— 研 究 —

イヌ精液の保存に関する研究

I. Ca 欠 KRP 液保存における糖, グリシン, 牛乳
および卵黄添加の影響について

黒 田 治 門 ・ 広 江 一 正

(宮崎大学農学部 家畜生理学教室)

はじめに

今日の家畜人工授精技術の発達には、1870 年に SPALLANZANI¹⁾ がイヌの人工授精に成功したことに端を発する。しかし、イヌの人工授精に関する研究は、他の家畜に比較してかなり遅れている。

HARROP²⁾ は滅菌牛乳を稀釈液としてイヌ精子を保存し、人工授精に成功している。WALES & WHITE³⁾ は各種の緩衝液を用いて 37°C で 4 時間イヌ精子を保存し、生存率の変化について報告した。FOOTE⁴⁾ はクエン酸塩、重炭酸塩およびリン酸塩について保存効果を検討し、クエン酸塩が最もよいことを指摘した。また、20% 卵黄クエン酸液（以下卵ク液と略す）に、グリシンとグルコースを添加することによって生存率の延長がみられた。BERTLETT⁵⁾ は Ca 欠 KRP 液にグルコース、フラクトースおよびマンノースを加えて、室温 (19~22°C) と 37°C で 8 時間保存し、精子生存率は室温保存の場合が高く、また 3 種の糖の中ではグルコースが最も有効であることを示した。

イヌは精のうを欠くために、その精液中に糖質をほとんど含有しないが、グルコースやフラクトースを添加すると、イヌ精子はそれらを代謝利用することが知られている⁷⁾。

本実験では、イヌ精子の緩衝液として代表的な Ca 欠 KRP 液を基礎にして、これに糖、グリシン、牛乳および卵黄を添加した場合の保存効果を検討した。

Studies on the storage of dog semen. I. Effects of suger, glycine, milk and egg-yolk on the survival of dog spermatozoa in calcium-free Krebs Ringer-phosphate.

KURODA, Haruto & Kazumasa HIROE (Department of Veterinary Physiology, University of Miyazaki, Miyazaki 880).

Jap. J. Animal Reprod. 16 (4), 1971.

実験材料および方法

供試動物には、スピッツ種の成雄犬（年令は 2~4 才）6 頭を用いた。

精液の採取は手指法⁸⁾で行なった。その方法は、まず亀頭球 (Bulbus glandis) 上部を背腹両面から、拇指、示指および中指で指圧保持する。勃起不十分の場合には、該部を数回マッサージすると興奮が高まるので、その状態で、亀頭球上部を射精終了まで指圧保持するとよい。個体によって異なるが、尿道口の先端部をロートに軽く触れさせることで興奮を高めることができる。採取に先立って、包皮およびペニスを洗浄した。なお、台雌は使用しなかった。

AMANTEA⁹⁾ がイヌの精液は 3 つの部分に分画射出され、精子濃厚部は 2nd fraction であると報告した。以来、全精液について、または 2nd fraction のみを用いて、イヌ精液の保存に関する研究がなされている。

精液採取器具としては、精液管 (目盛付スピッツグラス)、小ロートおよび精液管恒温槽 (Fig. 1) を用いた。実験には、2nd fraction を用いた。精液は 1st fraction, 2nd fraction および 3rd fraction に分画採取したが、

Fig. 1. イヌ精液採取用恒温槽

Table 1. Composition of Buffers and Extenders used in Experiment I to VI

Treatment code No.	Ingredients/KRP (100/ml)		Extender		pH
	Sugar (g)	Glycine (g)	Buffer: Milk	Buffer: Yolk	
I {	1 G 1.8				7.2
	2 F 1.8				7.2
	3 L 3.6				7.2
	4 M 3.6				7.2
	5 — —				7.2
II {	6 G 1.8				6.8
	7 F 1.8	0.75			6.8
	8 L 3.6	0.75			6.8
	9 M 3.6	0.75			6.8
	10 — —	0.75			6.8
III {	11 G 1.8		50 : 50		6.8
	12 F 1.8		50 : 50		6.8
	13 L 3.6		50 : 50		6.8
	14 M 3.6		50 : 50		6.8
	15 — —		50 : 50		6.8
IV {	16 G 1.8			80 : 20	6.6
	17 F 1.8			80 : 20	6.6
	18 L 3.6			80 : 20	6.6
	19 M 3.6			80 : 20	6.6
	20 — —			80 : 20	6.6
V {	21 G 1.8	0.75	50 : 50		6.8
	22 F 1.8	0.75	50 : 50		6.8
	23 L 3.6	0.75	50 : 50		6.8
	24 M 3.6	0.75	50 : 50		6.8
	25 — —	0.75	50 : 50		6.8
VI {	26 G 1.8	0.75		80 : 20	6.6
	27 F 1.8	0.75		80 : 20	6.6
	28 L 3.6	0.75		80 : 20	6.6
	29 M 3.6	0.75		80 : 20	6.6
	30 — —	0.75		80 : 20	6.6

G—Glucose, F—Fructose, L—Lactose, M—Maltose.

