

# 家兔の受精能に及ぼす精子老化の影響

町田 隆彦・矢野 一彦・青木 晋平

農学部 畜産学研究室

## The Influence of Ageing on the Fertilization of Rabbit *in vitro* Spermatozoa

Takahiko MACHIDA, Kazuhiko YANO and Shimpei AOKI

Laboratory of zootechnical Science, Faculty of Agriculture

**Abstract:** Ageing of spermatozoa *in vitro* causes a decrease in their fertilizing capacity and an increase in embryonic mortality.

The aim of the present experiment was to investigate the fertilizing capacity of rabbit spermatozoa aged *in vitro* by direct evaluation of ova, and pre- and post-implantation losses by examination of the aged spermatozoa *in vitro*.

Female rabbits were inseminated with spermatozoa which had either been freshly ejaculated or stored for 2-4 hr at 38°C. The oviduct of each female was flushed 48 hr after insemination and HCG injection. The number of live embryo at 14 days of pregnancy, and the number of litter size was counted at post-parturition. The semen samples were examined for sperm motility, morphology of acrosome cap, and quantitatively for their metabolism by Warburg method.

The main effect of ageing appeared to be on fertilization and to a lesser extent on post-implantation development. The glycolysis ratio was found to be decreased in the accumulation of lactic acid, especially. The abnormal morphology of acrosome was increased in ageing spermatozoa. Neither fertilization rate nor embryonic survival rate was significantly correlated with semen motility.

家畜の受精能力の減退、受精異常、受精卵の発育遅延、胚の死亡率の増加などに、受精時の性細胞の老化（加齢）が影響することが報告されている。とくに近年、家畜精子の凍結保存技術の進展に伴い、精子の長期保存が可能となったが、しかしその反面、長期保存精子の老化による受精障害が増加する可能性が考えられる。この老化精子による受精障害の機構については、まだ詳しく言及するに至っていない。また、従来この問題について報告されている研究の殆んどが、精子の老化の程度を体外ならびに体内での保存時間を目安として実験されているが、これは採取精液の質によって精子の老化の程度が一様でないで、老化の目安として妥当であるとは言えない。

そこで本実験では、家兔精子の老化に伴う精子の代謝能、形態ならびに受能能に対してどのような影響を齎らすかについて、精子の活力を目安として検討した。

### 実験材料および方法

供試した家兔精液は当研究室飼養の日本白色種成雄家兔5頭より人工膈法で採取した。採取した精液を、採取直後の精子活力70~95卍の新鮮精子区と、37°Cの温盪中で保存老化させ、活力を50卍まで低下させた老化精子区の2区に分け、精子の代謝能ならびに受精能について比較した。また精子の形態的な変化および受胎率を比較するための試験では、活力80~90卍の新鮮精子区、前述の方法で50卍~60卍まで活力を低下させた老化精子区I、さらに10+~30卍の老化精子区IIの3区を設けた。

### 1. 受精能の判定

新鮮精子区ならびに老化精子区の受精能の判定には成雌家兔（体重 2.0～3.5 kg）24頭を供試した。両区の精液 1 ml（精子数平均  $1.6 \times 10^8$ /ml）をピペットで膈内に注入後、直ちに HCG 50 iu（プベローゲン・三共）を静注するとともに、パイプカットした成雌家兔と同居させ排卵を誘起した。この家兔の生殖器を授精41～48時間後に屠殺摘出して、卵管および子宮を生理食塩水で灌流し、時計皿中に卵子を採取した。採取した卵は受精率および受精卵の分割程度を実体顕微鏡下で判定した。また卵巣ならびに子宮の所見を記録した。

### 2. 受胎試験

受胎試験には成雌家兔（体重 2.1～4.0 kg）41頭を供試した。前記3区の精液 1 ml を膈内注入後、HCG 75 iu 静注と同時にパイプカット成雌と一夜同居させた。授精後 14～15 日目に開腹し、胚の着床数、中止胚数などを観察した。観察後直ちに縫合し、妊娠を継続させ、分娩後の産子数を計数した。

### 3. 精子の代謝量測定

各区の原精液を 0.01 M フラクトースを添加した KRP で 2～3 倍希釈し、37°C のワールブルグ検圧計で  $O_2$  消費量を測定するとともに、糖消費量ならびに乳酸生成量を、Röe<sup>1)</sup> および Barker & Summerson 法<sup>2)</sup> で比色定量した。

