

牛凍結精液の生産性向上

(3) 精子運動解析装置を用いた精子の運動性評価の検討

棚原武毅 真喜志修 運天和彦 千葉好夫

I 要 約

牛凍結精液の生産性向上を図る目的で、精子数および精子の運動性に及ぼす精液性状検査用分析チャンバの影響について調査(試験I)し、顕微鏡的検査による精子生存指数と精子運動解析装置を用いた精子の運動性の相関関係について調査(試験II)した結果は以下のとおりであった。

試験Iではうなり交差周波数において深さ20 μ mの精液性状検査用分析チャンバB20 μ の値が有意に高かったが、他の運動性においては精液性状検査用分析チャンバ間に差は認められなかった。

試験IIでは採取時、凍結前、凍結融解後における精子生存指数と精子運動解析装置を用いて測定した運動精子率、経路速度、進行速度、トラック速度、高速との間に高い相関が認められた。また、精子生存指数と特に高い相関を示した運動精子率、高速について一次回帰を求めた結果、精子運動解析装置を用いた凍結融解後の検査基準を運動精子率が44.1程度、高速が39.3程度を目安に凍結精液の生産を行うことができると考えられた。

II 緒 言

高品質な凍結精液を供給することを目的として、これまで当場で顕微鏡的検査手法¹⁾を用いた精子の運動性の検査を行ってきた。しかしながら、顕微鏡的検査手法では作業に熟練を要することや、精子の詳細な運動性については把握できないこともある。これまで精液性状と受胎性の関係では、前進精子率²⁾、精子生存性および活力³⁾に関連性を示す報告があるが研究者によって一致していない^{2,4)}。しかし、精液ごとの精子の運動性を正確に把握することは凍結精液生産において重要である。

そこで本試験では、より高品質な凍結精液の供給を目的とし、精子運動解析装置を用いた精子の運動性について検討したので報告する。

III 材料および方法

1. 供試精液

試験Iは当場で製造した黒毛和種雄牛10頭の凍結精液を用い、試験IIでは当場に繋養している黒毛和種雄牛19頭から採取した精液を使用した。

2. 精液性状検査用分析チャンバ

試験Iの精液性状検査用分析チャンバにはA社製の深さ10 μ m (A10 μ) および深さ20 μ m (A20 μ) とB社製の深さ20 μ m (B20 μ) を用い、試験IIはA20 μ を使用した。なお、A社製は継続使用でき、B社製は使い捨て用である。

3. 使用機器

顕微鏡的検査にはオリンパス社製BX40顕微鏡を使用した。精子運動解析装置はHamilton Thorne Research社製のHTM-CEROS-VERSION12を使用した。

4. 試験方法

1) 試験I

各種精液性状検査用分析チャンバを用いて測定した精子数および精子の運動性を比較した。精液は凍結精液を38 $^{\circ}$ Cの温湯で融解し、ストロー中の精液0.5mlとクエン酸糖液1.5mlを混合したものを1回洗浄した後、上澄み1.9mlを取り除き、培養液(mTCM)0.9mlと混合したものをを用いた。

2) 試験II

採取時、凍結前、凍結融解後の精子生存指数⁵⁾と精子運動解析装置を用いた精子の運動性との比較を

行なった。精子生存指数は常法⁶⁾に従い顕微鏡的検査により求め、採取時は原精液を用い、凍結前および凍結融解後は原精液をグリセリン入り卵黄クエン酸糖液にて希釈し作成した精液を用いた。精子運動解析装置を用いた精子の運動性の測定には、採取時は原精液0.1mlとRinger-Sperm液0.9ml⁷⁾を混合したものから0.1mlを取り、mTCM1.9mlと混合して最終的に200倍に希釈したものを用いた。また、凍結前の精液は常温に戻した後、試験Iと同様に処理し、凍結融解後の精液は試験Iと同様に処理したものを用いた。

