一 研 究 一

家畜精子の走流性について

II. 家兎及びニワトリの精子が毛細管内を流れる際に示す方向性

河野憲太郎・諸橋巧介・木野勢芳紀

樋浦善敬・山本興三郎

(新潟大学農学部)

前報¹⁾において哺乳類の死滅精子は通常の塩類希釈液中では5秒以内に重力の方向への回転を終了し、かつ秒速約 0.363μ で沈降することを報告した。この沈降速度では水平に置かれた内径約 300μ の毛細管内を沈下するのに最大約 14 分を要する計算になる。従って毛細管内を死滅精子が流れる場合あまり間を置かずに頭部が下がり放物線状の流速分布の影響を受けながらゆっくり沈むので、BRETHERTON & ROTHSCHILD²⁾ の記述のように管の上半分では下流を、下半分では上流を向くのは当然であると考えられた。そこで次の段階として希釈液の粘性を高めることによって精子の回転ならびに沈降を妨げ、それが精子の方向性に如何なる影響を及ぼすかをみることにした。理論的には死滅精子は方向性を示し難くなる筈であり、さらに ROBERTS³⁾ によれば生存精子もまた重力の影響を強く受けるのであるから、もし精子に走流性が存在しないならばやはり方向性を示さなくなる筈である。一方ニワトリの精子は回転及び沈降速度が著しく遅かったので哺乳類の精子とは異なり通常の塩類希釈液中においても単なる紐状あるいは棒状浮遊物としての動きを示す可能性がある。そこでこれらの推測を確かめるために本実験を計画した。

実験材料及び方法

供試精液: 哺乳類として家兎3頭を用い、人工腔法で採取して正常な濃度と活力を有するものを使用した。ニワトリは白色トウマルの雑種雄を用い、マッサージ法で

濃厚精液を採取し増量のため2羽分を混合、活力を検査した後実験に供した。精子を殺す場合は前報同様ホルマリン原液の滴加によった。

希釈液: 家兎精液用—Tyrode 液, 37.5°C において比重 1.005, 相対粘度約 1.05, 以下比重と相対粘度はこの温度における数値を示す。ゼラチン 5% 及びグリセリン 7% 添加 Tyrode 液, 比重 1.034, 相対粘度約 4.09。ニワトリ精液用—Ringer 液, 比重 1.004, 相対粘度約 1.03。ゼラチン 5% 及びグリセリン 7% 添加 Ringer 液, 比重 1.039, 相対粘度約 4.83。いずれも NaHCO_3 で pH 7.2 に調節。以後ゼラチンとグリセリンを加えた液を単にゼラチン添加液と呼ぶことにする。

希釈液に粘性を与える物質としてゼラチンを選んだ理由は、生存精子の毛細管内における方向性を観察する手段として瞬間的に凍結させる方法をとったが、検鏡のために解凍した後でも凝固状態を保ち、しかも精子に対して無害であるという条件をほぼ満足すると考えられたからである⁴⁾。グリセリンはこれを加えないと凍結のさい首曲がりが多発し方向性も全く失われる。前報でニワトリ精液用として用いたリン酸緩衝液はゼラチン添加により濁りを生じ、精子の活力も著しく損われたので Lake 液など数種の生理液を比較した後 Ringer 液を採用した。

希釈倍率は家兎精液で 200 倍、ニワトリ精液では死滅精子の場合 200 倍、生存精子においては活力維持のため 6 倍とした。ただし装置 3 を使用する場合はいずれの場合も 10 倍と 50 倍の 2 種類とした。

実験装置及び使用法: 生存精子においては正常な運動状態を維持するために温度を $37\sim 38^{\circ}\text{C}$ に保つ必要があるため、実験条件をそろえるために精子の生死にかかわらず 37.5°C 前後で精液を流すことにした。このために実験台上にアクリル樹脂板を用いて幅 100 cm, 奥行 90 cm, 高さ 70 cm の恒温小室を作成した。小室の入口は

Rheotaxis of the spermatozoa in domestic animals.
II. Orientation of rabbit and cock spermatozoa in the flow of fluid in fine tubes.

