

# 体外山羊精子の活力と代謝におよぼす麻酔剤の経時的影響

町 田 隆 彦\*・西 川 義 正\*\*

\* (農学部 畜産学研究室)

\*\* (京都大学農学部 家畜繁殖学研究室)

## Effects of Anesthetics on the Motility and Metabolism of Spermatozoa in the Process of Aging

Takahiko MACHIDA\*・Yosimasa NISHIKAWA\*\*

\* Laboratory of Zootechnical Science, Faculty of Agriculture

\*\* Laboratory of Animal Reproduction, Faculty of Agriculture Kyoto University

**Abstract** : An experiment was conducted to influence of anesthetics (Methyl-hexobarbital Na, Amo-barbital Na and Procaine HCl) on the motility, respiration and fructolysis with lapse of time of incubation goats spermatozoa at 5°C. Semen samples was collected in an artificial vagina from 3 goats. We use in our experiments the semen washed Ca free Krebs-ringers phosphate buffer (KRP). Each washed semen samples was then extended at the rate of 1 part semen to 9 part of the KRP with 1 mol. fructose diluter. After incubated for 0, 12, 24 hour at 5°C the semen was hermetically measurment  $Zo_2$ ,  $Z\dot{O}_2$ ,  $Z\dot{O}_2$ , and motility by Warburg methods. The results are summarized as follow : 1) An Ultra-short acting barbiturate anesthetic, Methyl-hexobarbital Na inhibited the respiration of spermatozoa at the levels 50-200 mg/dl, while glycolysis was promoted by Pasteur effect. After the removal of the drug, Pasteur effect disappeared and the motility of spermatozoa was recovered reversibly to the same level as that in control. Short-acting Amobarbital Na also inhibited respiration even more markedly than Methyl-hexobarbital Na, causing a rapid decrease in motility. At the level of 100 mg/dl, both metabolism and motility were recovered after washing, but not at 200 mg/dl. 2) Regional anesthetic, Procaine HCl promoted the metabolism of spermatozoa and raised their motility index at the level of 1,000 mg/dl and 25 mg/dl respectively. Their beneficial effect remained even after their removal. In the case of procain HCl especially, their glycolysis was extremely promoted, showing by far a greater value than that before washing.

### 緒 言

筆者らは家畜精子を体外で長期に保存する手段の1つとして、中枢、迷走、知覚神経などを遮断する働きのある麻酔剤を精子稀釈液に添加して、精子の代謝を抑制し細胞内の内蔵性 Energy の消耗を少なくして、精子の生存性を延長する方法を試み、2~3種の麻酔剤に効果があることを認めた。さらにこれら麻酔剤の中、Barbitur 酸系誘導体は精子の呼吸を著しく抑制し、その代償として解糖を促進するいわゆる Pastur 効果により活力を維持すること、また局所麻酔剤の Procaine HCl, Nupercaine は呼吸、解糖を促進し、精子の運動を著しく活発にして、生存性を助長する効果があることを認めた。<sup>(1)</sup> 今回は 4°C に保存した精子の Aging が進む過程において麻酔剤が代謝と活力にもたらす影響がどのように変化してゆくかについて経時的に調べた。

### 実 験 方 法

実験材料としてはザーネン種山羊 3 頭より人工膣法で採取した新鮮精液を 30°C の条件下で KRP を加えて1回洗滌したのち、下記の麻酔剤を各濃度に添加した KRP で10倍に稀釈して用いた。この稀釈精液を毎分 10°C の割合で 5°C まで冷却したのち、0, 12, 24 時間保存して、それぞれの保存時間における精子の代謝(呼吸および好氣的解糖)および活力を 38°C の Warburg 検圧計で2時間振盪して測定し、 $Zo_2$  ( $\mu\text{l}/10^8\text{cells/hr.}$ ),  $Z\dot{O}_2$  ( $\text{mg/dl}/10^8\text{cells/hr.}$ ), ならびに

$Z\bar{O}_2$  (mg/dl/ $10^8$  cells/hr.) を算出した。なお Warburg 計 振盪前後の Fructose は Roe 法<sup>(2)</sup>, 乳酸は Baker & Summerson 法<sup>(3)</sup> で比色定量し, 消費量と蓄積量を算出した。活力は  $38^\circ\text{C}$  の精子加温器上で鏡検し, 生存指数に換算した。本実験に供試した麻酔剤は次の通りである。

