鶏精液検査法の 2, 3 の改良点について

樋浦 善敬・河野憲太郎

(新潟大学農学部畜産学科)

鶏や七面鳥の人工授精が一般化するにつれて、精液の性状検査は他の家畜同様に著しく重要性を増してきた。しかしその検査法は哺乳類のものをそのまま踏襲したものであって、家禽精子の特殊性はほとんど無視されており、その結果観察に際してはかなりの不便を忍んでいるのが現状であろう。そして多少の改良が考察されている。著者らはたまたま鶏精液を実験材料として選ぶにあたり、検査法の再検討の必要性に迫られ、2, 3 の実験を試みた。その結果若干の成果を得たので報告する。

1. 鶏精子形態観察用の標本作成法について

鶏の精子は長さ 100μ の糸状を呈するために慣用法によって標本を作成した場合、精子が互いにからみあって

線状の集塊を形成しがちで、尾部の屈折や彎曲等もかなり多く認められる。また頭部においてはしばしば著しく膨化かつ波状に変形するもの、あるいは空胞を生じるもの等が観察される。これらの頭部異常はその出現部位が塗抹面の起始部および辺縁部に限定されているうに標本によって出現程度がまちまちであることから、おそらく塗抹による人工的所産物であろうと考えられる。

そこで標本作成法について種々検討を加えた。

実験材料ならびに方法

供試鶏：単冠白色レグホーン種雄成鶏 10 羽である。

実験方法：腹部マッサージ法で採取した精液を温度ショックの影響を避けるために 15 分以内に標本作成に供した。

表 1. 形態標本の作成法手順

<p>方法 I. (従来の慣行法)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 原精液をスライドグラス上に滴下 2. 塗抹・風乾 3. メタノールで固定、水洗 4. カルボールフクシン液で染色、水洗 5. 透徹・封入 	<p>液で、染色 (5~10 分)、水洗</p> <p>7. 透徹・封入</p>
<p>方法 II. (仮称 盛り式法)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 卵白グリセリンを塗布したスライドグラスを用意 2. 原精液をリン酸緩衝液で 20~50 倍に稀釈 3. 稀釈精液をスライドグラスに盛り、直ちにスライドグラスを傾斜、下方に流下する精液を吸いとる 4. ドライヤーで急速に冷風乾 5. エタノールで固定 6. 25% カルボールフクシンリン酸緩衝 	<p>方法 III. (仮称 染色液稀釈法の湿式)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 原精液を 25% カルボールフクシンリン酸緩衝液で 20~50 倍に稀釈, 2~3 分間放置 2. スライドグラス上に滴下 3. 直ちに検鏡 <p>方法 IV. (仮称 染色液稀釈法の乾式)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 方法 III の 1 と同じ 2. 方法 II ~ 3 ~ 7 のに同じ <p>方法 V. (仮称 ホルマリン稀釈法)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 原精液を 10% 中性ホルマリン液で 20 ~ 50 倍に稀釈 2. 方法 II の 3 ~ 7 に同じ

On a few improvements in the evaluation of chicken semen.

HIURA, Yoshitaka & Kentaro KONO (Department of Animal Husbandry, Faculty of Agriculture, Niigata University, Niigata 950)

Jap. J. Animal Reprod. 18 (2), 1972.

試みた標本の作成法は従来の慣行法（方法Ⅰと略称）、盛り式法（方法Ⅱと略称）、染色液稀釈法の湿式（方法Ⅲと略称）、染色液稀釈法の乾式（方法Ⅳと略称）、ホルマリン稀釈法（方法Ⅴと略称）等である。その手順は表1のとおりである。

観察結果ならびに考察

同一サンプル7例について、上記の各方法で作成した標本の観察所見を記述する。

方法Ⅰによる標本では、精子がからみあって線状の集塊を形つくる傾向があり、精子の分散は様でなかった。頭部の膨化・波状変形が本法によった標本にのみ認められたので人工的所産であることは明白である。尾部の奇形は方法Ⅴによる標本について目立って多く、その大部分はコイル状に彎曲していたので、おそらく塗抹の際に不自然な力が加わったために生じたものと考えられる。方法Ⅱによる標本では、精子の分散は様であり、方法Ⅰで観察された頭部の膨化・波状変形は全く観察さ