KŌNO, Kentarō, Kōsuke MOROHASHI, Yoshinori KINOSE, Yoshitaka HIURA & Kōzaburō YAMAMOTO (Faculty of Agriculture, Niigata University, Niigata-shi 950-21)

Japan. J. Anim. Reprod. 23 (2), 1977.

Fig. 1. Apparatus 1. This apparatus was used on the desk of microscope. Streaming velocity was adjusted by the difference between the levels of the diluent and the semen pool. Semen stream was stopped by freezing with dry ice-alcohol poured into the enclosure of gum putty ridge. All procedures prior to the freezing were done at 37.5°C.

ビニール布製の 2 重のカーテンで仕切った。温度の維持調節は電熱器、サーモスタット及び小扇風器で行った。

装置 1—主に使用した装置である (Fig. 1)。毛細管は内径 250~350 μ のガラス製で両端を同一方向に約 5 mm 直角に曲げた。長さは流速の安定を考慮して家兎の場合約 30 cm としたが、その必要性はなかったのでニワトリでは約 18 cm とした。毛細管を支持するために厚さ 5 mm, 幅 5 cm, 長さ 28 cm (ニワトリでは 16 cm) のアクリル樹脂板の両端に半円形の切り込みを作り、ここに径 2 cm, 深さ 1 cm の小シャーレをはめ込み、接着固定して液槽とした。この装置をあらかじめ恒温小室内において加温してある顕微鏡の載物台に乗せ、液槽の片方に希釈液、他方に希釈精液を入れ、家兎ではまず精液を毛細管内に満たしてから両液槽を連絡して精液を流した。流速は家兎精液に含まれるゲルなどの運動性を持たない物質の流れをマイクロメーターによって測り、液槽内液面の高低差で流速を調節した。許容範囲は目的とする流速の 10% とした。ゼラチン添加液を使用する場合は毛細管を装置した後、ドライアイスアルコールによる凍結の便のために油土で堤防を作った。

精液槽内の精液を攪拌しながら必要時間精液を流し、ゼラチンを添加しない希釈液の場合は毛細管の一端にワセリンを付着させて流れを止め、直ちに精子の方向を調べた。ゼラチン添加液の場合はそのままの状態ドライアイスアルコールを堤防内に注いで凍結させた後、4°C の冷蔵庫内で解凍しゼラチンが固化している状態で精子の方向を観察した。

ニワトリの生存精子の観察に際しては希釈倍率が低いせいもあって精子相互のからまりが著しく、わずかに精液と希釈液の境界付近のみが観察可能であった。そこでまず希釈液を管内に満たした後両液槽を連絡した。

Fig. 2. Apparatus 2. Before the use of this apparatus, the streaming velocity was adjusted by measuring the flow rate with a small graduated syringe. The apparatus with the exception of the syringe was set in a vessel with adequate depth for the instantaneous freezing of the samples. All procedures prior to the freezing were done at 37.5°C.

装置 2—家兎精液では毛細管との比較の意味で内径 3 mm, 長さ 5 cm のガラス管を用いて Fig. 2 のような装置を作った。この装置はゼラチン添加液の場合のみに使用した。流速調節は精液槽の高さによって行い、あらかじめ希望する流速を得る高さを求めておき (小メスシリンダー内への流出量から流速を算出する), 小メスシリンダーをシャーレと置き換え、適当な深さの容器の中にこの装置をセットした。必要時間精液を流した後、そのままの状態で食塩飽和氷水を容器内に注いで凍結した。次いで水冷 10% ホルマリン液中に内容物を押し出して 24 時間固定し、約 0.1 mm の厚さに薄切したものをスライドグラスに貼り付けて検鏡した。

