

鶏凍結保存精液からの限外濾過による グリセロール除去が精子に及ぼす影響

西尾祐介・小島雄次・小野晴美

鶏精液の凍結保存に耐凍剤として用いるグリセロールを融解精液から除去する方法として限外濾過法を応用した場合のグリセロール除去後の受精率と、限外濾過が精子の形態と運動性に及ぼす影響を調査した。

6.7%のグリセロールを含むLake液を限外濾過した結果、2時間以上濾過を行っても濃度2.2%以下にはグリセロールを除去できなかった。6.7%のグリセロールを含む新鮮精液を、濾過開始前に予備希釈によってグリセロール濃度を3.3%に下げることにより、約2時間の濾過でグリセロールは受精可能な0.5%まで除去された。グリセロール除去後の受精率は79.7%と高く、精子性状の変化も少なかった。次に6.7%のグリセロールを含む凍結精液を融解し、グリセロール濃度を3.3%まで予備希釈した後限外濾過した結果、受精率は段階希釈法によってグリセロールを除去した場合の30～50%に比較して12～16%と低かった。また濾過後の融解精子の大部分が破壊されている様子が観察された。この結果から限外濾過法によるグリセロール除去は融解精子に与える物理的ダメージが段階希釈法より強く、精子の破壊と受精率の低下を招くことが示された。これを改善するためには限外濾過中に起こる浸透圧衝撃及び加圧、攪拌によるストレスの低減が必要である。

[キーワード：鶏、凍結保存精液、グリセロール除去、限外濾過、受精率]

Effects of Removal of Glycerol with Ultrafiltration from Cryopreserved Fowl Semen on Spermatozoa and Fertility. NISHIO Yusuke, Yuji KOJIMA, and Harumi ONO (Fukuoka Agric. Res. Cent., Chikushino, Fukuoka 818, Japan) *Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent.* 14: 194-198 (1995)

Ultrafiltration was applied to deglycerolized process from cryopreserved fowl semen, and appearance and fertility of ultrafiltered sperms were examined. Lake solution mixed with 6.7% glycerol as a dummy of frozen-thawed semen was ultrafiltered. But after 2 hours ultrafiltration, glycerol was not removed less than 2.2%. Fresh semen contains 6.7% glycerol was diluted 2 fold and concentration of glycerol was reduced to 3.3% prior to ultrafiltration. After 2 hours ultrafiltration, most of the glycerol content was removed with a remaining of 0.5%, fertilizable level. Fertility of ultrafiltered semen was 79.7% and appearance of sperms was normal. Frozen semen contains 6.7% glycerol was thawed and diluted 2 fold. Frozen-thawed semen contains 3.3% glycerol was ultrafiltered and fertilized. As control, half of thawed semen was deglycerolized with gradational dilution and centrifuge. After ultrafiltration, fertility of frozen-thawed semen was 12 ~ 16%, lower than control; 30 ~ 50%. The majority of ultrafiltered sperms were destroyed. It seemed that ultrafiltration caused a physical damage to the frozen-thawed spermatozoa. It is necessary to reduce osmotic shock and physical stress by pressure and stirring during ultrafiltration, to reduce damages on sperms and to improve fertility.

[Key words : Fowl, Cryopreserved semen, Removal of glycerol, Ultrafiltration, Fertility]

結 言

鶏精液の凍結保存技術においては、融解後の受精率が不安定で、平均的に見て実用レベルに届かないこと、また凍結保存から人工授精までの操作が牛精液に比べ複雑であることが実用化のための問題点として残されている。

受精率については過去4～5年の間に大幅な向上が見られ、人工授精後2日目～8日目の1週間の受精率において70～90%が得られるようになった^{6,7)}。既報⁵⁾においても、凍結過程の温度降下速度を5℃/分に設定することにより、新鮮精液に比較して反復毎の変動は大きい⁷⁾が72.5%の受精率が得られ、実用的に使用可能な水準に近づいている。

しかし、融解後の精液に含まれる耐凍剤のグリセロールに受精阻害作用がある¹⁾ことから、その除去が必要である点は変わっていない。この受精阻害作用は、精子がグリセロールを多量に含んだ状態で雌鶏卵管内の低浸透圧の粘液に触れ、精子内への急激な水の流入によって精子が破裂す

