



家畜精子の先体反応に関する研究

楠, 比呂志

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

1989-03-31

(Date of Publication)

2007-10-03

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0816

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000816>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

家畜精子の先体反応に関する研究

平成元年 1 月

神戸大学大学院自然科学研究科

楠 比呂志

目 次

第1章 序 論	1
第2章 先体反応精子の判別法に関する研究	5
第1節 緒 言	5
第2節 トリプルステイン法および同簡便法による判別	6
第3節 トリパンプルー・ギムザ染色法による判別	20
第4節 小 括	30
第3章 先体反応の人為的誘起法に関する研究	32
第1節 緒 言	32
第2節 摘出雌性生殖道を用いた先体反応の誘起	33
第3節 各種合成培地による先体反応の誘起	46
第4節 完全無機合成培地における先体反応の誘起	56
第5節 小 括	71
第4章 先体反応精子の特性に関する研究	73
第1節 緒 言	73
第2節 先体反応精子の卵子侵入特性	73
第3節 先体反応精子の運動能、生存性および卵子侵入能保持時間	80
第4節 先体反応精子に対するカフェインおよびイミダゾールの影響	86
第5節 小 括	89
第5章 先体反応精子の利用に関する研究	91
第1節 緒 言	91
第2節 X、Y精子の判別法に関する研究	91
第3節 先体反応精子の体外保存法に関する研究	98
第4節 小 括	104
第6章 総 括	106
謝 辞	109
引用文献	110

第1章 序 論

精子の頭部先端に特殊な構造物が存在することは、精子の発見者であるLeeuwenhoek¹⁻⁴⁾により“*plaga pellucida rotunda*”として既に記載されていた。この構造物は、その後、Lenhossek⁵⁾によって“*Akrosoma*(*acrosome*)”と呼ばれ、やがてそれが統一された名称となっている^{7,8)}。*Akrosoma*(和名; 先体)は後生動物の一部の例外を除いて⁹⁻³⁷⁾、無脊椎動物および脊椎動物の精子で広く知られてきたが、その意義が明らかにされたのは近年のことである。Dan^{118,120,121)}は、ウニの精子を卵子が存在する海水中に置くと、精子の先体が形態変化するとともに先体内容物が開口分泌されることを位相差顕微鏡を用いて観察し、この変化を*acrosome reaction*(和名; 先体反応)と名付けた。その後、同様の先体反応は、ウニ以外の無脊椎動物^{119,122-136)}や脊椎動物^{137,138)}の精子でも広く観察され、今では先体を持つ動物に普遍的に見られる現象の一つであると考えられている。精子における先体の形態、および先体反応時における形態変化は、電子顕微鏡の発達によって次第に明らかにされている。たとえば、精子ならびに先体の形態は、動物の種類によって千差万別であるが³⁸⁾、一般に哺乳動物の精子は、遺伝子をおさめている頭部と運動機関に当たる尾部から構成され、先体は精子頭部の前半を覆う形で存在している。なお、家畜精子の先体の基本構造は、単位膜である先体膜の中に先体物質(*acrosomal contents*)を含んだ嚢状をなすが、先体膜のうち、外側の原形質膜(*plasma membrane*)に接している範囲を先体外膜(*outer acrosomal membrane*)、内側で核膜と接している範囲を先体内膜(*inner acrosomal membrane*)と呼ぶ。先体膜の折り返しの部分は、特に赤道節(*equatorial segment*)と呼ばれ、先体の主部と区別されているが、赤道節は頭部のほぼ中央部で扁平な頭部の両面に扇状を呈しながら頭部を一巡している(*Fig. 1*)。

先体は精子完成によってゴルジ装置から由来したもので^{6,100-116,524)}、その内部には卵子の外被の基質を分解する作用を持つ生体物質が含まれている。哺乳動物では早くから、先体内にヒアルロニダーゼ活性が確認され、精子浮遊液中に卵子を置くと、精子の持つヒアルロニダーゼの作用によって卵子を包む顆粒膜細胞層が分散することが知られている^{39-49,534,535)}。さらにSrivastava et al.^{50,51)}は、ヒツジ、ウシおよびウサギの精子の先体にトリプシン様の酵素が存在することを報告し、Polakoski et al.⁵²⁾は、ブタ精子から抽出されたトリプシン様酵素にアクロシンと名付けている。なお、その発見と並行し

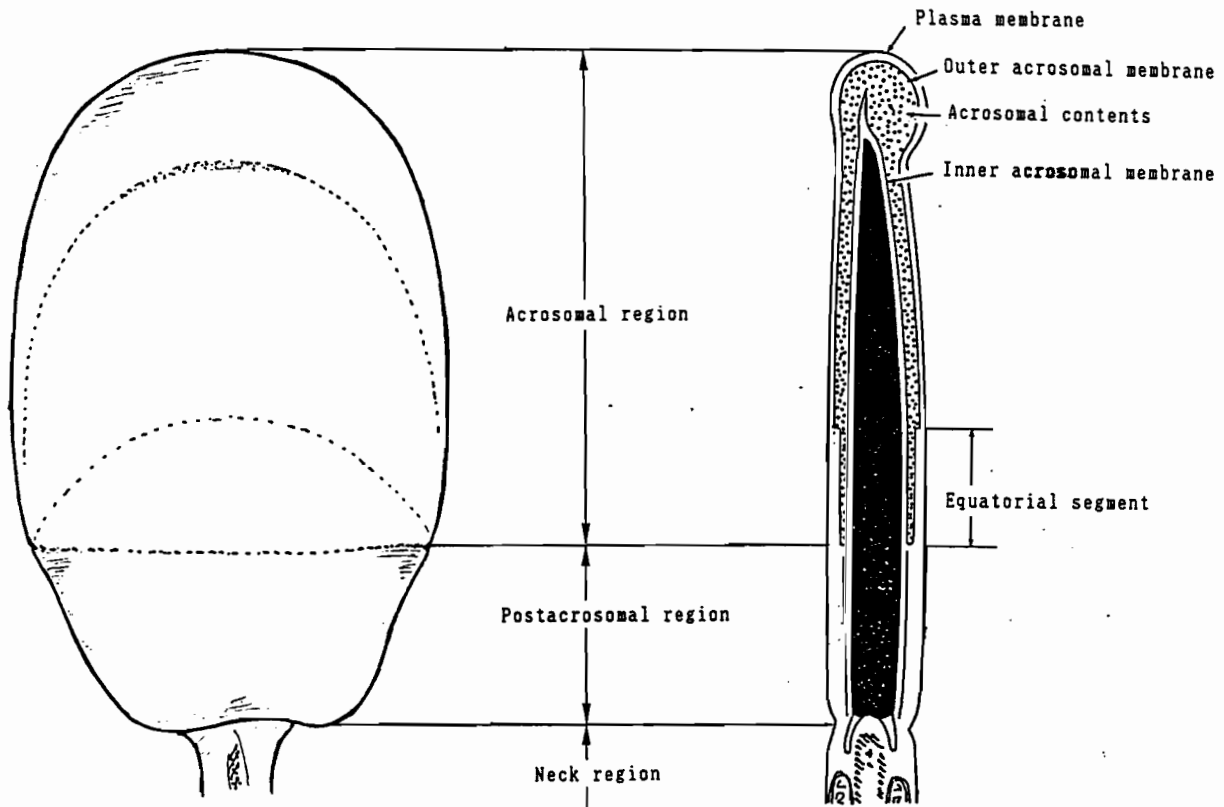


Fig. 1. Diagrams of an appearance and a sagittal section of domestic animal sperm head.

て、この酵素が透明帯を溶解する作用を持つことも明らかにされている^{52-74, 76-86, 400, 401, 403-407, 536-538}。また、これらのほかに哺乳動物精子の先体内で認められている酵素としてエステラーゼ^{87, 88}、ノイラミニダーゼ^{89, 91}、酸性ホスファターゼ^{88, 93}、ホスホリパーゼ⁶⁴、アリルスルファターゼ A^{90, 92, 94}、 β -N-アチルグルコサミニダーゼ^{55, 397}、コラゲナーゼ⁶⁵、アリルアミダーゼ⁹⁵、アスパルチラミダーゼ⁹⁶、カルパイン II⁹⁷、カテプシン-D 様プロテアーゼ^{98, 399}、 β -グルコシダーゼ⁹⁹、 β -ガラクトシダーゼ³⁹⁷、 β -グルクロニダーゼ³⁹⁷、 α -L-フコシダーゼ³⁹⁷、ホスフォリパーゼ C³⁹⁸、オルニチンデカルボキシラーゼ⁴⁰²やディペプチジルペプチダーゼ II⁷⁵などがあるが、これらの効果についてはまだ不明である。

先体反応の様式は動物の種類によって無脊椎動物型と哺乳動物型の2種類にわけられる。哺乳動物型の先体反応では(Fig. 2)、先体部の精子原形質膜と先体外膜が部分的に融合して多数の開口部を生じ、その開口部から先体内の分解酵素が放出されるが、先体内膜は先体反応後も無傷で残り、先体部と後帽部の境の部分で原形質膜と連結して、精子頭部の最外層の膜となる。一方、海産無脊椎動物型では、原形質膜と先体膜の融合によって先体の

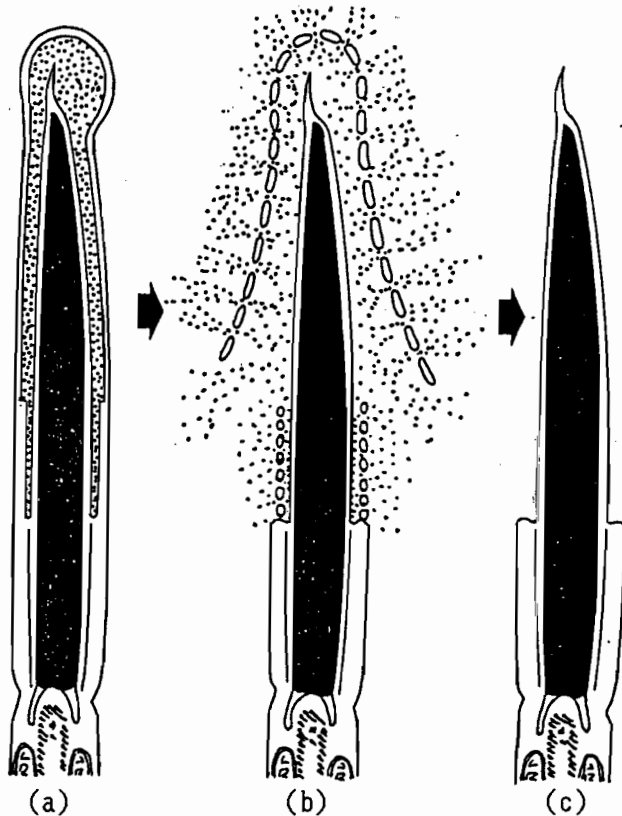


Fig. 2. Diagrams showing the progression of the acrosome reaction in domestic animal spermatozoon.

(a) Before the reaction. (b) The reaction is in progress. (c) The reaction is complete.

内容物が開口分泌されるが、その後は、先体内膜が1本または数本の盲細管として前方に伸長する。この盲細管は先体突起と呼ばれ、海産無脊椎動物の精子はこの先体突起の部分で卵子の原形質膜と接触することが知られている。

体外受精を行なう無脊椎動物では、受精現象の研究は早くから行なわれていたが、体内受精する哺乳動物では遅れている。その理由として、哺乳動物の成熟精子を体外で卵子に直接媒精しても受精が起こらず、体外受精を行なうことは以前は不可能であった。

しかし、Austin¹³⁹⁾とChang¹⁴⁰⁾は、それぞれラットとウサギにおいて、精子が機能的に完成し、先体反応を起こして卵子と受精する能力を獲得するには、雌の生殖道内において最終の成熟変化を受ける必要があることを明らかにし、その変化は、Austin¹⁴¹⁾によってcapacitation (和名; 受精能獲得) と命名された。なお、受精能獲得した精子では、原形質膜の構成成分が量的、位置的に変化し¹⁴⁴⁻¹⁶⁸⁾、表面荷電、流動性、透過性などの膜特性も変化し^{152, 169-176)}、精子の呼吸能を含む代謝能が増大する^{143, 177-190)}と報告されている。受精能獲得の発見によって哺乳動物の体外受精が可能となり、その後は、多くの実験動物^{191-206, 526, 575)}やウシ^{207, 527-530)}、ブタ^{208, 525, 531)}、ヒツジ²⁰⁹⁾およびヤギ²¹⁰⁾で体外受精が成功するようになり、それら精子の先体反応の研究も次第に行なわれるようになった。しかし、これまでの先体反応の研究は、主としてマウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギなどのいわゆる実験小動物を材料としたもので、家畜を対象とした研究はあまり行なわれていない。

近年急速に発展しつつある家畜繁殖技術のなかで、受精現象の詳細な解明とその制御技術の開発は当面の緊急な課題となっているが、そのためにも、家畜精子の先体反応について正確に把握することは極めて意義が高いと思われる。本研究は、ヤギ、ウシ、ブタなどの家畜精子における先体反応の実態と、その意義を解明することを目的として行なわれた。

第2章 先体反応精子の判別法に関する研究

第1節 緒 言

先体反応の研究においては、先体反応を起こした精子（先体反応精子）を正確に判別することがもっとも必要な基本条件となる。ウニやヒトデなど無脊椎動物の精子の先体反応は、先体物質を放出したのち、先体突起の形成など著明な形態変化を伴うため、先体反応の有無を光学顕微鏡で判定することが容易である。また、哺乳動物でもハムスターやモルモットの精子は比較的大型の先体を持つため、光学顕微鏡で先体反応の有無を確認することができる^{212, 213)}。しかし、家畜を含めた大部分の哺乳動物の精子では、先体は小型であるため先体反応の有無を光学顕微鏡で判定するのは難しい。そこで、これらの動物では、精子の先体反応の判定法として、体外受精による方法、透過型電子顕微鏡(TEM)による方法、あるいは染色による方法などが用いられている。

これらのうち、体外受精を行なって精子の卵子への侵入能力を確かめる方法は、精子が機能的、生理的また形態的に確実な先体反応を起こしたことを判定することができる。しかし、この方法は、家畜では卵子の入手が難しく、特殊な技術や設備を必要とするため、主に実験小動物でのみ行われていた。しかし近年、Hanada & Chang^{214, 215)}とYanagimachi²¹⁶⁾は、酵素処理で顆粒膜細胞層と透明帯を除去したハムスター卵子が、ラットやマウス、モルモットなどの異種動物の先体反応精子の侵入を許容することを発見し、このことから、透明帯除去ハムスター卵子に侵入可能か否かによって先体反応の有無を判定する方式が確立され^{217-222, 558-561, 570)}、ヤギ²²³⁾、ウマ³³³⁾、ウシ^{224, 520, 521)}、ブタ^{225, 226, 523)}およびヒツジ^{210, 522)}などの家畜精子の判定にも利用され始めている。

精子の先体に対する染色法としては、保存精子の先体の形態異常などを調べるために開発されたギムザ染色²²⁷⁻²²⁹⁾、Wells-Awa染色²³⁰⁾およびナフトール黄S・エリスロシンB染色²³¹⁾などが知られている。しかし、精子の先体の脱落は、先体反応によって起こる場合と、精子の死滅によって原形質膜および先体外膜が崩壊するために起こる場合があり¹⁴²⁾、これらの染色法では、先体の脱落が先体反応によるものか死後崩壊によるものかの区別ができない。

また、Saling & Storey²³³⁾は、蛍光色素を標識とする判定法として塩酸クロルテトラサイクリン(CTC-HCl)を用い、未固定の精子の先体に存在する Ca^{2+} とCTC-HClをキレートさ

せて先体を標識したのち、CTC-HClの蛍光の消失をもって精子の先体反応を判定する方法を提案した。この方法では、先体部の蛍光の有無と同時に、精子の運動性も観察できるため、運動（生存）精子における先体の脱落、すなわち正規の先体反応が判定できるが、マウス以外の動物種で用いられた報告はない。またTalbot & Chacon²³⁴⁾は、固定したヒト精子の先体をFITC結合トウゴマ種子凝集素60(FITC-RCA)を用いて標識し、先体部のFITC-RCAの蛍光の消失をもって先体反応を判定できると報告しているが、この方法では、固定した精子を使用するため、先体反応と先体崩壊との区別ができない。なお、これらの蛍光色素による標識法では、蛍光の急速な減衰が起こるため、標本の保存が困難で直ちに観察する必要がある。

TEMによる方式は、先体反応を起こした精子でみられる頭部の原形質膜と先体外膜の間で起こる規則的な胞状化を観察する¹⁴²⁾もので、先体反応特有の変化を正確に観察できる。しかし、この方法は、技術的に複雑でかなりの長時間を必要とするため日常的に使用することは困難である。そこで本章では、家畜精子の先体反応を簡便かつ正確に判定する方法を開発するため、主として染色法によって光学顕微鏡レベルで先体反応精子を判別する方法を検討した。また、判定の確認のため、透明帯除去ハムスター卵子への侵入能やTEMによる判別法についても比較検討した。

第2節 トリプルステイン法および同簡便法による判別

最近、Talbot & Chacon^{237, 238)}とTalbot & Dudenhausen²³⁹⁾は、ヒト先体反応精子の判別法として、トリパンブルー生体染色により生存精子と死滅精子を分別し、ついでビスマルクブラウンおよびローズベンガル染色により後帽部と先体部を染め分けるトリプルステイン法(TS法)を報告した。この方法は、精子の染色標本を光学顕微鏡下で観察することにより先体反応を起こしたか否かを判別できるもので、本節では、このTS法が、ヤギ、ウシ、ブタなどの家畜の先体反応精子の判別法として利用できるか否かを検討するとともに、TS法の簡易化を試み、より効率的な先体反応精子判別法を開発せんとした。

I. 材料および方法

ヤギ精液は日本在来種雄ヤギ4頭から、ウシ精液は黒毛和種雄ウシ3頭から人工陰法に

Table 1. Composition of media used for sperm treatment, hamster test, and in vitro maturation and fertilization of goat follicular oocytes in this study.

Components (mM)	B0 ¹	K-1	K-2	K-3	K-4	K-5
NaCl	112.00	120.20	124.57	125.83	162.83	166.21
KCl	4.02	4.02	-	-	-	-
CaCl ₂ 2H ₂ O	2.25	2.25	2.25	2.25	2.25	-
MgCl ₂ 6H ₂ O	0.52	0.52	-	-	-	-
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0.83	0.83	0.83	-	-	-
NaHCO ₃	37.00	37.00	37.00	37.00	-	-
Glucose	13.90	-	-	-	-	-
Na-pyruvate	1.25	-	-	-	-	-
Penicilline G ²	7.5 iu/ml	-	-	-	-	-
BSA ³	3 mg/ml	-	-	-	-	-

¹Brackett & Oliphant²³⁵⁾.

²Potassium salt.

³Bovine serum albumin (Fraction V).

より採取し、ブタ濃厚部精液はランドレース種雄ブタ3頭から手圧法により分画採取した。精液はウシ血清アルブミン無添加のBrackett & Oliphant²³⁵⁾液 (BSA欠B0液) (Table 1) で等倍 (ブタ) または8倍 (ヤギおよびウシ) 希釈し、600×gで5分間の遠心分離により3回洗浄したのち、精子を適量の同液に浮遊させた (約 1.5×10^9 精子/ml)。精子浮遊液の一部は、精子の先体反応を誘起する目的で、ヤギ、ウシおよびブタ精子については過排卵処理ハムスターから、またウシおよびブタ精子についてはマウスから摘出した子宮内において37℃で1時間、2～5時間または5.5時間インキュベートしたのち、BSA欠B0液で子宮内を灌流して精子を回収し、1回洗浄したのちBSA欠B0液に再浮遊させた (約 1×10^7 精子/ml)。残りのヤギおよびウシ精子浮遊液はBSA欠B0液で段階的に50倍希釈し、その一部は試験管内に取って37℃の恒温器内で5.5時間インキュベートし、また一部については-20℃凍結と融解を3回繰り返した。こうして得られた各精子試料を用い、TS法^{317, 318)}の原法または著者が考案したTS簡便法により染色した (Fig. 3)。

TS法の原法およびTS簡便法の主な相違点は、原法では、トリパンブルー染色後および固

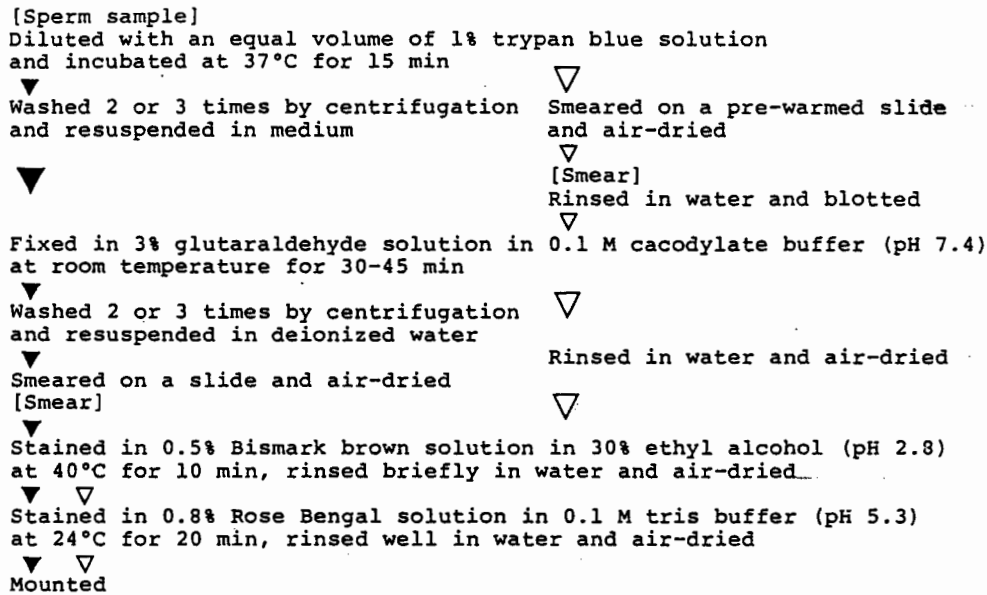


Fig. 3. Flow chart of the triple-stain technique.
▼; Original, ∇; Simplified.

定後にいずれも2回以上の遠心分離によってトリパンプルーと固定液を洗浄除去したのちに塗抹するのに対し、TS簡便法ではトリパンプルー染色の直後に塗抹し、トリパンプルーを水洗除去したのち固定および水洗したことである。染色標本は、400倍または1,000倍の光学顕微鏡下で観察し、1枚の標本に付き100~400個の精子頭部をランダムに調べた。

TS法におけるトリパンプルー染色が生体染色法として家畜精子の生死判別に有効か否か、またローズベンガル染色が家畜精子の先体観察に適するか否かを確認する目的で、ヤギ精子を材料として、精子の生死判別法として知られるニグロシン-エオシン染色法および先体染色法のひとつであるWells-Awa染色²³⁰⁾との比較を行なった。すなわち、ニグロシン-エオシン染色法では、精子試料と同量のニグロシン-エオシン染色液(10g/dlのニグロシンと1g/dlのエオシンの混合液)をスライドガラス上で混和し、直ちに塗抹し、火炎固定した。観察は400倍で行ない、1枚の標本に付き100~300個の精子頭部をランダムに調べ、頭部全体または後帽部が赤く染まった精子を死滅、その他を生存精子と判定した(Fig. 4)。また、Wells-Awa染色法では、精子試料に等量のWells-Awa染色液(1%エオシンB溶液と1%ファーストグリーンFCF溶液とエチルアルコールを1:2:1.7の割合で混合した液)を加え、37°Cで2~5分間インキュベートしたのち、スライドガラスに塗抹し、37°Cの加温盤上で風乾し、バルサム封入したのち、400倍で観察し、1枚の標本に付き100~400個の精子頭部をランダムに調べた。Wells-Awa染色では精子の核は赤く、先体は青く染め



Fig. 4. Goat live and dead (arrow) spermatozoa identified by a nigrosin-eosin staining. Original magnification, x1,000.

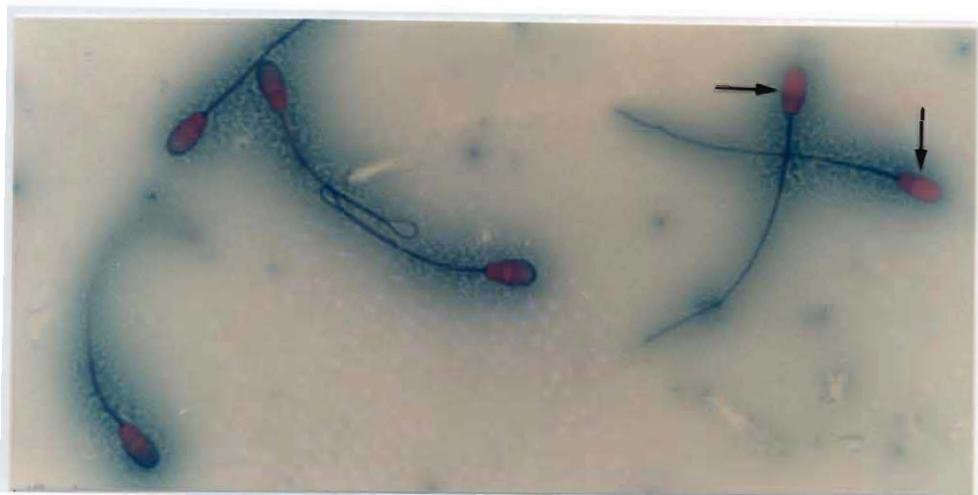


Fig. 5. Goat spermatozoa with and without (arrows) a normal acrosome identified by a Wells-Awa staining. Original magnification, x400.

られるため、正常先体を持つ精子とこれを失った精子の2種類が分類された(Fig. 5)。

また、ヤギ、ウシおよびブタ精子試料の一部を用いて、Hanada & Nagase^{33,6)}の方法に準じてハムスターテストも行なった。すなわち、成熟雌ゴールデンハムスターを、LD14:10 (午前5時点灯、午後7時消灯)の光条件下で飼育し、Post-oestrous discharge(POD)の有無を毎日観察し、4日周期の正常な性周期が2回以上認められた個体を実験に使用した。PODが膣口に観察された日の午後に、PMSG 30iuを腹腔内に注射し、その53~54時間後にhCG 30iuを腹腔内に注射して過排卵を誘起した。hCG注射の15~17時間後に、摘出した卵管の

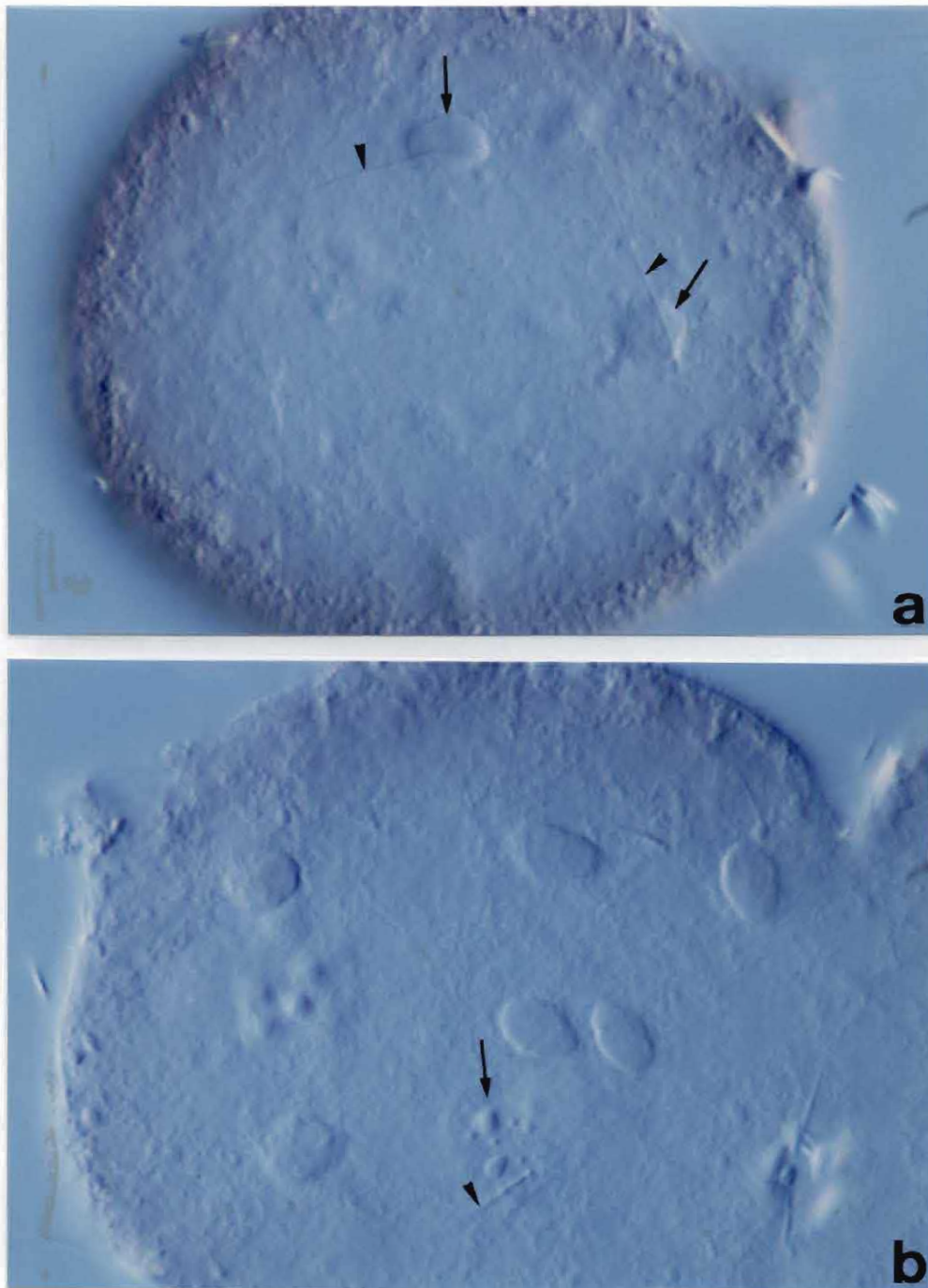


Fig. 6. Penetration of goat spermatozoa into zona-free hamster eggs. a; swollen sperm heads (arrows) and their sperm tails (arrow heads), b; male pronucleus (arrow) and its sperm tail (arrow head). Acetolacmoid stain. Differential interference-contrast. Original magnification, x400.

膨大部から卵子塊を回収し、0.1%ヒアルロニダーゼ処理および0.05%トリブシン処理により顆粒膜細胞層および透明帯を除去したのち、透明帯除去卵子を受精用培地に移した。なお、受精用培地には0.35 mlのB0液を用いた。媒精は、0.05 mlの精子浮遊液を添加して

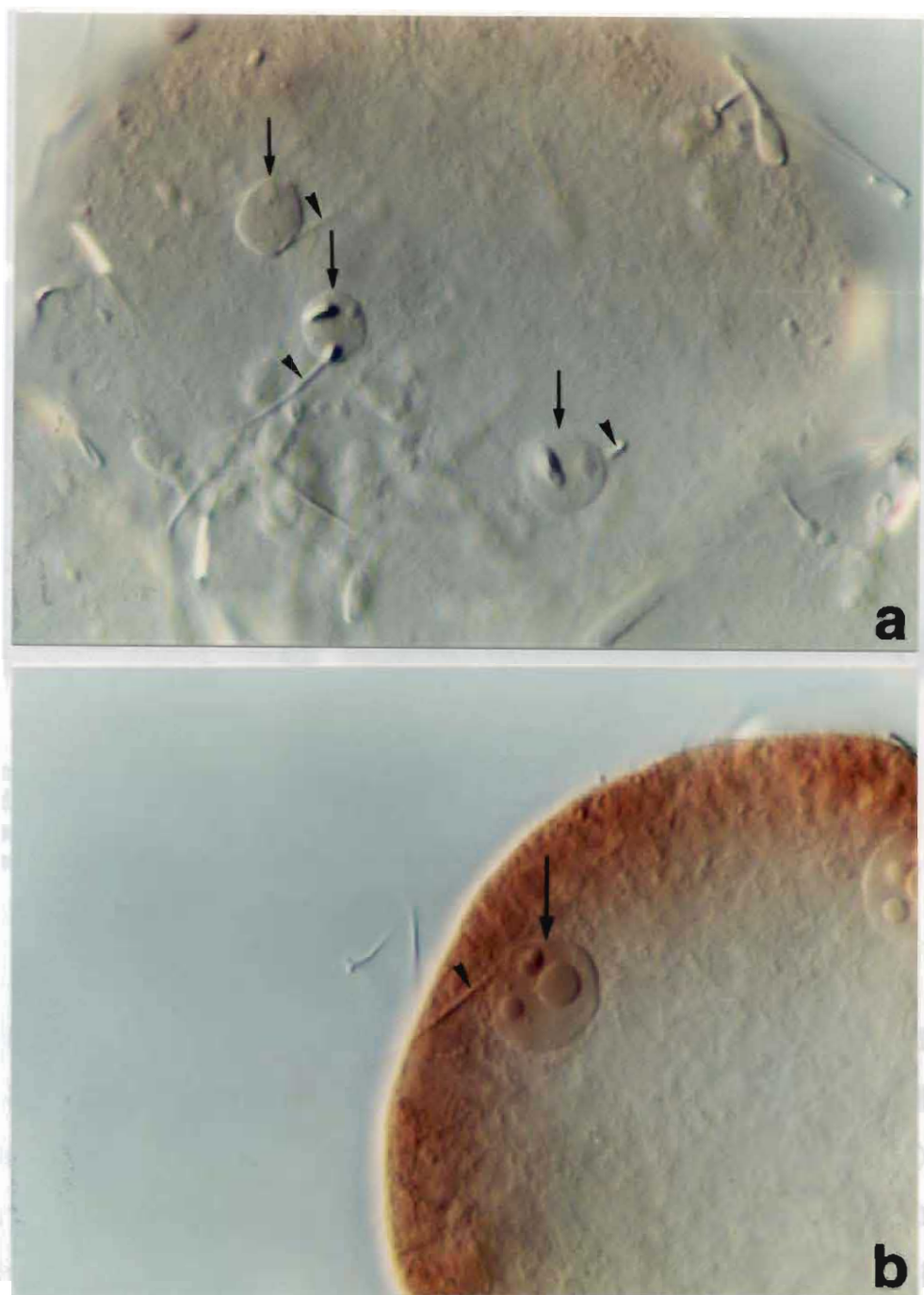


Fig. 8. Penetration of boar spermatozoa into zona-free hamster eggs. a; swollen sperm heads (arrows) and their sperm tails (arrow heads), b; male pronucleus (arrow) and its sperm tail (arrow head). Acetolacmoid stain. Differential interference-contrast. Original magnification, x400.

いは雄性前核とそれらの尾部が観察された場合に精子侵入があったと判定した(ヤギ ; Fig. 6、ウシ ; Fig. 7、ブタ ; Fig. 8)。

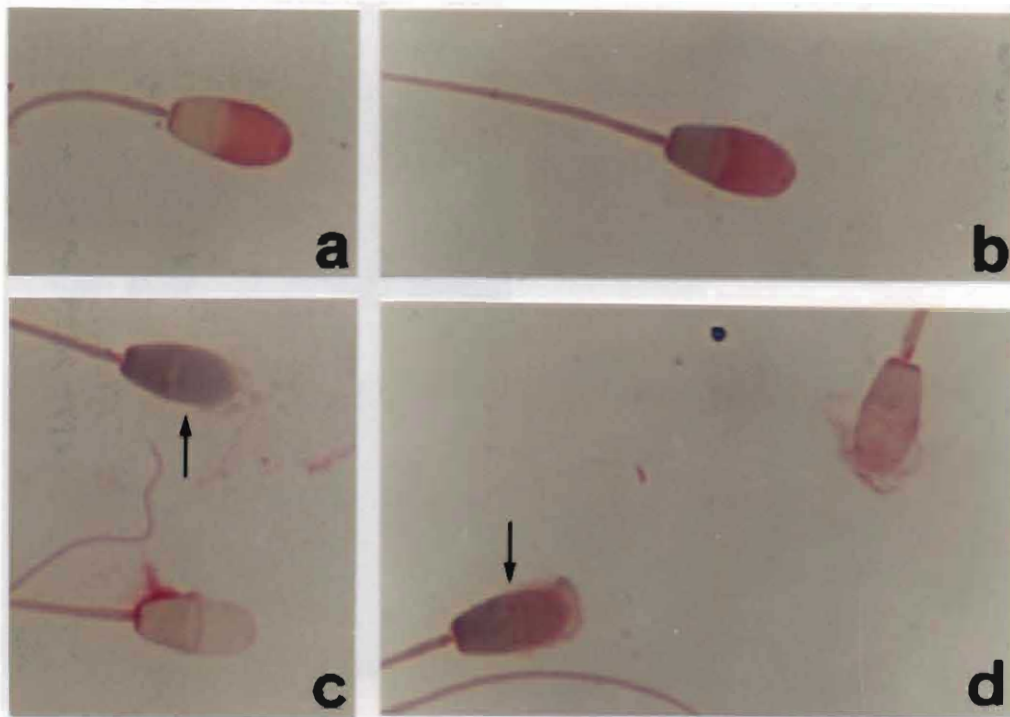


Fig. 9. Goat spermatozoa stained by a simplified triple-stain technique. a; live spermatozoon with a normal acrosome, b; live and dead (arrow) spermatozoa without an acrosome, c; dead spermatozoon with a normal acrosome, d; live and dead (arrow) spermatozoa with a damaged acrosome. Original magnification, x1,000.

II. 結 果

TS法またはTS簡便法による染色の結果、いずれの方法で染色した場合でも、動物種にかかわらず次の4種類の染色様式を示す精子が観察された。すなわち、②;後帽部が淡褐色で、先体部が赤色のもの(ヤギ; Fig. 9a、ウシ; Fig. 10a、ブタ; Fig. 11a)、⑤;後帽部が淡褐色で、先体部が不染(ヤギ; Fig. 9b、ウシ; Fig. 10c、ブタ; Fig. 11c)または部分的に赤色のもの(ヤギ; Fig. 9d、ウシ; Fig. 10b、ブタ; Fig. 11b)、③;後帽部が暗褐色で、先体部が暗赤色のもの(ヤギ; Fig. 9c、ウシ; Fig. 10d、ブタ; Fig. 11a)、④;後帽部が暗褐色で、先体部が不染または暗青色(ヤギ; Fig. 9b、ウシ; Fig. 10a、ブタ; Fig. 11d)あるいは部分的に暗赤色のもの(ヤギ; Fig. 9d、ウシ; Fig. 10a、ブタ; Fig. 11b)に分類できた。TS法の原理に従えば、トリパンブルー染色により頭部不染の生存精子と頭部全体または後帽部のみが青く染まる死滅精子とが染め分けられ、次いでビスマルクブラウン染色により後帽部が淡褐色の生存精子と暗褐色の死滅精子とに染め分けられ、最後にローズベンガル染色により赤色または暗赤色の正常先体を持つあるいは持たない生存

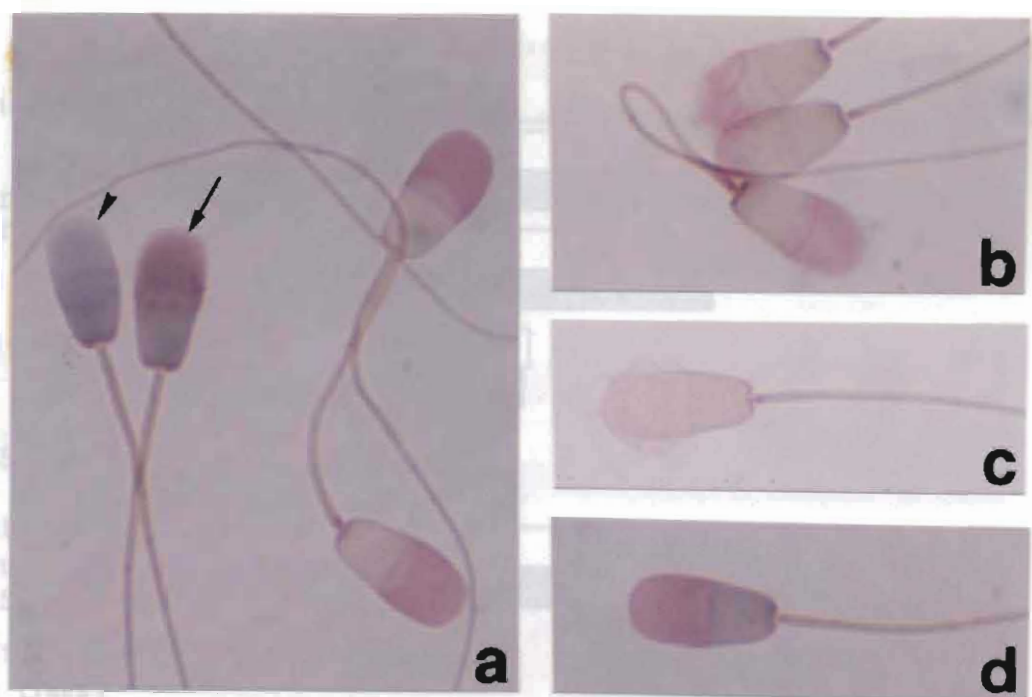


Fig. 10. Bull spermatozoa stained by a simplified triple-stain technique. a; live spermatozoa with a normal acrosome and dead spermatozoa with a damaged acrosome (arrow) and without an acrosome (arrow head), b; live spermatozoa with a damaged acrosome, c; live spermatozoon without an acrosome, d; dead spermatozoon with a normal acrosome. Original magnification, x1,000.



Fig. 11. Boar spermatozoa stained by a triple-stain technique. a; live (arrows) and dead (arrow head) spermatozoa with a normal acrosome, b; live and dead (arrow) spermatozoa with a damaged acrosome, c; live spermatozoa (arrows) without an acrosome, d; dead spermatozoon (arrow) without an acrosome. Original magnification, x1,000.

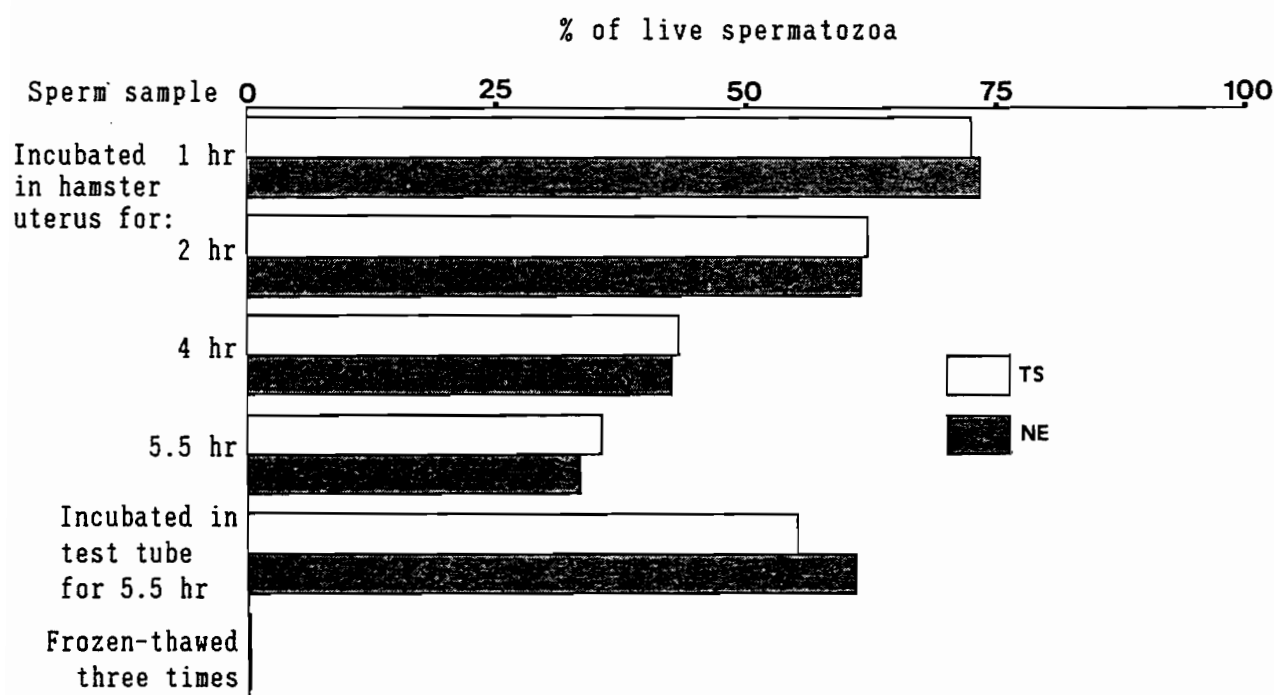


Fig. 12. Comparison between percentages of live spermatozoa assessed by a simplified triple-stain technique (TS) and a nigrosin-eosin staining (NE) (n=20).

または死滅精子に分けられたものと考えられる。したがって、上記分類の②は“正常先体を持つ生存精子”、③は“正常先体を持たない生存精子”、④は“正常先体を持つ死滅精子”、⑤は“正常先体を持たない死滅精子”と判断した。なお、分類③および⑤で先体部が部分的に赤色または暗赤色の精子は、先体の膨化または崩壊像を示すものであった(Figs. 9d, 10a, b & 11b)。

ヤギ精子を材料として、TS簡便法とニグロシン-エオシン染色法で得られた生存精子率を比較した結果(Fig. 12)、ハムスター子宮内で1時間、2時間、4時間および5.5時間インキュベートした試料の精子生存率の平均は、TS簡便法でそれぞれ54、41、32および20%、ニグロシン-エオシン染色法で55、46、30および21%となり、互いによく一致していた。このことはBSA欠B0液中で5.5時間インキュベートした試料および凍結融解後の試料でも同様であった。また、これらの染色法による精子生存率の間で有意な相関が認められた($r=0.89$, $P<0.001$, $n=26$)。なお、TS法およびTS簡便法の場合、トリパンプルー添加後のインキュベート時間は10~15分間が適当であり、これより短時間では生存性を過大評価し、長時間では試料によっては過小評価になる傾向があった。

また、上記と同様のヤギ精子試料を用い、TS簡便法およびWells-Awa染色法により先体

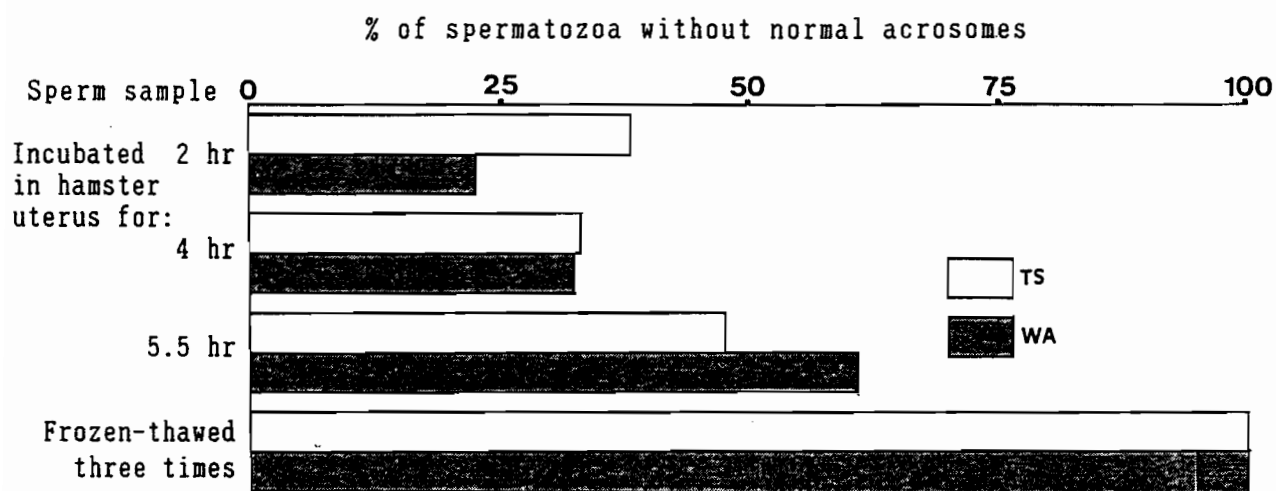


Fig. 13. Comparison between percentages of spermatozoa without a normal acrosome assessed by a simplified triple-stain technique (TS) and a Wells-Awa staining (WA) (n=11).

