

# 山羊の精巢精子ならびに精巢網液の採取

町田 隆彦・加藤征史郎\*・吉田 重雄\*\*

農学部畜産学研究室 \*京都大学農学部附属農場 \*\*京都府立大学農学部畜産学研究室

## Studies on Spermatozoa and Rete Testicular Fluid Collected Directly from the Testis the Conscious Goat

Takahiko MACHIDA, Seishiro KATÔ\*, Shigeo YOSHIDA\*\*

*Laboratory of Zootechnical Science, Faculty of Agriculture*

\* *University Farm, Faculty of Agriculture, Kyoto University*

\*\* *Laboratory of Zootechnical Science, Faculty of*

*Agriculture, Kyotofuritsu University*

**Abstract :** This experiment semmed directly from the development of a technique for implanting a catheter in to the rete testis of goat. This technique enable testicular spermatozoa to be collected in abundant numbers and under physiological conditions in the fluid which carries the spermatozoa out of testis. Cannulae were implanted in the rete testis two Sannen goats, 4 to 5 years old and weighting 60kg.

**Collection of rete testis fluid:** The fluid flowed from catheters in the rete testis of goats at a rate of 10.0 to 38.0 ml/day from an average sized of goat testis. The sperm concentration in these fluids ranged from 1.44 to  $1.28 \times 10^8$ /ml. when the catheter became blocked in two gats after 4 to 5 days in which fluid secretion and spem concetration was decreasing.

**Sperm motility :** The slight motility ( $5 \pm$  to  $10 \pm$ ) was seen in goat spermatozoa collected from a catheter in the rete testis.

**Amino acids :** Glutamine, glycine and alanine are present in higher concentration in rete testis than in seminal plasma.

**Total nitrogen :** The total nitregen of rete testis fluid a very much less than that of ejaculated seminal plasma, but this difference is largely due to the difference in protein concentration.

**Oxygen uptake :** The initial rate of respiration was present in testicular spermatozoa in similar rate to in ejaculated spermatozoa, but thereafter decreased progresively in ejaculate spermatozoa. Oxygen uptake of washed rete testicular spermatozoa was stimulated by the addition of rete testis fluid.

一般に哺乳動物の精子は精巢上体を通過する間に形態的、生理的に変化を受け成熟することが知られている<sup>(1)(2)(3)</sup>。この精子の成熟変化は精巢液および精巢上体液によるものであると Salisbury & Cragle<sup>(4)</sup>, Dawson, Mann & White<sup>(5)</sup>, Dawson & Rowlands<sup>(6)</sup>, Scott, Wallac & White<sup>(7)</sup>, Crabo & Gustafsson<sup>(8)</sup>, Crabo<sup>(9)</sup> らによって報告されている。また牛、羊の屠体から採取した精巢ならびに精巢上体精子の代謝については Redenz<sup>(10)</sup>, Henle & Zittle<sup>(11)</sup>, Lardy, Hansen & Phillips<sup>(12)</sup>, Wu, Mckenzie, Fang & Butts<sup>(13)</sup>, White & Wales<sup>(14)</sup> らによって調べられているが、屠体から採取した試料では精巢ならびに精巢上体液以外の組織液の混入が考えられるし、また量的にも十分でない。そこで Voglmayr, Waites & Sechell<sup>(15)(16)</sup> らは生体の羊精巢および精巢上体から精液をカテーテル法で採取して精子および分泌液の代謝と組成について検討している。また牛<sup>(17)(18)</sup> についても同様な報告がある。このカテーテル法で精巢より採取した精液を調べるとは精子形成過程の精子とその環境を知る手がかりとなる。しかし未だ解明されない点が多く、精子の成熟過程を詳しく論ずるに至っていない。とくに山羊についての報告は殆んど見当らな

い。そこで本実験では生体の山羊の精巣網精液をカテーテル法で採取し、精液の一般性状を検査するとともに精巣内精子の環境要因となる2, 3の組成について分析し、射出精液と比較してみた。

### 実験材料および方法

実験材料としては Sannen 種山羊の4才令、体重約 60 kg のもの2頭を用いた。精巣網精液は Voglmayr<sup>(16)</sup> らのカテーテル法に準じて採取した。すなわちイソゾール(武田)静注と、セラクター(バイエル)筋注の併用で全身麻酔した山羊の精巣を陰囊皮膚、総鞘膜、白膜の順に切開し、精巣ならびに精巣上体を裸出させた。次いで精巣上体頭部端を約 3~4 cm 程度精巣から剝離し、精巣輸出管を確認した。そこで先ず精巣輸出管の精巣上体接合部を結紮し、精巣精液が精巣上体管に下降するのを遮断した。そして精巣輸出管の1部を縦に切開し外径 0.9 mm, 内径 0.5 mm のポリエチレン・カテーテルを静かに挿入し、挿入口を縫合糸で固定した。(第1図)(写真1)

