

トリプルステイン染色したホルスタイン種雄牛精子の色調

寺脇 良悟・増田 実加・福井 豊
帯広畜産大学 帯広市 080

Color of Holstein bull's spermatozoa stained by triple-stain technique

Yoshinori TERAWAKI, Mika MASUDA and Yutaka FUKUI

Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine,
Obihiro-shi 080

キーワード：ホルスタイン種雄牛，精子，トリプルステイン，色調
Key words : Holstein bull, Spermatozoa, Triple-stain, Color

要 約

牛精子の生死判別と正常な先体の有無を客観的に評価する方法を確立するための基礎資料を得るため、トリプルステイン染色した牛精子の色調を画像解析装置を用いて調査した。3頭のホルスタイン種雄牛の凍結融解精子をトリプルステイン染色した。1頭につき100のトリプルステイン染色した精子を一人の観察者が評価した。評価は従来の方法に従って先体の有無と生死判別により精子を4つに分類した。同時に、精子の先体中央部と後先体域中央部の色調値をRGB表色系に基づいて計測した。先体中央部で計測した緑の色調値の平均値は、正常な先体の有無間で有意に異なり、判別に利用できる可能性が示唆された。後先体域中央部で計測した赤と青の色調値は生存精子と死滅精子との比較で平均値の差が有意であった。特に、青の色調値は生存精子と死滅精子で顕著な差があり、判別に利用できる可能性が高いと考えられた。

緒 言

精子の生存性と正常な先体の有無は精液の品質や精子の受精能獲得に関する研究において大変重要な観察項目の一つである。精子の生死判別を行う染色方法ではEosin-nigrosin染色法(CAMPBELL *et al.*, 1956; DOTT and FOSTER, 1972)が一般的である。また、精子の先体形状を判定するにはGiemsa染色法(SAACKE *et al.*, 1968)は最も一般的で有効な方法の一つである。しかし、これらの方法では精子の生死判別もしくは先体の形状判別のどちらかしか行うことが

できない。したがって、1つの精子について2つの項目を同時に判別できない。トリプルステイン染色法(TALBOT and CHACON, 1981)あるいはトリプルステイン簡便法(楠ら, 1985; KUSUNOKI *et al.*, 1987)は精子の生死判別と先体の形状判別を1つの精子について同時に行うことができる方法であり、最も一般的である。しかし、判別方法は他の染色法と同様で、観察者による顕微鏡検査によって行われる。その評価は観察者の判断に委ねられており、複数の観察者による検査では‘目合わせ’が必要である。しかし、‘目合わせ’を行っても観察者間の評価がすべて一致することは少ない。本研究では、コンピュータによる画像処理技術を用いた客観的評価の可能性を検討するため、第一段階として、トリプルステイン染色を施したホルスタイン種雄牛精子の色調を調査した。

材料および方法

本研究で用いた精子は、北海道家畜改良事業団十勝事業所で作製した3頭のホルスタイン種雄牛の凍結ストローを融解して得た。凍結融解精子は各雄牛ごとにトリプルステイン染色した。各雄牛について、約100精子を同一観察者が評価した。評価した精子については同時にRGB表色系(池田; 1980, 金子; 1988, 川上; 1981)に基づき赤、緑、青の色調値を計測した。各精子は、その染色様式により正常な先体を持つ生存精子、正常な先体を持たない生存精子、正常な先体を持つ死滅精子および正常な先体を持たない死滅精子のいずれかに分類された。染色を施した精子の色調値計測に関しては、精子のカラー画像を顕微鏡に接続したHitachi Color Camera, Nikon Brightness Control Unit, Hitachi Camera Control Unit および Sony Trinitron

Color Monitor を通して画像解析システム：高速カラー画像処理粒度分布解析装置 (SPICCA: Speedy Particle Image & Color Computer Analysis) (日本アビオニクス) に入力した。入力した精子のカラー画像上で先体中央部と後先体域中央部の色調値を、Image Command 5098 (日本アビオニクス) を使って計測した。色調値の統計量は SAS の MEANS PROCEDURE (Base SAS; 1993) で推定した。色調値の平均値に関する多重検定は SAS の GLM PROCEDURE 中の DUNCAN オプション (SAS/STAT; 1993) を使って行った。