の形態異常を調べた結果(Fig. 13)、先体の膨化、崩壊または離脱を示す精子の割合は試料により著しく異なったが、TS簡便法およびWells-Awa染色法の間で大きな差はみられなかった。また、これら2つの染色法の間には正常先体を持たない精子の割合について有意な相関が認められた($r=0.99$; $P<0.001$, $n=17$)。

ブタ精子試料をTS法(Fig. 14a)およびTS簡便法(Fig. 14b)により染色し、それぞれの方法で得られた生存精子率と“正常先体を持たない生存精子”の割合を比較した結果(Table 2)、TS法およびTS簡便法により得られた生存精子率の間には有意な差は認められなかった($t=1.5$, $P>0.05$, $n=12$)。一方、TS簡便法で得られた“正常先体を持たない生存精子”の

Table 2. Comparison between percentages of live spermatozoa without normal acrosome assessed by an original triple-stain technique and its simplified technique.

Treatment of spermatozoa			No. of tests	% of live spermatozoa without normal acrosome [% of live spermatozoa]	
				Original technique	Simplified technique
Incubated in isolated hamster uteri for:	3 hr	2		12.5 [31.3]	17.0 [35.9]
	4 hr	2		14.3 [53.2]	29.8 [52.5]
Incubated in isolated mouse uteri for:	2 hr	2		11.6 [24.0]	12.8 [26.9]
	3 hr	3		19.2 [41.5]	25.9 [46.1]
	4 hr	2		35.2 [56.8]	45.4 [57.0]
	5 hr	1		13.6 [15.1]	17.3 [21.5]

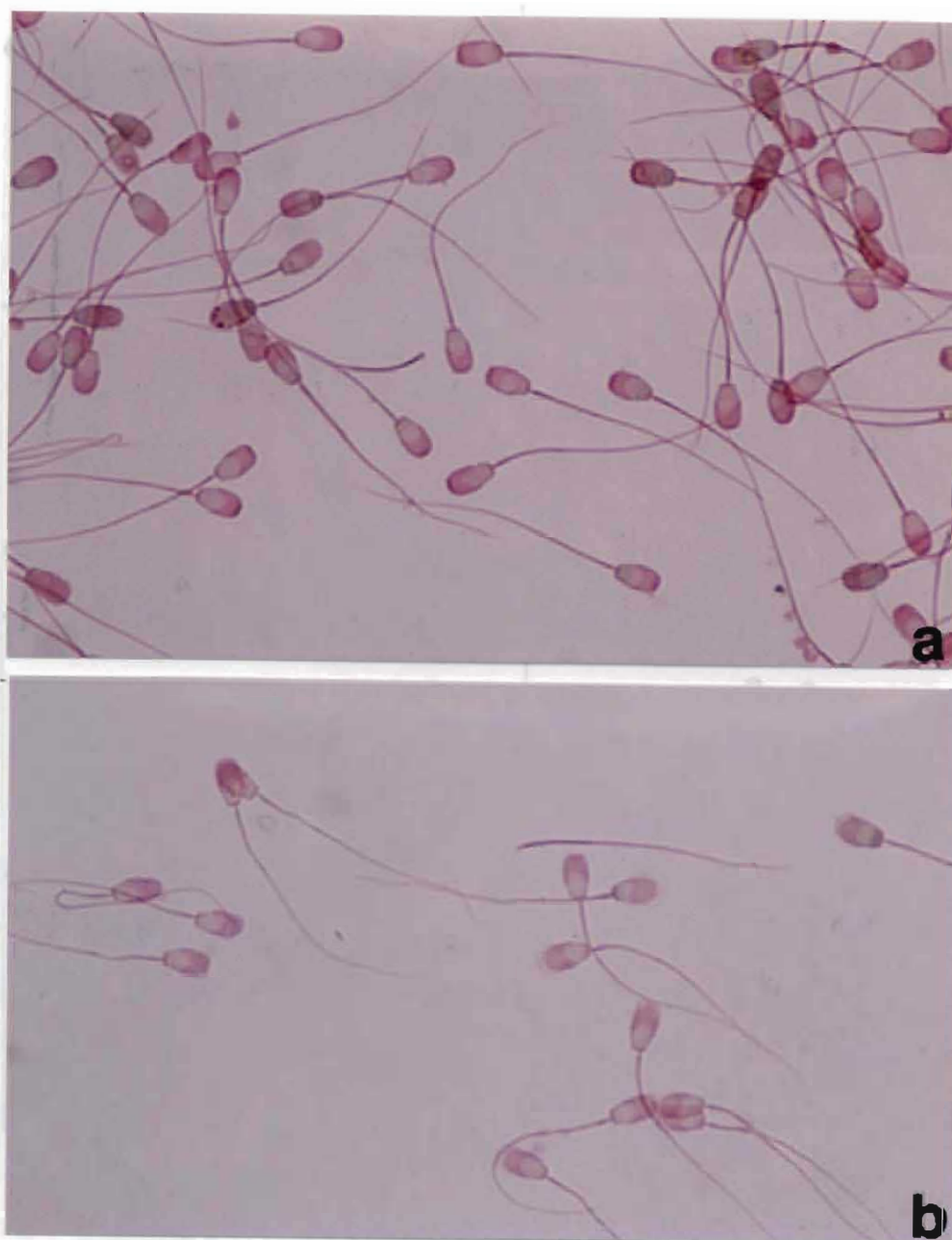


Fig. 14. Fresh boar semen stained by a triple-stain technique (a) and its simplified technique (b), showing numerous live spermatozoa with (a) or without (b) a normal acrosome. Original magnification, x400.

割合は、TS法に比べ常に3～10%高く、その差は有意であった($t=4.4$, $P<0.01$, $n=12$)。

なお、ヤギ精子でも同様の実験を行なったが、TS法およびTS簡便法により区別された4種類の精子の分布はよく一致し、また両者の方法の間で“正常先体を持たない生存精子”の割合に有意な差は認められなかった($t=0.56$, $P>0.05$, $n=43$)。また、ウシでも両者の方法で得られた成績はよく一致した。

TS法(ブタ)またはTS簡便法(ヤギ、ウシ、ブタ)により判別された4種類の精子の各種試料中での割合と、同一試料を用いてハムスターテストを行なった時に得られた精子侵

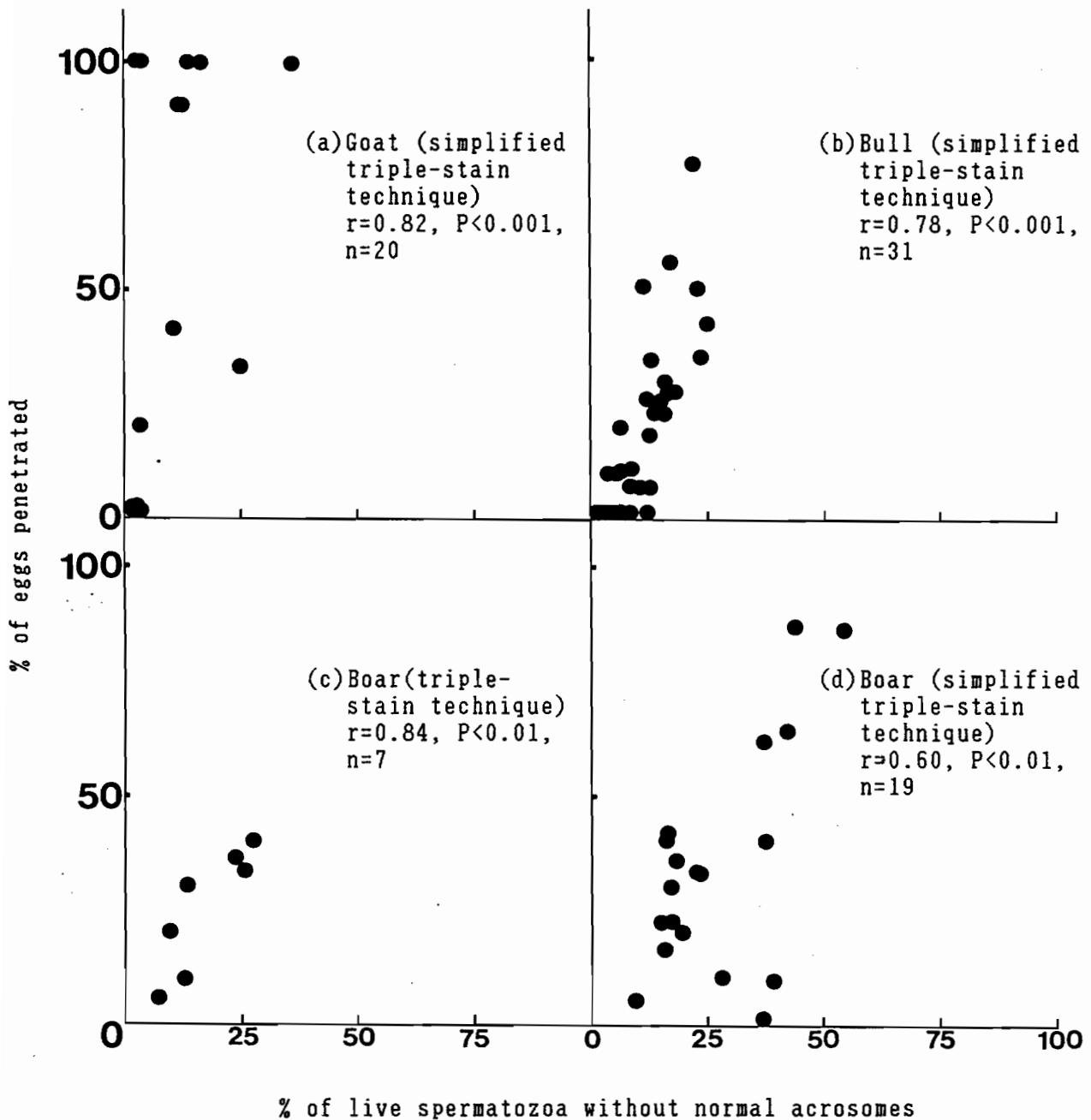


Fig. 15. Correlation between percentages of goat (a), bull (b) and boar (c,d) live spermatozoa without normal acrosomes assessed by a triple-stain technique (c) or its simplified technique (a,b,d) and those of zona-free hamster eggs penetrated by their spermatozoa. r was the correlation coefficient that was calculated with the values transformed to angles.

入卵子率との関係について検討した。4種類の精子の割合および精子侵入卵子率を角変換したのち、それぞれの種類の精子の割合と精子侵入卵子率の間の単相関係数を求めたところ、いずれの動物種においても、“正常先体を持たない生存精子”の割合(ヤギ; Fig. 15a、ウシ; Fig. 15b、ブタのTS法; Fig. 15c、ブタのTS簡便法; Fig. 15d)と精子侵入卵子率の間に有意な正の相関が認められた(ヤギ; $r=0.82$, $P<0.001$, $n=20$ 、ウシ; $r=0.78$, $P<0.001$, $n=31$ 、ブタのTS法; $r=0.84$, $P<0.01$, $n=7$ 、ブタのTS簡便法; $r=0.60$, $P<0.01$, $n=19$)。

III. 考 察

TS法およびTS簡便法によりヤギ、ウシおよびブタ精子を染色した場合、いずれの動物の精子もこれらの染色法で同様に染まり、正常先体を持つ生存精子と死滅精子、正常先体を持たない生存精子と死滅精子の4種類に分類することができた。これらの染色結果は、色調や先体の形態に関する細部を除けば、Talbot & Chacon^{237, 238)}がヒト精子で認めた染色結果ともほぼ一致していた。また、ヤギで調べた結果、TS法におけるトリパンブルー染色で得られた生存精子率はニグロシン-エオシン染色法で得られた生存精子率と一致し、またローズベンガル染色で得られた先体異常率はWells-Awa染色法²³⁹⁾で得られた先体異常率とよく一致していた。このことから、TS法は家畜精子個々の生死と先体の形態変化の有無を同時に判定できる有用な染色法であることが判明した。さらに、ヤギ、ウシ、ブタのいずれにおいても、ハムスターテストで得られた精子侵入卵子率と、TS法（ブタ）またはTS簡便法（ヤギ、ウシ、ブタ）により得られた“正常先体を持たない生存精子”の割合との間には有意な正の相関が認められた。このことからみると、本研究において、透明帯除去ハムスター卵子に侵入した家畜精子は、TS法またはTS簡便法によって判別された“正常先体を持たない生存精子”と考えられ、この種類の精子が先体反応を起こした精子であると推察される。

採取直後の新鮮なブタ精液をTS法およびTS簡便法で染色すると、TS法では精液中のほとんどの精子で正常先体が認められたが、TS簡便法では正常先体を持たない精子が多数認められた。また、同じ子宮内前培養ブタ精子試料をTS法とTS簡便法で染色した場合、4種類の精子の分布に差が認められた。すなわち、TS簡便法で染色した場合、正常先体を持たない精子、特に“正常先体を持たない生存精子”の割合が、TS法で染色した場合に比べ有意に高く判定された。これらのことから、ブタ精子をTS簡便法で染色すると“正常先体を持たない生存精子”、すなわち先体反応精子の割合を過大に評価する危険があると考えられる。一方、ヤギ精子の場合、TS簡便法で得られた先体反応精子の割合とTS法で得られた割合とはほぼ一致しており、両染色法で得られた先体反応精子の割合の差は統計的にも有意ではなかった。また、ウシ精子の場合もヤギと同様の結果であった。TS法とTS簡便法との間のもっとも大きな相違点は、TS法ではグルタルアルデヒド固定後に精子をスライドガラスに塗抹するのに対して、TS簡便法では固定前に塗抹し、風乾することである。液状保存または凍結保存の研究^{240, 241)}から、ブタ精子の先体がヤギやウシ精子に比べて著しく

脆弱であることが報告されており、精子を未固定の状態でスライドガラスに塗抹・風乾するTS簡便法の操作は、ヤギやウシの精子の先体には影響がなくても、ブタ精子の先体に対しては変性的に作用すると考えられる。TS簡便法はTS法に比べ手順をかなり簡略化しており、多数の標本を比較的短時間で処理できるという利点を持つが、本研究の結果からみると、ブタ精子ではTS簡便法ではなくTS法を採用すべきであると考えられる。

本研究中、TS法またはその簡便法により比較的高い先体反応精子率が得られた精子試料を、透明帯除去ハムスター卵子に媒精して検討した結果、精子侵入卵子率が低い場合があったが、これらの精子試料では、正常先体を持つ生存精子の割合も比較的高いこと、すなわち、生存精子のうちの先体反応精子の占める割合が低い場合が多かった。一般に、体外受精を行う場合、*in vivo*に比べて卵子を含む培地に非常に多くの精子を添加する。したがって、生存精子のうちの先体反応精子の占める割合が低い精子試料を培地に添加した場合、運動性が低下している先体反応精子よりも、活発な前進運動する正常先体を持つ生存精子のほうが先に大量に卵子に到達すると考えられる。これらの正常先体を持つ生存精子は透明帯除去ハムスター卵子には侵入できないが、その表面に大量に付着し、卵子を覆ってしまった場合、先体反応精子は卵子表面への付着や侵入が不可能になるのかも知れない。また、生存精子のうちで先体反応精子の占める割合がいくら高くても、生存精子率そのものが低い場合、卵子への精子侵入成績は低下していた。したがって、体外受精における媒精用の精子試料としては、生存精子率が高く、また生存精子中で先体反応精子の占める割合が高いものを選ぶべきである。TS法およびその簡便法は、これらの判定方法として極めて有効である。

第3節 トリパンブルー・ギムザ染色法による判別

本節では、TS法やTS簡便法よりも一層有用な家畜精子の先体反応の判定法を開発する目的で、ヤギ、ウシおよびブタ精子を用い、トリパンブルー生体染色²⁴⁵⁾とギムザ染色²²⁸⁾を組み合わせた方法を試みた。

I. 材料および方法

ヤギ精液は雑種雄ヤギ1頭から、ウシ精液は黒毛和種雄ウシ1頭およびホルスタイン種

[Sperm suspension]

↓
Diluted with an equal volume of
1% trypan blue solution
and incubated at 37.0-39.5°C
for 15 min

↓
Smear on a pre-warmed slide
and air-dried

[Smear]

↓
Rinsed in water and blotted

↓
Fixed in ORTH solution
at room temperature for 45 min,
rinsed in water and blotted

↓
(Soaked in 80% ethyl alcohol
for a few seconds and blotted)

↓
Stained in buffered Giemsa solution
(pH 7.4) at room temperature
for 90 min, rinsed in water
and air-dried

↓
Mounted

Fig. 16. Flow chart of the trypan blue-Giemsa method.

雄ウシ 1 頭から人工腔法により採取し、ブタ濃厚部精液は梅山豚 3 頭から手圧法により分画採取した。精液は、著者が考案した K-1 液、K-2 液、K-3 液または K-4 液（第 3 章第 4 節）を用いて等倍（ブタ）、また 8 倍（ヤギ、ウシ）希釈し、600×g で 5 分間の遠心分離により 3 回洗浄したのち、同液に精子濃度が $3 \sim 5 \times 10^9$ 精子/ml となるように浮遊させた。こうして得た洗浄試料の一部は、先体反応を誘起する目的で、密封ガラス管（第 3 章第 4 節）内において 39.5 °C で 1 時間、2 時間または 3 時間インキュベートし、また、一部の洗浄

試料については、-20°C 凍結と融解を 3 回繰り返した。

これらの洗浄試料、インキュベーション試料および凍結融解試料を用い、トリパンプルー・ギムザ染色法（TG 染色法）（Fig. 16）による染色を行った。得られた染色標本は 400 倍または 1,000 倍の顕微鏡下で観察し、1 枚の標本につきランダムに 200～400 個の精子頭部を調べた。また、TS 簡便法との比較の目的で、ヤギ精子試料については TS 簡便法（前節）による染色も行なった。また、ヤギ、ウシおよびブタ精子試料については、同時に透明帯除去ハムスター卵子への侵入能力（前節）も調べた。さらに、ヤギおよびブタ精子試料の一部は、直ちにグルタルアルデヒドとオスミウムで二重固定し、アルコール上昇系列で脱水したのち、スパー樹脂に包埋した。ついで、Porter blum 型ウルトラミクロトームを用いて超薄切片を作製し、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で電子染色を行ったのち、日立 H-300 型電子顕微鏡（TEM）を用い、80-90kV の加速電圧下で 4,000～20,000 倍で観察した。

II. 結 果

TG 染色の結果、精子は動物種にかかわらず、次の 4 種類の染色様式に大別できた。す

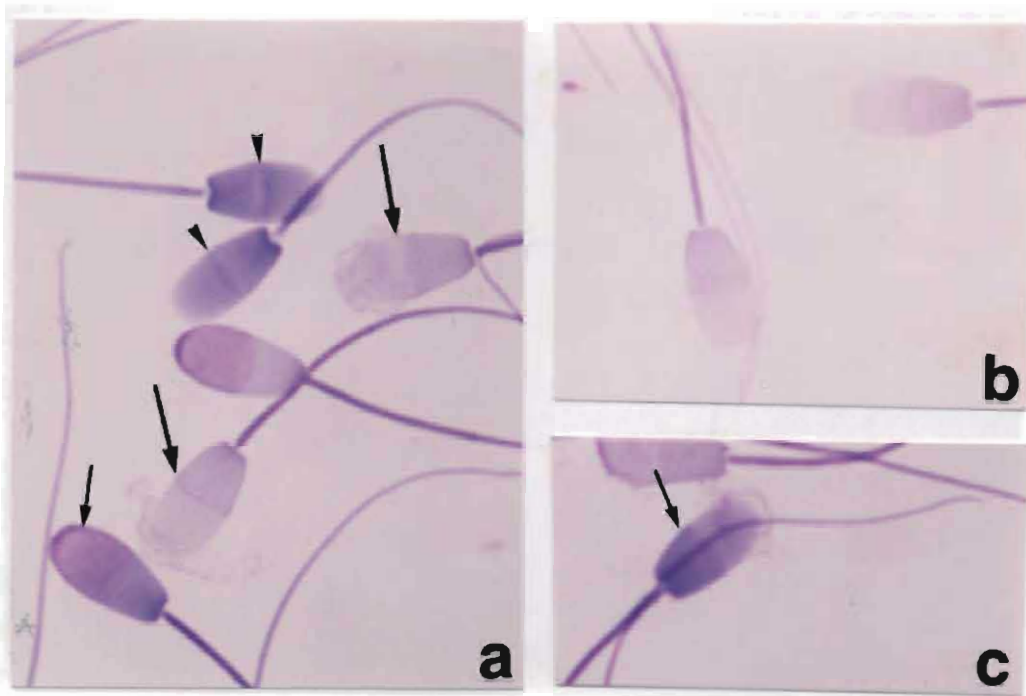


Fig. 17. Goat spermatozoa stained by a trypan blue-Giemsa method. a; live spermatozoa with a normal acrosome and a damaged acrosome (large arrows) and dead spermatozoa with a normal acrosome (small arrow) and without an acrosome (arrow heads), b; live spermatozoa without an acrosome, c; dead spermatozoa with a damaged acrosome (arrow). Original magnification, xl,000.

なわち、㉑; 後帽部が不染または淡青色で、先体部が赤紫色のもの(ヤギ; Fig. 17a、ウシ; Fig. 18a、ブタ; Fig. 19a)、㉒; 後帽部が不染または淡青色で、先体部が不染(ヤギ; Fig. 17b、ウシ; Fig. 18b、ブタ; Fig. 19b)または部分的に赤紫色のもの(ヤギ; Fig. 17a、ウシ; Fig. 18b、ブタ; Fig. 19c)、㉓; 後帽部が暗青色で、先体部が暗赤紫色のもの(ヤギ; Fig. 17a、ウシ; Fig. 18a、ブタ; Fig. 19d)、㉔; 後帽部が暗青色で、先体部が暗青色(ヤギ; Fig. 17a、ウシ; Fig. 18b、ブタ; Fig. 19e)または部分的に暗赤紫色のもの(ヤギ; Fig. 17c、ウシ; Fig. 18b、ブタ; Fig. 19f)、であった。TG染色法の染色性によれば、トリパンプルー染色により、頭部不染の生存精子と頭部全体または後帽部のみが青く染まる死滅精子に染め分けられ、次いでギムザ染色により赤紫色(生存精子)または暗赤紫色(死滅精子)の正常先体を持つものと、これを持たないものに分けられたものと考えられ、上記分類の㉑を“正常先体を持つ生存精子”、㉒を“正常先体を持たない生存精子”、㉓を“正常先体を持つ死滅精子”、㉔を“正常先体を持たない死滅精子”と判定するのが妥当である。

各試料中でTG染色法により判別された4種類の精子の割合と、同一試料を用いてハムス

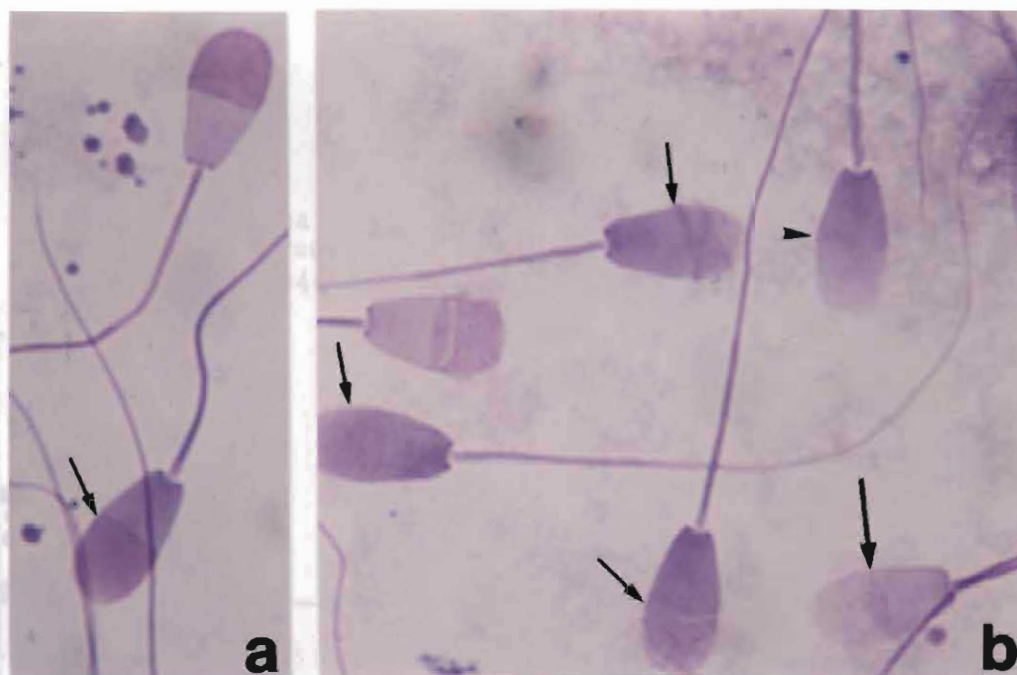


Fig. 18. Bull spermatozoa stained by a trypan blue-Giemsa method. a; live and dead (arrow) spermatozoa with a normal acrosome, b; live spermatozoa with a damaged acrosome and without an acrosome (large arrow) and dead spermatozoa with a damaged acrosome (small arrows) and without an acrosome (arrow head). Original magnification, x1,000.

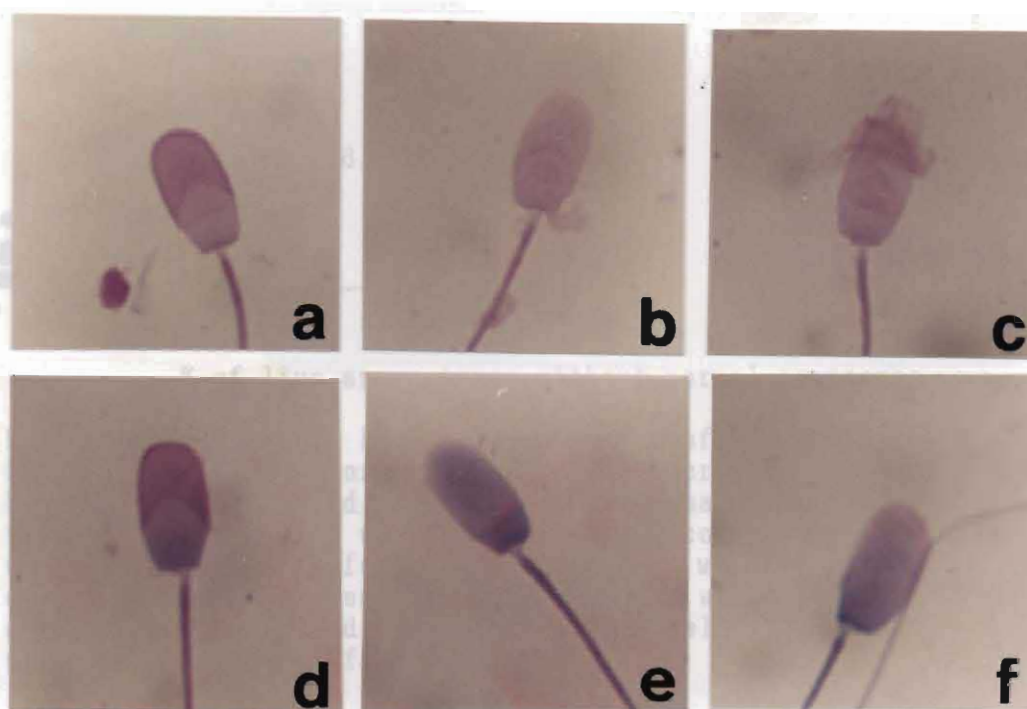


Fig. 19. Boar spermatozoa stained by a trypan blue-Giemsa method. a; live spermatozoon with a normal acrosome, b; live spermatozoon without an acrosome, c; live spermatozoon with a damaged acrosome, d; dead spermatozoon with a normal acrosome, e; dead spermatozoon without an acrosome, f; dead spermatozoon with a damaged acrosome. Original magnification, x1,000.

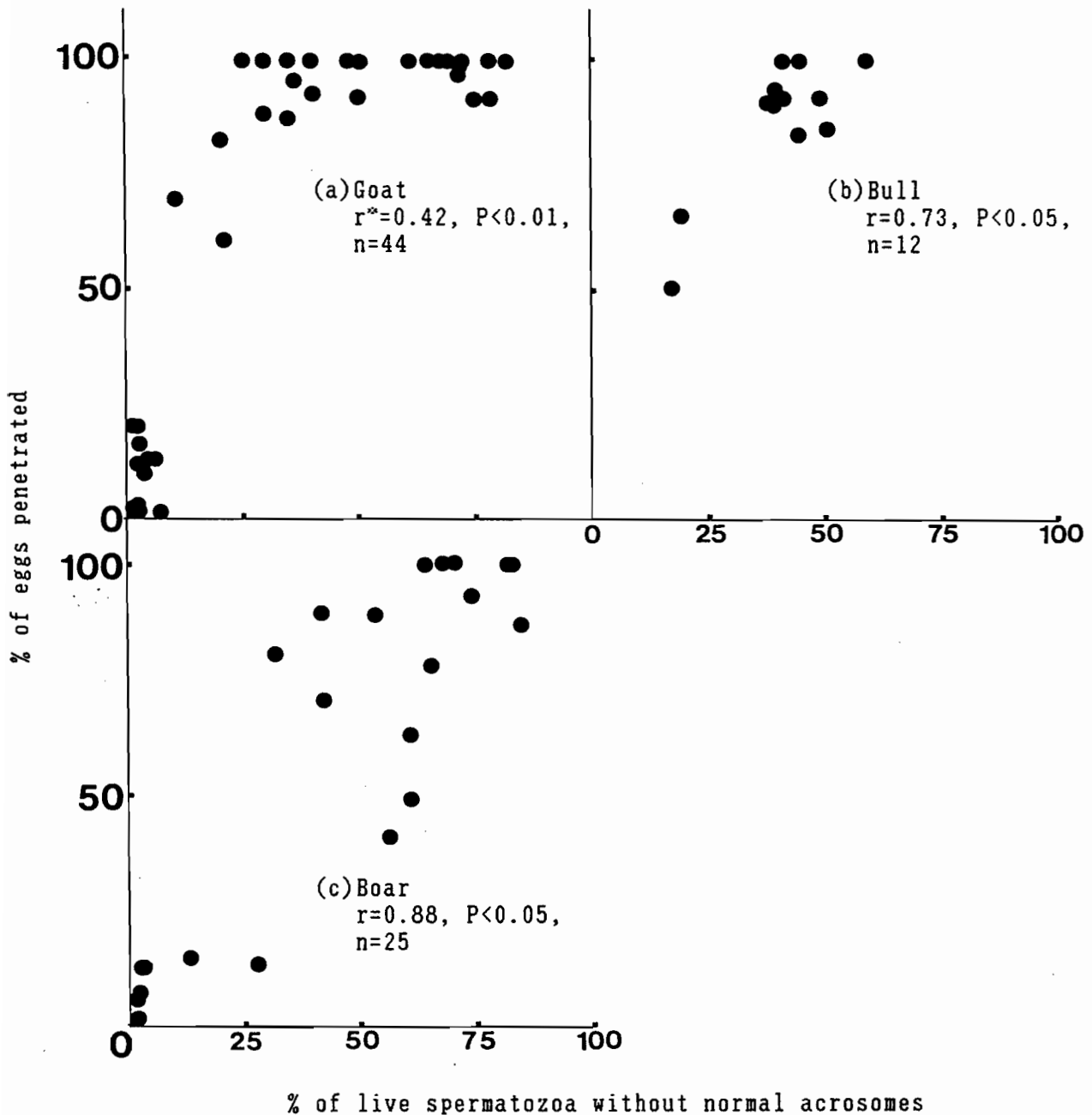


Fig. 20. Correlation between percentages of goat (a), bull (b) and boar (c) live spermatozoa without normal acrosomes assessed by a trypan blue-Giemsa method and those of zona-free hamster eggs penetrated by thier spermatozoa. r was the correlation coefficient that was calculated with the values transformed to angles. r^* was the partial correlation coefficient when percentages of live cells with normal acrosomes and those of dead cells with and without them were held constant, and was calculated with the values transformed to angles.

ターテストを行なった場合の精子侵入卵子率との関係について検討した。すなわち、4種類の精子の割合および精子侵入卵子率を角変換したのち、それぞれの種類の精子の割合と精子侵入卵子率の間の単相関係数（ウシ、ブタ）または偏相関係数（ヤギ）を求めたところ、いずれの動物種においても、“正常先体を持たない生存精子”の割合（ヤギ; Fig. 20a、

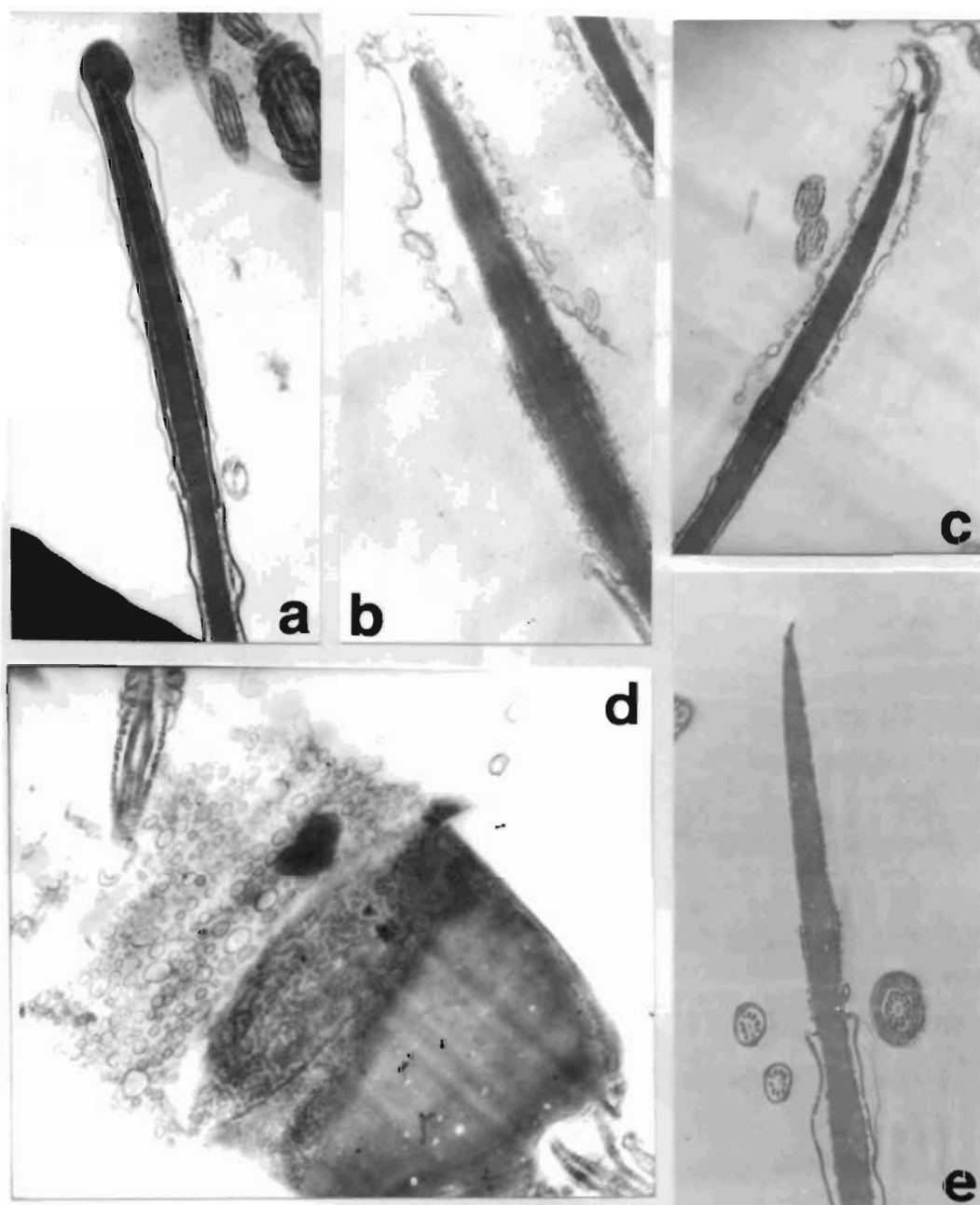


Fig. 21. Sagittal (a-c, e) and longitude (d) section of goat spermatozoa. a; spermatozoon with a normal acrosome, b; spermatozoon with undefined nuclus, c-e; acrosome-reacted spermatozoon. Original magnification, x15,000 (a, c-e) and x20,000 (b).

ウシ ; Fig. 20b、ブタのTS法 ; Fig. 20c)と精子侵入卵子率の間に有意な正の相関が認められた (ヤギ ; $r=0.42$, $P<0.01$, $n=44$ 、ウシ ; $r=0.73$, $P<0.05$, $n=12$ 、ブタ ; $r=0.88$, $P<0.05$, $n=25$)。

次に、ヤギ精子を材料として、K-3液を用いて3回洗浄を行った試料をTEMで観察した結果、試料中の78%が正常な先体を持つ精子 (Fig. 21a) で、その他はすべて核の輪郭が不

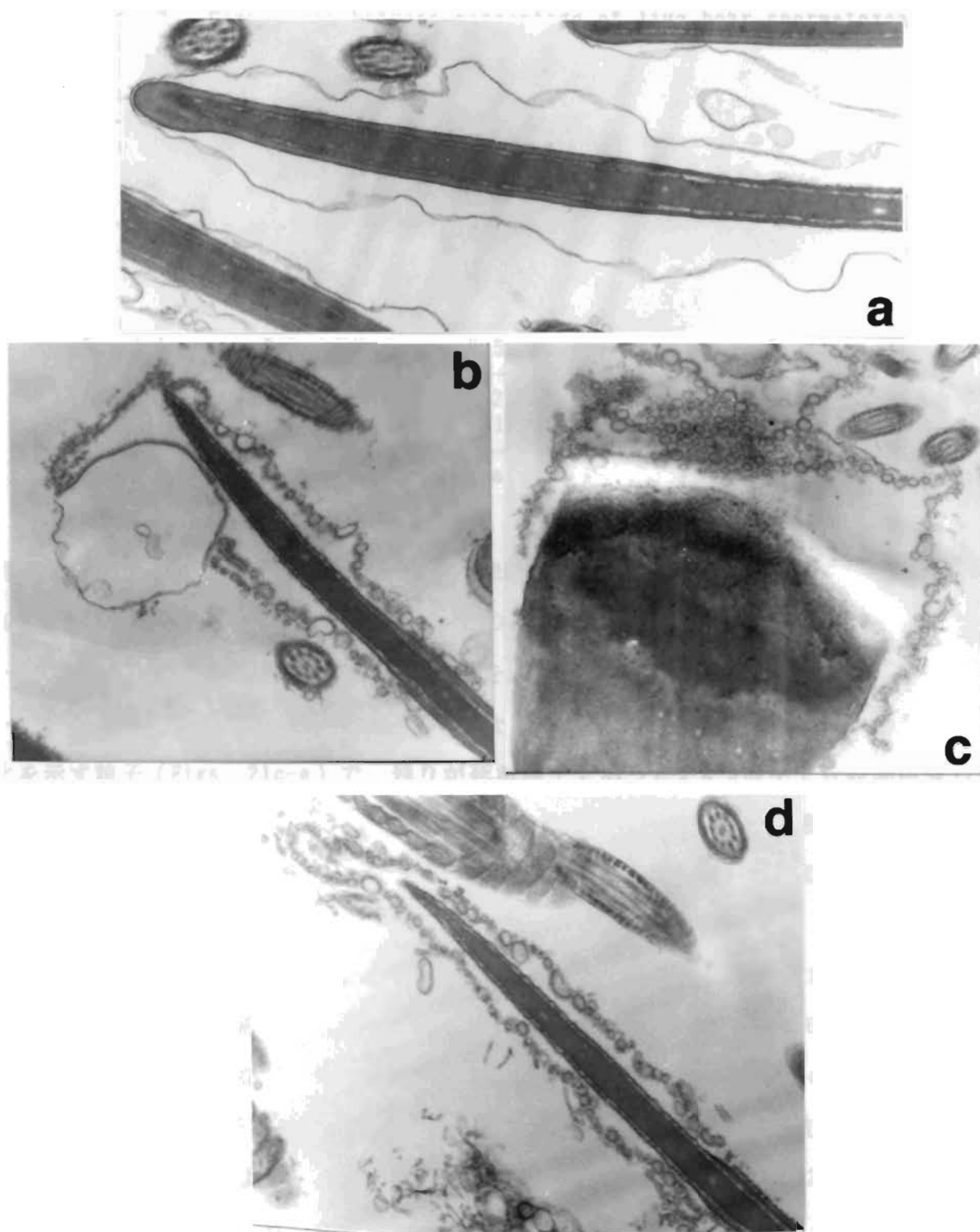


Fig. 22. Sagittal (a, b, d) and longitude (c) section of boar spermatozoa. a; spermatozoon with a normal acrosome, b-d; acrosome-reacted spermatozoon. Original magnification, x15,000 (b-d) and x35,000 (a).

Table 3. Comparison between percentage of live boar spermatozoa without normal acrosome assessed by a trypan blue-Giemsa (TG) method and that of acrosome-reacted boar cells assessed by a transmission electron microscopic (TEM) observation.

Treatment of spermatozoa	Sample number	% live sperm without normal acrosome assessed by TG method	% acrosme-reacted sperm assessed by TEM observation
Washed	1	3.9	3.1
	2	2.7	3.9
Incubated ¹ for 1 hr	3	12.4	9.8
	4	7.5	10.8
Incubated ¹ for 2 hr	5	75.2	78.9
	6	72.1	70.9

¹Washed boar spermatozoa were resuspended in K-3 medium and incubated in a sealed glass tube at 39.5°C.

明瞭な死滅精子 (Fig. 21b) であった。また、この試料をTG染色したところ、試料中の80%が‘正常先体を持つ生存精子’で、残りの20%は‘死滅精子’と判別された。さらに、K-3液およびK-4液中で2時間培養した試料をTEMで観察すると、正常な先体を持つ精子はK-3液およびK-4液ともに2%で、それぞれ全体の51%および41%が先体反応特有の形態変化を示す精子 (Figs. 21c-e) で、残りが死滅精子であった。K-3液中で3時間培養した試料では、正常な先体を持つ精子は全く認められず、先体反応特有の形態変化を示す精子が34%で、その他は死滅精子であった。一方、TG染色の結果では、‘正常先体を持つ生存精子’、‘正常先体を持たない生存精子’および‘死滅精子’の割合は、K-3液中で2時間培養した試料では3%、52%および45%、K-4液中で2時間培養した試料では2%、40%および58%、またK-3液中で3時間培養した試料では1%、32%および67%で、それぞれTEMで観察された正常な先体を持つ精子、先体反応精子および死滅精子の割合とよく一致した。また、ブタ精子を材料として、TG染色法により判別した“正常先体を持たない生存精子”の割合とTEMにより先体反応特有の形態変化を示す精子 (Figs. 22b-d) の割合を比較した結果 (Table 3)、6つの試料のいずれにおいてもその割合はよく一致し、統計的にも両者の数値間に有意な差は認められなかった ($t=0.095$, $P>0.01$, $n=6$)。

ヤギ精子を材料として、TG染色法とTS簡便法で得られた染色結果を比較したところ (Table 4)、TG染色法およびTS簡便法のいずれの場合も、洗浄直後の試料では約83%が正常先体を持つ生存精子、3時間インキュベートした試料では約75%が正常先体を持たない生存

Table 4. Percentages of live and dead goat spermatozoa with or without normal acrosomes assessed by a trypan blue-Giemsa method (TG) and a simplified triple-stain technique (TS).

Treatment of spermatozoa	No. of samples	Staining method	Live sperm(%[s.e.])		Dead sperm(%[s.e.])	
			with normal acrosome	without normal acrosome	with normal acrosome	without normal acrosome
Washed three times	20	TG	83.2[1.8]	0.0[0.0]	1.3[0.2]	15.5[1.8]
		TS	83.3[1.7]	0.0[0.0]	1.0[0.7]	15.7[1.7]
Incubated ¹	20	TG	0.2[0.1]	75.3[1.7]	0.1[0.0]	24.0[1.1]
		TS	0.1[0.0]	75.6[0.8]	0.1[0.0]	24.2[0.8]
Frozen-thawed three times	20	TG	0.0[0.0]	0.0[0.0]	0.0[0.0]	100.0[0.0]
		TS	0.0[0.0]	0.0[0.0]	0.0[0.0]	100.0[0.0]

¹Washed goat spermatozoa were resuspended in K-3 medium and incubated in a sealed glass tube at 39.5°C for 3 hr.

精子、凍結融解試料ではすべてが正常先体を持たない死滅精子となり、両染色法により判別された4種類の精子の試料中での割合はよく一致していた。

Ⅲ. 考 察

TG染色法によりヤギ、ウシおよびブタ精子を染色すると、動物種にかかわらずこれら動物の精子は、その染色様式により正常先体を持つ生存精子と死滅精子、正常先体を持たない生存精子と死滅精子の4種類に分類することができた。また、ヤギ、ウシ、ブタのいずれにおいても、ハムスターテストで得られた精子侵入卵子率とTG染色法により判別された正常先体を持たない生存精子の割合との間には有意な正の相関が認められた。さらに、ヤギおよびブタで調べた結果から、TG染色法により判別された正常先体を持つ生存精子、正常先体を持たない生存精子および死滅精子の割合は、それぞれTEMにより観察された正常な先体を持つ精子、先体反応特有の形態変化を示す精子および核の輪郭が不明瞭な死滅精子の割合とよく一致していた。これらの結果、TG染色法を用いることによって家畜精子が先体反応を起こしたか否かを光顕レベルで正確に判定できるとともに、この染色法により判別された正常先体を持たない生存精子が先体反応を起こした精子であると考えられた。

TG染色法で得られた精子の染色様式は、色調の違いを除けば、前節のTS法およびTS簡便法で得られた染色結果とよく一致していた。また、ヤギで調べた結果から、TG染色法またはTS簡便法により判別された4種類の精子の試料中での割合は互いによく一致していた。

TG染色法とTS簡便法は固定までの操作は同様であるが、TG染色法では固定以後の操作がTS簡便法に比べ極めて簡単である。例えば、TS簡便法では固定液のpHを事前に調整し、ローズベンガル染色液もpHを使用直前に確認し、再調整する必要がある、さらに染色温度も一定に保つ必要がある。しかし、TG染色法ではこのような操作は不要であった。また、TG染色法では、ギムザ染色により生存精子の後帽部、特にその基部が淡青色に染まる場合もあったが、トリパンブルーにより暗青色に染まる死滅精子の後帽部とは区別可能であり、精子の生死判別は容易であった。なお、予備実験において、精子の生死判別のための染色剤としてトリパンブルーのほかに、ブロムクレゾールグリーンおよびメチレンブルーの利用も試みた²⁴³⁾が、これらの色素では染色後の洗浄操作による退色が著しく、最終的には生死判別ができなかった。

ブタ精子の場合、前節においてTS簡便法で染色すると正常な先体を持たない精子の割合を過大評価する危険があり、その原因は、精子を未固定の状態でスライドガラスに塗抹する操作であると推察したが、本節のTG染色法においては、固定前に塗抹した試料と固定後に塗抹した試料の間で正常先体を持たない精子の割合に大きな差は認められなかった。さらに、TG染色法で得られた正常先体を持たない生存精子の割合は、TEMによる観察で判別された先体反応精子の割合とよく一致していた。これらの事実からみて、TG染色法によりブタ精子を染色しても、正常先体を持たない精子の割合を過大に誤認する危険性は少ないと考えられる。

本節のTEMによる観察で先体反応特有の形態変化が頭部に認められた精子とは、原形質膜と先体外膜の部分的融合によって生じた小胞様の構造物が先体部に認められ、先体内容物が認められない精子（以下、‘小胞が認められる精子’とする）と、先体内膜が完全に露出している精子（以下、‘先体内膜が露出した精子’とする）の2種類であった。TG染色法で判別された‘正常先体を持たない生存精子’のうちで先体部の染色様式が部分的に赤紫色の精子およびギムザ染色液に不染の精子は、それぞれTEMによる観察で判別された‘小胞が認められる精子’および‘先体内膜が露出した精子’に相当すると考えられる。しかし、TG染色法により判別された‘正常先体を持たない生存精子’の割合とTEMにより先体反応特有の形態変化が観察された精子の割合がほぼ一致しているにもかかわらず、TG染色した精子のうちで部分的に赤紫色の先体部を持つ精子と先体部がギムザ染色液に不染の精子の占める比率が、TEMで観察した精子のうちで‘小胞が認められる精子’と‘先体



Fig. 23. Acrosomal ghosts (arrows) in the smears containing numerous acrosome-reacted spermatozoa. Original magnification, $\times 1,000$.

