

家兎の雌生殖器内における精子の老化が受精及び  
受精後の胚の生存性に及ぼす影響

町田隆彦・矢野一彦・青木晋平  
(農学部 畜産学研究室)

Influence of Aged Spermatozoa on the Fertilization and  
Viability of Fertilized Embryo in the Female Reproductive  
Tract

Takahiko MACHIDA, Kazuhiko YANO, Shimpei AOKI  
*Laboratory of Zootechnical Science, Faculty of Agriculture.*

**Abstract:** The aim of the present experiment was to investigate a decrease in the fertilizing capacity and increase in the embryonic mortality at pre- and post-implantation at aging of rabbit spermatozoa passed which has previously been subject to an incubation in the female reproductive organs of the doe.

Female rabbits were injected HCG because to certain of fertilization of the maturation follicles after 0, 10, 14, 18, 22 hours (Treatment of incubation time: 10, 20, 24, 28, 32 hours) which had been inseminated with rabbit spermatozoa. The oviduct and uterus of each female was flushed 48 hours after HCG injection. The number of live embryo was counted at 10 days of pregnancy and the number of litter size was counted at post-parturition.

The main effect of aging of spermatozoa in the female reproductive organs appeared to be on fertilization and to a lesser extent on the pre-implantation. The divided of fertilized ova, fetus size, birth weight sex ratio and gestation period were non correlation with aging rabbit spermatozoa.

雌の生殖器内に入った精子は、子宮及び卵管において受精能を獲得し、受精可能な状態となる。しかし、その後経時的に精子は老化し、その代謝能が低下するとともに、精子の受精能は減退していく。したがって、精子が良好な受精能を保持している間に、排卵された新鮮な卵子と遭遇し、受精させることが受胎率向上のための重要な課題となる。

そこで、本実験では、雌生殖器内で卵子に遭遇するまでの貯留された家兎精子の老化が、精子の受精能及び受精後の胚の生存性に、どのような影響を齎らすかについて検討した。

材料及び方法

精液は、成雄家兎4頭より人工膾法で採取し、直ちに活力を検鏡し、75卅～90卅の良好な精液のみを供試した。

受精試験及び受胎試験には、成雌家兎(体重2.25～3.88kg)を、各々30頭ずつ供試した。各々の雌家兎に、採取精液1mlをピペットで膾内注入し、直ちにHCG75iuを静注して排卵を誘起した。なお、排卵は、HCG注射後10時間で誘起されるものと見做し、HCG注射時間を調整することにより、雌生殖器内において、精子が卵子に遭遇するまでの貯留時間区として、10, 20, 24, 28, 32時間の5区を設けた(Fig. 1)。受精試験は、HCG注射後48～58時間に雌家兎を屠殺し、生殖器を摘出後、

卵管、子宮を灌流して卵子を回収した。実体顕微鏡下で、回収卵数、受精の割合、受精卵の分割程度を測定した。なお灌流液としては、生理食塩水と同種血清を5:1の割合で混合したものを使用した。受胎試験は、受精後10日目の雌家兔を、セラクター(バイエル)麻酔下で開腹し、着床胎児数及び中止胚数を観察するとともに、着床胎児の大きさ(長径×短径)を測定した。測定後、直ちに縫合、整腹して妊娠を継続させ、自然分娩に導き、産子数、産子の生時体重、性別及び妊娠期間を調べた。なお、受精率などの算出法は次の通りである。

$$\text{受精率} = \frac{\text{受精卵数}}{\text{回収卵総数} - \text{変成卵数}} \times 100, \quad \text{受精家兔率} = \frac{\text{受精家兔数}}{\text{供試家兔数}} \times 100$$

$$\text{受胎率} = \frac{\text{受胎家兔数}}{\text{供試家兔数}} \times 100, \quad \text{出生率} = \frac{\text{産子数}}{\text{着床胎児数}} \times 100, \quad \text{着床胎児の大きさ} = \text{長径} \times \text{短径}$$