装置 3—ニワトリ精液では装置 1 による場合特殊な条件下にあると思われたので比較の意味でこの装置を作った。スライドグラスの両長辺に沿ってカバーグラスを樹脂接着剤を用いて貼り付け、幅約 15 mm, 深さ約 0.15 mm の浅い溝を作り、少量の白色ワセリンを使用してカバーグラスをかぶせ接着し、長方形の管を作った。管の 1 端に希釈精液を、他端に希釈液を盛り、液量の差で流速を調節した。この装置もゼラチン添加液にのみ用い、凍結はドライアイスアルコールを注いで行った。

いずれの装置による場合でも精子の方向の決定は流れの方向を軸として左右に 45°, 計 90° の角度で区分する線を想定して 4 方向に分け、それぞれ上流向き, 下流向き及び右向きと左向きとを合わせて左右向きとした。1 回の観察精子数は家兎で 400 個余り (3 mm 管の場合には 600~1,000 個), ニワトリで約 500 個である。表示は百分率によった。

観察結果ならびに考察

まず観察装置として毛細管を使用したことの適否が問題である。BRETHERTON & ROTHSCHILD²⁾ は流速の分布を単純化するために上下に狭い平行板間に希釈精液を流す方法を採用した。しかし平行板間の流体も毛細管内のそれも $\tau = \mu du/dy$, (τ : 摩擦応力, μ : 粘性, u : 流速, y : 壁面からの距離) を満足する Newton 流体, すなわち層流と見なされる⁵⁾。そして平行板間では $u = I_p y(h - y)/2\mu$, 毛細管では $u = I_p(a^2 - r^2)/4\mu$, (I_p : 圧力勾配, h : 高さ, a : 管の半径, r : 中心からの距離) なる関係, すなわち POISEUILLE の法則が導かれ, 基本的には全く同じとみて支障がない。毛細管を水平に保ち長軸の方向に垂直に切る断面を考えた場合, 左右の壁面に接近する程流速は 0 に近づき流速が精子の方向性に及ぼす力は弱くなるので, 左右向き精子の割合が多少ふえることが予測されるとしても全体的な傾向は把握できる筈である。また毛細管は長方形管に比し構造的に簡単であるため凍結に際して避けることができない装置の収縮が均一に行われて変形が少ないという利点がある。これらの点を考

Table 1. Influences of gelatin and glycerol added to Tyrode's solution to the orientation of dead spermatozoa of rabbit in the fine tube

Streaming velocity and Flowing period	Orientation	Solution	
		Tyrode's sol. ^{a)} (n=12)	Added gelatin ^{b)} and glycerol (n=12)
		%	%
100 μ /sec. 10 min.	Upstream	47.0 $\pm$ 7.1	27.2 $\pm$ 2.5
	Downstream	14.7 $\pm$ 7.4	22.8 $\pm$ 4.8
	Transverse direction	38.3 $\pm$ 8.1	50.1 $\pm$ 4.8
50 μ /sec. 20 min.	Upstream	53.1 $\pm$ 8.6	23.4 $\pm$ 11.7
	Downstream	11.5 $\pm$ 4.3	31.5 $\pm$ 10.2
	Transverse direction	35.4 $\pm$ 9.7	45.2 $\pm$ 6.5
25 μ /sec. 40 min.	Upstream	16.1 $\pm$ 6.7	
	Downstream	42.8 $\pm$ 11.3	
	Transverse direction	41.1 $\pm$ 8.2	
Significance test	Up-Down	***	*
	100 μ -50 μ	—	—
	Interaction	**	*

a: Sp. gr.; 1.005, relative viscosity; about 1.05 at 37.5°C.