内膜が露出した精子’の占める比率と一致せず、部分的に赤紫色の先体部を持つ精子の比率が‘小胞が認められる精子’の比率よりも低く、先体部が不染の精子の比率が‘先体内膜が露出した精子’の比率よりも高い場合があった。トリパンプルー染色後精子を未固定の状態でスライドガラスに塗抹する操作がヤギ精子の無傷の先体に対して傷害を与えないことは前節で述べたが、先体反応によって胞状化した先体は、塗抹操作によって比較的簡単に剥離するものと考えられる。なお、インキュベーション試料のTG染色標本中には、Yanagimachi & Phillips^{24,25}が“acrosomal ghost”と呼んだ剥離した先体の残遺物が多数認められた(Fig. 23)。

第4節 小 括

先体反応を起こした精子（先体反応精子）を判別し、その比率を知るための簡便な手法を開発することは、先体反応に関する研究を行なううえでもっとも基礎的かつ重要なことと思われるが、家畜精子の先体反応を簡単に判別する方法はまだ開発されていない。そこで本章は、家畜精子の先体反応を顕微鏡レベルで簡単に判定する方法を開発する目的で行なわれた。

最初に、ヒト先体反応精子の判別法として知られるトリブルステイン法（TS法）のヤギ、ウシおよびブタ精子への応用の可否につき検討した。その結果、いずれの家畜の場合でも、精子は頭部の染色様式の違いによって、正常先体を持つ生存精子と死滅精子および正常先体を持たない生存精子と死滅精子の4種類に分類された。また、TS法における染色および固定の操作を簡易化した染色法（TS簡便法）を新しく考案し、それによって染色した場合でも同様の分類が可能であった。ヤギ精子で調べた結果によると、TS簡便法による生存精子率はニグロシン・エオシン染色による生死判別結果と一致し、先体異常率はWells-Awa染色法による先体染色の結果とよく一致していた。さらに、ヤギ、ウシ、ブタのいずれにおいても、TS法およびTS簡便法により判別された正常先体を持たない生存精子の割合は精子侵入の認められた透明帯除去ハムスター卵子の割合との間に有意な正の相関を示し、この分類の精子が先体反応精子であることが確かめられた。なお、ブタにおいては、TS簡便法により試料中の先体反応精子の割合を過大に評価する危険のあることが認められた。

次に、トリパンプルー生体染色とギムザ染色を組み合わせた方法（TG染色法）により、ヤギ、ウシおよびブタ精子の先体反応の判定を試みた。その結果、いずれの家畜精子も、TS法やTS簡便法の場合と同様に前述の4種類に分類され、TG染色法とTS簡便法で得られたヤギ精子の判別結果はよく一致していた。また、ヤギ、ウシおよびブタのいずれにおいても、TG染色法により判別された正常先体を持たない生存精子の割合と精子侵入の認められた透明帯除去ハムスター卵子の割合との間には有意な正の相関が認められた。さらに、ヤギおよびブタにおいて、TG染色法により判別された正常先体を持たない生存精子の割合と透過型電子顕微鏡による観察で先体反応特有の形態変化が頭部に認められた精子の割合はよく一致し、この分類の精子が先体反応精子であることが確かめられた。このTG染色法は、その手法が極めて簡単で、ヤギ、ウシおよびブタ先体反応精子の判別法としてTS法やTS簡便法以上に有用であると考えられる。

第3章 先体反応の人為的誘起法に関する研究

第1節 緒言

卵子の非存在下において、様々な生体成分や非生体成分あるいは温度やpHなどの環境因子によって精子が先体反応を起こすか否かを調べることは、先体反応の誘起要因や誘起機構を解明する上で有意義なことと思われる。また、哺乳動物においては、先体反応を効率的かつ簡便に誘起できる条件を検索し、それを系として確立できれば、先体反応の特性解明のための研究材料や体外受精に供する精子の入手が極めて容易となる。

Dan¹¹⁸⁾は、ウニ精子を濃い卵子浮遊液の上清（卵海水）に晒すと、卵子がなくとも精子は先体反応を起こすことを発見した。ついで、酸性海水で抽出したヒトデやウニの卵子ゼリー物質（ゼリー溶液）^{244, 246)}でこれらの精子を処理すると、高率の精子で先体反応が誘起されることが報告された。これらの報告によって、ウニやヒトデの精子の先体反応が卵子の非存在下でも誘起されることが示唆されるとともに、これらの精子の先体反応誘起因子が卵子ゼリー層に存在する物質である可能性が示された。

哺乳動物の場合、Barros & Austin²⁴⁷⁾は、ハムスター精子をハムスター卵管液とともに体外でインキュベートすると、先体反応が誘起されることを報告し、ハムスター精子の先体反応誘起因子が卵管液中に存在すると述べた。その後、ハムスター、ヒト、ラットおよびマウスの精子の先体反応が、同種のみならず異種動物の卵管液によって誘起されることも明らかにされ^{247, 248, 308)}、ウサギやスナネズミでは、卵胞液^{212, 250-255, 265)}や子宮液^{256, 298)}が、マウスおよびハムスターでは、顆粒膜細胞²⁵⁷⁻²⁶⁴⁾や副腎抽出液²⁶⁷⁾が、また、多くの動物で、同種あるいは異種動物の不活化血清が精子の先体反応誘起に有効であることも報告されている^{541, 553, 574)}。最近、Yanagimachiと共同研究者^{212, 265-268, 539, 540)}は、ハムスター精子の先体反応誘起因子がアルブミンであること、タウリンやエピネフリンなどの低分子物質も補助的に作用していることなどを明らかにしている。また、単純な物理化学的因子によっても、精子は先体反応を起こすことが報告されている。例えば、多くの哺乳動物において、イオノフォアA23187処理^{327-332, 520, 521, 548, 550)}のほか、ムコ多糖類^{286, 289, 290, 301, 335, 543)}、脱脂粉乳³³⁶⁾、グリセリン³³⁷⁾、ジラウロイルフォ

スファチジルコリンで作ったリポソーム³³⁸⁻³⁴¹⁾で処理することによって、また、精子浮遊液の浸透圧を上げる^{333, 334, 542)}だけでも、精子は先体反応を起こすことが報告されている。

哺乳動物の体外受精を行なう場合には、媒精に先だち、精子の受精能獲得と先体反応を誘起しておく必要がある。マウス、ハムスター、モルモットなどの実験小動物では、受精の機序を解明する目的で体外受精に関する研究が古くから行なわれており、これらの動物では既に、精子の受精能獲得および先体反応の誘起法を含む体外受精技術が確立されつつある^{532, 585)}。また、ヒトにおいても不妊症を対照とした臨床治療技術として実用化されている。家畜の場合、精子の先体反応を人為的に誘起する方法はいくつか報告されているが、それらの方法では特殊な薬剤を必要としたり、結果の再現性に欠けるなどの問題点が残されている。そこで、本章では、ヤギ、ウシ、ブタ精子の先体反応の簡便で効率的な人為的誘起法を開発するとともに、これらの動物の先体反応の発現要因を解明する目的で、精子に様々な前処理を加えたのち、前章で著者が考案した染色法や、ハムスターテストまたはTEMを用いて先体反応誘起の有無や程度を調べた。

哺乳動物精子の受精能獲得と先体反応は全く別々の独立した現象であり、受精能獲得は先体反応誘起のための準備段階であると考えられている。しかし、近年、イオノフォアA23187で数分間処理することにより受精能獲得していない精子の先体反応誘起の例が報告され^{327-332, 520, 521, 548, 550)}、処理法によっては、精子は受精能獲得せずに先体反応を誘起する場合の有ることが示唆された。先体反応は精子の形態変化を伴うため、その有無の判定は確実に行なえるが、受精能獲得は、形態変化を伴わない精子の生理的、機能的な変化であるため、その判定は容易ではない。したがって、人為的に精子の先体反応を起こした場合でも、その精子が受精能獲得したか否かについては不明である。

第2節 摘出雌性生殖道を用いた先体反応の誘起

哺乳動物精子の先体反応に関する研究は、当初、交配雌の生殖道内の精子を材料として行なわれていた^{186, 193, 196, 200, 269-276)}。Iritani & Niwa²⁰⁷⁾とIritani et al.²⁰⁸⁾は、ウシやブタの発情雌から摘出した子宮や卵管内でこれらの動物の精子をインキュベートすると、先体反応が誘起されることを報告した。その後、ウサギの摘出子宮がウシ、ブタ精

子の先体反応誘起環境として有効であること²³⁶⁾やブタの摘出子宮または卵管がヤギ精子の先体反応誘起環境としての効果を持つこと²²³⁾が報告され、同種あるいは異種動物から摘出した雌生殖道内でのインキュベーションが家畜精子の先体反応誘起法として有用であることが示唆された。そこで本節では、マウス、ラット、ハムスター、ウサギなどの実験小動物から摘出した子宮や卵管を用い、ヤギ、ウシ、ブタ精子の先体反応誘起環境としての効果を調べた。

I. 材料および方法

ヤギ精液は日本在来種雄ヤギ2頭および雑種雄ヤギ2頭から、ウシ精液は黒毛和種雄ウシ2頭から人工陰法により採取し、ブタ濃厚部精液はランドレース種雄ブタ1頭から手圧法により分画採取した。雌生殖道提供動物には、6週令以上のゴールデンハムスター、ddY系マウス、Donryu系ラットおよびニュージーランドホワイトウサギを用いた。ヤギ精液は採取直後に、またウシおよびブタ精液は室温で一晩静置したのち、精子活力が良好なものをBSA欠B0液でブタ精子は等倍、また、ウシ、ヤギ精子は8倍希釈し、 $500 \times g$ で5分間の遠心分離により3回洗浄して精漿を十分に除去したのち、精子濃度約 1.5×10^9 精子/mlとなるように同液に精子を再浮遊させた。こうして得た精子浮遊液を、精子試料として実験に用いた。一方、生殖道提供雌動物は頸部脱臼法により屠殺し、開腹したのち、生殖道（子宮角あるいは卵管）の後端を結紮し、上記の精子浮遊液を生殖道の前端より注入した（Fig. 24a）。注入した精子浮遊液の量は、ヤギ、ウシ、ブタ精子のいずれの場合も、ハムスターおよびラット子宮で0.02ml、マウス子宮で0.01ml、ウサギ子宮で0.50ml、ウサギ卵管で0.25mlであった。ついで、生殖道の前端を結紮したのち、生殖道を摘出し、37℃の生理食塩水中に浸漬してインキュベートした（Fig. 24b）。インキュベーション終了後、0.3～0.5 mlのBSA欠B0液で生殖道内を灌流して精子を回収し（Fig. 24c）、血球および組織片を除去したのち、1回洗浄し、BSA欠B0液に再浮遊した。こうして得た各種のインキュベーション精子試料を用い、精子運動性を観察したのち、TS法（ブタ）またはTS簡便法（ヤギ、ウシ）による染色ならびにハムスターテスト（第2章第2節）により精子の先体反応の程度を調べた。なお、精子の運動性は、37℃に加温しながら400倍の光学顕微鏡下で観察した。

実験1 ハムスター、ラット、マウスまたはウサギ雌生殖道内でのインキュベーション

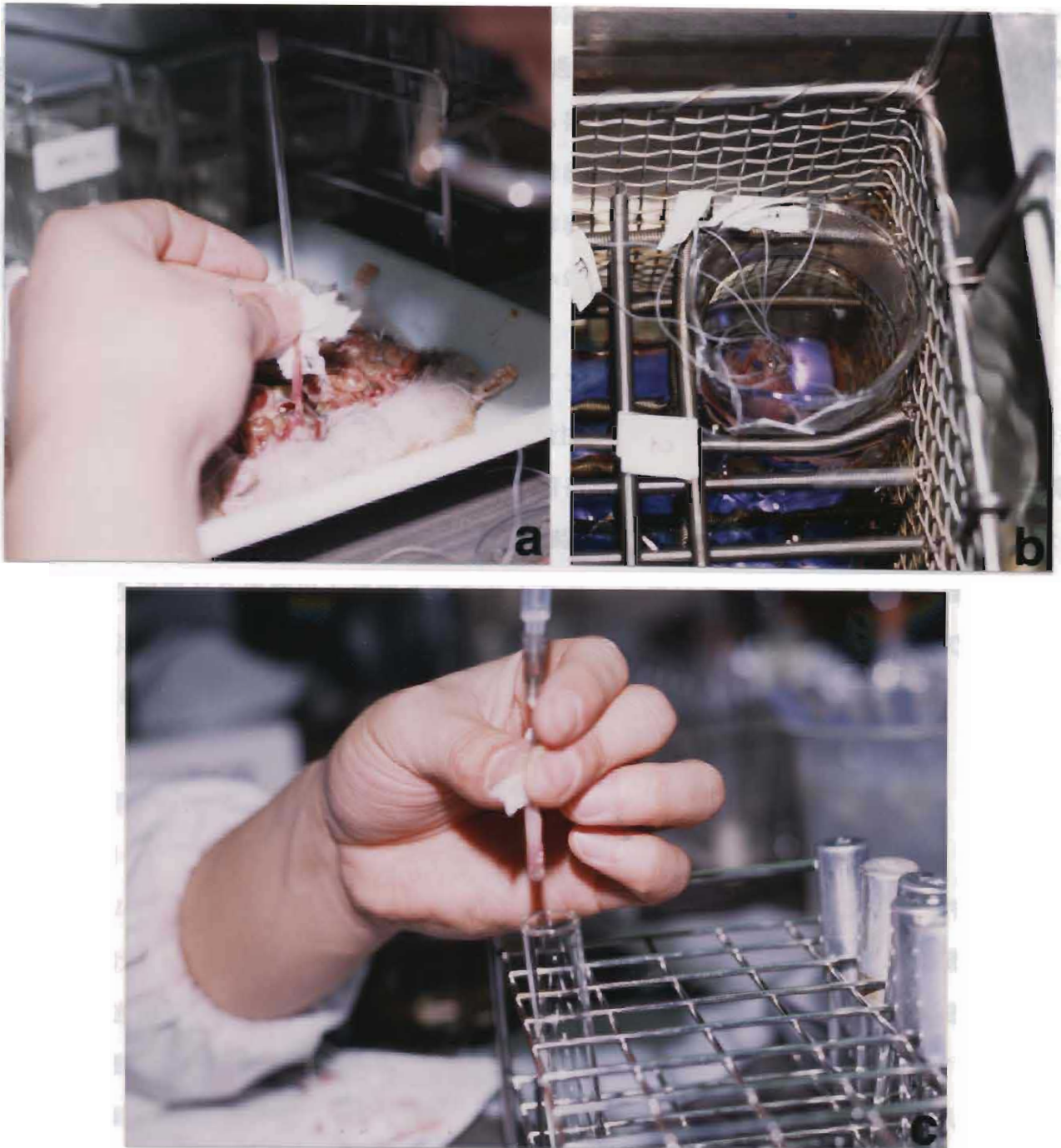


Fig. 24. Procedure of sperm preincubation in the female reproductive tracts isolated from laboratory animals. a; introduction of spermatozoa into the tract, b; incubation, c; collection of spermatozoa from the tract.

ヤギ精子は、過排卵処理ハムスター(hCG注射の約16時間後)、過排卵処理(hCG注射の約16~17時間後)または無処理(性周期の任意の時期)のマウスおよび過排卵処理ラット(hCG注射の約12時間後)から摘出した子宮、あるいは性周期の任意の時期のウサギから摘出し

た子宮または卵管内で、1時間または2～5.5時間インキュベートした。ウシ精子は、過排卵処理ハムスター(hCG注射の約16時間後)、過排卵処理(hCG注射の約16～17時間後)または無処理(性周期の任意の時期)のマウスから摘出した子宮内で、2または3～5.5時間インキュベートした。また、ブタ精子は、過排卵処理(hCG注射の約16時間後)または無処理(性周期の任意の時期)のハムスター、過排卵処理(hCG注射の約16～17時間後)または無処理(性周期の任意の時期)のマウスあるいは性周期の任意の時期のラットから摘出した子宮内で、2～5時間インキュベートした。

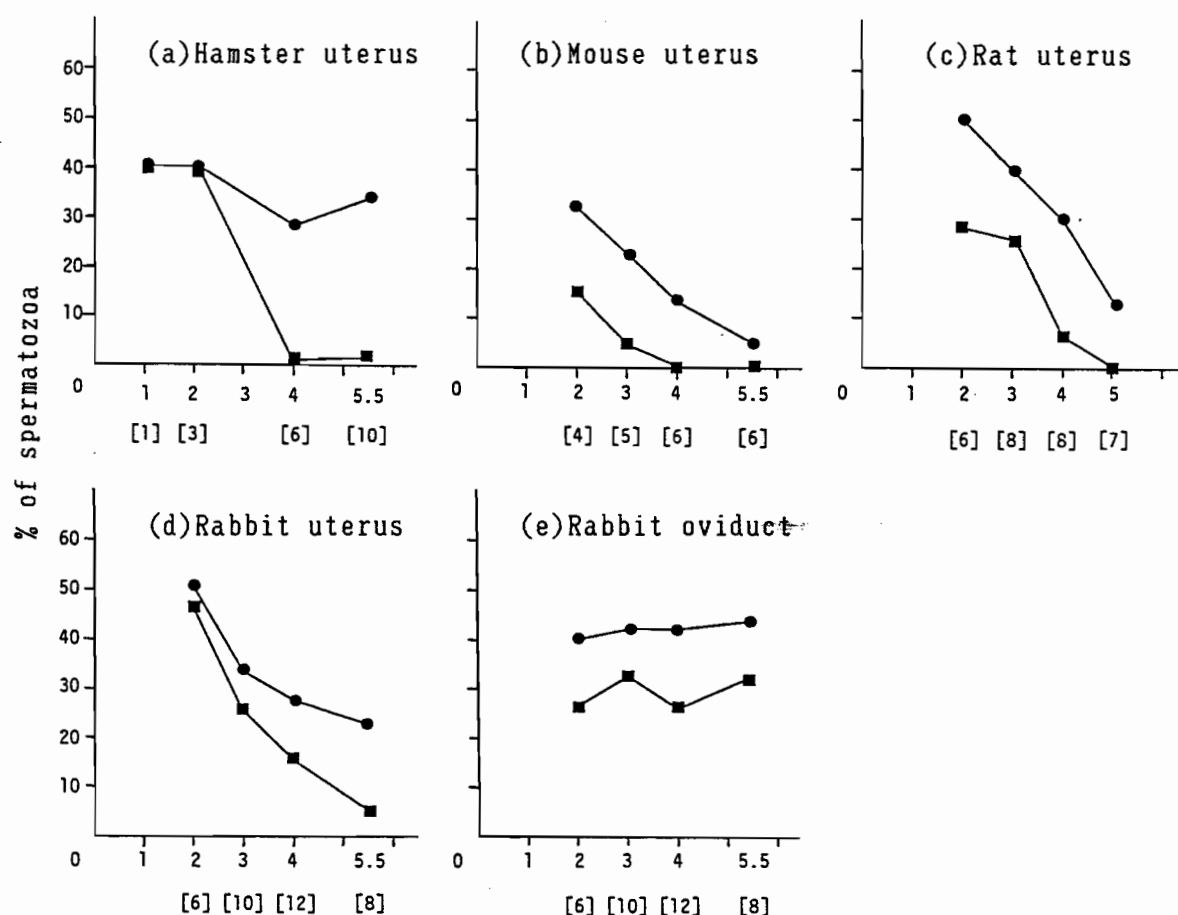
実験2 性周期の異なるハムスター子宮内のインキュベーション

ヤギ精子を、過排卵処理ハムスターからhCG注射の約16～17時間後に摘出した子宮または各性周期、すなわち発情前期、発情期、発情後期、発情休止期1日目および発情休止期2日目のハムスターから摘出した子宮内で5.5時間インキュベートした。なお、実験には安定した性周期が2周期以上確認されたハムスターを用いた。また、過排卵処理したハムスターおよび各性周期に相当するハムスターからの子宮摘出時刻は、発情期雌では1:00で、その他は10:00であった。

II. 結 果

1) ヤギ精子におけるインキュベーションの効果

雌のハムスター、マウス、ラットおよびウサギから摘出した生殖道内でインキュベーション中におけるヤギ精子の運動性の変化をみると、インキュベーション開始前の運動精子率および前進精子率はともに90～95%であったが、いずれの雌実験小動物の生殖道内でも、精子の運動性はインキュベーション期間中に著しく低下した(Fig. 25)。ウサギ子宮の場合、2時間と3時間のインキュベーションでは、運動精子のほとんどが前進したが、マウスおよびラットでは、いずれのインキュベーション時間でも前進精子率は運動精子率の約50%かそれ以下であった。また、マウス子宮では3時間および5.5時間のインキュベーションで前進精子および運動精子が失われ、ラット子宮では4時間のインキュベーションで前進精子が、またウサギ子宮では5.5時間のインキュベーションで前進精子がほとんど認められなくなった。しかし、ハムスター摘出子宮内インキュベーションでは、1～5.5時間のインキュベーションで他の実験小動物の生殖道の場合ほど大きな運動精子率の低下は認められなかった。また、1時間および2時間のインキュベーションでは運動精子のほ



Duration of incubation (hr)

Fig. 25. Effect of incubation in hamster uterus (a), mouse uterus (b), rat uterus (c), rabbit uterus (d) and rabbit oviduct (e) on the motility of goat spermatozoa.

●; Motile, ■; Progressively motile, []; No. of tests.

とんどすべてが前進精子であったが、4時間と5.5時間のインキュベーションでは前進精子はほとんど認められなかった。なお、ウサギ摘出卵管内インキュベーションの場合、2～5.5時間のインキュベーション期間中、運動精子率および前進精子率はいずれもほとんど変化しなかった。

TS簡便法による染色結果およびハムスターテストの結果 (Table 5)、マウスおよびラット子宮内インキュベーションでは、生存精子率はインキュベーション時間の経過に伴って著しく低下し、5時間または5.5時間インキュベートした精子試料中の生存精子率は、1時間または2時間の場合の約半数かそれ以下であった。ハムスターおよびウサギ摘出子宮内インキュベーションの場合でも、生存精子率は時間の経過に伴って低下したが、マウスおよびラット子宮の場合ほど大きな低下ではなく、特にウサギ摘出卵管内のインキュベ-

Table 5. Incidence^{1,2} of the acrosome reaction in ejaculated goat spermatozoa incubated in different female reproductive tracts.

Incubation condition		%[s.e.] of spermatozoa ¹		No. of eggs penetrated/ no. examined ² [%]	Average no. of sperm in penetrated eggs ²
Female reproductive tract	Duration (hr)	Live	Acrosome-reacted		
Hamster uterus	1	57.0 [7.8]	0.8 [0.2]	1/40 [2.5] ^a	1.0
	2	38.2 [7.2]	3.6 [1.9]	0/44 [0.0]	-
	3	34.5 [2.4]	12.0 [2.9]	8/40 [20.0] ^c	1.0
	4	25.5 [1.2]	20.5 [1.9]	28/47 [59.6] ^b	1.4
	5.5	26.8 [1.0]	22.5 [1.8]	65/85 [76.5] ^a	2.1
Mouse uterus	2	27.9 [4.1]	10.0 [1.8]	32/88 [36.4] ^c	1.4
	3	19.1 [1.6]	12.4 [1.5]	86/103 [83.5] ^a	2.9
	4	21.2 [2.3]	15.3 [3.3]	47/89 [52.8] ^b	3.1
	5.5	14.5 [0.7]	13.2 [3.6]	18/95 [18.9] ^d	1.1
Rat uterus	2	48.2 [10.4]	10.5 [4.4]	37/58 [63.8] ^a	2.1
	3	37.3 [4.1]	13.7 [2.6]	35/59 [59.3] ^a	1.4
	4	29.0 [4.9]	19.8 [4.5]	56/78 [71.8] ^a	1.5
	5	18.0 [1.3]	15.6 [4.6]	31/87 [35.6] ^b	1.8
Rabbit uterus	2	45.1 [10.9]	4.0 [1.1]	0/30 [0.0]	-
	3	27.0 [6.8]	6.9 [1.1]	0/41 [0.0]	-
	4	31.5 [6.7]	12.9 [2.3]	25/61 [41.0]	1.4
	5.5	32.0 [14.3]	13.0 [3.9]	9/39 [23.1]	1.0
Rabbit oviduct	2	39.6 [10.9]	1.7 [0.8]	0/30 [0.0]	-
	3	40.4 [8.1]	6.9 [1.9]	6/31 [19.4]	1.0
	4	33.5 [8.2]	10.8 [2.0]	5/40 [12.5]	1.2
	5.5	44.9 [10.9]	16.7 [3.7]	6/45 [13.3]	1.0

¹Assessed by a simplified triple-stain technique. Four to Seventy-one tests were performed for each duration of incubation.

²Assessed by a hamster test. Three to seven tests were performed for each duration of incubation. Ten to seventeen eggs were examined for each test. ^{a,b,c,d}Values with different superscripts differ significantly, $P < 0.05$ (χ^2 test).

シヨンの場合、2～5.5時間のインキュベーション期間中、生存精子率はほとんど変化しなかった。一方、先体反応精子率は、ハムスター子宮、ウサギ子宮および卵管では、インキュベーション時間の経過に伴って増加し、いずれも5.5時間で最高値が得られた。マウスおよびラット子宮では、共に2時間から約10%の先体反応精子率が得られ、それぞれ2～5.5時間および2～5時間のインキュベーション期間中、安定して比較的高い値が得られ、4時間でともに最高値が得られた。ハムスターテストの結果、ハムスター摘出子宮内

Table 6. Percentage[s.e.] of acrosome-reacted¹ goat spermatozoa after incubation in the right and left uterine horns isolated from superovulated hamsters.

Duration of incubation (hr)	No. of hamsters	Uterine horns used for incubation	
		Right horn	Left horn
4	10	29.1[4.4]	25.6[6.2]
5.5	15	30.6[3.7]	27.3[3.5]

¹Assessed by a simplified triple-stain technique.

インキュベーションでは、精子侵入卵子率はインキュベーション時間の経過に伴って増加する傾向があり、最高値は5.5時間のインキュベーションで得られた。また、4時間のインキュベーションから卵子への多精子侵入が認められるようになり、平均侵入精子数は5.5時間のインキュベーションでもっとも多かった。マウスおよびラット摘出子宮内インキュベーションでは、それぞれ2～5.5時間および2～5時間で卵子への多精子侵入が認められた。マウス子宮内では、3時間のインキュベーションで最高の精子侵入卵子率が、また4時間のインキュベーションで平均侵入精子数は最高値が得られた。また、ラット子宮の場合、 χ^2 検定の結果によれば、2時間から4時間のインキュベーションの間で精子侵入卵子率に有意な差は認められなかった($P < 0.05$)。ウサギから摘出した子宮および卵管内でのインキュベーションの場合、卵子への精子侵入は、それぞれ2時間と3時間のインキュベーションでは全く認められなかったが、4時間と5.5時間のインキュベーションおよび3～5.5時間のインキュベーションでは認められた。なお、いずれの場合でも、これらのインキュベーション時間の間で精子侵入卵子率に統計的に有意な差は認められなかった($P < 0.05$)。また、卵子への多精子侵入はいずれも4時間のインキュベーションでのみ認められた。

また、過排卵処理したハムスター子宮内で4時間または5.5時間インキュベートしたヤギ精子をTS簡便法で染色し、得られた先体反応精子率を左右の子宮角間で比較したところ (Table 6)、左右の子宮角で得られた先体反応精子率は、4時間インキュベーションでそれぞれ5.4～44.4% (平均; 29.1%, $n=10$) および3.1～41.8% (平均; 25.6%, $n=10$)、5時間インキュベーションでそれぞれ2.2～57.7% (平均; 30.6%, $n=15$) および4.1～55.4% (平均; 27.3%, $n=15$) で、いずれのインキュベーション時間においてもよく一致し、

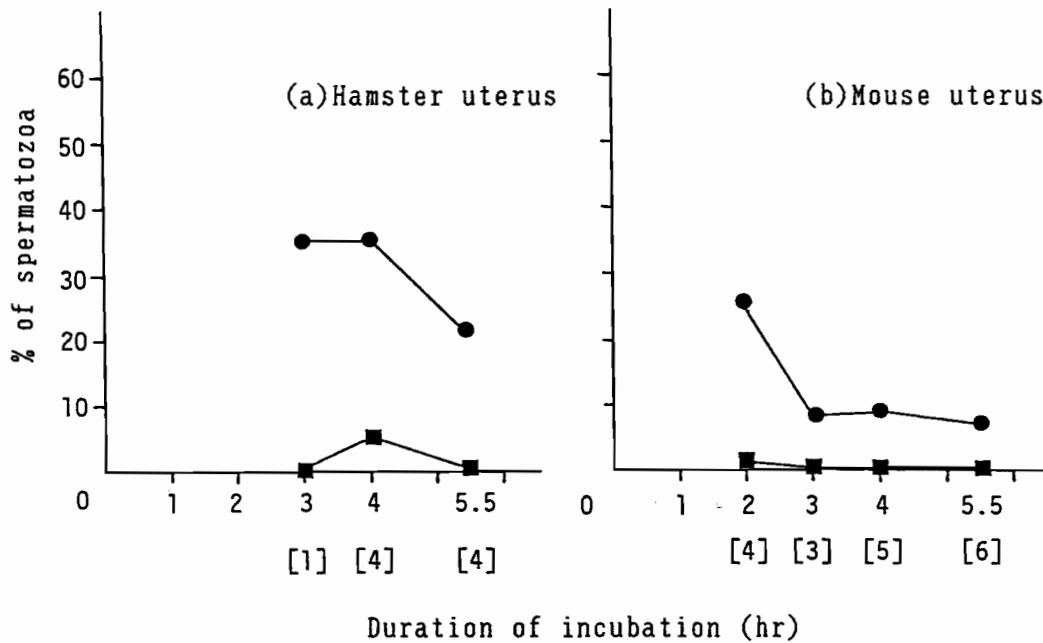


Fig. 26. Effect of incubation in hamster uterus (a) and mouse uterus (b) on the motility of bull spermatozoa.
 ●; Motile, ■; Progressively motile, []; No. of tests.

同一個体の左右の子宮角間では統計的にも有意な差は認められなかった（4時間インキュベーション； $t=0.95$, $n=10$, $P>0.05$ 、5時間インキュベーション； $t=1.15$, $n=15$, $P>0.05$ ）しかし、いずれのインキュベーション時間においても、ハムスター個体間で先体反応精子率にかなりの差が認められた。

2) ウシ精子におけるインキュベーションの効果

インキュベーション開始直前のウシ運動精子率および前進精子率はともに90～95%であった。ハムスターおよびマウス摘出子宮内インキュベーションの場合（Fig. 26）、運動精子率はともにインキュベーション時間の経過に伴って著しく低下したが、ハムスター子宮に比べてマウス子宮のほうが急激に低下した。一方、前進精子は、ハムスター子宮およびマウス子宮ともに、3～5.5時間および2～5.5時間のインキュベーション期間中ほとんど認められなかった。

TS簡便法による染色結果およびハムスターテストの結果（Table 7）、ハムスター摘出子宮内インキュベーションでは、生存精子率は3～5.5時間のインキュベーション時間中ほとんど変化しなかったが、先体反応精子率は、インキュベーション時間の経過に伴って増加し、5.5時間で最高値が得られた。また、マウス摘出子宮内インキュベーションでは、生存精子率はインキュベーション時間の経過に伴って低下したが、先体反応精子率は2～

Table 7. Incidence^{1,2} of the acrosome reaction in ejaculated bull spermatozoa incubated in different female reproductive tracts.

Incubation condition		%[s.e.] of spermatozoa ¹		No. of eggs penetrated/ no. examined ² [%]	Average no. of sperm in penetrated eggs ²
Female reproductive tract	Duration (hr)	Live	Acrosome-reacted		
Hamster uterus	3	26.0 [0.6]	2.8 [0.6]	0/10 [0]	-
	4	32.4 [4.7]	10.4 [2.1]	12/41 [29.3]	1.2
	5.5	27.4 [4.6]	11.4 [3.0]	16/44 [36.4]	1.1
Mouse uterus	2	54.1 [6.6]	24.3 [0.4]	19/52 [36.5] ^a	1.2
	3	29.0 [3.6]	17.0 [1.7]	15/51 [29.4] ^{ab}	1.3
	4	29.3 [7.9]	11.3 [1.9]	12/76 [15.8] ^b	1.2
	5.5	30.2 [8.1]	12.6 [0.3]	17/88 [19.3] ^b	1.1

¹Assessed by a simplified triple-stain technique. Two to six tests were performed for each duration of incubation.

²Assessed by a hamster test. One to six tests were performed for each duration of incubation. Ten to seventeen eggs were examined for each test. ^{a, b}Values with different superscripts differ significantly, $P < 0.05$ (χ^2 test).

5.5時間のインキュベーション期間中比較的高い値が安定して得られ、2時間で最も高かった。ハムスターテストの結果、ハムスター摘出子宮内インキュベーションの場合、3時間のインキュベーションでは卵子への精子侵入は認められなかったが、4時間と5.5時間のインキュベーションではいずれも30%前後の精子侵入卵子率が得られ、ともに多精子侵入であった。なお、4時間と5.5時間の間で精子侵入卵子率に統計的に有意な差は認められなかった($P < 0.05$)。マウス摘出子宮内インキュベーションでは、2～5.5時間のすべてのインキュベーション時間で卵子への精子侵入が認められ、いずれも多精子侵入であった。また、最高の精子侵入卵子率は2時間のインキュベーションで、平均侵入精子数は4時間のインキュベーションで得られた。

3) ブタ精子におけるインキュベーションの効果

インキュベーション開始直前の運動精子率および前進精子率は、それぞれ51および35%であった。運動精子率は、ハムスターおよびラット摘出子宮内インキュベーションでは、インキュベーションの経過に伴って著しく低下し、それぞれ4時間および5時間のインキュベーションで運動精子はほとんど認められなくなった。マウス摘出子宮内インキュベーションでは、2～5時間のインキュベーション期間中運動精子はほとんど認められなかった。

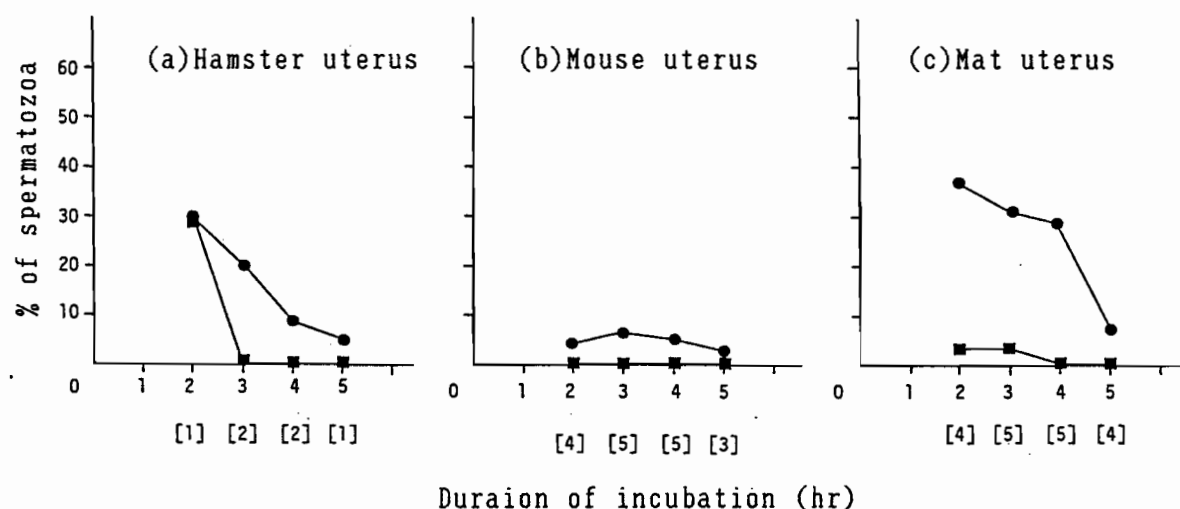


Fig. 27. Effect of incubation in hamster uterus (a), mouse uterus (b) and rat uterus (c) on the motility of boar spermatozoa.
 ●; Motile, ■; Progressively motile, []; No. of tests.

Table 8. Incidence^{1,2} of the acrosome reaction in ejaculated boar spermatozoa incubated in different female reproductive tracts.

Incubation condition		%[s.e.] of spermatozoa ¹		No. of eggs penetrated/ no. examined ² [%]	Average no. of sperm in penetrated eggs ²
Female reproductive tract	Duration (hr)	Live	Acrosome-reacted		
Hamster uterus	2	-	-	5/20 [25.0] ^{ab}	1.0
	3	-	-	24/55 [43.6] ^a	1.1
	4	-	-	19/60 [31.6] ^{ab}	1.1
	5	-	-	1/6 [16.7] ^b	1.0
Mouse uterus	2	24.5	17.9	19/77 [24.6]	1.0
	3	24.0	16.8	16/53 [30.2]	1.3
	4	26.6	25.9	15/45 [33.3]	1.4
	5	16.7	14.1	13/59 [22.0]	1.1
Rat uterus	2	61.3 [5.7]	14.8 [2.6]	2/8 [25.0] ^{ab}	1.0
	3	60.1 [1.1]	14.8 [1.6]	8/20 [15.0] ^b	1.3
	4	46.9 [6.6]	29.8 [3.0]	19/30 [63.3] ^a	1.4
	5	26.1 [6.2]	14.5 [4.9]	9/19 [47.4] ^{ab}	1.7

¹Assessed by a triple-stain technique. One to five tests were performed for each duration of incubation.

²Assessed by a hamster test. One to four tests were performed for each duration of incubation. Six to fifteen eggs were examined for each test. ^{a,b}Values with different superscripts differ significantly, $P < 0.05$ (χ^2 test).

また、前進精子は、ハムスター摘出子宮内で、2時間インキュベートした場合を除いてほとんど認められなかった (Fig. 27)。

TS法による染色結果およびハムスターテストの結果 (Table 8)、生存精子率は、マウス摘出子宮内インキュベーションでは、2～5時間のインキュベーション期間中でそれほど大きな変化はなかったが、ラット摘出子宮内インキュベーションの場合、2時間と3時間のインキュベーションでは変化なく、4時間のインキュベーションで幾分低下し、5時間のインキュベーションで著しく低下した。先体反応精子率は、マウス子宮およびラット子宮いずれの場合も、2～5時間のインキュベーション期間中、比較的高い値が安定して得られ、4時間で最も高かった。ハムスターテストの結果、ハムスター、マウスおよびラット摘出子宮のいずれの場合も、2～5時間のすべてのインキュベーション時間で卵子への精子侵入が認められた。また、ハムスター子宮内での3時間と4時間のインキュベーションで、またマウスおよびラット子宮内での3～5時間のインキュベーションで卵子への多精子がみとめられた。また、ハムスターおよびラット子宮内では、最高の精子侵入卵子率はそれぞれ3時間および4時間のインキュベーションで得られた。一方、マウス子宮では、2～5時間のインキュベーションの間で精子侵入卵子率に統計的に有意な差は認められなかった($P < 0.05$)。

4) 各性周期におけるハムスター子宮内インキュベーションの効果

各性周期に相当するハムスターまたは過排卵処理したハムスターの摘出子宮内で5.5時間インキュベートした精子試料を用い、TS簡便法による染色およびハムスターテストの結果

Table 9. Incidence^{1,2} of the acrosome reaction in ejaculated goat spermatozoa incubated in hamster uteri at various stage of the estrous cycle and superovulated uteri for 5.5 hr.

Stage of estrous cycle	%[s.e.] of spermatozoa ¹		No. of eggs penetrated/ no. examined ² [%]	Average no. of sperm in penetrated eggs ²
	Live	Acrosome-reacted		
Proestrus	17.9[1.1]	14.6[2.4]	46/90[51.1]	1.8
Estrus	29.6[0.3]	17.9[3.2]	95/171[55.5]	2.3
Metestrus	15.3[1.4]	10.3[2.0]	35/69[50.7]	2.2
Diestrus-day 1	17.4[1.6]	11.8[2.8]	34/75[45.3]	1.7
Diestrus-day 2	18.1[1.6]	14.9[3.9]	45/73[61.6]	2.1
Superovulated	23.2[2.4]	15.8[2.7]	125/254[49.2]	1.9

¹Assessed by a simplified triple-stain technique. Nine to twenty-five tests were performed for each duration of incubation.

²Assessed by a hamster test. Nine to nineteen tests were performed for each duration of incubation. Six to fifteen eggs were examined for each test.

果 (Table 9)、生存精子率および先体反応精子率、また精子侵入卵子率および平均侵入精子数は、子宮提供ハムスターの性周期および過排卵処理の有無にかかわらずいずれもほぼ類似した値となった。なお、先体反応精子率は、発情後期で最低、発情期で最高となり、また、精子侵入卵子率は、発情休止期 1 日目で最高、過排卵処理で最低となったが、各性周期および過排卵処理の間で、統計的に有意な差は認められなかった ($P < 0.05$)。

III. 考 察

本節の研究結果、ヤギ、ウシおよびブタ精子の先体反応誘起には、ハムスター、マウス、ラット、ウサギなどの実験小動物から摘出した雌生殖道内でのインキュベーションが有効であることが明らかにされるとともに、その誘起効果は、精子を提供する動物種と生殖道を摘出する雌の動物種の組み合わせや、生殖道提供雌動物の個体によって幾分異なるが、生殖道提供雌動物の性周期や過排卵処理の有無によって変化せず、また左右の子宮角の間でも差のないことが確かめられた。

各種実験動物の雌生殖道の中で、ヤギ精子がもっとも効率的に先体反応を誘起するのは、ハムスター子宮内では 4～5.5 時間、マウス子宮では 3～4 時間、ラット子宮では 2～4 時間、ウサギ子宮では 4～5.5 時間、またウサギ卵管では 3～5.5 時間のインキュベーションであることが認められた。

Kim et al.²³³⁾ は、ヤギ精子をブタの摘出子宮および卵管内で 5～5.5 時間インキュベートしたのち透明帯除去ハムスター卵子への精子侵入試験を行ない、それぞれ 52～63% および 38～76% の精子侵入卵子率を得たと報告し、花田と塩谷²⁷⁷⁾ は、ウサギ摘出子宮内で 3、4、5 および 6 時間インキュベートしたヤギ精子で、それぞれ 2.2～18.2%、4.7～29.3%、15.4～50.0% および 0.0～33.3% の精子侵入卵子率を得たと報告している。この結果は、本節のウサギ摘出子宮内でインキュベートしたヤギ精子を用いた透明帯除去ハムスター卵子への精子侵入試験の結果とよく一致していた。これらのことからみて、短いインキュベーション時間で効率的に先体反応を誘起しうるマウスおよびラット子宮はヤギ精子の先体反応誘起環境としてかなり有効であり、ハムスター子宮もこれらに次いで有効であるが、ウサギの子宮および卵管はあまり有効ではないと考えられる。本節の結果、ウシ精子の場合、ハムスター子宮では 4～5.5 時間の、マウス子宮では 2～3 時間のインキュベーションがもっとも効果的であった。ウシ精子について、Iritani & Niwa²⁰⁷⁾ は、ウシ摘出子宮や卵

管内でインキュベートした結果、体外で成熟させたウシ卵胞卵子との体外で約20%の受精率を得たと報告している。また、Hanada & Nagase²³⁶⁾はウサギの摘出子宮を用い4～6時間のインキュベーションののち透明帯除去ハムスター卵子に媒精し、8.6～23.1%の精子侵入卵子率を得たと述べている。本節の実験においてマウス子宮で得られた結果では、より短い2～3時間のインキュベーション時間で、やや高い先体反応精子率および精子侵入卵子率を得られた。なお、最高の先体反応精子率および精子侵入卵子率は、ともに2時間のインキュベーション時間で得られたものであり、マウス子宮内でも1時間前後のインキュベーション時間について検討する必要があると思われる。ブタ精子の場合、ハムスター子宮では3時間、マウス子宮およびラット子宮ではともに4時間のインキュベーションがもっとも効果的であった。ブタ精子について、Iritani et al.²⁰⁸⁾は、射出精子や精巣上体精子をブタの摘出子宮や卵管内でインキュベートしたのち、ブタ卵胞卵子に媒精し、20%前後の受精率を得たと報告している。一方、Imai et al.²²⁵⁾は、ブタの摘出子宮内の5～5.5時間のインキュベーションで、またHanada & Nagase²³⁶⁾は、ウサギの摘出子宮内の3～4.5時間のインキュベーションで、いずれも100%の透明帯除去ハムスター卵子への侵入率を得ている。しかし、本節のハムスター、マウスおよびラット摘出子宮内のインキュベーションでは、それぞれ6～44%、22～33%および15～63%の精子侵入卵子率しか得られなかった。これらの結果は、ハムスター、マウスおよびラットの摘出子宮がブタ精子の先体反応誘起環境として余り効果的でないことを示唆している。Saling & Bedford²⁷⁸⁾は、マウス、ハムスターおよびウサギの精子と卵子を、発情期のマウス、ハムスター、ウサギおよびラットの生体の卵管内に注入したところ、精子と卵子を同種動物の卵管に注入した場合と異種動物に注入した場合で、受精率にほとんど差がないことを認め、生体の雌生殖道における精子先体反応誘起効果は種特異的な現象とは言えないと報告している。以上のことから考えて、哺乳動物精子の先体反応誘起はほとんど種特異性を欠く現象であると思われる。

本節のヤギ、ウシおよびブタ精子のインキュベーションでは、過排卵処理および無処理のマウス子宮を、またブタ精子においては過排卵処理および無処理のハムスター子宮を用いたが、いずれの場合でも、過排卵処理と無処理の間で先体反応精子率および精子侵入卵子率に明確な差は認められなかった。さらに、生殖道提供雌動物の性周期の違いによって先体反応誘起効果に差があるか否かを確かめるため、精子提供動物にヤギを、また雌生殖

道提供動物にハムスターを用いて詳細に検討した。その結果、TS簡便法で判定された先体反応精子の割合は、子宮提供ハムスターの性周期に伴って変化し、すなわち、発情後期のハムスターから摘出した子宮内でインキュベートした精子試料では、先体反応精子率は10.3%、発情休止期1日目で11.8%、発情休止期2日目および発情前期でそれぞれ14.9および14.6%となり、発情期で17.9%の最高値となった。しかし、いずれの性周期の場合でも、比較的高い先体反応精子率が得られており、性周期のどの時期の個体から摘出した子宮を用いても、ヤギ精子の先体反応は効率的に誘起されるものと思われる。また、透明帯除去ハムスター卵子への精子侵入率は、発情休止期2日目でもっとも高い値が得られたが、 χ^2 検定の結果、他の性周期および過排卵処理した子宮の間で有意な差は認められなかった。

ヤギ、ウシおよびブタ精子のいずれにおいても、運動精子率と前進精子率は、どの雌実験小動物から摘出した生殖道内でのインキュベーションでもともに低下した。しかし、運動精子率が生存精子率とよく一致したことからみて、運動精子率の低下は単に精子の生存性の低下に起因すると考えられる。一方、前進精子率は、運動精子率や生存精子率とは無関係にこれらのインキュベーションにより著しく低下した。また、精子試料中の前進精子率の減少に伴って、先体反応精子率が増加する傾向が認められ、前進精子率と先体反応精子率の間には負の相関性がみられた。これらのことから、これらのインキュベーションによって、精子の運動能が完全に失なわれることはないが、かなり弱まることが明らかとなり、運動能の低下と先体反応の間にはなんらかの関係のあることが推察された。

第3節 各種合成培地による先体反応の誘起

哺乳動物でも、マウス^{263, 279)}、ラット²¹¹⁾、ハムスター²⁸⁰⁾、モルモット²⁸¹⁻²⁸³⁾、ウサギ²⁸⁴⁾、イヌ²⁸⁵⁾などの実験小動物では、先体反応誘起用の合成媒液が既にいくつか考案されている。最近、家畜においても、実験小動物用の媒液をそのままあるいは修正して用いた精子の先体反応誘起の例や、体外受精の成功例が報告されるようになった^{519, 528, 531)}が、実験小動物のように確実な方法はまだ確立されていない。

本節では、雌生殖道内における先体反応誘起要因を明らかにするとともに、摘出雌生殖道によらず人為的に家畜精子の先体反応を誘起する方法を開発する目的で、ヤギおよびブタ精子を材料とし、試験管内あるいはガラス管内でインキュベーションによる先体反応誘

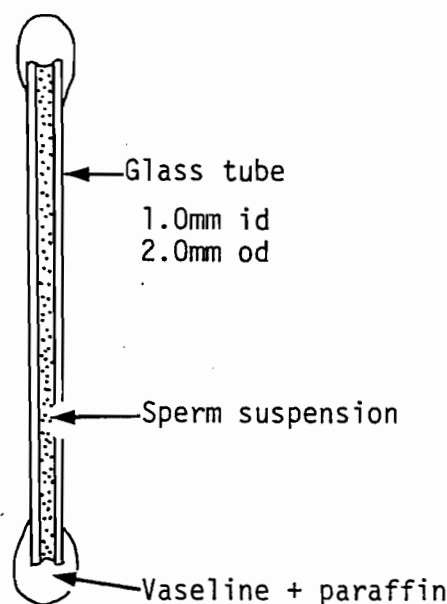


Fig. 28. Diagram of a sealed glass tube.

