

ドジョウの増殖に関する研究—Ⅲ.

精子の保存について※

久保田善二郎

Foundation Studies in Culturing of the Japanese Loach,
Misgurnus anguillicaudatus (CANTOR)—Ⅲ.
 Storing of Spermatozoon※

By

Zenziro KUBOTA

It may be one of the most important problems of carrying out the artificial fertilization successfully to keep the spermatozoon alive longly in normal condition. And there are quite many reports, in some of which this problem for fish are studied and in others of which this problems for the domestic animals are discussed.

The author examined the relation between the activity of the stored spermatozoon and the storing conditions, especially the kinds of the storing solution, concentration of the spermatozoon and the temperature during the storing, and found that it is more probable to get better results by employing rather the solution prescribed for the domestic animals such as GPC-5 than Ringer's one which has been used for the storing the seminal fluid of fish. And the results are shown in detail in the below.

1) The influence of the environmental conditions during the storing of the seminal fluid on the activity of the spermatozoon, *i. e.*, on the type of swimming, the duration of swimming and the swimming velocity are examined.

2) The spermatozoon can hold longer time its activity when it is stored in the GPC-5 solution than when it is in the Ringer's one as commonly used:

That is to say……

- i) The spermatozoon swimming forward is observed to continue its movement for such a long time as 10 to 12 days when it is stored in the GPC-5 solution at 10.8—13.0°C (11.4°C in average) in contrast with 5 days in the Ringer's solution and within a day in sulphite solution respectively.
- ii) When the spermatozoon is stored in the GPC-5 solution, it requires longer time to loose the activity into swimming circulatorily or oscillatorily, which are thought to be the stages of the spermatozoon loosing its activity, than when it is stored in the Ringer's solution.

※ 水産講習所研究業績 第339号, 1961年6月26日 受理.
 Contribution from the Shimonoseki College of Fisheries, No. 339.
 Received June 26, 1961.

- iii) The highest rate of surviving of the spermatozoa can be observed when they are stored in the GPC-5 solution, then this rate decreases in such an order as Ringer's solution and sulphite solution when they are stored in such solutions.
 - iv) The spermatozoon stored in the GPC-5 solution can swim more quickly than those stored in the Ringer's solution.
 - v) The spermatozoon stored in the GPC-5 solution within a certain period can continue to swim longer time than that of fresh condition, against the fact that no elongation of the duration of swimming can be caused by the storing in the Ringer's solution.
 - vi) The spermatozoa stored not so long time in the GPC-5 solution show higher activity in some time than those in fresh condition, although the spermatozoa stored in the Ringer's one can not show any higher activity than those of fresh condition at any period in storing.
- 3) The more densely the spermatozoon is stored, so far as the present investigations go, the spermatozoon keeps its activity longer time; especially the best result can be obtained when the spermatozoon is stored without any treatment, *i. e.*, as in state of testis.
- 4) The spermatozoon can keep its activity longer time, when it is stored in the lower temperature than in the higher one.
- 5) When it is colder than 20°C, the spermatozoon stored in the GPC-5 solution can survive longer time than kept in the Ringer's one; but *vice versa* in the warmer temperature.
- 6) At the temperature 7.4—9.4°C, the spermatozoon stored in the GPC-5 solution can hold its activity 11 days as against 4 days stored in the Ringer's solution.
- 7) The higher hatching rate is obtained in the eggs fertilized by the spermatozoa stored in the GPC-5 solution than that kept in the Ringer's one.
- 8) The higher rate of the malformed individuals is occurred in the eggs fertilized by the spermatozoa stored in the Ringer's solution than the eggs by the spermatozoa in the GPC-5 one.

ま え が き

精子を正常な状態で長期間保存することは、人工受精を計画化および能率化し、優良品種をつくり精子を長距離輸送する上に重要である。精子の活力および保存については、VRASSKI (1854) がスズキ類の一種 *Acerina vulgaris* の精子を6日間ガラス瓶中に貯蔵し得たことを報告して以来多くの業績がみられる。すなわち精子の活力および受精能力については ATKINS (1874) が *Salmo salar*, RUTTER (1902) がマスノスケ, 森脇 (1912) がベニザケ, 中野と野沢 (1925) が木崎湖産マス, 山本 (1941) がワカサギおよびアユ, SMITH と QUISTOFF (1943) がニジマスおよびマスノスケ, BARRET (1951) がサケ, ニジマスおよび *Salmo clarkii lewisi*, 岡田と伊藤 (1955) および岡田ら (1956) がサケでそれぞれ研究を行なった。

精子の保存を目的とした媒溶液については、家畜では無水葡萄糖を主成分とする GPC (ウシ用) および GPS (ヒツジ用) がソ連で、酒石酸法 (ウシ, ウマ, ブタおよびウサギ用) が MILANOV (1938), 硫酸

塩法（ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタおよびウサギ用）が LAMBERT (1940)、磷酸塩卵黄法（ウシ用）が PHILLIPS (1939) および LARDY と PHILLIPS (1940) によって考案され、KÜST (1936) は生理的食塩水も GPC と同価値のあることを報告した。一方、魚類では ELLIS と JONES (1939) が *Salmo salar* の精液の1滴を一定量の淡水および5～40%の海中水に入れて精子の寿命を検鏡した結果、活動時間が20%の海水中で最も長いことを確かめ、山本 (1941) は未受精卵および精子の短命は、体腔液と媒液との塩分濃度の差に原因すると考え、メダカの成熟未受精卵を滲透圧の等しいリンゲル氏液、すなわち M/7.5 NaCl 100+M/7.5 KCl 2.0+M/11 CaCl₂ 2.1 に保つと、長時間受精能力を保持することを発見した。また川村 (1944) はドジョウの人工孵化を行なう時は、水 1000 cc に対して食塩 7.5 g、塩化カルシウム 0.35 g、塩化カリ 0.2 g の溶液の使用を提案した。

著者は1952年5月から1957年5月にわたる間、精子の活力と保存環境、とくに保存液、精子濃度および温度との関係をしらべ、従来魚類精子の媒溶液として使用されてきたリンゲル氏液よりも、GPC-5液の方が精子の活力保持に対して著しくすぐれていることを知った。

本文に入るに先立ち御校閲を賜った京都大学教授松原喜代松博士ならびに終始御指導を仰いだ本所教授松井魁博士に感謝の意を表す。

精子の運動性および活力の検査方法

A. 運動性

ドジョウの精子は頭部、中片部および尾部の3部分からなり、頭部は直径約1.6 μ の球形で、それについて長さ約0.7 μ の中片部があり、さらにその後端からは長さ約18 μ におよぶきわめて細長い尾部をそなえている。生時において、尾部はほとんど観察されないが、その波状運動によって前進し、中片部は尾部の運動関節の働きをするものと考えられる。

精子は、精液またはそれと等調の滲透圧の溶液中ではほとんど運動しないが、それを水で稀釈すると急激に運動をおこす。精子の運動性は前進、旋回および振子の3様式に大別できる。すなわち活力の大きい新鮮な精子は、水を添加されると直線的な前進運動を開始するが、時間の経過に伴ってその速度を弱め、ついで大きく円形を描いて旋回するようになり、徐々にその回転半径を縮少し、ついには位置をほとんど変えないで、頭部を痙攣的または振子様に揺動する固着運動に変わり、最後には不動となる。ところで、これらの各過程は、全部の精子がたどるのではなく、同一精巢内の精子でも個体によって運動様式が相違し、前進運動を行なわないで旋回から振子、または振子から停止の過程をとるものもある。保存精子は貯蔵期間の増加に伴って前進から旋回、さらに振子運動精子の占める割合が大きくなる。したがって、これらの運動様式は精子の活力査定の一指標とすることができる。

ドジョウ精子の旋回運動の方向は、必ずしも一定していないが、時計の針の進む方向に対して逆のものが多く、全旋回精子の約70～80%を占める。清水を添加された精子が、運動を開始してから停止するまでに要する時間は同一条件下では前進運動精子が最も長く、振子精子が最も短い。

B. 活力の検査方法

精子活力の検査方法は、まず顕微鏡の視野中に Thoma-Zeiss 血球計算器の計算板をおき、つづいて載物ガラスの凹所、中央部附近に精液または精液を稀釈した保存溶液のごく微量を先端の尖ったピンセットで塗附し、それにスポイドで1滴の清水を添加後カバーガラスでおおい、直射日光をさけて低倍率で検鏡した。この際、稀釈された精液は毛細管作用によってほぼ均等に両ガラス間の空間を満たした。測定は上記の諸性質を考慮して精子の活動状況、運動時間および速度の3点について行なった。

a. **活動状況**：血球計算器の計算板のうちから16区面を選定し、精液またはその稀釈液に清水を添加後、その区面中の前進、旋回、振子の各運動精子個体数を、さらに全精子が停止した後その総個体数を算定し、各運動精子個体数の全精子個体数に対する割合を求めた。なお精子生存率は、運動精子個体数の全精子個体数に対する割合である。

b. **運動時間**：清水を添加してから計算板の16区面におけるすべての精子が運動を停止するまでに要する時間。

c. **運動速度**：前進運動精子が一定距離（140 μ ）を通過するに要する時間をはかり、これを60秒間の走行距離に換算して表わした。

なお、これらの各調査は、誤差範囲を小さくするために、測定を2～5回繰返しそれらの平均値を採用した。

精子の活力に及ぼす保存液の影響

A. 実験の材料および方法

実験は1956年7月5日から7月18日にわたる間、水産講習所増殖学教室で実施した。供試魚は下関市吉見町永田川一帯の溝で採捕した体長90～130 mmの雄17尾を使用した。実験方法は、まず魚の頭部を切断して即死させ、背部を切り開き精巣をできる限り傷つけないように注意して摘出した。一方、下記の各溶液に対してそれぞれ3個のシャーレを用意し、それらに供試液を80 cc あて入れた。これらのうちGPC-5液を入れた各シャーレには精巣2尾分ずつ、残りの2液にはそれぞれ1.5尾分ずつ収容し、冷蔵庫内に保存した。そして計画された時期に各液とも0.5尾分の精巣を取り出し、既述の方法によって精子活力の検査を行なった。一方、残りの2尾分の精巣は保存液に入れなくて基準群とし直ちに検鏡した。

