精子運動の集団計測に関する研究

飯田 勲・福田道雄・小島義夫・番場公雄

(静岡大学農学部 家畜繁殖学教室)

受精にとって射出精液の良否はその中に存在する精子の運動性に大いに関係する。個々の精子の運動性がよいことは当然望ましいことであるが、それよりも集団運動力 (group movement) が良いか悪いかは受精にとって一層大切である。こうした精子の集団運動力の評価を最も客観的に、しかも科学的に表示することは極めて重要なことで、この問題については古くから各種の方法が研究されてきた。例えば精子活力によるメチレンブルー還元力の方法¹⁾、インピーダンスの方法²⁾、解糖による果糖消費力の測定³⁾、酸素消費力の判定⁴⁾、精子活力の機械的測定⁵⁾ など多くの研究がなされてきた。しかし、まだ実用的に優れたものはなく、今日なお顕微鏡的観察によってなされているに過ぎない。わが国で行なわれている方法は精子の運動力と生存率とに区別し、運動力を卍, 卅, +, ……等の記号, 生存率を%で示している。これはどんなに熟練した者でも、その主観性をまぬがれることはできない。そこでわが国でもかかる欠点を改良すべくこの方面の研究者が集まって精子活力判定委員会をつくってその研究に努めてきたが、未だ完全なものではない。最近 GLOVER (1968)^{6,7,8)} は光学的に精子活力の変化を透過光量の変化でとらえられることを示唆した。その原理はすでに ROTHSCILD (1953)⁹⁾ が示している。すなわち顕微鏡下で精子の集団運動は shearing (運動力の剪断) すると運動性が規制され、また shearing をとめると運動性はもとにもどるということを観察した。しかも運動性の復活力は精子の活力に関係し、活力のよいものはその復活時間 (recovery time=R. T.) は早く、活力の悪いものは R. T. が遅いとしている。また WALTON (1952)¹⁰⁾ もこの考え方を提示し、自ら測定器を創ったが一般に使われるには至らなかった。著者らは 2 枚のガラス板の間に一定の厚さの精液層をつくり、下方から

一定の光量をあたえ、これを shearing することにより精子運動を規制し、これを止めた場合精子活力の復帰する力 (R. T.) を光量の変化として CdS (硫化カドミウム) でとらえ、これをペンレコーダーに記録して活力の判定を数的に表示できるような装置を試作し、実験したのでその結果を報告する。

実験材料および方法

供試精液は静岡県育成試験場に繋養の種雄牛から採取された原精液をセミンで 2 倍稀釈した正常な精液を用いた。送られた供試精液は 5°C に保存し、採精当日もしくは翌日試験目的に応じ同じセミンで精子数を調整した。試作した測定装置は Fig. 1 に示す通り、顕微鏡加温装置 (1)、精子活力測定装置 (2)、定電圧装置 (3)、ペン書き式記録装置 (4) の四つの部分からなる。加温装置は供試精液が常に 38°C に保てるように顕微鏡全体を一定温度下に置くようにした。光源は直流点灯とし、6 V, 1 A のランプを装着した。精子活力判定装置を Fig. 2 に示した。①は顕微鏡、②は photo cell でここに CdS が装着され受光の部分である。③は shearing moter で cell を回転し、その回転数は stabilizer で調

1. warmer (38°C)	2. shearing cell
3. voltage regulator	4. pen recorder

Fig. 1. General appearance of the apparatus for measuring the motility.

Studies on the method of measuring the group movement of bull spermatozoa.

IIDA, Isao, Michio FUKUDA, Yoshio KOJIMA & Kimio BAMBA (Laboratory of Reproductive Physiology, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, Iwata 438.)

Jap. J. Animal Reprod. 17(2), 1971.

1. microscope (without objective and eye piece) 2. photo cell
3. shearing motor 4. shearing cell 5. lamp 6. pen recorder

Fig. 2. Apparatus for measuring the motility.

