家畜精子の代謝に関する研究

V 凍結保存と精子代謝能力について

瑞穂 当・丹羽太左衛門・副島昭彦

(農林省畜産試験場)

家畜精液の凍結保存は SMITH & POLGE¹⁾ の発表に端を発し、以来幾多の業績により現在実用化の段階に達しているが、なお家畜の種類によつては凍結保存の困難なものがあり、また同種類の家畜でも個体的に凍結能のきわめて劣弱なものがあり、さらに凍結に耐えるものでも凍結後の精子生存率は凍結前に比べて低下することは避けられない状態であつて、精液の凍結の保存方法にはまだ改良すべき多くの余地が残されていると考えられる。

そこで現行の凍結保存術式に準拠して凍結精液を製造する諸過程における精子の代謝能力の状態を把握することにより、凍結術式の改良に資する目的で本実験を試みた。

実験材料ならびに方法

実験材料：抗凍結物質の比較にはグリセリン、プロピレングリコール、エチレングリコールの3者を用い、精液材料は豚および牛精液を使用した。処理の細部については各実験の項に述べる。

実験方法：精子代謝量の測定方法は第I報に準じた。すなわち呼吸量測定にはワールブルグ検圧装置を使用し、解糖量は ROE 法²⁾によりブドウ糖量として、乳酸量は BARKER & SUMMERSON 法³⁾によりそれぞれ比色定量した。

実験結果ならびに考察

[I] 抗凍結物質の添加が精子の代謝におよぼす影響

1. 37°C における実験

豚精液を遠心分離して精漿を除去し、卵ク液2容：6%ブドウ糖液1容：KRP液7容の保存液に浮遊せしめたものを15°Cに温度降下した後5区分し、同組成の保存液にグリセリンを4, 10, 15, 20, 40%に加えたもので

5回に分けて2倍希釈した。それを1夜15°Cに保存してグリセリン平衡をおこない、翌期37°Cにおいて精子の代謝量を測定し、また代謝測定前後に精子活力を検査した。その結果は第1図に示すようであつた。

第1図 グリセリン濃度と精子の代謝量、ならびに活力(4例平均)

備考：(1) 代謝量は好気的条件、37°C、精子1億、1時間当りの数値を示す。

(2) 精子生存指数の枠全体は代謝測定開始時、枠の黒色部分は同終了時の状態を表わす

すなわち、呼吸量、解糖量共にグリセリン濃度2% (終末濃度) では対照のグリセリン不含のものに劣らなかつたが、5%以上のグリセリン濃度の場合は高濃度になるほど精子の代謝量は低下することが認められた。精子活力においても、グリセリン濃度2%では対照と変らなかつたが、5%濃度では開始時の精子活力は良好であつたが代謝測定中に死滅する精子が増加し、7.5%濃度以上では開始時の精子活力がすでに低下しており代謝測定中に死滅する精子も多かつた。

グリセリンの場合と同様の実験をプロピレングリコールならびにエチレングリコールを用いて行なつたが、いずれもグリセリンを用いた場合と同様の傾向が見られた。

以上の実験結果から、これら抗凍結物質の添加は高濃度に至るほど精子の代謝を阻害し活力も害されるものと認められる。WHITE 等⁴⁾は綿羊および牛精子について実験し、7.5%のグリセリンを添加した場合は精子は代謝能力がなく、殊に37°Cにおいては急速に精子は死滅すると言っている。また PICKETT 等⁵⁾も牛精子につい

Studies on the metabolism of spermatozoa of farm animals. V. The effect of deep freezing on the metabolic activity of spermatozoa. MIZUHO, A., T. NIWA & A. SOEJIMA. (Nat. Inst. Anim. Indust., Chiba-shi) *Jap. J. Animal Reprod.*, 9 (3).

て 38°C の嫌気条件下でグリセリン濃度 10% > 1% > 3% の順のガス発生があつたが、これは解糖によるものかどうかは不明であるとし、一方精子活力に対しては 1% のグリセリン濃度では対照より良好であつたが、それ以上のグリセリン濃度は害をおよぼしたと報告している。

2. 15°C および 5°C における実験

精液の処理は前項の実験と同様におこない、同一供試精液についてグリセリン、プロピレングリコール、エチレングリコールの各 5%, 10%, 20% を含むものを抗凍結物質を含まない対照希釈精液と共に 15°C および 5°C に分けて保存した。ただしこの実験においては保存液として卵ク・ブドウ糖液 (1:4) を使用した。

保存中における精子活力の状況は第 2 図のようであつた。

第 2 図 抗凍結物質の濃度ならびに保存温度と精子活力 (2 例平均)

備考: (1) 第 2 次希釈 (抗凍結物質添加) 以後の精子活力の消長を生存指数で示す

(2) ●—● は 5% 濃度 ●—●—● は 10% 濃度 ●……● は 20% 濃度を表わす
×……× は抗凍結物質を添加しない対照

すなわち、15°C に保存したときはグリセリン、プロピレングリコール、エチレングリコール共に 5% の場合が良好な精子活力を示し、10% 濃度のものはやや劣り、20% 濃度のものは最も不良であつた。

