イヌ精子の代謝に関する研究

II. 緩衝液および希釈液の影響について

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

家畜精子の保存に関して、各種の緩衝液や希釈液が報告されているが、家畜の種類によりその組成がかなり異なっている。これは精子の生存に必要な至適条件が種類によって異なり、代謝能に関しても種類による特異性のあることを示すものである。イヌ精子の保存液に関する報告は少ないが、HARROP¹⁾、FOOTE^{2,3)}、黒田ら⁴⁻⁶⁾の報告している希釈液はいずれも良好な保存成績を示しており、人工授精に成功しているものもある^{1,6)}。また、イヌ精子の代謝に関しては IVANOV⁷⁾、MANN^{8,9)}、BARTLETT¹⁰⁾、WALES¹¹⁾、MURDOCH¹²⁾、黒田ら¹³⁾などの報告があり、そのイオン組成、基質の種類、季節などによって呼吸能および解糖能に差のあることが報告されている。しかし、他の家畜精子にくらべて報告が少なく、解明するべき点が多いといわざるをえない。

そこで本実験では、各種の緩衝液および希釈液がイヌ精子の生存性ならびに代謝能におよぼす影響を明らかにしようとした。

実験材料および方法

供試動物にはスピッツ種の成雄犬 (2~4 才) 10 頭を用いた。精液は手指法で分画採取し、実験には 2nd fraction を用いた。実験は原精液と精子を各希釈液で 1 回洗浄 (2,000 r. p. m., 10 分遠沈—上清除去) したのち、それぞれの希釈液を加えて 2 倍に希釈した希釈精液について行なった。供試精液は秋に採取したものをを用いた。

測定項目は温浴前後の精子生存率、呼吸量、糖消費量

および乳酸蓄積量であった。

精子の生存率および活力は精子生存指数に換算してカップ内に示した。

呼吸量はワールブルグ検圧装置を用いて、37°C で 2 時間好氣的条件下で測定し、1 時間値および 2 時間値を生存精子 1 億当りの μl で示した。

糖消費量は温浴直前に基質としてグルコースまたはフラクトースをそれぞれ 1.2~1.4 mg/ml ずつ供試精液に添加し、前後の糖質含量の差を求め、2 時間の糖消費量を生存精子 1 億当りの μg として示した。糖質の測定はグルコースについては SOMOGYI 法¹⁴⁾、フラクトースについては ROE の方法¹⁵⁾によって比色定量した。

乳酸蓄積量は温浴の前後における供試精液の乳酸含量を BARKER & SUMMERSON の方法¹⁶⁾により比色定量し、その差をもって乳酸蓄積量とした。成績は 2 時間の乳酸蓄積量を生存精子 1 億当りの μg で示した。

なお、原精液における測定値と比較するために、希釈液に関するそれぞれの測定値を原精液の場合の数値で除して、えられた数値に 100 を乗じた値を指数としてカップ内に示した。

供試した希釈液および緩衝液の組成はつぎの通りである。

a) Ca 欠 KRP 液 ¹⁷⁾			
b) 牛乳……新鮮な牛乳を 92°C で 15 分間加熱滅菌する			
c) グリシン液 (3%)			
d) 食塩液 (0.9%)			
e) 第 2 リン酸ナトリウム液 (0.1 M)			
f) グルタミン酸ナトリウム液 (3.8%)			
g) ペプトン添加緩衝液 (mg %)			
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	40,	KCl 60
	Glycine	750,	Peptone 1,000
	$\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,800	
h) PETIC 液 ⁵⁾ (mg %)			
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	20,	KCl 30
	Inositol	60,	Glycine 375

Studies on the metabolism of dog spermatozoa.
II. Effects of buffers and diluents on the aerobic metabolism of dog spermatozoa.

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

Jap. J. Animal Reprod. 19 (3), 1973.