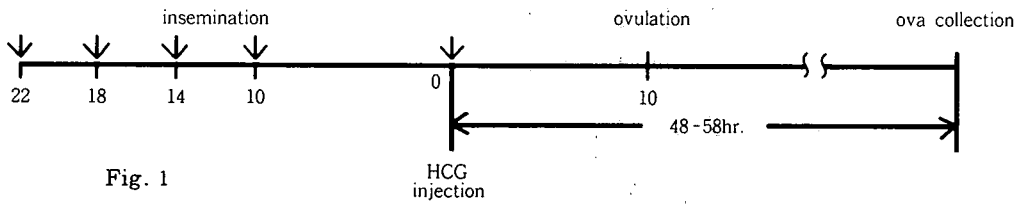


Fig. 1

Table 1. Effect of sperm aging on the fertilization in rabbit female reproductive tracts

Line	Identification	Treatment (sperm age in hours)					Total
		10	20	24	28	32	
1	No. of inseminated does	5	6	6	6	6	29
2	No. of ova	39	39	43	49	54	224
3	No. of fertilized ova	39	30	28	30	13	146
4	No. of ovulation points	54*	45	49	59	66	270
5	No. of does collected fertilized ova	5	5	5	4	4	23
6	$\frac{\text{No. of fertilized ova}}{\text{No. of ova}} \cdot 100$	100.0	76.9	65.1	61.2	24.1	—
7	$\frac{\text{No. of does collected fert. ova}}{\text{No. of inseminated does}} \cdot 100$	100.0	83.3	83.3	66.7	66.7	—
8	$\frac{\text{No. of fertilized ova}}{\text{No. of does collected fert. ova}}$	7.8	7.2	5.6	7.5	3.3	—
9	$\frac{\text{Total number of ova}^{**}}{\text{No. of ovulation points}} \cdot 100$	72.2	93.3	93.8	93.2	84.8	—
10	No. of denatured ova	0	3	3	6	2	14

54\* : value of 6 does

Total number of ova\*\* : No. of ova plus No. of denatured ova

結果及び考察

受精率は、精子の雌生殖器官内貯留時間の経過とともに(10,20,24,28,32時間), 100.0, 76.9, 65.1, 61.2, 24.1%と低下した。(Table 1. Line 6) 受精家兎率も、経時的に100.0, 83.3, 83.3, 66.7, 66.7%と漸減した。(Table 1. Line 7) このような精子老化による受精率の減退については、雌生殖器官内で先体反応を起こし、受精能を獲得した精子が、卵子と遭遇するまで長時間要した場合、先体内の受精酵素が消失したことに起因するのではないかと Tappel,<sup>1)</sup> Quinns<sup>2)</sup> は述べている。筆者ら<sup>3)</sup>も、生体外及び雌生殖器官内で長時間保存した老化精子において、アクロゾームの正常率が低下したことを観察している。さらに、Salisbury<sup>4)</sup> は、精子が老化するにつれて、そのDNAあるいはDNPが、量的よりもむしろ質的に変化を受け、遺伝情報の転移システムに損傷を引き起こさせるのかも知れないと報告している。本実験の32時間精子貯留区における受精率は24.1%であったが、筆者<sup>3)</sup>の前の実験の32時間区は5%であり、また、Tesh<sup>5)</sup> は0%であったと報告している。この受精率の差については本実験の注入精子数が、後2者の実験の約3倍 ( $2.92 \times 10^8 / ml$ ) であったため、受精部位の卵管膨大部への到達精子数の増加に起因することが考えられる。受精後10日目に開腹して調べ

Table 2. Effects of sperm aging on the conception in rabbit female reproductive tracts

Line	Identification	Treatment(sperm age in hours)					
		10	20	24	28	32	Total
1	No. of inseminated does	6	6	6	6	6	30
2	No. of conceived does	6	5	4	2	2	19
3	No. of fetus at 10 days	40	33	27	6	13	119
4	No. of mortality of fetus	2	0	1	0	0	3
5	No. of youngs	14	22	13	6	11	66
6	Size of fetus at 10 days.(Av. cm)	2.76	2.76	2.39	2.67	2.29	—
7	Gestation period(Av. days)	32.3	32.8	33.7	33.0	31.5	—
8	Weight of young(Av. g.)	49.1	50.6	48.6	79.5	48.2	—
9	sex(male : female)	3 : 2	3 : 3	7 : 4	0 : 6	5 : 5	18:20
10	$\frac{\text{No. of conceived does}}{\text{No. of inseminated does}} \cdot 100$	100.0	83.3	66.7	33.3	33.3	—
11	$\frac{\text{No. of youngs}}{\text{No. of fetus at 10 days}} \cdot 100$	35.0	66.7	48.1	100.0	84.6	—
12	$\frac{\text{No. of fetus at 10 days}}{\text{No. of conceived does}}$	6.7	6.6	6.8	3.0	6.5	—
13	$\frac{\text{No. of mortality of fetus}}{\text{No. of fetus at 10 days}} \cdot 100$	5.0	0.0	3.7	0.0	0.0	—