起法を試みた。また、これらのインキュベーションにおけるラット子宮液添加の効果を調べた。

I. 材料および方法

ヤギ精液は日本在来種雄ヤギ2頭および雑種雄ヤギ2頭から人工膣法により採取し、ブタ濃厚部精液はランドレース種雄ブタ1頭から手圧法により分画採取した。ヤギ精液は採取直後に、またブタ精液は室温で一晩静置したのち、BSA欠B0液で等倍（ブタ）または8倍希釈（ヤギ）

し、 $600 \times g$ で5分間の遠心分離により3回洗浄したのち適量の同液に浮遊させた。こうして得たヤギおよびブタ精子浮遊液を、まず、精子濃度を $1.5 \sim 2 \times 10^9$ 精子/mlとなるように調整し、BSA欠B0液（ヤギ）かB0液（ブタ）、または発情前期のラットから採取した子宮液で等倍希釈し、開放試験管内あるいは密封ガラス管内（Fig. 28）で2～18時間（ヤギ）または2～5時間、 37°C でインキュベートした。

次に、ヤギ精子浮遊液を種々の精子濃度（ $0.2 \sim 20 \times 10^9$ 精子/ml）に調整し、子宮液で等倍希釈したのち、密封ガラス管内で2～5時間インキュベートした。実験後、インキュベートした精子について、精子運動性を観察するとともに、TS法（ブタ）またはTS簡便法（ヤギ）による染色ならびにハムスターテスト（第2章第2節）により先体反応誘起の程度を調べた。

II. 結 果

本節の研究結果、インキュベートしたヤギ精子の運動精子率および前進精子率は、BSA欠B0液または子宮液のいずれで希釈しても、また開放試験管内または密封ガラス管内のいずれでインキュベートしても、インキュベーション時間の経過に伴って低下した（Fig. 29）。また、開放試験管および密封ガラス管内のいずれの場合でも、BSA欠B0液よりも子宮液で

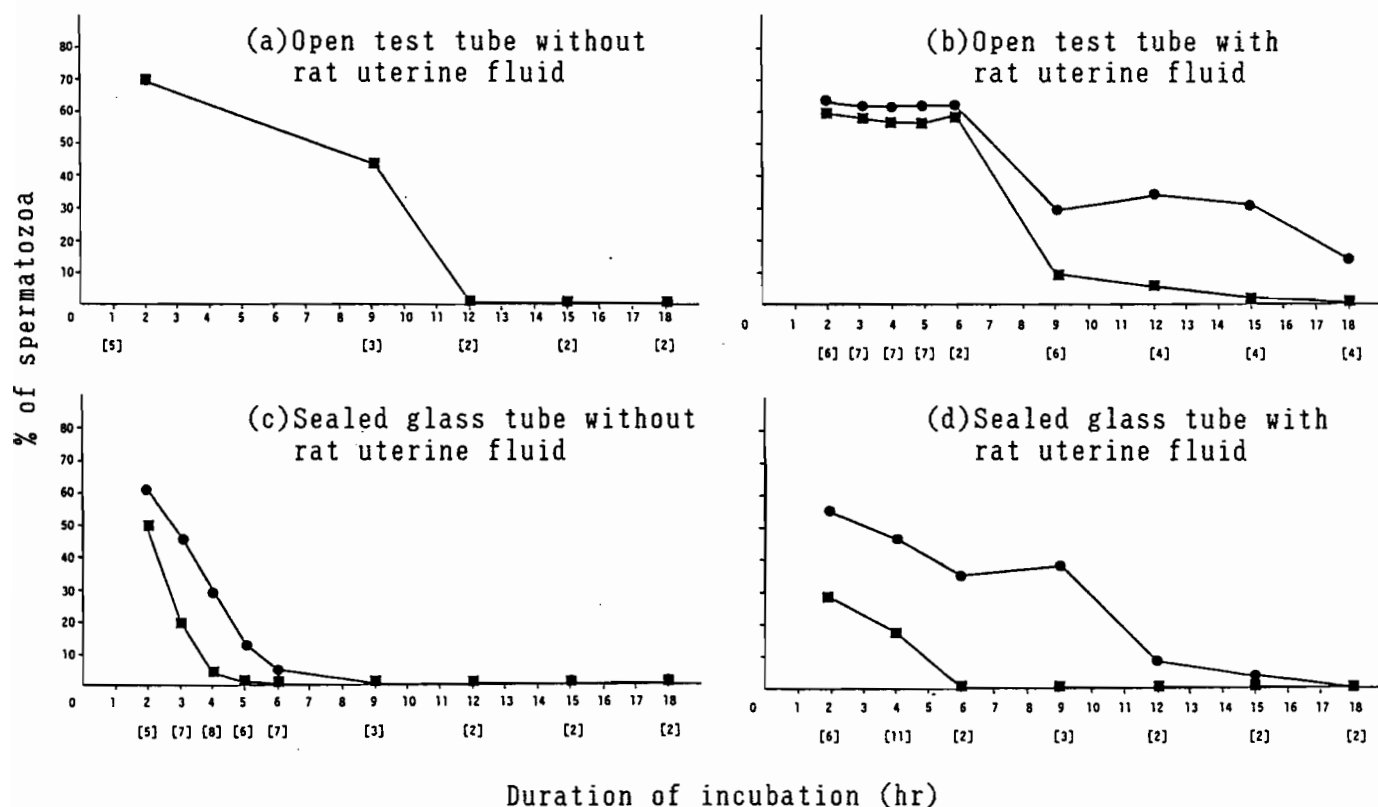


Fig. 29. Effect of incubation in open test tube (a,b) and sealed glass tube (c,d) with (b,d) or without (a,c) rat uterine fluid on the motility of goat spermatozoa.

●; Motile, ■; Progressively motile, []; No. of tests.

希釈した場合で、運動精子率および前進精子率が急激に低下した。また、BSA欠B0液および子宮液のいずれで希釈した場合でも、運動精子率は密封ガラス管に比べて開放試験管内インキュベーションで大きく低下したが、前進精子率はその逆であった。すなわち、開放試験管内では、BSA欠B0液で希釈した場合、運動精子のほとんどすべてが前進精子であったが、12時間後には認められなくなった。しかし、子宮液で希釈した場合は、前進精子は4時間、運動精子は6時間で認められなくなった。一方、密封ガラス管内インキュベーションでは、BSA欠B0液で希釈した場合、2～6時間では運動精子のほとんどすべてが前進精子で、この間これらはほとんど変化しなかった。6時間以上のインキュベーションでは、運動精子率は緩やかに低下したのに対して、前進精子率は急激に低下し12時間で認められなくなった。子宮液で希釈した場合、運動精子のうち前進精子は約ほぼ半数以下で、前進精子は6時間、運動精子は15時間のインキュベーションでほとんど認められなくなった。

TS簡便法およびハムスターテストの結果 (Table 10)、BSA欠B0液で希釈し開放試験管内でインキュベートした試料では、それぞれ2時間で約70%および3時間で約50%のヤギ

Table 10. Incidence^{1,2} of the acrosome reaction in ejaculated goat spermatozoa incubated in an open test tube and a sealed glass tube with or without rat uterine fluid.

Incubation condition			%[s.e.] of spermatozoa ¹		No. of eggs penetrated/ no. examined ² [%]	Average no. of sperm in penetrated eggs ²
Vessel	With(+) or without(-) uterine fluid	Duration (hr)	Live	Acrosome-reacted		
-	-	0	85.2 [12.3]	0.0 [0.0]	-	-
Open test tube	-	2	71.2	0.4	0/21 [0.0]	-
		3	54.3	0.9	0/21 [0.0]	-
		4	55.9	4.1	0/21 [0.0]	-
		5	50.8	4.1	0/19 [0.0]	-
		6	-	-	0/9 [0.0]	-
		9	50.3 [8.2]	5.6 [1.4]	0/17 [0.0]	-
		12	-	-	0/7 [0.0]	-
		15	52.0	4.9	0/3 [0.0]	-
		18	50.4	7.6	0/18 [0.0]	-
	+	2	79.8	0.0	-	-
		3	66.9 [9.4]	2.7 [1.1]	0/30 [0.0]	-
		4	49.9 [11.3]	2.2 [0.8]	0/50 [0.0]	-
		5	37.1 [10.7]	5.7 [2.4]	0/39 [0.0]	-
		6	20.2 [11.2]	6.8 [2.6]	0/52 [0.0]	-
		9	23.4	6.6	0/17 [0.0]	-
		12	-	-	0/8 [0.0]	-
		15	17.5	5.7	0/8 [0.0]	-
		18	18.8	3.7	0/7 [0.0]	-
Sealed glass tube	-	2	62.8 [9.6]	3.3 [1.2]	0/32 [0.0]	-
		3	60.3 [9.9]	2.5 [1.3]	0/48 [0.0]	-
		4	61.2 [8.1]	4.4 [1.8]	3/43 [7.0]	1.0
		5	60.3 [9.5]	4.1 [1.6]	7/44 [15.9]	1.0
		6	58.4	12.2	-	-
		7	35.4	10.4	-	-
		9	26.0 [11.0]	10.8 [3.2]	4/30 [13.3]	1.0
		12	24.6 [9.7]	10.9 [1.1]	2/12 [16.7]	1.0
		15	31.4 [11.7]	17.1 [4.2]	3/12 [25.0]	1.0
		18	29.7	16.6	1/12 [8.3]	1.0
	+	2	53.4	10.8	4/37 [10.8]	1.0
		3	49.6 [6.6]	9.2 [2.5]	4/52 [7.7]	1.0
		4	51.6 [7.0]	11.4 [3.6]	8/73 [11.0]	2.8
		5	49.6 [8.5]	15.8 [4.9]	13/37 [35.1]	1.9
		6	-	-	2/16 [12.5]	1.0
		7	23.7 [6.7]	11.9 [3.8]	-	-

¹Assessed by a simplified triple-stain technique. One to ten tests were performed for each duration of incubation.

²Assessed by a hamster test. One to ten tests were performed for each duration of incubation. Three to twelve eggs were examined for each test.

精子が生存していたが、先体反応を起こした精子はほとんど認められなかった。生存精子率は3時間以降特に変化せず、18時間のインキュベーションまで約50%の精子が生存していた。また、先体反応精子率は2～18時間のインキュベーション期間中で0.4～7.6%であった。子宮液で希釈し開放試験管内で2時間インキュベートした試料では、約8割の精子が生存していたが、先体反応精子は全く認められなかった。生存精子率はその後のインキュベーション時間の経過に伴って低下した。また、先体反応精子率は、2～18時間のインキュベーション期間中で0.0～6.8%であった。ハムスターテストの結果、開放試験管内インキュベーションでは、BSA欠B0液および子宮液のいずれで希釈した場合でも、2～18時間および3～18時間のすべてのインキュベーション時間で、卵子への精子侵入は全く認められなかった。BSA欠B0液で希釈し密封ガラス管内で2～6時間および7～18時間インキュベートした試料では、それぞれ約6割および約3割の精子が生存していた。また、先体反応精子率は2～5時間のインキュベーションでは2.5～4.4%であったが、6～18時間のインキュベーションでは10.8～17.1%であった。子宮液で希釈し密封ガラス管内で2～5時間インキュベートした試料では、約半数の精子しか生存していなかったが、9.2～15.8%の精子が先体反応を起こしていた。また、7時間のインキュベーションでは、生存精子率は23.7%に低下したが、その半数が先体反応精子であった。ハムスターテストの結果、密封ガラス管内インキュベーションでは、BSA欠B0液で希釈した場合、2～3時間のインキュベーションでは卵子への精子侵入は認められなかったが、4時間以上のインキュベーションで7.0～25.0%の卵子で精子侵入が認められた。また、子宮液で希釈した場合、2時間以上のインキュベーションで7.7～35.1%の精子侵入卵子率が得られ、4時間と5時間のインキュベーションでのみ卵子への多精子侵入が認められた。

また、ブタ精子のインキュベーションでは、B0液や子宮液のいずれで希釈しても、また開放試験管内や密封ガラス管内のいずれかでインキュベートしても、運動精子率および前進精子率はともに2～4時間または5時間のインキュベーション期間中で、それほど大きく変化しなかった（Fig. 30）。B0液で希釈した場合、開放試験管および密封ガラス管内インキュベーションでは、2～5時間のインキュベーション期間中の運動精子率はそれぞれ30～35%および41～50%で、いずれもその約半数が前進精子であった。子宮液で希釈した場合、開放試験管および密封ガラス管内インキュベーションでは、2～4時間のインキュベーション期間中の運動精子率はそれぞれ12～17%および20～33%であったが、前進精子

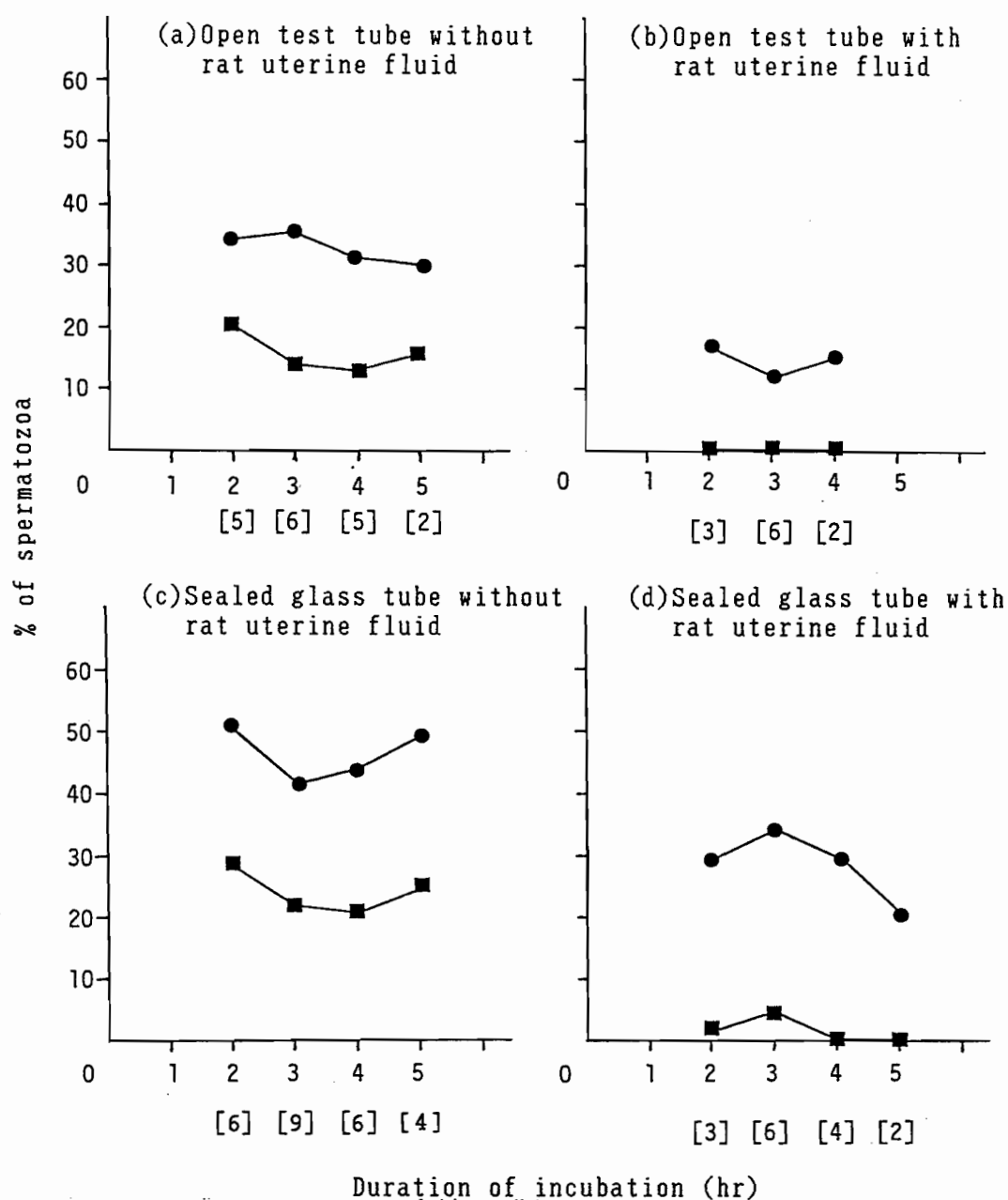


Fig. 30. Effect of incubation in open test tube (a,b) and sealed glass tube (c,d) with (b,d) or without (a,c) rat uterine fluid on the motility of boar spermatozoa. ●; Motile, ■; Progressively motile, []; No. of tests.

はほとんど認められなかった。

TS法およびハムスターテストの結果 (Table 11)、BO液で希釈したのち開放試験管内で2～4時間インキュベートした試料では、4～5割のブタ精子が生存しており、6.1～11.6%の精子が先体反応を起こしていた。一方、子宮液で希釈したのち開放試験管内で2～4時間インキュベートした試料では、3～4割の精子しか生存していなかったが、6.7～10.9

Table 11. Incidence^{1,2} of the acrosome reaction in ejaculated boar spermatozoa incubated in an open test tube and a sealed glass tube with or without rat uterine fluid.

Incubation condition			%[s.e.] of spermatozoa ¹		No. of eggs penetrated/ no. examined ² [%]	Average no. of sperm in penetrated eggs ²
Vessel	With(+) or without(-) uterine fluid	Duration (hr)	Live	Acrosome-reacted		
-	-	0	70.4 [10.9]	0.9 [0.8]	-	-
Open test tube	-	2	47.3 [11.0]	6.1 [1.2]	0/21 [0.0]	-
		3	36.9 [7.3]	7.8 [0.5]	0/20 [0.0]	-
		4	43.0 [6.7]	11.6 [2.0]	2/32 [6.3]	1.0
	+	2	35.3 [15.6]	6.7 [1.8]	2/7 [28.6]	1.0
		3	25.9 [5.8]	9.6 [1.4]	1/16 [6.3]	1.0
		4	28.9 [8.4]	10.9 [4.8]	2/13 [15.4]	1.0
Sealed glass tube	-	2	44.9 [5.0]	13.9 [3.6]	1/25 [4.0]	1.0
		3	39.9 [5.0]	11.6 [1.4]	2/34 [5.9]	1.0
		4	38.2 [2.5]	12.6 [2.2]	4/29 [13.8]	1.0
		5	41.7 [3.8]	12.0 [1.4]	1/18 [5.6]	1.0
	+	2	44.3 [11.8]	9.8 [0.8]	3/8 [37.5]	1.0
		3	41.3 [8.9]	10.6 [1.9]	1/15 [6.7]	1.0
		4	44.1 [3.9]	10.5 [2.8]	2/24 [8.3]	1.0
		5	41.5 [0.6]	14.2 [4.9]	4/18 [22.2]	1.0

¹Assessed by a triple-stain technique. One to ten tests were performed for each duration of incubation.

²Assessed by a hamster test. One to four tests were performed for each duration of incubation. Six to twelve eggs were examined for each test.

%の先体反応精子率が得られた。B0液または子宮液で希釈したのち密封ガラス管内で2～5時間インキュベートした試料では、約4割の精子が生存しており、9.8～14.2%の精子が先体反応を起こしていた。ハムスターテストの結果、B0液で希釈したのち開放試験管内でインキュベートした試料では、卵子への精子侵入は2～3時間のインキュベーションでは認められなかったが、4時間のインキュベーションでは低率ながら認められた。子宮液で希釈した試料では、2時間以上のインキュベーションで6.3～28.6%の卵子に精子侵入が認められた。密封ガラス管内インキュベーションでは、B0液および子宮液のいずれで希釈した試料でも、2時間以上のインキュベーションで卵子への精子侵入が認められ、それぞれ4.0～13.8%および6.7～37.5%の精子侵入卵子率が得られた。なお、すべてのインキュベーション条件で、卵子への多精子侵入は認められなかった。

なお、ヤギ精子浮遊液の精子濃度の違いによるインキュベーション効果を調べた結果

Table 12. Incidence^{1,2} of the acrosome reaction in ejaculated goat spermatozoa incubated in a sealed glass tube with rat uterine fluid in various sperm concentrations.

Final sperm concentration (x10 ⁶ /ml)	Duration of incubation (hr)	% of spermatozoa ¹		No. of eggs penetrated/ no. examined ² [%]	Average no. of sperm in penetrated eggs ²
		Live	Acrosome-reacted		
10.0	2	27.5	17.5	4/28 [14.3]	1.0
	3	23.6	20.6	8/65 [12.3]	1.5
	4	31.0	16.9	9/27 [33.3]	1.5
	5	35.0	19.7	10/22 [45.5]	3.7
5.0	2	-	-	1/28 [3.6]	1.0
	3	-	-	14/65 [21.5]	1.4
	4	-	-	6/39 [15.4]	1.0
	5	-	-	21/48 [43.8]	2.0
2.5	2	49.9	5.1	0/18 [0.0]	-
	3	18.7	7.1	6/43 [14.0]	1.0
	4	23.0	17.6	2/17 [11.8]	1.0
	5	17.6	13.4	3/26 [11.5]	1.0
1.0	4	87.8	2.3	0/17 [0.0]	-
	5	-	-	0/10 [0.0]	-
0.1	4	58.0	2.9	0/16 [0.0]	-
	5	61.9	2.9	0/18 [0.0]	-

¹Assessed by a simplified triple-stain technique. One to two tests were performed for each duration of incubation.

²Assessed by a hamster test. One to five tests were performed for each duration of incubation. Eight to thirteen eggs were examined for each test.

(Table 12)、 10.0×10^6 精子/mlの場合は、2～5時間のインキュベーション期間中常に3割程度の精子が生存しており、16.9～20.6%の精子が先体反応を起こしていた。また、 2.5×10^6 精子/mlの場合、生存精子率は2時間のインキュベーションでは約5割であったが、その後のインキュベーションで約20%に低下した。先体反応精子率は、インキュベーション時間の経過に伴って増加する傾向が認められ、4時間のインキュベーションで最高値が得られた。 1.0 および 0.1×10^6 精子/mlの場合、4～5時間インキュベートしたにもかかわらず、生存精子率は他の精子濃度に比べて高く、一方、先体反応精子率は2.3～2.9%と低かった。ハムスターテストの結果、精子濃度 10.0 および 5.0×10^6 精子/mlのいずれの場合も、2～5時間のすべてのインキュベーション時間で卵子への精子侵入が認められ、精子侵入卵子率および平均侵入精子数はインキュベーション時間の経過に伴って増加し、

ともに5時間のインキュベーションで最高値が得られた。 2.5×10^8 精子/mlの場合、2時間のインキュベーションでは卵子への精子侵入は認められなかったが、3～5時間のインキュベーションでは11.5～14.0%の精子侵入卵子率が得られた。しかし、 1.0 および 0.1×10^8 精子/mlの場合、4～5時間インキュベーションしたにもかかわらず、卵子への精子侵入は認められなかった。

Ⅲ. 考 察

本節の研究結果から、ヤギ射出精子の先体反応は、開放試験管内では誘起されないが、密封ガラス管内でインキュベートすれば誘起され、子宮液を添加すると一層短時間で誘起されることが知られた。一方、ブタ射出精子の先体反応は、B0液で希釈した場合、開放試験管内では4時間、密封ガラス管内では2時間のインキュベーションで誘起されるが、密封ガラス管内では子宮液添加と無添加のあいだで特に時間差がないことが知られた。また、密封ガラス管内でヤギ射出精子をインキュベーションする場合、精子濃度が高いほど短時間で効率的に誘起されることが知られた。

池上ら³⁰²⁾は、精子濃度 $2 \sim 3 \times 10^8$ 精子/mlのウシ精子浮遊液を空気の拡散のない容器内で、 37°C で0～60分間インキュベートした場合、精子浮遊液中の溶存酸素量はインキュベート10分後には0 mmHgとなり、その後60分間まで変化しなかったと報告している。本節の密封ガラス管では、高い精子濃度の精子浮遊液をガラス管内に入れワセリンとパラフィンの混合物で両端を完全に密封しているため、精子は数分以内に浮遊液中の酸素を完全に消費し、密封ガラス管内は絶対嫌気の状態になると思われる。またこの時、精子濃度が高いほど早く嫌気状態になると思われる。これらのことから考えると、本節の方法におけるヤギおよびブタ精子の受精能獲得および先体反応誘起要因の1つは嫌気条件、すなわち酸素不足ではないかと思われる。前節の実験小動物から摘出した生殖道内でも、血流を断たれた生殖道に高精子濃度の精子浮遊液を注入するため、精子はインキュベーション時間のごく早期に酸素不足に陥ると考えられる。また、著者は前節および本節において、ヤギおよびブタ精子の運動性が、雌実験小動物から摘出した生殖道内または嫌気条件下で著しく弱まり、先体反応精子率と前進運動精子率の間に負の相関性があることを認めている。一般にエネルギー獲得系としては、解糖系に比べて呼吸系でエネルギー効率の高いことが知られており、ウマやブタの精子はエネルギーの獲得を解糖よりも呼吸に依存すると言われ

ている。しかし、ヤギを含むほとんどの哺乳動物の精子では解糖が主と考えられており^{292, 294, 296, 311}、これらの精子では嫌気条件下においてもグルコースなどの代謝基質が存在すれば解糖により十分なエネルギーを獲得する^{568, 569}。したがって、呼吸依存型のブタ精子では、酸素不足によってエネルギー生成が著しく阻害されるが、解糖依存型のヤギ精子では、絶対嫌気条件下においてもエネルギー獲得で大きな損害は受けないと思われる。本節において、開放試験管内でのインキュベーションでは、ヤギ精子の先体反応は誘起されなかったが、ブタ精子の先体反応は誘起された。この場合、開放試験管内であっても、ブタ精子はかなりの高濃度の状態にあり、相当の酸素不足を生じたと推定される。これらのことから、ヤギとブタ精子の受精能獲得および先体反応誘起に対する開放試験管内インキュベーション法の効果の差はエネルギー獲得方法における種間の差に起因していること、また、ヤギおよびブタ精子の受精能獲得および先体反応誘起要因の一つは酸素不足によるエネルギー生成の低下であることが推察された。なお、ヤギおよびブタ精子を発情前期のラットの子宮に貯留する液で希釈後、嫌気条件下でインキュベートした場合、子宮液には嫌気条件下の先体反応誘起を高めるような作用は認められなかったが、誘起の時間を短縮する効果のあることが知られた。Iritani et al.³⁰⁴は、ラット子宮液にはラット精巣上体精子の呼吸を刺激する作用があることを報告している。したがって、本節において、ラット子宮液添加により、嫌気条件下でのヤギおよびブタ精子の先体反応の誘起に要する時間が短縮されたのは、子宮液によってこれらの精子の呼吸が刺激され、精子浮遊液中の溶存酸素がより短時間で欠乏したためではないかと考えられる。また、ブタ精子の密封ガラス管内インキュベーションでは、子宮液添加の有無で先体反応誘起効果に差は認められなかったが、ブタでは嫌気条件下で比較的急速に先体反応が誘起されるため、密封ガラス管内のような絶対嫌気条件下では、子宮液添加の効果が現われなかったものと推察される。子宮液が精子の受精能獲得や先体反応に関連しているとする報告はこれまでに多数出されている^{247, 248, 298, 308}。子宮液の成分については、様々な動物でその組成がほぼ明らかになっているが^{297, 300, 303-307, 500-505}、どの成分が精子の受精能獲得や先体反応に関与するのかはまだ不明である。しかし、最近、AXらのグループ^{286-290, 301}は、ムコ多糖類（グリコサミノグリカン）がウシ精子の先体反応を誘起することや、この多糖類が発情期のウシの子宮頸部粘液中に多いことを報告している。

精子の受精能獲得または先体反応を誘起する場合に用いられる媒液中には、通常、結晶

ウシ血清アルブミン(BSA)が含まれている。Fraser²⁹⁹⁾は、体外でのマウス精子の先体反応誘起には、BSAが必要であることを報告している。また、Lui & Meizel²⁹¹⁾は、ハムスター精子で同様のことを報告している。BSAを含む媒液は、一般に完全合成培地と呼ばれているが、市販のBSAは脂肪酸の含量が一定ではなく³⁰⁹⁾、また他のタンパクも混入しており³¹⁰⁾、また、市販のBSAを含む媒液を用いた実験成績は、BSAのロットに左右されることがよく知られている²⁹⁵⁾。したがって、BSAを必要としない受精能獲得および先体反応誘起用の媒液または誘起方法を開発することは有意義なことと思われる。本節において、ヤギ精子の洗浄およびインキュベーション用には、BSAを含まない媒液を用いたにもかかわらず、ヤギ精子は先体反応を起こした。このことは、ヤギ精子先体反応誘起にはBSAが必要でないか、または嫌気条件下でのインキュベーション法ではBSAを必要としないかのいずれかを示唆しているものと思われる。

第4節 完全無機合成培地における先体反応の誘起

哺乳動物精子の受精能獲得または先体反応を誘起するために通常用いられる媒液には、陽イオンとして Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} および Mg^{2+} 、陰イオンとして Cl^- 、 SO_4^{2-} および PO_4^{3-} 、代謝基質としてグルコース、ピルビン酸および乳酸、緩衝剤として重炭酸塩やHEPESなどが含まれている。また、そのほかに不活化血清や血清アルブミンなどが含まれる場合もある。これらのうち、 Ca^{2+} はほとんどの動物の精子の先体反応誘起に不可欠であると考えられている^{120, 121, 167, 548-550, 557)}が、その他の成分については動物種によって必要性が異なり、また同じ動物種においても研究者の間で見解が異なっている^{167, 211, 283, 312, 314, 315, 318-324, 365-370, 549, 551, 554-556)}。

そこで本節では、ヤギ射出精子の先体反応誘起に及ぼす媒液中の代謝基質の除去、インキュベーション温度および時間、媒液中の Ca^{2+} および各種イオンの影響について調べた。また、ヤギ精子で得られた簡便かつ効果的な先体反応誘起方式についてウシおよびブタ精子への応用を試みた。

I. 材料および方法

ヤギ精液は日本在来種雄ヤギ4頭(A、B、CおよびD)から人工陰法により、ブタ濃

厚部精液は梅山豚4頭から手圧法により分画採取した新鮮なものを用いた。ウシ精液は、黒毛和種雄ウシ1頭(A)およびホルスタイン種雄ウシ1頭(B)の凍結ストロー精液を常法に準じて融解したものを用いた。また、精子の洗浄およびインキュベーションには、BSA欠B0液およびこれから代謝基質を除去した各種無機溶液(K-1液、K-2液、K-3液、K-4液およびK-5液)を用いた(Table 1)。なお、各媒液の浸透圧はB0液と等張になるようにNaClで調整した。

実験1 まず、媒液中の代謝基質の除去ならびに前培養温度の影響を調べる目的で、ヤギ精液を、BSA欠B0液またはK-1液を用いて、 $600 \times g$ で5分間の遠心分離により3回洗浄精子浮遊液(精子濃度; 約 3×10^9 精子/ml)とし、開放試験管内あるいは密封ガラス管内において 37.0°C または 39.5°C で1~2時間インキュベートした。次に、前培養時間の影響を調べる目的で、ヤギ精液をK-1液を用いて3回洗浄精子浮遊液(精子濃度; 約 4×10^9 精子/ml)とし、密封ガラス管内において 39.5°C で1時間、2時間または3時間インキュベートした。

実験2 先体反応に関与する媒液の無機溶液成分を究明するため、精子の洗浄用ならびにインキュベーション用の媒液には、各種の塩類を組み合わせたK-1液、K-2液、K-3液およびK-4液の4種類の媒液を用いた(Table 1)。なお、これらの媒液の浸透圧はすべて等張となるようにNaClで調整した。ヤギ精液をこれらの4種類の媒液を用いて、 $600 \times g$ で5分間の遠心分離により高精子濃度($4 \sim 7 \times 10^9$ 精子/ml)の3回洗浄精子浮遊液とし、密封ガラス管内において 39.5°C で1時間、2時間および3時間インキュベートした。

実験3 先体反応とCaイオンとの関係を究明するため、精子の洗浄用ならびにインキュベーション用の媒液には、K-4液とK-5液の2種類の媒液を用いた(Table 1)。なお、K-5液の浸透圧はK-4液と等張となるようにNaClで調整した。ヤギ精液を、K-4液またはK-5液を用いて、 $600 \times g$ で5分間の遠心分離により高精子濃度($7 \sim 9 \times 10^9$ 精子/ml)の3回洗浄精子浮遊液とし、一部を密封ガラス管内において 39.5°C で1、2および3時間インキュベートした。また、K-5液で3回洗浄した精子の一部は、3,000 ppmのSrを含む蒸留水で適当に希釈したのち、原子吸光分光光度計を用いてCa含量を測定した。なお、Ca含量の単位は 10^9 精子当たりの μg 数によって表わした。

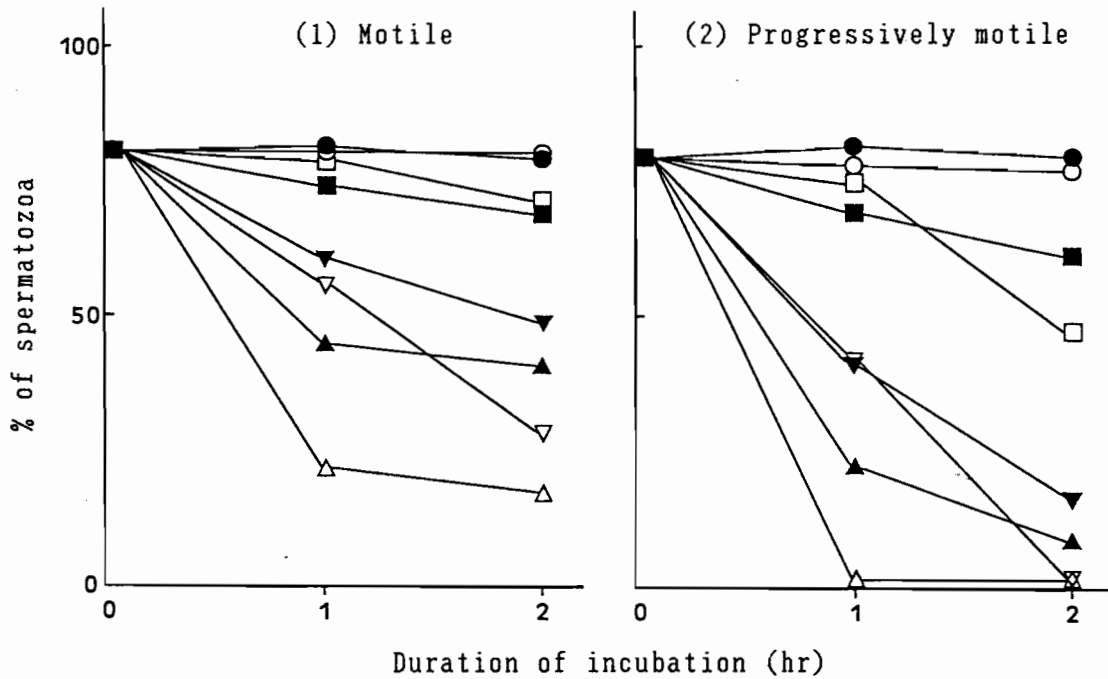


Fig. 31. Effects of elimination of energy substrate in medium and of incubation vessel and temperature on motility of goat spermatozoa (n=4).

●; Open test tube with substrate at 37.0°C, ○; Open test tube with substrate at 39.5°C, ▲; Open test tube without substrate at 37.0°C, △; Open test tube without substrate at 39.5°C, ■; Sealed glass tube with substrate at 37.0°C, □; Sealed glass tube with substrate at 39.5°C, ▼; Sealed glass tube without substrate at 37.0°C, ▽; Sealed glass tube without substrate at 39.5°C.

実験4 ウシおよびブタ精子の先体反応誘起について確かめるため、ウシおよびブタ精液は、K-3液を用いて等倍（ブタ）または8倍（ウシ）希釈したのち、600×gで5分間の遠心分離により高精子濃度（ウシ； $1.5 \sim 2.0 \times 10^9$ 精子/ml、ブタ；約 4×10^9 精子/ml）の3回洗浄精子浮遊液とし、密封ガラス管内において39.5°Cで1時間または2時間インキュベートした。

これらの精子は、運動性を観察するとともに、TG染色法による染色、ハムスターテストならびにTEMによる観察により先体反応誘起の程度を調べた。なお、TG染色法で得られた生存精子率および先体反応精子率は角変換したのち、分散分析を行い、Duncanの多重検定法³²⁶⁾により処理区間の差の有意性を検討した。また、試料の残りはハムスターテストに供した。得られた結果は、 χ^2 検定法により統計分析を行った。

Table 13. Effects of elimination of energy substrate in medium and of incubation vessel and temperature on incidence^{1,2} of the acrosome reaction in ejaculated goat spermatozoa (n=4).

Incubation condition			%[s.e.] of spermatozoa ¹		No. of eggs penetrated/ no. examined ² [%]	Average no. of sperm in penetrated eggs ²
Vessel	With(+) or without(-) substrate	Temperature (°C)	Live	Acrosome-reacted		
Open Test tube	+	37.0	76.1[2.9] ^{ab}	0.3[0.3] ^b	0/21[0.0]	-
		39.5	79.5[2.3] ^a	0.3[0.3] ^b	0/20[0.0]	-
	-	37.0	42.1[8.4] ^{cd}	12.4[2.5] ^b	6/18[33.3]	1.7
		39.5	20.7[2.2] ^d	13.1[4.3] ^{ab}	14/46[30.4]	1.1
Sealed glass tube	+	37.0	63.7[6.1] ^{abc}	4.3[2.1] ^b	0/42[0.0]	-
		39.5	73.8[6.8] ^{ab}	11.5[3.4] ^b	10/29[34.5]	1.8
	-	37.0	48.1[6.7] ^{bcd}	12.3[4.8] ^b	4/16[25.0]	1.5
		39.5	31.3[5.3] ^d	30.7[5.5] ^a	40/52[76.9] [*]	1.9

¹Assessed by a simplified triple-stain technique. ^{a,b,c,d}Values within the same column with different superscripts differ significantly, P<0.05 (Duncan's new multiple range test).

²Assessed by a hamster test. Two to five tests were performed for each incubation condition. Nine to twelve eggs were examined for each test.

*P<0.05 compared with values at 37.0 °C (χ^2 test).

II. 結 果

まず、ヤギ精子を開放試験管内インキュベートした場合、B0液中では、温度にかかわらず精子の運動性はインキュベーション期間中良好に保たれた (Fig. 31)。一方、K-1液中ではいずれの温度でも精子の運動性は著しく低下し、低下の程度は37.0°Cに比べて39.5°Cで大きく、インキュベーション1時間目で前進精子はほとんど認められなくなった。密封ガラス管内インキュベーションの場合、4種類のインキュベーション条件のいずれにおいても精子の運動性は低下し、B0液中に比べてK-1液中のほうが、また、37.0°Cに比べて39.5°Cのほうが低下の程度が著しかった。

2時間インキュベートした試料を用いたTS簡便法およびハムスターテストの結果 (Table 13)、B0液中では、インキュベーション容器やインキュベーション温度にかかわらず、試料中の60~70%の精子が生存し、一方、K-1液中では、いずれの容器でも37.0°Cで40~50%、39.5°Cで20~30%の精子が生存していた。生存精子率は、37.0°Cの密封ガラス管内でのインキュベーションの場合を除いて、媒液間では有意差がみられたが、容器間およびインキュベーション温度間では有意差はなかった。B0液中では、開放試験管内インキュベ-

Table 14. Effect of incubation time on incidence^{1,2} of the acrosome reaction in ejaculated goat spermatozoa.

Duration of incubation (hr)	No. of tests	%[s.e.] of acrosome-reacted sperm ¹	No. of eggs penetrated/no. examined ² [%]	Average no. of sperm in penetrated eggs ²
1	3	2.5[1.6] ^b	3/33[9.1] ^b	1.0 ^b
2	5	32.3[4.8] ^a	36/39[92.3] ^a	4.1 ^a
3	4	21.2[8.7] ^a	37/45[82.2] ^a	3.7 ^a

¹Assessed by a simplified triple-stain technique.

²Assessed by a hamster test. Seven to twelve eggs were examined for each test.

^{a,b}Values within the same column with different superscripts differ significantly, $P < 0.05$ (left and right columns; Duncan's new multiple range test, center column; χ^2 test).

シヨンの場合、いずれの温度でも先体反応を起こした精子はほとんど認められなかったが、密封ガラス管内インキュベーションでは、37.0℃で4.3%および39.5℃で11.5%の先体反応精子率が得られた。一方、K-1液中では、37.0℃および39.5℃の温度のインキュベーションにおいて開放試験管内ではそれぞれ12.4%および13.1%の、密封ガラス管内では、それぞれ12.3%および30.7%の先体反応精子率が得られ、いずれの容器の場合でも、K-1液中で39.5℃において有意に高い先体反応率が得られた。また、ハムスターテストの結果、開放試験管内インキュベーションでは、B0液の場合、インキュベーション温度にかかわらず卵子への侵入は全く認められなかったが、K-1液の場合は約30%の卵子で精子侵入が認められた。密封ガラス管内インキュベーションでは、B0液の場合、37.0℃では精子侵入は認められなかったが、39.5℃で29個中10個の卵子で精子侵入が認められた。また、K-1液の場合、37.0℃および39.5℃でそれぞれ25.0%および76.9%の精子侵入卵子率が得られ、これらの精子侵入卵子率の間の差は有意であった。

次に、K-1液を用い、39.5℃の密封ガラス管内で先体反応誘起に対するインキュベーション時間の影響を検討した。TS簡便法による染色結果ならびにハムスターテストの結果、インキュベーション1時間目では、先体反応精子率はわずか2.5%であった(Table 14)。また、ハムスターテストで得られた精子侵入卵子率および平均侵入精子数も低く、それぞれ9.1%および1.0個であった。しかし、2時間目では、先体反応精子率、精子侵入卵子率および平均侵入精子数はいずれも有意に増加し、それぞれ32.3%、92.3%および4.1個となった。また、3時間目でも、2時間目と同程度の高い値が得られた。

Table 15. Time-related changes in the penetration of incubated goat ejaculated spermatozoa into zona-free hamster eggs in vitro.

Time after insemination (hr)	No. of eggs penetrated/ no. examined [%]	Average no. of sperm in penetrated eggs	No. of enlarged sperm heads [%] + no. of male pronuclei [%]
1	0/41[0.0]	-	0[0]+0[0]
2	36/39[92.3]	3.6	128[99]+2[1] ^b
3-4	76/77[98.7]	3.4	144[59]+117[41] ^a
5	39/41[95.1]	3.6	66[46]+76[54] ^a

^{a, b}Values with different superscripts differ significantly, $P < 0.05$ (χ^2 test).

さらに、K-1液に浮遊させ、密封ガラス管内において39.5℃で2時間インキュベートしたヤギ精子を用い、媒精後の透明帯除去ハムスター卵子への精子の侵入状況を経時的に調べた結果、媒精後1時間目では、卵子への精子侵入は認められなかったが、2時間目では、39個中36個(92.3%)の卵子に平均3.6個の精子が侵入していた(Table 15)。なお、2時間目以後、精子侵入卵子率および平均侵入精子数に変化は認められなかった。また、2時間目では、侵入した精子の98.7%が膨化の段階にあり、雄性前核はほとんど認められなかったが、媒精後のインキュベーション時間の経過に伴って、観察される雄性前核の数は有意に増加した。

次に、K-1、K-2、K-3およびK-4液の無機媒液を用いてインキュベートした結果(Table 16)、インキュベーション直前では、TG染色法の結果、約80%の精子が生存していたが、先体反応を起こした精子はほとんど認められなかった。インキュベーション開始後は、時間の経過に伴って、生存精子率は有意に低下したが、先体反応精子率、精子侵入卵子率および平均侵入精子数は有意に増加した。2時間および3時間インキュベートした試料では生存精子のほとんどすべての精子が先体反応精子と判別され、また、ハムスターテストでは、ほとんどの透明帯除去ハムスター卵子で2～5個の精子が侵入しているのが観察された。なお、先体反応精子率と精子侵入卵子率はともに2時間と3時間のインキュベーション時間の間で有意差は認められなかった。

次に、K-4液とK-5液との効果を比較した結果(Table 17)、インキュベーション直前に

Table 16. Incidence^{1,2} of the acrosome reaction in ejaculated goat spermatozoa incubated in various physiological salt solutions.

Incubation condition		No. of tests	% [s.e.] of spermatozoa ¹		No. of eggs penetrated/ no. examined ² [%]	Average no. of sperm in penetrated eggs ²
Medium	Duration (hr)		Live	Acrosome-reacted		
K-1	0	5	78.4 [8.7] ^a	0.1 [0.1] ^b	-	-
	1	4	78.8 [6.9] ^a	2.0 [1.5] ^b	3/44 [6.8] ^b	1.0
	2	14	41.6 [5.8] ^b	40.3 [5.3] ^a	66/72 [91.7] ^a	3.4
	3	16	46.6 [5.5] ^b	46.4 [5.4] ^a	80/87 [92.0] ^a	3.5
K-2	0	5	79.9 [4.3] ^a	0.1 [0.1] ^b	-	-
	1	5	84.2 [2.8] ^a	0.8 [0.3] ^b	1/52 [1.9] ^b	1.0
	2	5	54.6 [13.1] ^b	49.5 [12.1] ^a	80/92 [87.0] ^a	2.1
	3	5	55.3 [12.2] ^b	55.2 [12.1] ^a	73/78 [93.6] ^a	4.4
K-3	0	18	81.2 [3.1] ^a	0.1 [0.0] ^b	-	-
	1	4	85.0 [6.3] ^a	1.7 [0.7] ^b	1/28 [3.6] ^b	1.0
	2	6	65.3 [8.9] ^{ab}	58.5 [6.7] ^a	106/116 [91.4] ^a	4.8
	3	16	59.2 [3.7] ^b	59.0 [3.6] ^a	83/86 [96.5] ^a	3.0
K-4	0	6	77.2 [3.5] ^a	0.1 [0.1] ^b	-	-
	1	6	79.1 [3.3] ^a	2.0 [0.6] ^b	7/44 [15.9] ^b	1.3
	2	6	67.8 [7.2] ^a	66.5 [6.6] ^a	44/47 [93.6] ^a	5.0

¹Assessed by the trypan blue-Giemsa method.²Assessed by the hamster test. Five to twenty eggs were examined for each test.^{a, b}Values within the same column with different superscripts differ significantly, $P < 0.05$ (% of spermatozoa; Duncan's new multiple range test, % of eggs penetrated; χ^2 test).