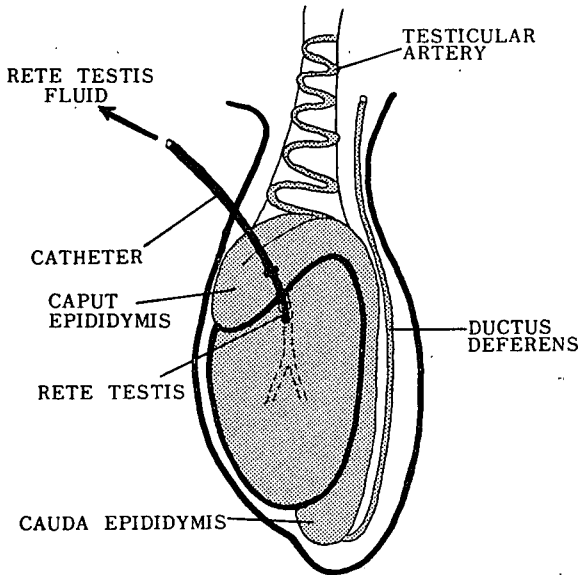


Fig. 1 Diagram of Sete of Rete Testis Catheter



Photo 1

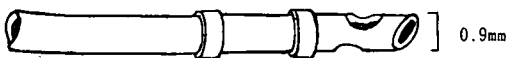


Fig. 2 Diagram of the catheter used for collecting testicular spermatozoa

なおポリエチレンカテーテルは第2図のように脱落防止のため2段の節を装置した。陰囊外部に取り出したカテーテル他端の途中にミニスバルポンプ(2.5 ml/hr)を装置し、氷冷した魔法ビン内の採取瓶

に誘導したが(写真2)、精巣網液の流出量とポンプ引圧が合致せず採取不能であった。したがって自然流出させて採取したが、低抗を少くするためカテーテルを20 cm 程度に短くし、上腿部の皮膚に縫合した袋内の試料瓶に接続して精巣網精液を貯留した(写真3)。

対照として用いた射出精液は残り片側の精巣から電気刺激法で採取した。

採取した精巣ならびに射出精液は一般性状を検査したのち、酸素消費量、遊離アミノ酸濃度、窒素量、還元糖量を測定した。なお酸素消費量は採取精液を KRP 液で2回洗滌したのち 37°C の



Photo 2



Photo 3

Warburg 検圧計で2時間酸素消費量を測定し、 $Zo_2$  を算出した。遊離アミノ酸分析は遠心分離した精漿にアセトン・アルコールを1:2の割合で加えて除蛋白したのち、10000 rpm で10分遠沈した上澄をロータリーエバポレーターで乾固して日立034型液体クロマト装置で自動分析した。また全窒素はマイクロキエルダール法、還元糖はFolin-Malmros法で定量した。

### 結果および考察

精巣網精液: 1, 2号山羊とも片側ずつ2度に亘って精巣からカテーテル法で精巣網液を採取したが、第1表のように1号は4~6日、2号の4月採取区は最も長く10日で精巣液の流出が停止した。なお2号の7月区は3日目にカテーテルが脱落し採取不能となった。実験終了時に精巣を剖見するとカテーテル挿入部に線維結合組織と脂肪の癒着がみとめられ、カテーテルの開口部が閉封していた(写真4)。本実験では挿入の容易なことから固いポリエチレンチューブを使用したが入部位の刺激が大きく癒着時期を早めたと考えられるので、今後の実験にはカテーテルの材質を十分に検討する必要がある。流出精巣網液の最大量は1



Photo 4

Table 1 Fluid Production and Spermatozoa Concentration in the Secretion Collected from the Testis of Goats

Goat No.	Date	vol/RTF/day (ml)	vol/RTF/hr. (ml)	Sperm conc. ( $10^8$ /ml)
1	4/23	13.0	0.54	1.44
	24	8.8	0.36	0.68
	25	5.3	0.26	0.76
	26	1.6	0.06	0.31
	6/ 6	10.0	0.42	
	7	10.5	0.44	
	8	10.0	0.42	
	9	3.0	0.12	
	10	4.2	0.18	
	11	few		
	2	4/23	22.5	0.94
24		10.0	0.42	1.21
25		11.0	0.46	0.64
26		12.0	0.50	1.03
27		6.3	0.26	0.56
28		Interruption		
29		8.6	0.35	0.38
30		2.7	0.11	
5/ 1		Interruption		
2		13.4	0.56	
7/18		38.4	1.60	1.28
19		17.3	0.72	1.16

