家畜精子の代謝に関する研究

II. 各種保存液ならびに抗菌性物質の添加が

精子の代謝におよぼす影響について

瑞穂 当・丹羽太左衛門・副島昭彦

(農林省畜産試験場)

精液に添加する保存液に関しては従来多数の発表があり、また精液の保存に当って細菌の増殖を防止するために抗菌性物質を添加することは今日では常識的となつてゐる。しかしこれら保存液あるいは抗菌性物質が精子の代謝におよぼす影響については未だ充分解明されてゐるとは言えない状況であるので、従来発表されてゐる保存液乃至希釈液あるいは抗菌性物質の中から代表的なものを選び、これらを精液に添加した場合の精子の代謝量を測定し精子生存性との関連について考究した。

実験材料ならびに方法

実験材料：供試精液としては豚精液を用いた。実験項目別の供試精液の調製要領は次の通りである。

1) 保存液の比較試験用供試精液の調製

実験に用いた保存液は、牛乳、8% 脱脂粉乳液、卵黄磷酸緩衝液、卵黄クエン酸ソーダ液（以下卵ク液と略称）、6% ブドウ糖液、6% 果糖液、10% 蔗糖液、3% グリシン液、2.5% グルタミン酸ソーダ液、KREBS の phosphate-Ringer 液（以下 KRP 液と略称）、0.7% 食塩水、M/10 磷酸緩衝液、3% クエン酸ソーダ液の計 13 種であり、豚精液をこれら保存液で 2 倍希釈し、希釈しただけのものと希釈後 40°C から 15°C に急冷衝撃を与えたものとの 2 区に分けた。

なお、これら保存液の pH 値が中性をはずれるものは補整をおこない、また豚精液は糖含量が少ないので解糖源の不足を来さないように糖液以外の保存液には 1/20 量の 6% 果糖液を添加した。

2) 抗菌性物質の比較試験用供試精液の調製

供試した抗菌性物質はサルファ剤および抗生物質を主体とした下記 22 点であり、これらを精液量と等量のブドウ糖加 KRP 液に溶解し pH 値を 7.0 に補整した後豚

精液に加えた。各抗菌性物質の濃度は、予備実験において数段階の濃度について精漿中の細菌の発育状況を検査し、細菌の増殖を殆んど防止し得る最低濃度（第 1 表参照）を用いた。

供試抗菌性物質は次のようである。

〔サルファ剤〕

ホモスルファミン、サルファメラジンナトリウム、サルファジメトキシシン、サルファメトキシピリダジン、サルファメサジンナトリウム、サルファイソミジンナトリウム、スルファミン、サルファチアゾール、アセトスルファミン、サルファダイアジン、サルファイソキサゾール、サルファイソメゾール、サルファグアニジン。

〔抗生物質〕

カナマイシン、ペニシリン、ストレプトマイシン、クロロマイセチン、アクロマイシン、オーレオマイシン。

〔その他〕

フェニール砒酸、硼酸、グアノフラシン

実験方法：精子代謝量の測定方法は第 I 報に準じた。すなわち、呼吸量はワールブルグ検圧装置を使用し 37°C における精子 1 億 1 時間当りの酸素消費量をもつて示し、解糖量は ROE¹⁾ の方法、乳酸量は BARKER-SUMMERSON 法²⁾ による比色定量により、37°C の好気的条件下における精子 1 億 1 時間当りの量を算出した。

なお、実験装置の関係から同一精液材料について全実験区を同時に実施することができなかつたので、測定数値はそれぞれの対照区の値を 100 とした指数に換算して表示し、おのおのの優劣を比較する方法をとつた。

実験結果ならびに考察

〔I〕 各種保存液の添加が精子の代謝量ならびに活力におよぼす影響

(1) 添加保存液と精子代謝量

添加した保存液の種類と精子代謝量との関係は第 1 図に示すようであつた。

a) 精子の呼吸量：

精子の呼吸を促進する効果が認められたのは、牛乳、

Studies on the metabolism of spermatozoa of farm animals. II. The effect of some diluents or antibacterial agents on the metabolism of spermatozoa. MIZUHO, A., T. NIWA & A. SOEJIMA (Nat. Inst. Anim. Indust., Chiba-shi) *Jap. J. Animal Reprod.*, 9 (3).