供試液の成分は次の通りである。

GPC-5液 第1液…… H_2O 1000 g + $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 57.0 g + KH_2PO_4 2.8 g

第2液…… H_2O 1000 g + NaPO_3 30.3 g + $\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g + Na_2SO_4 1.7 g
+ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 0.1 g

硫酸塩液 H_2O 1000 g + Na_2SO_4 3.6 g + $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 39.0 g + pepton

リンゲル氏液 H_2O 1000 g + NaCl 7.5 g + KCl 0.2 g + CaCl_2 0.35 g

これら溶液の氷点降下 4°C は、GPC-5液では -0.60 、硫酸塩液では -0.58 、リンゲル氏液では -0.51 である。

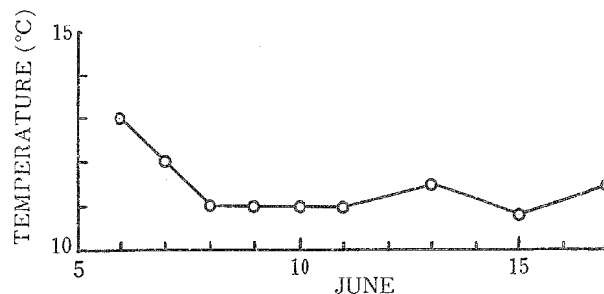


Fig. 1. Temperature of the storing solution in ice box.

GPCはウシの人工受精に使用する稀釈液で、ソ連で考案され、各国において最も広く採用され1号から7号までであるうち、GPC-4とGPC-5が非常に好評である。各号とも第1液は主に滲透圧を精子の活

動に適するように調節するために葡萄糖を主材とし、第2液は主に精液酸度の緩衝、調節を目的として磷酸ソーダを主材とし、使用する際はこの両液を等量に混合する。硫酸塩法は LAMBERT (1940) が考案した方法で、本実験では、そのうちのウサギに使用する稀釈液を採用した。さらにリンゲル氏液は川村 (1944) がドジョウの人工孵化を行なう際に使用した成分を用いた。

実験中の保存液の温度は 10.8~13.0°C、平均 11.4°C (第1図)、また測定の際に添加した清水の温度は 27.0~29.8°C である。各保存液の pH は、実験開始時では GPC-5 液が 7.4、硫酸塩液およびリンゲル氏液がともに 5.8、また終了時には GPC-5 液およびリンゲル氏液がいずれも 5.8 である。

B. 実験結果

2尾の基準群における精子の運動様式は、ともに前進的で、その速度は 29°C の稀釈水中で1分間に 5.38 mm および 5.83 mm 進み、さらに運動時間は 1分58秒および 2分16秒であった。

貯蔵日数と各群の前進精子含有率 (前進運動をする精子個体数の全精子個体数に対する割合。以下これにならう) との関係を示した。すなわち含有率は GPC-5 液では 2日に100%、5日、48%、10日、

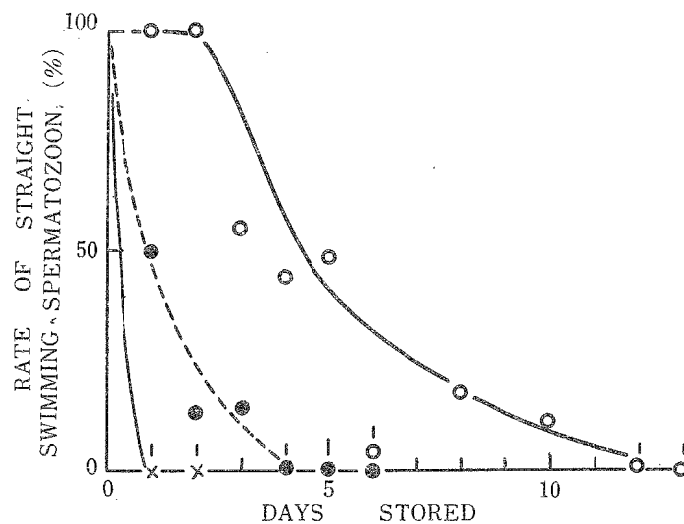


Fig. 2. Change of the rate of straightly-swimming spermatozoon to total ones with days stored.

Note: ○, GPC-5 solution; ●, Ringer's solution; ×, sulphite solution.

11%, リンゲル氏液では 2日に13%、4日、1%、さらに硫酸塩液では 1日に0%で、GPC-5 液が最大、硫酸塩液が最小である。精巢中に前進運動精子が含有される期間は、GPC-5 液が10~12日間、リンゲル氏液が5日間、硫酸塩液が0~1日で、GPC-5 液はリンゲル氏液の2倍以上に相当する。

貯蔵日数と各群の旋回精子含有率との関係は第3図に示した通りで、含有率は GPC-5 液では 2日まで 0%、6日が最高で66%、10日で11%であるのに対して、リンゲル氏液では 1日が6%、2日が最高で60%、4日で13%そして10日で6%となり、同精子の出現は、前者の方が後者よりも遅れる。

さらに振子精子含有率は、GPC-5 液では 5日まで 0%、8日に32%で峯をつくり、それ以後減少して 12日に16%となるが、リンゲル氏液では 3日まで 0%、6日が最高で20%、12日に5%で、同精子の出現時期は旋回精子の場合と同様に前者が後者よりも遅れる (第4図)。貯蔵日数に対する各群の精子生存率の関係は第5図に示した通りである。すなわち、精子の生存日数は硫酸塩液では 2日間、GPC-5 液およびリ

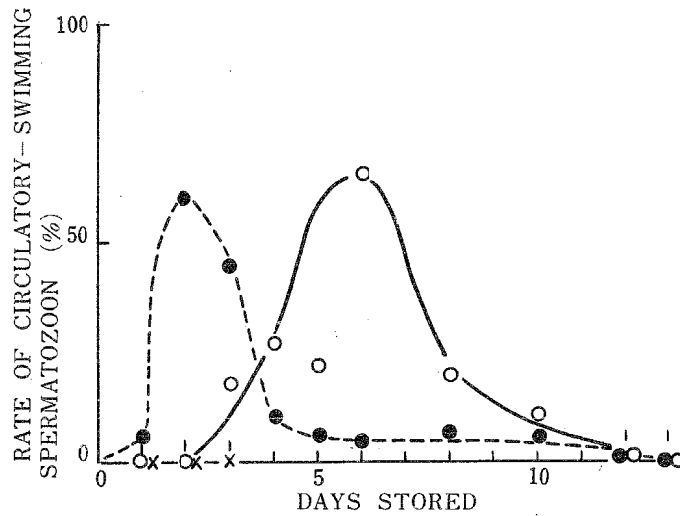


Fig. 3. Change of the rate of circulatory-swimming spermatozoon to total ones with days stored.

Note is the same as in Fig. 2.

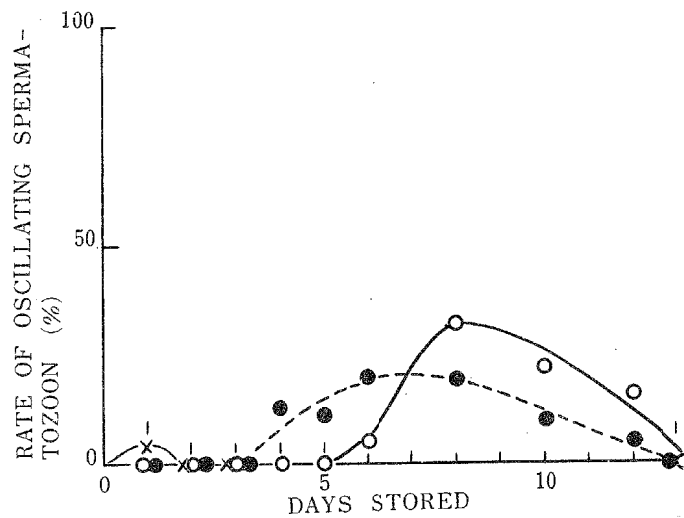


Fig. 4. Change of the rate of oscillating spermatozoon to total ones with days stored.

Note is the same as in Fig. 2.

ンゲル氏液ではいずれも12日間である。ところで後の2者は生存期間では一致したが、その精子生存率の減少傾向では著しく相違し、前者が8日まで緩慢、それ以後急激となるのに対して、後者では4日まで急速で、それ以後は緩慢である。

畸形精子は貯蔵開始後7日頃から振子運動精子および運動を停止した精子の間に現われ始め、実験終了日に近づくにしたがって、徐々に増加した。同精子は正常精子に比べて光沢がなく、頭部が変形して矮小である。また斃死した精子は集合して塊状となっていた。

貯蔵日数と精子の運動時間との関係は第6図に示した通りである。運動時間は硫酸塩液では3日の間に急減するが、リンゲル氏液では12日まで2分前後の運動力を持続し、この点で基準群とほぼ同一時間を保持する。一方GPC-5液は基準群よりも大きく延長され、6日までは8~14分、とくに3日には26分15秒およ

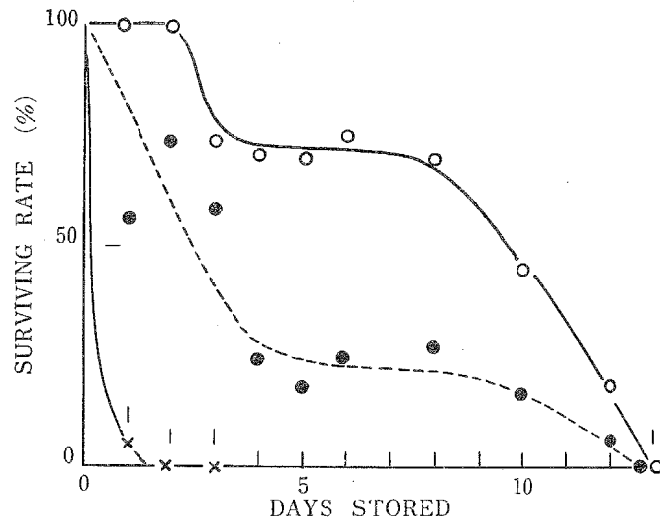


Fig. 5. Surviving rate of the spermatozoon to total ones during the storing.
Note is the same as Fig. 2.