RTF: Rete testicular fluid

号の4月区は13.0 ml/日, 0.54 ml/時, 6月区は10.5 ml/日, 0.44 ml/時で最大精子濃度は $1.44 \times 10^8$ /mlであった。また2号は4月区22.5 ml/日, 0.94 ml/時, 7月区38.4 ml/日, 1.6 ml/時,  $1.28 \times 10^8$ /mlで精液量に個体差が認められた。精巣網液量, 精子濃度とも経時的に減少する傾向が認められた。とくにカテーテル装着後3~4日目に急激に減少した。この精子の減少現象は Setchell<sup>(19)</sup>らも羊で認め、その原因としてはカテーテルを挿入した精上皮細胞から凝集性の多核細胞が出て、それがカテーテル内を狭窄するので精子数が減少すると論じている。Voglmayr<sup>(15)(16)</sup>らは羊においては40 ml/日, 1.5 ml/時, 0.5~1.0 ml/100g/時<sup>(16)</sup>, 牛は0.4 ml/100g/時<sup>(17)</sup>であったと報告しているが、本実験の山羊は羊より少く牛に近い値であった。なお本実験では実験終了時に摘出した山羊の精巣がかなり萎縮し(115g)正常重量より軽いと思われたので精巣重量当の分泌量として算出することができなかった。

精子活力: 精巣精子は一般に運動性を有していないといわれているが、本実験で供用した山羊の精巣精子は5~10±程度の運動精子が観察された。

精子形態: 採取した精巣精子の殆んどに細胞質滴が附着していたが(写真5), KRP液で数時間 incubate するとかなりの精子から消失していた。

遊離アミノ酸量: Gassner & Hopwood<sup>(20)(21)</sup>は牛の精漿中に存在するアミノ酸の主な生産源は精巣と精巣上体であると報告している。同様な結果を Lake & McIndoe<sup>(23)</sup>, Ahluwalia &

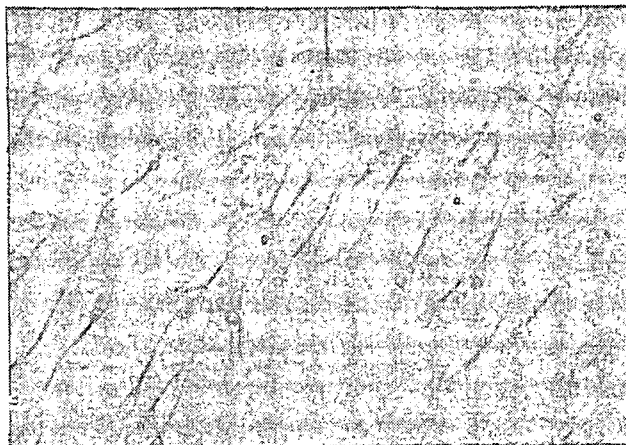


Photo 5 精巣精子

Graham<sup>(24)</sup> が鶏の精液で証明している。また Setchell<sup>(22)</sup> らは羊の精巣網液中のグリシン, アラニン, アスパラギン酸, グルタミン酸とくにグルタミン酸が精巣リンパ液, 血清, 副生殖腺液に比べて多く, これらアミノ酸の殆んどは精細管でグルコースから合成されると述べている。また精巣網液中にとくに多いグルタミン酸は精子の重要なエネルギー源となっているとは考えられないが, このグルタミン酸が精子の成熟に関係しているのではないか, さらにアスパラギン酸, グリシン, グルタミン酸は精細管内の核酸とくにプリン塩基, ピリミジン塩基の合成に関与しているであろう考察している。また Voglmayr<sup>(16)</sup> らは精巣精子にも僅かながらアミノ酸合成能力を有するが精巣上体を通過する間にその能力が消失すると報告している。本実験でも山羊精巣液中の遊離アミノ酸の構

Table 2 Free Amino Acids in Rete Testicular Fluid and Seminal Plasma of the Conscious Goats