Table 1. Effects of buffers and diluents on the aerobic glycolysis of dog spermatozoa (n=9~4)

Diluent	Sperm viability (%)		O ₂ uptake (μ l/10 ⁸ live sperm)		Glucose utilized (μ g/10 ⁸ live sperm/2 hrs)	Lactate accumulated (μ g/10 ⁸ live sperm/2 hrs)
	Initial	Final	1 hr	2 hrs		
Control (intact semen)	94	57 (20)*	12.2	20.8 (100)	139 (100)	206 (100)
Ca free-KRP	95	62 (32)	9.1	16.3 (78)	122 (87)	29 (15)
Milk	95	42 (13)	25.1	52.8 (253)	279 (200)	825 (400)
Glycine	95	15 (3)	15.6	23.3 (112)	142 (102)	21 (19)
Sodium chloride	94	55 (33)	12.9	20.8 (100)	183 (132)	415 (201)
Phosphate buffer	95	31 (9)	24.1	28.6 (137)	145 (104)	142 (69)
Sodium glutamate	93	80 (55)	14.6	25.3 (121)	163 (117)	346 (168)
Peptone buffer	92	58 (43)	10.6	22.1 (106)	64 (46)	118 (57)
PETIC solution	94	74 (50)	11.6	22.1 (106)	209 (150)	326 (158)

()* Motility index of sperm

Table 2. Effects of buffers and diluents on the aerobic fructolysis of dog spermatozoa (n=9~4)

Diluent	Sperm viability (%)		O ₂ uptake (μ l/10 ⁸ live sperm)		Fructose utilized (μ g/10 ⁸ live sperm/2 hrs)	Lactate accumulated (μ g/10 ⁸ live sperm/2 hrs)
	Initial	Final	1 hr	2 hrs		
Control (intact semen)	95	48 (17)*	11.5	18.9 (100)	170 (100)	235 (100)
Ca free-KRP	92	52 (10)	13.9	23.4 (124)	268 (156)	129 (55)
Milk	95	50 (10)	24.0	42.3 (224)	210 (123)	499 (212)
Glycine	95	51 (6)	12.2	21.7 (114)	198 (116)	55 (23)
Sodium chloride	95	62 (33)	11.0	17.4 (92)	231 (136)	94 (40)
Phosphate buffer	95	20 (5)	45.6	47.3 (250)	233 (137)	53 (23)
Sodium glutamate	93	73 (40)	11.8	23.2 (123)	216 (127)	269 (114)
Peptone buffer	95	60 (40)	12.5	22.7 (120)	438 (258)	29 (12)
PETIC solution	95	81 (60)	18.8	38.3 (203)	53 (31)	568 (242)

()* Motility index of sperm

Peptone 500, Na₃C₆H₅O₇ · 2H₂O 900
 Tris (hydroxymethyl) aminomethane 1.211
 Citric acid 681, Homosulfamine 10
 Egg yolk 20% (v/v)
 上記の液に Penicillin 900 U/ml,
 Streptomycin 0.9 mg/ml を添加した。

本実験に用いた緩衝液および希釈液は単純なイオン組成のもの (c, d, e, f) と有機物を含む複雑な希釈液 (a, b, g, h) の 8 種類である。

実験成績

実験成績はそれぞれの平均値をグルコースを基質とし

た場合は Table 1, フラクトースを基質とした場合は Table 2 に一括して表示した。

精子の生存性

温浴前の精子生存率はいずれの基質においても希釈液間に著しい差は認められなかったが、温浴後では希釈液によって大きな変動が認められた。原精液の場合の精子生存指数と対比して、両基質ともに高い精子生存指数 (Table 1, 2 のカッコ内数字) を示したのは PETIC 液、ペプトン添加緩衝液、グルタミン酸ナトリウム液および生食液であった。一方、低いのはグリシン液、第 2 リン酸ナトリウム液および牛乳で、Ca 欠 KRP 液は基質によって傾向を異にした。温浴後とくに高い精子生存性が

示されたのは PETIC 液とグルタミン酸ナトリウム液である。

呼吸量

生存精子 1 億 2 時間当りの呼吸量を原精液の場合と比較した指数 (Table 1, 2 のカッコ内数字) で比較すると、グルコースを基質とした場合は牛乳、第 2 リン酸ナトリウム液、グルタミン酸ナトリウム液およびグリシン液が高く、Ca 欠 KRP 液では低下している。フラクトースを基質とした場合は生食液で低下した以外はすべて増加している。両基質ともに呼吸量の増加を認めた希釈液は牛乳と第 2 リン酸ナトリウム液である。とくに牛乳では原精液の 2 倍以上の呼吸量を示し、第 2 リン酸ナトリウム液では初めの 1 時間で全呼吸量の約 90% が消費され、その後急速に低下することが示されたことは注目すべきことである。PETIC 液ではグルコースの場合は著しい増加を示さなかったのに対して、フラクトースでは約 2 倍に増加している。