種 類	名 称	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	X
バルビツール酸系 誘 導 体	Amo-barbital Na	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	i-C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	H	O
	Methyl-Hexobarbital Na	CH <sub>3</sub>	n-C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	H	O
局 所 麻 酔 剤	Procaine HCl	NH <sub>2</sub> $\curvearrowright$ COOCH <sub>2</sub> ·CH <sub>2</sub> N (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>			

## 結 果 お よ び 考 察

### I. Barbitur 酸系誘導体

#### 1. Methyl-Hexobarbital Na

##### a. 保存直後の代謝

Methyl-Hexobarbital Na を添加した精子を  $5^\circ\text{C}$  に保存して経時的な代謝と活力について示したのが Table 1, Fig. 1 である。

Methyl-Hexobarbital Na の添加濃度が高くなるにつれて精子細胞の呼吸が抑制された。とくに 100 mg/dl の添加区は対照区と同程度の生存指数が維持されているにもかかわらず,  $Z\bar{O}_2$  値は  $\frac{1}{2}$  以下にまで低下した。200 mg/dl 以上の濃度になると振盪中に運動性, 生存性が阻害され,  $Z\bar{O}_2$  はさらに顕著な減少を来たした。

これらにひきかえ解糖量は 100 mg/dl の添加濃度まで呼吸抑制とは逆に Fructose 消費量, 乳酸蓄積量の両者ともに増加する傾向を示した。とくに 100 mg/dl 添加区が解糖量が最大となった。この点については先に筆者からの報告<sup>(1)</sup> で述べたように Barbitur 酸系誘導体を添加した精子細胞は呼吸が著しく抑制されるが, この呼吸抑制による Energy 損失の代償として解糖を促進して,

Table 1. Influence of Methyl-Hexobarbital Na on the motility, respiration and fructolysis with lapse of time of goat spermatozoa at  $4^\circ\text{C}$

Incubation time (hr.)	Concentration of barbiturate (mg/dl)	$Z\bar{O}_2$ ( $\mu\text{l}$ )	$-Z\bar{O}_2$ (mg/dl)	$+Z\bar{O}_2$ (mg/dl)	Motility	
					Initial	Final
0	0	17.7	7.02	5.15	75.0	70.0
	25	14.5	8.80	7.05	75.0	70.0
	50	12.4	10.28	8.05	75.0	70.0
	100	7.3	12.94	9.21	75.0	70.0
	200	4.1	8.11	10.08	65.6	28.3
12	0	9.0	5.11	1.23	50.0	40.0
	25	7.5	5.19	3.20	55.0	45.0
	50	5.8	11.88	4.80	48.1	10.2
	100	4.8	7.82	2.83	48.1	7.5
	200	4.0	4.15	1.60	1.3	1.0
24	0	8.2	4.76	0.38	40.0	30.0
	25	6.5	5.99	1.22	45.0	30.0
	50	5.1	6.82	0.95	30.0	1.3
	100	3.8	7.25	2.59	7.5	1.3
	200	3.1	0	0.09	1.3	1.0

正常な運動ならびに生存性を維持しようとする Pasteur 効果が発現した結果であろう。この Barbitur 酸系誘導体の Pasteur 効果について Greig<sup>(4)</sup> は Hexose-6-phosphate を生成するために, Hexokinase 反応で Glucose が ATP によって磷酸化されること, または 1, 3 Diphosphoglycerol aldehyde の DPN による酸化(脱水素)を阻害しないことを示しているように思われる。また低濃度の Barbitur 酸系誘導体は Succinate の酸化を阻害しないと報告している。200 mg/dl 以上の添加濃度では更に呼吸抑制が顕著なために, Pasteur 効果によって促進された解糖からの Energy では不足し, 運動性が低下し始めた。呼吸と Fructose 消費量が抑制を受け生存指数が低下した 200 mg/dl 区において, 乳酸蓄積量が依然として促進の傾向を示したのは, 極度の呼吸阻害が TCA Cycle の代謝回路の結果生ずる乳酸が再度 TCA 回路に入る過程が阻害されて, 見かけの蓄積量が多くなったのではあるまいか。この他高濃度区では pH, 滲透圧などにも影響を受け振盪後著しく生存性が低下した。とくに 5°C では緩慢な生存性の減退も 38°C の Warburg 検圧計の条件下では代謝が活発となるために阻害反応も強く働き, 精子細胞の老化が急激に進行し活力の低下が早くなった。

