and of the Cowper's gland may be considerably different.