b: Sp. gr.; 1.034, relative viscosity; about 4.09

慮して毛細管を選んだ。得られた成績を動物別に記述すれば次のとおりである。

家兔精子

死滅精子: 毛細管内を流した場合の成績を Table 1 に示した。流した時間は精子の沈降速度から計算して大部分の精子が管底に沈むに要する 10 分間を最低とし, 流速 100 μ 区 10 分, 50 μ 区 20 分, 25 μ 区 40 分とした。観察部位は精液槽から 2, 4 及び 6 cm の場所としたが, これはすでに管内に在る精子も新たに液槽から吸い込まれる精子も同じ流速にさらされたものを観察し, 同時に流される距離と時間の影響をもみたいと意図したからである。しかし得られた結果は距離間に全く有意差が認められなかったので表には平均値のみを示した。全く方向性を示さなければ上流, 下流, 左右向きそれぞれ 25, 25, 50% となる筈である。この割合でゼラチン無添加区の観察精子数から理論値を求め χ^2 検定を施したところ, すべて著しく高度に有意となり, 分散分析の結果からも方向性の存在が明らかであった。すなわち流速が毎秒 100 μ 及び 50 μ の時は上流を向く精子が約半数を占め, 下流を向く精子は 10% 台に過ぎず, 左右向きが 35~38% であった。一方流速 25 μ の区では上流向きと下流向きの割合が逆転し, 上流向きが著しく少なくなった。なお流速の速い区で下流向きが 0 とならず, 左右向きもかなり見出されたことは毛細管を採用することにした当初から予期されたことである。

しかし希釈液にゼラチンを加えると死滅精子の示す方向性に著しい変化が起こった。 χ^2 の値は全体に関しては高度な有意性を示したもののその内容を個々に検討したところ全項目の半数が小数点以下であった。分散分析の結果は上流向きと下流向きの間の差が有意であったが流速 100 μ 区と 50 μ 区とでその割合が逆であった。流速 100 μ 区の方が無方向に近かつ分散も小さかった。さらにゼラチン添加液を用いて 3 mm 管内を 50 μ /秒で 20 分間流した結果 (Table 2) を毛細管 100 μ 区及び 50 μ 区と比較したところ, 後者との間で全く差が認められなかった。すなわち管の太さとは無関係のようであった。

以上の成績から, 当初の予想通り希釈液にゼラチンを加えることによって死滅精子が毛細管内を流れる際に示す方向性は, 完全とまでは行かないまでもかなり有効に阻止できることがわかった。

生存精子: 前項でゼラチン添加の効果が明らかとなったので生存精子につき観察を試み, その成績を Table 3 にまとめた。流速は 100 μ /秒, 流す時間は BRETHERTON ら²⁾ の報告によると生存精子の上流への方向転換は 15

Table 2. Orientation of rabbit spermatozoa flowing in the tube of 3 mm in diameter when Tyrode's solution containing gelatin and glycerol was used

Motility	Dead (n=10)	Live (n=6)
Sperm concentration 10 ⁸ /ml	2.5~3.9	2.5~3.0
Index of motility ^{a)}	—	45.1~73.4
Orientation		
Upstream	25.9±4.1%	21.9±3.1%
Downstream	29.6±4.6	27.1±4.7
Transverse direction	44.4±7.9	50.9±6.7
Significance test	Up—Down	**
	Dead—Live	*
	Interaction	—
a: Index of motility (NISHIKAWA ³⁾)	%	
The most active forward movement	100	a
Active forward movement	75	b
Forward movement	50	c
Oscillatory or circular movement	25	d
Index of motility =	$\frac{100 \times a + 75 \times b + 50 \times c + 25 \times d}{100}$	

秒以内, ROBERTS³⁾ によれば 1 分以内で完了する筈であるから 1 分間とした。観察部位についてはゼラチン添加区では精液槽から遠い方が分散が小さくなる傾向を認めたので精液槽から約 6 cm とした。毛細管側壁付近の流速勾配の影響を避けるために両側からほぼ 4 分の 1 ずつ

を除外し, また精子には重力の方向へ泳ぐ性質(走地性)があるというので^{3,6)}, 管内を上, 中, 下の 3 層に分けて精子の分布と方向を観察した。ゼラチン添加液中における精子は粘性のため速度はやや鈍るとは言え活発な前進運動を示した。