しかし 5°C に保存された場合は趣きを異にし、グリセリン添加区では 10% と 20% 濃度の場合にむしろ 5% 濃度のものより良好な精子活力を示し、しかも対照の抗

凍結物質無添加のものに比べてグリセリンを含むものの方がいずれも良好な結果を示した。プロピレングリコール添加区では 10% 濃度が最もすぐれ、5% 濃度はやや劣り、20% 濃度のものが最も悪かつた。エチレングリコール添加区では 10% 濃度のものが良好で、5% および 20% 濃度のものは共にやや劣つた。

一方、精液の保存中において、48 時間後および 96 時間後に精液中の乳酸蓄積量を測定した結果は第 3 図に示すようであつた。

第 3 図 抗凍結物質の濃度ならびに精液保存温度と乳酸蓄積量 (2 例平均)

備考: それぞれの温度の静置条件下における精子 1 億当りの蓄積量を示す

すなわち、15°C 保存の場合は各抗凍結物質において 5% 濃度のものは乳酸蓄積量が多かつたが、添加濃度が大きくなるにしたがつて乳酸蓄積量は少なかつた。

5°C 保存の場合には、10% 濃度のものが 5% 濃度のものより多く、20% 濃度のものでも 5% 濃度のものに劣らない乳酸蓄積が認められた。ただ、プロピレングリコールの場合においては、20% 濃度のものは 15°C 保存の場合と同様に乳酸蓄積が少なかつた。

なお、5°C 保存の場合には、抗凍結物質を添加しない対照区に比べて、抗凍結物質添加区の方が全般的に乳酸蓄積量が大いことが注目され、15°C 保存の場合とは異なる所見であつた。

この実験において糖の定量を試みた結果は、使用した保存液中の糖含量が多く、しかも低温条件のため解糖量が少ないためと思われるが、保存中に精液内の糖量の減少を検出できず、ほとんど全例において糖が増加したかのような矛盾した発色度が見られた。精液の保存中において未知の還元性物質が増加することは MANN⁶⁾ も述

べている。

3. 抗凍結物質についての総合考察

上述の 37°C, 15°C, 5°C における実験結果から総合すると、抗凍結物質の添加は、高温度においては添加濃度が高いほど精子の生存ならび代謝に有害に作用するが、低温条件では逆に効果的に作用するものと考えられることができるようである。

抗凍結物質 3 者の比較においては、グリセリンが最もすぐれ、エチレングリコールはやや劣り、プロピレングリコールは有害性が大きいように認められ、精子活力の良否によつて判定した牛についての西川⁷⁾等、豚についての丹羽⁹⁾等の結果と一致する。

【II】凍結の温度過程における精子の代謝能力ならびに活力の消長

遠流した豚精子を卵ク・ブドウ糖液 (1:4) に浮遊せしめ、15°C において 20% リグセリン加卵クブドウ糖液で 2 倍稀釈し、1 夜静置してグリセリン平衡をおこなった後、15°C から出発して精液の凍結を行なつた。温度降下速度は -15°C までは毎分 1°C, -15°C から -79°C まで毎分 3°C とした。供試精液は温度降下直前に試験管に 6 等分し、15°C, 0°C, -10°C, -15°C, -20°C, -79°C の各温度において 1 本づつ取り出し、それらの精液材料について 37°C において精子の代謝量を測定し、また代謝測定の前後に精子活力を検査した。その結果は第 4 図に示すようであつた。

すなわち、精子呼吸量は 0°C までの精液温降下のものでは影響がなく、-10°C 以下に下げられたものでは低下が認められたがその程度は少なく、-79°C に凍結さ

第 4 図 凍結過程の各温度において保持する精子の代謝能力ならびに活力 (3 例平均)

備考: (1) 精液試料は次の各温度において採取した

A: 15°C のまま (対照), B: 0°C,
C: -10°C, D: -15°C, E: -20°C,
F: -79°C

(2) 代謝量は好気的条件, 37°C, 精子 1 億, 1 時間当りの数値を示す

(3) 精子生存指数の枠全体は代謝測定開始時、枠の黒色部分は同終了時の状態を表わす

(4) グリセリン終示濃度は 10%

れたものでも特に顕著な低下は示さなかつた。解糖量は -10°C までの温度降下のものではまだ相当の量を示したが、-15°C 以下に下げられたものでは低下が著しく、乳酸蓄積量からもその状況がうかがわれた。

精子活力の検査結果においては、-10°C までの温度降下ではまだ相当良好な活力を保持していることが知られたが、-15°C 以下に冷却された精子は活力低下が大きかつた。なお、代謝測定終了時における精子活力の低下は高温 (37°C) によるグリセリン (10%) の悪感作の結果と思われる。

以上の結果から、精液の凍結温度過程において -15°C 以下になつたときに顕著な精子活力の低下がみられるのは、精子の解糖作用が障害されることに主な原因があると考えられる。