Fluid	RTF			SP	
	No. 1	No. 2		No. 1	No. 2
Goats					
Samp. time	24 hr.	24 hr.	2 hr.	0.5 hr.	0.5 hr.
(A. A.)	(μmoles/ml)				
Asp	0.24	0.30	0.50	0.54	0.12
Thr	0.28	0.49	0.46	0.63	0.47
Ser	trace	—	—	0.18	0.16
Glu	1.18	2.57	3.86	1.63	1.17
Gly	0.85	1.02	0.97	0.61	0.31
Ala	0.46	0.49	0.54	0.36	0.27
Val	trace	0.03	0.04	0.06	0.08
Met	trace	—	—	0.04	0.03
Ile	trace	trace	trace	0.04	trace
Leu	trace	trace	0.02	trace	trace
Tyr	trace	trace	trace	—	—
Phe	trace	trace	trace	trace	trace
Lys	trace	trace	0.02	trace	0.06
His	trace	trace	trace	trace	trace
Arg	trace	traee	0.05	trace	trace

RTF: Rete testicular fluid  
S P: Seminal plasma

成と濃度を測定し、射出精液の精漿中の濃度と比較検討した。その成績は第2表に示す通りである。精巢網液、射出精液の15アミノ酸の中、アスパラギン酸、スレオニン、グルタミン酸、グリシン、アラニンが多く存在した。また1、2号山羊とも精巢網液中のグルタミン酸、グリシン、アラニンが射出精液に比べて高い濃度を示した。とくに2号山羊の2時間毎に分離採取した精巢液中のグルタミン酸が最も高い値となり、射出精液の3倍強であった。この2時間採取区に比べて24時間貯留採取区が低い濃度を示したことはその間精子によってグルタミン酸が消費されたと考えられる。この精子のグルタミン酸代謝については Filipse<sup>(25)(26)</sup> らはトランスアミナーゼとグルタミン酸脱水素が重要な役割をもち、 $\alpha$ -ケトグルタル酸が中間代謝物であると報告している。このように精巢精液中のグルタミン酸が血漿、精巢リンパ、副生殖腺液中よりも高濃度に維持されているのは Crabo<sup>(27)</sup> によると精細管壁の選択的透過性によるものであると考察している。

全窒素濃度： Setchell<sup>(28)</sup>、Johnson<sup>(29)</sup> らは羊の精巢液中の全窒素および蛋白質は血清、精巢リンパに比べて著しく少く、なかでも r-globulin が少いと報告しているが、本実験の山羊精巢液中の全窒素濃度は射出精液の1/10以下であった(第3表)。この濃度差は両者の蛋白含量の差によるものである。

Table 3 Total Nitrogen in Rete Testicular Fluid and Seminal Plasma of the Concious Goats

RTF	SP
(Mg/Dl)	
63.7	780.2

RTF: Rete testicular fluid  
SP: Seminal plasma

Table 4 The Oxygen Uptake of Washed Testicular and Ejaculated Goat Spermatozoa from the Same Goat

	Testicular spermatozoa		Ejaculated spermatozoa
	Washed+RTF		washed
Oxygen uptake ( $\mu\text{l}/10^8$ cells/hr.)	11.4	14.7	15.4
Mot.	Initial	10 $\pm$ 10 $\pm$	75 $\pm$
	Final	5 $\pm$ 10 $\pm$	70 $\pm$

酸素消費量： KRP液で2回洗滌した精巢精子の内因性呼吸量は射出精子に近い  $Zo_2$  値 ( $\mu\text{l}/10^8$  sperm/hr) を示した(第4表)。射出精子の活力が75 $\pm$ に対して精巢精子が僅か10 $\pm$ と著しく運動精子が少なかったにもかかわらず  $Zo_2$  が射出精子に大差ない  $Zo_2$  値を示したことは興味ある問題である。運動性が低い精巢精子がこのようにかなりの内因性基質の消費能力を有していることは精子成熟あるいは精巢上体内での長期生存に必要な要因となっているかもしれない。また両者の酸素消費の経時的パターンは射出精子は最初の1時間の  $Zo_2$  値に対して2時間値が低下し下降曲線のカーブを示したが、精巢精子は振盪2時間を通して直線的に  $Zo_2$  値が増加した。洗滌した無基質の精巢精子に精巢分泌液を添加すると酸素消費量は増大し、ワールブルグ2時間振盪後の活力も若干良くなるように思われた。この精巢分泌液の呼吸促進効果については Voglmayr<sup>(30)</sup> らも羊、牛について同様な報告をしている。

## 要 約

山羊の精巢網精液をカテーテル法で採取し、一般性状検査と2、3の組成について分析し射出精液との比較を行った。

(1) 精巢精液の採取は裸出した精巢の精巢上体頭端部を3~4cm 剝離し、外径0.9mm、内径0.5mmのポリエチレンチューブを精巢輸尿管部に挿入固定し、外側に取り出した約20cmのポリエチレンチューブを上腿部に縫合下垂させた試料瓶に誘導し2、24時間毎に精巢網液を自然流下