### 4. 精子の形態的变化

スライドガラスに塗抹、乾燥した精子を Watson 液で染色し、アクロゾームの形態的变化を位相差顕微鏡ならびに走査型電子顕微鏡で観察した。

## 結果および考察

### 1. 家兔老化精子の受精率

新鮮精子授精区（70～85冊）および老化精子授精区（50冊）の受精成績は Fig. 1 に示す通りである。新鮮精子区の受精率は83.3%であったのに対し、老化精子区では15.1%と著しく低下した。また新鮮精子区では採取した受精卵のうち81.4%が8分割から桑実胚に发育していたが、老化精子区の受精卵は殆んどは（90.9%）第2極体放出直後の未分割卵であった。精子は老化するにつれ、その受精能が減退するとともに、受精時の精子侵入に多くの時間を費し、以後の卵の发育が遅延すると思われる。

Koefoed ら<sup>3)</sup> も 5°C で 24～28 時間保存した老化家兔精子において本実験と同様、受精能が著しく減退し、受精した卵においても着床前後の死亡率が増加したと報告している。また Maurer,<sup>4)</sup> Jesh & Glover<sup>5)</sup> らは、家兔精子の雌生殖器内での老化は、その受精能の減退、卵の分割の遅延および胚盤胞まで发育する割合が減少すると報告している。前述のように本実験の結果も同様の傾向を示した。

### 2. 家兔老化精子の受胎および分娩率

新鮮精子授精区（75～90冊）、老化精子授精区 I（50+～60冊）、同 II（10+～30冊）の受胎試験の結果は Fig. 2 に示す通りである。精子の老化が進行するにつれて、受胎率は43.8%（75～90冊区）、30.8%（50+～冊～60冊区）、25%（10+～冊～30冊）と低下した。また发育途中で中止した