1. holder 2. shearing plate (glass)
3. spacer 4. fixed plate (glass)

Fig. 3. Apparatus of shearing cell.

節するようにしてある。④は shearing cell で、ここに一定量の試料を入れる。⑤は光源ランプで、光量は定電圧装置で一定にした。⑥はペン書き式の記録計である。Fig. 3 は活力判定の部分さらに詳細に図示したもので、①は holder で shearing plate を被う硝子製の蓋になっている。試料を入れる時はこの蓋を取る。②は shearing plate で直径 34 mm の硝子製の板で、この上に供試精液をとる。holder とこの shearing plate の間隙は 0.27 mm で、供試精液量は 0.25~0.35 ml 位が適

当であることが予備実験でわかった。つまりこの試料の厚さは透過光量に密接な関係にあり、この程度の試料で精子数 3 千万~5 千万位まで変化をとらえ得ることがわかった。以下この基準で実験を進めた。③は spacer, ④は fixed plate でこの両者を固定し、ベルトで motor に連結して回転する。供試精液は 5°C に保存してあるので、ピペットで一定量を shearing plate に採取したので、ちしずかに holder を装着するのであるが、この時絶対に気泡を作らないように注意して操作する。そして装着終了後約 3 分経過し、試料温度が 38°C に等しくなった時 shearing して R. T. を記録するように実験を行なった。実験終了後は holder および shearing plate をエーテルもしくはアルコールで清拭し、板面が乾燥してから次の試料を取るようにした。

実験結果

活発な集団運動を示している精子活力を人為的に shearing をすることによって規制し、この操作を止めた場合もとの運動に復活する力が果して精子の運動力を示すかどうかを実験した。Fig. 4 はその関係を調べたものである。これによると (1) は cell に全く精子材料を入れない状態で shearing した結果を示したものである。さらに (2) は cell に精液量 0.3 ml を入れたもので、この精液中の精子は高温にさらして全く運動性を示さないように調整し、予め顕微鏡で運動性のないことを確認して shearing したものの結果を示す。これによる

(1) no specimen (2) non motile sperm (3) motile sperm

Fig. 4. Figures which appeared in pen recorder for different type of motility.

と明らかに運動性のない精液試料は光学的变化はなく、R. T. は読みとることはできないことがわかる。(2) は精子数 $8 \times 10^8/\text{ml}$ で肉眼顕微鏡の精子活力は 80% の活発な運動性を示すものを同一条件で shearing した結果である。これによると R. T. は 1.4 秒であった。ここで shearing によって下方に曲線が下がることは透過率が大きくなることを示し、精子の運動力は一定に規制されていることを意味している。recorder では出力+を逆にしているため、散乱角からいえば shearing 中の方が、しない時よりも小さいといえる。この結果から、shearing を止めた場合もとの透過光量にもどる力、つまり R. T. は活力の度合いを示すということになる。すなわち R. T. が短い程精子活力がよいことを示すことになる。もし精子運動力が低下すればこのカーブは記録紙上の傾斜がずれ、R. T. は大きくなっていく。以上のような基礎実験結果から、精子の集団運動力は R. T. を測定することによって数的に精子活力を測定できる可能性を得た。以上精子活力の測定を R. T. によって進めていく場合各種の条件が出てくるので、以下次の実験を行なった。

I. 精子数と R. T. との関係

本実験は先に述べたように透過光量と精子運動力の変化をとらえていく装置であるので、一定容積中の精子濃度によって R. T. に差があるかどうかを調べたものである。まず同一精液試料を $4.0, 2.0, 1.0, 0.5 \times 10^8/\text{ml}$

Table 1. Relationship between recovery time (R. T.) and number of bull spermatozoa

	Number of bull spermatozoa			
	4.0×10^8	2.0×10^8	1.0×10^8	0.5×10^8
R.T.(sec.)	3.14	2.86	2.94	2.76

Analysis of variances of data

Factor	D. F.	M. S.	Fs
Number of sperm	3	174.3	0.31
Error	276	547.8	
Total	279		

Notes: 1) Shearing speed was 45 r.p.m.