All extenders were contained 1,000 unit of Penicillin and 1,000 μ g of dihydrostreptomycin per ml.

2nd fraction 射出終了後、生殖器とロートに付着した精子を洗い込むために 3rd fraction を数滴加えた。

精子の生存率および活力は、西川式精液性状検査板と同精子検査用恒温器を用いて、37°C に加温し顕微鏡下(200 倍)で検査した。精子の活力は 5 段階に分類し、次の基準で生存指数に換算して表示した。たとえば、活力を(85卅, 5卅)と判定した場合の生存指数は、(85×1) +

(5×1/2)=88 となる。

実験に用いた稀釈液の組成は Table 1 に示すごとくであった。稀釈倍率は 5 倍とし、4°C (冷蔵庫) に保存した。Ca 欠 KRP 液は、UMBREIT¹⁰⁾ らに従い、溶液 1,000 ml 中の組成は次のようにした。

Na ₂ HPO ₄	0.1419 g	KCl	0.3725 g
MgSO ₄	0.1203 g	NaCl	7.7144 g
KH ₂ PO ₄	0.1361 g		

実験成績

各稀釈液についての精子生存率および活力は、一括して生存指数として表示した。各実験成績はそれぞれ 10 例の平均として表示した (Table 2)。

I. Ca 欠 KRP 液に糖を加えた成績 (Table 2-I)

Ca 欠 KRP 液にグルコース、フラクトース、マルト

運動の状態	活力の評価	生存指数 換 算 率
最活発前進運動	卅	1
活発前進運動	卅	1/2
緩慢な前進運動	+	1/4
旋回およびバック運動	±	1/8
静 止	—	0

Table 2. The motility index of dog spermatozoa stored at 4°C (Average of ten ejaculates)

Days stored at 4°C	Treatment code No.																													
	I					II					III					IV					V					VI				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
0	68	73	65	76	77	28	32	30	25	50	75	73	77	75	83	81	84	82	82	87	84	83	84	83	89	86	85	86	84	88
1	9	8	14	10	20	4	4	5	12	7	29	22	14	26	27	13	10	10	11	22	23	22	22	21	27	10	11	12	14	20
2	4	4	9	4	7	2	2	3	8	2	13	8	8	8	10	6	6	4	3	9	2	2	2	2	2	1	1	1	1	0
3	1	2	5	2	3	1	1	2	6	1	5	4	3	3	3	3	3	3	2	4	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0
4	0	1	3	1	1	0	0	1	4	0	2	3	2	2	2	2	2	2	1	3	0	0	1							
5		0	2	0	0			0	2		1	1	1	2	1	1	2	1	1	2			0							
6			1						1		1	1	1	1	1	1	1	1	0	0										
7			1						0		0	0	0	0	0	0	0	0												

ースおよびラクトースを添加した場合の実験成績は、Table 2-I に示すごとくであった。

生存日数は Ca 欠 KRP 液のみでは 4 日であったが、ラクトース添加では 7 日と最長を示し、その他は 4 日であった。

稀釈直後の生存指数は Ca 欠 KRP 液のみでは 77、糖を加えたものでは 76 から 65 の間であった。保存中の生存指数は、KRP 液のみにくらべて糖添加の効果はみられなかった。

II. Ca 欠 KRP 液にグリシンおよび糖を加えた成績 (Table 2-II)

生存日数では Ca 欠 KRP 液にグリシンのみを添加したものが 3 日であったのに対して、マルトースを添加した場合 6 日で最も長く、その他は 4 日以内であった。

稀釈直後の生存指数は、グリシン添加のみのもので 50、グリシンと糖を添加したものでは 32 から 25 の間であった。これは実験 I の結果に比べかなり低い値を示しており、グリシンによる稀釈ショックのためと考えられる。グリシンはイヌ精子にとってはむしろ有害であることを示している。保存中の生存指数においては特に差はみられなかった。

III. 糖添加 Ca 欠 KRP 液に牛乳を加えた成績 (Table 2-III)

実験 I に用いた稀釈液と牛乳を 1:1 の割合に混合した液にイヌ精子を保存した。

生存日数ではいずれも 6 日を示し、この点実験 I に比べて牛乳はかなり有効であることを示した。

稀釈直後の生存指数は 77 から 73 であった。これは実験 I に比べてかなり高い値であり、牛乳が稀釈ショック防止の効果のあることを示している。糖を添加しな

った場合 (No. 15) には、生存指数は 83 で糖添加の場合より高い値を示した。保存中の生存指数は第 1 日目から 20 から 14 (実験 I では 9 から 4) で実験 I に比べてややよい成績を示した。