#### b. 保存12時間後の代謝

0~100 mg/dl 添加区の 5°C, 12時間保存後の活力は保存直後の 70~78% の低下にとどまったが, 呼吸量は $\frac{1}{2}$ 程度まで減少した。しかしながら濃度間の抑制割合は保存直後ほど顕著には認められなかった。これはこの Methyl-Hexobarbital Na が超短時間作用型であるため比較的短時間に分解されたためであろう。しかし12時間の保存で老化に進んだ精子は 50 mg/dl 以上の濃度では振盪後の活力が急激に劣化した。この保存時間においても Pasteur 効果が認められ, とくに Fructose 消費量は保存直後に近い数値を示した。200 mg/dl 区は Warburg 振盪前において鏡検ですでに殆どどの精子が運動性を停止していたが, 代謝は対照区(生存指数 50)と同程度の数値を示している。

#### c. 保存24時間後の代謝

50 mg/dl の濃度では Pasteur 効果としての解糖促進がみられるが, 呼吸抑制による Energy の損失が大きいために Warburg 振盪後において前進運動を呈する精子を僅かしか認めることができなかった。しかしこの 50~100 mg/dl 区の 1.3 という僅かな生存指数しか示さなかった精子も  $Zo_2$ ,  $Zo_2$  値は12時間保存後と同程度の数値となっているために, 決して死滅を意味するものでなく, 大部分の精子が運動を停止したものであろう。このことは生死染色によっても確かめられた。以上のことから保存初期においては呼吸抑制を解糖促進によって償ういわゆる Pasteur 効果によって維

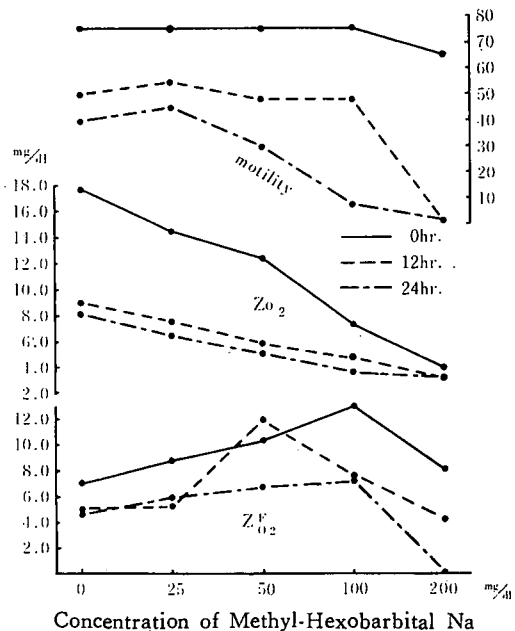


Fig. 1. Influence of Methyl-Hexobarbital Na on the motility, respiration and fructolysis with lapse of time of goat spermatozoa at 4°C.

持された Barbitur 酸系誘導体添加精子の活力も、老化に伴いその代謝能力が急激に低下するために Energy 不足をきたし、漸次生存指数が減退した。

## 2. Amo-barbital Na

### a. 保存直後の代謝

Table 2. Influence of Amo-Barbital Na on the motility, respiration and fructolysis with lapse of time of goat spermatozoa at 4°C

Incubation time (hr.)	Concentration of barbiturate (mg/dl)	Z <sub>O<sub>2</sub></sub> (μl)	-Z <sub>O<sub>2</sub></sub> <sup>F</sup> (mg/dl)	+Z <sub>O<sub>2</sub></sub> <sup>L</sup> (mg/dl)	Motility	
					Initial	Final
0	0	13.4	16.7	5.8	65.0	55.0
	25	6.3	16.8	5.7	65.0	55.0
	50	3.1	16.2	3.4	65.0	48.1
	75	2.3	4.3	1.4	56.9	34.4
	100	0.9	5.0	1.7	56.9	3.8
12	0	7.5	3.8	0.6	45.0	40.0
	25	3.3	3.1	1.2	50.0	35.0
	50	1.4	1.8	0.8	39.4	11.3
	75	0.7	1.1	0.3	25.0	2.5
	100	0.5	1.6	0.7	1.0	0
24	0	2.8	2.3	0.5	6.3	1.0
	25	2.7	1.1	0.4	1.9	1.0
	50	1.3	0.7	0.1	0	0
	75	1.9	1.0	0.2	0	0
	100	1.2	0.4	0.2	0	0