は、7～8割の精子が生存し、そのすべてが正常な先体を持つ精子であったが、これらの精子を密封ガラス管内にとり39.5℃でK-4液を用いてインキュベートすると、2時間後には生存精子のほとんどすべてに相当する59.3%の精子が正常な先体を失った。また、この試料を用いてハムスターテストを行なったところ、93.5%のハムスター卵子に4.1個の精子が侵入した。なお、K-4液を用いた場合に得られたTG染色法およびハムスターテストの結果には、ヤギ個体間で特に差は認められなかった。一方、K-5液を用いてヤギAの精子をインキュベートした場合、3時間後には生存精子の約9割に相当する62.1%の精子が、正常な先体を失った。しかし、この試料を透明帯除去ハムスター卵子に媒精しても、精子侵入はわずか8.4%の卵子にしかみられなかった。ヤギB、CおよびDの精子を用いた場合、TG染色法で得られた結果にはヤギ個体間で特に差は認められず、ヤギAの場合と同様に3時間のインキュベートで生存精子の8～9割に相当する精子が正常な先体を失った。

Table 17. Incidence^{1,2} of the acrosome reaction in ejaculated goat spermatozoa incubated in the medium with (K-4) and without (K-5) Ca²⁺.

Medium	Goat	Duration of incubation (hr)	%[s.e] of spermatozoa ¹		No. of eggs penetrated/ no. examined ² [%]	Average no. of sperm in penetrated eggs ²
			Live	Acrosome-reacted		
K-5 (-Ca)	A	0	85.7[2.0]	0.0[0.0]	-	-
		1	71.0	1.5	0/20[0.0]	-
		2	70.0[4.1]	2.7[1.2]	0/24[0.0]	-
		3	68.3[3.9]	62.1[3.7]	13/155[8.4]	-
	B	0	81.8[0.7]	0.0[0.0]	-	-
		3	70.8[2.1]	61.3[2.1]	85/98[86.7]	3.1
	C	0	68.0	0.0	-	-
		3	55.5	47.5	1/22[4.5]	1.0
	D	0	70.0[6.9]	0.0[0.0]	-	-
		3	52.3[7.7]	46.0[9.9]	8/48[16.7]	1.4
	Total ³	0	78.6[2.7]	0.0[0.0]	-	-
		1	78.9[2.3]	1.9[0.5]	7/54[12.9]	1.3
		2	60.9[6.0]	59.3[9.1]	58/62[93.5]	4.1

¹Assessed by a trypan blue-Giemsa method. Two to ten tests were performed for each duration of incubation.

²Assessed by a hamster test. Two to ten tests were performed for each duration of incubation. Ten to Sixteen eggs were examined for each test.

³A+B+C+D

しかし、ハムスターテストの結果はヤギ個体間で異なり、得られた精子侵入卵子率と平均侵入精子数は、それぞれヤギBで86.7%と3.1個、Cで4.5%と1.0個、Dで16.7%と1.0個であった。

K-4液を用いて2時間インキュベートした精子試料 (Fig. 32a)、およびK-5液を用いて3時間インキュベートした精子試料 (Fig. 32b,c) で認められた正常先体を持たない生存精子をTG染色で比較検討したが、両者の染色像の間で特に差異は認められなかった。なお、K-5液を用いた場合において、透明帯除去ハムスター卵子に侵入する場合 (Fig. 32b) と侵入しない場合 (Fig. 32c) の間でも、染色像に差異は認められなかった。次に、これらの精子試料をTEMで観察した結果、K-4液を用いて2時間インキュベートした精子試料 (Fig. 33a) およびK-5液を用いて3時間インキュベートした精子試料 (Fig. 33b,c) のいずれにおいても、多数の精子の頭部に先体反応特有の形態変化が認められ、K-5液を用いて3時間インキュベートした精子試料のほうが胞状化の形態が若干不規則であることを除いて両

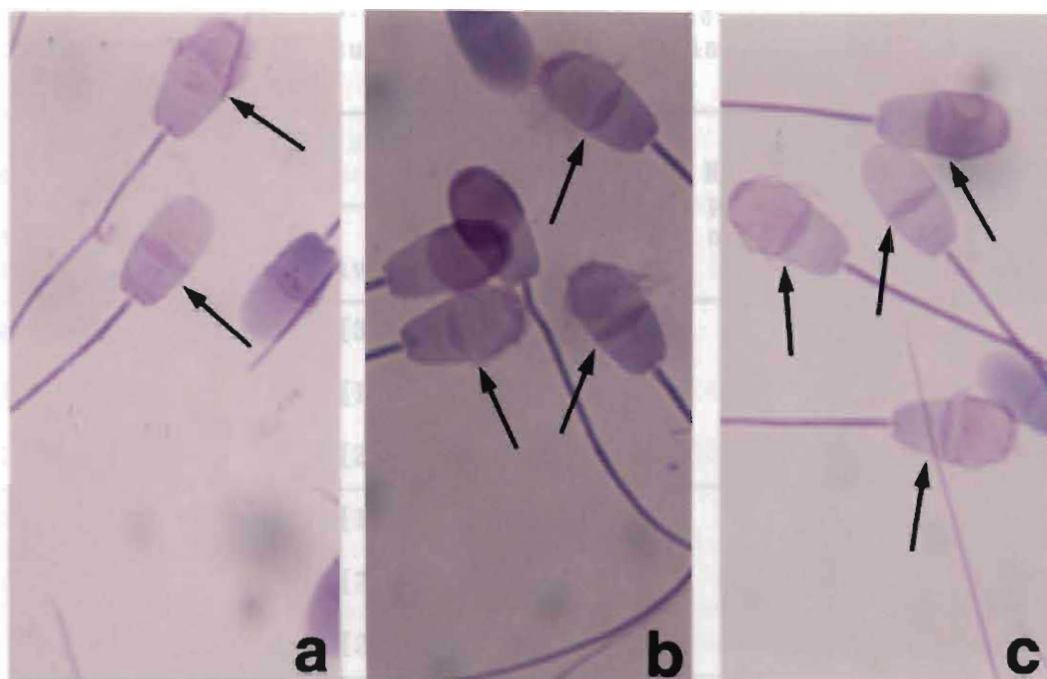


Fig. 32. Goat spermatozoa stained by a trypan blue-Giemsa method after incubation in K-4 (a) or K-5 (b & c) medium, showing live spermatozoa without a normal acrosome (arrows) that could (a & b) and could not (c) penetrate zona-free hamster eggs. Original magnification, x1,000.

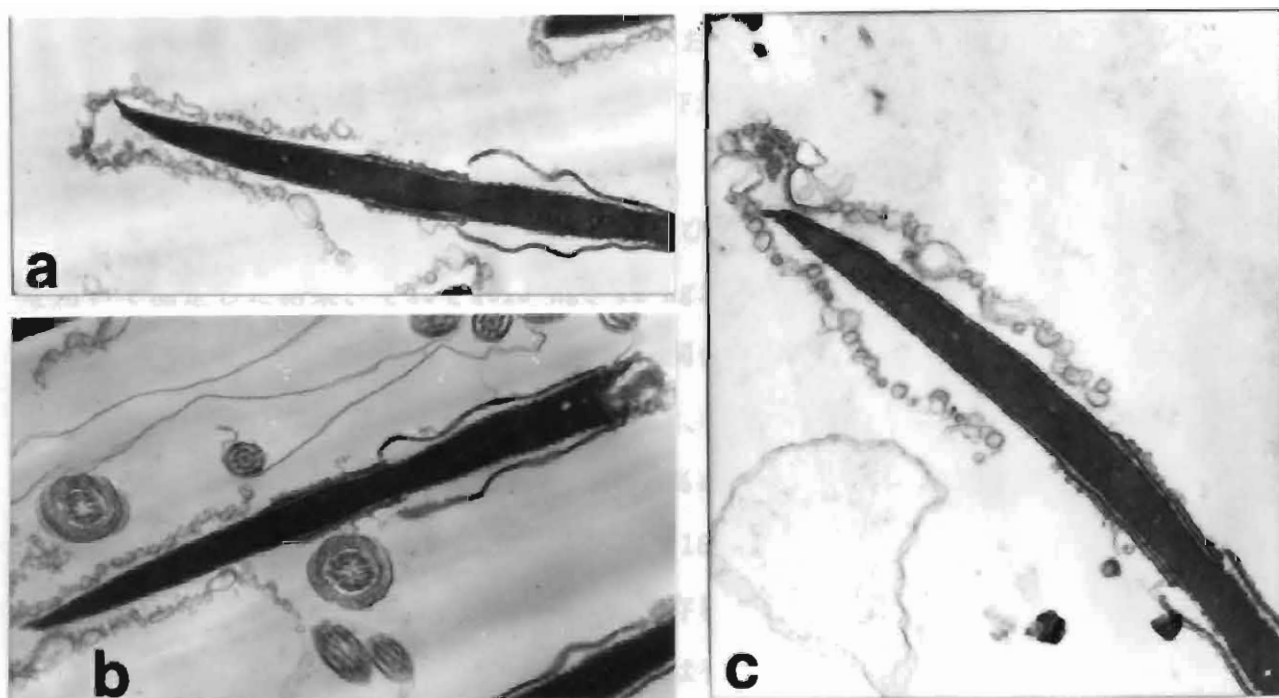


Fig. 33. Sagittal section of acrosome-reacted goat spermatozoa after incubation in K-4 (a) or K-5 (b & c) medium, showing spermatozoa that could (a & b) and could not (c) penetrate zona-free hamster eggs. Original magnification, x15,000 (a, b) and x20,000 (c).

Table 18. Incidence^{1,2} of the acrosome reaction in ejaculated bull spermatozoa³ incubated in K-3 medium in a sealed glass tube at 39.5°C (n=3).

Bull	Duration of incubation (hr)	%[s.e.] of spermatozoa ¹		No. of eggs penetrated/ no. examined ² [%]	Average no. of sperm in penetrated eggs ²
		Live	Acrosome-reacted		
A	0	63.2[3.1] ^b	3.4[1.6] ^c	-	-
	1	59.5[1.6] ^{bc}	25.0[6.2] ^b	34/52[65.4] ^b	1.4
	2	47.0[2.5] ^c	37.0[0.8] ^{ab}	33/36[91.7] ^a	1.8
B	0	82.8[1.1] ^a	2.5[1.1] ^c	-	-
	1	58.3[2.2] ^{bc}	49.2[3.2] ^a	43/44[97.7] ^a	3.8
	2	46.7[2.3] ^c	43.8[2.7] ^a	35/41[85.4] ^a	1.5

¹Assessed by the a trypan blue-Giemsa method.

²Assessed by the a hamster test. Twelve to eighteen eggs were examined for each test.

^{a,b,c}Values within the same column with different superscripts differ significantly, $P < 0.05$ (% of spermatozoa; Duncan's new multiple range test, % of eggs penetrated; χ^2 test).

者のTEM像に特に差異は認められなかった。なお、K-5液を用いた場合において、透明帯除去ハムスター卵子への侵入の有(Fig. 33b)無(Fig. 33c)によって、TEM像の差異は認められなかった。

K-5液を用いて3回洗浄したヤギA、BおよびDの精子のCa含量を原子吸光分光光度計を用いて測定した結果、それぞれ13 ng、44 ngおよび29 ng/10⁶精子となり、Ca含量とハムスターテストの結果の間に有意な正の相関関係が認められた($r=0.89$, $P < 0.01$, $n=8$)。

ウシ精子をK-3液でインキュベートした場合、3回洗浄のみを施したインキュベーション直前(0時間目)のウシA試料では、約63%の精子が生存精子と判別されたが、先体反応精子は約3%しか認められなかった(Table 18)。また、インキュベーション後は時間の経過に伴って生存精子率は有意に低下し、生存精子のうちでは正常先体を持つ精子の割合が低下したのに対して、先体反応精子の割合は有意に増加し、その割合は1時間インキュベーション試料で生存精子の約4割に相当する25.0%で、2時間試料で生存精子の約8割に相当する37.0%であった。ハムスターテストの結果、1時間インキュベーション試料で65.4%の精子侵入卵子率と1.4個の平均侵入精子数が、2時間インキュベーション試料で

Table 19. Incidence^{1,2} of the acrosome reaction in ejaculated boar spermatozoa incubated in K-3 medium in a sealed glass tube at 39.5°C.

Duration of incubation (hr)	No. of tests	%[s.e.] of spermatozoa ¹		No. of eggs penetrated/ no. examined ² [%]	Average no. of sperm in penetrated eggs ²
		Live	Acrosome-reacted		
0	15	79.7[1.8]	1.4[0.3] ^c	-	-
1	15	79.7[2.8]	18.8[6.3] ^b	40/146[27.4] ^b	1.3
2	10	82.8[2.1]	62.7[5.2] ^a	80/95[84.2] ^a	2.1

¹Assessed by the a trypan blue-Giemsa method.

²Assessed by the a hamster test. Nine to twelve eggs were examined for each test.

^{a,b,c}Values within the same column with different superscripts differ significantly, $P < 0.05$ (% of spermatozoa; Duncan's new multiple range test, % of eggs penetrated; χ^2 test).

91.7%の精子侵入卵子率と1.8個の平均侵入精子数が得られた。なお、ウシBでも、ウシAと類似した結果が得られたが、ウシAとの相違点は、インキュベーション直前の生存精子率がAよりも高く82.8%であったこと、1時間のインキュベーションで生存精子の約8割に相当する49.2%が先体反応を起こしたこと、ハムスターテストにおいて1時間インキュベーション試料でも非常に高い精子侵入卵子率(97.7%)と平均侵入精子数(3.8個)が得られたことなどであった。

ブタ精子を用いてインキュベートした場合、4頭の雄ブタを用いたが、個体間で得られた結果に大きな差は認められなかった(Table 19)。生存精子率は、2時間のインキュベーション期間中ほとんど変化せず、常に8～9割の精子が生存していた。また、3回洗浄直後の試料では、先体反応精子は1～2%しか認められなかったが、インキュベーション時間の経過に伴って有意に増加し、その割合は1時間インキュベーション試料で生存精子の約2割に相当する18.8%で、2時間インキュベーション試料で生存精子の約7割に相当する62.7%であった。ハムスターテストの結果、1時間インキュベーション試料で27.4%の精子侵入卵子率と1.3個の平均侵入精子数が、2時間インキュベーション試料で84.2%の精子侵入卵子率と2.1個の平均侵入精子数が得られた。

III. 考 察

本節の研究結果から、ヤギ射出精子の先体反応を効果的に誘起する条件としては、インキュベーション容器には開放試験管よりも密封ガラス管が、媒液では代謝基質の除去が、また、インキュベーション温度は37.0℃よりも39.5℃が有効であることが知られた。さらに、先体反応を誘起しうる条件下でインキュベートされた精子では、運動性が著しく弱まることが知られた。

著者は前節において、ヤギ射出精子を密封ガラス管内でインキュベーションすると先体反応が誘起されることを明らかにするとともに、この方法による先体反応の誘起要因が、環境の酸素不足に伴う精子の呼吸阻害から生じたエネルギー不足である可能性を示唆した。しかし、この方法によるヤギ射出精子の先体反応誘起は必ずしも効率的ではなく、その理由として、媒液中に代謝基質が存在すれば、哺乳動物の精子が嫌気条件下においても解糖により十分なエネルギーを獲得できるためであると推測した。実際、本節の実験において、媒液から代謝基質であるグルコースとピルビン酸を除去して嫌氣的解糖を阻害したところ、代謝基質が存在する場合よりも高い誘起効果が得られた。すなわち、精子をB0液に再浮遊し開放試験管内でインキュベートした場合、精子は運動性に特に変化は認められず、常に活発な前進運動を行ったが、密封ガラス管を用いると運動性はインキュベーション時間の経過に伴って低下した。さらに、B0液のかわりに基質欠B0液を用いると、精子は、運動性、特に前進運動性はB0液の場合よりも急激に低下し、開放試験管内でもヤギ精子は先体反応を起こすことが知られた。なお、その誘起効果は同液を用いた密封ガラス管内インキュベーションの場合ほど高くなかったが、精子の運動性は著しく弱まった。外因性代謝基質が存在しない好気条件下では、精子は内在基質であるリン酸を利用した呼吸によりエネルギーを獲得することが知られている²⁹⁶⁾。したがって、この場合の先体反応誘起要因は、解糖阻害によるエネルギー不足であると考えられる。しかし、本研究のヤギ射出精子の先体反応誘起でも、使用する媒液には代謝基質を添加しないほうが確実に有効であった。

精子の受精能獲得または先体反応を誘起するインキュベーションその他の処理は、通常37.0～37.5℃の温度条件下で行われる。しかし、本研究の密封ガラス管内インキュベーション法では、37.0℃よりも39.5℃のインキュベーション温度で高い誘起効果が得られた。最近、イオノフォアA23187を用いたウシ精子の前処理法においても、処理時の温度は37.5℃よりも39℃が有効であることが報告されている^{317, 571, 572)}。精子の代謝が温度の上昇に

伴って促進されることはよく知られている³¹⁶⁾。したがって、本研究の密封ガラス管内インキュベーションにおいて、37.0℃よりも39.5℃で精子の代謝が促進された結果、浮遊液中の溶存酸素がより短時間で欠乏し、短時間で嫌気条件が形成されたものと考えられる。実際に、精子の運動性は37.0℃よりも39.5℃で急激に低下していた。

また、基質欠B0液を用い、39.5℃の密封ガラス管内でヤギ射出精子をインキュベーションした場合、2～3時間のインキュベーションで先体反応精子が高率に出現することが知られた。さらに、2時間インキュベートしたヤギ精子の透明帯除去ハムスター卵子への侵入状況を経時的に調べたところ、精子は媒精後1～2時間の間に卵子への侵入を開始し、精子侵入卵子率および平均侵入精子数は媒精後2～5時間の間でほとんど変化しないことから、精子は2時間以内にハムスター卵子への侵入を実質的に完了することが推察された。包と花田³¹³⁾は、イオノフォア処理したヤギ精子で同様の実験を行い、精子侵入卵子率および平均侵入精子数は媒精後4時間目までは経時的に増加し、それ以後は変化しなかったと報告している。本研究では、媒精後わずか2時間でほとんどの卵子に平均3.4～3.6個の精子が侵入しており、本法で得られたヤギ先体反応精子の大部分は、先体反応が完了したか、それに近い精子であると推察される。

先体反応は開口分泌現象の一種であるが、開口分泌現象は一般に、細胞（精子）内の遊離 Ca^{2+} 濃度の上昇によって誘起され则认为られている。開口分泌における遊離 Ca^{2+} は、分泌顆粒の膜と細胞の原形質膜の負の電荷を中和し、膜間の水分子を除いて両膜を接近させる³⁴²⁾ほか、膜の相転換と相分離を誘起して膜融合を促す³⁴³⁾と认为されている。このことからみると、先体反応では、原形質膜と先体外膜の間の遊離 Ca^{2+} の濃度が上昇し、膜が接近、融合し開口部を生じ、先体酵素が放出されるとものと思われる。ウシの精液では、精漿よりも精子でCa濃度が低いことが報告されている³⁴⁴⁾。したがって、細胞では常時、 Ca^{2+} の汲み出し機構によってCa濃度が低い状態に維持されている。家畜精子の場合、ウシ^{345, 346)}とブタ³⁴⁷⁾で、頭部原形質膜にCaポンプ様の輸送機構が存在することが報告されているが、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送系については、ブタ精子の頭部原形質膜には存在しないと報告されており³⁴⁷⁾、家畜精子の頭部の原形質膜と先体外膜の間の部分を含めた精子内遊離 Ca^{2+} 濃度は、主にCaポンプの働きによって低く保たれていると推察される。なお、Santos-Sacchi & Gordon³²⁵⁾は、モルモット精子を基質欠媒液中で培養すると、短時間の間にATPレベルが94%も低下するが、精子先体反応が高率に誘起されると報告し、ATPレベルの低

下により Ca^{2+} ポンプが不活化されて Ca^{2+} の排出が停止し、その結果として先体反応が誘起されたと考えている。本研究の先体反応誘起条件下でも、前述のようにインキュベーションのごく早い時期に精子は呼吸も解糖も抑制され、エネルギー(ATP)不足になっていると思われるが、このことから考えると、本研究の条件下で精子の先体反応が誘起されたのは、頭部原形質膜のCaポンプが、呼吸や解糖が抑制され作動しなくなり、精子内の遊離 Ca^{2+} 濃度が上昇したためではないかと推測される。

また、インキュベーション温度の上昇によって、先体反応誘起効果が高まったが、環境温度が高くなると、精子運動も活発になることが知られており、消費されるATP量が増加してATPの枯渇が早められたためと推測される。

哺乳動物精子の受精能獲得や先体反応を誘起する目的で従来用いられてきた媒液は、主にクレブズ・リンゲル重炭酸塩溶液やタイロード液の組成を一部修正したものが普通であるが、本節の結果からみると、媒液中の K^+ 、 Mg^{2+} 、 PO_4^{3-} および HCO_3^- の存在は、ヤギ精子の先体反応の誘起においては無意味であり、ヤギ精子は NaCl および CaCl_2 だけからなる極めて簡単な組成の生理的塩類溶液中でのインキュベーションによって先体反応を起こすことが知られた。

一般に、精子の先体反応の場合、主に外からの Ca^{2+} の流入によって遊離 Ca^{2+} 濃度の上昇は生じると考えられている³⁴⁹⁻³⁵⁴⁾。そのため、先体反応誘起用の媒液には通常 Ca^{2+} が含まれており³⁵⁵⁾、ハムスター³⁵⁶⁾およびマウス³⁵⁷⁾では、それぞれ少なくとも $200\sim 400\ \mu\text{M}$ 以上および $450\ \mu\text{M}$ 以上の Ca^{2+} が含まれる必要があると報告されている。しかし、本節では、 Ca^{2+} をほとんど含まない媒液を用いたインキュベーションでも、精子のCa含量が比較的高いヤギ精子では多数が先体反応を起こし、Ca含量が低いヤギ精子でも一部は先体反応を起こした。また、 Ca^{2+} を十分に含む媒液を用いたインキュベーションでは、精子のCa含量にかかわらずすべてのヤギの精子が先体反応を起こすのが認められた。これらの結果からみると、ヤギ精子の先体反応誘起には外因性および内因性の Ca^{2+} が関与しており、精子内の貯蔵Caの遊離によって精子内遊離 Ca^{2+} が上昇して先体反応は誘起されるものと思われる。

なお、ブタ³⁴⁸⁾やヒツジ³³²⁾の精子では、先体外膜表面に比較的多量のCaが局在していることが報告されているが、本研究の結果と合わせて考えると、家畜精子は、精子外に Ca^{2+} がある場合には、外から流入してくる Ca^{2+} と先体外膜から遊離してくる Ca^{2+} の両方によっ

て、精子外に Ca^{2+} がない場合には、先体外膜から遊離してくる Ca^{2+} のみによって、原形質膜と先体外膜の隙間の部分の遊離 Ca^{2+} 濃度が上昇し、その結果、先体反応が起こるものと推察される。

本節の結果、先体反応前の精子は卵子侵入ができないが、ヤギ先体反応精子は卵子の原形質膜との融合は可能なことが明らかとなった。哺乳動物では、受精の際に卵子の原形質膜と最初に融合が生じる精子の部位は、後帽部の原形質膜であると報告され、³⁵⁸⁻³⁶⁰。また、透明帯除去ハムスター卵子への異種動物精子の侵入の場合でも同様のことが観察されている³⁶¹。先体反応の前後で後帽部の形態に大きな変化は認められないが、以上のことから考えると、後帽部の原形質膜は先体反応中に、卵子の原形質膜との融合に必要な変化を独立して起こすものと推察される。本研究のヤギでは、先体部における形態変化よりも、卵子の原形質膜との融合に必要な変化が Ca^{2+} 依存度が高いように思われる。マウス^{362, 363}、ラット^{161, 364}、ハムスター^{281, 356}およびウサギ⁵⁵²では、精子と卵子の膜融合に Ca^{2+} が重要な役割を果たしており、受精用培地から Ca^{2+} を除去すると両者の膜融合（受精）が阻害されることが報告されている。これらの報告では、 Ca^{2+} の欠乏が、精子側または卵子側のいずれの融合能に影響するのか特定できなかったが、本研究の結果から、 Ca^{2+} の欠乏は少なくとも精子側の融合能に影響を及ぼすことが明らかにされた。

なお、ヤギ精子で考案された先体反応誘起法は、ウシとブタの精子の先体反応誘起にも有効であり、これらの動物の精子も極めて単純な組成の媒液中で先体反応を起こすことが知られた。これらの結果は、著者の開発した先体反応誘起法が他の多くの動物種にも応用できる可能性や、著者が示した先体反応誘起要因が多くの動物種に共通である可能性を示唆するものであり、今後、他の動物種への応用について検討する必要があると思われる。なお、ウシ精子を用いた実験では、個体間で得られた結果に若干の差異が認められた。著者の先体反応誘起法では、精子を密封したガラス管内でインキュベーションし、精子自身の呼吸作用によって精子浮遊液中の溶存酸素を消費させて嫌気状態を作出するが、この場合、精子の活力が良好であるほど溶存酸素の消費が早く短時間で嫌気状態を生じる。したがって、先体反応誘起に要する時間の差はインキュベーション開始時の精子生存性の差に起因することも考えられる。

第5節 小 括

本章では、簡便で効率的な家畜精子の先体反応誘起法を開発する目的で、精子を様々な条件でインキュベートしたのち、TS法やTS簡便法またはTG染色法による染色、ハムスターテストあるいはTEMによる観察で先体反応誘起の有無や程度を調べた。

まず、ヤギ、ウシおよびブタ洗浄射出精子をハムスター、マウス、ウサギまたはラットの摘出子宮内あるいはウサギの摘出卵管内において37℃でインキュベートし、先体反応誘起が可能か否かを調べた。その結果、ヤギ精子の場合、ハムスターおよびマウス子宮では、インキュベーション時間の経過に伴って先体反応誘起率が増大し、それぞれ4～5.5時間および3～4時間のインキュベーションが最も有効であった。ラット子宮では、2～4時間のインキュベーションによって一様に高い誘起率が得られた。しかし、ウサギ子宮および卵管では、他の動物の子宮に比べ高い誘起率は得られなかった。ウシ精子の場合、ハムスター子宮では4～5.5時間、マウス子宮では2～3時間のインキュベーションで最も効率的に先体反応が誘起された。また、ブタ精子の場合、ハムスター子宮では3時間のインキュベーションが、マウスおよびラット子宮では4時間のインキュベーションが最も有効であった。また、ヤギ精子における結果から、摘出生殖道の先体反応誘起効果は、生殖道提供雌動物の性周期やホルモン処理の有無、また同一個体の左右の子宮角間でそれほど差のないことも知られた。しかし、この方法では、精子を提供する動物種と生殖道を提供する動物種の組み合わせによって、また生殖道提供雌動物の個体間で誘起効果にかなりの差があることが推察された。

次に、ヤギおよびブタ射出精子を洗浄後、Brackett-Oliphantの液(BO液)に再浮遊し、ラット子宮液添加または無添加の場合について開放試験管内または密封ガラス管内において37℃でインキュベートした。その結果、ヤギ精子の先体反応は、開放試験管内インキュベーションでは、ラット子宮液の添加の有無に関係なく全く誘起されなかったが、密封ガラス管内では4時間以上のインキュベーションで誘起され、子宮液を添加すると2時間でも誘起された。また、密封ガラス管内では、精子濃度が高いほど短時間で先体反応が誘起された。さらに、ブタ精子の先体反応は、開放試験管内では4時間、密封ガラス管内では2時間のインキュベーションで誘起され、開放試験管内では子宮液の添加によってより短い時間で誘起されたが、密封ガラス管内では子宮液添加と無添加の間で差はなかった。

次に、ヤギ射出精子を洗浄後、BO液またはこれから代謝基質を除去した液(K-1液)に

再浮遊し、開放試験管内または密封ガラス管内において37.0℃または39.5℃で1～3時間インキュベートした。その結果、基質欠B0液を用いると、開放試験管内インキュベーションでもヤギ精子の先体反応は誘起されたが、開放試験管よりも密封ガラス管を用いた場合には、培地から代謝基質を除去した場合に、またインキュベーション温度を37.0℃よりも39.5℃にした場合においてより高い誘起効果が得られた。なお、最も高い効果が得られたのは、K-1液に再浮遊した精子を密封ガラス管内において39.5℃で2～3時間インキュベートした場合であった。

以上の実験の結果から、家畜精子の先体反応誘起要因の一つが、呼吸や解糖の抑制によるエネルギー不足であることが推察された。

次に、ヤギ精子の先体反応誘起に対する媒液中の K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 PO_4^{3-} および HCO_3^- の必要性について調べた。その結果、媒液中の Ca^{2+} を除くこれらのイオンの存在は、先体反応誘起においては特に必須でないことが明らかにされ、NaClと $CaCl_2$ だけからなる極めて簡単な組成の媒液（K-4液）中でのインキュベーションによってヤギ精子の先体反応を誘起できることが発見された。なお、 Ca^{2+} を含まない媒液中でもヤギ精子は先体反応特有の形態変化を起こすが、透明帯除去ハムスター卵子への侵入能はCa含量の高い精子でしか獲得されず、ヤギ精子の先体反応誘起用の媒液には Ca^{2+} を添加するのが望ましいと思われる。

最後に、ヤギ精子で開発した著者の方法のウシおよびブタ精子への応用を試みたところ、この方法は、ウシおよびブタ精子の先体反応誘起にも有効であり、最適インキュベーション時間はそれぞれ1～2時間および2～3時間であることが知られた。

代謝基質を含まない極めて簡単な組成の媒液に高精子濃度に再浮遊した精子を密封ガラス管内において39.5℃でインキュベーションする方法は、技術的にも簡単で結果の再現性も高く、家畜精子の先体反応誘起方法として非常に有用であると考えられる。

第4章 先体反応精子の特性に関する研究

第1節 緒言

先体反応精子の形態変化や卵子侵入方式は体外受精型のウニやヒトデでは既に詳細に研究され、先体反応の誘起部位や先体反応精子の卵子外被の通過方式などが明らかにされている³⁷¹⁻³⁷³。一方、体内受精型の哺乳動物では、卵管内の受精途中にある精子を直接観察するのはほとんど不可能であるため、交配雌あるいは人工授精した雌の卵管から受精途中の卵子を採取して、体外で観察する方式がとられていた^{137, 138, 175, 374-377, 493-494}。近年、マウスやラットなどの実験小動物では体外受精が可能となっているため、これらの動物では精子の卵子外被通過を連続的に観察することができるようになり、精子の先体反応と卵子外被通過との関係についても活発な研究がはじめられている^{376, 378, 379, 495-498, 545, 546, 564, 566, 573}。しかし、これまでに得られた結果は、研究者の実験条件によって同じ動物種でも異なり、まだ確実な報告は出されていない。一方、家畜の場合、ようやく体外受精が試みられているが⁵³³、まだ子畜生産のための実用技術として研究されている段階であり、先体反応の学術的解析はあまり行なわれていない⁴⁹⁹。そこで本章では、これまでに考案した方法によって人為的に先体反応を誘起させたヤギ精子を用い、家畜の先体反応精子の種々の特性について調べた。

第2節 先体反応精子の卵子侵入特性

体外受精を行なう場合、卵子は、ホルモン処理した雌の卵管から過剰排卵卵子を採取するのが普通で、実験小動物では過排卵処理の方法や卵子の採取方法などがほぼ確立している⁵⁰⁶⁻⁵¹³。しかし、家畜では、まだ経済的、技術的理由によって過排卵卵子の利用はあまり行なわれていない。

一方、家畜を含む多くの哺乳動物において、卵巣から直接取り出した卵母細胞は、体外でインキュベートすると成熟分裂を再開するため³⁸⁰⁻³⁹¹、このようにして体外成熟させたあるいは排卵直前または排卵時の卵母細胞を用いれば体外受精が可能ながマウス^{392, 393}、ウサギ^{394, 395}およびヒト^{194, 396}で報告されている。Iritani & Niwa²⁰⁷および Iritani et al.²⁰⁸は、それぞれウシおよびブタにおいて、屠場材料の卵巣から採取し体外成熟させた卵胞卵子の体外受精に成功したことを報告した。その後、ウシ^{442, 518, 519}、

⁵⁶⁷⁾やブタ⁴⁴³⁾では、体外受精に用いる卵子として、屠場材料の卵巢から採取し体外成熟させた卵胞卵子が多用されているが、ヤギについては、屠場材料がなく、その卵胞卵子の体外受精は知られていない。本節では、先体反応を誘起したヤギ精子を用いてヤギ卵子の体外受精を行ない、先体反応精子の透明帯通過や卵子原形質膜との融合などの卵子侵入特性について検討した。

I. 材料および方法

日本在来種成熟雄ヤギ1頭から人工膣法により採取した精液を、K-3液 (Table 1) を用いて、600×gで5分間の遠心分離して高精子濃度(約 7×10^9 精子/ml)の3回洗浄精子浮遊液とした。ついで、先体反応を誘起する目的で、精子浮遊液の一部を密封ガラス管内において39.5℃で3時間インキュベートした(第3章第4節)。インキュベーション終了後、ガラス管から回収した精子は、K-3液に精子濃度が 1×10^7 精子/mlとなるように再浮遊し、一部は透明帯除去ハムスター卵子および後述の透明帯除去あるいは保有ヤギ卵子に媒精した。また、精子浮遊液の一部は、先体反応誘起率を知るためTG染色を行なった。さらに、一部はTEMによって観察した。

ヤギ卵子の採取のためには、2～3カ月令のトッケンブルグ種未成熟雌ヤギ1頭に1,000 iuのPMSGを皮下注射し、PMSG注射の48時間後に卵巢を摘出した。ついで、22 Gの注射針を付けた1.0 ml注射器で卵巢表面にみられる直径2～7 mmの卵胞から卵子を吸引採取した。得られた卵胞卵子はB0液中に置き、成熟を誘起する目的でCO₂インキュベーター内で26～28時間インキュベートした。成熟の有無は位相差顕微鏡で観察し、第1極体の放出が認められたものを成熟卵子と判定した。インキュベーション終了後、卵子はヒアルロニダーゼ処理とピペッティングにより顆粒膜細胞を除去し、また一部の卵子については0.25%プロナーゼ処理とピペッティングにより透明帯も除去したのち、受精用培地に移した。なお、受精用培地には0.35 mlのB0液を用いた。媒精は、0.05 mlの精子浮遊液(精子濃度 1×10^7 精子/ml)を添加して行なった。次いで、CO₂インキュベーター内で7時間インキュベートしたのち、卵子を回収してスライドガラスにマウントした。卵子は、固定・染色したのち、ノマルスキー微分干渉装置付きの光学顕微鏡下で精子侵入の有無や侵入状況を観察し、卵子原形質内に膨化精子頭部あるいは雄性前核やこれらの尾部が観察された場合に精子侵入があったと判定した。



Fig. 34. Ovaries isolated from an immature goat 48 hr after PMSG treatment, showing ovarian response to the PMSG.

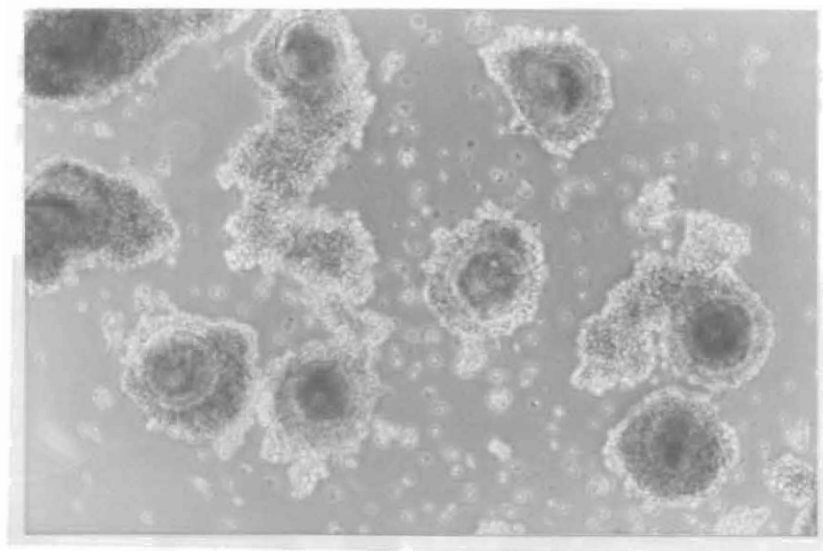


Fig. 35. Follicular oocytes with compacted cumulus cells collected from an immature goat 48 hr after PMSG treatment. Original magnification, x100.

II. 結 果

密封ガラス管内で3時間インキュベートした精子試料をTG染色した結果、試料中の65.3%の精子が生存し、そのすべてが先体反応精子と判別された。また、この精子試料を用いたハムスターテストの結果、100% (25/25) の精子侵入卵子率と3.4個の平均侵入精子数が得られた。

未成熟雌ヤギにPMSGを投与して48時間後に摘出した卵巣は、左右の卵巣ともに表面には

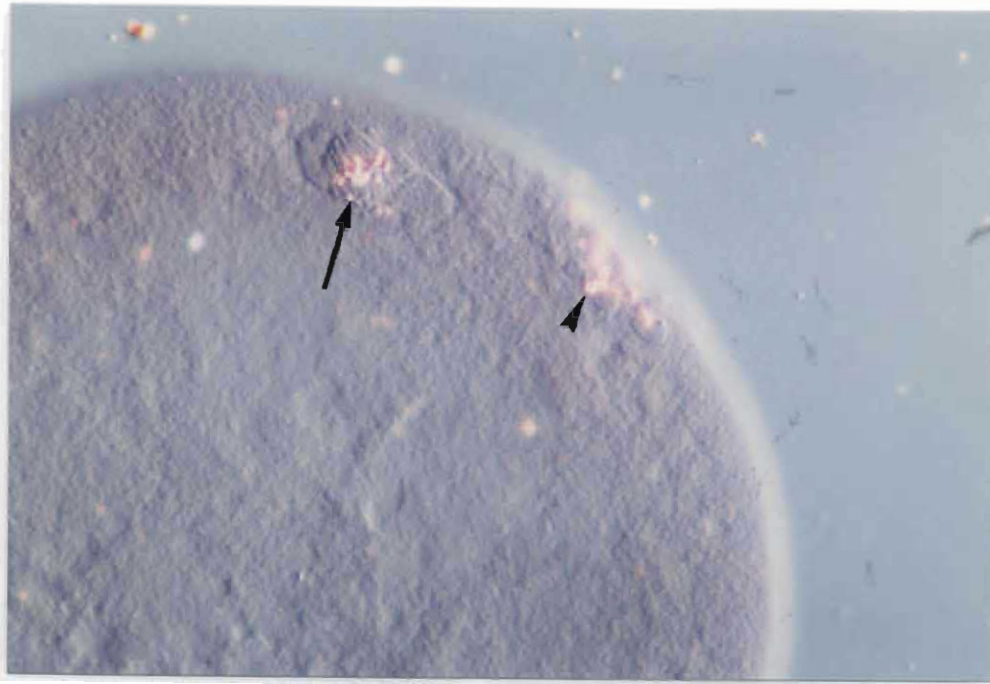


Fig. 36. Goat follicular oocytes matured in culture for 24 hr, showing the nucleus at metaphase I stage (arrow) and a released first polar body (arrow head). Aceto-orcein stain. Differential interference-contrast. Original magnification, x400.

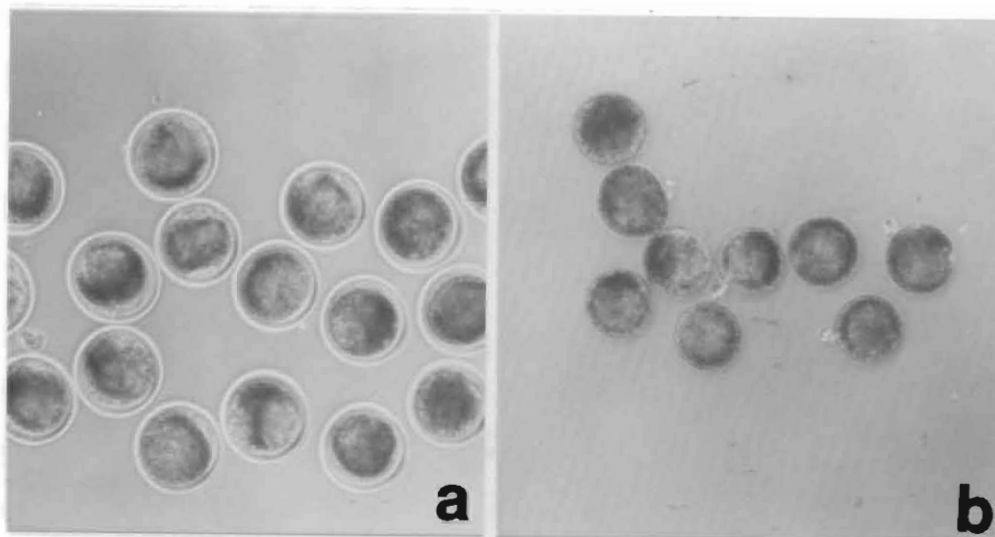


Fig. 37. Cumulus-free (a) and zona-free (b) goat oocytes matured in culture. Original magnification, x100.

発達した卵胞が多数認められ、ブドウ状の形態を示した (Fig. 34)。注射器を用いて直径 2 ～ 7 mm の卵胞の内容物を吸引採取した結果、左右の卵巣から緻密な顆粒膜細胞に包まれた卵胞卵子が計 18 個採取された (Fig. 35)。これらの卵胞卵子を B0 液中で 26 ～ 28 時

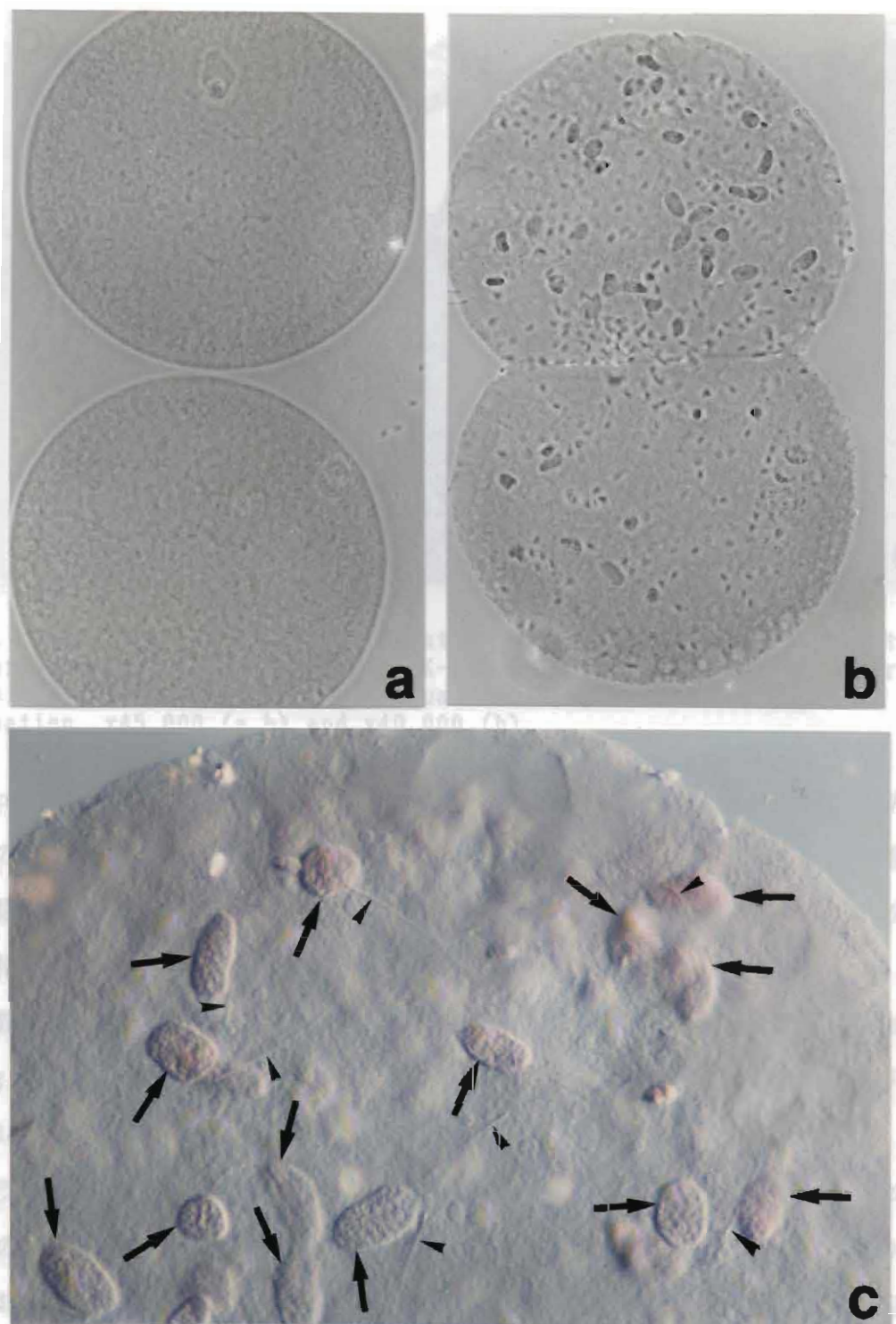


Fig. 38. Unfertilized zona-intact (a) and fertilized zona-free (b & c) goat oocytes matured in culture. c; swollen sperm heads (arrows) and their sperm tails (arrow heads). Aceto-orcein stain. Phase contrast (a & b) and differential interference-contrast (c). Original magnification, x200 (a & b) and x400 (c).

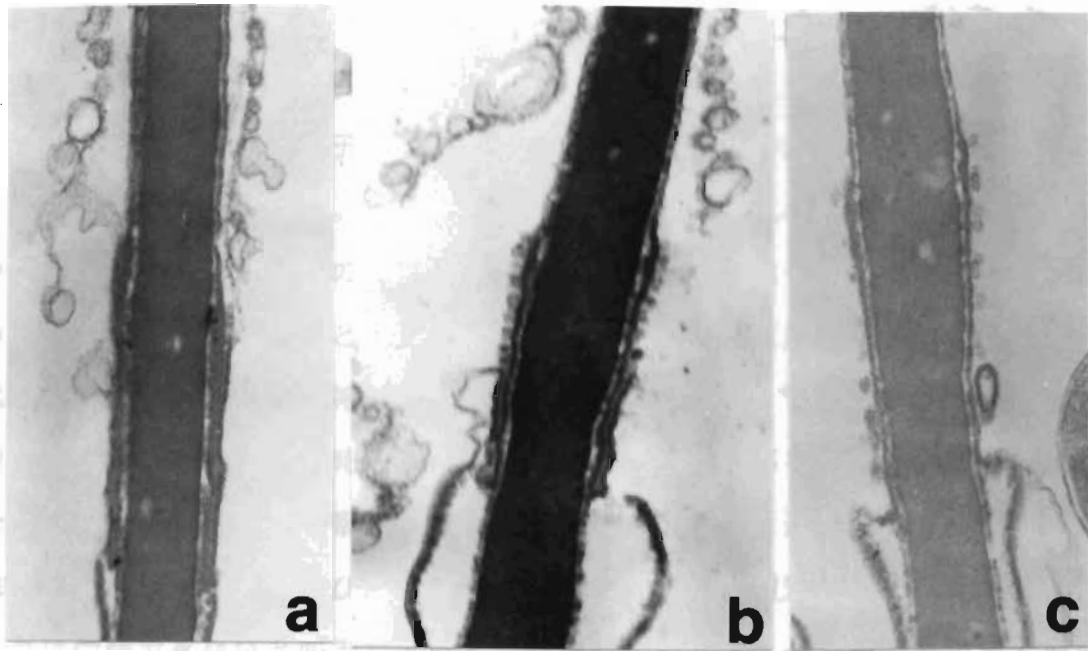


Fig. 39. Sagittal section of the equatorial segment of acrosome-reacted goat spermatozoa after incubation in K-3 medium for 3 hr, showing spermatozoa with (a) and without (b, c) intact equatorial segment. Original magnification, x45,000 (a,b) and x40,000 (b).