結果および考察

先体と後先体域の中央部で計測した RGB 表色系の赤、緑および青に関する色調値の平均値、標準偏差、変動係数および範囲を表 1 に示した。最も小さい平均値は先体中央部の緑について推定され、93.9 であった。また、先体中央部の青の平均値が最も大きく 168.8 であった。先体中央部と後先体域中央部を比較すると、赤と青の平均値は先体中央部の方が後先体域中央部より大きかった。一方、緑の平均値は先体中央部が後先体域中央部より小さい値であった。先体中央部で計測した緑の標準偏差は後先体域中央部より大きく、逆に、先体中央部で計測した赤および青の標準偏差は後先体域中央部より小さく推定された。標準偏差の比較で認められた傾向は、変動係数においてより一層顕著であった。つまり、各色調値の統計量を先体中央部と後先体域中央部について比較すると、赤と青の色調値は同様の傾向を示したが、緑の色調値はまったく逆の傾

向を示した。

表 2 には、先体中央部で計測した色調値の平均値を精子の染色様式別に示した。平均値は左から小さい順にならべた。平均値の下に示した直線は、平均値の多重検定の結果を示しており、同じ直線の上にある平均値間には有意差が認められないことを示している。赤の平均値は正常な先体を持つ死滅精子で最も小さく 142.6 であった。この平均値は他の 3 つの分類の平均値と比較すると有意に小さかった ($P < 0.01$)。緑の平均値も正常な先体を持つ死滅精子で最も小さかった。緑に関する多重検定の結果は、正常な先体を持つ精子と持たない精子で有意な差が認められることを示した ($P < 0.01$)。先体の染色様式は正常な先体の有無を判断するために用いられる (TALBOT and CHACON, 1981; 楠ら, 1985; KUSUNOKI *et al.*, 1987)。緑の平均値に関する多重検定は、4 つの分類を正常な先体を持つ精子と持たない精子に分類できることを示唆した。このことは、先体中央部で計測した緑の色調値が正常な先体の有無の指標として利用できる可能性を示している。各分類の青の平均値は、正常な先体を持つ死滅精子で最も小さく (154.6)、正常な先体を持たない生存精子で最も大きかった (189.1)。また、その差は、3 つの色調 (赤、緑、青) のなかで最も大きかった。多重検定の結果は、死滅精子と生存精子の間で平均値の差が認められた ($P < 0.01$)。この結果は、先体の染色様式が従来正常先体の有無の判断に利用され、精子の生存の判定には用いられていない事実と矛盾する。

表 3 には、後先体域中央部の色調値の平均値を分類別に示した。緑の平均値は分類による大きな差異が認

表 1 トリプルステイン染色した精子の色調に関する統計量

計測箇所	色調	平均値	標準偏差	変動係数	範囲
先体中央部	赤	153.5	30.66	19.97	154
	緑	93.9	35.48	37.78	190
	青	168.8	23.98	14.21	153
後先体域中央部	赤	150.2	32.24	21.46	162
	緑	103.0	32.71	31.76	164
	青	156.6	33.63	21.48	178

表 2 トリプルステイン染色した精子の先体中央部で計測した分類別の色調平均値と多重比較

赤 a	正常な先体を持つ死滅精子	正常な先体を持たない死滅精子	正常な先体を持つ生存精子	正常な先体を持たない生存精子
	142.6	153.3	156.6	165.5
緑 a	正常な先体を持つ死滅精子	正常な先体を持つ生存精子	正常な先体を持たない生存精子	正常な先体を持たない死滅精子
	78.9	80.7	106.3	112.4
青 a	正常な先体を持つ死滅精子	正常な先体を持たない死滅精子	正常な先体を持つ生存精子	正常な先体を持たない生存精子
	154.6	160.6	180.1	189.1