精子の分布—上, 中, 下層それぞれ 37.06, 29.28, 33.66% で, 層間の差は有意であった。すなわち精子は中層に比較的少なく, 下層より上層に幾分多い傾向であった。精子が周辺部に多く分布する現象は懸滴標本では通常経験するところである。上層部に多い傾向がゼラチン添加による影響であるか否かは例数が少ないので断定し難い。BRANHAM⁶⁾ がデキストランを添加することによって重力に逆らって泳ぐ精子の割合を高めていることをあわせ考えると, 恐らく精子の比重の分布に起因する重力の方向への回転運動が液の粘性によって妨げられた結果であろうと推定する。

精子の方向性— χ^2 検定の結果は著しく高度な有意性で否定され方向性の存在が明らかであったが, 全層についてのそれぞれの向きの割合は上流向き 34.97%, 下流向き 32.53%, 左右向き 32.47% で, 分散分析の結果方向間, 層間, 交互作用いずれも有意性が認められなかった。すなわち層に関係なく 3 方向 3 分の 1 ずつであった。

3 mm 管内を 50 μ /秒で 20 分間流した場合の生存精子の方向は Table 2 のとおりで, χ^2 検定, 分散分析いずれも方向性の存在を示した。しかし χ^2 の個々の内容は

Table 3. Orientation of live spermatozoa of rabbit in the fine tube when they were allowed to flow in Tyrode's solution containing gelatin and glycerol (n=5)

Sperm concentration 10 ⁸ /ml		3.08± 0.21			
Index of motility		48.8±11.5			
Rate of deformity %	Before freezing	5.2±2.2			
	After freezing	7.8±3.0			
Layer		Upper	Middle	Bottom	
Distribution of sperm	%	37.06± 4.25	29.28± 4.39	33.66±3.07	
Orientation	%				Mean
Upstream		35.60±13.71	31.48±11.71	37.82±6.56	34.97±10.16
Downstream		32.60±12.65	34.00± 9.03	31.00±4.28	32.53± 8.71
Transvers direction		31.76±10.78	34.48± 8.34	31.18±5.01	32.47± 7.90
Significance test		Distribution: Between Layer			*
		Orientation: Between Orientation			—
		Between Layer			—
		Interaction			—

Table 4. Orientation of dead or live spermatozoa of fowl in the fine tube or in the rectangular cell when they were allowed to flow in Ringer's solution containing or not containing gelatin and glycerol

Motility		Dead (<i>n</i> =12)		Live (<i>n</i> =12)						
Solution		Ringer's sol. ^{a)}		Added gelatin and glycerol ^{b)}						
Orientation		Upstream Downstream Transvers		Upstream Downstream Transvers						
Streaming velocity		Upstream Downstream Transvers		Upstream Downstream Transvers						
Pine tube	50 μ /sec.	23.1 $\pm$ 2.4	14.3 $\pm$ 1.7	62.6 $\pm$ 1.0	20.4 $\pm$ 1.3	12.1 $\pm$ 2.2	67.5 $\pm$ 1.7	17.5 $\pm$ 2.0	12.3 $\pm$ 2.0	70.3 $\pm$ 3.5
	25 μ /sec.	18.4 $\pm$ 0.8	15.2 $\pm$ 1.4	66.3 $\pm$ 2.0	21.7 $\pm$ 2.8	17.5 $\pm$ 1.7	60.8 $\pm$ 2.2	14.7 $\pm$ 2.5	11.2 $\pm$ 1.0	74.1 $\pm$ 2.1
	12.5 μ /sec.	19.1 $\pm$ 1.2	17.8 $\pm$ 1.5	63.1 $\pm$ 1.6	14.6 $\pm$ 3.2	17.1 $\pm$ 0.6	68.3 $\pm$ 2.7	15.4 $\pm$ 1.6	17.9 $\pm$ 1.0	66.6 $\pm$ 2.3
	Mean	20.2 $\pm$ 2.6	15.8 $\pm$ 2.1	64.0 $\pm$ 2.3	18.9 $\pm$ 3.9	15.6 $\pm$ 3.0	65.5 $\pm$ 4.1	15.9 $\pm$ 2.3	13.8 $\pm$ 3.3	70.3 $\pm$ 4.0
	Significance test: Up-Down ***, Dead-Live ***, Between solution ***, Between streaming velocity -, Interaction ***									
Rectangular cell	50 μ /sec.	Dilution rate	50 times	25.4 $\pm$ 1.4	27.3 $\pm$ 5.8	47.3 $\pm$ 7.2	26.4 $\pm$ 3.4	22.8 $\pm$ 0.3	50.8 $\pm$ 3.1	
			10 times	25.6 $\pm$ 0.3	27.3 $\pm$ 0.1	47.1 $\pm$ 0.4	24.9 $\pm$ 1.6	24.2 $\pm$ 1.1	50.9 $\pm$ 0.4	
			Mean	25.5 $\pm$ 0.8	27.3 $\pm$ 3.4	47.2 $\pm$ 4.2	25.7 $\pm$ 2.3	23.5 $\pm$ 1.1	50.9 $\pm$ 1.8	
Significance test: Non significant between all factors										
a): Sp. gr.: 1.004, Relative viscosity: about 1.03 b): Sp. gr.: 1.039, Relative viscosity: about 4.84										