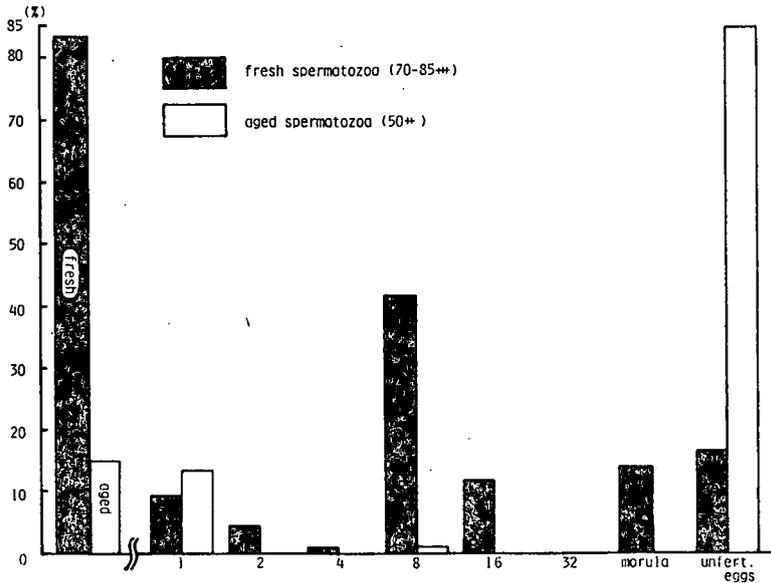


Fig. 1 Effects of ageing on the fertility of rabbit *in vitro* spermatozoa

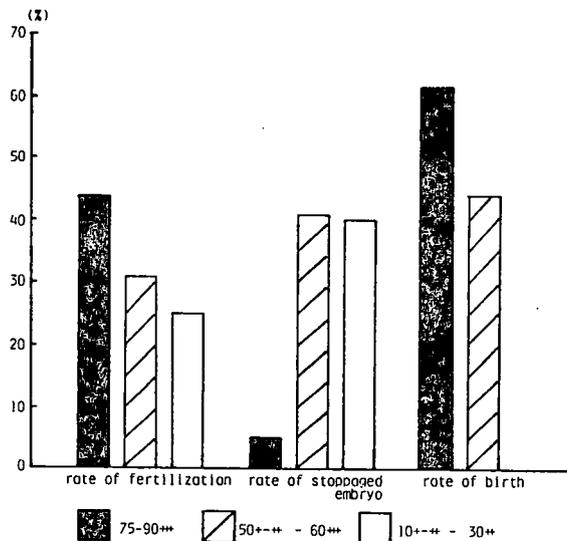


Fig. 2 Effects of age on the fertilization of rabbit *in vitro* spermatozoa

胚の割合は、新鮮精子区で4.9%であったのに対し、老化精子区Ⅰは40.7%、老化精子区Ⅱでは40.0%と急激に増加した。このように老化精子によって受精した卵は着床後の死亡率が増加した。出生率も新鮮精子区は63.5%、老化精子区45.2%と減少した。ただ出生率の場合、供試家兔を受精後14日目と21日目に開腹し着床胚、中止胚などを観察したが、その開腹刺激による流産が若干考えられる。以上の精子の老化による受精率、受胎率、出生率の減少ならびに中止胚の増加については幾つかの報告<sup>3,4,5,6,7,8,9,10,11)</sup>があるが、未だその要因の結論を見出すに至っていない。Salisburyら<sup>6,12)</sup>、Burfening & Ulberg<sup>13)</sup>は、老化した精子は頭部のDNAに変化を来たし、とくにSalisburyらはDNAが量よりも質的に変化を受け、遺伝情報の転移システムに損傷を引き

起すかも知れないと推論している。

### 3. 家兔老化精子の代謝

#### a, 呼 吸 量

老化精子の  $O_2$  消費量の測定結果は Fig. 3 の通りである。老化精子区の  $Zo_2$  値は、新鮮精子区の83%に減少した。

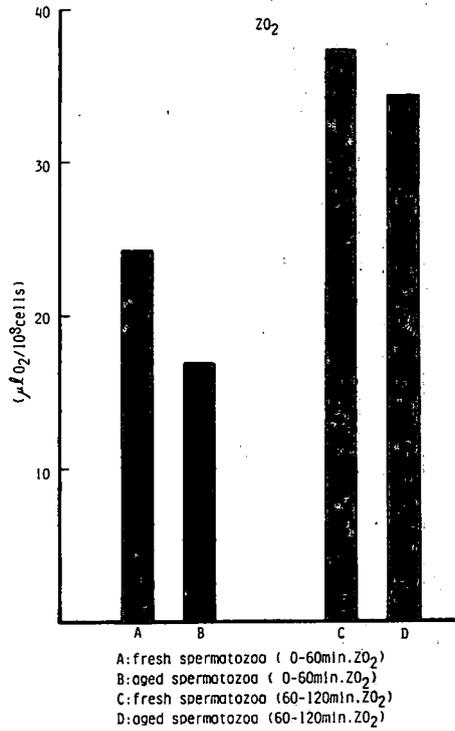


Fig. 3 Effects of ageing on the oxygen uptake of rabbit *in vitro* spermatozoa

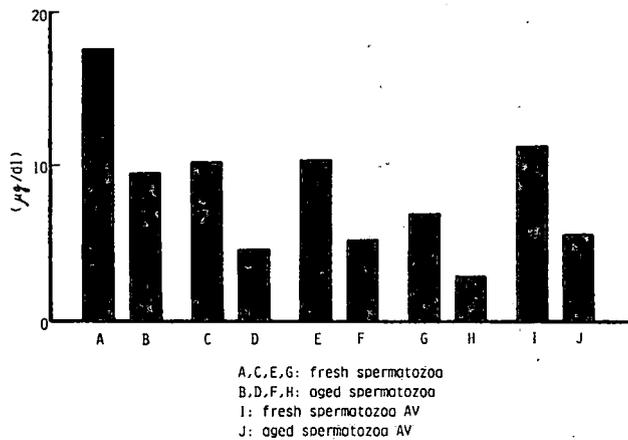


Fig. 4 Effects of ageing on the production of lactate of rabbit *in vitro* spermatozoa

## b, 乳酸生成量

精子の解糖を乳酸生成量で推測したが、その結果は Fig. 4 に示す通りである。老化精子区の乳酸生成量は、新鮮精子区の49.6%まで減少した。

一般に、哺乳動物の精子の第1義的運動エネルギー源は、解糖から得られているといわれているが、本実験の結果からも乳酸生成量即ち解糖能の減退が、精子の活力の低下ひいては老化につながった。

## 4. 老化精子の Acrosome の形態的变化

精子頭部の Acrosome の形態を観察した結果は Fig. 5 に示した。新鮮精子区の Acrosome の正常な割合は75.7%であったが、老化精子区 I は60.3%, 老化精子区 II では54.0%となり、老化が