れなかった。尾部に細かい波状を呈するものが認められたが、この所見は奇形とは考えられない程度のもので、精子が運動しながら風乾されたために生じたものと考えられる。方法Ⅲによる標本では、精子が染色液中に浮游しているためにⅠ匹の精子を観察する際焦点をいちいち移動させて合わせなくてはならず、顕微鏡の操作が煩雑となり、また小さな色素塊が浮游していて観察の妨げとなった。しかし精子の形態は自然であって、人工的所産物と思われる奇形は全く認められなかった。方法Ⅳによる標本では、精子の分散は様で、尾部は自然状態に最も近く、方法Ⅱのような尾部の細かい波状は全く認められなかった。だが頭部はやや膨化していた。試みに精液を5%フェノールと混合したところ、同様な所見を得たのでおそらくカルボール・フクシン液中のフェノールの影響が現われたものと考えられる。方法Ⅴによる標本では、精子の分散は様であったが、頭部の彎曲、首曲り、尾部の彎曲等の異常精子が著しく多く出現した。この現

表 2. 作成方法と奇形率との関係

方 法	奇 型	鶏番号	No. 1	2	3	4	5	6	7	平 均
Ⅰ	頭 部 奇 形		1.7%	1.6%	2.6%	4.4%	2.0%	2.4%	2.9%	$2.51 \pm 0.96\%$
	中片部 "		1.7	3.7	3.4	2.2	10.2	4.0	1.9	3.87 ± 2.94
	尾 部 "		9.1	9.1	9.5	8.8	16.3	8.0	15.8	10.94 ± 3.52
	全		12.5	14.4	15.5	15.4	28.5	14.4	19.6	17.19 ± 5.44
Ⅱ	頭 部 奇 形		2.1	1.6	2.5	2.4	2.7	1.4	2.8	2.21 ± 0.54
	中片部 "		1.0	1.2	1.7	2.9	6.8	3.1	2.3	2.71 ± 1.97
	尾 部 "		2.9	1.3	3.8	5.3	3.2	5.8	8.5	4.40 ± 2.35
	全		5.0	4.1	8.0	10.6	12.7	10.3	13.6	9.19 ± 3.65
Ⅲ	頭 部 奇 形		2.3	1.9	2.3	3.7	2.0	3.5	1.8	2.50 ± 0.78
	中片部 "		1.9	2.1	5.3	8.8	3.2	4.5	5.0	4.40 ± 2.36
	尾 部 "		5.0	4.6	6.0	9.7	3.5	8.0	7.7	6.36 ± 2.19
	全		10.2	8.6	13.6	22.2	8.7	15.0	14.5	13.26 ± 4.77
Ⅳ	頭 部 奇 形		4.6	6.2	8.7	3.2	2.2	2.5	6.2	4.80 ± 2.37
	中片部 "		1.0	1.4	1.5	2.3	3.1	2.5	2.1	3.17 ± 0.73
	尾 部 "		2.8	1.4	4.4	9.3	2.6	5.5	4.1	4.30 ± 2.58
	全		8.4	9.0	14.6	15.8	7.9	10.5	12.4	11.23 ± 3.11
Ⅴ	頭 部 奇 形		18.2	23.6						20.98 ± 3.82
	中片部 "		1.0	3.6						2.30 ± 1.84
	尾 部 "		51.5	52.7						52.10 ± 0.85
	全		70.7	79.9						75.30 ± 6.51

注：① 人工的産物と思われる頭部膨化、波状変形は除外した

② 色素の小塊が浮游しているため観察にくい

③ 頭部がやや膨化する欠点がある

④ 精子の変形が著しいので2例に止めた

図 1. 作成方法と奇形率との関係
(同一サンプル 7 例)

象は精子がホルマリンによって固定される過程に生じたものと考えられる。

次に各方法で作成した標本の精子奇形率を同一サンプル 7 例について比較した。その結果は表 2 と図 1 に示した。方法 I に多発する頭部の膨化・波状変形は明らかに人工的産物であると考えられるので、奇形の中に含めなかった。各方法間の比較は平均値の差の検定で行なった。ただ方法 V における奇形の発生が特に顕著であって、問題外と考えられるので本法の検定から除外した。

頭部の奇形率は方法 V が顕著に高く、ついで方法 IV, I, III, II の順であった。平均値の差の検定では方法 IV と II との間にのみ 5 % 水準で有意差が認められた。中片部の奇形率においては方法 III が最も高く、ついで方法 I, II, IV の順であったが、どの方法間にも全く有意差はなかった。尾部の奇形率は方法 V が非常に高く、精子の約半分がこの奇型であった。それについて方法 I, III, II, IV の順であり、方法 I と他の II, III, IV との間に 5 % 水準で有意差が認められ、他の方法間で有意ではなかった。以上の各方法間の部位別奇形率の総和は方法 V が著しく高く、精子の 70~80 % が奇形であった。ついで方法 I, III, IV, II の順であり、方法 I と方法 II との間にのみ 5 % 水準で有意差が認められた。