させ採取した。

(2) 精巣網精液の最大日量は1号山羊が13.0 ml, 2号山羊は38.4 mlで個体差が認められた。まだ精子濃度は1.44, 1.28であった。カテーテル挿入部の癒着がみられ、術後3, 4日で精液量, 精子濃度ともに激減し、数日で停止した。

(3) 採取した精巣精子の殆んどに細質滴が附着していた。

(4) 精巣網液中の遊離アミノ酸はグルタミン酸, グリシン, アラニンが射出精液中よりも多くとくにグルタミン酸が高濃度に存在した。

(5) 全窒素は射出精液の1/10以下程度しか精巣液には含まれていなかった。

(6) 洗滌精巣精子の酸素消費量は運動精子が著しく少いにもかかわらず、射出精子に近い $Zo_2$ 値を示した。また無基質の精巣精子に精巣液を添加することにより酸素消費量は増加した。

### 参 考 文 献

- (1) Bishop, M. W. H. & Walton (1960) *Marshalls Physiology of Reproduction*. 3rd edn, 1, 94.
- (2) Bishop, D. W. (1961) *Sex and Internal Secretion*. 3rd edn, 2, 707.
- (3) Mann, T. (1964) *The Biochemistry of Semen and of the Reproduct Tract*.
- (4) Salisbury, G. W. & Cragle, G. (1956) *Anim. Reprod.* 1, 25.
- (5) Dawson, R. W. C., Mann, T. & White, I. G. (1957) *Biochem. J.* 65, 627.
- (6) Dawson, R. W. C. & Rowlands, I. W. (1959) *Physiol.* 44, 26.
- (7) Scott, T. W., Wales, R. C., Wallace, J. C. & White, I. G. (1963) *J. Reprod. Fert.* 6, 49
- (8) Carbo, B. & Gustafsson, B. (1964) *J. Reprod. Fert.* 7, 23.
- (9) Carbo, B. (1964) *Acta Vet. & Scand.* 6, Suppl. 5.
- (10) Redenz, B. (1933) *Biochem.* 257, 234.
- (11) Henle, G. & Zittle, C. A. (1942) *Am. J. Physiol* 136, 70
- (12) Lardy, H. A., Hansen, R. G. & Phillips, P. H. (1945) *Archs Biochem.* 6, 41.
- (13) Wu, S. H., McKenzie, F. F., Fang, S. C. & Butts, J. S. (1959) *J. Dairy Sci.* 42, 110.
- (14) White, I. G. & Wales, R. G. (1961) *J. Reprod. Fert.* 2, 225.
- (15) Voglmayr, J. K., Waites, G. M. & Setchell, B. P. (1966) *Nature* 210, 861.
- (16) Voglmayr, J. K., Scott, T. W., Setchell, B. P. & Waites, G. M. H. (1967) *J. Reprod. Fert.* 14, 87.
- (17) Voglmayr, J. K., Larsen, L. H. & White, I. G. (1970) *J. Reprod. Fert.* 21, 449.
- (18) Voglmayr, J. K., Kavanaugh, J. F., Grial, L. C. & Amann, R. P. (1972) *T. Reprod. Fert.* 31, 291.
- (19) Setchell, B. P., Voglmayr, J. K. & Hinks, N. T. (1971) *J. Reprod. Fert.* 24, 81.
- (20) Gassner, F. X. & Hopwood, M. L. (1952) *Proc. Soc. Exp. Biol.* 81, 37.
- (21) Hopwood, M. L. & Gassner, F. X. (1962) *Fertil. Steril.* 13, 290.
- (22) Setchell, B. P., Hinks, N. T., Voglmayr, J. K. & Scott, T. W. (1967) *Biochem. J.* 105, 1061.
- (23) Lake, P. E. & McIndoe, W. M. (1950) *Biochem. J.* 71, 303.
- (24) Ahluwalia, B. S. & Graham, E. F. (1966) *J. Reprod. Fert.* 12, 363.
- (25) Flips, R. J. & Dietz, R. W. (1969) *J. Dairy Sci.* 52, 113.
- (26) Flips, R. J., Sexton, T. J. & Dietz, R. W. (1969) *Dairy Sci.* 52, 386.
- (27) Crabo, B. (1965) *Acta vet. Scand.* 6, Suppl. 5.
- (28) Setchell, B. P. (1967) *J. Physiol.* 189, 63.
- (29) Johnson, M. H. & Setchell, B. P. (1968) *J. Reprod. Fert.* 17, 403.
- (30) Voglmayr, J. K., Waites, G. M. H. & Setchell, B. P. (1966) *Nature.* 210, 861.

(昭和54年9月25日受理)

(昭和55年2月21日発行)