a ; RGB 表色系の色調を示す。

— ; 同一直線上の平均値間に有意差なし ($P < 0.01$)。

表3 トリプルステイン染色した精子の後体域中央部で計測した分類別の色調平均値と多重比較

赤 a	正常な先体を持つ 死滅精子 135.0	正常な先体を持た ない死滅精子 143.1	正常な先体を持つ 生存精子 161.2	正常な先体を持た ない生存精子 166.2
緑 a	正常な先体を持つ 死滅精子 93.1	正常な先体を持た ない死滅精子 101.4	正常な先体を持つ 生存精子 106.9	正常な先体を持た ない生存精子 117.5
青 a	正常な先体を持た ない死滅精子 134.5	正常な先体を持つ 死滅精子 137.8	正常な先体を持つ 生存精子 181.6	正常な先体を持た ない生存精子 188.2

a; RGB 表色系の色調を示す。

—; 同一直線上の平均値間に有意差なし ($P < 0.01$)。

められなかった。正常な先体を持たない死滅精子の平均値は、他の3つの分類と有意差がなかった。赤の平均値は多重検定の結果、生存精子と死滅精子とに大きく分かれた ($P < 0.01$)。青の平均値は正常な先体を持たない死滅精子で最も小さく134.5であり、正常な先体を持たない生存精子で最も大きく188.2であった。これらの差は赤ならびに緑と比較して顕著に大きく、青が分類によって大きく異なることを示している。特に、正常な先体を持つ死滅精子と正常な先体を持つ生存精子の平均値の差は約44と大きかった。これとは対照的に、死滅精子の2つの分類の差は約3であった。また、生存精子の2つの分類での差は約7であった。平均値の多重検定の結果、死滅精子と生存精子との間で有意な差が認められた ($P < 0.01$)。

以上の結果から、先体中央部で計測した緑の色調値は正常な先体の有無の判定に利用できる可能性が認められた。死滅精子と生存精子の判定には後先体域中央部で測定した赤と青の色調値が利用できることが示唆された。特に、後先体域中央部で測定した青の平均値は死滅精子と生存精子で顕著に差があることから、その色調値は指標として利用できる可能性が高いと考えられた。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、ホルスタイン種雄牛の凍結精液をご提供頂いた北海道家畜改良事業団十勝事業所に対して深謝いたします。また、画像解析装置の使用を快諾いただいた帯広畜産大学獣医学科家畜解剖学講座に対し感謝いたします。

文 献

Base SAS ソフトウェア：プロシジャガイド (1993)
Version 6, First Edition, 217-236, サスインスティ

チュートジャパン。東京。

CAMPBELL, R. C., H. M. DOTT and T. D. GLOVER (1956) Nigrosin eosin as a stain for differentiating live and dead spermatozoa. *J. Agric. Sci.*, 48: 1-8.

DOTT, H. M. and G. C. FOSTER (1972) A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential 'live/dead' stain. *J. Reprod. Fertil.*, 29: 443-445.

池田光男 (1980) 色彩光学の基礎。28-53. 朝倉書店。東京。

金子隆芳 (1988) 色彩の科学。65-82. 岩波書店。東京。
川上元郎 (1981) JIS 使い方シリーズ色の常識。増補改訂2版。64-77. 日本規格協会。東京。

楠比呂志・藤崎 裕・加藤征史郎・荻田 淳 (1985) トリプルステイン簡便法による牛先体反応精子の判別。人工授精研誌, 7: 9-11.

KUSUNOKI, H., M. SAKAUE, S. KATO and S. KANDA (1987) Identification of acrosome-reacted boar spermatozoa by a triple-stain technique. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 33: 123-127.

Saacke, R. G., R. P. Amann and C. E. Marshall (1968) Acrosomal cap abnormalities of sperm from subfertile bulls. *J. Anim. Sci.*, 27: 1391-1400.

SAS/STAT ソフトウェア：ユーザーズガイド (1993)
Version 6, First Edition; 569-666, 株式会社サスインスティチュートジャパン。東京。

TALBOT, P. and R. CHACON (1981) A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *J. Exp. Zool.*, 215: 201-208.