

## ウシの精液検査における精子運動能自動解析装置の応用

李 玉田・小山 久一・渡辺 展子・向井 直樹・平尾 和義  
酪農学園大学, 江別市, 069

## Application of Sperm motility analyzer to Bull semen analysis.

Yutian LI, Hisaichi KOYAMA, Hiroko WATANABE, Naoki MUKAI and Kazuyoshi HIRAO

Rakuno Gakuen University, Ebetsu, 069

キーワード : ウシ精子, 精子運動能解析, 自動解析装置

Key words : bull spermatozoa, sperm motile analysis, computerized semen analysis

## 要 約

ウシ精液の精子濃度, 精子生存率および前進運動精子率を検査する方法として, 精子運動能自動解析装置 (HTM-IVOS, Ver.10.6, Hamilton-Thorne Research) を応用するため, ウシ精液に適したセットアップ・パラメーター値およびマクラー精子分析カウントチェンバーの使用条件を検討し, 従来のウシの精液検査との比較を試みた。その結果, セットアップ・パラメーター値は, 画面の照明輝度 2350, 画面背景輝度に対する最小コントラストは 80, 最小セルサイズは 6, 精子以外の物体を識別する静止物体のサイズ限度, 輝度限度および伸長限度はそれぞれ 0.7~2.0, 0.3~1.6 および 15~70, 精子の運動速度を分類する中速度精子上限値および中速度精子下限値は 90  $\mu\text{m/s}$  と 50  $\mu\text{m/s}$  であった。マクラー精子分析カウントチェンバーへの滴下精液量は 10~20  $\mu\text{l}$  とし, 精液滴下後 3 分間以内に解析すると, 安定した精子濃度および精子生存率が得られた。一方, 精子運動能自動解析装置で算定した精子濃度および精子生存率とウシ精液の顕微鏡検査で算定した精子濃度 (トーマ氏血球計算盤法) および精子生存率 (エオシン・ニグロシン染色法) ならびに精子運動能自動解析装置で算定した前進運動精子率と顕微鏡検査で算定した精子生存指数法との比較では, 精子濃度の間には  $r=0.94$ , 精子生存率の間には  $r=0.91$  および前進運動精子率と精子生存指数との間には  $r=0.93$  の正の相関係数が得られ ( $P < 0.01$ ), ウシの精液検査における本装置の有効性が示された。

## 緒 言

ウシの精液検査は, 一般には肉眼検査と顕微鏡検査

が実施されている (入谷, 1973)。これらの検査は熟練した技術者によって行われているが, 顕微鏡検査の精子生存率および精子活力については技術者による個人差がみられ (HAFEZ, 1992), 正確で客観的検査法の確立が求められている。近年, 梶田ら (1989) は, ヒトの精液性状を精子運動能自動解析装置で解析し, 顕微鏡検査との間に高い相関関係のあることを報告している。本研究ではウシの精液検査に, 精子運動能自動解析装置 (Motility analyzer HTM-IVOS Ver.10.6, Hamilton-Thorne, Research, 以下, IVOS) を応用することを目的に, ウシ精子に適したセットアップ・パラメーター値とマクラー精子分析カウントチェンバー (以下, マクラー) に滴下する精液量および解析までの時間について検討し, IVOS で算定した精子濃度, 精子生存率および前進運動精子率と顕微鏡検査で算定した精子濃度, 精子生存率および精子生存指数の比較を試みた。

## 材料および方法

供試精液はホルスタイン種雄牛の凍結精液を, 実験 1 では 4 頭, 実験 2 では 15 頭または 17 頭用いた。凍結精液は, 精子濃度および精子生存率の異なるものを選び, 38°C の温湯で約 40 秒間浸漬融解し, IVOS 画面の精子数が 20~30 になるよう BO 液 (BRACKETT and OLIPHANT, 1975) で希釈した。本実験では約 4 倍の希釈が適切であった。希釈精液は直ちにマクラーに移し, IVOS のステージに載せて解析した。

IVOS は解析対象物 (精子) とそれ以外の物体 (非精子) を識別し, 一定時間における精子運動能を解析する装置である。本来, ヒト用に開発されたもので, ウシの精子運動能の解析には予め, 次の 8 項目 (セットアップ・パラメーター) の値を設定する必要がある。セットアップ・パラメーターには, 精子と非精子を大きさと輝度で識別する照明輝度, 最小コントラスト,

最小セルサイズ、静止物体サイズ限度、静止物体輝度限度および静止物体伸長限度の6項目と、精子の運動速度を高速と中速に分類する中速精子上限値、中速と低速に分類する中速精子下限値の2項目がある。

ウシ用のセットアップ・パラメーター値は、IVOSのプレイバック機能により求めた。プレイバック機能はIVOSの画面上に一定時間観察した画像を繰り返し表示できる機能であり、肉眼で精子と非精子を確認できる。精子の大きさや輝度に関する項目は、画面を観察しながらセットアップ・パラメーター値をIVOSの指定範囲内で変動させて解析し、最適値を求めた。また、精子の運動速度に関する項目もIVOSの指定範囲内で変動させ、顕微鏡検査による精子活力と比較しながら最適値を求めた。その結果は表1に示した。