5. 調査項目

1) 試験I

精子数、運動精子率、経路速度、進行速度、トラック速度、側生頭部転位幅、うなり交差周波数および直線度を測定した。

なお、図1に測定項目の模式図を示した。

2) 試験II

精子生存指数、運動精子率、経路速度、進行速度、トラック速度、高速（経路速度 $>30\mu/\text{sec}$ ）を測定し、精子生存指数とそれぞれの調査項目との相関を求めた。

また、精子生存指数と運動精子率および高速との関係から採取時、凍結前および凍結融解後の一次回帰式を求め、その一次回帰式と当場の凍結精液融解後の精液検査基準である精子生存指数40から、精子運動解析装置を用いた運動精子率および高速の精液検査基準を算定した。

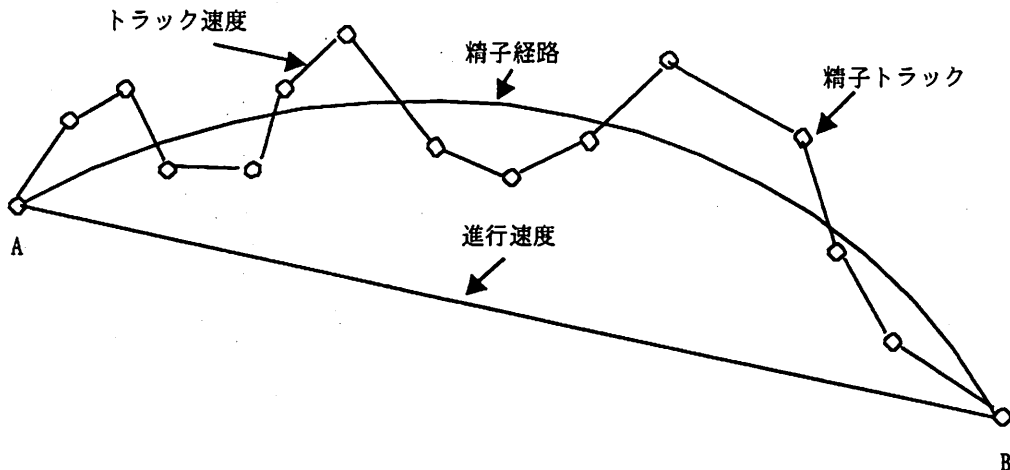


図1 測定項目の模式図

注1) 経路速度は精子経路ABを経過時間で除した値。

2) 進行速度は直線ABを経過時間で除した値。

3) 直線度は進行速度を経路速度で除した値。

4) 側生頭部転位幅は精子経路と精子トラック間の最大距離を2倍した幅。

5) うなり交差周波数は精子トラックが精子経路の左右いずれかの方向に横切る頻度。

IV 結果および考察

1. 試験I

試験Iにおける精子数および精子の運動性に及ぼす精液性状検査用分析チャンバの影響を表1に示した。うなり交差周波数において $B20\mu$ の値が有意に高く、 $A10\mu$ および $A20\mu$ は低い値を示した。精子数および他の運動性においては精液性状検査用分析チャンバ間に有意な差は認められなかった。

表1 精子数および精子の運動性に及ぼす精液性状検査用分析チャンバの影響 n=30

項目	CON (10 ⁶ /ml)	MOT (%)	VAP (μm/sec)	VSL (μm/sec)	VCL (μm/sec)	ALH (μm)	BCF (Hz)	STR (%)
A10μ	18.7±5.6	59.2±12.6	106.5±11.5	86.1±7.4	182.9±28.0	7.4±0.9	23.9±3.4'	82.3±4.7
A20μ	17.9±5.6	59.0±10.9	109.4± 9.7	86.3±4.8	187.8±29.6	7.7±1.1	22.7±3.0'	80.1±5.0
B20μ	18.6±5.6	60.7±12.7	107.8±11.2	88.3±8.4	184.8±29.7	7.1±1.1	27.0±3.0'	82.3±3.4

注1)CON（精子数），MOT（運動精子率），VAP（経路速度），VSL（進行速度），VCL（トラック速度），ALH（側生頭部転位幅），BCF（うなり交差周波数），STR（直線度）

