

# 人工授精に於ける Hyaluronidase に関する研究

## (2) 添加 Hyaluronidase が牡牛精子の活力に及ぼす効果

和田 宏・竹原 宏

Studies on hyaluronidase in the artificial insemination.

### (2) Effects of added hyaluronidase on the motility of bull spermatozoa.

Hiroshi WADA and Hiroshi TAKEHARA

Twenty eight ejaculates were obtained from five bulls containing four Holstein bulls and one of the Japanese Black Breed.

These semen samples were diluted 1:5, 1:20, or 1:50 with egg yolk-citrate diluter, and then the hyaluronidase preparation was added to them and stored at 6°C. excepting only three samples which were stored at 38°C.

For hyaluronidase in this studies, "Sprase" was used which a testicular hyaluronidase preparation of Mochida Pharmaceutical Manufacturing Co., Ltd. and its enzymatic activity is shown in the V.U.M. (Viscosity Reducing Unit of Mochida).

Several dosage levels of this enzym preparation ranging from 100 to 100,000 V.U.M. per 1 cc. of the diluted semen were used.

Estimation of motility of spermatozoa was made according to the common method used in our country, using the hanging drop technic and employing a 37°C. microscope stage incubator.

In the semen samples diluted five times and stored at 6°C., there were no significant differences statistically in the percentage of motile spermatozoa between the control and the semen samples to which various dosage levels of hyaluronidase were added up to about 50,000 V.U.M. But, from the P value of t-test, there seems to be a tendency that the motility of spermatozoa decrease when the hyaluronidase level exceeds about 50,000 V.U.M.

When the semen was diluted by twenty or fifty times, the decrease above mentioned does not seem to have occurred.

It rather seems that the decrease in spermatozoa motility is due to either something like a change of osmotic pressure in the semen presumably caused by the large amount of hyaluronidase preparation added or impure substances contained in the preparation than toxicity of hyaluronidase itself.

When the semen to which hyaluronidase added were stored at 38°C., sperm lost its motility in about ten hours just as in the case of the control, and there were no difference between them.

Summaizing briefly, the amount of hyaluronidase (Sprase) up to about 50,000 V.U.M. added per 1 cc. of the diluted bull semen did not affect significantly the motility of

spermatozoa during storage at 6° C.

Accordingly, about this level of hyaluronidase added to the semen is not harmful to the sperm in the artificial insemination.

## 緒 言

酵素 Hyaluronidase〔以下 H-ase とす〕が哺乳動物の精子並びに精液中に存在しており、哺乳動物の受精過程に於ける重要な役割が提唱された。生物学的にも非常に興味ある問題として此の酵素に関する数多くの報告がなされた。

牝牛精液が高い濃度の H-ase を有することはすでによく知られた事実であるが、筆者等も前報に於いてそれを報告した。斯くも多量の H-ase が全く無意義に存在するものとも思われぬが精液中の H-ase を増すことが人工授精に於ける受胎率向上に対し望ましい効果をもたらすか否か、にわかに断定は出来ない。精液中の H-ase を増す方法としては H-ase の製剤を添加することが考えられるが、その際に精子の活力や生存に対して如何なる影響を及ぼすかを研究する為に此の実験を行つた。それらの結果について報告する。

## 実験材料並びに方法

試験に用いた精液は 1952 年 6 月から同年 12 月までの間に健康なホルスタイン種 4 頭、和牛 1 頭、計 5 頭の種牝牛から擬牝台、人工腔法により採取した 28 例の精液である。採取後は常法に従つて漸次冷却し 2 時間目に H-ase 製剤を添加した。H-ase としては持田製薬株式会社の牝牛睾丸性 H-ase であるスプラーゼ (Sprase) を用いた。