実験1 マクラーの使用条件の検討

マクラーに滴下する精液量およびIVOSで解析するまでの経過時間が精子濃度および精子生存率に及ぼす影響を検討した。マクラーに滴下する精液量は5 $\mu$ l, 10 $\mu$ l, 15 $\mu$ lおよび20 $\mu$ lの4容量とした。解析までの経過時間は、IVOSの保温ステージ上に載せた直後(0分間)、3分間、5分間、10分間、15分間および20分間とした。

表1 ウシ用セットアップ・パラメーター値

項目	設定値
照明輝度	2350
最小コントラスト	80
最小セルサイズ	6
静止物体サイズ限度	0.7-2.0
静止物体輝度限度	0.3-1.6
静止物体伸長限度	15-70
中速運動精子の上限値 (MVV)	90 $\mu$ m/s
中速運動精子の下限値 (LVV)	50 $\mu$ m/s

実験2 IVOSと顕微鏡検査で算定した結果の比較

IVOSで算定した精子濃度、精子生存率および前進運動精子率について、従来のウシ精液の顕微鏡検査で行われているトーマ氏血球計算盤法(精子濃度)、エオシン・ニグロシン染色法(精子生存率)および精子生存指数(入谷, 1973)の結果と比較し、相関係数を求めた(吉田, 1975)。

統計処理

精子濃度は対数変換、精子生存率および前進運動精子率は角変換を行った。実験1の滴下する精液量および経過時間における平均値の比較は、2元配置分散分析法を行い、有意差の認められた項目についてDuncanの検定法でその差を調べた(吉田, 1975)。

結果および考察

実験1 マクラーの使用条件の検討

滴下精液量および経過時間に伴う精子濃度と精子生存率の推移は図1に示した。解析までの経過時間に伴い、5~20 $\mu$ lのいずれの精液量においても精子濃度ならびに精子生存率は低下傾向を示した。精液量5 $\mu$ lでは0分間と他の全ての時間との間に1%水準で有意の差が認められた。また、10 $\mu$ l, 15 $\mu$ lおよび20 $\mu$ lにおいても、0分間と5~20分間との間に1%水準で有意の差が認められた。しかし、10 $\mu$ l, 15 $\mu$ lおよび20 $\mu$ lでは、0分間と3分間の間に有意の差は認められなかった。マクラーにおける精液分布状態を観察したところ、5 $\mu$ lでは精液がマクラー全体に行き渡らず、精液の蒸発が早かった。10 $\mu$ lでは精液がマクラー全体に行き渡り、15 $\mu$ lおよび20 $\mu$ lでは精液がマクラー周囲にまで溢れ出していたが、蒸発は少なかった。

実験2 IVOSと顕微鏡検査で算定した結果の比較

IVOSで算定した精子濃度および精子生存率と顕微

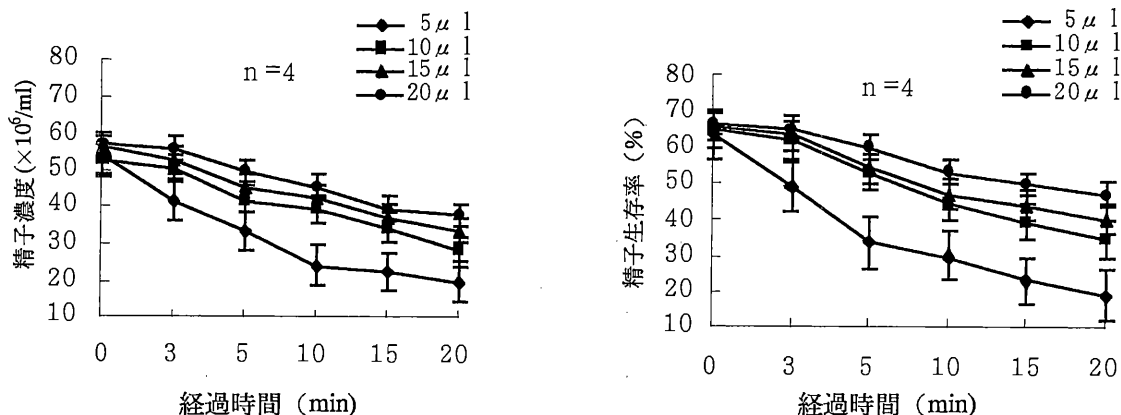


図1 マクラー精子分析カウントチェンバーに滴下する精液量および解析までの経過時間が精子濃度および精子生存率に及ぼす影響 (平均値 $\pm$ S.E.)