有意な値を示すものが全体の半数に満たず、平均値は無方向の場合と比べて数 % の差でしかなく、しかも生死にかかわらず下流向き精子の方が上流向きより幾分多い傾向であった。

さて、希釈液の粘性を高めて重力による精子の回転ならびに沈降を妨げた場合、精子の方向性に影響を及ぼすものは精子の自主的な運動と毛細管内流体に存在する流速分布との相互作用が主要因となる。したがって管壁へ向かう精子は上流に、管心に向かう精子は下流に向けられ、管の円周に沿う方向に泳ぐ精子と流心部を泳ぐ精子には方向性が与えられないことになる。上述のように毛細管内のどの層をとってみても 3 方向はほぼ 3 分の 1 ずつであったことは、精子の自主的な運動方向が流れと関係がなく、全く偶然によるものであると考えなければ説明がつかない。無方向の場合に比し左右向きが少なくなったことは狭い毛細管内であるために流速分布の影響を受ける機会が多く、上流または下流へ方向づけられる精子が増加したことによると推定される。3 mm 管の場合の結果が、統計学的に有意な多少の片寄りがみられたとは言え方向性がない場合の 3 方向の比率と大差がなかったことがこれを裏づけている。すなわち家兎精子には走流性はないと考えざるを得ない。

ニワトリ精子

一括して Table 4 に示した。流した時間は、死滅精子は秒速 50μ 20 分、 25μ 40 分、 12.5μ 80 分、生存精子は 2 分である。装置 3 では装置が小さいので、上記死滅精子の項において流す距離（同時に時間）の差がほとんど認められなかったことから死滅精子も生存精子も秒速 50μ 2 分間とした。

毛細管を使用した場合死滅精子にも生存精子にも方向性が認められた。ところがその方向は縦方向ではなく横方向で 61% から 74% を占めた。下流向きに比し上流向きが多かったが、流速が小さいと上流向きが減じて下流向きが増す傾向を示し、ゼラチンを加えた区では両者の割合が逆転した。生存精子と死滅精子の間の差は統計学的には有意となったものの、その内容は生存精子で左右向きが多くその分だけ縦方向が減じたもので、上流下流両方向間の関係は死滅精子の場合と大差がなかった。

長方形管（装置 3）を使用した場合無方向を帰無仮説とする χ^2 検定の結果は一応有意となったが、内容的には大部分の χ^2 の値が小数点以下で方向性を示すという結論は引き出せなかった。上流向きと下流向きに関して分散分析を施した結果はすべての要因間で全く有意差を示さず、生存精子と死滅精子との間にも差がなかった。

すなわちいずれの装置を用いても生存精子は死滅精子と比べて格別異なった方向性を示さなかったのである。その原因は多分ニワトリ精子の遊泳速度がわずかに秒速 17μ という著しい不活発さにあると考えられる。