以上のような観察所見並びに各方法間の奇形率の比較試験から、精子形態用の標本作成法としては方法 II すなわち盛り式法が最も適していると考ええる。

2. 湿式染色法による鶏精子の生死判定について

従来、精子活力の判定は肉眼的・顕微鏡的な観察で行なわれており、その判定方法並びに表示方法は観察者に

よって異なる場合が多い。その為に客観性のある精子活力判定法の開発が切望されている。客観化の 1 つとして染色法による精子の生死判別法がある。染色法による精子の生死判別法がある。染色法には普通の色素による方法と蛍光性色素による方法とがあり、後者は精子をアクリジン・オレンジ、プリムリンあるいはプリムリンとローダミンの等量混合液等の蛍光性色素と反応させ、蛍光顕微鏡下で精子の蛍光性の違いによって判別するものであって、実験小動物、豚、牛および人の精子について良い成績が得られている^{1,2)}。しかし家禽のものについては報告例を見ない。一方、前者は精子を水溶性エオジン主剤とする染色液と混合し、直ちに塗抹・熱風乾燥して、顕微鏡下で染色(死滅)と不染(生存)とを判別するものであり、家畜・家禽の精子活力の判定法として検討が加えられている。だがしかしこの方法は不染と染色、特に中間色をとっている精子の判別に苦慮する場合が多く、その判定結果は観察者によってかなり異なり、さらに塗抹標本の染色精子は場所によってかなり差異がある等の欠点があるので、客観性並びに再現性に乏しい。近年、塗抹・熱風乾燥法にかわって湿式法、すなわち精子を染色液で稀釈しスライドガラス上に滴下して、乾燥しないうちに検鏡判別する方法が試みられた。WILSON らは鶏精子の生死判別を 1.8 % トリパンプブルー・リン酸緩衝液で行ない、好成績を得たとのべ³⁾、また永瀬等は牛の精子につき 9 種類の生体染色剤を試験して、3 % クエン酸ソーダ液 (pH を 7 に補正) に酸性フクシンおよびブロームフェノールブルーを各々 1 % 前後になるように加えた染色液が最良であったと報告した⁴⁾。

そこで著者らは鶏精子について湿式法の追試を試み、さらにこの方法を実際に応用する場合の問題点を検討した。

1) 染色液の色素について

生死精子の染め分けが良好でかつ観察し易く、精子の凝集等を生じない適当な染色液を見出すために、次の 14 種の色素について湿式標本を作成して試験した。

エオジン Y, ヤーヌスグリーン, トルイジンプルー, コンゴレッド, メチレンブルー, サフラニン O, ニグロシン, ブリリアントグリーン, メチルバイオレット, ゲンチアナバイオレット, ブロームフェノールブルー, 酸性フクシン, トリパンプレッド, トリパンプブルー

それらの色素の濃度が 0.6~1.8 % になるようにリン酸緩衝液 (pH 7.2) で調整した。リン酸緩衝液は第一リン酸ナトリウム ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 5.07 g と第二リン酸ナトリウム (Na_2HPO_4) 16.04 g に蒸留水を加えて 1 l

にしたものである。

その結果精子の全部が染まるもの、染め分けが困難なもの、頭部が崩壊するもの、精子が凝集するもの等の欠点のあるものが多く、上記の目的には酸性フクシン、トリパンレッド、トリパンプルーの3色素が比較的良好であると認められた。これらの色素について精子の運動性を目安として色素の毒性を比較したところ、トリパンレッドとトリパンプルーでは精子の運動はほとんどなかった。それに対して酸フクシンでは活発な運動性を示した。また色彩の点で青より赤の方がはるかに観察容易であった。

従って湿式法用染色液の色素は酸フクシンが適当と考える。

2) 染色液の溶媒について

供試鶏は心 10 羽で、溶媒としてはリン酸緩衝液 (pH 7.2), Lock 液 (pH 7.2 に補正), Ringer 液 (pH 7.2 に補正), Sørensen のリン酸緩衝液 (pH 7.0) および脱塩水を使用した。なお pH の補正はリン酸緩衝液で行なった。各溶媒で酸性フクシン濃度が 1 % になるように調整した。

腹部マッサージ法で採取した精液を上記の各染色液で約 100 倍に稀釈し、スライドガラス上に湿式標本を作成した。観察部位は標本の中央部で、精子 300~400 個を約 3 分間で計測して、染色精子率を算定した。結果は表

表 3. 染色精子率と染色液の溶媒との関係
(同一サンプル 10 例)