2) Values were the mean of 70 trials, 14 ejaculates from 6 bulls.

の 4 種類に調整し、これを 5°C に保管して各々 0.3 ml ずつ試料を cell に採り、shearing の回転数は 45 r.p.m. としその R. T. を記録した。本実験に使った種雄牛数は 7 頭で、14 射精、70 回実験をしその結果を Table 1 に示した。この結果から明らかに精子数と R. T. との間には有意差がないことがわかった。従って精子数の差によって R. T. が変わることはないので、本実験装置は再現性があり、精子活力測定に使えることがわかった。た

だ、記録紙上の読みの点からみると、精子数は 1~2 億精子/1 ml 程度で測定する方が R. T. は読み易いといえる。これは精子数が少なくなると透過光量の変化が少なくなつて記録上の変化が少なくなってくるからである。

II. 回転数と R. T. の関係

精子数を一定とし、活力も一定のものを材料とし、shearing の回転数を変えた場合 R. T. にどんな影響があるかを調べたのが本実験である。使用種雄牛数は 5 頭、15 射精のもので 65 回実験を行ないその結果を Table 2 に示した。この結果から shearing の回転数と R. T. との間に有意差が認められなかった。従つて shearing の回転数は R. T. に影響しないので本装置を使って精子運動を R. T. で測定していくことに支障はないということになる。

III. 経時的活力変化 (肉眼的観測) と R. T. との関係

実験 I II から精子数および回転数は R. T. に対して有意差をもたらさないことが確認されたので、精子活

Table 2. Relationship between recovery time (R.T.) and r.p.m. of shearing of bull spermatozoa

	Shearing (r.p.m.)			
	60	45	33	20
R.T.(sec.)	4.20	3.92	3.94	3.94

Analysis of variance of data

Factor	D. F.	M. S.	Fs
Shearing	3	1014.4	1.12
Error	256	901.9	
Total	259		

Notes: 1) Number of spermatozoa was 2×10^8 /ml.

2) Values were the mean of 65 trials, 13 ejaculates from 5 bulls.

Table 3. Relationship between recovery time (R. T.) and various rates of motility

Stored at 5°C. for:	No. 1		No. 2		No. 3		No. 4		No. 5	
	R. T. (sec.)	Motility (%)	R. T. (sec.)	Motility (%)	R. T. (sec.)	Motility (%)	R. T. (sec.)	Motility (%)	R. T. (sec.)	Motility (%)
1 day	1.8	90	1.5	90	1.4	95	2.0	85	1.3	90
2	5.6	70	1.6	90	3.0	85	13.2	60	6.4	90
4	11.1	55	2.9	75	3.2	70	13.3	60	10.2	80
6	13.0	40	4.5	70	3.9	55	16.2	45	12.4	60
8	15.3	20	6.3	40	6.8	45	19.8	40	23.0	20
10	20.8	10	18.0	25	19.1	15	19.3	15	—	—

Notes: 1) Number of sperm was 2×10^8 /ml.

2) Shearing speed was 45 r.p.m.

力が変化した場合 R. T. とどのような関係があるかを検討した。この実験では精子数は一定にし、その試料を 5°C に長日間保存し、その間に低下していく活力の変化を予め従来の肉眼的観測を行ない、同時に R. T. を測定し比較した。その結果は Table 3 に示してある。この実験でわかるように活力の低下と共に R. T. も延びていくことが明らかである。さらに実験回数を重ね、5 種雄牛から 14 射精の精液を保存し、経時的に R. T. を測定して肉眼的に観察した活力%との関係をみた。R. T. はすべて対数変換 ($\log_{10}$ R. T.) をしてから両者間の相関関係および回帰を調べてみた (Fig. 5)。80 回の実験を行なった結果、その肉眼的の観察と R. T. の回帰直線を求めたのが Fig. 5 に示してある。これより精子活力の変化と R. T. との間には極めて高い負の有意な相関関係 ($r = -0.826$) のあることがわかった ($P < 0.01$)。これ

Fig. 5. Relationship between recovery time (R. T.) and motility rating of bull spermatozoa.