ることによると推察されている²⁾。

グリセロール除去の方法は、過去の報告の大部分が融解精液をグリセロールを含まない希釈液で段階的に10～25回にわけて10倍程度に希釈し、遠心分離して精子を沈澱させ、上澄みを除去する方法(段階希釈法)である^{3,4,5,6,7)}。他の方法としては透析を用いた報告がある⁸⁾。

このグリセロール除去行程に汎用型の限外濾過装置が応用できれば、10～25回の段階希釈と遠心分離の行程が1行程に簡素化できると考えられる。しかし、鶏融解精液から限外濾過によってグリセロール除去を行った報告は見られないため、限外濾過によるグリセロール除去操作が精子及び受精率に及ぼす影響を調査した。

試 験 方 法

供試鶏は精液採取用雄鶏及び人工授精用雌鶏とも360～420日齢の白色レグホン(福岡N系)を用いた。精液

は24羽の雄から採取して混合し、雌は受精率の調査1回につき12～14羽ずつ使用した。

凍結精液の作成及び融解は既報⁵⁾と同様に行った。即ち、体積比10%のグリセロールを混合した350 mosmのLake希釈液⁴⁾で、5℃の条件下で原精液を4倍に希釈し、グリセロール濃度6.7%とした。アルミンプルに1 mlずつ封入し、プログラムフリーザーを用いて5℃/分の冷却速度で凍結した。融解は5℃の氷水中でンプルを振盪して行った。

限外濾過には第1図に示す装置を用い、濾過チャンバーは最大容量14 mlのアミコン製8010型を使用した。再希釈液には330 mosmのLake再希釈液⁴⁾を使用した。限外濾過を開始する前にチャンバー及び再希釈経路内にエアを残さないため、濾過チャンバーに入れる試料量は14 mlとし、また濾過開始前には再希釈液経路に一度再希釈液を通した。

グリセロール除去の最終目標濃度は、1.2%以下まで除去すれば受精卵が得られるとしている報告¹⁾もあるが、グリセロールを0.7%以下まで除去して1回の腔内授精後1週間において70%以上の受精率を得た近年の報告^{5,6,7,8)}を考慮し、本試験では受精阻害作用をほぼ無視できるレベルとして0.5%、浸透圧が約420 mosmに設定した。

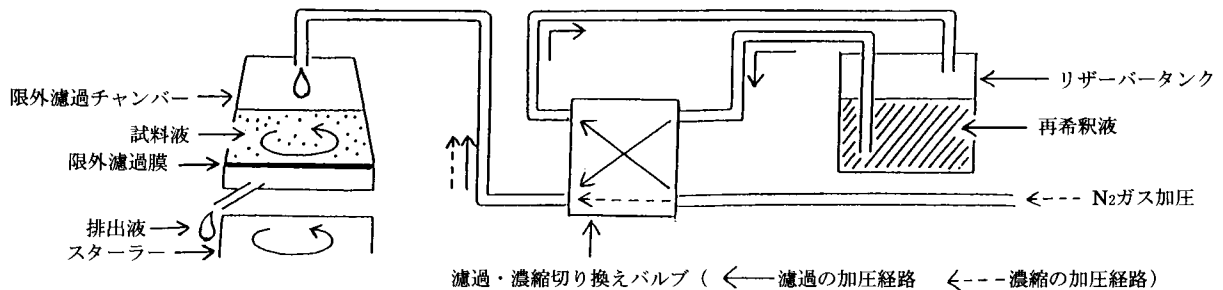
限外濾過によるグリセロール除去を行ったあとのチャンバー内精液は、原精液に対する希釈倍率が4倍以上となる。段階希釈法によってグリセロールを除去した精液の、原精液に対する希釈倍率は1～2倍である⁵⁾ことから、この差

を無くして受精率比較のための条件を揃えるため、限外濾過による420 mosmまでのグリセロール除去が完了すると、第1図に示す切り換えバルブを操作し、再希釈液を送りこむ限外濾過作業をN₂ガスの加圧による濃縮作業へ切り換え、チャンバー内の精液量を原精液の2倍量まで濃縮した。

限外濾過によるグリセロール除去試験は、第1表及び以下に示す内容で3回実施し、いずれも5℃の条件下で行った。

1回目は、融解精液と同じ濃度の6.7%のグリセロールを混合して浸透圧が約1,250 mosmとなったLake希釈液を濾過の対象に用い、分画分子量の異なる3種類の限外濾過膜について、グリセロール除去速度及び最終的に到達するグリセロール濃度を調査した。限外濾過膜には分画分子量が5,000、10,000及び300,000の3種類（アミコン製親水性限外濾過膜YM5、YM10、XM300）を用いた。