溶媒 鶏番号	P	L	R	S	W
1	14.1%	10.0%	14.4%	5.4%	8.0%
2	6.3	11.5	7.6	7.2	7.0
3	12.3	15.6	12.9	7.8	12.3
4	8.6	7.9	10.3	16.3	11.2
5	2.1	7.8	14.1	7.9	8.9
6	3.7	7.8	7.6	5.6	6.2
7	19.0	18.2	16.8	29.2	22.3
8	12.3	7.0	10.2	12.4	10.2
9	15.7	15.8	11.4	9.2	14.3
10	14.8	15.9	15.1	14.8	14.6
平均	10.89 ±5.52	11.75 ±4.24	12.04 ±3.14	11.58 ±7.23	11.50 ±4.76

注 P: リン酸緩衝液 S: Sørensen のリン酸緩衝液
L: Lock 液 W: 脱塩水
R: Ringer 液

3に示した。

表から明らかなように染色精子率はどの溶媒でも同じような値であって、有意差は認められなかった。また、精子の運動性は溶媒が脱塩水の場合に不動で、その他の場合では運動していた。だが計測にはさしつかえなかった。

以上のことから湿式・染色液の溶媒は脱塩水でも構わないことは明らかで、むしろ精子の運動が強く抑制され不動になるので計測が著しく容易である。その点では最も優れていると考えることが出来る。

3) 湿式標本の観察部位と染色精子率との関係

染色液は 1 % 酸性フクシン・リン酸緩衝液を用いた。観察部位は覆ったカバーガラスの左上端部 5×5 mm (a と略称), 右下端部 5×5 mm (b と略称), 中央部 5×5 mm (c と略称) の 3 区画である。a と b を選んだ理由はカバーガラスをかける際の染色精子の分布不均を考慮したからである。同一サンプル 15 例について各区画の観察する順序を a b c, b c a, c a b と変えて、次の事項について検討した。

(1) 観察順序と各区画の算定値との関係

(2) 同一サンプル内の染色精子の分布について

なお各区画とも 100~150 個の精子を計測して、染色精子率を算定した。

結果は表 4 に示した。まず第 1 項目について、a b c の順における各区画の染色精子率の平均は 6.20%, 8.46%, 8.49% であって、区画間には有意差はなかった。b c a の順の各平均は 8.53%, 9.49%, 15.67% で、a と b, c との間に有意差があった。c a b の順で

表 4. 染色精子率と観察部位との関係
(同一サンプル 15 例)

a	b	c
6.20±4.22% (1)	8.46±5.62% (2)	8.49±5.91% (3)
15.67±6.38 (3)	8.53±4.29*1 (1)	9.49±6.14*1 (2)
10.76±6.75*2 (1)	15.61±11.50 (3)	8.46±5.72*2 (1)
10.88±6.95	10.86±8.34	8.81±5.81

注 a: 左上端部 5×5 mm の区画

b: 右下端部 "

c: 中央部 "

() 内の数字は観察順を示す

*1 a との間に 5 % 水準で有意

*2 b との間に "

はbとc, aの間に有意差が認められた。以上のことからaとbの区画では観察順(時間)が遅くなると染色される精子が増加する傾向にあり, それに対してc区画ではその影響はほとんどみられなく最も安定していると考えられる。第2項目についてはa, b, c区画の各染色精子率の平均は10.88%, 10.86%, 8.81% であって, c区画がaとb両区画に比して低い傾向にあったが, 有意となるには至らなかった。aとb区画の間には全く差はなかった。

従って湿式標本の中央部の方が周縁部より観察するに適していると考ええる。

4) 観察所要時間と染色精子率との関係について

精液を1%酸フクシン・リン酸緩衝液(pH 7.2)で約100倍に稀釈し, スライドガラス上に滴下, カバーガラスを覆って湿式標本を作成した。その後30秒間放置して計測を開始し, 3分以内, 5分以内, 8分以内および12~15分間の4グループについて観察計測を行って, 各々の染色精子率を算定した。観察精子数は3分および12~15分間の両グループでは300~400個, 5分以内では500~600個, 8分以内では800~1000個であ

た。観察中における標本の乾燥の影響を調べるために, 一方はカバーガラスの周囲を流動パラフィンで封じ, 他方は封入せず, 両者を比較した。前者は8例, 後者は10例である。各グループの染色精子率ならびに3分以内の算定値を100とした場合の各グループの算定値を指数化したものを表5に示した。表から明らかなように封入区と非封入区の3分以内, 5分以内, 8分以内および12~15分間の各々の染色精子率は4.53%, 4.28%; 4.62%, 4.72%; 5.40%, 5.56%; 9.28%, 10.79% であって, 封入区では12~15分のグループと3分以内および5分以内のグループとの間に, また非封入区では12~15分のグループと他の3グループとの間に各々有意差が認められた。両区共に時間の増加に伴って染色精子が増加する傾向にあった。指数化したものについて封入区と非封入区を比較してみると, 5分以内, 8分以内ならびに12~15分の各々には103.4, 106.2; 123.9, 128.2; 201.9, 276.1 であって, 染色精子は非封入区が封入区より常に多かった。