第1図 添加保存液と精子の代謝量 (3例平均)

備考 (1) □は呼吸量, ■は解糖量, ▨は乳酸蓄積量を表わす。

(2) 好気的条件 37℃, 精子1億1時間当りの数値を無処置対照の値を100とした指数に換算して示す。

脱脂粉乳液, 卵黄磷酸緩衝液, 卵ク液の4種であり, その他の保存液の添加は精子の呼吸量を抑制する結果が見られた。

温度急冷による精子呼吸作用の障害を防止する効果が認められたのは, 卵黄磷酸緩衝液, 牛乳, 脱脂粉乳液の3者であつた。

b) 精子の解糖量:

保存液を添加することによって精子の解糖量に促進効果が認められたのは脱脂粉乳区のみであり, その他はいずれも対照区よりも解糖量が少なかった。

精液温の急冷処理をした後において精子の解糖量が対照区よりも多かつたのは卵ク液添加区のみであつたが, 牛乳, 脱脂粉乳, 磷酸緩衝液添加区においても対照区にほぼ近い解糖量が見られた。

c) 乳酸蓄積量:

果糖液添加区における乳酸蓄積量が全実験区を通じて最下位にあつた。蔗糖あるいはブドウ糖の添加区において解糖量に比して乳酸蓄積が多かつた点は疑問が残る。

(2) 添加保存液と精子活力

供試精液について, 代謝測定の前後における精子活力を検査した結果は第2図に示すようであつた。

すなわち, 保存液を添加した直後においては対照の無

第2図 保存液添加ならびに温度処置後における精子活力 (3例平均)

備考 (1) 精子活力を生存指数に換算し, 無処置対照の値を100とした比で表わす。

(2) 棒の黒色部分は代謝測定終了時の状態を示す。

希釈原精液と殆んど変わらない精子活力が見られたが, 37℃に90分間振盪された後(代謝測定終了時)において対照区より良好な活力を維持したものが多く, これらの保存液の添加は精子活力の持続に好影響を与えたものと言える。

一方, 保存液添加後精液温を急冷した実験区では, 牛乳, 脱脂粉乳液, 卵黄磷酸緩衝液, 卵ク液, ブドウ糖液, グリシン液, 磷酸緩衝液の各添加区では対照区より良好な精子活力が認められた。

(3) 保存液についての総合考察

以上の実験結果を総合してみると, 精子の代謝に有効に作用した牛乳, 脱脂粉乳液, 卵黄磷酸緩衝液, 卵ク液の各区においては精子の生存性も良好であつたが, 一方代謝量に低下が認められた他の保存液区においても添加直後においては対照区に劣らない精子活力が観察された。この理由としては中尾等³⁾の報告のように, 精子の運動機序としてエネルギー発生系, エネルギー伝達系, エネルギー貯蓄系等の存在が考慮され, 一定量以上の代謝が行なわれた場合は精子の運動は一様の活発性を示し, それ以上の代謝によつて発生したエネルギーは貯蓄されあるいは無為に放散されることが妥当のように思われる。

卵黄系統の保存液は TOSIC & WALTON⁴⁾の報告と同様に精子の呼吸を促進する効果にすぐれたが, 解糖作用には抑制的に働く結果が見られた。牛乳系統の保存液は精子の呼吸および解糖作用に好影響を与えたが, 温度の急冷から精子を保護する効果は卵黄系統の保存液に劣る