2回目は新鮮精液を材料とし、限外濾過によるグリセロール除去が新鮮で凍結傷害の無い精子にどの程度の影響を与えるかを調査した。新鮮精液は、凍結精液と同様に10%のグリセロールを混合したLake希釈液で4倍に希釈してグリセロール濃度6.7%とした後、限外濾過前の予備希釈として1/10量のLake希釈液を1分間隔で10回混合し、グリセロール濃度3.3%、希釈倍率8倍、浸透圧約800 mosmの状態から限外濾過した。限外濾過膜は分画分子量300,000のXM300を用いた。排出液の浸透圧が420 mosmに下がるまで限外濾過した後、原精液量の2倍量までの濃縮を行った。



第1図 限外濾過装置

第1表 試験区分及び内容

試験	区	グリセロール 除去方法	供試材料	グリセロール 除去前の予備希釈	限外濾過膜			人工授精前 精液量設定	授 精 注入量
					種 類	分画分子量	加圧設定		
1回目	1	限外濾過	Lake液	—	YM5 親水性	5,000	3.0kg/cm ²	—	—
	2	"	"	—	YM10 "	10,000	3.0kg/cm ²	—	—
	3	"	"	—	XM300 "	300,000	0.5kg/cm ²	—	—
2回目	—	限外濾過	新鮮精液	2倍に予備希釈 ²⁾	XM300 親水性	300,000	0.5kg/cm ²	原精液の2倍	0.1ml/羽
3回目	試験区1	限外濾過	融解精液	2倍に予備希釈	XM300 親水性	300,000	0.5kg/cm ²	原精液の2倍	0.1ml/羽
	対照区1	段階希釈	融解精液 ¹⁾	予備希釈なし	—	—	—	原精液の2倍	0.1ml/羽
	試験区2	限外濾過	融解精液	2倍に予備希釈	PM30 疎水性	30,000	3.0kg/cm ²	原精液の2倍	0.1ml/羽
	対照区2	段階希釈	融解精液 ¹⁾	予備希釈なし	—	—	—	原精液の2倍	0.1ml/羽

1) 対照区の融解精液は、それぞれ上の試験区に供試した融解精液と同一ロットのものをを用いた。

2) 新鮮精液は、融解精液と同じ4倍希釈・グリセロール6.7%の状態に一度設定した後、2倍に予備希釈した。

3 回目は、凍結保存して融解した精液を分割し、限外濾過を実施する試験区と段階希釈を実施する対照区を設定し、グリセロール除去後の受精率と精子性状を比較した。試験区は2回目の新鮮精液と同様にグリセロール濃度3.3%，原精液に対する希釈倍率8倍に予備希釈した後、限外濾過と濃縮を行った。限外濾過膜にはXM300及び疎水性で分画分子量30,000の膜（PM30）の2種類を使用した。試験区の膜1種類に対してそれぞれ対照区を設定し、対照区では既報⁵⁾と同様の段階希釈法によるグリセロール除去を行った。即ち、5℃の条件下で融解精液量に対して1/8、1/4、3/8、1/2、5/8量のLake再希釈液を各量について5回ずつ1分間隔で混合した後、1,000 Gで20分間遠心分離を行い、上澄みを除去し、沈澱精子にLake再希釈液を滴下して原精液の2倍量の液に戻した。

2及び3回目における人工授精は、試験区、対照区ともに雌鶏1羽当たり0.1 mlを腔内深部に注入した。3回目における試験区と対照区の人工授精は同時に行うものとし、融解から人工授精までの経過時間が同じになるようにした。

調査項目は、1回目は限外濾過開始後20分毎の排出液浸透圧、2回目は限外濾過開始後20分毎の浸透圧、人工授精前の精子運動性と形態、人工授精後2日目～8日目の1週間における受精率、3回目は人工授精前の精子運動性と形態、人工授精後2日目～8日目の1週間における受精率とした。