糖消費量

両基質ともに高い指数を示した希釈液は牛乳、グリシン液、生食液、第 2 リン酸ナトリウム液およびグルタミン酸ナトリウム液で、他の希釈液は基質によって傾向を異にしている。すなわち、Ca 欠 KRP 液およびペプトン添加緩衝液はグルコースでは低下し、フラクトースでは増加している。とくに後者においてはこの傾向が著しいといえる。PETIC 液ではグルコースの消費量が多く、フラクトースの消費量は著しく減少している。

乳酸蓄積量

原精液の場合と指数で比較すると、両基質ともに高いのは牛乳、PETIC 液およびグルタミン酸ナトリウム液で、その他の希釈液ではいずれも低下している。とくにグリシン液および第 2 リン酸ナトリウム液では著しく低値を示したことは注目すべきことである。

希釈液別にみた精子の生存性および代謝能は、つぎのとおりである。

a) Ca 欠 KRP 液: 総体的にフラクトースの場合に代謝能が高い。前報の成績 (洗浄精子の代謝) にくらべて原精液に対する相対的な比率は低い、各項目の測定値はほぼ一致している。

b) 牛乳: 呼吸量、糖消費量および乳酸蓄積量ともに著しく高い値を示し、イヌ精子の代謝能を促進する効果のあることが示された。しかし、温浴後の精子生存率はかなり低下している。

c) グリシン液: 呼吸量および糖消費量は原精液の場合とほぼ同じか、やや増加する結果が得られたにもか

かわらず、乳酸蓄積量は両基質ともに対照の約 20% で著しい低下を示した。温浴後の精子生存率はきわめて低い。

d) 生食液: 糖消費量は基質を問わず約 30% 増加しているにもかかわらず、乳酸蓄積量はグルコースで約 2 倍、フラクトースでは半減と全く逆の傾向が示された。精子生存率および呼吸能などはほぼ一定の値を示していることを考慮すると、生食液では精子の乳酸分解能は基質による差が著しいものと推測される。

e) 第 2 リン酸ナトリウム液: 呼吸量が著明な増加を示し、しかも全呼吸量 (2 時間) の約 85% 以上が最初の 1 時間に消費され、以後急速に低下するという特異な傾向が示された。この傾向は他の希釈液には認められなかった。糖消費量はフラクトースにおいて対照よりも約 30% 多い。乳酸蓄積量および温浴後の精子生存率は両基質ともに低値を示した。

f) グルタミン酸ナトリウム液: 精子生存率および代謝能ともに原精液より高い値が示された。

g) ペプトン添加緩衝液: 呼吸量は原精液の場合とほぼ等しいが、糖消費量はグルコースで半減し、フラクトースでは約 2.5 倍の高い値を示して全く逆の傾向が示された。これに対して乳酸蓄積量はいずれの基質でも低い値を示した。温浴後の精子生存率はかなり高い。

h) PETIC 液: 温浴後の精子生存性は供試希釈液の中では最もよいといえる。呼吸量はグルコースではほぼ原精液と一致しているが、フラクトースでは約 2 倍に増加している。糖消費量はグルコースで高く、フラクトースでは減少して呼吸量とは逆の傾向が認められた。乳酸蓄積量はいずれの基質でも増加している。これらの傾向はペプトン添加緩衝液とはほぼ逆の関係にあるといえる。

考 察

豚精子に関する瑞穂ら¹⁰⁾の成績では、原精液にくらべて、呼吸量については牛乳、卵黄リン酸緩衝液および卵黄クエン酸液 (以下卵ク液と略記) で希釈した場合に高く、フラクトース消費量と乳酸蓄積量については牛乳系統の希釈液では高いが、卵黄リン酸緩衝液、卵ク液、グリシン液、グルタミン酸ナトリウム液、Ca 欠 KRP 液、生食液およびリン酸緩衝液ではすべて低い値を示している。とくに、グルタミン酸ナトリウム液、卵黄リン酸緩衝液およびグリシン液では糖消費量と乳酸蓄積量は半減している。これらの成績とイヌ精子の成績をくらべると、牛乳では増加の傾向が一致しているが、他の希釈液につ