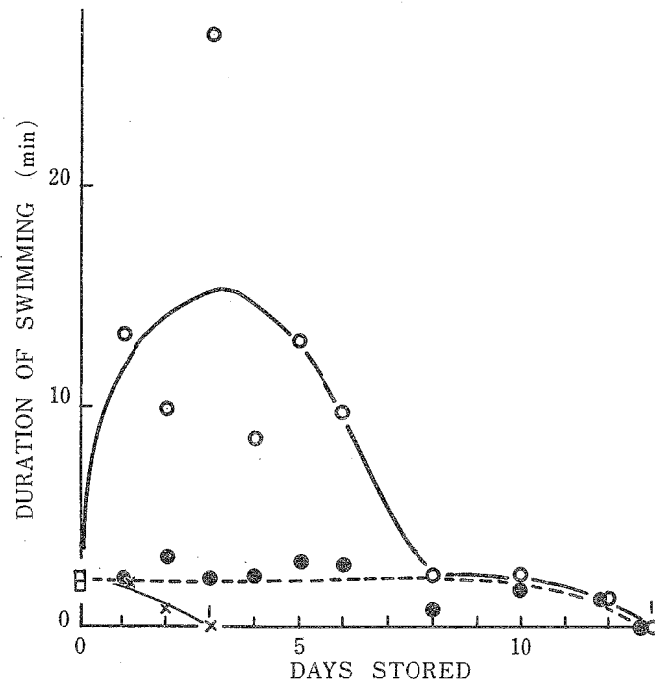


Fig. 6. Change of duration of swimming of spermatozoon with days stored.
Note : ○, GPC-5 solution ; ●, Ringer's solution ; ×, sulphite solution ; □, original seminal fluid.

び26分57秒を記録した。これは基準群の約10倍の長さに相当する。GPC-5液における精子の運動時間の拡大は、同液に精巣を収容してから短時間内に行なわれるようで、試みに基準群の精巣の小片を収容したところ、60分後に11分9秒となった。

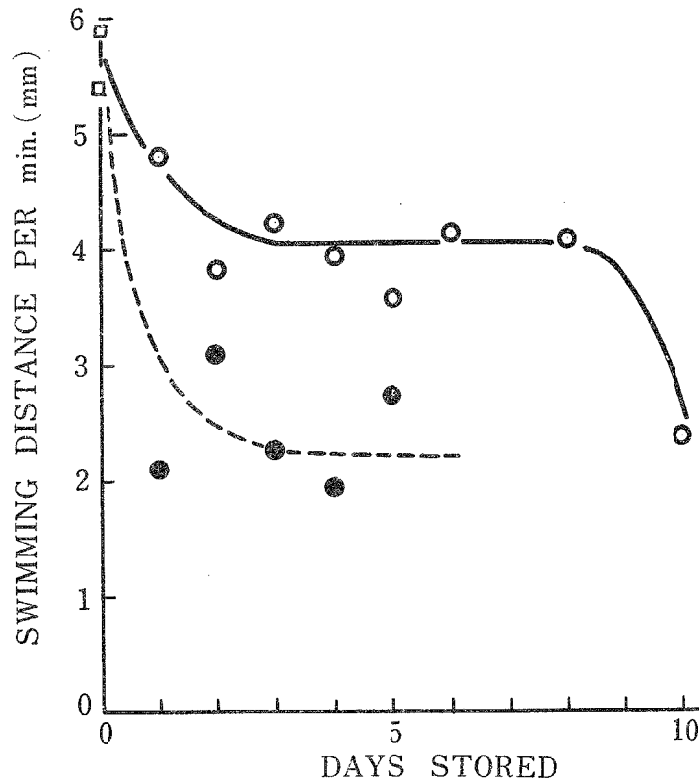


Fig. 7. Swimming distance per min. of the spermatozoon stored in two kinds of solution. Marks are the same as those of Fig. 6.

貯蔵日数と各群の精子の運動速度との関係は第7図に示した通りである。すなわち精子の1分間における運動距離は実験開始時には5.5~5.9 mmであるが、それ以後GPC-5液とリンゲル氏液ではともに減少し、前者では2日から8日にかけて3.56~4.24 mm、また後者では2日から5日にかけて1.60~3.36 mmを示し、さらにそれ以後では急減する。このように精子の運動速度はGPC-5液に保存した精子の方がリンゲル氏液におけるよりも早い。

保存液中における精子の濃度とその活力との関係

A. 実験の材料および方法

実験は1956年7月23日から8月7日までの16日間実施した。供試魚は14尾で、さきの方法にしたがって精巢を摘出し、そのうち11尾分の精巢から含有精子をGPC-5液45 cc中にしぼり出して原液とし、それをさらにGPC-5液で稀釈することによって濃度の異なる下記の5液を作製して供試液とした。

A群	原液	20 cc		
B群	"	10 cc + GPC-5液	10 cc	……… 2倍液
C群	"	5 cc + "	"	15 cc …… 4 "
D群	"	2 cc + "	"	18 cc …… 10 "
E群	"	1 cc + "	"	19 cc …… 20 "

残りの3尾分の精巣は、そのままGPC-5液20cc中に保存して対照群とした。なお原液1mm³中の精子個体数は29652である。保存容器、貯蔵場所、活力の検査方法はさきの実験と全く同じである。実験中の保存液の温度は12.0~16.2°C、平均12.7°Cで、前実験(平均11.4°C)の場合よりも高く(第8図)、添加した清水の温度は28.0~29.5°Cである。原液のpHは実験開始時に7.4、終了時に5.7で、保存日数の増加に伴って酸性域へ移行した(第9図)。

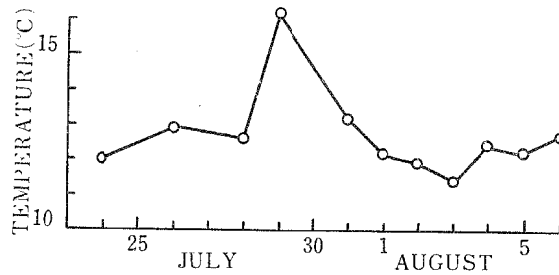


Fig. 8. Temperature of the storing solution in ice box.

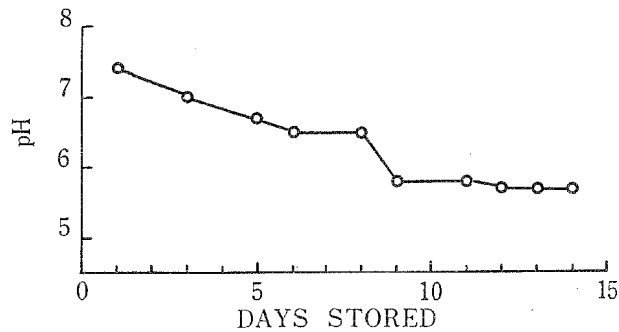


Fig. 9. pH of storing solution during the experiment.

B. 実験結果

貯蔵日数と各群の前進精子含有率との関係は第10図に示した通りである。含有率は1日ではA, B, Cの各群で100%, D群で20%, E群で2%, また2日ではA群で11%, B群で10%, C群で4%, DおよびE群ではともに0%, さらに3日では対照群で32%, A群で2%, その他の各群では0%で、高濃度群の含有率は低濃度群よりも高率である。精子中に前進運動精子が含有される期間は、対照群で5日、A群で3日、BおよびC群ではともに2日、DおよびE群ではいずれも1日で高濃度群ほど長い。

貯蔵日数と各群の巡回精子含有率との関係は第11図に示した通りである。各群において最高の含有率を示す時期は、対照群が3日、A・B・Cの各群が2日、DおよびE群がともに1日で、高濃度群ほど遅い。この傾向は振り精子の場合にも適合し、最高率は対照群で5~7日、A群で4日、B・C・Dの各群で3日、E群で2日でそれぞれ示される(第12図)。

貯蔵日数と各群の精子生存率との関係は第3図に示した通りである。精子生存率は、5日に対照群で56%, A群で15%, BおよびC群で5%, D群で4%, E群で1%, また10日に対照群で40%, A群で3%, B群で5%, CおよびD群で3%, E群で0%で、高濃度群の精子生存率は低濃度群におけるよりも高率である。各群の精子の生存日数はE群で5日、D群で12日、BおよびC群ではともに13日、A群で14日そして対照群で14日以上で、高濃度群ほど長い。

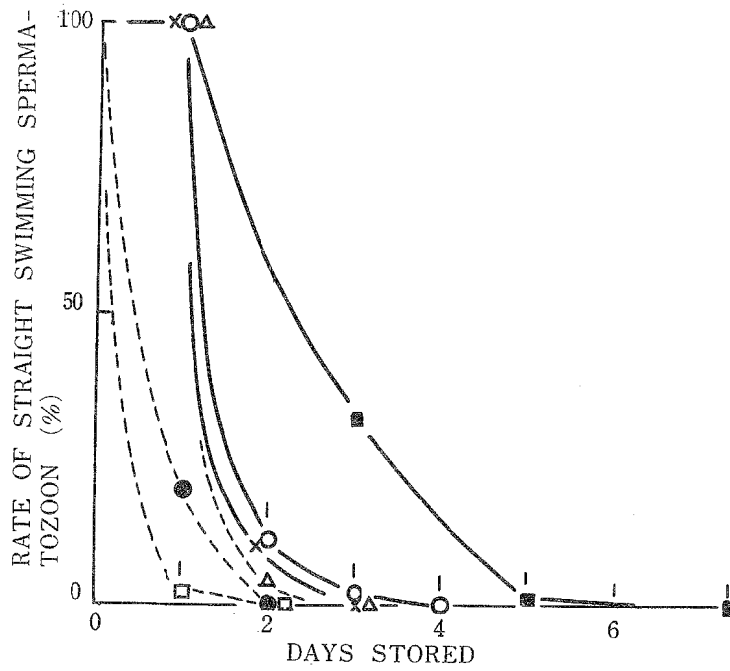


Fig. 10. Change of the rate of straightly-swimming spermatozoa to total ones with days stored.
 Note : ○, Group A ; ×, Group B ; △, Group C ; ●, Group D ; □, Group E ; ■, Control.