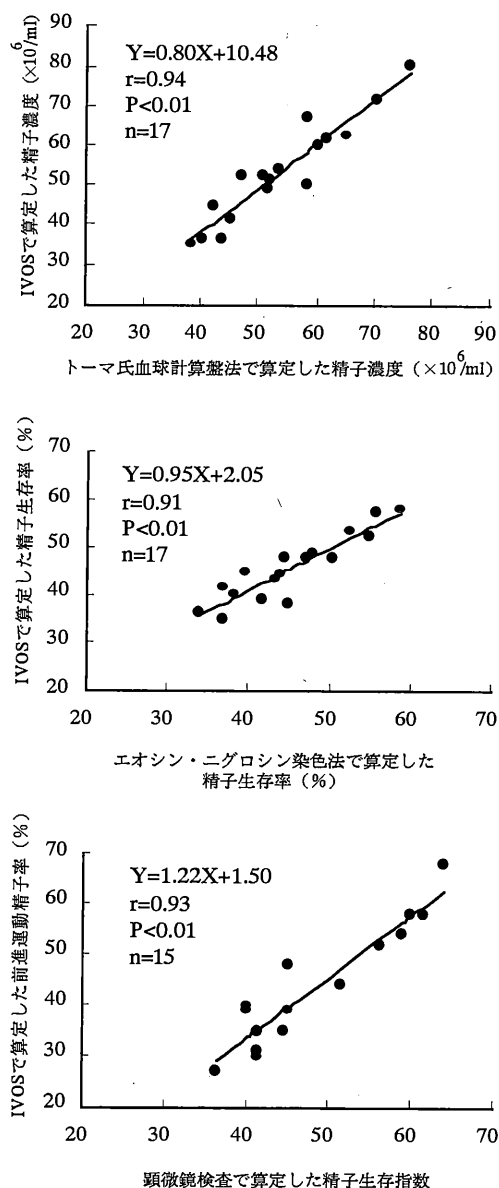


図2 精子運動能自動解析装置 (IVOS) と従来の顕微鏡検査の相関関係

鏡検査で算定した精子濃度 (トーマ氏血球計算盤法)、精子生存率 (エオシン・ニグロシン染色法) ならびに IVOS で算定した前進運動精子率と顕微鏡検査で算定した精子生存指数との相関関係を図2に示した。精子濃度の間には  $r=0.94$ 、精子生存率の間には  $r=0.91$  および前進運動精子率と精子生存指数の間には  $r=0.93$  の正の有意な相関 ( $P<0.01$ ) が認められた。

マクラーは従来の顕微鏡検査による精液検査に用いられているが、今回の試験結果から解析までの経過時間に伴う精子濃度ならびに精子生存率の低下が確認された。この原因として、マクラー周囲の精液蒸発による乾燥が影響しているものと思われた。すなわち、マ

クラーは開放型であるため精液の周辺部が乾燥し、周辺部に死滅精子が集中することにより精子濃度が減少したものと思われた。この結果は宇津木ら (1990) が精子運動能自動解析装置 HT-M 2030 (Hamilton-Thorne Research) を用い、得られた精子濃度および精子生存率の経時的推移とほぼ一致していた。しかし、柳田ら (1989) は精子運動能自動解析装置 Cellsoft シリーズ 3000 とマクラーを用い、精子濃度および精子生存率の推移を検討したところ、逆に経過時間に伴い、これらの値は増加したと報告している。この結果は本実験と相反するものであるが、3分間以内に解析すれば安定した結果が得られるとの結論では一致していた。従って、マクラーの使用条件は、滴下精液量を乾燥による影響の少ない  $10\mu l \sim 20\mu l$  とし、3分間以内に解析する必要があると判断された。

一方、IVOS で算定した精子濃度および精子生存率と顕微鏡検査で算定した精子濃度 (トーマ氏血球計算盤法) および精子生存率 (エオシン・ニグロシン染色法) ならびに IVOS で算定した前進運動精子率と顕微鏡検査で算定した精子生存指数との比較では有意な相関係数が得られており、両者のよく一致することが示された。このことは、IVOS にウシの精子に合わせたセットアップ・パラメーター値を設定することにより、正確で、客観的にウシ精液の精子濃度、精子生存率および前進運動精子率を算定できることを証明しており、IVOS が従来の顕微鏡検査に代わる可能性があると思われた。

## 文 献

- BRACKETT, B. G. and G. OLIPHANT, (1975) Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. Biol. Reprod., **12**: 260-274.
- HAFEZ, E. S. E., (1992) ハーフエツ家畜繁殖学 (吉田重雄・正木淳二・入谷明訳) 第5版. 451-477. 西村書店. 新潟.
- 入谷 明, (1973) 新家畜繁殖講座II (加藤浩・星修三・西川義正編集). 精液の性状とその検査の項執筆. 51-80. 朝倉書店. 東京.
- 宇津木利雄・中島敬和・五十嵐正雄, (1990) 精液検査結果の時間的変化. 日不妊会誌, **35**: 956 (講演要旨).
- 吉田 実, (1975) 畜産を中心とする実験計画法. 68-194. 養賢堂. 東京.
- 柳田 薫・星 和彦・月川 奏・佐々木宏子・遠藤 力・佐藤 章, (1989) 精液分析方法の検討 (Semen auto analyzer による分析法と Makler counting chamber の特性). 日不妊会誌, **34**: 893-901.