供試精液は卵黄クエン酸緩衝液 (三興化学株式会社のグルコ・チトラートを用い、新鮮卵黄 1 容：グルコ・チトラート 3 容を混合した) で 5 倍、10 倍、20 倍に稀釈した。斯く高度の稀釈を行つたのは、精液固有の H-ase に対し、添加した H-ase の影響をより明らかにする為であつた。

一定時間に多くの試料の精子の活力検査が困難であるので、稀釈精液 1 cc. に対しスプラーゼ 1 万単位以上添加の場合を高単位区とし、1 万単位以下の場合を低単位区とし、実験を区分して行つた。

低単位添加試験に於ては、それぞれの精液は 5 倍に稀釈された。之を 5 区に分ち、その中 1 つの区は対照区として H-ase を添加せず、他の 4 つの区は試験区として、それぞれ稀釈精液 1 cc. に対しスプラーゼを 100V. U. M., 500V. U. M., 1,000V. U. M. 及び 2,000V. U. M. づつ添加した。此の試験に用いた精液は 6 例であつて、精液原液 1 cc. 中の精子数は 1133 百万乃至 1970 百万、平均 1371 百万であつた。

高単位添加試験では、供試精液は 5 倍に稀釈してから 6 つに区分し、1 つの区は対照区として H-ase を添加せず、他の 5 つの区には、それぞれ 10,000V. U. M., 30,000V. U. M., 50,000V. U. M., 70,000V. U. M. 及び 100,000V. U. M. のスプラーゼを添加した。此の試験に用いた精液は 7 例であつたが、その原液 1 cc. 中の精子数は 2055 百万乃至 883 百万平均 1006 百万であつた。

そのほか、20 倍稀釈精液 2 例 (精液原液の平均精子濃度 1032 百万/cc.) につき上述の H-ase の量をもつて高単位添加試験を行つた。

さらに 50 倍稀釈精液 9 例 (精液原液の平均精子濃度 1133 百万/cc.) につき 5 万単位添加試験を行い、同じく 4 例 (精液原液の平均精子濃度 1254 百万/cc.) につき 10 万単位添加試験を

行つた。

なお、3例の精液につき稀釈後、低単位のスプラーゼを添加し 38°C. に保存した場合の影響を観察した。

以上の実験に於いて、試料は褐色尖底試験管に入れてゴム栓を施し、法の如くガーゼを巻いた上にゴムの指サツクをかぶせた。之を温度衝撃をさける為に水道水を充たしたビーカー中に立て、6°C. の電気恒温冷蔵庫の中に保存した。また 38°C. 保存試験のものは、恒温水槽の中に保つた。

試料の観察は 12日間以上にわたり精子が全く動かなくなるまで行われた。その間、毎日一定の時刻に、はじめは3回、次いで2回、中頃からは1回各試験管から少量の試料をとり出して懸滴標本となし、顕微鏡標本加温装置で 37°C. に加温して鏡検した。精子の活力や生存率の観察は各試料につき6視野づゝについて行いその平均値を求めた、而してその活力等の記載は本邦で普通に行われている方法によりその活動力並びに百分率を併記した。

### 実験成績並びに考察

#### (1) 5倍稀釈精液に対する低単位 H-ase の添加

6例の精液を用い、各精液は5倍に稀釈してその1cc. に対し 100v. U. M. 乃至 2,000v. U. M.

Table 1. Effect of several low dosage levels of hyaluronidase on the mean percentage of motile sperm during a 10-day storage at 6° C.