いては大きな差が認められる。また単一組成の希釈液 (c, d, e, f) における精子の呼吸量と糖消費量はほぼ増加の傾向を一にしているが、乳酸蓄積量は傾向を異にしている。

グリシンは精子の生存に有効であり、PETIC 液の一組成になっている。牛精子の代謝能におよぼすグリシンの影響について FLIPSE ら¹⁹⁾は、フラクトース消費量は減少しないが、乳酸蓄積量が減少することを明らかにしている。イヌ精子における著者らの成績でも同様の傾向が示された。DIETZ & FLIPSE²⁰⁾はグリシン-¹⁴Cを用いて、グリシンが精子のグルコース利用を減少させる原因を究明し、精子内へのグリシンの取込みは active transport system によること、このことは温度や阻害剤に鋭敏に反応し、グルタミン酸、グルコース、アルギニンおよびプロリンの間に競合が起こることを明らかにしている。イヌ精子の場合にも同様の傾向が認められたことから、グリシン代謝の方向性が暗示される。WALES & WALLACE²¹⁾は、好気的条件下でのイヌ洗浄精子は、乳酸とフラクトースが共存する場合はフラクトースの酸化率が高いこと、また、リン酸塩は牛精子の呼吸量の低下ならびにフラクトース分解能の促進をもたらすが、その他の家畜精子 (イヌ、兎、鶏) には呼吸を促進する以外に他の代謝促進効果はないとのべている。本実験成績においても、グルタミン酸ナトリウム液以外の単一組成の希釈液 (c, d, e) ではほぼ一致する結果を示した。

グルタミン酸ナトリウム液では原精液よりもやや高い代謝能を示し、測定後の精子生存性も良好であったことなどから、イヌ精子の希釈液またはイヌ精子を処理する場合の緩衝液に使用できると考えられる。しかし、グルタミン酸ナトリウムがイヌ精子の代謝促進効果をもたらす理由は明らかでないが、代謝系路に何らかの役割を持つことが推測され、今後明らかにされなければならない。

牛乳をイヌ精子の希釈液として利用しうる²²⁾ことが報告されているが、代謝能におよぼす影響については論じられていない。牛乳は供試希釈液 8 種類中もっとも著しい代謝促進効果を示したが、逆に精子の生存性の低下は著しかった。また基質を添加しない場合でも原精液の場合の約 2 倍の値を示したことなどから、牛乳中の各種のイオン、糖質および酵素などが相互に作用して代謝を促進したものと考えられる。著者らの牛乳によるイヌ精子の保存試験では長期保存効果が低かったが、その理由の一つとして本実験で示された牛乳による精子の代謝促進効果が考えられる。

ペプトン添加緩衝液および PETIC 液においては、精子の生存性ならびに呼吸能は原精液よりも高い値を示しているが、糖消費量と乳酸蓄積量との間には基質による傾向の相違が明らかである。黒田ら¹⁸⁾はイヌ精子の代謝能が季節によって差のあることを明らかにし、秋にはグルコースよりもフラクトースの代謝量が多いとのべている。本実験成績においても大部分の希釈液では傾向において一致しているが、牛乳と PETIC 液では逆の傾向が示された。枘田²³⁾は、山羊精子に卵黄を添加すると呼吸能が促進されるが、その原因物質は主として卵黄中のグルコースであるとのべている。これだけでは PETIC 液における代謝促進効果の説明には不十分であるが、一つの示唆を与えるものと考えられる。

代謝能と精子の生存性との関係は希釈液によって傾向を異にしているが、供試希釈液 8 種類の中で両者ともに良好な成績がえられたのは PETIC 液とグルタミン酸ナトリウム液である。保存精液を人工授精に用いる場合、精子の生存性維持だけでなく、雌性生殖器官における諸要因に対応しうる能力、すなわち代謝能を保持していなければならない。これらの観点から、PETIC 液はイヌ精子の保存効果が高いだけでなく、代謝能も高いことから、希釈保存液として十分利用しうるものと考えられる。