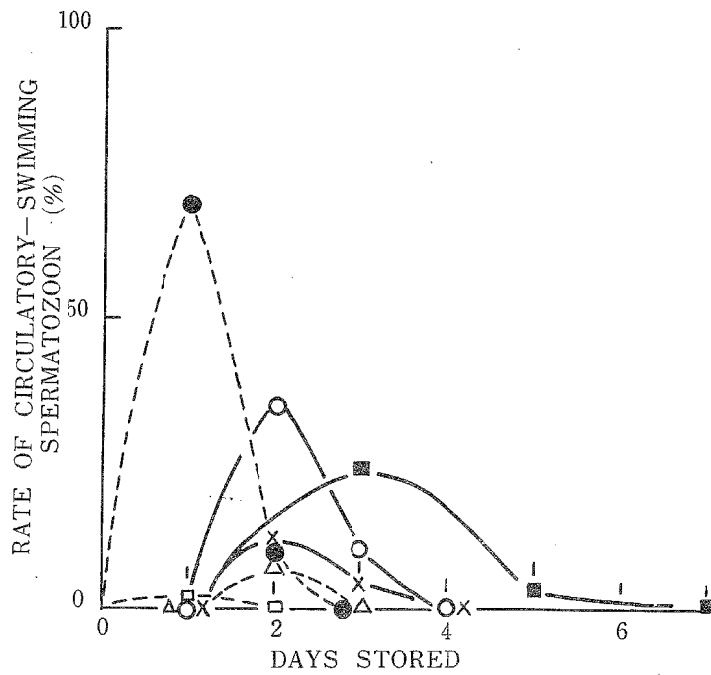


Fig. 11. Change of the rate of circulatory-swimming spermatozoa to total ones with days stored.
 Marks are the same as those of Fig. 10.

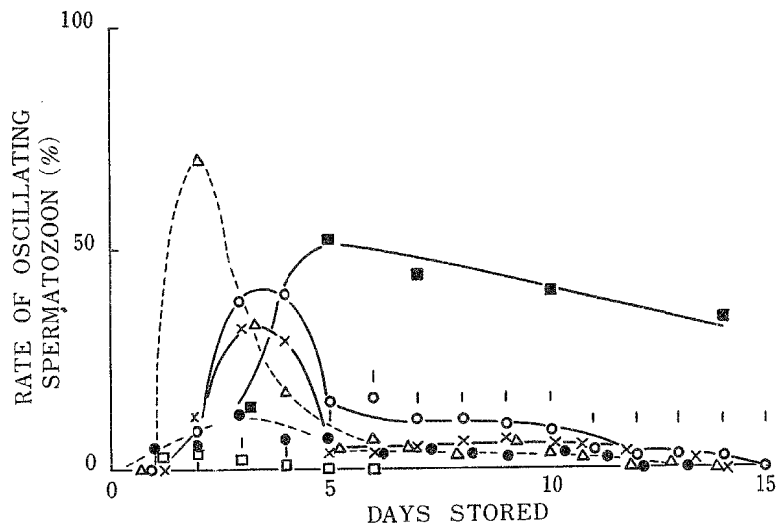


Fig. 12. Change of the rate of oscillating spermatozoon to total ones with days stored.
Marks are the same as those of Fig. 10.

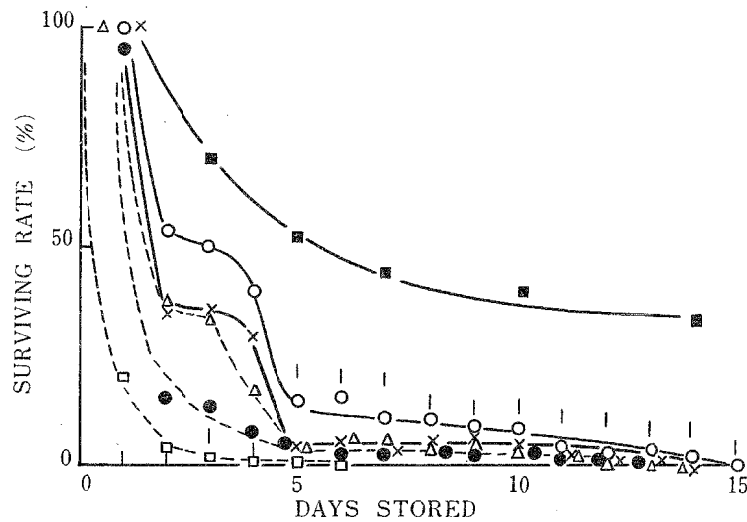


Fig. 13. Surviving rate of the spermatozoon to total ones during the storing.
Marks are the same as those of Fig. 10.

貯蔵日数と各群の精子の運動時間との関係は第14図に示した通りである。運動時間は、3日では対照群で20分、A群で13分、B群で9分、C群で8分、E群で6分、D群で5分、また10日では対照群で12分、A群で9分、BおよびC群ではともに5分、そしてD群では4分で、高濃度群ほど長い。

貯蔵日数と各群の精子の運動速度との関係は第15図に示した通りである。1分間の走行距離は、1日ではC、A、B、D、E群の順序に、2日ではA、B、C群の順序に、3日では対照群、A群の順位に長く、したがって精子の運動速度は高濃度群ほど早い傾向がある。

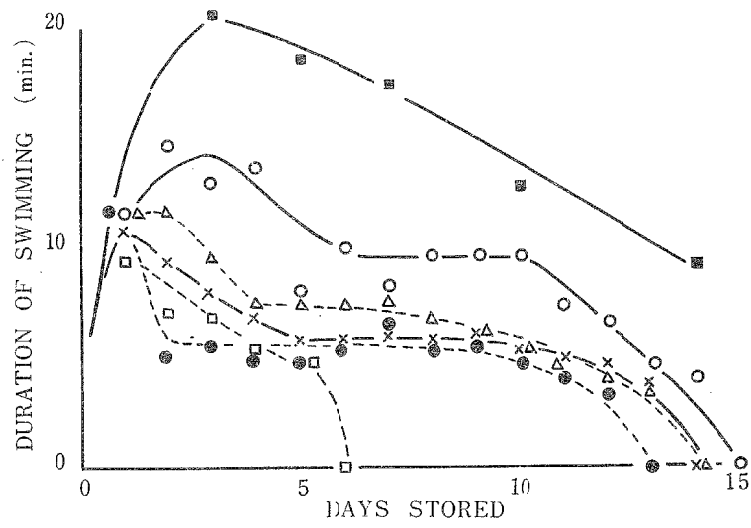


Fig. 14. Change of duration of swimming of spermatozoon with days stored.
Marks are the same as those of Fig. 10.

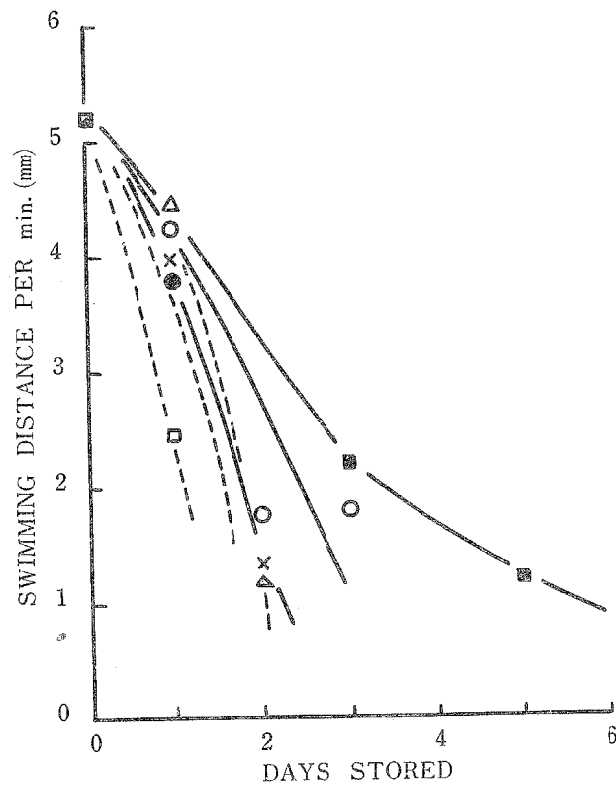


Fig. 15. Swimming distance per min. of the spermatozoon stored in various groups.
Marks are the same as those of Fig. 10.