さて、これまでに述べて来た家兎ならびにニワトリの精液について観察した成績から考え、死滅精子については毛細管内の流体に認められる放物線状の流速分布と重力の影響に基づく精子の回転ならびに沈降との相互作用で方向性が与えられるという BRETHERTON & ROTH-SCHILD²⁾ 及び ROBERTS³⁾ の主張は、哺乳類の精子に関しては全く正当であると思われる。そして希釈液の粘性を高めることによって重力の影響は妨げられ、流速分布は依然として存在するにもかかわらず死滅精子はその方向性を著しく減じ、生存精子についてもまたその方向が上流または下流に偏向するという現象を認め難くなった。そこで我々は哺乳類の生存精子が毛細管内で示す走流性は実は重力と流速分布の影響によるものであるとする ROBERTS³⁾ の説を支持したい。BRETHERTON ら²⁾ は生存精子に正の走流性を現すための何らかの機構の内蔵を示唆しているけれども、彼ら自身の報告中で流れの方向を逆転しても精子は直ちに方向を転じるのではなく、初め下流の方向に泳いでいる精子がやがて下方に向かい底面付近で上流に方向を転じ、一部泳ぎ上る精子も上壁面付近で同様に上流に向く軌跡を図示しており、ROBERTS³⁾ の言うように流速分布の影響を受けていることが推察されるのである。ニワトリの精子についてはすでに三村⁹⁾ が YAMANE & ITO¹⁰⁾ の方法を用いて観察を繰り返し、継続的な遡上は認められなかったと報告している。ニワトリの精子はその紐状形態ならびに頭部と尾部の比重差が少ないと思われることから（前報）重力の影響が及び難く、特に希釈液の粘性を高めなくともその本来の方向性を示したものであろう。我々は少なくとも家兎とニワトリの精子には、そして多分ヒト及びウシの精子にも、本質的な走流性はないものと考えられる。

要 約

毛細管内を流れる際に死滅精子が示す方向性を希釈液の粘性を高めることにより阻止できるか否かを検討し、さらにこの希釈液を用いて生存精子の走流性を観察しようと試みた。実験動物は家兎とニワトリを用い、家兎精液には Tyrode 液、ニワトリ精液には Ringer 液を希釈液として使用した。粘性の付与はゼラチンを 5% 添加して行い、凍害防止の目的でグリセリンを 7% 配合した。装置は主に毛細管を使用した。比較の意味で家兎精液

には内径 3 mm の管、ニワトリ精液には深さ約 0.15 mm の長方形の管も用いた。ゼラチン添加液を使用した場合の精子の方向の観察は、ドライアイスアルコールを注いで凍結した後 4°C で解凍し、凝固状態のままで検鏡した。3 mm 管の場合は飽和食塩水で凍結した後内容物を氷冷 10% ホルマリン液で固定し、薄切して検鏡した。観察結果の概略は下記のとおりである。

1. 死滅家兎精子を Tyrode 液を用いて秒速 100 及び 50 μ で毛細管内に流すと、上流を向く精子はほぼ 50%、下流向きは 11~15% であったが、25 μ ではそれぞれ 16% 及び 43% となった。ゼラチン添加液では毛細管も 3 mm 管も共に上流、下流、左右向きそれぞれ 25, 25, 50% の割合に近づき、方向性が著しく妨げられた。

2. ゼラチン添加液を用い生存家兎精子を毛細管内に 100 μ /秒で流し、左右の側壁付近を 4 分の 1 ずつ除外して上、中、下層の精子の方向を観察したところ、いずれの層も上流、下流、左右向きがおのおの 3 分の 1 ずつとなった。3 mm 管の場合はそれぞれ 25, 25, 50% に近い割合となった。

3. ニワトリ精液をゼラチン無添加または添加 Ringer 液で希釈して毛細管内を秒速 50, 25, 12.5 μ で流すと左右向き精子が 60~70% を占め、縦方向に関しては流速により上流向きと下流向きの割合が逆となった。ゼラ