ようである。糖の添加が精子の呼吸を阻害することは LARDY & PHILLIPS⁵⁾ や HENLE & ZITTLE⁶⁾ も報告しており、また過量の糖の存在は精子の解糖に悪影響があるという MACLEOD⁷⁾ の報告もある。われわれの実験結果でも同様の傾向が見られたが、殊に精液中の糖成分の主体をなす果糖が添加された場合の精子解糖量が全実験区を通じて最下位にあつたことは注目すべき所見と思われる、今後検討すべき問題を含むと考えられる。ただこの実験結果からいえば、糖の利用に当つては過量をいまいしめ、他の保存液と併用することが望ましいと考えられる。KRP 液あるいは食塩水は精子の代謝を促進する効果は認められなかつたが、その反面抑制することも少ないようで、精液の単なる希釈増量の目的には適するものと考えられる。グリシンならびにグルタミン酸ソーダは精子の代謝を促進することはないようである。

第3図 添加抗菌性物質と精子代謝量 (3例平均)

備考: (1) □は呼吸量, ■は解糖量, ▨は乳酸蓄積量を表わす。

(2) 好気的条件, 37°C, 精子1億, 1時間当りの数値を対照の値を100とした指数に換算して示す。

〔II〕 各種抗菌性物質の添加が精子の代謝ならびに生存におよぼす影響

(1) 添加抗菌性物質と精子の代謝量

所要量の抗菌性物質を精液に添加した場合の精子の代謝状況は第3図に示すようであつた。

a) 精子の呼吸量:

抗菌性物質を添加しない対照区に比べて、精子の呼吸にむしろ促進的に作用したものは、ホモスルファミン、サルファジメトキシ、サルファイソミジンナトリウム、ペニシリンの4区であり、その他の抗菌性物質は程度の差はあるがいずれも抑制作用を示し、特にグアナフロラシン、オーシオマイシンの2者は抑制度が顕著であつた。

b) 精子の解糖量:

抗菌性物質を添加しない対照区に比較して同等あるいはそれ以上の解糖量が見られたのは、ホモスルファミン、サルファメラジンナトリウム、サルファジメトキシ、クロロマイセチンの4区であり、その他の抗菌性物質はいずれも精子の解糖を抑制した。オーレオマイシンは特に精子の解糖を阻害することが甚だしく、この添加区においては糖量の減少は全く検出し得なかつた。

第4図 添加抗菌性物質と精子活力 (3例平均)

備考: 対照区の精子生存指数を100とした比率で示す。枠の黒色部分は代謝測定終了時の状態を表わす。

BRANTON & PRATHER⁸⁾もスルファミン、ペニシリン、ストレプトマイシンが牛精子の解糖ならびに乳酸蓄積を抑制すると報告している。

c) 乳酸蓄積量：

この実験は好氣的条件下になされたので、乳酸の蓄積量は解糖量の大小とは完全には一致しない場合が生じ、極端な例としてはクロロマイセチン添加区においては呼吸が抑制され解糖は促進されたため、結果的に乳酸蓄積量は対照区の約2倍に達している。一方、オーレオマイシンならびにグアノフラシン添加区においては乳酸量がきわめて少なく、あるいは減少すら認められ、解糖が殆

第1表 各種抗菌性物質の総合比較

区 別	濃度 (%)	精子生存性		呼吸量	解糖量	乳酸蓄積量	水溶性
		直後	90分後				
対 照		100	92	100	100	100	
サ ル フ ア 剤	ホ モ ス ル フ ァ ミ ン	0.1	100	96	127	105	84 ○
	サルファメラジンナトリウム	0.2	100	91	87	102	93 ○
	サルファジメトキシ	0.3	100	91	139	138	69 ×
	サルファメトキシピリダジン	0.2	100	91	73	90	67 ×
	サルファメサジンナトリウム	0.3	100	89	82	84	94 ○
	サルファイソミジンナトリウム	0.3	100	87	116	78	40 ○
	ス ル フ ァ ミ ン	0.3	100	86	76	94	98 △
	サルファチアゾール	0.1	98	89	88	84	80 ×
	アセトスルファミン	0.2	98	86	70	86	108 △
	サルファダイアジン	0.1	98	54	58	76	80 ×
抗 生 物 質	サルファイソキサゾール	0.2	91	42	43	69	71 ×
	サルファイソメゾール	0.3	86	66	52	66	85 ×
	サルファグアニジン	0.3	89	46	54	50	56 ×
	カ ナ マ イ シ ン	1 mg 力価/ml	100	92	91	95	83 ○
	ペ ニ シ リ ン	500 単価/ml	100	92	106	93	96 ○
	ストレプトマイシン	0.1	100	90	92	88	106 ○
そ の 他	クロロマイセチン	0.1	96	83	55	121	196 △
	ア ク ロ マ イ シ ン	0.1	68	42	65	55	92 △
	オーレオマイシン	0.5	0	0	23	0	4 ×
	フ ェ ニ ール 砒 酸	0.1	98	82	75	34	61 ○
	砒 酸	0.4	96	69	52	33	31 △
そ の 他	グ ア ノ フ ラ シ ン	0.1	91	0	10	12	-3 ○