間インキュベートした結果、11個（61％）の卵子で第1極体の放出が認められた（Fig. 36）。そのうちの5個の卵子は顆粒膜細胞のみを除去したのち（Fig. 37a）、また4個の卵子は顆粒膜細胞と透明帯を除去したのち（Fig. 37b）受精用培地に移し、65.3％の先体反応精子を含む精子浮遊液を添加し、CO₂インキュベーター内で7時間インキュベートした。その結果、顆粒膜細胞のみを除去して透明帯を残した卵子では精子侵入は全く認められなかったが（Fig. 38a）、透明帯除去卵子では、すべて（100％）の卵子で精子侵入が認められ（Figs. 38b,c）、平均侵入精子数は22個となり、極めて高い値であった。

密封ガラス管内で3時間インキュベートした精子試料における先体反応精子の形態、特に赤道節の形態をTEMで詳しく観察した結果、この試料中の先体反応精子はその約30％で、赤道節においても原形質膜、先体外膜および先体内容物が失われ、小胞様の構造のみが認められた（Fig. 39b）。また、残りの大部分の精子は、赤道節の小胞様構造が部分的にまたは全域で消失し、先体内膜の一部またはすべてが露出し（Fig. 39c）、無傷の赤道節を持つ精子（Fig. 39a）はほとんど認められなかった。なお、赤道節で観察された小胞様の構造物は赤道節より前方の先体部で観察されるものに比べて小型で、先体内膜に沿って規則的に配列していた。

III. 考 察

本研究の結果から、著者が考案した方法（第3章第4節）で先体反応誘起したヤギ精子は、ヤギおよびハムスター卵子原形質膜との融合能は有するが、ヤギ卵子透明帯の通過能は失っていることが知られた。また、TEMによる観察の結果、3時間インキュベートした試料中の先体反応精子は、その大部分で赤道節部分の胞状化や先体内膜の露出が認められ、無傷の赤道節を持つ精子はほとんどみられなかった。先体反応の過程で赤道節の部分にも胞状化が生じることは、多数報告されている^{232, 386, 415-418, 421, 422}。今井ら⁴²⁰は、未経産ブタの摘出子宮内で5時間培養したヤギ精子の先体部をTEMで観察した結果、赤道節を含む先体部に本研究の観察と類似の形態変化が生じたと述べ、このような精子は透明帯を除去したハムスターおよびヤギの卵子には侵入して受精できるが、透明帯を有するヤギ卵子とは受精できないと報告している。同様に、ハムスターでも、赤道節で原形質膜と先体外膜が部分的に融合したり、先体内膜が露出した精子は、透明帯除去卵子とは受精するが、透明帯を有する卵子とは受精しないと言われている^{415, 547}。透明帯の基質を溶解する先体内の酵素がアクロシンであることは前述したが、この酵素の先体内における局在部位について、先体内膜上にあるか^{142, 408-414, 544}と赤道節にあるか^{376, 415}の2説が出されている。ハムスター³⁷⁶、ヒト⁴²¹およびブタ⁴²²精子についても、透明帯通過時に赤道節が消失することが観察されているが、本節の結果からみると、ヤギも含めた多くの動物種において、精子の透明帯通過には赤道節が重要な役割を有し、透明帯の通過に必要な酵素は赤道節に存在することを示唆しているように思われる。

幼若雌から卵胞卵子を採取して体外成熟させる方法は、過排卵処理法が未確立で、屠場材料の入手困難なヤギにおいては体外受精の卵子を得る方式として極めて有用であると思われる。しかし、体外成熟させた卵胞卵子は、核相は第2成熟分裂中期像を示すものの、細胞質の成熟が不十分であるため、体外受精後の正常発生率が極めて低いことが、ブタで報告されている。一方、ウシでは、花田⁴⁴²が屠場材料のウシ卵巣から得た卵胞卵子を体外成熟後、体外受精させて正常産子を得ている。ヤギでは、FSH処理した幼若雌にhCGを投与して得た排卵卵子を体外受精して正常産子が得られたとの報告はあるが²¹⁰、幼若雌から得た体外成熟卵胞卵子が受精後正常に発生するか否かは不明であり、今後さらに検討する必要がある。

Hanada & Chang²¹⁴およびYanagimachi²¹⁶が異種動物の先体反応の間接的検定法とし

て考案した透明帯除去ハムスター卵子への侵入試験（ハムスターテスト）は、実験用卵子の入手が困難なヒトや家畜においては極めて有用であるが、透明帯除去ハムスター卵子に侵入可能な精子が透明帯を保有した同種卵子と必ずしも受精可能であるとは限らないと言われている²²⁰⁾。すなわち、透明帯除去ハムスター卵子に侵入可能な精子は、先体反応を完了した精子に相当すると思われるから、既に先体酵素が失われている可能性が高く、精子は同種卵子の透明帯を通過できないのは当然である。本研究の場合、ヤギ精子の透明帯除去ハムスター卵子への侵入能はヤギ卵子実質への侵入能とよく一致し、その結果は、第3章第4節で著者が考案した方法によって誘起したヤギ精子の先体反応が機能的にも正常なものであることを示唆している。最近、Yanagimachi⁴¹⁹⁾は、高濃度塩類溶液を用いることにより、体外成熟ヒト卵胞卵子を4℃で保存すれば透明帯の保存が可能であることを指摘し、この保存透明帯がヒト精子の透明帯通過能の判定に利用できることを報告した。この方法は、透明帯の随時利用が可能であるため、ヒト先体反応精子の判定において、ハムスターテストとともに広く利用されているが⁵⁸⁶⁻⁵⁸⁸⁾、今後、この方法の家畜への応用についても検討する必要があると思われる。

第3節 ヤギ先体反応精子の運動能、生存性および卵子侵入能保持時間

哺乳動物において、精細管内や精巣輸出管内にある未熟な精子、精巣上体管内の成熟変化を受けつつある精子、および成熟後の射出精子の特性については、家畜を含む様々な動物種で古くから研究されているが^{117, 576-582)}、雌の生殖道内で受精能獲得し先体反応を起こした精子の特性について調べた報告は少なく⁴²⁹⁾、特に家畜ではほとんど知られていない。したがって、受精の前段階にある先体反応精子の特性を明らかにすることは、哺乳動物の雄における複雑な生殖機能を解明する上で極めて有意義なことと思われる。

そこで本節では、前章で開発した方法を用いて先体反応を誘起させたヤギ精子の運動能、生存能および卵子への侵入能保持時間について調べた。

I. 材料および方法

日本在来種成熟雄ヤギ2頭から人工陰法により採取した精液を、K-3液（Table 1）を用いて、600×gで5分間の遠心分離により高精子濃度($3 \sim 4 \times 10^9$ 精子/ml)の3回洗浄精子浮

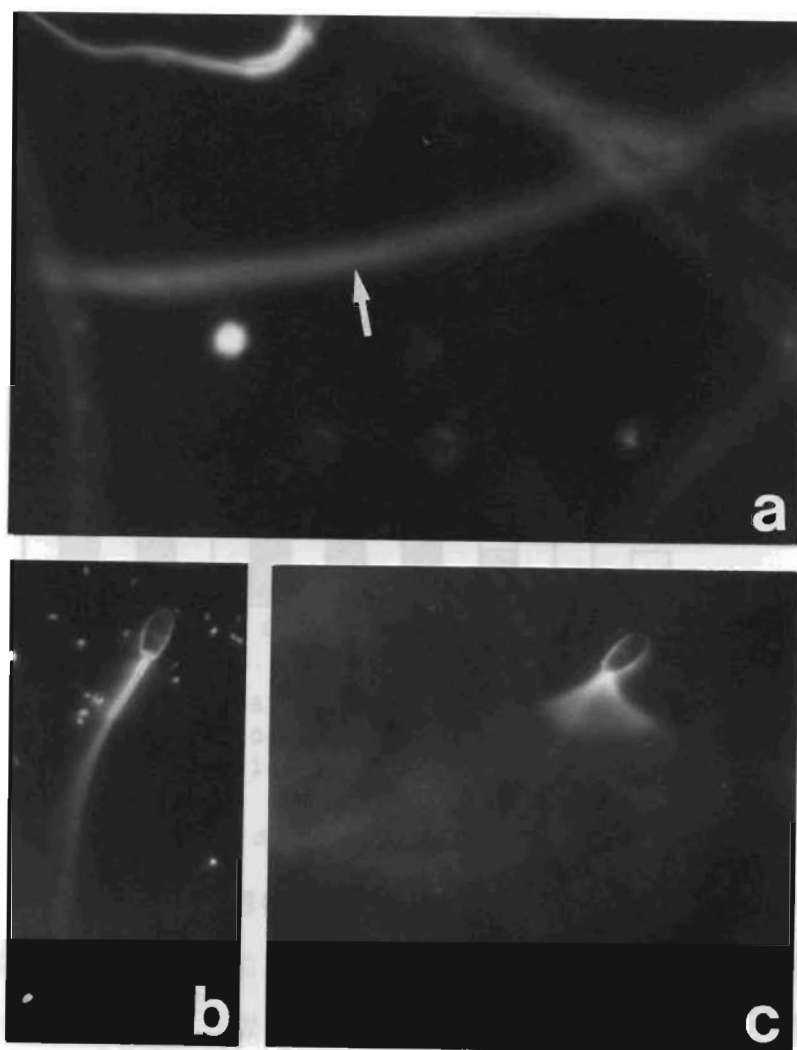


Fig. 40. Microphotographs of goat spermatozoa at an exposure period of one second under dark-field illumination. a; spermatozoon advancing vigorously (arrow), b; spermatozoon with trembling tails, c; spermatozoon exhibiting "whiplash" motility. Original magnification, x400.

遊液とした。ついで、先体反応を誘起する目的で、精子浮遊液の一部を密封ガラス管内において39.5℃で2時間インキュベートした（第3章第4節）。3回洗浄のみを施した精子と先体反応誘起処理後の精子をB0液に約 3×10^8 精子/mlの精子濃度となるように浮遊させ、37℃の恒温槽内で5時間インキュベートし、その間の運動性および生存性の変化を経時的に観察した。なお、精子の運動性は、37℃にインキュベートしながら顕微鏡下で観察し、個々の精子の運動様式を詳しく観察する目的で、中野の方法⁴³⁾に準じて時間露光式測定法(BEP法)を行った。精子の生存性および先体反応の有無はTG染色法（第2章第3節）により調べた。得られた運動精子率および生存精子率は角変換したのち、分散分析を行い、

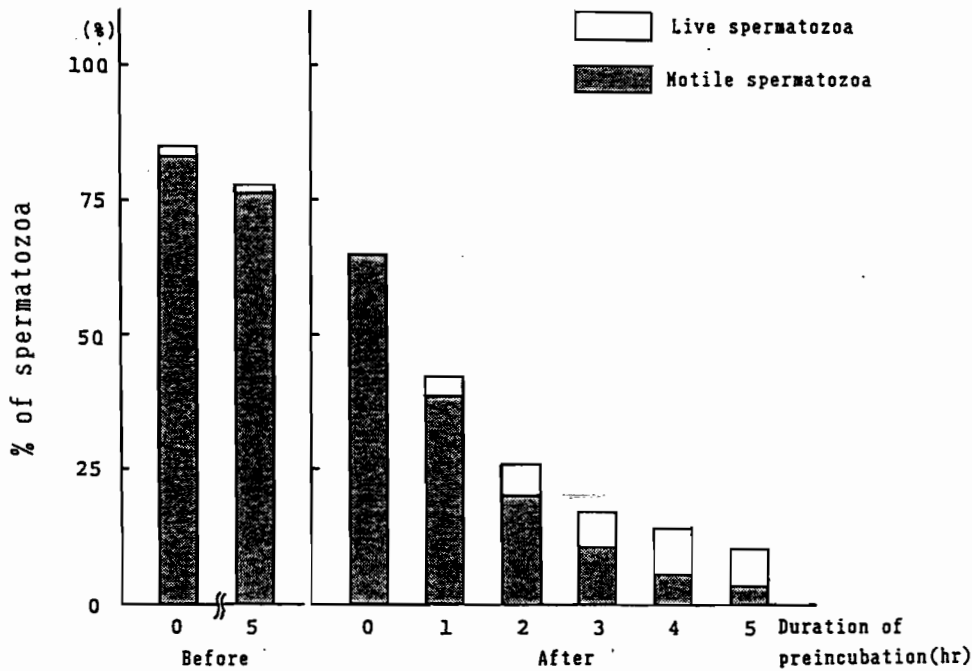


Fig. 41. Comparison of motility and viability of goat spermatozoa before and after inducing the acrosome reaction (n=6).

Duncanの多重検定法³²⁶⁾によりインキュベーション時間区間の差の有意性を検定した。また、先体反応誘起後のヤギ精子の透明帯除去ハムスター卵子への侵入能保持時間を調べる目的で、先体反応誘起処理後BO液に再浮遊した直後の精子および各媒液中で3時間プレインキュベートした精子を、透明帯除去ハムスター卵子に媒精し、37.5℃のCO₂インキュベーター内で5時間インキュベートし、その間1時間毎に卵子を回収し、固定・染色して卵子への精子の侵入状況を経時的に観察した。精子侵入が認められた透明帯除去ハムスター卵子の割合および侵入卵子当たりの平均侵入精子数のインキュベーション時間区間における差の有意検定は、それぞれ χ^2 検定およびDuncanの多重検定法³²⁶⁾で行った。なお、卵子の受精能保持時間の影響を除外するため、ハムスター卵子はすべてhCG注射後17時間目に卵管膨大部から採取した卵子を用いた。また、生存性の観察結果から、3時間プレインキュベーション試料ではインキュベーション直後試料よりも精子生存性が低下することが知られたので、直後試料の4～6倍の精子濃度で媒精した。

II. 結 果

先体反応誘起処理の前後においてヤギ精子の運動能および生存性を比較した結果、3回洗浄直後では、約80%の精子が活発な前進運動を行う生存精子で、とくに先体反応を起こ

Table 20. Time-related changes of the penetration of acrosome-reacted goat spermatozoa into zona-free hamster eggs (n=4).

Time after insemination (hr)	No. of eggs penetrated/ no. examined [%]	Average no. of sperm in penetrated eggs	No. of enlarged sperm heads [%] + no. of male pronuclei [%]
1	22/36 [61.1] ^a	2.1 ^b	46 [100] + 0 [0]
2	32/38 [84.2] ^b	4.3 ^a	122 [90] + 14 [10] ^c
3	29/29 [100.0] ^a	4.6 ^a	92 [69] + 42 [31] ^b
4	24/24 [100.0] ^a	4.8 ^a	69 [60] + 46 [40] ^b
5	29/29 [100.0] ^a	4.5 ^a	79 [47] + 88 [53] ^a

^{a,b,c}Values within the same column with different superscripts differ significantly, $P < 0.05$ (left and right columns; χ^2 test, center column; Duncan's new multiple range test).

した精子はほとんど認められなかった。これらの前進運動を行う精子は、BEP法では連続した運動の軌跡として示された (Fig. 40a)。一方、先体反応誘起処理直後では、生存精子率は約65%で、そのほとんどすべてが先体反応を起こしていた。BEP法においては、先体反応精子は赤道節の付近でスライドガラスまたはカバーガラス面に付着し、先体反応誘起処理直後は尾部が微弱な振動運動を示すのみで (Fig. 40b)、これらの精子をB0液に浮遊させると、尾部が頸部を支点とした左右非対称の振幅の大きなムチ振り様の運動を開始した (Fig. 40c)。先体反応誘起の前後における精子の運動性および生存性の変化を調べた結果 (Fig. 41)、先体反応誘起前の精子では、B0液中でのインキュベーション期間を通じて、運動性および生存性に顕著な変化は認められず、一方、先体反応誘起後の精子では、インキュベーション時間の経過に伴って運動性および生存性は有意に低下し ($P < 0.05$)、インキュベーション5時間目の生存精子率は10%以下となった。また、インキュベーション1時間目までは、生存精子のほとんどすべてが運動していたが、2時間目および3時間目の精子ではそれぞれ約80%および約60%しか運動しておらず、その後のインキュベーション時間の経過に伴って運動しない生存精子の割合はさらに有意に増加した ($P < 0.05$)。

次に、先体反応誘起後のヤギ精子の透明帯除去ハムスター卵子への侵入能保持時間を調べた結果 (Table 20)、媒精後1時間目では、36個中22個 (61.1%) のハムスター卵子に平均2.1個のヤギ精子が侵入していた。なお、侵入したこれらの精子の核はすべてまだ膨化の

Table 21. Effect of preincubation before insemination on the ability of acrosome-reacted goat spermatozoa to penetrate zona-free hamster eggs.

preincubation time before insemination (hr)	No. of eggs penetrated/no. examined [%]	Average no. of sperm in penetrated eggs
0 ¹	23/31 [74.2]	1.6
3	0/45 [0.0]	-

¹Immediately after incubation for inducing the acrosome reaction.

段階にあり、雄性前核を形成した精子核は認められなかった。2時間目では、38個中32個(84.2%)の卵子に平均4.3個の精子が侵入しており、侵入した精子の約10%が雄性前核を形成していた。また、3時間目では実験に供した29個すべての卵子で精子侵入が認められ、平均侵入精子数は4.6個で、そのうちの31%が雄性前核であった。これ以後

では、精子侵入卵子率および平均侵入精子数に特に変化は認められなかったが、観察される雄性前核の割合はインキュベーション時間の経過に伴って増加した。次に、B0液に再浮遊直後または3時間プレインキュベートしたヤギ先体反応精子をハムスター卵子に媒精して5時間インキュベートした結果(Table 21)、再浮遊直後の精子を卵子に媒精した場合、31個中23個(74.2%)の卵子で平均1.6個の侵入精子が認められた。しかし、B0液中で3時間プレインキュベートした先体反応精子を媒精した場合は、卵子への侵入は全く認められなかった。

Ⅲ. 考 察

本節の実験結果から、まずヤギ精子では、先体反応誘起の前後において運動様式が異なることが知られた。Yanagimachi⁴³⁹⁾は、ハムスター精子では受精能獲得に伴って先体反応が起こり、それとともに運動様式が変化すると述べ、受精能獲得後の精子の特徴的な運動様式を超活性化運動と名付けた。その後、同様の現象がモルモット^{167, 375, 415, 425, 440, 565)}、イヌ⁴³²⁾、マウス^{430, 436, 423)}、ウサギ^{427, 434, 435)}、ヒツジ^{428, 328)}、コウモリ²¹⁸⁾、イルカ²¹⁷⁾などで観察されている。本節において観察されたヤギ精子の先体反応誘起後の運動様式は、これらの動物種で観察された運動様式と極めて類似し、超活性化運動はヤギ精子にも共通する現象であることが示唆された。

本節において、ヤギ精子の超活性化運動は、先体反応誘起用に用いたK-3液中では観察されず、精子をB0液に再浮遊したのちに認められた。Fraser & Quinn³¹⁵⁾は、マウス受精能獲得精子が、超活性化運動を開始するにはグルコースが必要であることを報告している。

モルモットにおいても、超活性化運動の開始に外因性の代謝基質が必要であることが報告されている⁴⁴¹⁾。K-3液の組成をB0液に比較すると、K-3液には K^+ 、 Mg^{2+} 、 PO_4^{3-} 、代謝基質およびウシ血清アルブミンが含まれていない。したがって、本節においてK-3液中で精子が超活性化運動を示さなかった主因は、K-3液が特に代謝基質を含まないことにありと推察される。著者らは予備実験において、K-3液中では、ヤギ精子の運動性が先体反応誘起の前後にかかわらず急速に低下することを認めている。精子の運動エネルギーが呼吸や解糖から供給されることはよく知られており、代謝基質を全く含まないK-3液中では精子は超活性化運動を行うのに十分なエネルギーを獲得できなかったかも知れない。

本節の結果から、先体反応誘起後のヤギ精子の運動能および生存性は、誘起前に比べてかなり低下していることが確認され、またこれらの精子の透明帯除去ハムスター卵子への侵入能保持時間は3時間以内であることが明らかになった。これにくらべ、Freming & Yanagimachi⁴²⁹⁾はモルモットの先体反応精子について、モルモット卵子またはハムスター卵子の原形質膜との融合能の保持時間は8～9時間以内であり、モルモット卵子透明帯の通過能の保持時間は2時間以内であると報告している。なお、ウニ精子^{531, 439)}では、受精能は先体反応後数分しか維持されることが報告されている。すなわち、先体反応精子の受精能保持時間は動物種によって異なるが、一般にかなり短時間であるものと思われる。

本節の研究結果から、受精能獲得と先体反応を起こした精子の寿命は極めて短いことが示唆された。しかし、Seitz et al.⁴³⁷⁾は、ウサギの体外受精実験において交配後36時間目に子宮から回収した精子でも卵子と受精することを認めている。一般にウサギ精子は雌生殖道内で6時間の滞在により受精能獲得を起こす⁴²⁴⁾ことからみると、先体反応精子の短い生存時間からみて、雌の生殖道内では受精能獲得および先体反応誘起される時期が精子によって違うか、あるいはその後の生存性の保持機構があるのかも知れない。雌の排卵時間は光条件や外気温のほか生理的諸条件によっても影響を受けることが知られている。さらに雌の生殖道内において受精能獲得および先体反応誘起に要する時間が精子によって異なるとも言われ、精液中には様々な日齢の精子が含まれている⁴²⁶⁾ことから、この日令の差が受精能獲得および先体反応誘起時期の差に関係するものと考えられる。

第4節 ヤギ先体反応精子に対するカフェインおよびイミダゾールの影響

前節の研究結果から、先体反応誘起後のヤギ精子では、生存性がかなり低下することが明らかとなった。家畜精子を用いたハムスターテストおよび体外受精において、精子の前処理用培地または受精用培地にホスホジエステラーゼ阻害剤⁴⁴⁶⁾であるカフェイン^{210, 442, 443)}や、附活剤⁴⁴⁴⁾であるイミダゾール⁴⁴⁵⁾を添加すると、精子侵入卵子率や受精率が上昇することが報告されている。そこで本節では、ヤギ先体反応精子の運動能、生存性および卵子への侵入能保持時間に対するカフェインおよびイミダゾール添加の影響について調べた。

I. 材料および方法

日本在来種成熟雄ヤギ2頭から人工膣法により採取した精液を、K-3液(Table 1)を用いて、600×gで5分間の遠心分離により高精子濃度($3\sim4\times10^8$ 精子/ml)の3回洗浄精子浮遊液とした。ついで、先体反応を誘起する目的で、精子浮遊液の一部を密封ガラス管内において39.5℃で2時間インキュベートし(第3章第4節)、精子を、B0液、2 mMカフェイン添加B0液および10 mMイミダゾール添加B0液に約 3×10^8 精子/mlの精子濃度となるように浮遊させ、37℃の恒温槽内で5時間インキュベートして、その間の運動性および生存性の変化を経時的に観察した。精子の運動性は、37℃に加温しながら顕微鏡下で観察し、生存性および先体反応の有無はTG染色法(第2章第3節)により調べた。得られた運動精子率および生存精子率は角変換したのち、分散分析を行い、Duncanの多重検定法³²⁶⁾によりインキュベーション時間区間、各種媒液区間などの諸区間の差の有意性を検定した。また、先体反応誘起後のヤギ精子の透明帯除去ハムスター卵子への侵入能保持時間に対するイミダゾール添加の影響を調べる目的で、先体反応誘起処理後B0液または10 mMイミダゾール添加B0液に再浮遊した精子を、浮遊直後、および各媒液中で3時間ブレインキュベートしたのち、透明帯除去ハムスター卵子に媒精し、卵子への精子の侵入状況を経時的に観察した。精子侵入が認められた透明帯除去ハムスター卵子の割合および精子侵入卵子1個当たりの平均侵入精子数の培養時間区間における差の有意検定は、それぞれ χ^2 検定およびDuncanの多重検定法³²⁶⁾で行った。なお、卵子の受精能保持時間の影響を除外するため、ハムスター卵子はすべてhCG注射後17時間目に卵管膨大部から採取した卵子を用いた。また、前

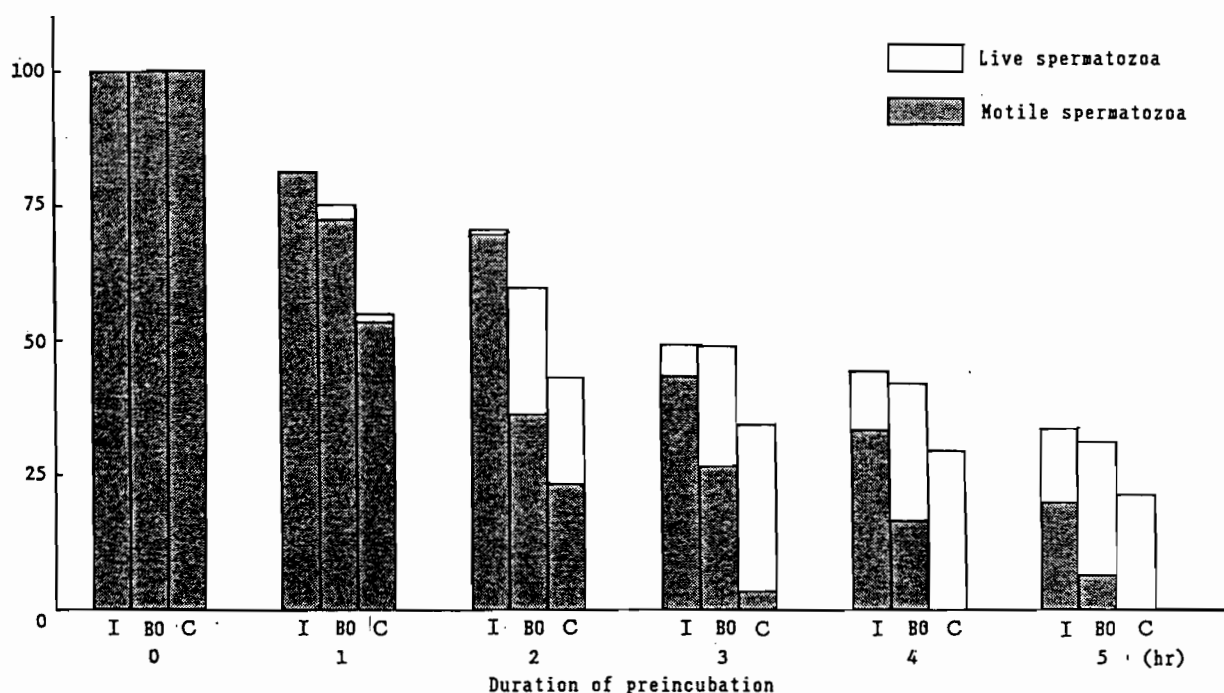


Fig. 42. Effects of caffeine and imidazole on motility and viability of goat acrosome-reacted spermatozoa ($n=4$).
BO; BO medium (Control), I; BO medium with 10-mM imidazole, C; BO medium with 2-mM caffeine.

節の結果から、3時間プレインキュベーション試料では浮遊直後の試料よりも生存性が低下していると考え、直後試料の4～6倍の濃度で媒精した。

II. 結 果

この実験で密封ガラス管内にインキュベートし、先体反応誘起したヤギ精子は、35%が先体反応を起こしていた。これらの先体反応精子をBO液、カフェイン添加BO液およびイミダゾール添加BO液にそれぞれ再浮遊させ、37℃でインキュベートした結果、BO液、カフェイン添加BO液およびイミダゾール添加BO液のいずれに再浮遊した場合でも、運動精子率および生存精子率はインキュベーション時間の経過に伴って有意に低下した($P<0.05$)(Fig. 42)。特に、カフェイン添加BO液に再浮遊した精子は、再浮遊後の数時間は、他の2種類の媒液に再浮遊した精子よりも激しい運動を示した。しかし、その運動精子率はカフェイン添加の場合は急速に低下した。また各媒液間では、いずれのインキュベーション時間においても、運動精子率および生存精子率はともに対照に比べてイミダゾール添加で高く、カフェイン添加で低い傾向にあった。

次に、先体反応誘起後のヤギ精子をBO液またはイミダゾール添加BO液に再浮遊させ、3

Table 22. Effect of imidazole on the retention of the ability of acrosome-reacted goat spermatozoa to penetrate zona-free hamster eggs.

preincubation time before insemination (hr)	With(+) or without(-) imidazole	No. of eggs penetrated/ no. examined [%]	Average no. of sperm in penetrated eggs
0	-	23/31 [74.2]	1.6
	+	32/33 [97.0]*	2.8*
3	-	0/45 [0.0]	-
	+	10/51 [19.6]	1.0

* $P < 0.05$ compared with values without imidazole (right column; χ^2 test, left column; Duncan's new multiple range test).

時間ブレインキュベートしたのちハムスター卵子に媒精して5時間インキュベートして、精子侵入状況を調べた結果、インキュベーション直後の精子を卵子に媒精した場合、B0液由来の精子の侵入卵子は31個中23個(74.2%)で、イミダゾール添加B0液由来精子については33個中32個(97.0%)となり、卵子当たりの侵入精子数は平均1.6個および2.8個であった。なお、B0液中で3時間ブレインキュベートした精子は、媒精しても卵子への侵入が全く認められなかったが、イミダゾール添加B0液中で3時間ブレインキュベートした精子は、51個中10個(19.6%)の卵子内に1個ずつの精子侵入を示した (Table 22)。

Ⅲ. 考 察

本節の実験結果から、媒液へのイミダゾールの添加はヤギ先体反応精子の運動能および生存性の維持、ならびに卵子への侵入能保持時間の延長に有効であること、また、カフェインの添加は、これらの精子の運動を一時的に付活するが、運動能や生存能の維持に対してはむしろ有害に作用することが知られた。なお、カフェイン添加媒液における精子運動の一時的な活性化は、マウスでも報告されている⁵⁸⁴⁾。さらに、イオノフォア処理で先体反応を誘起させたウシ³³¹⁾やヤギ²¹⁰⁾精子の運動に対しても、カフェインが一時的には付活するが、その維持に対しては有害に作用することが報告されている。また、花田⁴⁴⁵⁾は、ウサギ摘出子宮内でインキュベートしたヤギ精子のハムスターテストにおいて、精子浮遊液および受精用培地へのイミダールの添加により精子侵入卵子率が有意に上昇したことを

報告している。カフェインは、精子の環状アデニール酸(cAMP)分解酵素(ホスホジエステラーゼ)の作用を抑制して間接的にcAMPの細胞内蓄積を促すと言われ^{445, 562, 563)}、一方、イミダゾールは、cAMPホスホジエステラーゼの作用を亢進することが知られている⁴⁴⁴⁾が、本研究で得られた先体反応誘起後のヤギ精子の運動能と生存能に対するカフェインとイミダゾール作用機構については現在のところ不明であり、今後の研究課題である。なお最近、カフェインにウシ精子の受精能獲得および先体反応の誘起を促進することが報告されている⁵¹⁸⁾。

第5節 小 括

著者が考案した方法で先体反応を誘起させたヤギ精子を用いて、先体反応精子の卵子侵入特性ならびに運動能、生存性および卵子への侵入能の保持時間について調べた。また、先体反応精子のこれらの特性に対するカフェインおよびイミダゾールの影響についても検討した。

ヤギ精子を無機塩のみからなるK-3液に浮遊させ、密封ガラス管内で3時間インキュベートしたのち、ホルモン処理した2～3カ月令の未成熟雌ヤギの卵巢から採取し体外成熟させた卵胞卵子、および体外成熟後透明帯を除去した卵子に対して体外受精を行なった。その結果、透明帯除去卵子ではすべてで受精が確認されたが、透明帯保有卵子では受精した卵子は認められなかった。また、TEMによる観察結果から、3時間インキュベート試料中の先体反応精子の大部分で、赤道節にも胞状化が生じていることが知られた。これらのことから、K-3液を用い密封ガラス管内で3時間のインキュベートにより先体反応を誘起したヤギ精子は既に透明帯を通過する能力を失っていることが認められ、またヤギ精子の透明帯通過には赤道節の部分に関与していることが推察された。

次に、K-3液を用い密封ガラス管内で2時間インキュベートして先体反応を誘起したヤギ精子の運動能、生存性および透明帯除去ハムスター卵子への侵入能保持時間について調べた。個々の精子の運動様式を時間露光式測定法を用いて詳細に観察した結果、ヤギ精子は、先体反応の前後で運動様式が異なり、先体反応後には、多数の哺乳動物の受精能獲得精子で知られる超活性化運動に類似した運動を示した。また、先体反応を起こしたヤギ精子の運動能および生存性は先体反応を起こしていない精子に比べて著しく低下した。さらに、ヤギ先体反応精子の透明帯除去ハムスター卵子への侵入能保持時間は3時間以下であっ

た。

さらに、密封ガラス管内でK-3液を用い2時間インキュベートして先体反応を誘起したヤギ精子を、B0液か、カフェインまたはイミダゾール添加B0液に再浮遊して37℃で5時間インキュベートし、運動性、透明帯除去ハムスター卵子への侵入能および生存性を経時的に調べた結果、イミダゾールは、運動能および生存性の維持ならびに透明帯除去ハムスター卵子への侵入能保持時間の延長に有効であったが、カフェインは、一時的に精子の運動を付活するのみで、運動能および生存性の維持に対してはむしろ有害であった。

第5章 先体反応精子の利用に関する研究

第1節 緒 言

哺乳動物の先体反応精子を対象とした研究の場合、従来は交配雌の生殖道から回収した精子を材料とするのが普通であった^{186, 193, 196, 200, 269-276}。そのため、同一条件の先体反応精子を簡単に多数採取することは容易ではなく、先体反応精子の利用について検討された報告はほとんどない。しかし、著者が開発した方法を用いれば、先体反応精子を得ることが容易で、それを材料とする研究が可能である。そこで、この章では、先体反応を人為的に誘起させたヤギ精子を利用して、いくつかの興味ある実験を行なった。

第2節 X、Y精子の判別法に関する研究

ヒトや家畜における産子の性支配については古くから多様な試みが行なわれてきたが、まだ確実な性支配方式はない。性支配の一つの方法として、X精子とY精子を分離して授精させる方式が知られているが^{485, 491}、家畜を対象とした研究は少ない⁴⁴⁷。ヒトのY精子には、キナクリン・マスタード染色によって特異的に蛍光を発する蛍光小体が存在すると言われ^{448, 483}、この小体の存在によってY精子の区別が可能とされている。蛍光小体は、ヒトとゴリラの精子にのみ存在するとされてきた⁴⁴⁹が、最近になって、ウシ、ブタおよびウマの精子にも存在することが報告されている^{450, 484, 490}。しかし、それがY精子に特異的に存在するか否かについては、まだ確認されていない。したがって、現時点では、家畜におけるX精子とY精子の区別は核型分析によらざるを得ない。

射出された精子の核は、精子完成の過程で凝縮しており⁴⁵¹、そのままでは核型分析することはできない。しかし、卵子に侵入した精子は卵子原形質内で膨化し、雄性前核を形成するため、このような前核期に達した精子は核型分析が可能である。Rudak et al.⁴⁶⁰は、透明帯除去ハムスター卵子に侵入させたヒト精子が雄性前核を形成し、核型分析が可能であることを報告した。その後、ヒト精子ではこの方法を用いて多くの核型研究が報告されている^{452, 453, 486-489, 492}が、家畜を含むその他の動物の応用例はTateno & Mikamo⁴⁵⁴のウシおよびCreighton & Houghton⁴⁵⁵のブタにおける報告を挙げうるにすぎない。透明帯除去ハムスター卵子を用いて精子の核型標本を得るには、単精子侵入を成立させる必要がある。Tateno & Kamiguchi⁴⁵⁴は、最初の精子侵入の開始時期に、卵子表面の余剰

付着精子をピペッティングにより洗い落とすことにより単精子侵入卵子を高率に得ることが可能であると報告している。

そこで、本節の実験では、著者の先体反応を誘起したヤギ精子を透明帯除去ハムスター卵子に媒精し、卵子に侵入した精子の雄性前核の核型標本を作製して、ヤギX、Y精子の区別が可能か否かを調べた。

I. 材料および方法

日本在来種雄ヤギ2頭から人工陰法により採取した新鮮精液を、K-3液に希釈し、 $600 \times g$ で5分間遠心分離して高精子濃度($4 \sim 7 \times 10^9$ 精子/ml)の3回洗浄精子浮遊液とし、密封ガラス管内において 39.5°C で2または3時間インキュベートして、先体反応を誘起した。精子の先体反応誘起の程度は、TG染色法により確かめた。

実験1 雄性前核形成時期と単精子侵入卵子の作出

まず、卵子への精子の侵入開始時期および侵入状況を知る目的で、1または 2×10^6 精子/mlの精子濃度の先体反応精子試料を透明帯除去ハムスター卵子に媒精し(第2章第2節)(最終精子濃度、 12.5 または 25.0×10^5 精子/ml)、媒精の0.5、1.0、1.5、2.0および3.0時間後に卵子を回収し、固定・染色後精子侵入の様子を観察した。

次に、多精子侵入を阻止し、単精子侵入卵子を作出するため、Tateno & Mikamo⁴⁵⁴⁾の方法を試みた。すなわち、1または 2×10^6 精子/mlの精子濃度の先体反応精子試料を透明帯除去ハムスター卵子に媒精し、0.5、1.0または2.0時間インキュベートしたのち、軽くピペッティングを行ない卵子の余剰付着精子を洗い落とした。ついで、卵子は精子を含まない媒液に移しかえ、媒精から通算して7時間インキュベートし、その間の精子侵入状況ならびに前核形成状況を経時的に調べた。なお、この実験では、卵子への精子侵入の判定ならびに前核の観察は、卵子を固定・染色せずに位相差顕微鏡下で観察して行ない、第2極体と2個以上の前核が観察された卵子を精子侵入卵子、そのうち第2極体と2個の前核が観察できたものを単精子侵入卵子と判定した。

実験2 核型標本の作製

2×10^6 精子/mlの精子濃度の先体反応精子試料を透明帯除去ハムスター卵子に媒精し、媒精の1時間後に卵子を精子を含まない新しい媒液に移し、インキュベーションを続けながら、媒精の7～8時間後にポドフィロトキシン(Sigma社)とピンブラスチン(Sigma社)

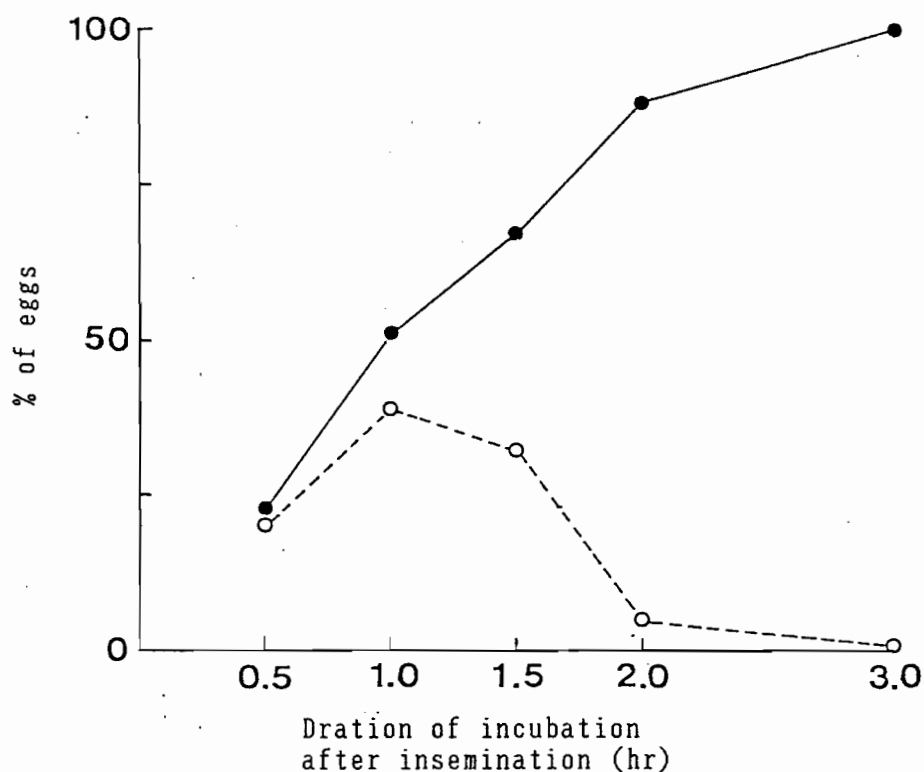


Fig. 43. Time-related changes of sperm penetration into zona-free hamster eggs after insemination.
 ●; Eggs penetrated, ○; Monospermic eggs.

を最終濃度でいずれも $0.04 \mu\text{g}/\text{ml}$ になる様に添加し、さらにインキュベーションを続けた。核型標本の作製に当たっては、媒精の17~24時間後に雌雄両前核が消失した精子侵入卵子を第1卵割中期に達した卵子とみなし、漸進固定空気乾燥法^{461,462}により核型標本作製した。核板が十分に広がったものをBarium/Saline/Giemsa法⁴⁵⁹によりCバンド染色し、核型分析に供した。分析に際しては、30本の染色体が確認できる核型標本を用い、最も小型で、Cバンドの認められない染色体をY染色体と判定し、Y精子由来のもの、また、このような染色体を持たないものをX精子由来の核型と判定した。

II. 結 果

密封ガラス管内で2または3時間インキュベートしたヤギ精子をTG染色した結果、平均65%の精子は生存精子で、その9割に相当する63%の精子が先体反応を起こしていた。このような先体反応精子試料を透明帯除去ハムスター卵子に媒精した。

実験1において、卵子への精子侵入状況を経時的に調べた結果(Fig. 43)、媒精の0.5時間後で23% (18/77)の卵子に精子侵入が観察された。その後、精子侵入卵子率はインキュ

Table 23. Effects of sperm concentration and incubation time with spermatozoa on goat sperm penetration into zona-free hamster eggs.

Final sperm concentration (x10 ⁵ /ml)	Incubation time with sperm (hr)	No. of eggs examined	No. [%] of eggs penetrated	No. [%] of monospermic eggs
12.5	1	50	23 [46.0]	20 [40.0]
	2	50	28 [56.0]	18 [36.0]
25.0	0.5	50	10 [20.0]	7 [14.0]
	1	50	32 [64.0]	25 [50.0]
	2	50	41 [82.0]	14 [28.0]

ベーション時間の経過に伴って上昇し、3時間後には供試したすべての卵子で膨化精子頭部がみられ、また、一部の卵子では雄性前核を持つものも認められた。単精子侵入率は、媒精の0.5時間および1時間後でそれぞれ20% (15/77) および39% (30/77) であり、これらの卵子はそれぞれ精子侵入卵子のうちの87% (15/18) および76% (30/39) に相当した。しかし、その後はインキュベーション時間の経過に伴って単精子侵入卵子率は低下し、2時間後にはわずか5% (4/87) となった。

単精子侵入作出のための媒精時の精子濃度および卵子の余剰付着精子の除去時期に付き検討した。すなわち、 12.5×10^5 精子/mlの精子濃度で1時間および2時間インキュベートした場合の精子侵入卵子率は、それぞれ46.0% (23/50) および56.0% (28/50)、また、単精子侵入卵子率は、それぞれ40.0% および36.0% で、いずれも時間による有意差はみられなかった。しかし、 25.0×10^5 精子/mlの精子濃度で0.5、1および2時間インキュベートした場合、精子侵入卵子率はそれぞれ20.0%、64.0% および82.0% で、1および2時間での精子侵入卵子率は、0.5時間の値よりも有意に高くなった。また、単精子侵入卵子率は、1時間では50.0%であったのに比べ、0.5および2時間ではそれぞれ14.0% および28.0% と低い値であった (Table 23)。

また、前核形成は、これらの単精子侵入卵子では、精子を含まない培地に移して1時間後より観察でき、その後はインキュベーション時間の延長とともに前核を含む卵子の割合は増加し、5時間後では61.0% (119/195) となった。また、2個の前核が認められる卵子の割合は、媒精後5時間までに47.2% (92/195) となり、前核形成が認められた卵子のうち

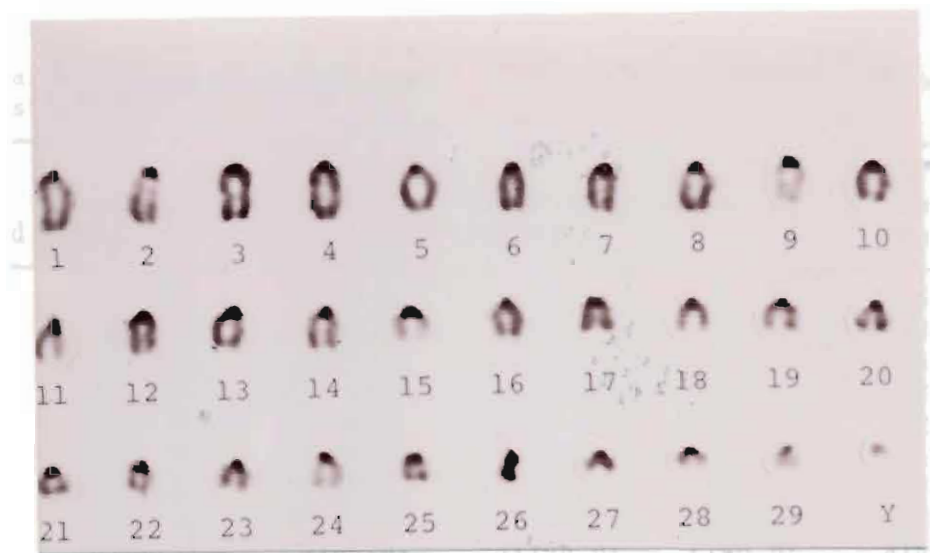


Fig. 44. Karyotype of a goat spermatozoon bearing Y chromosome (C banding).

の77.3% (92/119)に相当した。

実験2において、2個の前核と1個の極体が認められた単精子侵入卵子をポドフィロトキシシンとビンブラスチンとともにインキュベートした場合、前核形成が認められて2～3時間後にこれらの分裂阻止剤を添加したところ、その6時間後(媒精13時間後)までに19.3% (33/171)の卵子が、また10時間後(媒精17時間後)までにすべての卵子が第一卵割中期に達し、雌雄両前核が消失した。これらの第一卵割中期に達した卵子を用いて核型標本作製した結果、その42.7% (73/171)で核板が得られ、これは全供試卵子の18.4% (73/397)に相当した。これらの核型標本のうちハムスター卵子由来の22本の染色体とヤギ精子核由来の30本の染色体が確認できた標本は86.3% (63/73)であり、これは全供試卵子の15.9% (63/397)に、また単精子侵入卵子の36.8% (63/171)に相当した。これらの標本を用いてCバンド染色を行なった結果、52.4% (33/63)がY精子由来の核板(Fig. 44)で、残りの47.6% (30/63)がX精子由来の核板と判別された(Table 24)。

Ⅲ. 考 察

本節の研究の結果、先体反応を誘起したヤギ精子を透明帯除去ハムスター卵子に侵入させ、形成された雄性前核の核型標本をCバンド染色することによって、X精子またはY精子由来の核盤が判別可能となることが確かめられた。また、この系において核型分析を行なうためには単精子侵入卵子が必要となるが、 25×10^5 精子/mlのヤギ先体反応精子とともに

Table 24. Analysis of goat X- and Y-bearing spermatozoa penetrated into zona-free hamster eggs.

Exp. no.	No. of eggs examined	No. [% ¹] of monospermic eggs	No. [% ²] of sperm karyotypes	No. [% ³] of karyotypes identified	No. [% ⁴] of Y-bearing karyotypes	No. [% ⁴] of X-bearing karyotypes
1	58	12 [20.7]	6 [50.0]	3 [50.0]	1 [33.3]	2 [66.7]
2	43	11 [25.6]	3 [27.3]	2 [66.7]	2 [66.7]	1 [33.3]
3	40	17 [42.5]	4 [23.5]	4 [100.0]	2 [50.0]	2 [50.0]
4	46	20 [43.5]	5 [25.0]	4 [80.0]	3 [75.0]	1 [25.0]
5	30	18 [60.0]	10 [55.6]	8 [80.0]	6 [75.0]	2 [25.0]
6	25	15 [60.0]	6 [40.0]	6 [100.0]	5 [83.3]	1 [16.7]
7	65	37 [56.9]	18 [48.6]	16 [88.9]	5 [31.3]	11 [68.8]
8	24	13 [54.2]	12 [92.3]	11 [91.7]	4 [36.4]	7 [63.3]
9	44	15 [34.1]	5 [33.3]	5 [100.0]	2 [40.0]	3 [60.0]
10	22	13 [59.1]	4 [30.8]	4 [100.0]	3 [75.0]	1 [25.0]
Total	397	171 [43.1]	73 [42.7]	63 [86.3]	33 [52.4]	30 [47.6]

¹/no. of eggs examined.²/no. of monospermic eggs.³/no. of sperm karyotypes.⁴/no. of karyotypes identified.