Table 4. Effect of semen volume and number of bull spermatozoa on recovery time (R.T.)

	Semen volume (ml)				Mean % of motile sperm
	0.27	0.7	1.0	1.5	
2.0×10^8	1.52	2.77	2.61	2.29	93.3
1.0×10^8	1.34	2.41	2.42	2.19	91.7
0.5×10^8	1.35	1.93	2.37	1.79	88.3
0.3×10^8	—	2.12	2.25	1.80	86.7

- Motes: 1) Shearing speed was 45 r.p.m.
 2) The diameter of shearing plate was 34 mm.
 3) Values were the mean of recovery time (sec.) of 15 trials from 3 bulls.

により本装置を使って客観的に精子活力を表示できることが確認された。

IV. 供試精液量と精子との関係

精子活力を測定すべき供試精液量はできるだけ少ない方が望ましい。また人工授精の立場からはできるだけ注入すべき精子数は少ない方が望ましい。以上のような条件下で精子活力を R. T. で求めている場合、透過光量の

の観察では精子活力は精子数が少なくなるとかく低く見誤る傾向がみられた。

V. 供試精液量、精子数と活力変化の関係

供試精液量と精子数の組合せを一定にした場合、活力変化と R. T. との関係をみた結果を Table 5 に示した。これによるとやはり R. T. は精子活力の低下と同時に延長していくことがわかった。また肉眼的活力観察と同様な傾向であった。この表で実線は記録計が読めなかった部分、点線の部分は R. T. が無限大に延びていったものを示している。

考 察

精子活力を客観的に表示するには精子の集団運動力を何らかの方法で計測することが必要である。このために ROTHCHILD⁹⁾ は精子運動によるインピーダンスの変化度を計測する方法を考案した。しかしこの方法では、比較的精子活力がよく濃度の高いものには使いうるが、反対の場合には余り使い得ない。一方著者ら⁵⁾ は精子がアットランダムに運動している場合、単位面積 (slit) 内を一定時間内に通過する精子数はその活力が良い程多いと考えて、その数を暗視野照明下で光学的にとらえて活

Table 5. Effect of semen volume and number of sperm on recovery time (R.T.) and motility rating of bull spermatozoa

		Stored at 5°C. for:					
		1 day		4 days		8 days	
		R.T. (sec.)	Motility (%)	R.T. (sec.)	Motility (%)	R.T. (sec.)	Motility (%)
0.27 ml	2.0×10^8	1.20	95	1.95	70	10.58	40
0.7	1.0×10^8	1.16	95	2.40	75	10.46	30
1.0	0.5×10^8	—	90	2.80	70	10.94	20
1.5	0.3×10^8	—	90	2.73	70		5

変化でとらえている以上そこにある限界があると思われる、本実験を試みた。精子数は 2, 1, 0.5, 0.3×10^8 /ml とし、供試精液量は 0.27, 1.0, 1.5 ml とした。cell の直径は 34 mm のものを用いた。従って供試量の差は厚さの差を示すことになる。3 頭の種雄牛から得た精液にて 15 回実験を行なった成績は Table 4 に示す通りである。この結果から、精液量 0.27 ml では 2 億、1 億、5 千万の精子数では R. T. にあまり差はないが、3 千万では測定困難であり、精液量 0.7, 1.0, 1.5 ml では R. T. にみだれを生じたように思われる。この点さらに検討をし、最適試料量を求めていく考えである。肉眼