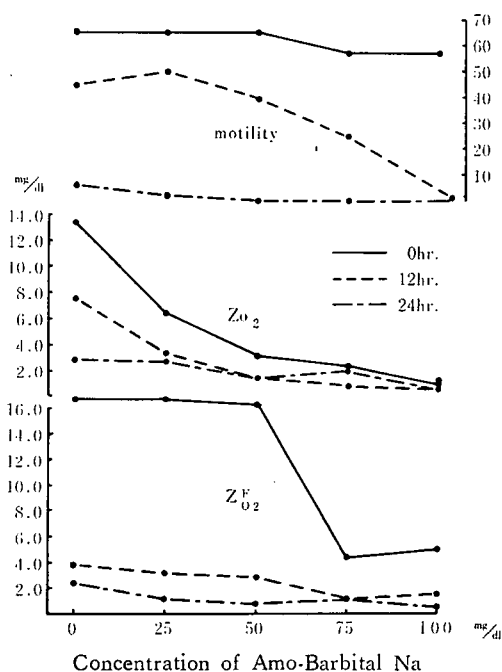


Fig. 2. Influence of Amo-Barbital Na on the motility, respiration and fructolysis with lapse of time of goat spermatozoa at 4°C.

Amo-barbital Na 添加保存精子の成績は Table 2, Fig. 2 の通りである。

前回の生存試験で精子の生存性を延長する効果が若干認められた前記 Methyl-Hexobarbital Na に対して、麻酔作用が長時間型で代謝抑制の働きも強く生存を阻害した Amo-barbital Na は、さらに呼吸抑制が顕著で 50 mg/dl の低濃度の添加でも呼吸量は対照区の 1/4 以下となり、また解糖も Methyl-Hexobarbital Na のような著しい Pasteur 効果が認められなかったために Energy が不足し、50 mg/dl 添加区では呼吸、解糖ともに著しい抑制を受け、振盪後の生存指数は 3.8 と急激に劣化した。

### b. 保存12時間後の代謝

基質を含まない KRP で稀釈した精子は 5°C で 12 時間も経つと Aging 進行が早くなり、対照区、試験区共に呼吸量は保存直後の 1/2 にまでに低下し、解糖量も 1/4 以下となった。このため作用時間のながい

Amobarbital Na を加えると Methyl-Hexobarbital Na よりもさらに強い阻害を受け、50 mg/dl 以上の添加区は  $Z_{O_2}$ ,  $Z_{O_2}^F$ ,  $Z_{O_2}^L$  が僅かな数値となり、生存性の低下が顕著に認められた。

### c. 保存24時間後の代謝

24時間保存した精子は老化のために殆んど運動精子が観察されず、これに伴い対照区、試験区とも問題となるほどの代謝が行われていなかった。

精子の代謝を抑制し、Energy の損耗を少くして生存性を延長する目的で用いた Barbitur 酸系誘導体の中、Methyl-Hexobarbital Na は呼吸抑制で制限された Energy 不足を Pasteur 効果によって補い、とくに 25 mg/dl 添加区は精子の老化を対照区よりも遅延させるような傾向を示したが、麻酔作用の強い Amo-burbital Na は代謝抑制が顕著であったために短時間で精子が死滅した。

## II. 局所麻酔剤 (Procaine HCl)

### a. 保存直後の代謝

前回の保存試験<sup>(4)</sup> で活力を賦活し、生存延長の効果が認められた Procaine HCl を添加した精子の経時的な代謝と活力の数値を示したのが Table 3, Fig. 3 である。

Procaine HCl は Barbitur 酸系誘導体とは異なり、精子細胞の呼吸、解糖を促進し、運動性を著しく活発にした。この代謝促進については Quastell<sup>(5)</sup> は Amine oxydase による酸化的脱 Amino 反応でできる Ammonia の阻害を Procaine HCl が不活性化して、ある Amine の有毒分解生成物の酸化的阻害作用を弱めるか、または起らなくさせると報告している。この呼吸、解糖の促進は精子の代謝能力を増強するために Procaine HCl を添加した試験区は振盪後の活力が対照区に比べ良好となっている。またこの Procaine HCl の特色は非常に薬害が少く、2000 mg/dl という高濃度の添加においても代謝および活力の低下は認められなかった。

Table 3. Influence of Procaine HCl on the motility, respiration and fructolysis with lapse of time of goat spermatozoa at 4°C