に1時間インキュベートした透明帯除去ハムスター卵子を、ピペッティングにより余剰付着精子を除去したのち精子を含まない新しい培地に移すことにより、比較的高率に単精子侵入卵子が得られることが判明した。

本節の実験結果から、精子侵入の認められた透明帯除去ハムスター卵子は、媒精1時間までは大部分が単精子侵入で、その後急激に多精子侵入卵子が増加することが知られた。この結果からみると、ハムスターテストにおける透明帯除去ハムスター卵子への多精子侵入は、複数の先体反応精子が同時に侵入するのではなく、最初の先体反応精子が侵入したのちにも継続的に精子侵入を生じるためと考えられる。このことは、ハムスター卵子の多精拒否機構が透明帯反応に依存していることを示すもので、ヒトやハムスターでは卵黄遮断がほとんどないとされている報告^{465, 466}と一致する。

しかし、透明帯および原形質膜が無傷でも、体外受精の卵子は多精子侵入を受けやすいと言われており、哺乳動物卵子の多精拒否機構は絶対的なものではないと考えられている。体外受精系では、体内受精に比べて高い濃度で媒精されるため、多くの卵子で多精子侵入が生じるとも考えられ、媒精時の精子濃度を下げる試みが行なわれたが、精子濃度の低下は多精子侵入の減少とともに、受精率の低下を招くと報告されている。本節の実験においても、媒精時の精子濃度は 1×10^6 精子/mlよりも 2×10^6 精子/mlの場合で高い精子侵入卵子

率が得られた。さらに、この研究では、透明帯除去ハムスター卵子への媒精後1時間以内にピペッティングにより余剰付着精子を除去し、精子を含まない新しい培地に移した結果、約50%の高い単精子侵入卵子率が得られたが、多精子侵入をも含む全精子侵入卵子率では約65%に過ぎず、ピペッティングによって、必要な精子も除去されたことが考えられる。しかし、本研究で用いたTateno & Kamiguchi⁴⁵⁴⁾の方法は、ハムスターテストのみにみらず同種卵子の体外受精にも有効に利用できると思われ、今後の応用が期待される。

核型標本の作製において、細胞分裂を有糸分裂中期で停止させるためには、通常、コルヒチンやコルセミドなどのアルカロイドが用いられるが、これらはハムスター卵子の発生を著しく阻害することが知られている⁴⁶³⁾。最近、ハムスター卵子の発生に対して毒性の少ない分裂毒として、ポドフィロトキシンとビンブラスチンが見出され⁴⁶⁴⁾、ハムスター卵子でも第1卵割中期の核型が得られるようになった。なお、卵子の第1卵割中期の核型を得るには、雌雄両前核が認められてから2～3時間後に添加するのが適当とされている。実験1の結果から、透明帯除去ハムスター卵子内に2個の前核が認められるのは媒精の4～5時間後であることから、実験2ではその2～3時間後に相当する媒精の7～8時間後に分裂毒を添加した。その結果、添加後約10時間目までに約63%の卵子が第1卵割中期で分裂を中止した。なお、前核の消失の起こらなかった卵子では、卵子原形質内に多数の膨化精子頭部が認められ、このことから、多精子侵入卵子では核型標本が得られないことが再確認された。

本節では、Cバンド染色法によりY染色体を識別し、Y染色体を持つ核型標本をY精子由来、Y染色体を持たない標本をX精子由来のものと判別した。哺乳動物の染色体についての研究は、末梢血培養法の確立によりヒトを中心として急速に進歩してきた。最近では、種々の分別染色法が開発され、ヒトにおいては個々の染色体の分染像も明らかにされている⁴⁵⁶⁾。しかし、家畜を対象とした研究はいまだ少なく、国際的に統一された標準核型が示されたのはGバンド像のみにすぎない⁴⁵⁷⁾。しかし、ヤギにおいては、X染色体は常染色体と同じく端部着糸型で、3番目の大きさであることが知られており⁴⁴⁷⁾、また、Y染色体は常染色体の最小のものとの区別が困難である⁴⁴⁷⁾ため、ギムザ染色はヤギにおけるY染色体の識別には不適當と考えられる。一方、Cバンド染色法では、ヤギのY染色体は全体に淡染でCバンドが認められず、最小の常染色体との区別は容易である⁴⁵⁹⁾。なお、ウシでは、ギムザ染色標本において、X染色体とY染色体を形態的に判別可能であると言

われ⁴⁴⁷⁾、ブタでは、ヤギと同様に形態的性染色体の識別が困難で⁴⁴⁷⁾、Qバンド染色法が用いられている⁴⁵⁸⁾。

本研究においてヤギ精子の核型が最終的に分析できた卵子は、単精子侵入卵子のうちの約37%であった。なお、ウシ⁴⁵⁴⁾およびブタ⁴⁵⁵⁾精子を同様の方法で分析した核型分析の成功率は、ウシで89%以上、ブタで20%前後と報告されている。この核型分析法はその成否が術者の熟練度によるが、今後の技術的改善によってさらに高い分析率が得られるものと期待される。

また、本研究において、判別されたヤギ精子由来の核盤のうちで、X精子由来のものとY精子由来のものの占める割合は、それぞれ47.6%および52.4%で、このことは、ヤギ精子に対して本研究で用いた先体反応誘起法の効果ならびにヤギ先体反応精子の透明帯除去ハムスター卵子への侵入能が、X精子とY精子のあいだでほとんど差のないことを示唆しているように思われる。

第3節 先体反応精子の体外保存法に関する研究

精子の体外保存に関する研究報告は、これまで枚挙の暇のないほど多数出されているが、加藤ら⁴⁶⁷⁾の精巣網精子を用いた報告を除けば、そのほとんどが射出精子か精巣上体尾部精子を対象としたもので、先体反応精子の保存に関する報告はまだ出されていない。そこで、この節では、ヤギ先体反応精子の4℃液状保存および凍結保存の可能性について検討した。また、ヤギ先体反応精子の延命に効果のあることが明らかにされた(第4章第4節)イミダゾールが、体外保存したヤギ先体反応精子の卵子への侵入能の改善に有効か否かについても検討した。

I. 材料および方法

日本在来種雄ヤギ3頭から人工膣法により採取した新鮮精液を、K-3液を用いて600×gで5分間の遠心分離により高精子濃度($3\sim6\times10^9$ 精子/ml)の3回洗浄精子浮遊液とし、この精子浮遊液を密封ガラス管内において39.5℃で2時間インキュベートした(第3章第4節)ものを先体反応精子試料とした。

Table 25. Compositions of diluents.

Components	CG	ECG ¹	ECG-catalase ¹
Na-citrate(%)	2.1	2.1	2.1
Glucose(%)	0.6	0.6	0.6
Penicillin G ² (I.U./ml)	1000	1000	1000
Egg yolk(%v/v)	-	20	20
Catalase(S.U. ³ /ml)	-	-	150

¹Diluents were centrifused for removing unsoluble substance before use.

²Potassium salt.

³Sigma unit.

1) 4℃液状保存

精子の保存希釈液にはCG液、ECG液⁴⁷⁾およびカタラーゼ添加ECG液(Table 25)の3種類の液を用いた。すなわち、先体反応誘起処理後、ガラス管から回収した精子は、まず、CG液に精子濃度が 1×10^9 精子/mlとなるように浮遊させ、ついで、CG液、ECG液またはカタラーゼ添加ECG液の3種類の希釈液を用いて5～10倍に希釈したのち、4時間以上かけて4℃まで冷却し、そのままの温度で1、3、5または7日間保存した。

2) 4℃液状保存した先体反応精子の受精用培地へのイミダゾール添加

カタラーゼ添加ECG液中において4℃で1日間保存したヤギ先体反応精子を、透明帯除去ハムスター卵子に媒精し、5時間インキュベートしたのち、卵子を固定・染色して精子の侵入状況を調べた。

3) 凍結保存

先体反応誘起処理後、ガラス管から回収した精子は、まず、カタラーゼ添加ECG液に精子濃度が $2 \sim 4 \times 10^8$ 精子/mlとなるように浮遊させ、4時間以上かけて4℃まで冷却したのち、8%グリセロールを含むあるいは含まないカタラーゼ添加ECG液で等倍希釈し、ストロー法(0.25 ml)あるいは錠剤化凍結法(0.20 ml)で凍結し、液体窒素中(-196℃)で保存した。なお、融解は、ストロー法では40℃の恒温槽中に行ない、錠剤化凍結法では40℃に加熱したBeltsville thawing solution(BTS; 3.7%グルコース、0.6%クエン酸ナトリウム、0.125%重炭酸ナトリウム、0.125%EDTA、0.075%KClを含む水溶液)^{46b)}を用いて行なっ

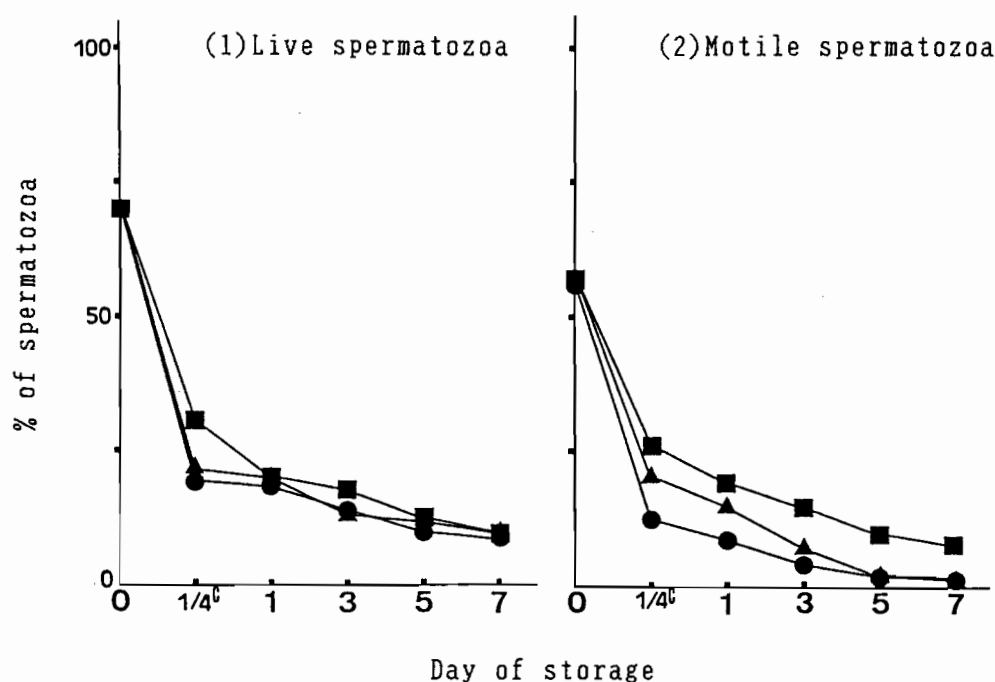


Fig. 45. Time-related changes in viability (1) and motility (2) of acrosome-reacted goat spermatozoa during the storage at 4°C in different diluents. ●; CG diluent, ▲; ECG diluent, ■; ECG-catalase diluent.

^cImmediately after cooling to 4°C.

た。

保存成績の検討に当たっては、これらの実験終了後、精子の運動性を、37°Cに加温しながら顕微鏡下で観察したほか、精子の生存性および先体反応の有無についてはTG染色法（第2章第3節）により確かめた。なお、得られた運動精子率および生存精子率は角変換したのち、分散分析を行い、Duncanの多重検定法³²⁶⁾によって、保存前後、保存日数間および希釈液間などで差の有意性を検定した。また、ハムスターテスト（第2章第2節）により卵子侵入能についても検討したが、すべての実験区において媒精用の精子浮遊液の濃度は、生存精子数が等しくなるように調整した。精子侵入が認められた卵子の割合および精子侵入卵子1個当たりの平均侵入精子数の保存前後、保存日数間および希釈液間などにおける差の有意検定は、それぞれ χ^2 検定およびDuncanの多重検定法³²⁶⁾で行った。

II. 結 果

4°C液状保存の結果、先体反応誘起処理前の精子試料では、約8割の精子が正常な先体

Table 26. Time-related changes in the ability to penetrate zona-free hamster eggs of acrosome-reacted goat spermatozoa during the storage at 4°C in ECG-catalase diluent (n=6).

Day of storage	No. of eggs penetrated/ no. examined [%]	Average no. of sperm in penetrated eggs
0 ¹	136/136 [100.0]	4.4
1	27/161 [16.8]	1.1
3 or 4	4/54 [7.4]	1.0
6 or 7	0/39 [0.0]	-

¹Immediately after incubation for inducing the acrosome reaction.

を持つ生存精子で、その大部分が運動精子であった。このような精子試料を密封ガラス管内において39.5°Cで2時間インキュベートしたところ、生存精子率は約70%に低下したが、そのほとんどすべてが先体反応を起こした。また、先体反応精子の約8割が運動精子であった。このような先体反応精子試料を4°Cに冷却して保存した。

4°C保存期間中の先体反応精子の生存性と運動性の経時的変化を検討した結果(Fig. 45)、生存精子率は、希釈

液の種類に関りなく、4°Cへの冷却期間中にかなり低下し、4°C到達直後では、冷却前の値の1/2~1/3の20~30%となった。また、その後の保存期間中も、生存精子率は徐々に低下し、保存7日目には冷却前の値の約1/7の10%前後となった。なお、いずれの時間段階においても、希釈液間における生存精子率の有意差は認められなかった。一方、運動性の検討結果は、希釈液の種類によって異なり、CG液とECG液では、保存5日目で運動精子はほとんど認められなかったが、カタラーゼ添加ECG液では、保存7日目でも生存精子の大部分が運動精子であった。なお、すべての時間区において、CG液とECG液の運動精子率の間に有意差はなかったが、CG液とカタラーゼ添加ECG液の間の差は有意であった。また、ECG液とカタラーゼ添加ECG液間の差は、保存5日目と7日目では有意であった。

次に、先体反応誘起処理直後のヤギ精子を透明帯除去ハムスター卵子に媒精し、5時間インキュベートしたのち、侵入成績を調べた結果(Table 26)、実験に用いた136個の透明帯除去ハムスター卵子のすべてでヤギ精子の侵入が認められ、平均侵入精子数は4.4個であった。また、カタラーゼ添加ECG液中において4°Cで1日間および3または4日間保存したヤギ先体反応精子を透明帯除去ハムスター卵子に媒精した場合、精子侵入卵子率は16.8%(27/161)および7.4%(4/54)となり、卵子当たりの侵入精子数はそれぞれ1.1および1.0個となった。しかし、6または7日間保存した精子では、卵子への精子侵入は全く認められなかった。

Table 27. Effect of addition of imidazole (20 mM) to the fertilizing medium¹ on the ability to penetrate zona-free hamster eggs of acrosome-reacted goat spermatozoa stored for 1 day at 4°C in ECG-catalase diluent (n=5).

With(+) or without(-) imidazole	No. of eggs penetrated/ no. examined [%]	Average no. of sperm in penetrated eggs
-	15/50 [30.0]	1.1
+	25/53 [47.2]	1.4

¹BO medium containing 3 mg/ml BSA.

さらに、4°C液状保存したヤギ先体反応精子の透明帯除去ハムスター卵子への受精用培地にイミダゾールを添加しなかった場合の精子侵入卵子率は30.0% (15/50)で、平均侵入精子数は1.1個であったが、イミダゾールを添加すると、これらの値はともに上昇し、精子侵入卵子率は47.2% (25/53)に、平均侵入精子数も1.4個

となった(Table 27)。

凍結保存の場合、先体反応誘起処理直後の試料では、生存精子率は約80%でそのほとんどすべてが先体反応を起こし、運動精子率60%の精子試料を用いたハムスターテストの結果、100.0%の精子侵入卵子率と2.2個の平均侵入精子数が得られた。このような先体反応精子試料を4°Cまで冷却したところ、生存精子率と運動精子率はそれぞれ約24%と約20%にまで低下した。ついで、この4°C冷却精子試料をグリセロール添加または無添加の状態でストロー法あるいは錠剤化凍結法で凍結し、融解後の生存性、運動性および透明帯除去ハムスター卵子への侵入能を調べた結果、融解後の生存精子率と運動精子率は、グリセロールの有無や凍結方法にかかわらず著しく低下し、それぞれ2.3~9.6%と0.0~5.0%であった。また、いずれの条件で凍結した精子試料においても、透明帯除去ハムスター卵子への精子侵入は全く認められなかった(Table 28)。

III. 考 察

ヤギ先体反応精子を37°Cの条件下においた場合、その生存率は5時間で1/4~1/5にまで低下し、運動性も5時間前後でほとんど失われた(第4章第3節)。しかし、本節の実験1においてヤギ先体反応精子を4°Cに冷却して保存すると、希釈液中の卵黄およびカタラーゼの有無にかかわらず、保存7日目で約1/7の先体反応精子が生存していた。また、卵黄もカタラーゼも含まない希釈液(CG液)や卵黄を含む希釈液(ECG液)中で低温保存した場合、保存5日目で運動性はほとんど失われたが、これらを共に含む希釈液(カタラーゼ添加ECG液)中では、保存7日目で生存精子の大部分が運動性を有していた。卵黄が精子の温

Table 28. Viability, motility and the ability to penetrate zona-free hamster eggs of acrosome-reacted goat spermatozoa frozen-thawed in ECG-catalase diluent with (8%) or without glycerol by the straw method (n=3) or the pellet method (n=1).

Treatment	Freezing Method	%[s.e.] of live sperm ²	%[s.e.] of motile sperm ³	No. of eggs penetrated/ no. examined ⁴ [%]	Average no. of sperm in penetrated eggs ⁴
Control ¹	-	81.0[2.0]	53.3[5.4]	96/96[100.0]	2.2
Freeze-thawing without glycerol	Straw	4.1[0.5]	1.6[1.4]	0/45[0.0]	-
	Pellet	2.3	0.0	0/21[0.0]	-
Freeze-thawing with glycerol	Straw	9.6[0.8]	5.0[0.0]	0/46[0.0]	-
	Pellet	5.1	0.0	0/22[0.0]	-

¹Immediately after incubation for inducing the acrosome reaction.

²Examined by a trypan blue-Giemsa method.

³Examined under light microscope (x400) at 37°C.

⁴Examined by a hamster test.

度衝撃に対して優れた保護効果を有することが発見されて^{469,470)}以来、ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジなどの多くの家畜の精子の保存希釈液に広く添加されているが、希釈液に卵黄を添加すると、卵黄中の芳香族アミノ酸が精子により代謝されて過酸化水素を生じ、精子の代謝や運動を阻害するため、精子の運動性は保存期間中に徐々に低下すると言われている⁴⁷¹⁾。そこで、ウシ⁴⁷²⁾やブタ⁴⁷³⁻⁴⁷⁶⁾精子の保存においては、卵黄含有希釈液に過酸化水素を分解するカタラーゼを添加して、精子の運動性の阻害を防止している。著者は、先体反応誘起処理を行なわなかった洗浄ヤギ射出精子を用いた保存実験について、EG液中よりもECG液中で、さらにカタラーゼ添加ECG液中で最もよく維持されることを認めているが、先体反応後においても、卵黄とカタラーゼを含む希釈液を用いて4℃液状保存を行なうと、ヤギ先体反応精子の生存性と運動性は比較的長い期間保持されることが知られた。

次に、カタラーゼ添加ECE液を用いて4℃液状保存したヤギ先体反応精子について、保存期間中の透明帯除去ハムスター卵子への侵入能の経時的変化を調べた結果、少なくとも一部の先体反応精子は、3日から4日間は透明帯除去ハムスター卵子への侵入能を維持することが判明した。37℃の条件下では、ヤギ先体反応精子の透明帯除去ハムスター卵子への侵入能は、わずか3時間で失われたが(第4章第3節)、この結果からみると、ヤギ先体反応精子の卵子への侵入能は、精子を低温環境に置くことによりかなりの期間保持されることが明らかとなった。

本実験で用いたカタラーゼ添加ECG液における卵黄とカタラーゼの添加量は、それぞれ20 %v/vと150 S.U./mLであった。これらの添加量について、著者は特に検討を加えなかったが、ヤギ精子の保存希釈液における卵黄の至適濃度について、加藤⁴⁷⁷⁾は、10～30 %の濃度では精子の生存性に特に大差はなく、いずれの濃度でも良好に維持されたと報告している。また、カタラーゼについては、一般にかなり広い濃度範囲で有効であると言われており⁴⁷⁶⁾、ここではブタ^{476, 478)}で好適とされている量を添加した。なお、ヤギ先体反応精子を4℃液状保存した場合、透明帯除去ハムスター卵子への侵入能の低下防止のためイミダゾールの有効性を検討した結果、受精用培地へイミダゾールを添加することより卵子への侵入能がかなり改善されることが知られた。イミダゾールはホスホジエララーゼ阻害剤として知られている⁴⁴⁴⁾が、著者は予備実験として、ホスホジエララーゼ阻害剤⁴⁴⁵⁾であるカフェイン(10 mM)の受精用培地への添加を試みた結果、卵子への侵入はほとんど完全に阻害された。しかし、ブタ精子の5℃液状保存においては、保存希釈液へのカフェインの添加により、精子の生存性が延長されることが報告されている^{479-482, 583)}。イミダゾールやカフェインがどのような機構で4℃保存したヤギ先体反応精子の卵子への侵入能を向上あるいは低下させるのかは不明であるが、もし、保存希釈液にイミダゾールを添加することによって、冷却または保存期間中のヤギ先体反応精子の生存性の低下が軽減されるのであれば、保存可能期間が更に延長できるかも知れない。

本節の実験結果、ヤギ先体反応精子の凍結保存は、保存希釈液に耐凍剤のグルセロールを添加しても、またストロー法や錠剤化凍結法のいずれの方法によってもかなり困難であった。その理由は、4℃への冷却期間中における生存性の低下が主因であるとも考えられ、ヤギ先体反応精子の凍結保存では4℃への冷却期間中における生存性の低下を防止する方法を考えねばならない。

第4節 小 括

ヤギ先体反応精子を透明帯除去ハムスター卵子に媒精し、卵子侵入した精子の雄性前核を形成させ、その核型標本を検索することによって、ヤギのX、Y精子を区別する方法を検討した。その結果、前核を形成したヤギ誘起精子の核型標本は、Cバンド染色することによってX精子由来の核盤とY精子由来の核盤が判別可能となることが確かめられた。また、核型分析を行なうためには多精子侵入の防止が必要となるため、 25×10^5 精子/mLのヤ

ギ先体反応精子とともに0.5～1時間インキュベートした透明帯除去ハムスター卵子を、ピペッティングにより余剰付着精子を除去したのち精子を含まない新しい培地に移した結果、比較的高率に単精子侵入卵子が得られることが判明した。さらに、この系において高率に第1卵割中期の卵子を得るには、分裂毒を媒精の7～8時間後に添加するのが好ましいことも知られた。なお、これらの方法により、最終的に精子の核型が分析できた卵子は、単精子侵入卵子のうちの約37%であった。また、本研究において、判別されたヤギ精子由来の核盤のうちで、X精子およびY精子由来のものが占める割合は、それぞれ約48%および約52%であった。

次に、現行の体外受精系で必要とされている先体反応精子の保存の可能性について検討した結果、4℃液状保存において、精子の運動能および生存性を一定期間維持するには保存希釈液に卵黄とカタラーゼを添加する必要があることが知られた。また、これらを添加した希釈液中では少なくとも一部のヤギ先体反応精子は、3～4日間は、透明帯除去ハムスター卵子への侵入能を保持することが判明した。一方、ヤギ先体反応精子の凍結保存については、希釈液への耐凍剤（グリセロール）の添加の有無や凍結方法に関りなく極めて困難であることが示された。さらに、受精用培地へのイミダゾールの添加により、4℃液状保存したヤギ先体反応精子の卵子への侵入能が改善されることが明らかにされた。

第6章 総括

本研究は、ヤギ、ウシ、ブタなどの家畜精子について、先体反応の実態や先体反応を起こした精子の特性を解明する目的で行なわれた。

1. 先体反応精子の判別法に関する研究

先体反応を起こした精子を判別し、その比率を知るための簡便な手法を開発することは、先体反応に関する研究を進めるうえでもっとも基礎的な課題であると思われる。そこでこの章では、家畜精子の先体反応を簡単に判別する方法を究明するため、ヤギ、ウシおよびブタ精子を用い、主として染色法による判別を試みた。まず、ヒトの先体反応精子の判別法として知られるトリブルステイン法（TS法）による染色の結果、どの家畜の精子も、頭部の染色様式の違いによって、正常先体を持つ生存精子と死滅精子、および正常先体を持たない生存精子と死滅精子の4種類が分類された。これらを透明帯除去ハムスター卵子への侵入試験（ハムスターテスト）によって検討した結果、正常先体を持たない生存精子が先体反応精子であることが確かめられた。

つぎに、TS法を著者が簡易化したTS簡便法による染色ではTS法と同様の精子判別が可能であったが、ブタ精子への応用は不適當であった。。

また、著者が考案したトリパンブルー・ギムザ染色法（TG染色法）は、いずれの家畜精子も前述の4種類に分類することができ、その結果は透過型電子顕微鏡による観察やハムスターテストによって確認された。

すなわち、この研究の結果、家畜の先体反応精子の判別法として比較的簡単で確実な染色法が発見され、特にTG染色法は、ヤギ、ウシおよびブタ精子の先体反応判定法として極めて有用であることが知られた。

2. 先体反応の人為的誘起法に関する研究

家畜精子の先体反応を人為的に誘起することができれば、体外受精に必要な先体反応精子の作出が容易になるばかりでなく、先体反応の要因や機構を解明するうえにも有意義であると思われる。この章では、まず、ヤギ、ウシおよびブタの射出精子をハムスター、マウス、ウサギまたはラットなどの実験小動物の摘出子宮内あるいはウサギの摘出卵管内において37℃でインキュベートした結果、先体反応が誘起されることを認め、摘出生殖道の先体反応誘起効果は、生殖道提供雌動物の性周期やホルモン処理では影響されないことを

確かめた。つぎに、ヤギまたはブタ精子を媒液とともに開放試験管内または密封ガラス管内でインキュベートした結果、先体反応は密封ガラス管内で誘起され易いことが認められ、さらに、ラット子宮液の添加が誘起時間の短縮に有効となることが確かめられた。なお、密封ガラス管内のインキュベーションでは、精子濃度が高いほど、またインキュベーション温度が37.0℃よりも39.5℃で先体反応誘起効果は高くなることが判明した。さらに、先体反応誘起用媒液の組成について、代謝基質はむしろ阻害的に作用し、むしろNaClとCaCl₂のみからなる媒液でも先体反応が誘起され、ハムスターテストによって先体反応誘起用の媒液にはCa²⁺の添加が望ましいことが判明した。

3. 先体反応精子の特性に関する研究

先体反応精子の特性を究明するため、先体反応を誘起したヤギ精子を用いて、まず、体外成熟させた卵胞卵子および体外成熟後透明帯を除去した卵子へ体外受精を行なった結果、透明帯除去卵子では受精するが、透明帯保有卵子では精子侵入がなく、先体反応を誘起したヤギ精子は透明帯を通過する能力を失っていることを確認した。また、ヤギ精子は、先体反応後は、いわゆる超活性化運動に類似した運動を示したが、先体反応精子の運動能および生存性は先体反応を起こしていない精子に比べて著しく低下し、透明帯除去ハムスター卵子への侵入能は3時間以内に失われた。なお、先体反応精子の運動能、生存性ならびに透明帯除去ハムスター卵子への侵入能保持時間は、イミダゾール添加によって延長されることが確かめられた。

4. 先体反応精子の利用に関する研究

まず、家畜の性支配を目的としてX、Y精子の判別法を開発するため、先体反応を誘起したヤギ精子を用い、透明帯除去ハムスター卵子に媒精して精子侵入させたのち、雄性前核を形成したヤギ精子の核型標本作製し、Y精子の判別を試みた結果、核型分析のためには、媒精後7～8時間の分裂阻止剤（ポドフィロトキシンおよびビンブラスチン）添加や、多精子侵入防止措置が必要なことを指摘した。次に、ヤギ先体反応精子の保存法について検討し、ヤギ先体反応精子を卵黄およびカタラーゼを含む希釈液中において4℃で保存した場合には、少なくとも一部の先体反応精子は、透明帯除去ハムスター卵子への侵入能を3・4日間保持できることを発見した。また、受精用培地へのイミダゾールの添加により、4℃液状保存したヤギ先体反応精子の卵子への侵入能が改善されることを明らかにした。しかし、ヤギ先体反応精子の凍結保存は、希釈液への耐凍剤（グリセロール）の添

加や凍結方法に関りなく極めて困難なことが知られた。

すなわち、この研究は、家畜精子の先体反応について、その人為的誘起法を確立するとともに、先体反応精子の簡単で確実な判別法を開発し、また、先体反応精子の特性を明らかにして、その体外保存の可能性についても検討したもので、その研究内容は、家畜精子の先体反応の研究および体外受精の発展に大きく寄与すると思われる。

謝 辞

本研究の遂行ならびに本論文の作成にあたり、ご指導、ご校閲を賜わった苅田 淳教授に深甚の謝意を表するとともに、ご懇篤な指導、ご鞭撻を頂いた加藤征史郎助教授に深く感謝する。さらに、終始適切なご指導を賜わった小野 一教授、木村 重教授ならびに宮野 隆助手に感謝する。

また、本研究の期間中、多様なご援助を頂いた本学農学部附属農場の南條 巖助手、家畜育種学研究室の向井文雄助手、果樹園芸学研究室の中西テツ助教授、共同開発センターの土田廣信助教授、土壌学研究室の高橋竹彦助教授、また米国イリノイ大学のDr. C. N. Gravesならびに岡山大学農学部の丹羽皓二教授に心から感謝する。さらに、本研究の遂行上ご協力を頂いた本学農学部家畜繁殖学研究室の専攻生、藤崎 裕君、阪上守人君ならびに原山 洋君に心から感謝する。

引用文献

1. Leeuwenhoek, A. (1677) Philos Trans R. Soc. Lond [Biol] 12: 1040.
2. Leeuwenhoek, A. (1678) Philos Trans R. Soc. Lond [Biol] 13: 1044.
3. Leeuwenhoek, A. (1684) Reprinted in Arcana Naturae, pp.149. Lugduni Batavorum, Langerak, 1722
4. Leeuwenhoek, A. (1701) Reprinted in Arcana Naturae, pp.367. Lugduni Batavorum, Langerak, 1719
5. Lenhossek, M.V. (1898) Arch. Mikrosk. Anat., 51: 215.
6. Benda, G. (1887) Arch. Mikrosk. Anat., 30: 49.
7. Fawcett, D.W. (1958) Int. Rev. Cytol., 7: 195.
8. Fawcett, D.W. & Burgos, V.M.H. (1955) Ciba Foundation Symposium on Aging of Trisient Structure.
9. Bresciani, J. & Fenchel, T. (1965) Vidensk. Meddr. Dansk. Naturh. Foren., 128: 85.
10. Bresciani, J. & Fenchel, T. (1967) Ophelia., 4: 1.
11. Tuzet, O., Garrone, R. & Pavans de Ceccatty, M. (1970) Ann. Sci. Nat. Zool., 12: 27.
12. Schincariol, A.L., Habowsky, J.E.J. & Winner, G. (1967) Can. J. Zool., 45: 590.
13. Weissman, A., Lentz, T.L. & Barnett, R.J. (1969) J. Morphol., 128: 229.
14. Stagni, A. & Lucchi, M.L. (1970) Comparative Spermatology (Baccetti, B. ed.), pp.357, Academic Press, New York.
15. Moore, G.P.M. & Dixon, K.E. (1972) J. Morphol., 137: 483.
16. Hendelberg, J. (1977) Acta. Zool. Fennica., : 149.
17. Newton, W.D. (1975) Biol. Bull., 149: 551.
18. Nyholm, K.G. (1976) Zoon., 4: 11.
19. Koehler, J.K. (1965) Z. Mikrosk. Anat. Forsch., 67: 57.
20. Marchand, B. & Mattei, X. (1976) J. Ultrastruct. Res., 54: 347.
21. Reger, J.F. (1971) J. Submicrosc. Cytol., 3: 193.
22. Baccetti, B. & Dallai, R. (1977) Tissue Cell., 9: 563.
23. Villa, L. (1977) Acta Embryol. Exp. pp.179.
24. Woollacott, R.M. (1977) J. Morphol., 152: 77.
25. Kubo, M., Ishikawa, M. & Numakunai, T. (1978) Acta Embryol. Exp., 3: 283.
26. Kubo, M. (1977) J. Ultrastruct. Res., 61: 140.
27. Kubo, M. & Ishikawa, M. (1978) J. Submicr. Cytol., 10: 411.
28. Brown, G.G. (1970) Comparative Spermatology (Baccetti, B. ed.), pp.183, Academic Press, New York.
29. Wingstrand, K.G. (1972) K. Danska. Selsk. Skr., 19: 5.
30. Reger, J.F. (1964) Ibid., 11: 181.
31. Reger, J.F. (1969) J. Ultrastruct. Res., 28: 422.
32. Legg, G. (1973) J. Zool., 170: 429.
33. Reger, J.F. (1963) J. Ultrastruct. Res., 8: 607.
34. Baccetti, B. (1979) Arthropod Phylogeny (Gupta, A.P. ed.), pp.609, Van Nostrand Co., New York.
35. Ginsburg, A.S. (1963) J. Embryol. Exp. Morphol., 11: 13.
36. Jespersen, A. (1971) J. Ultrastruct. Res., 37: 178.
37. Sasaki, Y.T. (1976) Develop. Growth & Differ., 18: 1.
38. Baccetti, B. & Afzelius, B.A. (1976) The biology of the sperm cell. Monographs

- in Developmental Biology, vol.10. (Karger, S. ed), AG, Basel.
39. Schenk, S.L. (1878) Mitt. Embryol. Inst. K. K. Univ., Wien, 1: 107.
 40. Yamane, J. (1935) Cytologia, 6: 475.
 41. McClean, D. (1931) J. Pathol. Bacteriol., 34: 459.
 42. Hoffman, D.C. & Duran-Reynals, F. (1931) J. Exp. Med., 53: 387.
 43. Zaneveld, L.J.D., Polakoski, K.L. & Schumacher, G.F.B. (1973) J. Biol. Chem., 248: 564.
 44. Fléchon, J.E. & Dubois, M.P. (1975) C. R. Acad. Sci., 280: 877.
 45. Morton, D.B. (1975) J. Reprod. Fert., 45: 375.
 46. Yang, C.-H. & Srivastava, P.N. (1975) J. Biol. Chem., 250: 79.
 47. Gould, S.F. & Bernstein, M.H. (1975) Differentiation, 3: 123.
 48. Brown, C.R. (1975) J. Reprod. Fert., 45: 537.
 49. Brown, C.R. (1981) J. Reprod. Fert., 45: 537.
 50. Srivastava, P.N., Adam, C.E. & Hartree, E.F. (1965) Nature, 205: 498..
 51. Srivastava, P.N., Adam, C.E. & Hartree, E.F. (1965) J. Reprod. Fert., 10: 61.
 52. Polakoski, K.L., Zaneveld, L.J. D. & Williams, W.L. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun., 45: 381.
 53. Stambaugh, R. & Buckley, J. (1968) Science, 161: 585.
 54. Stambaugh, R. & Buckley, J. (1969) J. Reprod. Fert., 19: 423.
 55. Stambaugh, R. & Buckley, J. (1970) Biol. Reprod., 3: 275.
 56. Stambaugh, R. & Buckley, J. (1972) Biophys. Biochim. Acta., 284: 473.
 57. Stambaugh, R. & Smith, M. (1974) Science, 186: 745.
 58. Zaneveld, L.J.D., Srivastava, P.N. & Williams, W.L. (1969) J. Reprod. Fert. 20: 337.
 59. Zaneveld, L.J.D., McRoie, R.A. & Williams, W.L. (1969) Fed. Proc. Amer. Exp. Biol., 28: 705.
 60. Polakoski, K.L., McRoie, R.A. & Williams, W.L. (1973) J. Biol. Chem., 248: 8178.
 61. Polakoski, K.L., McRoie, R.A. & Williams, W.L. (1973) J. Biol. Chem., 248: 8183.
 62. Fink, E., Schiebler, H., Arnhold, M. & Finz, H. (1972) Z. Physiol. Chem., 353: 1633.
 63. Schiebler, H., Finz, H., Arnhold, M., Fink, E. & Tschesche, H. (1972) Z. Physiol. Chem., 353: 1638.
 64. Allison, A.C. & Hartree, E.F. (1970) J. Reprod. Fert., 21: 501.
 65. Koren, E. & Milkovic, S. (1973) J. Reprod. Fert., 32: 349.
 66. Stambaugh, R., Smith, M. & Foltas, S. (1975) J. Exp. Zool., 193: 119.
 67. Garner, D.L., Easton, M.P., Munson, M.E., & Doane, M.A. (1975) J. Exp. Zool., 191: 127.
 68. Schleuning, W., Hell, R., Schiessler, H. & Fritz, H. (1975) Z. Physiol. Chem., 356: 1915.
 69. Schleuning, W., Kolb, H.J., Hell, R., & Fritz, H. (1975) Z. Physiol. Chem., 356: 1923.
 70. Schleuning, W., Schiessler, H. & Fritz, H. (1975) Z. Physiol. Chem., 356: 1931.
 71. Meizel, S. & Mukerji, S.K. (1975) Biol. Reprod., 13: 83.
 72. Meizel, S. & Mukerji, S.K. (1976) Biol. Reprod., 14: 444.
 73. Phillips, D.M. (1972) J. Ultrastruct. Res., 38: 591.
 74. Polakoski, K.L., Zahler, W.L. & Paulson, J.D. (1977) Fertil. Steril., 28: 668.
 75. Polakoski, K.L. & Parrish, R.F. (1977) J. Biol. Chem., 252: 1888.
 76. Talbot, P. & Dicalantonio, G. (1985) J. Histochem. Cytochem., 33: 1169.
 77. Tobias, P.S. & Schumacher, G.F.B. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun., 74: 434.
 78. Brown, C.R. & Harrison, R.A.P. (1978) Biochim. Biophys. Acta, 526: 202.
 79. Brown, C.R. & Hartree, E.F. (1978) Biochem. J., 175: 227.

80. Mukerji, S.K. & Meizel, S. (1975) Arch. Biochem. Biophys., 168: 720.
81. Mukerji, S.K. & Meizel, S. (1979) J. Biol. Chem., 254: 11721.
82. Garner, D.L. & Easton, M.P. (1977) J. Exp. Zool., 200: 157.
83. Green, D.P.L. & Hockaday, A.R. (1978) J. Cell Sci., 32: 177.
84. Parrish, R.F. & Polakoski, K.L. (1979) Int. J. Biochem., 10: 391.
85. Seigel, M.S., Bechtold, D.S., Kopta, C.I. & Polakoski, K.L. (1986) Biol. Reprod., 35: 481.
86. Fock-Nüzel, R., Lottspeich, F., Henschen, A. & Müller-Esterl, W. (1984) Eur. J. Bim., 141: 441.
87. Bryan, J.H.D. & Unnithan, R.R. (1972) Histochem. J., 4: 413.
88. Bryan, J.H.D. & Unnithan, R.R. (1973) Histochemie, 33: 169.
89. Srivastava, P.N., Zaneveld, L.J.D. & Williams, W.L. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun., 39: 575.
90. Seiguer, A.C. & Castro, A.E. (1972) Biol. Reprod., : 31.
91. Srivastava, P.N. & Abou-Issa, H. (1977) Biochem. J., 161: 193.
92. Yang, C.H. & Srivastana, P.N. (1974) Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 145: 721.
93. Gonzales, L.W. & Meizel, S. (1973) Biochim. Biophys. Acta., 320: 180.
94. Dudkiewicz, A.B. (1984) Biol. Reprod., 30: 1005.
95. Meizel, S. & Cotham, J. (1972) J. Reprod. Fert., 28: 303.
96. Bhalla, V.K., Tillman, W.L. & Williams, W.L. (1973) J. Reprod. Fert., 34: 137.
97. Schollmeyer, J.E. (1986) Biol. Reprod., 34: 721.
98. Erickson, R.P. & Martin, S.R. (1974) Arch. Biochem. Biophys., 165: 114.
99. Bhattacharyya, A.K. & Zaneveld, L.J.D. (1982) Biochemistry of Mammalian Reproduction (Zaneveld, L.J.D. & Chatterton, R.T. eds.), pp.119, John Wiley & Sons, New York.
100. Leblond, C.P. & Clermont, Y. (1952) Am. J. Anat., 90: 167.
101. Cavazos, L.F. & Melampy, R.M. (1954) Am. J. Anat., 95: 467.
102. Burgos, M.H. & Fawcett, D.W. (1955) J. Biophys. Biochem. Cytol., 1: 287.
103. Clermont, Y. & Leblond, C.P. (1955) Am. J. Anat., 96: 229.
104. Oakberg, E.F. (1956) Am. J. Anat., 99: 507.
105. Hancock, J.L. (1957) J. R. Micr. Soc., 76: 84.
106. Hancock, J.L. & Trevan, D.J. (1957) J. R. Micr. Soc., 76: 77.
107. Bishop, M.W.H. & Walton, A. (1960) Marshall's Physiology of Reproduction, 3rd edited (Parks, A.S. ed.), vol.1, part 2, pp.1, Longmans, London.
108. Lovell, J.E. & Getty, R. (1960) Am. J. Vet. Res., 21: 597.
109. Amann, R.P. & Almquist, J.O. (1962) J. Dairy Sci., 45: 774.
110. 大沼(秀) (1963) 畜試研報, No.2: 209.
111. 大沼(秀) (1963) 畜試研報, No.2: 225.
112. 大沼(秀) (1964) 家畜繁殖誌, 9: 127.
113. 大沼(秀) (1964) 家畜繁殖誌, 10: 95.
114. 大沼(秀), 西川(義), 藤崎(尚) (1963) 畜試研報, No.1: 135.
115. Dan, J.C. & Shirakami, A. (1971) Dev. Groth Differ., 13: 37.
116. Dan, J.C. (1970) Pro. 1st Intern. Symp. Rome-Siena, 487.
117. 加藤(征), 吉田(重) (1986) ホルモンと臨床, 334(増刊号): 126.
118. Dan, J.C. (1952) Ibid., 103: 54.
119. Dan, J.C. (1954) Ibid., 107: 203.
120. Dan, J.C. (1954) Ibid., 107: 335.
121. Dan, J.C. (1956) Intl. Review Cytol., 5: 365.
122. Niiijima, L. & Dan, J.C. (1965) J. Cell Biol., 25: 243.
123. Niiijima, L. & Dan, J.C. (1965) J. Cell Biol., 25: 249.
124. Colwin, A.L. & Colwin, L.H. (1955) J. Morph., 97: 543.