Hours after adding	Control		Hyaluronidase added							
			100v. U. M.		500v. U. M.		1000v. U. M.		2000v. U. M.	
	mean % of motile sperm	ratio	mean % of motile sperm	ratio	mean % of live sperm	ratio	mean % of motile sperm	ratio	mean % of motile sperm	ratio
Initial	74.0	100	74.0	100	74.0	100	74.0	100	74.0	100
8	68.7	92.8	68.3	92.3	72.2	97.6	71.3	96.4	69.4	93.8
12	62.5	84.5	65.1	88.0	65.0	89.2	71.3	96.4	68.5	92.6
24	56.8	76.8	55.9	75.5	62.5	84.5	63.4	85.7	59.0	79.7
48	50.1	67.7	48.6	65.7	52.4	70.8	51.1	69.1	50.5	68.2
72	43.3	58.5	43.5	58.8	42.8	58.0	46.9	63.4	42.0	56.8
96	38.1	51.5	37.6	50.8	42.2	57.0	40.6	54.9	39.4	53.2
120	32.9	44.5	30.0	40.5	31.2	42.2	34.5	46.6	33.0	44.6
144	27.6	37.3	29.9	40.4	29.0	39.2	29.9	40.4	26.7	36.1
168	23.3	31.5	22.0	29.7	22.0	29.7	22.0	29.7	22.0	29.7
192	20.6	27.8	20.5	27.7	18.9	25.5	20.2	27.3	19.5	26.4
216	20.1	27.2	20.0	27.0	18.6	25.1	19.6	26.5	19.0	25.7
240	19.6	26.5	20.0	27.0	18.3	24.7	19.6	26.5	19.0	25.7

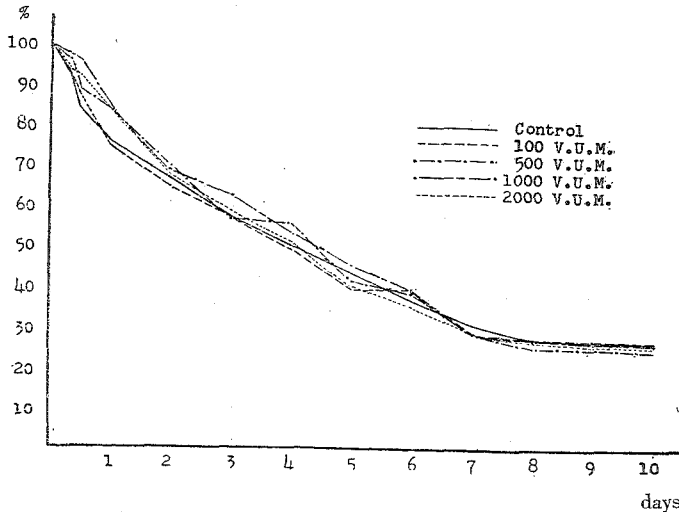
The mean spermatozoa concentration of the six ejaculates used in this experiment was 1371 millions per milliliter ranging from 1133 to 1970 millions.

These semen samples were diluted 1 : 5 with a diluter composed of one part by volume of fresh egg yolk and three parts by volume of "Crusco-citrat" ("Crusco-citrat" is a preparation for diluent of semen of Sanko Kagaku Co., Ltd., and contains glucose 3% and sodium citrate 2.35%).

For hyaluronidase, "Sprase" was used which a preparation of testicular hyaluronidase of Mochida Pharmaceutical Manufacturing Co., Ltd., and its unit was called the v. U. M. (Viscosity Reducing Unit of Mochida).

Fig. 1. Effect of added hyaluronidase on the spermatozoa motility.

(Dilution 1 : 5, low dosage of hyaluronidase, storage at 6°C)



Initial mean percentage of motile spermatozoa was plotted as 100%.

たが、これらの点に於いても対照区と試験区の間には差があるとは云えない。

Table 2. Effect of several high dosage levels of hyaluronidase on the mean percentage of motile sperm during a 10-day storage at 6° C.