結 果

1回目の限外濾過試験として6.7%のグリセロールを含んだLake液14 mlを3種類の限外濾過膜を用いて限外濾過した場合の排出液浸透圧の変化を第2図に示した。

膜の分画分子量が大きいほど濾過開始後100分頃までの浸透圧低下はやや早まるが、その速度差は小さかった。また、どの膜においても濾過開始後120～140分頃、浸透圧650 mosm付近、グリセロール濃度にして約2.2%に低下したあたりではほぼ平衡状態となり、グリセロール除去がほとんど進行しなくなった。この結果から、6.7%のグリセロールを目標とする0.5%の濃度まで除去することは困難

と考えられたため、受精率調査が必要な2回目以降の試験では、精液の濾過開始前のグリセロール濃度を2倍の予備希釈によって6.7%から3.3%に低減させた。

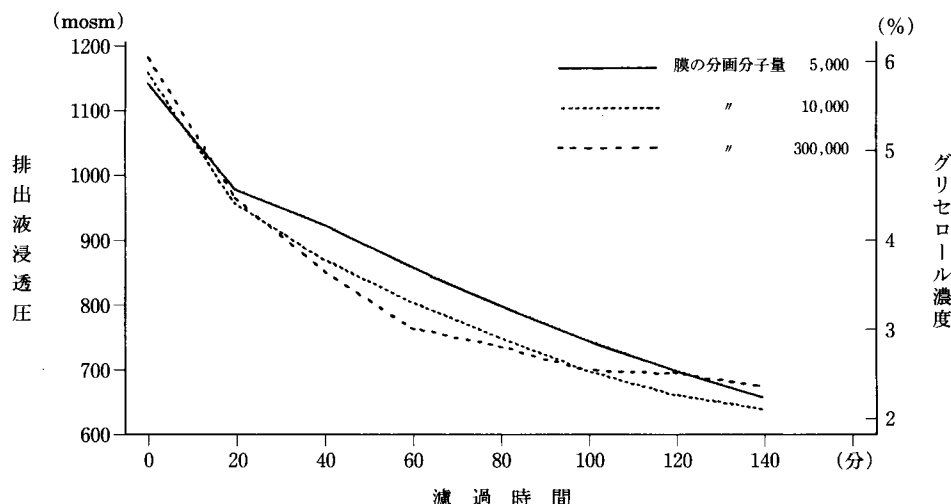
2回目の試験における排出液の浸透圧の変化は第3図のとおりで、約120分で浸透圧は目標とする420 mosm、グリセロール濃度において0.5%に達した。濾過と濃縮の完了した精液を人工授精した後1週間の受精率は第2表のとおり約80%であった。精子を鏡検した結果、新鮮精子としては運動性がやや低く++であったが、精子の外見には変化を認めなかった。

3回目に融解精液を限外濾過した結果を第3表に示した。用いた2種類の濾過膜のグリセロール除去速度については、いずれの膜においても浸透圧が420 mosmに達するまでの時間が120分で差が無く、疎水性の濾過膜による除去速度の促進効果は見られなかった。限外濾過した精液の受精率は、段階希釈法に比べて低かった。人工授精前の融解精液を鏡検した結果は、新鮮精液を限外濾過した場合とは精子性状が大きく異なり、200倍の顕微鏡視野内が精子の破壊残渣と思われる不定型の物質で満たされた状態が見られ、その残渣の隙間に少数の運動精子が認められる状態であった。なお、段階希釈後の精液については、精子の破壊された様子は見られなかった。