125. Colwin, A.L. & Colwin, L.H. (1955) *Biol. Bull.*, 109: 357.
126. Dan, J.C. & Wada, K. (1955) *Biol. Bull.*, 109: 40.
127. Colwin, A.L. & Colwin, L.H. (1961) *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 10:211.
128. Colwin, A.L. & Colwin, L.H. (1961) *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 10:231.
129. Colwin, A.L. & Colwin, L.H. (1961) *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 10:255.
130. Brown, G.G. & Humphreys, W.J. (1971) *J. Cell Biol.*, 51: 904.
131. Brown, G.G. (1966) *J. Ultrastruct. Res.*, 14: 425.
132. Colwin, A.L. & Colwin, L.H. (1963) *J. Cell Biol.*, 19: 477.
133. Colwin, A.L. & Colwin, L.H. (1963) *J. Cell Biol.*, 19: 501.
134. Kille, R.A. (1960) Fertilization of the lamprey egg. *Exp. Cell Res.*, 20:12.
135. Kleve, M.G., Yudin, A.I. & Clark, W.H.Jr. (1980) *Tissue Cell*, 12: 29.
136. Clark, W.H.Jr., Kleve, M.G. & Yudin, A.I. (1981) *J. Exp. Zool.*,
137. Austin, C.R. & Bishop, M.W.H. (1958) *Proc. R. Soc. London. Ser. B*, 149: 234.
138. Austin, C.R. & Bishop, M.W.H. (1958) *Proc. R. Soc. London. Ser. B*, 149: 241.
139. Austin, C.R. (1951) *Aust. J. Sci. Res. Ser. B*, 4:581.
140. Chang, M.C. (1951) *Nature*, 168: 697.
141. Austin, C.R. (1952) *Nature*, 170: 326.
142. Bedford, J.M. (1970) *Biol. Reprod. Suppl.*, 2: 128.
143. Iritani, A., Tsunoda, Y., Miyake, M. & Nishikawa, Y. (1975) *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 46: 531.
144. Esbenshade, K.L. & Clegg, E.D. (1977) *Pro.10th Annu. Meet. So. Study Reprod.*, Abstract, No.82.
145. Gordon, M., Dandekar, P.V. & Bartoszwicz, W. (1974) *J. Reprod. Fert.*,36:211.
146. Gordon, M., Dandekar, P.V. & Bartoszwicz, W. (1975) *J. Ultrastruct. Res.*, 50: 199.
147. Gordon, M. (1977) *Male Reproductive System* (Yates, R. D. & Gordon, M. eds.), pp.15, Masson, New York.
148. Talbot, P. & Franklin, L.E. (1978) *J. Exp. Zool.*, 204: 291.
149. Talbot, P. & Franklin, L.E. (1978) *J. Exp. Zool.*,203: 1.
150. Kinsey, W.H. & Koehler, J.K. (1978) *J. Ultrastruct. Res.*, 64: 1.
151. Schwarz, A.M. & Koehler, J.K. (1979) *Biol. Reprod.*, 21: 1245.
152. Courtens, J.L. & Fournier-Delpech, S. (1979) *J. Ultrastruct. Res.*, 68: 136.
153. Rosado, A., Velázquez, A. & Lara-Ricalde, R. (1973) *Fertil. Steril.*,24:354.
154. Clegg, E.D., Morre, D.J. & Lunstra, D.D. (1975) *The Biology of Male Gametes* (Duckett, J.G. & Racey, P.A. eds.), pp.321, Cademic Press, London.
155. Snider, D.R. & Clegg, E.D. (1975) *J. Anim. Sci.*, 40: 269.
156. Koehler, J.K. & Gaddum-Rosse, P. (1975) *J. Ultrastruct. Res.*, 51: 106.
157. Friend, D.S. (1977) *Immunobiology of Gametes* (Edidin, M. & Johnson, M.H.eds.), pp.5, Cambridge University Press, London.
158. Friend, D.S. (1980) *Membrane-Membrane Interactions* (Gilula, N.B.ed.),pp.153, Raven Press, New York.
159. Friend, D.S., Orci, L., Perrelet, A. & Yanagimachi, R. (1977) *J. Cell Biol.*, 74: 561.
160. Davis, B.K. (1976) *Proc. Soc. Biol. Med.*, 152: 257.
161. Davis, B.K. (1978) *Symposium on the Pharmacological Effects of Lipids*, AOCs Monogr. No.5, pp.145.
162. Davis, B.K., Byrne, R. & Hungund, B. (1979) *Biochem. Biophys. Acta*, 558:257.
163. Davis, B.K., Byrne, R. & Hungund, B. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77: 1546.
164. Huacuja, L., Sosa, A., Delgado, N.M. & Rosado, A. (1973) *Life Sci.*, 13:1383.
165. Delgado, N.M., Huacuja, L., Merchant, H., Reyes, R. & Rosado, A. (1976)

- Life Sci., 16: 1483.
166. Johnson, O. & Eliasson, R. (1978) *Int. J. Androl.*, 1: 485.
 167. Yanagimachi, R. & Usui, N. (1974) *Exp. Cell Res.*, 89: 161.
 168. Babcock, D.F., Singh, J.P. & Lardy, H.A. (1979) *Dev. Biol.*, 69: 85.
 169. Lewin, L.M., Weissenberg, R., Sobel, J.S., Marcus, Z. & Nebel, L. (1979) *Arch. Androl.*, 2: 279.
 170. Vaidya, R.A., Glass, R.W., Dandekar, P. & Jhonson, K. (1971) *J. Reprod. Fertil.*, 24: 299.
 171. O'Rand, M.G. (1977) *Dev. Biol.*, 55: 260.
 172. O'Rand, M.G. (1979) *The Spermatozoa* (Faucett, D.W. & Bedford, J.M., eds.), pp.195, Urban & Schwarzenberg, Munich.
 173. Bedford, J.M. (1964) *J. Reprod. Fert.*, 7: 221.
 174. Bedford, J.M. (1965) *J. Reprod. Fertil.*, 9: 249.
 175. Bedford, J.M. (1969) *Advances in Bioscience*, vol.4 (Raspe, G. ed.), pp.35, Pergamon Press, Oxford.
 176. O'Rand, M.G. & Metz, C.B. (1976) *Biol. Reprod.*, 14: 586.
 177. Hamner, C.E. & Williams, W.L. (1963) *J. Reprod. Fert.*, 5: 143.
 178. Mounib, M.S. & Chang, M.C. (1964) *Nature*, 201: 943.
 179. Murdoch, R.N. & White, I.G. (1967) *J. Reprod. Fert.*, 14: 213.
 180. Iritani, A., Gomes, W. & VanDemark, N.L. (1969) *Biol. Reprod.*, 1: 77.
 181. Grotjan, H.E., Day, B.N. & Mayer, D.T. (1974) *J. Anim. Sci.*, 38: 1235.
 182. Stone, R.T., Foley, C.W., Thorne, J.G. & Huber, T.L. (1973) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 142: 64.
 183. Hicks, J.J., Martinez-Manautou, J. Pedron, N. & Rosado, A. (1972) *Fertil. Steril.*, 23: 172.
 184. Hicks, J.J., Pedron, N. & Rosado, A. (1972) *Fertil. Steril.*, 23: 886.
 185. Rogers, B.J. & Morton, B. (1973) *Biol. Reprod.*, 9: 361.
 186. Rosado, A., Hicks, J.J., Reyes, A. & Blanco, I. (1974) *Fertil. Steril.*, 25: 821.
 187. Hoskins, D.D. & Casillas, E.R. (1975) *Molecular Mechanisms of Gonadal Hormone Action*, vol.1 (Thomas, J.A. & Sinhal, R.L., eds.), pp. 293, University park Press, Baltimore,.
 188. Huacuja, L., Delagado, N.M., Merchant, H., Pancardo, R.M. & Rosado, A. (1977) *Biol. Reprod.*, 17: 89.
 189. Cummins, J.M. & Teichman, R.J. (1974) *Biol. Reprod.*, 10: 555.
 190. Soupart, P., Anderson, M.L., Albert, D.H., Coniglio, J.G. & Repp, J.S. (1979) *Fertil. Steril.*, 32: 450.
 191. Thibault, C., Dauzier, L. & Winterberges, S. (1954) *C. R. Soc. Biol., Paris*, 148: 780.
 192. Yanagimachi, R. & Chang, M.C. (1963) *Nature*, 200: 281.
 193. Whittingham, D.G. (1968) *Nature*, 220: 592.
 194. Edwards, R.D., Bavister, B.D. & Steptoe, P.C. (1969) *Nature*, 221: 632.
 195. Pickworth, S. & Chang, M.C. (1969) *J. Reprod. Fert.*, 19: 371.
 196. Hamner, C.E., Jennings, L.L. & Sojka, N.J. (1970) *J. Reprod. Fert.*, 23: 477.
 197. Yanagimachi, R. (1972) *Anat. Rec.*, 174: 9.
 198. Noske, I.G. (1972) *Experimantia*, 28: 1348.
 199. Gould, K.G., Cline, M.E. & Williams, W. L. (1973) *Fertil. Steril.*, 24: 260.
 200. Miyamoto, H. & Chang, M.C. (1973) *Nature*, 241: 50.
 201. Mahi, C.A. & Yanagimachi, R. (1976) *J. Exp. Zool.*, 196: 189.
 202. Hanada, A. & Chang, M.C. (1978) *J. Exp. Zool.*, 203: 277.
 203. Brackett, B.G. (1978) *Methods in Mammalian Reproduction* (Daniel, J.C. ed.), pp. 333.
 204. Gould, K.G. (1979) Report to the 273. Ethics Board on Research Involving

- Human In Vitro Fertilization and Embryo Transfer. Washington, No.14. pp.1.
205. Kreitmann, O., Lynch, A., Nixon, W.E. & Hodgen, G.D. (1980) In Vitro Fertilization and Embryo Transfer (Hafez, E. S. E. & Semm, K. eds.), pp.303, MTP Press, Lancaster, England.
 206. Gould, K.G. (1983) *Fertil. Steril.*, 40: 378.
 207. Iritani, A. & Niwa, K. (1977) *J. Reprod. Fert.*, 50: 119.
 208. Iritani, A., Niwa, K. and Imai, H. (1978) *J. Reprod. Fert.*, 54: 379.
 209. Bondioli, K.R. & Wright, G.W.Jr. (1980) *J. Anim. Sci.*, 51: 660.
 210. 花田(章) (1985) *家畜繁殖誌*, 31(5): 21p.
 211. Toyoda, Y. & Chang, M.C. (1974) *J. Reprod. Fert.*, 36: 9.
 212. Yanagimachi, R. (1969) *J. Exp. Zool.*, 170: 269.
 213. Yanagimachi, R. (1969) *J. Reprod. Fert.*, 18: 275.
 214. Hanada, A. & Chang, M.C. (1972) *Biol. Reprod.*, 6: 300.
 215. Hanada, A. & Chang, M.C. (1976) *J. Reprod. Fert.*, 46: 239.
 216. Yanagimachi, R. (1972) *J. Reprod. Fert.*, 28: 477.
 217. Fleming, A.D., Yanagimachi, R. & Yanagimachi, H. (1981) *J. Reprod. Fert.*, 63: 509.
 218. Lambert, H. (1981) *Gamete Res.*, 4: 525.
 219. Moor, H.D.H. (1981) *J. Androl.*, 4: 321.
 220. 丹羽(皓), 入谷(明) (1985) *家畜繁殖誌*, 31(5): 17p.
 221. Yanagimachi, R., Yanagimachi, H. & Rogers, B.J. (1976) *Biol. Reprod.*, 15:471.
 222. Samour, J., Moore, H.D. & Smith, C.A. (1986) *J. Exp. Zool.*, 239: 295.
 223. Kim, C.I., Niwa, K., Imai, H. & Iritani, A. (1980) *J. Exp. Zool.*, 213: 181.
 224. Lorton, S.F. & First, N.L. (1979) *Biol. Reprod.*, 21: 301.
 225. Imai, H. Niwa, K. & Iritani, A. (1979) *J. Reprod. Fert.*, 56: 489.
 226. Imai, H. Niwa, K. & Iritani, A. (1980) *Biol. Reprod.*, 23: 481.
 227. Hancock, J.L. (1952) *J. Exp. Biol.*, 29: 445.
 228. 大沼(秀) (1963) *畜試験報*, 3: 105.
 229. Saacke, R.G., Ammann, R.P. & Marshall, C.E., (1968) *J. Anim. Sci.*, 27:1391.
 230. Wells M.E. & Awa, O.A. (1970) *J. Dairy Sci.*, 53: 227.
 231. Bryan, J.H.D. & Akruk, S.R. (1977) *Stain Technol.*, 52: 47.
 232. Bedford, J.M. (1968) *Am. J. Anat.*, 123: 329.
 233. Saling, P.M. & Storey, B.T. (1979) *J. Cell Biol.*, 83: 544.
 234. Talbot, P. & Chacon, R.S. (1980) *Gamete Res.*, 3: 211.
 235. Brackett, B.G. & Oliphant, G. (1975) *Biol. Reprod.*, 12: 260.
 236. Hanada, A. & Nagase H. (1981) *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 27: 113.
 237. Talbot, P. & Chacon, R.S. (1981) *J. Exp. Zool.*, 215: 201.
 238. Talbot, P. & Chacon, R.S. (1981) *Am. J. Primatol.*, 1: 211.
 239. Talbot, P. & Dudenhausen, E. (1981) *Stain Technol.*, 56: 307.
 240. Pursel, V.G. & Jhonson, L.A. (1972) *J. Anim. Sci.*, 35(Abs.): 1123.
 241. 加藤(征), 井上(陽), 入谷(明), 西川(義) (1974) *凍結精液研報*, 44: 7.
 242. Yanagimachi, R. & Phillips, D.M. (1984) *Gamete Res.*, 9: 1.
 243. 永瀬(広), 花田(章), 富塚(常), 川倉(一) (1980) *畜試験法*, 37: 7.
 244. Haino, K. & Dan, J.C. (1961) *Embryologia*, 5: 376.
 245. Mclimans, W.F., Davis, E.V., Glover, F.L. & Rake, G.W. (1957) *J.Immunol.*, 79: 428.
 426. Ikadai, H. & Hoshi, M. (1981) *Dev. Groth Differ.*, 23: 81.
 247. Barros, C. & Austin. C.R. (1967) *J. Exp. Zool.*, 166: 317.
 248. Barros, C. (1968) *J. Exp. Zool.*, 166: 317.
 249. Mukherjee, A.B. & Leppes, J. (1972) *Can. J. Genet. Cytol.*, 14: 167.
 250. Bedford, J.M. (1969) *Adv. Biosci.*, 4: 35.

251. Iwamatsu, T. & Chang, M.C. (1969) *Nature*, 224: 919.
252. Gwatkin, R.B.L. & Andersen, O.F. (1969) *Nature*, 224: 1111.
253. Yanagimachi, R. (1970) *J. Exp. Zool.*, 170: 269.
254. Noske, I.G. (1972) *Experientia*, 28: 1348.
255. Rosado, A., Hicks, J.J., Reyes, A. & Blanco, I. (1974) *Fertil. Steril.*, 25: 821.
256. Kirton, K.T. & Hafs, H.D. (1965) *Science*, 150: 618.
257. Gwatkin, R.B.L., Andersen, O.F. & Hutchinson, C.F. (1972) *J. Reprod. Fert.*, 30: 389.
258. Gwatkin, R.B.L. (1977) *Fertilization Mechanisms in Man and Animals*. Plenum, New York.
259. Gwatkin, R.B.L., Andersen, O.F. & Williams, D.T. (1974) *J. Reprod. Fert.*, 41: 253.
260. Cross, P.C. & Brinster, R.L. (1970) *Biol. Reprod.*, 3: 298.
261. Miyamoto, H. & Chang, M.C. (1972) *J. Reprod. Fert.*, 30: 309.
262. Pavlok, A. & McLaren, A. (1972) *J. Reprod. Fert.*, 29: 91.
263. Hoppe, P.C. & Pitts, S. (1973) *Biol. Reprod.*, 8: 420.
264. Hoppe, P.C. & Whitten, W.K. (1974) *J. Reprod. Fert.*, 39: 433.
265. Yanagimachi, R. (1970) *Biol. Reprod.*, 3: 147.
266. Bavister, B.D. (1975) *J. Reprod. Fert.*, 43: 363.
267. Bavister, B.D., Yanagimachi, R. & Teichman, R.J. (1976) *Biol. Reprod.*, 14: 219.
268. Bavister, B.D. & Yanagimachi, R. (1977) *Biol. Reprod.*, 16: 228.
269. Seitz, H.M., Rocha, G., Brackett, B.G. & Mastroianni, L. (1970) *Fertil. Steril.*, 21: 325.
270. Suzuki, S. & Mastroianni, L.Jr. (1968) *Fertil. Steril.*, 19: 716.
271. Dandekar, P. & Fraser, L.R. (1976) *J. Reprod. Fert.*, 46: 7.
272. Lambert, R.D. & Hamner, C.E. (1975) *Fertil. Steril.*, 26: 660.
273. Dauzier, L. & Thibault, C. (1959) *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 248: 2655.
274. Kraemer, D.C. (1966) *Diss. Abstr.*, 27: 285B.
275. Harms, V.E. & Smidt, D. (1970) *Ber. Münch. Tierärztl. Wochenschr.*, 83: 269.
276. Meyer, J.N. & Smidt, D. (1973) *Ber. Münch. Tierärztl. Wochenschr.*, 86: 104.
277. 花田(章), 塩谷(康) (1981) *家畜繁殖誌*
278. Saling, P.M. & Bedford, J.M. (1981) *J. Reprod. Fert.*, 63: 119.
279. 豊田(裕), 横山(峯), 星(冬) (1971) *家畜繁殖誌*, 16: 147.
280. Yanagimachi, R. (1982) *In Vitro Fertilization and Embryo Transfer* (Hafez, E. S.E. & Semm, K. eds.), pp.65, MTP Press. New York.
281. Yanagimachi, R. (1978) *Biol. Reprod.*, 19: 949.
282. Murphy, S.J. & Yanagimachi, R. (1984) *Gamete Res.*, 10: 1.
283. Barros, C. (1974) *Physiology and Genetics of Reproduction*, Part B (Coutinho, E.M. & Fuchs, F. eds.), pp.3, Plenum Press, New York.
284. Brackett, B.G. (1970) *Fertil. Steril.*, 21: 169.
285. Mahi, C.A. & Yanagimachi, R. (1978) *Gamete Res.*, 1: 101.
286. Lee, C.N., & Ax, R.L. (1984) *J. Dairy Sci.*, 67: 2006.
287. Lee, C.N., Handrow, R.R., Lenz, R.W. & Ax, R.L. (1985) *Gamete Res.*, 12: 345.
288. Lee, C.N., Lenz, R.W. & Ax, R.L. (1983) *J. Anim. Sci.*, 57, Suppl. 1: 352.
289. Lenz, R.W., Ax, R.L., Grimek, H.J. & First, N.L. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 106: 1092.
290. Lenz, R.W., Ball, G.D., Lohse, J.K. & Ax, R.L. (1983) *Biol. Reprod.*, 28: 683.
291. Lui, C.W. & Meizel, S. (1977) *Differentiation*, 9: 59.
292. MacLeod, J. (1942) *Amer. J. Physiol.*, 138: 512.
293. Mastroianni, L.Jr. & Jones, R. (1965) *J. Reprod. Fert.*, 9: 99.
294. Mann, T. (1954) *Biochemistry of Semen*. Methuen Co., London.

295. Meizel, S. (1978) Development in Mammals, vol.3 (Jhonson, M.H. ed.), pp.1, North-Holland, Amsterdam.
296. Redenz, E. (1933) Biochem. Z., 257: 234.
297. Rowan, D. & Goode, L. (1967) J. Anim. Sci., 26: 1116.
298. Brackett, B.G., Mills, J.A., Oliphant, G., Seitz, H.M., Jeitles, G.G. & Mastroianni, L. (1972) Int. J. Fertil., 17: 86.
299. Fraser, L.R. (1985) J. Reprod. Fert., 74: 185.
300. Hamner, C.E. & Williams, W.L. (1965) Fertil. Steril., 16: 170.
301. Handrow, R.R., Lenz, R.W. & Ax, R.L. (1982) Biochem. Biophys. Res. Comm., 107: 1326.
302. 池上(順), 加藤(征), 入谷(明), 西川(義) (1978) 日畜会報, 49: 665.
303. Iritani, A., Gomes, W.R. & VanDemark, N.L. (1969) Biol. Reprod., 1: 72.
304. Iritani, A., Kasai, M. & Miyake, M. (1977) Mem. Coll. Agr. Kyoto Univ., No.109: 15.
305. Iritani, A. & Nishikawa, Y. (1970) Jpn. J. Zootech. Sci., 41, Suppl. 3: 80.
306. Iritani, A., Nishikawa, Y., Gomes, W.R. & VanDemark, N.L. (1971) J. Anim. Sci., 33: 829.
307. Iritani, A., Sato, E. & Nishikawa, Y. (1974) J. Anim. Sci., 39: 582.
308. Iwamatsu, T. & Chang, M.C. (1972) J. Exp. Zool., 182: 211.
309. Kane, M.T. (1979) Biol. Reprod., 20: 323.
310. Kane, M.T. & Headdon, D.R. (1980) J. Reprod. Fert., 60: 469.
311. Lardy, H.A. & Phillips, P.H. (1941) Am. J. Physiol., 133: 602.
312. Bavister, B.D. & Yanagimachi, R. (1977) Biol. Reprod., 16: 228.
313. 包(旭), & 花田(章) (1985) 家畜繁殖誌, 31: 115.
314. Dravland, E. & Meizel, S. (1981) Gamete Res., 4: 515.
315. Fraser, L.R. & Quinn, P.J. (1981) J. Reprod. Fert., 61: 25.
316. Freund, M., Mixner, J.P. & Mather, R.E. (1959) J. Dairy Sci., 42: 79.
317. 花田(章), 服部(篤), 塩谷(康) (1985) 家畜繁殖誌, 31(5): 71p.
318. Hoppe, P.C. (1976) Biol. Reprod., 15: 39.
319. 星(和), 斉藤(晃), 鈴木(雅), 林(恵), 柳町(隆) (1982) 日本不妊学雑誌, 27: 439.
320. Hyne, R.V., & Edwards, K.P. (1985) J. Reprod. Fert., 73: 59.
321. Mujica, A., & Valdes Ruiz, M.A. (1983) Gamete Res., 8: 335.
322. Murphy, S.J., Roldan, E.R.S. & Yanagimachi, R. (1986) Gamete Res., 14: 1.
323. Rogers, B.J., Chang, L. & Yanagimachi, R. (1979) J. Exp. Zool., 207: 107.
324. Rogers, B.J. & Yanagimachi, R. (1975) Biol. Reprod., 13: 568.
325. Santos-Sacchi, J. & Gordon, M. (1982) J. Androl., 3: 108.
326. Steel, R.G.D. & Torrie, J.H. (1960) Principles and Procedures of Statistics. MacGraw-Hill Book Co., New York.
327. Russell, L.R.N., Peterson, R.N. & Freund, M. (1980) Anat Rec., 198: 449.
328. Shams-Borhan, G. & Harrison, R.A.P. (1981) Gamete Res., 4: 407.
329. Byrd, W. (1981) J. Exp. Zool., 215: 35.
330. Smith, M., Peterson, R.N. & Russell, L.D. (1983) J. Exp. Zool., 225: 157.
331. 高橋(芳), 花田(章) (1984) 家畜繁殖誌, 30: 30.
332. Watson, P.M. & Plummer, J.M. (1986) J. Exp. Zool., 238: 113.
333. Brackett, B.G., Cofone, M.A., Boice, M.L. & Bousquet, D. (1982) Gamete Res., 5: 217.
334. Bousquet, D. & Brackett, B.G. (1982) Theriogenology, 17: 199.
335. Lee, C.N., Clayton, M.K., Bushmeyer, S.M., First, N.L. & Ax, R.L. (1986) J. Anim. Sci., 63: 861.
336. Courtens, J.L., Nunes, J.F. & Corteel, J.M. (1984) Gamete Res., 9: 287.
337. Slavik, T. (1987) J. Reprod. Fert., 79: 99.

338. Graham, J.K., Foote, R.H. & Parrish, J.J. (1986) *Biol. Reprod.*, 35: 413.
339. Graham, J.K. & Foote, R.H. (1987) *Gamete Res.*, 16: 133.
340. Graham, J.K. & Foote, R.H. (1987) *Gamete Res.*, 16: 147.
341. Graham, J.K., Foote, R.H. & Hough, S.R. (1987) *Biol Reprod.*, 37: 181.
342. Papahadjopoulos, D. & Portis, (1978) *Anal. of the N.Y. Academy of Science*, 308:50.
343. Papahadjopoulos, D. (1978) *Cell Surface Reviews*, vol.5 (Poste, G. & Nicolson, G.L. eds.), pp.765, Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
344. Queen, P.J., White, I.J. & Wirrick, B.R. (1965) *J. Reprod Fert.*, 10: 379.
345. Breitbert, H. & Rubinstein, S. (1983) *Biochem. Biophys. Act.*, 732: 464.
346. Breitbart, H., Darshan, R. & Rubinstein, S. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 122: 479.
347. Ashraf, M., Perterrson, R.N. & Russell, L.D. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 107: 1273.
348. Berruitti, G., Franchi, E. & Camatini, M. (1986) *J. Exp. Zool.*, 237: 257.
349. Dan, J.C., Ohori, Y. & Kushida, H. (1964) *J. Ultrastruct. Res.*, 11: 508.
350. Dan, J.C., Hashimoto, S. & Kubo, M. (1975) *Wenner-Gren Cent. Int. Symp. Ser.* 23: 39.
351. Decker, G.L., Joseph, D.B. & Lennarz, D.B. (1976) *Dev. Biol.*, 53: 115.
352. Talbot, P., Summers, R.G., Hylander, B.L., Keough, E.M. & Franklin, L.E. (1976) *J. Exp. Zool.*, 198: 383.
353. Collins, F. & Epel, D. (1977) *Exp. Cell Res.*, 106: 211.
354. Summers, R.G., Talbot, P., Keough, E.M., Hylander, B.L. & Franklin, L.E. (1976) *J. Exp. Zool.*, 196: 381.
355. Rogers, B.J. (1978) *Gamete Res.*, 1: 165.
356. Yanagimachi, R. (1982) *Gamete Res.*, 5: 323.
357. Fraser, L.R. (1987) *J. Reprod. Fert.*, 81: 77.
358. Pikò, L. & Tyler, A. (1964) *Proc. Vth Int. Congr. Anim. Reprod. A. I. Trnto* 2: 372.
359. Stefanini, M., Oura, C. & Zamboni, L. (1969) *J. Submicrosc. Cytol.* 1: 1.
360. Yanagimachi, R. & Noda, Y.D. (1970) *Am. J. Anat.* 128: 429.
361. 今井(裕) (1983) 京大学位論文.
362. Fraser, L.R. (1982) *J. Anidrol.*, 3: 412.
363. Iwamatu, T. & Chang, M.C. (1971) *J. Reprod. Fert.*, 26: 197.
364. Miyamoto, H. & Ishibashi, T. (1975) *J. Reprod. Fert.*, 45: 523.
365. Bhattacharyya, A., Roldan, E.R.S. & Yanagimachi, R (1986) *Gamete Res.*, 15: 285.
366. Fraser, L.R. (1983) *J. Reprod. Fert.*, 69: 539.
367. Green, D.P.L. (1978) *J. Cell Sci.*, 32: 137.
368. Hyne, R.V., Higginson, R.E., Kohlman, D. & Lopata, A. (1984) *J. Reprod. Fert.*, 70: 83.
369. Mrsny, R.J., & Meizel, S. (1981) *J. Cell Biol.*, 91: 77.
370. Rogers, B.J., Ueno, M. & Yanagimachi, R. (1981) *Biol. Reprod.*, 25: 639.
371. Chambers, R. (1930) *Biol. Bull. (Woods Hole, Mass)* 58: 344.
372. Colwin, L.H. & Colwin, A.L. (1967) *Fertilization (Metz, C.B. & Monroy, A. eds.)*, vol.1: pp.295, Academic Press, New York.
373. Summers, R.G. & Hylander, B.L. (1976) *Exp. Cell. Res.*, 100: 190.
374. Bryant, J.H.D. (1974) *Biol. Reprod.*, 10: 414.
375. Yanagimachi, R. & Mahi, C.A. (1976) *J. Reprod. Fert.*, 46: 49.
376. Yanagimachi, R. & Noda, Y.D. (1970) *J. Ultrastruct. Res.*, 31: 465.
377. Overstreet, J.W. & Cooper, G.W. (1979) *J. Exp. Zool.*, 209: 97.
378. Thompson, R.S., Smith, D.M. & Zamboli, L. (1974) *Fertil. Steril.*, 25: 222.

379. Saling, P.M., Sowinski, J. & Storey, B. (1979) *J. Exp. Zool.*, 209: 229.
380. Pincus, G. & Enzmann, A.E.V. (1935) *J. Exp. Med.*, 62: 665.
381. Chang, M.C. (1955) *J. Exp. Zool.*, 48: 379.
382. Edwards, R.G. (1965) *Nature*, 208: 349.
383. MacGaughey, R.W. & Polge, C. (1971) *J. Exp. Zool.*, 176: 383.
384. Motlik, J. (1972) *Folia Biol. Praha.*, 18: 345.
385. Tsafiriri, A. & Channing, C.P. (1975) *J. Reprod. Fert.*, 43: 149.
386. Motlik, J. & Fulka, A.J. (1976) *J. Exp. Zool.*, 198:155.
387. MacGaughey, R.W. & VanBlerkom, J. (1977) *Dev. Biol.*, 56: 241.
388. 佐藤(英), 入谷(明), 西川(義) (1977) *家畜繁殖誌*, 23: 12.
389. Sato, E. & Ishibasgi, T. (1977) *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 48: 22.
390. 佐藤(英), 石橋(武) (1977) *日畜会報*, 48: 107.
391. 佐藤(英), 入谷(明), 西川(義) (1978) *日畜会報*, 49: 400.
392. Cross, P.C. & Brinster, R.L. (1970) *Biol. Reprod.*, 3: 298.
393. Mukherjee, A.B. (1972) *Nature*, 237: 397.
394. Seitz, H.M., Brackett, B.G. & Mastroianni, L. (1970) *Biol. Reprod.*, 2:262.
395. Brackett, B.G., Mills, J.A. & Jeites, G.G. (1972) *Fertil. Steril.*,23:898.
396. Steptoe, P.C. & Edwards, R.G. (1976) *Lancet.*, 1: 880.
397. Srivastava, P.N., Farooqui, A.A. & Gould, K.G. (1981) *Biol. Reprod.*, 25:363
398. Srivastava, P.N., Brewer, J.M. & White, R.A. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 108: 1120.
399. Srivastava, P.N. & Ninjour, V. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,109:63.
400. Stambaugh, R., Brackett, B.G. & Mastroianni, L. (1969) *Biol. Reprod.*,1:223.
401. Zaneveld, L.J.D., Robertson, R.T. & Williams, W.L. (1970) *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.*, 11: 345.
402. Quian, Z., Tsai, Y., Steinberg, A., Lu, M. & Greenfield, A.R.L. (1985) *Biol. Reprod.*, 33: 1189.
403. Zaneveld, L.J.D., Robertson, R.T., Kessler, M. & Williams, W.L. (1971) *J. Reprod. Fert.*, 25: 387.
404. Zaneveld, L.J.D., Polakoski, K.L., Robertson, R.T. & Williams, W.L. (1975) *Proteinase and Biological Control* (Fritz, H. & Tschesche, H. eds.), pp.236. de Gruyter, New York.
405. Zaneveld, L.J.D. (1976) *Human Semen and Fertility Regulation in Men*(Hafez, E.S.E. ed.), pp.570, Mosby, St. Louis.
406. Bhattacharyya, A.K., Goodpasteur, J.C. & Zaneveld, L.J.D. (1979) *Am. J. Physiol.*, 237: E40.
407. Joyce, C., Freund, M. & Peterson, R.N. (1979) *Contraception*, 19: 95.
408. Bedford, J.M. (1972) *Am. J. Anat.*, 133: 213.
409. Bedford, J.M. (1974) *Physiology and Genetics of Reproduction*,Part B(Coutinho, E.M. & Fuchs, F. eds.), pp.55, Plenum Press, New York.
410. Brown, C.R. & Hartree, E.F. (1974) *J. Reprod. Fert.*, 36:195.
411. Brown, C.R., Andani, Z. & Hartree, E.F. (1975) *Biochem. J.*, 149: 133.
412. Koehler, J.K. (1975) *Biology of the Male Gamete* (Duckett, J. G. & Racey, P. A. eds.), pp.337, Linnean Society of London/Academic Press. London.
413. Morton, D.B. (1976) *Lysosomes in Biology and Pathology*, vol.5 (Dingle, J.D. & Dean, R.T. eds.), pp.203, Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
414. Morton, D.B. (1977) *Immunobiology of Gametes* (Edidin, M. & Johnson, M.H.eds.), pp.115, Cambridge University Press, London.
415. Barros, C., Berrios, M. & Herrera, E. (1973) *J. Reprod. Fert.*, 34: 547.
416. Bedford, J.M. (1967) *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 2: 35.

417. Szollosi, D. & Hunter, R.H.F. (1973) *J. Anat.*, 116: 181.
418. McMaster, R., Yanagimachi, R. & Lopata, A. (1978) *Biol. Reprod.*, 19: 212.
419. Yanagimachi, R., Lopata, A., Odem, C.B., Bronson, R.A., Mahi, C.A. & Nicolson, G.L. (1979) *Fertil. Steril.*, 31: 562.
420. 今井(裕), 金(正), 丹羽(皓), 入谷(明) (1983) *家畜繁殖誌*, 29: 94.
421. Soupart, P. and Strong P.A. (1974) *Fertil. Steril.*, 25: 11.
422. Szollosi, D. and Hunter, R.H.F. (1978) *J. Anat.*, 127: 33.
423. Aonuma, S., Okabe, M., Kawaguchi, M. & Kishi, Y. (1980) *Chem. Pharm. Bull.*, 28: 1497.
424. Austin, C.R. (1974) *Proc. Roy. Soc. Med.*, 67: 925.
425. Barros, C. & Berrios, M. (1977) *J. Exp. Zool.*, 201: 65.
426. Ben-Nun, I., Lancet, M. & Danon, D. (1980) *Int. J. Ferti.*, 25: 127.
427. Cooper, G.W., Overstreet, J.W. & Katz, D.F. (1979) *Gamete Res.*, 2: 35.
428. Cummins, J.M. (1982) *Gamete Res.*, 6: 53.
429. Fleming, A.D. & Yanagimachi, R. (1982) *J. Exp. Zool.*, 220: 109.
430. Fraser, L.E. (1977) *J. Exp. Zool.*, 202: 439.
431. Kinsey, W.H., SeGall, G.K. & Lennarz, W.J. (1979) *Dev. Biol.*, 71: 49.
432. Mahi, C.A. & Yanagimachi, R. (1976) *J. Exp. Zool.*, 196: 189.
433. 中野(眞) (1983) *日本不妊学会雑誌*, 28(3): 363.
434. Overstreet, J.W. & Cooper, G.W. (1979) *J. Reprod. Fert.*, 55: 53.
435. Overstreet, J.W., Katz, D.F. & Johnson, L.L. (1980) *Biol. Reprod.*, 22: 1083.
436. Phillips, D.W. (1972) *J. Cell Biol.*, 53: 561.
437. Seitz, H.M.Jr., Rocha, G., Brackett, B.G. & Mastroianni, L.Jr. (1970) *Fertil. Steril.*, 21: 325.
438. Vacquire, V.D. (1979) *Dev. Growth Diff.*, 21: 61.
439. Yanagimachi, R. (1970) *J. Reprod. Fert.*, 23: 193.
440. Yanagimachi, R. (1972) *Anat. Rec.*, 174: 9.
441. Yanagimachi, R. (1975) *Biol. Reprod.*, 13: 519.
442. 花田(章) (1985) *家畜繁殖誌*, 31(5): 56p.
443. 豊田(裕) (1985) *家畜繁殖誌*, 31(5): 40p.
444. Butcher, R.W. & Sutherland, E.W. (1962) *J. Biol. Chem.*, 237: 1244.
445. 花田(章) (1981) *家畜繁殖誌*, 27(3,4): 123.
446. Sutherland, E.W. & Rall, T.W. (1958) *J. Biol. Chem.*, 232: 1077.
447. 榊田(博) (1987) *畜産の研究*, 42: 103.
448. Barlow, P. & Vosa, C.G. (1970) *Nature*, 226: 961.
449. Bhattacharya, B.C. (1976) *Proc. 8th Int. Cong. Anim. Reprod. Art. Insem.*, 4: 876.
450. 尾川(昭), 山川(宏), 山井(淳), 西田(司), 竹島(勉), 松本(徹), 田内(正), 長嶋(比), 加納(康) (1987) *家畜繁殖誌*, 33: 140.
451. Calvin, H.I. & Bedford, J.M. (1971) *J. Reprod. Fert.*, 13: 65.
452. Yanagimachi, R. (1984) *Gamete Res.*, 10: 187.
453. Ueda, K. & Yanagimachi, R. (1987) *Gamete Res.*, 17: 221.
454. Tateno, H. & Mikamo, K. (1987) *J. Reprod. Fert.*, 81: 119.
455. Creighton, P. & Houghton, J.A. (1987) *J. Reprod. Fert.*, 80: 619.
456. An International System for human Cytogenetics Nomenclature (ISCN) (1978) *Birth defects: Original article series*, vol. XIV, No. 8; also in *Cytogenet. Cell Genet.*, 21: 309.
457. Ford, C.E., Pollock, D.L. & Gustavsson, I. (1980) *Hereditas*, 92: 145.
458. Sumner, A.T. (1972) *Exp. Cell. Res.*, 75: 304.
459. Evans, H.J., Buckland, R.A. & Sumner, A.T. (1974) *Cytogenet. Cell Genet.*, 13: 246.
460. Rudak, E., Jacob, P.A. & Yanagimachi, R. (1978) *Nature*, 274: 911.

461. 美甘(和) (1981) 哺乳動物の初期発生 (妹尾左知丸他編), 理工学社, pp.307.
462. 美甘(和), 上口(勇) (1981) リプロダクション実験マニュアル (飯塚理八他編), 講談社, pp.82.
463. Orsini, M.W. & Pansky, B. (1952) *Science*, 15: 88.
464. Kamiguchi, Y. & Mikamo, K. (1986) *Am. J. Hum. Genet.*, 38: 724.
465. Austin, C.R. (1961) *The mammalian eggs* (Thomas, C. C. eds.), Springfield.
466. 柳町(隆), 及川(胤) (1976) 代謝, 16(4月臨時増刊号, 性I): 689.
467. 加藤(征), 三宅(昇), 前田(統), 菊田(淳) (1986) 人工授精研誌, 8(3): 1.
468. Pursel, V.G. & Jhonson, L.A. (1975) *J. Anim. Sci.*, 40: 99.
469. Phillips, H.A. (1939) *J. Biol. Chem.*, 130: 415.
470. Phillips, H.A. & Lardy, H.A. (1940) *J. Dairy Sci.*, 23: 399.
471. Tosic, J. & Walton, A. (1950) *Biochem. J.*, 47: 199.
472. Foote, R.H. (1967) *J. Dairy. Sci.*, 50: 1468.
473. Jhonson, C.E., Reynolds, R.C., Norman, C., Kidder, H.E. & Horvath, D.J. (1968) *A. I. Digest*, 16(6): 8.
474. Igboeli, G. (1970) *J. Anim. Sci.*, 30: 569.
475. Dede, T. & Steinbach, J. (1976) *Proc. 8th Int. Cong. Anim. Reprod. A. I. [Krakow]* 1: 65.
476. 加藤(征), 池上(順), 斉田(二) (1979) 家畜繁殖誌, 25(3): 120.
477. 加藤(征) (1978) 京大学位論文.
478. 原山(洋), 加藤(征), 南條(巖), 菊田(淳), 得丸(哲) (1988) 家畜繁殖技術研誌, 10: 10.
479. 中西(徑), 藤井(清), 田中(幹) (1985) 京都府畜産試験場研究成績, 25: 177.
480. 吉田(重) 瀬崎(勝), 田中(哲) (1981) 京都府大学術報告, 33: 43.
481. 和出(泰), 副島(昭), 枅田(博) (1977) 家畜繁殖誌, 23: 99.
482. 和出(泰), 副島(昭), 枅田(博), 菊地(仁), 間庭(英), 岡崎(好) (1982) 人工授精研誌, 4(1): 9.
483. 枅田(博) (1987) 畜産の研究, 41: 1014.
484. Ogawa, S., Yamakawa, H., Yamanoi, J., Nishida, S., Kano, Y., Takeshima, T., Tauchi, K. & Nagashima, H. (1988) *Theriogenology*, 29: 1083.
485. Jhonson, L.A., Flook, J.P., Look, M.V. & Pinkel, D. (1987) *Gamete Res.*, 16: 1.
486. 立野(裕), 上口(勇), 島田(昌), 美甘(和) (1986) 遺伝, 40(10): 73.
487. 立野(裕), 上口(勇), 島田(昌), 美甘(和) (1986) 遺伝, 40(11): 48.
488. 上口(勇), 美甘(和) (1986) 細胞, 18: 476.
489. 上口(勇), 美甘(和) (1986) 細胞, 18: 481.
490. 戸津川(清), 萱場(猛), 大澤(有), 上野(宏), 須藤(信), 富樫(稔) (1988) 日豚会誌, 25: 147.
491. Kaneko, S., Oshio, S., Kobayashi, T., Iizuka, R. & Mohri, H. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 124: 950.
492. Wramsby, H. & Yanagimachi, R. (1986) *Gamete Res.*, 15: 295.
493. Sugawara, S., Totsukawa, K. & Masaki, J. (1980) *Tohoku J. Agri. Res.*, 31(1): 21.
494. Horiuchi, T., Takahashi, J., Sugawara, S. & Masaki, J. (1981) *Tohoku J. Agri. Res.*, 32(3): 110.
495. Motomura, M. & Toyoda, Y. (1980) *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 51: 595.
496. Shalgi, R. & Phillips, D.M. (1980) *Biol. Reprod.*, 23: 433.
497. Cummins, J.M. & Yanagimachi, R. (1986) *Gamete Res.*, 15: 187.
498. Yanagimachi, R. & Phillips, D.M. (1984) *Gamete Res.*, 9: 1.
499. Peterson, R.N., Russel, L., Bundman, D. & Freund, M. (1980) *Science*, 207: 73.
500. 辻井(弘), 菅原(七), 竹内(三) (1971) 家畜繁殖誌, 16: 140.
501. 長谷川(喜), 菅原(七), 竹内(三) (1973) 家畜繁殖誌, 19: 26.
502. 長谷川(喜), 菅原(七), 竹内(三) (1973) 家畜繁殖誌, 19: 73.
503. 長谷川(喜), 菅原(七), 竹内(三) (1977) 家畜繁殖誌, 22: 139.

504. 長谷川(喜), 菅原(七), 竹内(三) (1977) 家畜繁殖誌, 22: 145.
505. Perkins, J.L., Goode, L., Wilder, W.A.Jr. & Henson, D.B. (1965) *J. Anim.Sci.*, 24: 383.
506. 佐藤(晶) (1959) 遺伝学雑誌, 34: 226.
507. 佐藤(晶) (1962) 遺伝学雑誌, 37: 253.
508. Fowler, R.E. & Edwards, R.G. (1957) *J. Endocrin.*, 15: 374.
509. Edwards, R.G. & Gates, A.H. (1959) *J. Endocrin.*, 18: 292.
510. Edwards, R.G. & Fowler, R.E. (1960) *J. Endocrin.*, 21: 147.
511. Edwards, R.G. & Wilson, E.D. (1963) *J. Endocrin.*, 26: 389.
512. Greenwald, G.S. (1962) *Endocrinology*, 71: 378.
513. 橋詰(良), 伊藤(雅), 石島(芳), 平林(忠) (1974) ホルモンと臨床, 22: 1186.
514. Gengenbach, D.R., Butendieck, N., Riek, P.M., Scipioni, R.L., Oltenacu, E.B. & Foote, R.H. (1978) *J. Anim. Sci.*, 46: 1293.
515. Pitar, A.J., Maxwell, W.M.C. & Salamon, S. (1984) *J. Reprod. Fert.*, 72: 559.
516. Rao, V.H. & Bhattacharyya, N.K. (1980) *J. Reprod. Fert.*, 58: 67.
517. Cameron, A.W.N., Battye, K.M. & Trounson, A.O. (1988) *J. Reprod. Fert.*, 83: 747.
518. Ohgoda, O., Niwa, K., Yuhara, M., Takahashi, S. & Kanoya, K. (1988) *Theriogenology*, 29: 1375.
519. Iritani, A., Kasai, M., Niwa, K. & Song, H.B. (1984) *J. Reprod. Fert.*, 70: 487.
520. 福島(護), 富永(敬), 太田(垣), 寺田(邦), 金子(史) (1985) 兵庫畜試研報, 22: 47.
521. 福島(護), 富永(敬), 太田(垣), 寺田(邦), 金子(史) (1986) 兵庫畜試研報, 23: 60.
522. Pavlok, A. & Flèche, J.E. (1985) *J. Reprod. Fert.*, 74: 597.
523. Imai, H., Niwa, K. & Iritani, A. (1977) *J. Reprod. Fert.*, 51: 495.
524. 大沼(秀) (1969) 家畜繁殖誌, 15(2): 39.
525. Crozet, N., Huneau, D., Desmedt, V., Thèron, M.-C., Szöllösi, D., Torrès, S. & Sèvellec, C. (1987) *Gamemet Res.*, 16: 159.
526. Dukelow, R.W., Chan, P.J., Hutz, R.J., Demayo, F.J., Dooley, V.D., Rawlins, R.G. & Ridha, M.T. (1983) *J. Exp. Zool.*, 228: 215.
527. Brackett, B.G., Bousquet, D., Boice, M.L., Donawick, W., Evans, J.F. & Dressel, M.A. (1982) *Biol. Reprod.*, 27: 147.
528. Bondioli, K.R. & Wright, R.W.Jr. (1983) *J. Anim. Sci.*, 57: 1001.
529. Ball, G.D., Leibfried, M.L., Ax, R.L. & First, N.L. (1984) *J. Dair Sci.*, 67: 2775.
530. Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L., Leibfried-Rutledge, M.L., Cristen, E.S., Eyestone, W.H. & First, N.L. (1986) *Theriogenology*, 25: 591.
531. Hunt, C.W., Paterson, J.A., Fischer, J.R. & Williams, J.E. (1983) *J. Anim. Sci.*, 57: 1013.
532. 丹羽(皓), 三宅(正), 入谷(明), 西川(義) (1976) ホルモンと臨床, 24: 663.
533. Wright, R.W.Jr. & Bondioli, K.R. (1981) *J. Anim. Sci.*, 53: 702.
534. Talbot, P. & Franklin, L.E. (1974) *J. Exp. Zool.*, 189: 321.
535. Talbot, P. (1984) *J. Exp. Zool.*, 229: 309.
536. Srivastava, P.N., Munnell, J.F., Yang, C.H. & Foley, C.W. (1974) *J. Reprod. Fert.*, 36: 36.
537. Yang, C.H. & Srivastava, P.N. (1974) *J. Reprod. Fert.*, 37: 17.
538. Wincek, T.J., Parrish, R.F. & Polakoski, K.L. (1979) *Science*, 203: 553.
539. Ohzu, E. & Yanagimachi, R. (1982) *J. Exp. Zool.*, 224: 259.
540. Mrsny, R.J., Maxman, L. & Meizel, S. (1979) *J. Exp. Zool.*, 210: 123.
541. Sato, K. (1984) *Jap. J. Fert. Ster.*, 29(2): 179.
542. Oliphant, G. & Brackett, B.G. (1973) *Fertil. Steril.*, 24: 948.
543. Meizel, S. & Turner, K. (1986) *J. Exp. Zool.*, 237: 137.
544. Garner, D.L., Reamer, S.A., Johnson, L.A. & Lessley, B.A. (1977) *J. Exp. Zool.*, 201: 309.

545. Hirao, Y. & Yanagimachi, R. (1978) *Gamete Res.*, 1: 3.
546. Roger, B.J., Cash, M.K.M. & Vaughn, W.K. (1987) *Gamete Res.*, 16: 97.
547. Barros, C., Fujimoto, M. & Yanagimachi, R. (1973) *J. Reprod. Fert.*, 35: 89.
548. Talbot, P., Summers, R.G., Hylander, B.L., Keough, E.M. & Franklin, L.E. (1976) *J. Exp. Zool.*, 198: 383.
549. Hyne, R.V. (1984) *Biol. Reprod.*, 31: 312.
550. Reyes, A., Goicoechea, B. & Rosado, A. (1978) *Fertil. Steril.*, 29: 451.
551. Tsunoda, Y. & Chang, M.C. (1974) *J. Exp. Zool.*, 193: 79.
552. Davis, B.K., Hunt, D.M. & Chang, M.C. (1974) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 147: 479.
553. Binor, Z., Rao, R., van de Ven, H. & Scommegna, A. (1982) *Fertil. Steril.*, 38: 222.
554. Roblero, L., Guadarrama, A., Ortiz, M.E., Fernández, E. & Zegers-Hochschild, F. (1988) *Fertil. Steril.*, 49: 676.
555. 今井(裕), 丹羽(皓), 入谷(明) 家畜繁殖誌, 29(2): 108.
556. Lee, M.A. & Storey, B.T. (1986) *Biol. Reprod.*, 34: 349.
557. Hyne, R.V. & Garbers, D.L. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76: 5699.
558. Roger, B.J., Campen, H.V., Ueno, M., Lambert, H., Bronson, R. & Hale, R. (1979) *Fertil. Steril.*, 32: 664.
559. 星(和), 斉藤(晃), 鈴木(雅), 柳町(隆), 林(恵) (1982) 日本不妊学会雑誌, 27: 306.
560. Binor, Z., Sokoloski, J.E. & Wolf, D.P. (1982) *J. Exp. Zool.*, 222: 187.
561. Martin, R.H. & Taylor, P.J. (1982) *British J. Obstet. Gynaecol.* 89: 951.
562. Franklin, G., Peterson, R.N. & Freund, M. (1973) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 144: 420.
563. Schoff, P. K. & Lardy, H. A. (1987) *Biol. Reprod.*, 37: 1037.
564. Wolf, D.P., Hamada, M. & Inoue, M. (1977) *J. Exp. Zool.*, 201: 29.
565. Katz, D.F., Yanagimachi, R. & Dresden, R.D. (1978) *J. Reprod. Fert.*, 52: 167.
566. Fraser, L.N. (1983) *J. Reprod. Fert.*, 69: 419.
567. Shioya, Y., Kuwayama, M., Fukushima, M., Iwasaki, S. & Hanada, A. (1988) *Theriogenology*, 30: 489.
568. 池上(順), 加藤(征), 入谷(明), 西川(義) (1979) 日畜会報, 50: 716.
569. 池上(順), 加藤(征), 入谷(明), 西川(義) (1979) 日畜会報, 50: 768.
570. Quinn, P., Barros, C. & Wittingham, D.G. (1982) *J. Reprod. Fert.*, 66: 161.
571. 瑞穂(当), 丹羽(太), 副島(昭) (1960) 農技研報G(畜産), 19: 1.
572. 瑞穂(当), 丹羽(太), 副島(昭) (1963) 家畜繁殖誌, 9: 63.
573. Talansky, B.E., Barg, P.E. & Gordon, J.W. (1987) *J. Reprod. Fert.*, 79: 447.
574. Leibfried-Rutledge, M.L., Critser, E.S. & First, N.L. (1986) *Biol. Reprod.*, 35: 850.
575. Yanagimachi, R. & Chang, M.C. (1964) *J. Exp. Zool.*, 156: 361.
576. Kato, S., Yasui, T. & Kanda, S. (1983) *Jpn. J. Anim. Sci.*, 29: 209.
577. Kato, S., Yasui, T. & Kanda, S. (1983) *Jpn. J. Anim. Sci.*, 29: 214.
578. Kato, S., Yasui, T. & Kanda, S. (1983) *Jpn. J. Anim. Sci.*, 29: 217.
579. 加藤(征), 安井(司), 南条(巖), 荏田(淳) (1984) 人工授精研誌, 6: 15.
580. 加藤(征), 安井(司), 荏田(淳) (1987) 神戸大学自然科学研究科紀要, 5B: 35.
581. 加藤(征) (1985) 家畜繁殖誌, 31: 105.
582. 加藤(征) (1985) 日畜会報, 56: 843.
583. 中西(徑), 藤井(清), 加藤(征), 吉田(重) (1986) 人工授精研誌, 8: 56.
584. Fraser, L.E. (1979) *J. Reprod. Fert.*, 57: 377.
585. 山田(武) (1985) 細胞, 17: 240.
586. Overstreet, J.W., Yanagimachi, R., Katz, D.F., Hayashi, K. & Hanson, F.W. (1980) *Fertil. Steril.*, 33: 534.
587. Fayer-Hosken, R.A. & Brackett, B.G. (1987) *Gamete Res.*, 17: 191.
588. Boatman, D.E., Andrews, J.C. & Bavister, B.D. (1988) *Gamete Res.*, 19: 19.