保存温度と精子活力との関係

A. 実験の材料および方法

実験は1957年1月30日から2月17日にわたる19日間実施した。供試魚は32尾でそのうち30尾は実験群、残りの2尾は基準群として使用した。実験方法は、GPC-5液およびリンゲル氏液、各250cc中にそれぞれ15尾分の精巣から精子をしばり出して精子含有液をつくり、さらにこれらを40ccあて、各液5本のガラス管瓶中に収容した。つづいて両液の管瓶1本あてを、あらかじめサーモスタットおよび冷蔵庫で5段階の温度に調節しておいた場所に安置した。その後毎日管瓶から少量の精子含有液を取り出して前実験と同様な方法で調査を行なった。なお精子含有液の1mm³中における精子個体数はリンゲル氏液が38750、GPC-5液が34575で、前者が後者よりもわずかに高濃度である。一方、基準群は精巣を摘出後保存液に入れないで、直ちに精子の活力検査を行なった。

実験中の平均保存温度は、A群で3.1°C (0.8~4.8°C)、B群で20.3°C (19.0~21.0°C)、C群で25.6°C (25.0~26.8°C)、D群で29.2°C (29.0~29.5°C)、E群で35.0°C (35.0~35.0°C)である(第16図)。pHは実験開始時ではGPC-5液が7.4、リンゲル氏液が5.6で、それ以後は前実験の場合と同様に保存日数の増加に伴って、前者の各群では大きく酸性化するが、後者の各群ではほとんど変化しない。GPC-5液の各群におけるpHの変化は、低温群よりも高温群の方が著しく、1日保存した場合、A群で7.0、B・C・Dの各群で6.8、E群で6.6、また13日ではA群の6.2に対してB群では4.4である(第17図)。

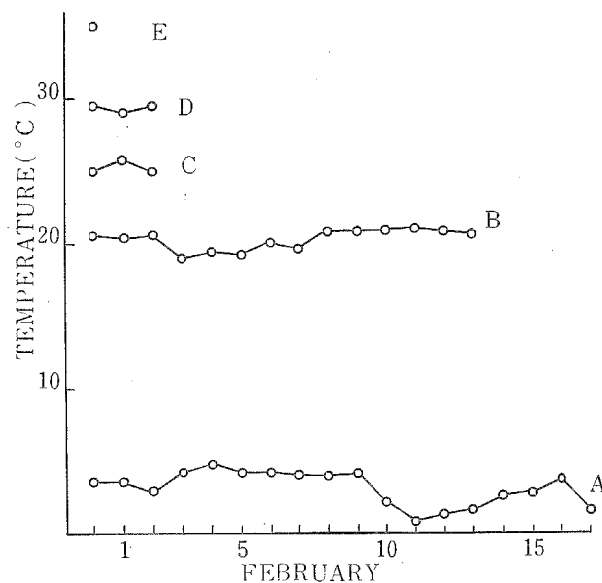


Fig. 16. Temperature of respective storing solution of spermatozoon during the experiment.

Note : A, Group A ; B, Group B ; C, Group C ; D, Group D ; E, Group E.

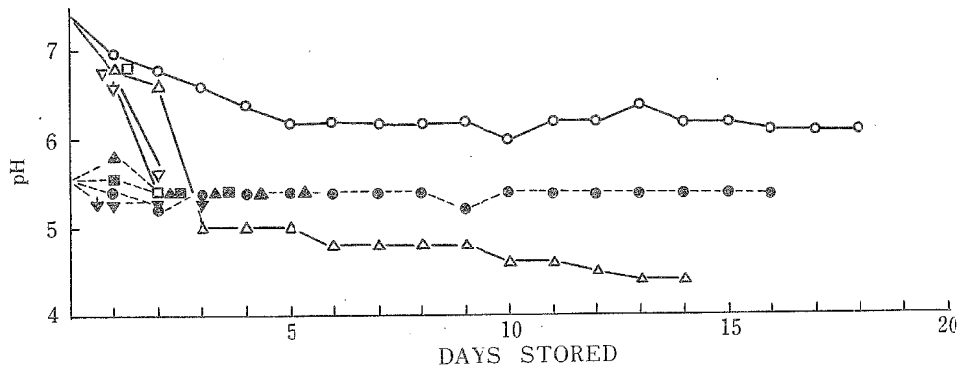


Fig. 17. pH of storing solution of spermatozoon during the experiment.
 Note : ○, Group GA ; ●, Group RA ; △, Group GB ; ▲, Group RB ;
 □, Group GC ; ■, Group RC ; ▽, Group RD ; ▼, Group RE ; ◇, Group GE ; ▽, Group RE.

B. 実験結果

基準群の精子の運動様式は、旋回運動精子が全精子の99.5%を占め前進運動精子はわずかに0.5%に過ぎず、そして振子および停止精子は発見できなかった。この結果は前述の各実験結果と著しく相違するが、この原因は本実験の行なわれた時期が、他の諸実験の行なわれた時期と異なり、精子がまだ十分成熟していないことによるものと考えられる。これらの精子の運動時間は14.8°Cの稀積水中では5分12秒～5分30秒、その速度は1分間に3.11 mmであった。

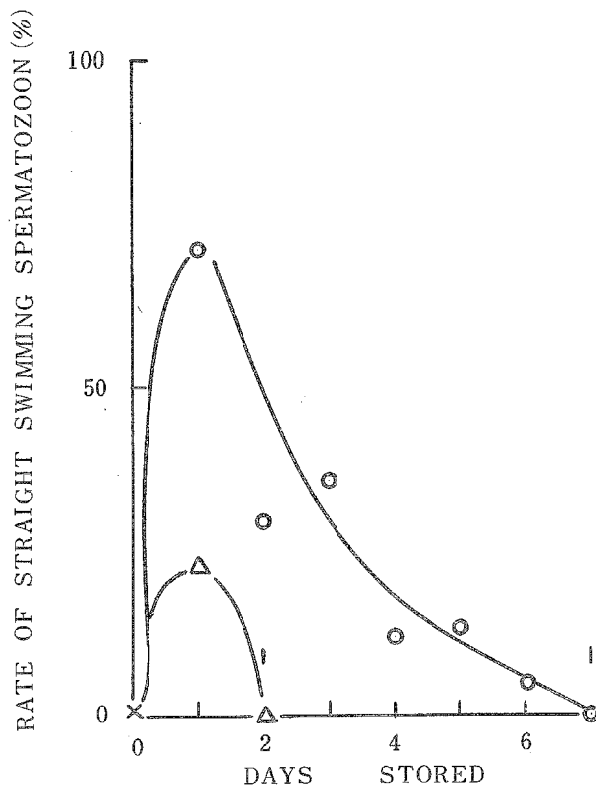


Fig. 18. Change of the rate of straightly-swimming spermatozoon to total ones with days stored.
 Note : ○, Group GA ; △, Group GB.

貯蔵日数と各群の前進精子含有率との関係は第18図に示した通りである。含有率は1日ではGA群（GPC-5液のA群を意味し、同様にRA群はリンゲル氏液のA群をさす。以下これにならう）で71.4%，GB群で23.2%で、両群とも実験開始時の0.5%から急増するが、それ以後では減少して前者では7日で、後者では2日でそれぞれ消滅した。このように前進運動の精子はGPC-5液における低温の2群にのみ出現し、その2群のうちでは低温群の方が高温群よりも同精子の含有期間は長く、その含有率も高いことを示す。

旋回運動の精子は、GPC-5液における低温の3群にのみ出現し、同精子含有率は第19図に示すように保存日数の増加に伴って各群とも減少し、GA群では7日で、GB群とGC群ではともに2日で消滅した。

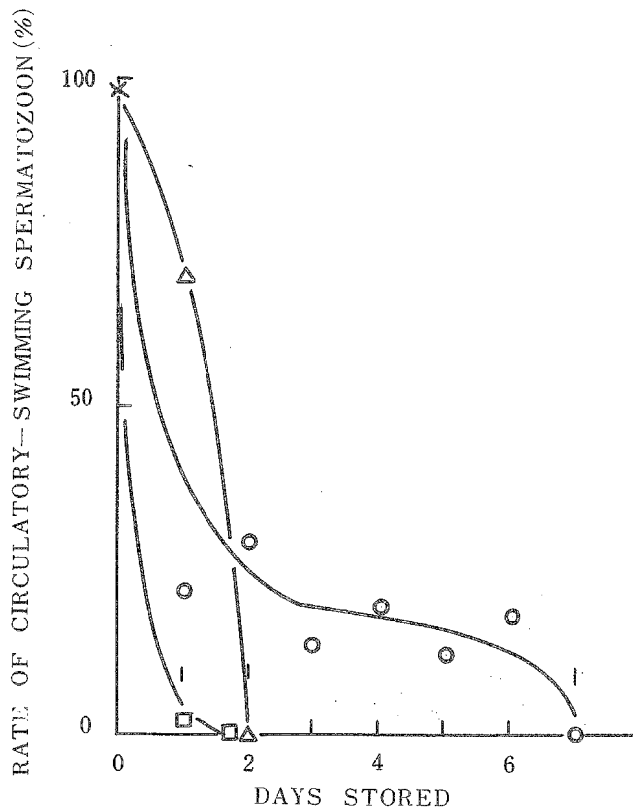


Fig. 19. Change of the rate of circulatory-swimming spermatozoa to total ones with days stored.

Note: ○, Group GA; △, Group GB; □, Group GC.