次に, さらに観察時間を延長した場合の両区の染色精子率の変動を比較してみた。方法は前記とほとんど同様

表 5. 観察所要時間と染色精子率との関係

流動パラフィン封入区

鶏番号 時間	1	2	3	4	5	6	7	8	平 均
0—3分	2.6% (100)	4.0% (100)	3.2% (100)	7.9% (100)	8.6% (100)	2.5% (100)	4.1% (100)	3.3% (100)	4.53±2.38% (100)*
0—5	3.3 (126)	4.1 (102)	3.0 (93)	7.9 (108)	8.8 (102)	2.6 (103)	4.1 (100)	3.3 (100)	4.64±2.36 (103.4±9.7)*
0—8	4.2 (163)	5.1 (128)	3.6 (113)	8.5 (100)	9.5 (111)	2.6 (103)	4.7 (114)	5.0 (152)	5.40±2.38 (123.9±22.2)
12—15	6.4 (246)	8.5 (212)	6.9 (216)	12.1 (153)	23.2 (270)	3.4 (136)	5.6 (136)	8.1 (246)	9.28±6.16 (201.9±53.3)

注: () 内の数字は3分以内の算定値を基にした際の指数である

*: 「12—15」との間に5%水準で有意である

非 封 入 区

鶏番号 時間	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平 均
0—3分	2.0% (100)	7.1% (100)	3.7% (100)	4.1% (100)	11.7% (100)	2.8% (100)	3.7% (100)	2.3% (100)	2.3% (100)	3.1% (100)	4.28±2.99 (100)*
0—5	2.0 (100)	7.1 (100)	3.7 (100)	4.4 (109)	15.1 (129)	3.0 (107)	3.8 (102)	2.4 (104)	2.5 (108)	3.2 (103)	4.72±3.92 (106.2±8.7)*
0—8	2.3 (115)	7.4 (104)	6.4 (174)	4.2 (102)	17.4 (149)	3.1 (111)	4.1 (110)	3.7 (160)	3.1 (134)	3.9 (125)	5.56±4.44 (128.2±24.7)*
12—15	4.0 (200)	10.5 (145)	8.1 (218)	11.7 (285)	24.4 (209)	14.8 (529)	15.4 (405)	7.6 (330)	6.3 (273)	5.2 (167)	10.79±6.13 (276.1±118.5)

表 6. 観察時間と染色精子率との関係

(同一サンプル 5 例)

	直 後	15(分後)	30(分後)	45(分後)	60(分後)	75(分後)	90(分後)	
封 入 区	1.80±1.01 %	1.90±2.05 %	3.04±2.05 %	4.52±2.80 %	5.82±2.89 %	8.44±1.50 %	8.68±1.81 %	P<0.01
非封入区	2.48±0.50	4.30±1.97 *	8.90±5.63 *	14.06±8.00 *	20.14±12.62 *	27.58±16.69 *	36.92±26.73 *	
P<0.01								

注 *: 封入区と非封入区との間に 5 % 水準で有意である

で、同一視野中の 40~80 個の精子につき染色精子数の変化、標本作成直後から 90 分後まで 15 分間隔で計測した。両区とも同一サンプル 5 例を用いた。結果は表 6

に示した。

非封入区では標本作成直後、15 分後、30 分後、45 分後、60 分後、75 分後および 90 分後の各染色精子率は 2.48%, 4.30%, 8.90, 14.06%, 20.16%, 27.58%, 36.92% であって、観察時間の経過に伴って幾何級数的に増加した。封入区も同様の傾向を示したが、その増加は非封入区に比し著しく小さかった。統計処理の結果では封入区と非封入区との間および観察時間の間に各々 1 % 水準で有意性が認められた。同じ観察時間における両区の染色精子率を比較してみると、標本作成直後では両区に差はなかったが、それ以後の時間では封入区が非封入区より常に小さく、有意差があった。以上のことから精子が死滅変性し色素をとるのは標本の乾燥による影響が大であるが、そのほかの要因も少なからず関与しているものと考えられる。