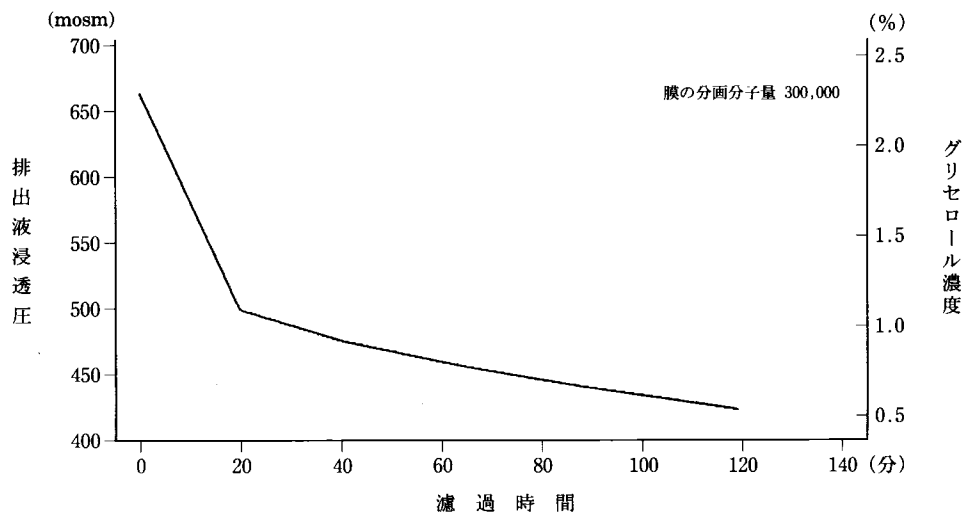
考 察

凍結保存して融解した鶏精液から限外濾過装置を用いてグリセロールを除去した結果、受精卵を得ることができたが、グリセロールの除去速度、グリセロール除去後の融解精子の性状と受精率について次のような問題点が見られた。

まず、グリセロールの限外濾過膜透過性が低かったことである。膜の分画分子量とグリセロールの分子量92から単純に見れば、今回使用した濾過膜のいずれにおいてもグリセロール分子の阻止率は0であり、30分程度でグリセロール除去率は95%以上、排液浸透圧において380 mosm前後になると計算される。しかし実際には、2時間以上の濾過を行ってもグリセロールの除去率は約67%であり、受精阻害作用の消える濃度までグリセロール濃度を下げるためには濾過開始前の予備希釈が必要であった。



第2図 3種類の限外濾過膜におけるLake液からのグリセロール除去の進行



第3図 3.3%のグリセロールを含む新鮮精液からのグリセロール除去の進行

第2表 限外濾過によってグリセロール除去を行った新鮮精液の精子運動性と受精率

除去方法	濾過膜種類	分画分子量	濾過時間 ¹⁾	除去後の精子運動性 ²⁾	授精♀羽数	種卵総数	受精卵数	受精率
限外濾過	XM300 親水性	300,000	120分	++	12羽	69個	55個	79.7%

1) 20分間隔で排出液浸透圧を測定し、420 mosmまで下がるのに要した時間。

2) +++～-の5段階で評価

第3表 限外濾過によってグリセロール除去を行った融解精液の精子運動性と受精率

除去方法	濾過膜種類	分画分子量	濾過時間 ¹⁾	除去後の精子運動性	授精♀羽数	種卵総数	受精卵数	受精率
限外濾過	XM300 親水性	300,000	120分	± ²⁾	12羽	65個	8個	12.3%
段階希釈 (対照)	—	—	—	+	12羽	62個	19個	30.6%
限外濾過	PM30 疎水性	30,000	120分	± ²⁾	14羽	50個	8個	16.0%
段階希釈 (対照)	—	—	—	+	14羽	59個	30個	50.3%

1) 20分間隔で排出液浸透圧を測定し、420 mosmまで下がるのに要した時間。

2) 運動性の5段階評価(+++～-)では±であったが、大部分の精子が破損。

限外濾過において溶質の膜透過速度が遅くなる要因は、膜表面で溶質が濃縮され濃度分極を生じるためと、膜孔に溶質や夾雑物が目詰まりするための2つがある。今回の試験結果からいずれの要因が大きいのかの特定はできないが、Lake液の溶質中の最大分子量であるポリビニルピロリドンの約10,000⁴⁾よりはるかに大きい分画分子量300,000の膜を用いても、また物質の吸着の少ない疎水性濾過膜を用いても透過性がほとんど向上しなかったことから、目詰まりよりも濃度分極が発生していると推察される。

次に、融解精液の限外濾過後には精子の著しい破壊損耗が認められたことである。一方、段階希釈法で処理した融解精子には破壊が見られなかった。このことは以下のように考察される。

まず、凍結～融解の過程を経る際に、鶏精子を含めて動物細胞には、①細胞内氷晶形成による損傷、②細胞外氷晶

発生に伴って不凍水部分の塩類が濃縮され、細胞膜に加わる塩害、③細胞周囲の塩類濃度上昇によって細胞が脱水され、限界最小容量以下に縮小しようとするために起こる細胞膜の損傷、④氷晶に圧縮された細胞同士の機械的損傷、⑤融解時の特定温度域通過時に氷晶の形成、再結晶の発生が細胞に与える損傷、等の多様な傷害が起こるとされている⁹⁾。今回の結果においても、新鮮精液を限外濾過しても精子の破壊が起こらず、融解精液では大部分の精子が破壊されたことから、融解精子の大部分が新鮮精子より物理的に脆弱化していることが伺われた。