- 備考：(1) 濃度は精液中の細菌の増殖を殆んど防止し得る最低濃度を示す。
 (2) 精子生存性は対照の実験開始時の精子生存指数を100とした比で示す。
 (3) 精子代謝量はいずれも対照の値を100とした指数で示す。
 (4) 水溶性は、○印は易溶、△印は加温により溶解するもの、×印は難溶を示す。

んどなされなかつたことを示している。

(2) 添加抗菌性物質と精子の生存

所要濃度の抗菌性物質を添加した直後ならびに 37°C に 90 分間振盪後（代謝測定終了時）における精子の生存状況を検査し、精子生存指数で表現した結果は第4図に示すようであつた。

すなわち、サルファ剤の中ではホモスルファミンが最もすぐれ、無添加の対照区に比べて劣らない精子活力が見られた。サルファダイアジン、サルファイソキサゾール、サルファイソメゾール、サルファグアニジンの添加は精子の活力に害が大きかつた。

抗生物質の中では、カナマイシン、ペニシリン、ストレプトマイシンは精子活力に害が少なかつたが、クロロマイセチン、アクトマイシンは若干害作用が認められ、オーレオマイシンは細菌の発育を防止するに足る量を添加することによつて精子はすべて死滅した。抗生物質添加と精子活力との関係については HENNAUX 等⁹⁾、FOOT & SALISBURY¹⁰⁾、ALMQUIST 等¹¹⁾、FOOT & BRATTON¹²⁾、STALLCUP & MCCARTNEY¹³⁾ 等の報告があるが、いずれも抗生物質の中で精液の保存に利用可能なものはペニシリンとストレプトマイシンであることは一致した見解のようである。

フェニール砒酸、砒酸を添加した場合にも精子活力に若干低下が認められた。グアノフラシンを添加した場合は、添加直後にはまだ相当の精子生存が認められたが、37°C に 90 分間振盪後にはすべての精子が死滅していた。

(3) 各種抗菌性物質の優劣についての総合比較

精液に添加する抗菌性物質の条件としては、細菌には強い抑制作用を示し、精子にはなるべく無害であるべきことは勿論であるが、その抗菌性物質が水溶性に富むことも実用上の大きな要素となる。これら諸種の要素を総合的に比較して精液の保存に有効に利用し得るものを判定する。

ために、上記の実験結果を一表にまとめると第1表のようである。

この表によれば、サルファ剤 13 種の中ではホモスルファミンが抗菌力、精子の生存性ならびに代謝量、溶解性の各項目についてすぐれており、これに次いでサルファメラジンナトリウム、サルファメサジンナトリウム、サルファイソミジンナトリウム、スルファミンが適当と思われる。サルファジメトキシンは精子の生存を害せず、精子の代謝には促進効果さえ見られたが、難溶性のため実用性に乏しく、その他のサルファ剤もいずれかの項目に不満の点が認められる。

抗生物質 6 種の中では、従来使用されているストレプトマイシン、ペニシリンが好結果を示した。カナマイシンは同様に好結果を示したが、潮解性が強いいため実用上の不便がある。クロロマイセチンが精子生存に害を示したのは呼吸を阻害することが大きかったためと思われる。オーレオマイシンは精子に対する害作用がきわめて強く精液保存のための添加抗菌物質としては利用し得ないと判断される。