さらに振子運動の精子において、その最高含有率がみられる時期は、GA群で5日、GB群で3日、その他の各群ではいずれも1日で、GPC-5液の各群では高温度群よりも低温度群の方が遅れる傾向がみられ、またリンゲル氏液では、保存日数1日の含有率がRA, RB, RC, RD群の順位に大きく、高温度群では低温度群におけるよりも高率である（第20図）。

精子の生存日数はGA群で17日、RA群で15日、GB群で13日、RB群で3日、RCおよびRD群ではともに2日、GC群で1日、RE, GD, GEの各群ではいずれも1日以内で、同一保存液のうちでは、低温度群が高温度群よりも、またGPC-5液とリンゲル氏液の各群を比べると、20°C以下の温度では前者、それ以下の温度では逆に後者の方が生存日数が長い。精子の保存温度とその生存日数との関係でとくに注目される点は、生存日数がGPC-5液においては、3°Cと20°Cとで大差が認められないが20°Cから25°Cに

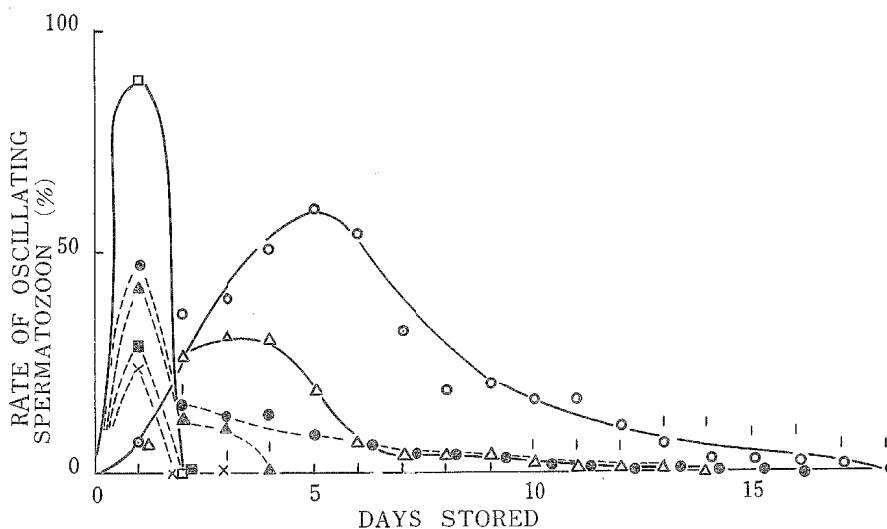


Fig. 20. Change of the rate of oscillating spermatozoon to total ones with days stored.

Note : ○, Group GA ; △, Group GB ; □, Group GC ; ●, Group RA ; ▲, Group RB ; ■, Group RC ; ×, Group RD.

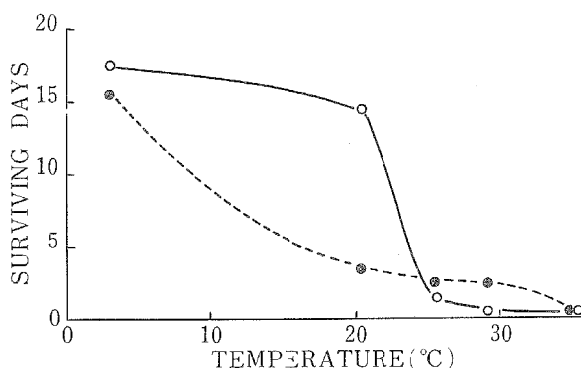


Fig. 21. Change of the surviving days with increase in storing temperature.

Note : ○, GPC-5 solution ; ●, Ringer's solution.

かけて大きく減少し、一方リンゲル氏液では、このような傾向がみられないで低温から高温にかけて徐々に減少することである (第21図)。

貯蔵日数と各群の精子生存率との関係を第22図に示した。精子生存率は3日ではGA群で89.9%, GB群で31.0%, RA群で13.5%, RB群で10.1%, その他の各群ではいずれも0%, また6日ではGA群で77.0%, GB群で6.5%, RA群で5.9%で、同一保存液のうちでは低温群の方が高温群よりも高率を示し、リンゲル氏液群とGPC-5液群とを同一温度群について比べると、20°C以下の保存温度では前者の方が後者よりも低率で、また20°C以上の温度では両者はほぼ等しいか、あるいは前者の方がやや高率である。精子生存率はGA群では6日から7日、GB群およびGC群では1日から2日、その他の各群では実験開始時から1日にかけてそれぞれ大きく減少した。

貯蔵日数と精子の運動時間との関係は第23図に示した通りである。すなわちGPC-5液の各群の運動時

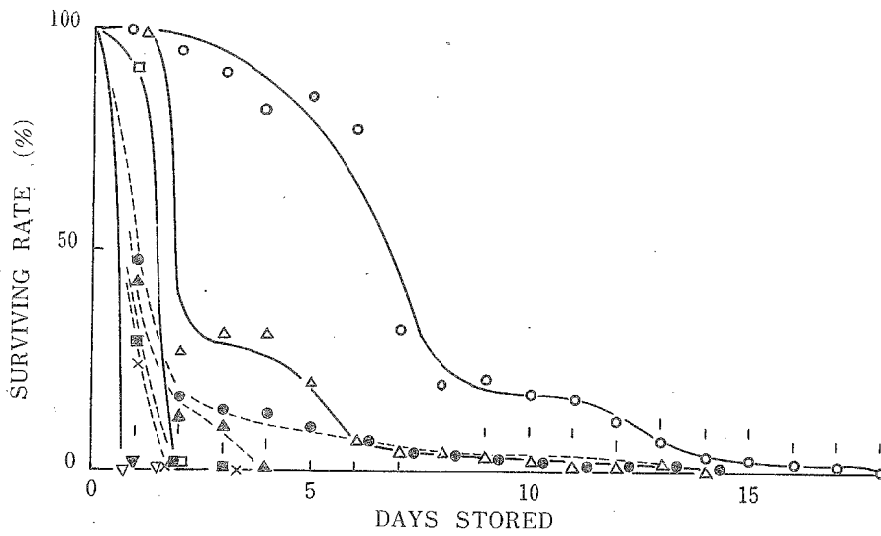


Fig. 22. Surviving rate of the spermatozoon to total ones during the storing.
 Note : ○, Group GA ; △, Group GB ; □, Group GC ; ▽, Group GD ; ●, Group RA ; ▲, Group RB ; ■, Group RC ; ×, Group RD ; ▼, Group RE.

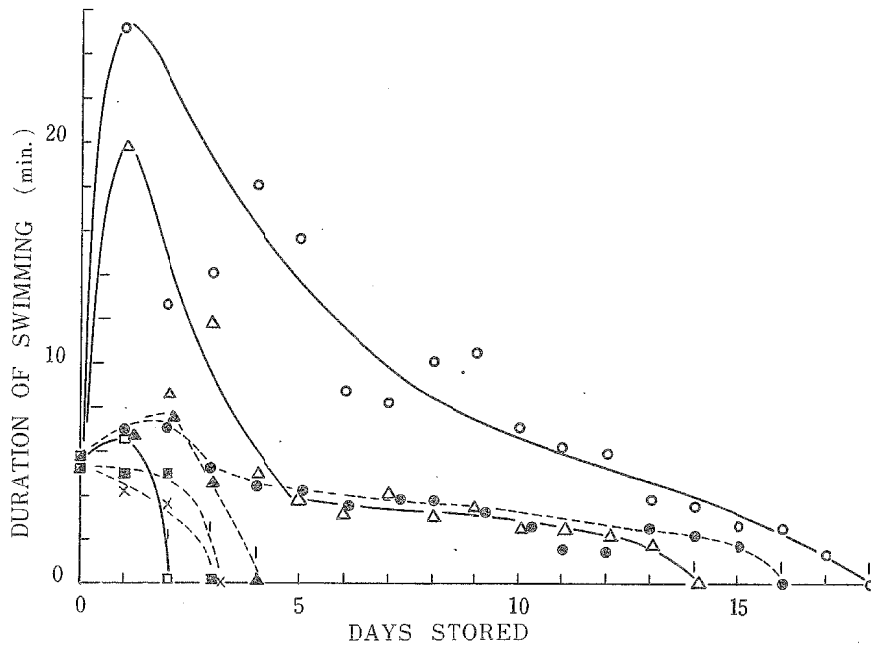


Fig. 23. Change of duration of swimming of spermatozoon with days stored.
 Note : ○, Group GA ; △, Group GB ; □, Group GC ; ●, Group RA ; ▲, Group RB ; ■, Group RC ; ×, Group RD ; ▨, original seminal fluid.

間は、実験開始後に急増し、1日ではGA群で25分、GB群で19分、そしてGC群では6分で、低温保存群ほど長く、それ以後5日までは急激に、さらにその後では緩慢に減少した。一方リンゲル氏液の各群では、GPC-5液の各群で示されたような運動時間の拡大はなくて、実験開始時とほぼ同一か、または短く、そ

してGPC-5液の場合と同様にわずかながら低温群が高温群よりも長い傾向が認められる。

精子の運動速度は、GA群では貯蔵開始後1日において最も早く、1分間に7.08 mm、つまり実験開始時の2倍以上に匹敵する速度を示すが、1日から2日にかけて急激に、それ以後6日にかけて緩慢に減少する。またGB群ではGA群のような速度の増加はなくて、実験開始時から2日にかけて、それぞれ減少する(第24図)。

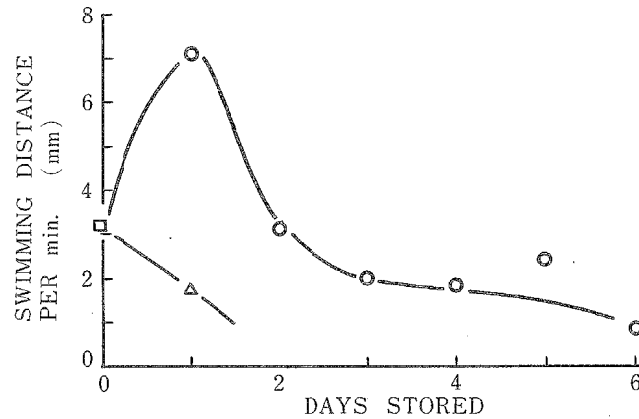


Fig. 24. Swimming distance per min. of the spermatozoon stored in two different groups.

Note: ○, Group GA; △, Group GB; □, original seminal fluid.