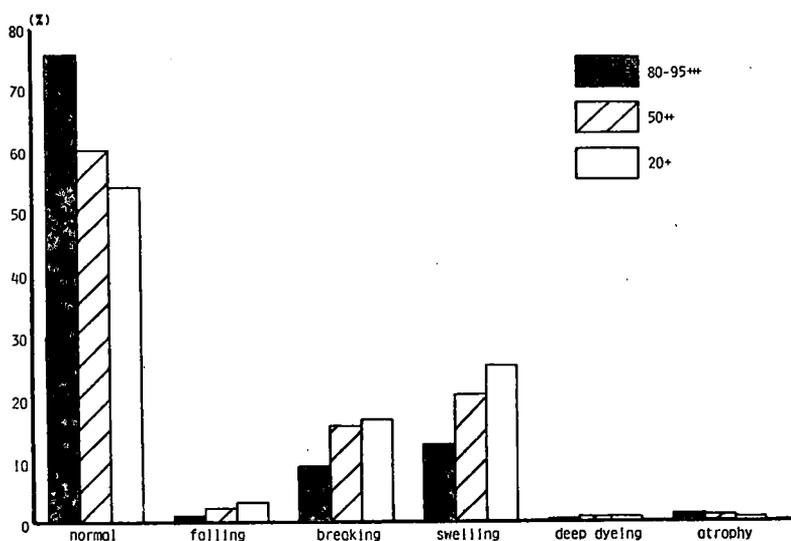


Fig. 5 Effects of ageing on the morphology of acrosome of rabbit *in vitro* spermatozoa

進行するにつれて欠損、崩壊、膨潤などの異常な Acrosome をもつものが増加した。このように老化精子の Acrosome 異常が増加したことは、受精過程において、老化精子の Acrosome からの受精酵素の早期離脱が起こり、受精能の減退、あるいは受精過程の遅延が生じたことが推察される。この老化精子の受精遅延については Roche<sup>14)</sup> らの同様の報告がある。

## 要 約

家畜の繁殖能力を減退させる要因の1つとして、受精に至るまでの性細胞の老化による影響が考えられる。そこで本実験は家兔精子を授精前に38°Cで保存して老化させ、それに伴う精子活力の減退が受精能におよぼす影響を調べるとともに、精子自身の代謝能および形態がどのように変化するかについて調べた。

1. 新鮮精子区(70~90日)の受精率は83.3%であったのに対し、老化精子区(50日)では15.1%まで低下した。また新鮮精子区から採取した受精卵の81.4%が8分割から桑実胚に发育していたのに対し、老化精子区の90.8%は末分割(第2極体放出卵)で卵の发育が著しく遅延した。

2. 着床卵の中止胚の割合は、新鮮精子区(75~90 $\mu$ )では4.9%であったが、老化精子区I(50+~60 $\mu$ )は40.7%、老化精子区II(10+~30 $\mu$ )では40.0%と増加した。
3. 老化精子のO<sub>2</sub>消費量は新鮮精子区の83.0%程度の減少であったが、乳酸生成量は49.6%まで減少した。
4. 精子のアクロゾームの正常な割合は、新鮮精子区, 75.7%, 老化精子区I, 60.3%, 老化精子区II, 54.0%と漸減した。

## 引用文献

- 1) Roe, J.H. (1934) *J. Biol. Chem.* 107, 15.
- 2) Barker, J.B. & Summerson, H.H. (1941) *J. Biol. Chem.* 138, 535.
- 3) Koefoed-Johnson, H.H., Ravlok, A. & Fulka, J. (1971) *J. Reprod. Fert.* 26, 351.
- 4) Maurer, R.R., Whitener, R.H. & Foote, R.H. (1969) *Proc. Roc. exp. Biol. Med.* 131, 882.
- 5) Tesh, J.M. & Glover, T.D. (1966) *J. Reprod. Fert.* 124, 14.
- 6) Salisbury, G.W. & Flerchinger, F.H. (1961) *Proc. IVth int. Congr. Anim. Reprod., The Hague* 3, 601.
- 7) Amoroso, E.C. & Parkes, A.S. (1947) *Proc. R. Soc. B*, 134, 57.
- 8) Dott, H.M., Ishida, K. & Chang, M.C. (1969) *J. Reprod. Fert.* 11, 485.
- 9) Edwards, R.G. (1957) *Proc. r. Soc. B*, 146, 469.
- 10) Rowson, L.E.A. & Dott, H.M. (1964) *Proc. V th int. Congr. Anim. Reprod., Trento.* 4, 552.
- 11) Bateman, A.J. (1960) *Genet. Res.* 1, 381.
- 12) Salisbury, G.W. (1968) *Proc. VI th Congr. Anim. Reprod. Paris*, 2, 1189.
- 13) Burfening, P.J. & Ulberg, L. C. (1968) *J. Reprod. Fert.* 15, 87.
- 14) Roche, J.F., Dziuk, P.J. & Lodge, J.R. (1968) *J. Reprod. Fert.* 11, 155.

(昭和56年8月5日受理)

(昭和56年10月5日発行)