2)異符号間に5%水準で有意差あり。

2. 試験II

顕微鏡的検査による精子生存指数と精子運動解析装置を用いた精子の運動性の関係を表2に示した。採取時、凍結前、凍結融解後において精子生存指数と精子運動解析装置を用いて測定した運動精子率、経路速度、進行速度、高速との間に高い相関が認められた。トラック速度は採取時、凍結融解後において相関が高かった。採取時の運動精子率、進行速度および高速の相関が凍結前および凍結融解後と比較して低いのは採取時に用いた精液が原精液で濃度が高いため、誤差が大きかったと考えられる。

表2 精子生存指数と精子運動解析装置を用いた精子の運動性との関係（相関係数）n=28

項目	MOT	VAP	VSL	VCL	Rapid
採取時	0.648**	0.627**	0.559**	0.566**	0.708**
凍結前	0.849**	0.509**	0.620**	0.431*	0.855**
凍結融解後	0.954**	0.696**	0.734**	0.661**	0.946**

注1) MOT（運動精子率），VAP（経路速度），VSL（進行速度），VCL（トラック速度），Rapid（高速）

2) ** P<0.01, * P<0.05

採取時、凍結前および凍結融解後の精子生存指数と精子運動解析装置を用いた各種精子の運動性を比較し、精子生存指数と特に相関の高かった運動精子率および高速について一次回帰式を表3に示した。また、その一次回帰式と当場の凍結融解後の検査基準である精子生存指数40から、精子運動解析装置を用いた運動精子率、高速の検査基準を表4に示した。凍結融解後の一次回帰式より、運動精子率および高速の検査基準は44.1および39.3となった。

表3 MOTおよびRapidに対する精子生存指数の一次回帰式

項目	MOT		Rapid	
	回帰式	標準誤差	回帰式	標準誤差
採取時	y=0.769x+19.372	7.54	y=0.831x+17.608	6.99
凍結前	y=0.846x+11.238	6.05	y=0.761x+20.282	5.93
凍結融解後	y=0.993x- 3.790	5.30	y=1.021x- 0.146	5.71

注1)MOT（運動精子率），Rapid（高速）

2)yは精子生存指数，xは運動精子率および高速。

表4 精子運動解析装置を用いた検査基準

項目	MOT	Rapid
検査基準	44.1	39.3

注)MOT（運動精子率），Rapid（高速）

以上実験 I, II の結果より, 採取時の精子数と採取時, 凍結前および凍結融解後の精子生存指数を精子運動解析装置および精液性状検査用分析チャンバA10 μ , A20 μ , B20 μ のいずれを用いても求めることができ, 凍結融解後の運動性の回帰式から精液検査基準を運動精子率が44.1程度, 高速が39.3程度を目安に凍結精液の生産を行なうことができると考えられる。

しかしながら, 今回は顕微鏡的手法で求めた精子生存指数と精子運動解析装置を用いた運動性だけを比較しており, 実際の受胎率との関係は明らかにしていない。今後は精子運動解析装置を用いた精子の運動性と受胎率との関係を明らかにする必要がある。

V 引 用 文 献

- 1)内藤元男監修, 1989, 畜産大辞典, 351-352, 養賢堂
- 2)西川義正, 飯田勲, 1972, 哺乳動物の精子, 212, 学窓社
- 3)日本家畜人工授精師協会, 1999, 家畜人工授精師講習テキスト(平成10年版), 268, 日本家畜人工授精師協会
- 4)日本家畜人工授精師協会, 1999, 家畜人工授精師講習テキスト(平成10年版), 316, 日本家畜人工授精師協会
- 5)菅原七郎編, 1986, 図説哺乳動物の発生工学実験法, 270, 学窓社
- 6)日本家畜人工授精師協会, 1999, 家畜人工授精師講習テキスト(平成10年版), 310-331, 日本家畜人工授精師協会

研究補助: 小濱健徳, 前田昌哉