Incubation time (hr.)	Concentration of local anaesthesia (mg/dl)	$Z_{O_2}$ ( $\mu$ l)	$-Z_{O_2}^F$ (mg/dl)	$+Z_{O_2}^L$ (mg/dl)	Motility	
					Initial	Final
0	0	10.2	4.11	2.37	65.0	60.0
	250	12.4	4.25	2.49	70.0	65.0
	500	13.3	5.49	4.73	70.0	65.0
	1000	14.1	8.19	5.54	70.0	65.0
	2000	12.0	8.64	5.53	65.0	60.0
12	0	7.5	3.04	2.16	50.0	30.0
	250	11.4	7.02	3.45	60.0	40.0
	500	11.8	11.23	4.75	60.0	50.0
	1000	11.0	12.58	3.87	60.0	50.0
	2000	7.0	5.91	3.84	45.0	22.5
24	0	3.5	1.85	1.24	21.8	1.0
	250	6.1	11.45	4.10	40.0	30.0
	500	8.2	13.26	4.61	43.8	43.8
	1000	6.7	12.16	3.08	43.8	7.5
	2000	4.1	2.42	1.56	31.8	3.8

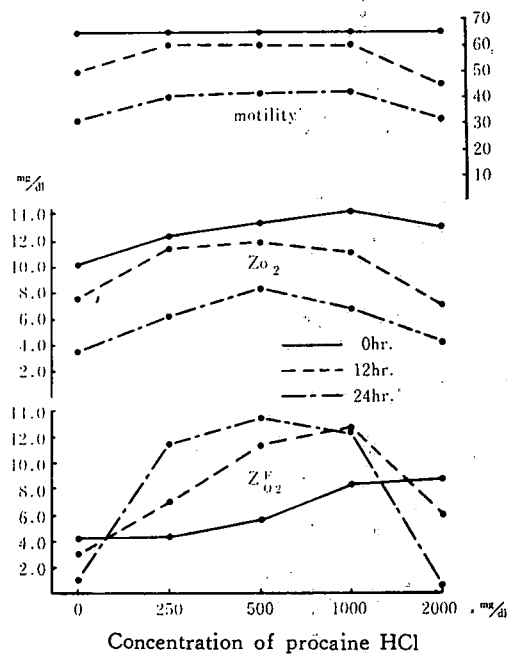


Fig. 3. Influence of Procaine HCl on the motility, respiration and fructolysis with lapse of time of goat spermatozoa at 4°C.

#### b. 保存12時間後の代謝

基質の少ない KRP 希釈液で 12 時間 incubate した精子においても呼吸，解糖の促進の傾向は持続された。とくに 250～1000 mg/dl 添加区の Fructose 消費量は保存直後の Procaine 添加精子の 2 倍近くに増加し，Warburg 振盪前後の活力は対照区よりも優れた成績を示した。この数値は統計的に有意な差であった。

#### c. 保存24時間後の代謝

細胞の老化が進んだ24時間保存精子においても代謝を促進する作用は依然として保持され，とくに解糖量が対照区に比較して増大した 250～500 mg/dl 添加区は著しく生存性が改善された。このように精子細胞に対する Procaine HCl の刺激はとくに糖の摂取能力を高める働きが盛になり，細胞に活力を賦与するよう考えられる。

### 要 約

5°C に保存した麻酔剤添加精子が Aging が進むにつれて代謝と活力の関係がどのように変化するのかについて調べ，2, 3 の知見を得た。

方法としては人工腔で採取した山羊精液を供試麻酔剤を添加した K.R.P. で10倍に希釈し，0, 12, 24時間 5°Cに保存して各保存時間における呼吸，解糖を Warburg 検圧計で調べた。

(1) Barbitur 酸系誘導体の中，超短時間作用型の Methyl-Hexobarbital Na は保存初期においては，呼吸抑制による Energy の損失を解糖促進で償う Pasteur 効果によって正常な活力を維持したが，Aging が進むにつれて解糖能が低下するために運動 Energy が不足し，麻酔剤の濃度が高くなると活力が急激に低下した。短時間作用型の Amo-barbital Na は呼吸抑制が顕著なために，

保存後の代謝および活力を強く阻害した。

(2) 局所麻酔剤の Procaine HCl は呼吸, 解糖を促進し, 活力を活発にする働きが認められた。とくに Aging の進んだ精子の解糖を著しく促進し, 優れた活力を長時間保持した。

## 文 献

- 1) 町田隆彦・竹林 隆・川島正彦・西川義正, 高知大学研究報告, 12, 自然Ⅱ, No. 8 (1963)
- 2) Roe, J. H., *J. Biol. Chem.*, 107: 15 (1934)
- 3) Barker, J. B. & Summerson, W. H., *Biol. Chem.*, 138: 535 (1941)
- 4) Greig, M. E., *J. Pharmacol.*, 87: 185 (1946)
- 5) Quastell, J. H. *Neurochem.*, 7: 153 (1955)

(昭和47年 9 月30日受理)