従って湿式染色法による染色精子率を計測算定する場合は観察時間をほぼ 3 分以内にするのが望ましいと考える。

5) 染色精子率と温度並びに時間との関係について

実験方法: 精液 4 例を Ringer 液 (pH 7.2 に補正) と水で各々 3 倍に稀釈した。それらの精液の一方を室温 (20°C 前後) に放置し、他方は 42°C の湯煎中に加温した。水を選んだ理由は水で死滅を促された精子の染色率の変動を考慮したからである。観察は稀釈直後、1, 2 および 3 時間後の 4 回である。各時間に稀釈精液を 1% 酸性フクシン, Ringer 液 (pH 7.2 に補正) および 1% 酸性フクシン水溶液で約 30 倍に稀釈混合して、湿式標本を作成した。その後 30 秒間放置して観察を始めて、3 分以内に約 350 個の精子を計測して染色精子率を算定し

図 2. 染色精子率と温度並びに時間との関係

表 7. 染色精子率と温度並びに時間との関係

稀釈後の 時間	稀釈液 染色液 温度	Ringer 液			水		
		1 % 酸フクシン Ringer 液	1 % 酸フクシン水溶液	1 % 酸フクシン Ringer 液	1 % 酸フクシン水溶液	1 % 酸フクシン Ringer 液	1 % 酸フクシン水溶液
直 後	a	4.3% 4.1% 5.2% 4.8%	4.6% 3.3% 4.8% 4.3%	4.6% 4.5% 5.4% 4.9%	3.5% 3.0% 5.1% 4.5%		
	温	(100) (100) (100) (100)	(100) (100) (100) (100)	(100) (100) (100) (100)	(100) (100) (100) (100)		
	b c (20°C前後)	[100]	[100]	[100]	[100]		
1 時 間	室 温	5.2 4.6 5.1 5.2 (121) (112) (98) (108) [109.7±9.5]	5.1 3.5 5.0 4.8 (111) (106) (104) (112) [108.2±3.9]	4.7 4.7 6.5 6.9 (102) (104) (120) (141) [116.8±18.1]	3.9 3.5 6.2 4.5 (111) (117) (122) (100) [112.5±9.5]		
	加 温 (42°C)	5.4 11.8 15.9 13.5 (126) (288) (306) (281) [250.3±83.5]	5.5 13.0 15.5 14.2 (119) (394) (323) (330) [291.5±119.4]	9.6 47.6 17.4 14.6 (209) (1058) (322) (298) [471.8±393.8]	9.4 48.0 17.0 14.1 (268) (1600) (333) (313) [628.5±648.2]		
2 時 間	室 温	6.2 4.2 5.0 5.2 (144) (102) (96) (108) [112.5±21.6]	5.7 4.8 6.1 5.0 (124) (145) (127) (116) [128.0±12.2]	5.3 5.0 7.8 8.1 (115) (111) (144) (165) [133.8±25.5]	6.7 4.8 7.2 4.6 (191) (160) (141) (102) [148.5±37.2]		
	加 温	30.2 34.0 24.1 17.2 (702) (829) (463) (358) [588.0±215.7]	19.4 28.7 17.2 18.0 (422) (870) (358) (419) [517.2±237.0]	43.4 86.0 66.7 32.6 (943) (1911) (1235) (665) [1188.5±534.9]	51.1 88.2 61.8 27.4 (1460) (2940) (1212) (609) [1555.3±989.9]		
3 時 間	室 温	7.1 4.4 10.3 5.7 (165) (107) (198) (119) [147.3±42.1]	6.0 4.6 12.9 5.3 (130) (139) (373) (123) [191.3±121.3]	7.5 6.2 14.7 9.7 (163) (138) (272) (198) [192.8±58.2]	6.8 4.4 13.9 7.6 (194) (147) (272) (169) [195.5±54.5]		
	加 温	35.6 36.4 47.3 44.4 (828) (888) (909) (925) [887.5±42.5]	35.0 35.5 48.8 45.2 (761) (1076) (1017) (1051) [976.3±145.5]	86.9 89.0 95.6 84.3 (1889) (1978) (1770) (1720) [1839.3±116.5]	87.4 88.2 97.7 80.0 (2497) (2940) (1916) (1780) [2282.8±537.6]		