要 約

スピッツ種の成雄犬を用いて、イヌ精子の糖代謝能に及ぼす希釈液の影響について検討した。その結果はつぎの通りである。

1. 原精液よりも希釈精液の方がいずれの場合にも高い代謝能を示した。
2. グリシン液およびリン酸緩衝液では呼吸量および糖消費量が高いにもかかわらず、乳酸蓄積量はきわめて低値を示した。これらの希釈液ではイヌ精子は糖の利用と並行して乳酸も利用しうると推測される。
3. 牛乳およびグルタミン酸ナトリウム液で希釈された精子の呼吸能および解糖能は原精液の場合よりも高かった。この傾向は牛乳において特に著明であった。
4. PETIC 液は精子の生存維持ならびに糖代謝能のいずれに関しても好影響をもたらすことが知られた。

(1973. 7. 7 受付)

文 献

- 1) HARROP, A. E.: *J. Amer. Vet. Med. Assoc.*, 129, 564, 1956.

- 2) FOOTE, R. H.: *Amer. J. Vet. Res.*, **25**, 32, 1964.
- 3) FOOTE, R. H. & E. P. LEONARD: *Cornell Vet.*, **54**, 78, 1964.
- 4) 黒田 (治)・西川 (義)・入谷 (明): 凍結研会報 (31), 3, 1970.
- 5) 黒田 (治)・西川 (義)・入谷 (明): 第 159 回日本臨床獣医学会 (福岡) 講演一日獣誌: **23**, 650, 1970.
- 6) 黒田 (治) 広江 (一): 第 183 回日本臨床獣医学会 (岐阜) 講演, 1972.
- 7) IVANOV, E. E.: *C. R. Soc. Biol., Paris*, **102**, 363, 1929.
- 8) MANN, T.: *J. Agric. Sci.*, **38**, 323, 1948.
- 9) MANN, T. & I. G. WHITE: *Nature, Lond.*, **178**, 142, 1956.
- 10) BARTLETT, D. J.: *J. Reprod. Fertil.*, **3**, 190, 1962.
- 11) WALES, R. G.: *J. Reprod. Fertil.*, **10**, 369, 1965.
- 12) MURDOCH, R. N. & I. G. WHITE: *J. Reprod. Fertil.*, **12**, 271, 1966.
- 13) 黒田 (治)・広江 (一): 家畜繁殖誌, **17**, 89, 1972.
- 14) SOMOGYI, M.: *J. Biol. Chem.*, **195**, 19, 1952, (cit 藤井著, 生化学実験法 定量編, 南山堂, 1961)
- 15) ROE, J. H.: *J. Biol. Chem.*, **107**, 15, 1934. (cit. 吉川著, 臨床医化学 I 実験編, 共同医書, 1966,
- 16) BARKER, S. B. & W. H. SUMMERSON: *J. Biol. Chem.*, **138**, 535, 1941. (cit. 吉川著, 臨床医化学 I 実験編, 共同医書, 1966)
- 17) UMBREIT, W. W., R. H. BURRIS & J. F. STAUFFER: *Manometric techniques and tissue metabolism*. Baugess, Minneapolis, 1949.
- 18) 瑞穂 (当)・丹羽 (太)・副島 (明): 家畜繁殖誌, **9**, 92, 1963.
- 19) FLIPSE, R. J. & J. O. ALMQUIST: *J. Dairy Sci.*, **41**, 1787, 1958,
- 20) DIETZ, R. W. & R. J. FLIPES: *J. Dairy Sci.*, **49**, 85, 1966.
- 21) WALES, R. G. & J. C. WALLACE: *J. Reprod. Fertil.*, **8**, 361, 1964.
- 22) 枅田 (博): 学位論文 (京都大学), 1969.

Summary

The effects of eight sorts of diluent were studied on the metabolic activity of dog spermatozoa using ten adult male Spitzdogs. Spermatozoa in the second fraction of ejaculate were washed once with the diluents and resuspended in them. The results are summarized as follows:

1. In general, the metabolic activity of dog spermatozoa suspended in the diluents was higher than that in undiluted semen. The accumulation of lactic acid varied markedly according to the diluents.
2. The glycine and phosphate buffer were effective in stimulating oxygen uptake and glucose or fructose utilization of dog spermatozoa. However, the lactate was accumulated very little in these buffers.
3. Cow's milk diluent stimulated metabolic activity of dog spermatozoa markedly. Sodium glutamate diluent was shown to have a similar effect.
4. PETIC solution was effective keeping viability and glycolytic activity of dog spermatozoa.