IV. 糖添加 Ca 欠 KRP 液に卵黄を加えた成績 (Table 2-IV)

実験 I に用いた稀釈液と卵黄を 4:1 の割合で混合した液にイヌ精子を保存した。

生存日数は 5 ないし 6 日であった。稀釈直後の生存指数は 84 から 81 の間を示し、実験 III の成績よりもかなり高い値を示した。このことから稀釈ショックの防止には牛乳よりも卵黄の方が効果のあることが知られた。糖を加えなかった稀釈液 (No. 20) では、生存指数は 87 で、実験 I ~ IV では最高であった。保存中の生存指数はむしろ牛乳添加のものよりも低い値を示した。

V. 糖およびグリシン添加 Ca 欠 KRP 液に牛乳を加えた成績 (Table 2-V)

実験 II に用いた稀釈液と牛乳を 1:1 の割合に混合した液にイヌ精子を保存した。

生存日数はマルトース添加の場合が最も長く 4 日 (実験 II では 6 日)、その他は 3 日以内であった。実験 II に比べて生存日数はかなり短くなっている。

稀釈直後の生存指数は、89 から 83 の間で実験 II に比べると非常に高い値を示した。保存中の生存指数は、第 1 日目が 27 から 15 の間で実験 II (12 から 4) に比べてかなりよい値を示したが、第 2 日目はすべて 2 で実験 II (8 から 2) の成績より急に低下している。

VI. 糖およびグリシン添加 Ca 欠 KRP 液に卵黄を加えた成績 (Table 2-VI)

実験 II に用いた稀釈液と卵黄を 4:1 の割合に混合した

液にイヌ精子を保存した。

生存日数は糖を添加したものがわずかに 2 日、その他は 1 日であり、この実験では最も短い生存日数であった。

稀釈直後の生存指数は 86 から 84 の間で総体的に高い値を示した。保存中の生存指数は、第 1 日目は 22 から 10 の間であったが、第 2 日目は 1 と最低の値を示した。

考 察

イヌ精子の生存性に対する糖の影響について、FOOTE^{4,5)} および BERTLETT⁶⁾ はグルコースが有効であると述べ、BEDERKE¹¹⁾ および WALES⁸⁾ はグルコースについて著しい効果は認められないと報告している。その他の糖については、BERTLETT⁶⁾ はフラクトースとマンノースはグルコースよりも保存効果が劣ると述べ、FOOTE⁵⁾ はアラビノースをグルコースと併用した場合、グルコースと同程度の効果があると述べている。また、WALES⁸⁾ の成績では、イノシトールは有効ではない。

本実験では、保存中のイヌ精子のエネルギー補給源の 1 つとして糖の利用を考え、明らかにイヌ精子が代謝利用することのできるグルコースとフラクトースを選び、そのほかに 2 糖類の中からマルトースとラクトースを選んで添加してみた。

実験 I および II の結果から、グルコースおよびフラクトース添加では、マルトースおよびラクトース添加よりも生存日数が短かった。精子生存率は総体的に低く、糖を加えることによって生存率を高めることはできなかった。保存 4 日目に稀釈精液の pH を測定した結果、グルコースおよびフラクトース添加では、pH の低下が著しく、稀釈直後の pH が 7.0~6.8 であったのに対して 4 日目には 6.0~5.8 に低下している。このことから、イヌ精子が保存中にグルコースなどを代謝利用して、その結果乳酸が蓄積され、pH の低下を招いたものと考えられる。著者¹²⁾らのイヌ精子の代謝に関する実験によると、緩衝液の種類によって、糖消費量および乳酸蓄積量が異なるが、多量の乳酸の存在によってイヌ精子の生存率が著しく低下することが知られている。これらのことから Ca 欠 KRP 液によるイヌ精子の保存には、糖の効果は認められないといえるようである。

グリシンはイヌ精子に対して、強い稀釈ショックを与え、そのため精子生存率の低下が著しく、精子にとってかなり有害であることが知られた。FOOTE⁵⁾ はイヌ精子の稀釈液にグリシンが有効であると報告しているが、彼