注 a: 染色精子率を示す

b: 稀釈直後の算定値を基にした場合の指数を示す

c: 指数の平均を示す

表 8. 不動精子と染色精子との関係

鶏番号	溶媒	Lock 液	Lock 液 (pH 7.2)	生食液	生食液 (pH 7.2)	Ringer 液	Ringer 液 (pH 7.2)	リン酸緩衝液	Sørensen の リン酸緩衝液	0.1 M リン酸緩衝液
1	染色精子率	5.3%	9.7%	11.4%	11.5%	9.8%	10.4%	8.5%	9.2%	10.0
	不動精子率	8.0 (150)	11.7 (120)	13.7 (120)	12.4 (107)	11.5 (117)	11.3 (108)	9.5 (111)	11.7 (127)	13.1 (131)
2	染色精子率	25.0	15.7	13.5	17.0	15.9	18.5	19.3	20.8	22.5
	不動精子率	28.9 (124)	29.1 (128)	19.2 (142)	18.4 (108)	17.1 (107)	20.4 (110)	21.0 (108)	23.5 (112)	25.8 (114)
3	染色精子率	25.2	21.1	12.6	19.8	19.7	17.2	17.8	24.2	28.7
	不動精子率	31.2 (123)	25.6 (121)	17.2 (136)	23.5 (118)	21.7 (110)	20.2 (117)	19.0 (106)	27.5 (113)	30.8 (107)
4	染色精子率	8.2	9.8	8.0	11.4	8.2	7.8	7.6	6.9	8.6
	不動精子率	11.9 (145)	12.7 (129)	10.9 (136)	13.8 (121)	10.3 (125)	9.7 (124)	8.2 (107)	8.6 (124)	10.3 (119)
平 均		(132.4 ±14.0)	(123.6 ±4.5)	(130.8 ±10.2)	(115.2±7.2)	(115.2±7.0)	(116.2±7.1)	(110.2±5.3)	(120.6±7.5)	(121.0±11.4)
相 関		0.995	0.997	0.969	0.988	0.993	0.986	0.997	0.999	0.994

注: () 内の数字は染色精子率を基にした場合の不動精子率を指数で表わしたものである

た。その結果は表 7 と図 2 に示した。

水で稀釈した場合は稀釈直後から精子の運動を全く認めなかった。なお精液を水および Ringer 液で稀釈し、室温放置と 42°C 加温の際における染色精子率の時間的変動を調べるために、稀釈直後の染色精子率を 100 とし、それ以後の各時間の算定値を指数化した。

室温における Ringer 液稀釈と水稀釈の染色精子は 1 時間後で 109.7 と 116.8, 2 時間後で 112.5 と 133.8, 3 時間後で 147.3 と 192.8 であった。両稀釈とも時間経過に伴って漸次増加する傾向にあり、その増加の度合は水稀釈の方が Ringer 液より大きかった。Ringer 液で稀釈した精液を 42°C に加温した際における 1, 2, 3 時間後の各染色精子は稀釈直後の算定値の 2.5 倍, 5.9 倍, 8.8 倍であって、時間の経過とともに増加した。3 時間後の染色精子率は 35.6~47.7% の範囲内であって、50% に満たなかった。それに対して水で稀釈し加温した場合における 1, 2, 3 時間後の各染色率は 4.7 倍, 11.9 倍, 18.4 倍であって、2 時間後以降で急激に増加した。3 時間後に至って、染色精子率は 84.3~95.6% の範囲であって著しく高く、ほとんどの精子が色素をとっていることが認められた。

以上のことは次の様に考えられる。水による稀釈直後の精子が全く運動性を示さなかったことは、浸透圧の急変によってほとんど瞬間的に死滅したことを示すものであろう。ところが染色精子の増加は表で理解されるように、室温に放置の場合は緩慢であるのに対し、加温の場合は 2 時間以降において著しく急激である。このことは精子が染色されるには何らかの固定が必要である。著者は精子を 70°C に加温すると瞬時にして酸性フクシンにより染色されることを確かめている。すなわち精子が変性を生じた場合は染色されるのであって、水によって死滅した場合は染色されるほどの変性が起こらず、時間の経過と共におそらく自己融解によって構成たんぱく質が変性し、染色性を獲得するに至るものと思われる。加温によって染色精子の増加が加速されることはこの推測を裏づけるものであろう。

一般の精液検査に際し、染色法によって生死を判定しようとする場合、染色された精子は死後かなりの時間を経過したものであり、採取時あるいはその後何らかの原因、たとえば水の混入などによって死滅した精子は本法では算定不可能であることが推察される。

なおここでも染色液の溶媒が Ringer 液でも、水であっても染色精子率において大差がなく、前項に既述したことが再確認された。

6) 不動精子と染色精子との関係について

不動精子には死滅精子と観察中に偶然運動しない精子とが含まれ、また染色精子は前項で既述したように、死後かなりの時間を経たものであること等から、死滅即染色あるいは生存即不染とならないことは明らかであるが、不動精子と染色精子との数的な関係を確めるために、また精子の運動性を計測する際に染色液の溶媒の影響が考えられるので併せて検討した。

染色液の溶媒は Lock 液 (pH 7.2 に補正), 0.85% 食塩水, 0.85% 食塩水 (pH 7.2 に補正), Ringer 液, Ringer (pH 7.2 に補正), リン酸緩衝液 (pH 7.2), Sørensen のリン酸緩衝液 (pH 7.2), 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) の 8 種で、酸性フクシン濃度が 1% になるように各々調整した。