精子の保存日数と孵化率との関係

上述の諸実験結果から、精子の活力を長期間保持させる環境条件としては、保存液ではリンゲル氏液よりもGPC-5液、温度では高温よりも低温、精子の濃度では低密度よりも高密度の方がそれぞれ優れていることを知った。ところでこれらの諸結果は精子の運動性だけからしらべられたものであって、これらの環境下に保存した精子がはたして受精および孵化能力を有するかどうか、また孵化率に如何に影響するかは全く不明である。そこで本実験はこれらの諸点を明らかにする目的で行なった。

A. 実験の材料および方法

実験は1957年5月13日から5月31日までの期間に行なった。供試魚は雄28尾、雌2尾である。実験方法は、まず受精前15日から受精日にかけて、1・2の例外を除き、毎日リンゲル氏液およびGPC-5液各40ccを入れた直径3cm、高さ10cmのガラス管瓶中に、各1尾分の精巢を収容し、さらにそれらを冷蔵庫に安置した。なお保存液は受精日から7日前および受精日から16日前の2回にわたってそれぞれ別個に作製した。

卵巣卵の成熟および排卵促進は川村(1944)の方法で行ない。排出した卵は一応パラフィンの反膜で内部を裏づけたピーカー内に収容し、その後収容した卵の均一性をはかるために鶏羽で十分に攪拌した。一方、精子懸濁液は直径9.5cm、高さ2cmのシャーレ中で前述した保存精子各1尾分に保存液5ccを加えて作製した。受精は精子懸濁液に23.2°Cの清水50ccを加えると同時に、その中に卵を撒布する方法で行なった。その後各収容卵数、孵化仔魚数および畸形魚の有無をしらべるとともに、1日1回換水を行なった。受精率の検査は行なわなかった。その理由は川村(1944)および鈴木(1951)が認めたようにドジョウの成熟未受精卵を水中に入れると卵膜が収縮し、動物極の附近に微細な細胞質が集まって胚盤を形成し、第2分割まで

は受精卵も未受精卵も同様な経過をたどり、その少数は桑実期附近まで卵分割が進み、第3分割までの観察では受精卵か未受精卵かを判定できないことによるものである。

B. 実験結果

精巢の保存温度は7.4~9.4°C (第25図)、孵化用水の温度は21.0~23.2°C、孵化所要時間は2~3日で

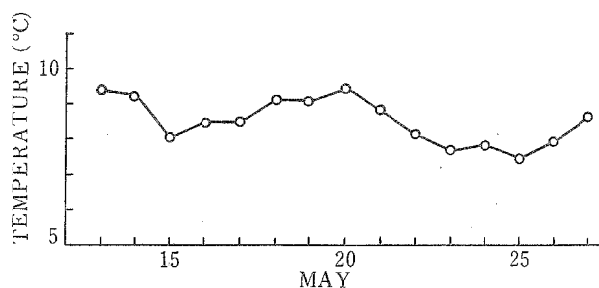


Fig. 25. Temperature of the storing solution in ice box.

ある。保存精子が卵を受精孵化させ得る能力を持続する期間は、R群（リンゲル氏液群）では4日間、G群（GPC-5液群）では11日間で、後の方が前者よりも長い。孵化率はR群よりG群の方が著しく高率を示し、R群では精子の保存期間が長いほど低率となるが、G群では保存期間が7日間から10日間および媒精日から6日間の間では、それぞれ期間が長いほど高率となる異常傾向を示した。* 精巢を保存しないで新鮮な精子を使用した場合の孵化率は、R群で24.9%に対して、G群では38.2%で、後の方が前者よりも高率である。孵化仔魚の畸形率は、G群よりR群の方が大きく、後者では精子の保存日数が増加するに伴って高率となるが、前者では精子を1日間保存した場合に7.7%の出現がみられた以外は皆無であった（第1表、第26図）。

Table 1. The details of the results of hatching of the eggs fertilized by the spermatozoa stored in the Ringer's solution or in the GPC-5 one.

Solution	Days stored	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13	15
Ringer's solution	Number of eggs	113	37	84	50	66	73	42	93	46	47	28	68	77	59
	Number of eggs hatched	28	6	10	7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Number of malformed fry	1	1	3	3	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Hatching rate	24.9	16.2	11.9	14.0	1.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Rate of malformed fry	3.6	16.7	30.0	42.9	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
GPC-5 solution	Number of eggs	34	60	29	65	34	84	47	45	62	52	105	76	91	41
	Number of eggs hatched	13	26	18	32	18	41	34	0	1	1	14	5	0	0
	Number of malformed fry	0	2	0	0	0	0	0	—	0	0	0	0	—	—
	Hatching rate	38.2	43.3	62.0	49.2	53.0	48.8	72.4	0	1.6	1.9	13.3	6.6	0	0
	Rate of malformed fry	0	7.7	0	0	0	0	0	—	0	0	0	0	—	—

* G群では既述のように保存液を2回にわたって作製したので、この実験も2回にわけて行なった。

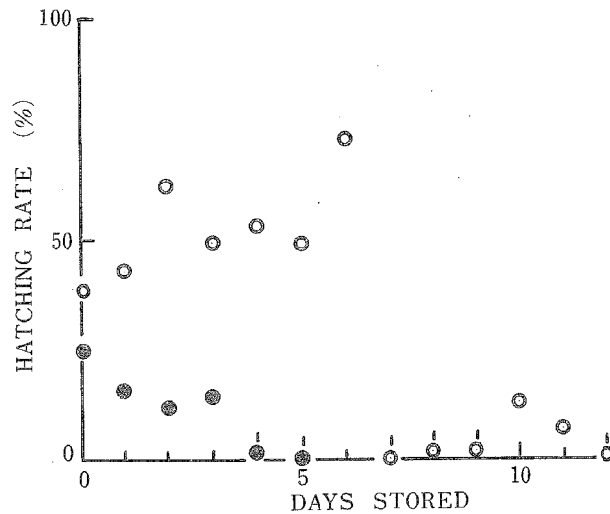


Fig. 26. Hatching rates of eggs fertilized by the spermatozoa stored in two kinds of solutions.
Note : ○, GPC-5 solution ; ●, Ringer's solution.

考 察

受精の目的を達成するには、まず水中に放出された精子が卵子まで到達し、しかもその卵門内に進入しなければならぬ。したがって人工受精を行ない、良好な受精率および孵化率を得るには、それに用いる精子の運動速度が早く、活動時間が長いと同時に、その運動様式が振子よりも旋回、旋回よりも前進的であることが望ましく、精子の保存を目的とした媒溶液は、そのように優れた活力を長期間保持させるとともに、保存した精子でもって受精し、孵化した仔魚が畸形魚でなくて正常魚であることが条件とされる。

本実験では、精子の保存液として従来魚類に使用されてきたリンゲル氏液よりもGPC-5液の方が上記の諸条件のすべてにわたってすぐれた結果を得た。GPC-5液に収容された精子が長期間にわたって活力を保持できる原因は、葡萄糖による滲透圧の調節および磷酸ソーダによる精液酸度の緩衝が行なわれることに加えて、葡萄糖が精子の中片部および中心体に存在するグリコーゲンの量を増加、または補う役割をはたしていること、さらに無機塩類の陽イオンによる賦活作用などが考えられ、リンゲル氏液に保存した精子では、それに清水を添加後の運動時間および速度が生鮮精子の場合に比べてほぼ等しいか、または減少するのに対して、GPC-5液では顕著な増加を一時期に示し、さらに運動様式が活力の一層大きい様式へと変化することは、以上の事実を裏づけているように思われる。

媒溶液に保存した精子の密度とその活力との関係は、実験範囲内では密度が高いほど活力が長期間保持され、最良の結果は媒溶液中に精巢のまま収容した際に得られた。精子を低密度よりも高密度の状態に保存した方が精子活力の旺盛な原因は、精子1個体当りの運動空間が密度が大きいほど狭小となり、精子の活動が抑制され、エネルギーおよび酸素の消費量が小さくなるためと考える。

精子を収容した媒溶液の温度と精子活力との関係は、高温よりも低温域の方が長期間旺盛な活力を示したが、この結果は従来魚類および多くの家畜で行なわれた諸実験結果と一致した。魚類における温度と精子活力との関係については、森脇(1912)はヒメマスについて体外に取り出した精液を曝気の状態に保存すると、8°Cで66時間活力を示すが、空中遮断の場合はわずかに3時間であるとし、中野・野沢(1925)は木崎湖産マスの精液を曝気の状態に、5.3~13.0°Cに保存し、97時間後においてもなお新鮮な卵子を十分に受精させ

ることができるとした。山本 (1941) は親魚斃死後、体内に保ったワカサギおよびアユの精子の活力について実験を行ない、前者において $2.2\sim 7.5^{\circ}\text{C}$ では 1.5時間までは活力に大差が認められないが、8時間後には全く受精力を失い、また後者において 20°C 前後では $15\sim 20$ 分は活力を維持するが、30分以上経過すると受精力を失うとした。

BARRETT (1951) はサケの精液を $2.5\sim 5.8^{\circ}\text{C}$ で冷蔵し、新鮮な卵子を36時間までは平均90%以上、ある例では7日後にも70%内外受精させる能力があることを報告した。岡田・伊藤 (1955) および岡田ら (1956) はサケについて体外精子の活力保有期間は高温よりも低温の方が長く、 5°C で 161時間、 11°C で 77時間、 16°C で 41.5時間、 33°C で 4時間とし、保存温度 (x) と活力保有期間 (y) との間に $x(y+1.1)=45$ の実験式を得た。その場合、空気接触の有無により大きな影響を受け、空気接触を遮断すると 20°C で 60分以内、 11°C で 60分、 0°C で 180分以内で活力を失ない、また死魚体内の精液は、体外の場合と同様に、死後の魚体温が高いほど速かに受精力が減退し、 $11\sim 12^{\circ}\text{C}$ で 90分内外、 $13\sim 14^{\circ}\text{C}$ で 50分内外、 $18\sim 19^{\circ}\text{C}$ では 30分内外を越えると受精力が減退することを報告した。