【III】凍結保存期間別の精子代謝能力の保持状況

卵ク液、グリセリン濃度 7%, 保存温度 -79°C の条件で 1 年 5 カ月乃至 2 年 5 カ月にわたつて凍結保存された牛精液を 5°C において融解した後、高温度におけるグリセリンの悪感作を可及的に防止する目的で KRP 液を加えて 5 倍稀釈したものについて、37°C において精子の代謝量を測定し、あわせ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 1 表に示すようであつた。

死滅精子を含めた精子 1 億当りの呼吸量は少なかつた

第 1 表 凍結保存期間別の牛精子の代謝量ならびに活力

凍結保存期間	呼吸量		乳酸蓄積量		精子生存率	
	精子 1 億当り	生存精子 1 億当り	精子 1 億当り	生存精子 1 億当り	測定開始時	測定終了時
	μl	μl	γ	γ	%	%
17 カ月	2.0	20.0	0	0	10	5
	1.7	11.3	3.1	20.7	15	5
	0.8	16.0	0.3	6.0	5	1
18 カ月	2.7	13.5	-1.3	-6.5	20	5
	3.9	26.0	3.8	25.3	15	1
	2.1	14.0	-3.4	-22.6	15	10
	3.5	14.0	4.2	16.8	25	5
19 カ月	1.5	7.5	2.4	12.0	20	1
	1.0	20.0	-0.5	-10.0	5	1
	1.9	12.7	1.7	11.3	15	10
	0.7	14.0	0.2	4.0	5	0.1
24 カ月	2.4	24.0	3.7	37.0	10	1
	0.9	18.0	1.6	32.0	5	1
26 カ月	2.3	23.0	-0.5	-10.0	10	1
	2.6	26.0	-1.3	-13.0	10	1
	1.9	27.1	0	0	7	1
27 カ月	2.0	28.6	5.3	75.7	7	1
	2.6	26.0	3.6	36.0	10	5
29 カ月	2.0	10.0	2.3	11.5	20	1
	5.9	29.5	0.5	2.5	20	1

が、実験開始時において生存していた精子 1 億当りに換算してみると採取直後の新鮮精子が示す値にほぼ匹敵し、凍結に耐えて生き残った精子については呼吸能力の低下は少なく、また凍結保存期間の延長によつてもさほど減退することはないものと言えよう。

精子の解糖量について測定を試みたが、測定時間中において糖量の減少は認め得なかつた。乳酸蓄積量は精子 1 億当りの数値は勿論、生存精子 1 億当りに換算した値でも、新鮮精子の正常値に比べると低値であり、[II]の実験における豚精子についての観察と同様、凍結によつて精子は解糖能力を強く傷害されるものと考えられる。しかしその傷害は凍結時に受け範囲にとどまり、凍結保存期間の延長に伴なつて低下する傾向はないものようであつた。

供試精液の融解後（代謝測定開始時）の精子生存率はさほど良好とは言えない材料であつたが、保存期間の長短による差は少なく、また代謝測定中における生存率の低下にも保存期間による特定の傾向は認められなかつた。

要 約

精液の凍結保存と精子代謝能力との関係について実験を行ない、次の所見を得た。

(1) 凍結精液製造のために添加する抗凍結物質 3 者の比較においては、グリセリンが精子の代謝能力ならびに活力の面では最適と考えられ、エチレングリコールがこれに次ぎ、プロピレングリコールは最も劣るもののように認められた。

またこれら抗凍結物質の性質として、高温度条件においては精子に有害に作用し、低温度においては有効に作用するという知見が得られた。

(2) 精液の凍結過程において精液温が -15°C 以下となつた場合に精子が活力を害されるのは、精子の解糖能力の低下に原因するものと認められ、呼吸能力の低下はあまり顕著ではなかつた。

(3) 長期間凍結保存された場合においても、生き残った精子の呼吸能力の低下は少なかつた。乳酸蓄積量から推察した解糖能力は低値ではあつたが、保存期間の延長による低下は少なかつた。このような代謝能力の長期持続が精子の生存維持の裏付けとなつているものと考えられる。

終りに、本研究に対し種々御指導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) SMITH, A. U. & C. POLGE: *Nature*, **166**, 668, 1950. 2) ROE, J. H.: *J. B. C.*, **212**, 335, 1955. 3) BARKER, S. B. & W. H. SUMMERSON: *J. B. C.*, **138**, 535, 1941. 4) WHITE, I. G., A. W. BLACKSHAW & C. W. EMMENS: *Aust. Vet., J.*, **30**, 85, 1954. 5) PICKETT, B. W. & C. P. MERILAN: *J. Dairy Sci.*, **42**, 1227, 1959. 6) MANN, T.: *The Biochemistry of Semen* (Methuen & Co. Ltd., London, 1954). 7) 西川義正・永瀬弘: 本誌, **1**, 17, 1955. 8) 丹羽太左衛門・瑞穂当・副島昭彦: 未印刷 (日本畜産学会講演発表, 1958).