グアノフラシンは精子に対する害作用が顕著で利用価値はない。フェニール砒酸と硼酸は利用可能の余地はあるが、サルファ剤や抗生物質に代り得ると思われにくい。

要 約

各種保存液および各種抗菌性物質を精液に添加した場合の精子の代謝ならびに生存性について実験し、次の結果を得た。

(1) 牛乳あるいは卵黄を主体とした保存液の添加は精子の活力に好影響があつたが、これは精子の呼吸あるいは解糖を促進する効果のためであると考えられる。

(2) 牛乳系統の保存液は精子の解糖を促進する効果において卵黄系統の保存液よりもすぐれたが、精液温の急冷から精子を保護する効果は卵黄系統のものの方がまさるように認められた。

(3) 糖液の添加は精子の呼吸および解糖を抑制した。したがって糖の利用に当つては過量を避け、他の保存液と適宜併用すべきものと考えられる。

(4) グリシン、グルタミン酸ソーダは精子の活力ならびに代謝に効果を示さなかつた。KRP 液および食塩水は精子の代謝を促進しない反面抑制する作用も少なかつたので、精液の単なる増量の目的には適しているもの

と思われる。

(5) 抗菌性物質の中には細菌の増殖を抑制する濃度において精子の代謝にはむしろ良効果を示すものがあつた。この所見は従来から適当な抗菌性物質の添加によつて精子の生存時間の延長が見られていたことの一原因と考えられる。

(6) 実験に供したサルファ剤 13 種の中ではホモスルファミンが抗菌力、精子の生存性ならびに代謝量、水に対する溶解性の各項目においてすぐれており、これに次いで、サルファメラジンナトリウム、サルファメサジンナトリウム、サルファイソミジンナトリウム、スルファミンが良好であつた。

(7) 抗生物質 6 種の中ではストレプトマイシンおよびペニシリンが良好で、カナマイシンは精子に対する害は少なかつたが潮解性が強いことが実用上の不便となると思われる。他の 3 種は何等から難点が認められ、特にオーレオマイシンは細菌を抑制する濃度では精子に著害を示し、精液に添加する抗菌性物質としては利用しがたいものと認められた。

(8) 硼酸およびフェニール砒酸は利用可能の余地はあると考えられたが、グアノフラシンは不適当であると思われた。

終りに、本研究に対し種々御指導をいただいた東大農学部教授星冬四郎博士に厚く感謝致します。

(1962. 12. 1 受付)

文 献

- 1) ROE, J. H. : *J. B. C.*, **212**, 335, 1955.
- 2) BARKER, S. B. & W. H. SUMMERSON : *J. B. C.*, **138**, 535, 1941.
- 3) 中尾 真・関根隆光・野末源一・高橋泰常・古川美採・吉川春寿 : 生体の科学, **4**, 29, 1953.
- 4) TOSIC, J. & A. WALTON : *Nature*, **159**, 554, 1945.
- 5) LARDY, H. A. & P. H. PHILLIPS : *J. B. C.*, **138**, 195, 1941.
- 6) HENLE, G. & C. A. ZITTLE : *Amer. J. Physiol.*, **136**, 70, 1942.
- 7) MACLEOD, J. : *Endocri.*, **29**, 583, 1941.
- 8) BRANTON, C. & W. B. PRATHER : *J. Dairy Sci.*, **37**, 228, 1954.
- 9) HENNAUX, L., E. DIMITROPOULOS & E. CORDIEZ : *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, **141**, 1272, 1947. (*A. B. A.*, **17**, 36, 1949 による)
- 10) FOOTE, R. H. & G. W. SALISBURY : *J. Dairy Sci.*, **31**, 763, 1948.
- 11) ALMQUIST, J. C., P. J. GLANTZ & H. E. SHAFFER : *J. Dairy Sci.*, **32**, 183, 1949.
- 12) FOOTE, R. H. & R. W. BRATTON : *J. Dairy Sci.*, **33**, 544, 1950.
- 13) STALLCUP, O. T. & H. K. MCCARTNEY : *J. Dairy Sci.*, **36**, 293, 1953.