力を判定しようとして実験を行なった。これによってある程度精子活力を機械的に表示ができる可能性を得た。しかし再現性の点で多少問題が残っている。本実験は精液中に浮遊し集団的に運動している精子群の動きを人工的に shearing することにより一定の規制をあたえ、その shearing の操作を止めた場合もとのアットランダムな運動にもどる力、つまり復活力を精子活力として光学的に測定しようとしたものである。この実験で shearing による精子運動規制と復活力の理論的問題についてはまだよくわかっていない。特に shearing することによっておこる精子運動の規制は人間の視覚によっ

て一定に規制されているようにみえるのかどうか、精子の一定方向からおこる光学的影響なのか、また視野中の液層の濃度、粘度により影響があるのかどうかという点について今後検討すべき問題として残っている。今回はこの方法で精子活力を客観的に表示し、かつ実用的利用価値があるかどうかを検討した。その結果本装置は精子活力を客観的に計測できかつ実際の利用価値のあることが実証された。しかし今回行なった実験は精子濃度、shearing の回転数、精子活力の変化、試料の供試量などについてのみ実験したのであって、その他稀釈液の粘度、稀釈液中の光学的異物、特に脂肪球などの R. T. に及ぼす影響、また R. T. と受胎率との関係などについても検討する必要性が残されている。さらに測定器機としてはその精度、測定限界など多くの検討問題を残している。

要 約

精子の集団運動力を客観的に計測するために著者らが試作した装置を用いて実験したところ、次の結果を得た。

1) 本装置を用いた場合、shearing によって精子の運動を規制し、これを解く場合に復活する能力 (R. T.) を測定することによって精子活力を計測することができた。

2) R. T. の測定には用いた精子数の間には有意差がみられないことがわかった。但し R. T. を記録紙で読みとる点では 1~2 億精子/ml あたりが適当と思われた。

3) 用いた shearing の回転数は R. T. に対して有意

差をもたらされないことがわかった。

4) 肉眼的測定値と R. T. との間には極めて高い負の相関係数 $r = -0.826$ が検出された ($P < 0.01$)。これによって、本装置は精子活力を R. T. で求めることにより数字的に示すことができる。

本研究を進めるに当って、牛精液試料を提供して頂いた静岡県育成試験場並びに本装置の試作に協力を賜った興和 K. K. 電機光学部に深く感謝する。

(1971. 8. 20 受付)

文 献

- 1) UMBREIT, W. W., R. H. BURRIS & J. F. STAUFFER: Monometric Techniques and Tissue Metabolism. Minneapolis, Burgers Publishing Co. 1949.
- 2) ROTHSCHILD, L.: *Nature, Lond.* **163**, 358, 1949.
- 3) MANN, T.: *J. Agric. Sci.*, **38**, 325, 1948.
- 4) DIXSON, M.: *Manometric Methods*. 2nd ed. 1943.
- 5) 飯田 (勲)・番場 (公): 日本畜産学会東海支部会報, (17), 1969.
- 6) GLOVER, F. A.: *Nature*, **219**, 1263~64, 1968.
- 7) GLOVER, F. A.: VI. Cong. Intern. Repord. Anim. Insem. Artif. Paris. Vol. II. p. 1045, 1968.
- 8) GLOVER, F. A.: *J. Sci. Instrument.*, **2**, 8, 1969.
- 9) ROTHSCHILD, L.: *J. Exp. Biol.*, **30**, 178, 1953.
- 10) WALTON, A.: *S. Exp. Biol.*, **29**, 520, 1952.

昭和 46 年 12 月 25 日 印刷
昭和 46 年 12 月 30 日 発行
(会員頒布)

発行者 星 修 三
東京都小平市津田町 1494-22
編集者 高 嶺 浩
東京都府中市幸町 東京農工
大学農学部家畜生理学教室
(郵便番号 183)

印刷所 株式会社 国際文献印刷社
東京都新宿区山吹町 184
発行所 家 畜 繁 殖 研 究 会
東京都世田谷区下馬 3-34-1
日本大学農獣医学部
家畜臨床繁殖学教室