チン添加液を用いて長方形管内を流すと 3 方向おのおの 25, 25, 50% となった。精子の生死による差は少なく、長方形管では全く認められなかった。

以上の成績は家兎及びニワトリの精子には本来走流性が存在しないことを示すものと考察した。

稿を終るに当たりウシ精液の提供を受けた新潟県生乳販売連合協同組合、ならびに流体力学に関する御教示を戴いた新潟大学農学部農業工学科豊田勝助教授に深く感謝する。なお本報告の一部は昭和 50 年 4 月、日本畜産学会第 64 回大会（神戸）において発表した。

(1976. 9. 20 受付)

文 献

- 1) 河野(憲)・木野勢(芳)・樋浦(善)・山本(興): 本誌 23, 35, 1977.
- 2) BRETHERTON, F.P. & L. ROTHSCHILD: *Proc. Roy. Soc. B* 153, 490, 1961.
- 3) ROBERTS, A.M.: *Nature* 228, 375, 1970.
- 4) 西川(義): 家畜人工授精法, 養賢堂, 341, 151, 1944
- 5) 本間(仁): 標準水理学, 丸善, 73, 1970.
- 6) BRANHAM, J.M.: *J. Reprod. Fert.* 18, 97, 1969.
- 7) 星(冬): 繁殖学辞典, 文永堂, 91, 1968.
- 8) 三村(一): 三村一先生退官記念論文, 8, 1969.
- 9) YAMANE, J. & T. ITO: *Cytologia* 3, 188, 1932.

Summary

Experiments were carried out to arrest rheotaxis-like orientation of dead spermatozoa in fine tubes by increasing viscosity of the diluents, and then to observe the inherent rheotaxis of live spermatozoa by using these highly viscous diluents.

Semen was diluted either with Tyrode's solution (rabbit) or with Ringer's solution (cock). The viscosity of the diluents was increased by adding 5% gelatin, and 7% glycerol was supplemented to prevent the freezing damage. The fine tubes of $250\sim 350\mu$ in diameter were primarily used in this experiment. Tubes of 3 mm in diameter or rectangular cells about 0.15 mm depth were also used for the comparison when the semens were diluted with the highly viscous solutions. The stream of semen diluted with the highly viscous solution was stopped by pouring either dry ice-alcohol (fine tubes) or ice water saturated with NaCl (3 mm tubes). Then the former was defreezed at 4°C and the latter was sliced after fixing in cold 10% formalin before the observation of the directions of spermatozoa under microscope in the coagulated state.

Results obtained are summarized as follows:

1. When the rabbit semen diluted with the Tyrode's solution were allowed to flow in the fine tube at streaming velocity of $100\mu/\text{sec.}$ and $50\mu/\text{sec.}$, dead spermatozoa showed positive rheotaxis-like orientation but negative at $25\mu/\text{sec.}$ If the semen was diluted with the gelatin solution, the rates of spermatozoa pointing upstream, downstream and transverse direction approached to 25, 25 and 50% respectively in both fine tube and 3 mm tube.

2. The live spermatozoa of rabbits which were diluted in the gelatin solutin pointed upstream, downstream and transverse directions in a proportion of 1:1:1 respectively at the streaming velocity of $100\mu/\text{sec.}$ in the fine tube. This proportion was not different among upper, middle and bottom layers in the tube. In the 3 mm tube, their percentages approached to similar proportions as in the case of dead spermatozoa.

3. When the cock semens diluted with the Ringer's solution with or without gelatin were allowed to flow in the fine tubes at the streaming velocities of 50, 25 or $12.5\mu/\text{sec.}$, the proportions of spermatozoa toward transvers direction were 60~70% in all cases regardless of the conditions employed in this experiment, and the proportions of upstream ones and downstream ones changed by the streaming velocities. In the rectangular cell, these three directions were 25, 25 and 50% respectively. There were few differences between live and dead spermatozoa.

From these results it was suggested that there were no rheotaxis inherent in rabbit and cock spermatozoa.