次に、グリセロール除去の過程でも、①グリセロール濃度低減のため精子が低浸透圧の再希釈液と接触させられることから生じる浸透圧衝撃、②処理過程で加わる遠心分離、攪拌、加圧等の機械的ストレス、の2種類の要因によってダメージが加わる。

今回供試した融解精液は、限外濾過と段階希釈に同一ロットを分割して用いたため、凍結・融解過程における①～⑤のダメージについては同等である。グリセロール除去過程における2種類の精子加害要因について段階希釈法と限外濾過法を比較すると、まず浸透圧衝撃については、再希釈液を漸増的に混合して急激な浸透圧変化を与えない段階希釈法に対して、限外濾過法では、濾過開始初期にガス圧によって再希釈液が一気に流入し、比較的大きな浸透圧変化が生じている(第2, 3図)。また機械的ストレスについても、段階希釈法で与えられる機械的ストレスが遠心分離および数分間の攪拌であるのに対し、限外濾過では2時間以上にわたってスターラーによる攪拌と窒素ガスの加圧がかけられる。

このように、2要因の両方において限外濾過法は段階希釈法より強く精子へストレスを加えている。凍結と融解によって全体的に脆弱化した融解精子は、段階希釈法では緩やかな浸透圧変化と弱い機械的ストレスのため形態が維持されるが、限外濾過ではストレスが大部分の精子の強度限界を越え、破壊が起こると考えられる。ただし、融解精子を破壊する主要因が浸透圧差と機械的ストレスのいずれにあるのか、あるいはこれらの複合によって初めて破壊が起こるのかは今回の試験からは判明しない。

限外濾過後の融解精液の受精率が、段階希釈法によって処理したものより低くなったことは、上記のとおり限外濾過が段階希釈法より精子に及ぼすダメージが強く、より多くの精子が受精能を喪失する結果と考える。

以上のとおり、限外濾過法においては浸透圧衝撃と機械的ストレスの強さが融解精子を損傷し、受精率を低下させていると考えられるため、受精率向上のためには融解精子へのストレスの軽減を図る必要がある。具体的には、N₂ガスの加圧を漸増的に設定して濾過開始時の再希釈液流入量を抑える、加圧と攪拌を弱く設定する等の方策が考えられる。また、グリセロールの除去速度が遅く限外濾過と濃縮に合計4時間近くを要したことも、精子への機械的ストレスの助長と時間経過による精子の活性低下を招いた可能

性が考えられるため、グリセロールが濃度分極を起こしにくく、早い除去が可能な濾過膜の種類及び加圧力設定の検討も必要である。

引用文献

- 1) LAKE, P. E., BUCKLAND, R. B. and RAVIE, O. (1980) Effect of glycerol on the viability of fowl spermatozoa - implications for its use when freezing semen. *CryoLett.*, 1: 301-306.
- 2) LAKE, P. E. and RAVIE, O. (1984) An exploration of cryoprotective compounds for fowl spermatozoa. *Br. poult. sci.*, 25: 145-150.
- 3) LAKE, P. E., RAVIE, O. and MCADAM, J. (1981) Preservation of fowl semen in liquid nitrogen. *Br. poult. sci.*, 22: 71-77.
- 4) LAKE, P. E. and STEWART, J. M. (1978) Preservation of fowl semen in liquid nitrogen - an improved method. *Br. Poult. Sci.*, 19: 187-194.
- 5) 西尾祐介・石山英光・井上尊尋(1991)鶏凍結精液の受精率改善と融解後の効率の利用法. 西日本畜産学会報 34: 50～54.
- 6) 大原睦生・小関忠雄・田村千秋・高橋 武・草刈直仁(1990)雄鶏個体別凍結精液の受精率並びに7日間隔で4回人工授精した時の凍結精液の受精率. 家禽会誌 27(6): 398-402
- 7) 坂本秀樹・国分洋一・永山文夫(1991)鶏精液の凍結保存に関する研究. 福岡県養鶏試験場研究報告. 22: 21-24
- 8) 杉山和寿・番場公雄(1990)鶏凍結精液からの透析によるグリセリン除去について. 静岡中小試研報. 3: 45-49
- 9) 高橋恒夫(1987)動物細胞の凍結傷害と凍害防御剤の作用機序. 凍結保存(酒井昭編), 東京: 朝倉書店, pp. 16-19