精液 5 例を上記の各染色液で約 100 倍に稀釈し、活力盤上に滴下して湿式標本を作成した。観察は加温 (38°C) しておこなった。不動精子数と染色精子数は観察精子数 (300 個前後) に対する百分比で表わした。不動精子と染色精子との関係を調べるために各算定値から相関係数を算出し、また両精子の比率は染色精子率を基にして不動精子率を指数化した。結果は表 8 に示した。

9 種の染色液中における精子運動性は溶媒がリン酸緩衝液の場合が最強で、Sørensen のリン酸緩衝液が最弱であった。しかし精子の運動・不動の区別は困難でなかった。表から明らかなように、不動精子と染色精子との相関はどの染色液でも比較的高く、特に Sørensen の 0.999, Lock 液 (pH 7.2 に補正) の 0.997 およびリン酸緩衝液の 0.997 等は高い値であった。染色精子率と不動精子率の比率は常に後者が前者より 6~50% 高かった。そしてその比率について 9 種の溶媒を比較してみると、Lock 液の場合が最高で 132.4, 最低はリン酸緩衝液の 110.2 であった。これはリン酸緩衝液の場合に精子の運動が他の溶媒に比して強いので、生存精子のうち運動性を示さない精子が比較的少なかったためと考えられる。また常に不動精子が染色精子よりも多い傾向を示したことは死滅後あまり時間を経過していない精子が含まれていることを意味するものであろう。

以上の結果から、不動精子と染色精子との関係を検討する際の染色液の溶媒としてリン酸緩衝液が望ましいと思われるが、例数が十分であるとは言えないので、さらに例数を増やして検討したいと考えている。

要 約

鶏精子形態観察用の標本作成並びに湿式染色法による

鶏精子の生死判定について検討を加えた。

1. 鶏精子形態観察用の標本作成法について

従来の慣行法（方法Ⅰ），盛り式法（方法Ⅱ），染色液稀釈法の湿式（方法Ⅲ），染色液稀釈法の乾式（方法Ⅳ），ホルマリン稀釈法（方法Ⅴ）につき比較検討を行なった。方法Ⅰは人工の所産物と考えられる頭部の膨化・波状変形が塗抹面の起始部や周縁部に多く出現し，コイル状に彎曲している尾部の奇形もかなり多かった。方法Ⅱでは尾部が微細な波状を呈する。奇形率はどの方法よりも低値であった。方法Ⅲでは色素の小塊が浮游し観察の障害となり，中片部並びに尾部の奇形がかなり認められた。方法Ⅳでは頭部がやや膨化するが，中片部並びに尾部はどの方法よりも自然状態に近かった。方法Ⅴでは精子の大半がコイル状に彎曲していた。

以上のことから方法Ⅱ，すなわち盛り式が最適であると考えた。

2. 湿式染色法による鶏精子の生死判定について

1) 色素 14 種について検討した結果，酸性を選び，さらに脱塩水を含む 5 種の溶媒について比較したところ，染色精子率は溶媒間に差がなかった。精子の運動性は脱塩水の場合にのみ不動であったので計測の容易性の点で脱塩水が適していると考えた。

2) 湿式標本の観察部位と染色精子率との関係を調べたところ，標本の中央部の染色精子は周縁部より少なく，かつ時間経過による変動も小さかったので，中央部

が適当であると考えた。

3) 染色精子率と観察所要時間との関係について，染色精子率は時間の増加と共に幾何級数的に高くなったので，観察計測する時間は 3 分前後で終ることが望ましいと考えた。

4) 精液を水およびリンゲル液で稀釈し，室温放置と 42°C 加温の際における染色精子率の時間的変動を調査した結果，室温放置の場合の増加ははなはだ緩慢であるのに対し，稀釈，加温の場合は 2 時間以降において増加が著しく急激であった。すなわち死滅精子が染色されるためには，死後かなりの時間的経過を必要とすることがわかった。また不動精子が染色精子より常に多かったので，採取後に死滅した精子は本法では算定不可能であることが認められた。

終りに臨み動物管理に協力を得た教室の学生諸君に対し深く感謝する。
(1972. 3. 14 受付)

文 献

- 1) VAN DUIN, JUN., C.; *Mikroskopie*, 9, 324, 1954.
- 2) BISHOP, M. M.: *Nature*, 179, 308, 1957.
- 3) WILSON, H. R., A. C. WARNICK & J. H. GUTIERREZ: *Poultry Sci.*, 48, 714, 1969.
- 4) 永瀬(弘)・花田(章)・富塚(常)・正木(淳)・森本(久): 日畜会報. 42 (学会号). 60, 1971.