た受胎率は、雌生殖器内での精子貯留時間が長びくにつれて、100.0, 83.3, 66.7, 33.3, 33.3%と経時的に減退した。とくに、24時間以降の貯留区では、受精家兔率(100.0, 83.3, 83.3, 66.7, 66.7)に比べて減退割合が著しく、受精卵の着床阻害あるいは、着床胚の極く初期の死亡が生じたと思われる。(Table 2, Line 10) このような老化精子の初期胚の死亡については Koefoed-Johnsenら<sup>6)</sup> Maurer<sup>7)</sup>及び Tesh & Glover<sup>8)</sup>なども、家兎で同様の結果を報告している。しかしながら、着床後の胚の死亡は、10時間貯留区で1例(2個)、24時間貯留区で1例(1個)中止胚が観察されたに過ぎなかった。(Table 2, Line 4, 13) Teshら<sup>5)</sup> 町田ら<sup>3)</sup>は老化精子によって受精着床した胚は、着床後の中止胚が増加したと報告しているが、本実験ではこの傾向は認められず、28, 32時間の長時間貯留区においても高い出生率が得られた。(Table 2, Line 11) 開腹時(受精後10日目)の着床胎児の大きさは、10, 20時間区では2.76cm<sup>3</sup>であったのに対し、24, 28, 32時間区では、各々2.39, 2.67, 2.29cm<sup>3</sup>と少々小さくなった。(Table 2, Line 6) また、生時体重は、産子数に反比例して減少し、着床後の子宮の哺育能力に大きく支配を受けていることが示唆された。

### 要 約

雌生殖器内での精子の老化が、受精能、受精後の胚の生存性などにどのような影響を齎らすかについて検討した。

精液 1 ml を注入後、排卵を誘起するHCG注射の時間を調整して、雌生殖器内での精子の貯留時間区として、10, 20, 24, 28, 32時間の5区を設けた。受精試験は、HCG注射後、48~58時間後に卵子を回収し、受精の有無を検鏡した。また、受胎試験は、受精後、10日目に雌家兎を開腹し、胎児の着床状態を調べたのち、縫合整腹して妊娠を継続させ自然分娩に導いた。

受精率は、雌生殖器内で10, 20, 24, 28, 32時間と精子の老化が進行するにつれて100.0, 76.9, 65.1, 61.2, 24.1%と経時的に低下した。また、受精家兔率が、100.0%, 83.3, 83.3, 66.7, 66.7%と漸減したのに対し、受胎率は、100.0, 83.3, 66.7, 33.3, 33.3%となり、とくに24時間以降、胚の早期死亡が起こり、着床迄に至らなかった胚の割合が増加した。着床後の中止胚は2例観察されたに過ぎず、28, 32時間区においても100.0, 84.6%の高い出生率が得られた。受精卵の分割遅延、受精後10日目の着床胎児の大きさ、産子の生時体重、性比及び妊娠期間には、精子の老化による影響は認められなかった。

### 引 用 文 献

- 1) A. L. Tappel(1966) Effects of low temperature and freezing on enzymes and enzyme system In Cryobiology, pp. 163. Ed. H. T. Meryman Academic Press, New York.
- 2) P. J. Quinn; I. G. White & K. W. Cleland (1969) J. Reprod. Fert., 18 : 209.
- 3) 町田 隆, 矢野一彦, 青木晋平(1981)高知大学研報第30巻 農学
- 4) G. W. Salisbury(1968) Proc. VI th Congr. Anim. Reprod. Paris, 2 : 1189.
- 5) J. M. Tesh(1969) J. Reprod. Fert., 20 : 299.
- 6) H. H. Koefoed-Johnsen, A. Pavlok & J. Fulka(1971) J. Reprod. Fert., 26 : 351.
- 7) R. R. Maurer, R. H. Whitener & R. H. Foote(1969) Proc. Soc. exp. Biol. Med., 131 : 882.

(昭和 58 年 7 月 11 日受理)

(昭和 58 年 11 月 30 日発行)