精子の活力保有期間が高温よりも低温の方が長い原因は、岡田ら (1956) がサケの精液および卵子の各 1 cc が 1 時間に消費する酸素量は 10.8°C では、それぞれ 21mm^3 および 2mm^3 、また 18.7°C では 94mm^3 および 5mm^3 で、精液は卵子に比べて多量の酸素を消費し、低温ほど酸素消費量が減少することによって説明できるとしたが、本実験においても同様な理由に基づくと考えられる。

GPC-5液とリンゲル氏液とにそれぞれ保存した精子は、 20°C 以下の温度では前者の方が、またそれ以上の温度では後者の方がそれぞれ長期間にわたって生存した。この原因は媒溶液の水素イオン濃度に関連しているように思われる。すなわち媒精時に使用する稀釈液は、中性ないし弱アルカリ性、つまり pH 7.0 \sim 7.6を適当とするが、精子を保存して長くその受精能力を辛じて持たせるためには、精子の活動を抑圧し、できるだけ不動の状態におくことが必要であって、保存液としてはむしろ pH 6.8以下、すなわち弱酸性程度の液が適当とされる。しかし媒溶液を加えた精液は保存中に酸性化し、その度が進むにしたがって精子は不動となりついには死滅する。本実験における保存液の酸性化は、リンゲル氏液ではごくわずかで、しかも保存温度の高低によって大差が認められないが、一方GPC-5液では顕著に大きくて、低温保存では徐々に、また高温保存では急速に行なわれた。この結果からGPC-5液は 20°C 以下の保存温度では、リンゲル氏液よりも精子の活力保持に対しては既述の通り好影響を与えるが、それ以上の温度では水素イオン濃度の急激な酸性への移行が精子を麻痺させ、リンゲル氏液におけるよりも早期に死滅さす原因となるのであろう。

保存精子の孵化能力実験およびそれと同方法で保存した精子の活力実験 (精子の活力に及ぼす保存液の影響) によって、精子の活力と孵化能力との関係について考察すると、前進運動精子の含有期間は、GPC-5液では10日ないし11日間、リンゲル氏液では5日間、また孵化能力所有期間は、前者では11日間、後者では4日間で、両期間はほぼ一致し、精子の活力保有期間は、前者および後者ともに12日間で、孵化能力所有期間とは相違している。精子の活力と受胎率との関係について、KINGMAN (1936) はウシにおいて精子活力の良否は必ずしも受胎の良否と平行しないが、一般に活力の高い場合には受胎率もまた高いといい、さらに HABIBULLIN (1938) によると射精後短時間の精液では、その活力が旺盛な場合受胎率もまた良好であって、たとえば一視野中の精子の80%が旺盛な活力を示している場合には、受胎率もほぼ80%となって活力と受胎率は平行するが、長時間保持すればするほど、両者は平行しなくなり、24時間して活力67 \sim 70%の精液の受胎率は、わずかに31 \sim 36%に過ぎないことを報告したが本実験結果はこれらと同傾向を示しているように思われる。このような精子の活力保有日数と孵化能力所有日数との不一致の原因は、本実験の場合GPC-5液とリンゲル氏液とに保存した精子が、生存日数では大差がなく、孵化能力保有日数で著しい相違がみられることおよび前進精子の含有期間と孵化能力保有期間とが一致することから、主に精子の運動性に起因し、その様式が前進または一部の旋回運動精子では孵化能力を有するが大部分の旋回精子およびすべての振子運動精子ではその能力が欠除しているものと考えられ、さらに保存日数の増加に伴う精子の畸形化が

1 因とされよう。

精子の保存期間と孵化率との関係は、精子を長期間保存するほど孵化率が低下するのが普通であって、本実験の場合リングル氏液に保存した精子では、この傾向が認められるが、GPC-5液では保存期間が7日間から10日間および媒精日から6日間の間では、それぞれ期間が長いほど高率となる異常傾向を示した。この異常傾向が現われる原因は、保存液の作製日が媒精日より16日および7日前の2回で、液を作製してからそのなかに精巣を収容する期間が長いほど、その精子による孵化率が低下していることから、その間における保存液中の細菌の増加に影響されるものと思われる。その顕著な例としては、保存日数6日の精子により媒精した卵の孵化率は72.4%に対して、その前日から保存を開始した精子による孵化率は0%で、両者間に大きな相違が認められるが、これらの精巣は保存液を作製してから前者では1日、後者では9日後にそれぞれ収容したものである。試みに保存液を作製してから、それを室温(約15°C)で5日間放置したところ、硫酸塩液には球状、またGPC-5液の第1液には糸状および球状の細菌が多量、そしてリングル氏液およびGPC-5液の第2液には球状の細菌が少量観察された。これらの細菌は保存液を作製してから精巣を収容するまでの期間が長いほど多量に増加して、酸素および栄養を吸収すると同時に、毒素を排出し、精巣を収容する以前において、精子の生存に悪影響を及ぼす環境をつくることが考えられる。

このような見地から、精子の活力をさらに長期間保持させるには、保存液を無菌の状態に保つか、またはそれを作製してからできるだけ短時間内に精巣を収容することおよび精巣を保存中に再三新しくつくった媒溶液に移し換えて細菌を少なくし、しかも適当なpHを有する環境にすることが考えられる。

GPC-5液の実際的利用に際しては、魔法塩を使用することにより、比較的容易に目的が達成され、本実験における保存精子の孵化能力保有日数から、わが国と海外間との精子輸送が可能と思われる。

摘 要

1. 精子の保存環境が精子の活力、すなわち運動の様式、時間、速度に及ぼす影響についてしらべた。
2. 精子は魚類精子の媒溶液として従来使用されてきたリングル氏液よりもGPC-5液に保存した方が、その活力所有期間が長い。
 - A. 前進運動の精子が含有される期間は、10.8~13.0°C、平均11.4°Cの環境下において、GPC-5液に保存した精子では10~12日間、リングル氏液では5日間、硫酸塩液では1日以内である。
 - B. 旋回および振子運動の精子は、リングル氏液よりもGPC-5液に保存した精子の方が遅れて出現する。
 - C. 生存精子の含有率は、精子をGPC-5液に保存した場合に最も高く、つづいてリングル氏液、硫酸塩液の順位である。
 - D. 精子の運動速度は、GPC-5液に保存した精子の方がリングル氏液の場合よりも早い。
 - E. 精子の運動時間は、リングル氏液中に保存した精子では、生鮮精子と比べてほぼ等しいか、あるいは減少するのに対して、GPC-5液では著しく増大する。
 - F. 精子の運動様式は、生鮮精子と比べてGPC-5液に保存した精子では、一時期に活力の一層大きい様式へと変化するが、リングル氏液の場合は、常に活力の一層劣る様式へと移行する。
3. 精子の活力所有期間は、媒溶液中に低密度よりも高密度の状態に保存する方が、実験範囲内では長く、とくに最良の結果は精巣のままの状態に液中に収容した場合に得られた。
4. 精子は高温よりも低温下で保存した方がその活力所有期間が長い。
5. 精子は20°C以下の温度ではGPC-5液に、それ以上の温度ではリングル氏液に保存した方が、その生存期間が長い。
6. 7.4~9.4°Cのリングル氏液およびGPC-5液に保存した精子の孵化能力所有期間は、前者では4

日間、後者では11日間である。

7. GPC-5液に保存した精子により媒精した卵の孵化率は、リンゲル氏液の場合よりも高率である。
8. 畸形魚の出現率はGPC-5液よりもリンゲル氏液に保存した精子により媒精した方が高率である。

文 献

- 1) ATKINS, C.G., 1874: On the salmon of eastern North American and its artificial culture. *Rept. of Comm. of U.S. Fish and Fisheries*, 2.
- 2) BARRET, I., 1951: Fertility of salmonoid eggs and sperm after storage. *Jour. Fish. Res. Bd. Canada*, 8 (3).
- 3) HAEIBULLIN, C.C., 1938: Aktivität und Befruchtungs-fähigkeit von Aufbewahrtm Sperma Eines Schafbockes. *Probl. Zhirotn., Jahrg.*, 9, S. 142.
- 4) 川村智治郎, 1944: 鱈類放養の基礎的研究.
- 5) 森脇幾茂, 1912: 姫鱈精虫活力保続時間. 北水試, 第3回事業報告.
- 6) 中野宗治・野沢 鑑, 1925: 鱈の卵及び精虫活力試験. 水講試報, 21 (2).
- 7) 岡田 雫・伊藤哲司, 1955: 鮭人工孵化における不受精現象の研究—I. 精子の活力と受精力について. 水講試報, 10 (1,2).
- 8) ———・石川嘉郎・木村義一, 1956: 鮭人工孵化における不受精現象の研究—II. 精子及び卵子の生存能力について. 水講試報, 11.
- 9) RUTTER, C., 1902: The natural history of the Quinnat salmon. *Bull. U.S. Bur. Fish.*, 22.
- 10) 芝田清吾, 1948: 家畜人工授精の研究. 明文堂.
- 11) SMITH, R. T. and E. QUISTORFF, 1943: Experiments with the spermatozoa of the steel-head trout, *Salmo gairdnerii* and the chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Copeia*, 1943.
- 12) 鈴木 亮, 1951: ドジョウの未受精卵の発生 (予報). 採集と飼育, 13 (11).
- 13) 山本孝治, 1941 a. 斃死ワカサギの卵及び精子の活力に就いて, 水研誌, 36 (11).
- 14) ———, 1941 b. 斃死アユの卵及び精子の活力に就いて, 水研誌, 37 (1).
- 15) 山本時男, 1941 a. 受精及び賦活による魚卵表層の変化 (第2報). 動雑, 53 (11).
- 16) ———, 1941 b: 魚卵の滲透圧と透過性 (1~3). 植動, 9 (4), 9 (5), 9 (6).
- 17) ———, 1943: 魚類の発生生理. 養賢堂, 東京.