の成績においても純グリシン液では稀釈ショックが強く認められ、稀釈直後の生存率は 40% 以下であり、最長生存日数も 4 日以内で著者らの成績と一致している。

脱脂粉乳がウシ精子の稀釈液として実用に供され、また牛乳がイヌ精子の稀釈液として有効であることは、HARROP²⁾の実験で証明されているが、牛乳を稀釈液として利用する場合、牛乳が不透明であるために精子の検査にかなりの困難を伴う。この欠点を補うには、精子に対する保護効果を害さない程度に稀釈する必要があるが、本実験では Ca 欠 KRP 液で 2 倍に稀釈して用いた。実験 III および IV の成績から、牛乳が稀釈ショックを防止する効果を認めたが、Ca 欠 KRP 液と牛乳の混合液では、イヌ精子に対する保存効果は充分ではなく、卵黄の効果より劣ることが知られた。Ca 欠 KRP 液に卵黄を加えることにより、稀釈ショックはほぼ完全に防止することができた(実験 IV および VI)。

FOOTE⁴⁾ はクエン酸塩、磷酸塩および酒石酸塩について比較した結果、クエン酸ナトリウム (1.16 g)、グリシン (0.75 g)、卵黄 (20 ml) および水 100 ml から成る稀釈液がイヌ精子の保存に最もよく、その生存率は 8 日で 47% であったと報告している。さらにグルコースを添加することによって生存率が著しく改善されたとも述べている。

実験 II ではグリシンを添加することによって生存率が低下したが、卵黄の添加によって(実験 VI)稀釈ショックを防止することができた。実験 III および VI で、生存日数が 6 日であったが、グリシンを添加した場合(実験 V および VI)、生存日数は 2 日に短縮された。その原因は Ca 欠 KRP 液にグリシン、糖、卵黄および牛乳などを添加することによって、稀釈液の滲透圧が高くなりすぎたためと考えられる。グリシンを卵黄と併用すれば、稀釈ショックは防止されるので、この点を考慮すれば、イヌ精子に対する保護物質として利用できるものと考えられる。

イヌ精子の稀釈液には、緩衝液の組成が重要な要因であり、Ca 欠 KRP 液では充分な保存効果を期待できないといえる。さらに有効な緩衝液の組成が確立されることが期待される。

要 約

イヌ精子の生存性に関して、Ca 欠 KRP 液保存における糖、グリシン、牛乳および卵黄添加の効果について検討した。

1. Ca 欠 KRP 液のイヌ精子に対する保存効果は小さ

- く、全実験を通して最長生存日数は日 7 であった。
2. Ca 欠 KRP 液保存において糖添加は、イヌ精子の生存性延長に対して効果は少ない。
3. Ca 欠 KRP 液保存において、牛乳添加に比べて卵黄添加の方がイヌ精子の生存性に対して有効である。
4. グリシンはイヌ精子に対して卵黄と併用しなければむしろ有害である。 (1970. 11. 28 受付)

文 献

- 1) HAFEZ, E. S. E. 編著, 西川(義)訳: 家畜家禽繁殖学, 養賢堂, 1966.
- 2) HARROP, A. E.: *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **129**, 564, 1956.
- 3) WATES, R. G. & I. G. WHITE: *J. Reprod. Fertil.*, **5**, 67, 1963.
- 4) FOOTE, R. H.: *Am. J. Vet. Res.*, **25**, 32, 1964.
- 5) FOOTE, R. H. & E. P. LEONARD: *Cornell Vet.*, **54**, 78, 1964.
- 6) BERTLETT, D. J.: *J. Reprod. Fertil.*, **3**, 173, 1962.
- 7) MANN, T.: *The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract*. 1st publ., Butler & Tanner Ltd., 1964.
- 8) BOUCHER, J. H., R. H. FOOTE & R. W. KIRK: *Cornell Vet.*, **48**, 67, 1958.
- 9) AMANTEA, G. R. C.: *Accad. Lincei*, Ser. 5A, **23**, 457, 1914.
- 10) UMBREIT, BURRIS & STAUFFER: *Manometric techniques and tissue metabolism*. Buagess, Minneapolis, 1949.
- 11) BEDERKE, G.: *Arch. Tierernähr. Tierz.*, **9**, 585, 1933.
- 12) 黒田(治)・広江(一): 57 回日畜学会講演, 1970.

Summary

Effects of sugar, glycine, milk and egg-yolk in the calcium-free Krebs Ringer-phosphate on the liability of dog spermatozoa stored at 4°C were studied.

1. It was indicated that the calcium-free KRP buffer was less available on the storage of dog spermatozoa and the longest survival period of dog spermatozoa were seven days in treatments.
2. The sugars were less effective on the viability of diluted dog spermatozoa in the calcium-free KRP buffer.
3. Egg yolk-calcium-free KRP buffer was superior to the milk-calcium-free KRP buffer improving for the storage of dog spermatozoa.
4. Glycine was seemed to harmful on the survival of dog spermatozoa without egg-yolk extenders.