Hours after adding	Control		Hyaluronidase added									
			10,000 V.U.M.		30,000 V.U.M.		50,000 V.U.M.		70,000 V.U.M.		100,000 V.U.M.	
	mean % of motile sperm.	ratio	mean % of motile sperm.	ratio	mean % of motile sperm.	ratio	mean % of motile sperm.	ratio	mean % of motile sperm.	ratio	mean % of motile sperm.	ratio
Initial	78.5	100.0	78.5	100.0	78.5	100.0	78.5	100.0	78.5	100.0	78.5	100
8	72.6	93.0	70.9	90.8	71.4	91.2	71.3	91.1	69.8	89.1	67.9	87.0
12	71.3	91.5	69.4	88.8	68.7	87.9	67.2	86.4	67.9	86.8	66.4	85.0
24	67.2	86.2	63.5	81.1	61.8	79.4	55.5	70.9	60.9	77.6	58.5	75.0
48	53.3	68.3	58.9	75.2	56.5	72.0	48.7	62.1	48.5	61.6	47.4	60.3
72	45.7	58.7	52.3	65.8	48.9	62.2	38.8	48.7	40.2	51.4	39.5	45.9
96	40.3	51.6	45.6	58.1	41.9	53.1	35.5	41.3	34.7	44.5	30.8	39.2
120	35.5	45.1	38.8	49.4	36.3	46.1	32.1	40.6	29.6	38.0	25.6	32.6
144	31.3	40.1	32.7	41.7	31.2	39.8	28.9	36.8	22.8	29.5	19.2	24.9
168	23.8	30.5	27.5	35.2	24.7	31.5	22.9	29.2	16.6	21.6	14.0	18.4
192	14.8	19.4	18.6	23.9	19.2	24.8	16.8	21.7	12.1	16.0	9.6	12.5
216	10.5	13.8	12.8	16.4	12.8	16.5	11.1	14.3	8.5	11.2	6.4	8.1
240	6.3	8.2	7.1	9.0	7.5	9.6	6.9	8.8	4.8	6.2	4.5	5.8

The mean spermatozoa concentration of the seven ejaculates used in this experiment was 1006 millions per milliliter ranging from 2055 to 833 millions.

These semen samples were diluted 1 : 5 with egg yolk-citrate diluter mentioned in table 1.

のスプレーゼを添加して 6°C. に保存し、精子の活力を 2 週間以上にわたり観察した。供試精液は夏季のものであり採取直後に於てもその生存率や活力は必ずしも充分とは云えないものであつたがスプレーゼ添加後 10 日間に於ける活動精子の百分率の平均値及びその指数を一括表示すれば第 1 表の様になつた。生存率が最初の 50 % 以下になつたのは 4 ~ 5 日の間であり、また 10 日後には活動精子の率はどれも最初の 25 % 前後になつた。

## (2) 5倍稀釈精液に対する高単位 H-ase の添加

5倍稀釈精液に対し、1 cc. 当り 10,000V. U. M. 乃至 100,000V. U. M. のスプレーゼを添加した。10日間の各区の活動精子の百分率の平均値及びその指数を第2表に示した。その各々につき分散を分析し、対照区との間の平均値の差の有意性を検定したところ、危険率 P の値は第3表の如くであつた。

Table 3. P value in t-test of difference between the treatment and control regarding the percentage of motile spermatozoa at every 24 hours.  
(Dilution of semen ; 1 : 5, addition ; high dosage levels of hyaluronidase ; storage, 6° C.)

Hours after adding	Hyaluronidase dosage V. U. M./cc.				
	10,000	30,000	50,000	70,000	100,000
24	0.4-0.3	0.6-0.5	0.2-0.1	0.3-0.2	0.2-0.1
48	0.3-0.2*	0.7-0.6*	0.7-0.6	0.4-0.3	0.4-0.3
72	0.2-0.1*	0.6-0.5*	0.4-0.3	0.5-0.4	0.2-0.1
96	0.2-0.1*	0.8-0.7*	0.9-0.8	0.5-0.4	0.2-0.1
120	0.4-0.3*	0.9-0.8*	0.6-0.5	0.5-0.4	0.2-0.1
144	0.8-0.7*	1.0-0.9	0.8-0.7	0.3-0.2	0.3-0.2
168	0.6-0.5*	0.9-0.8*	0.9-0.8	0.4-0.3	0.3-0.2

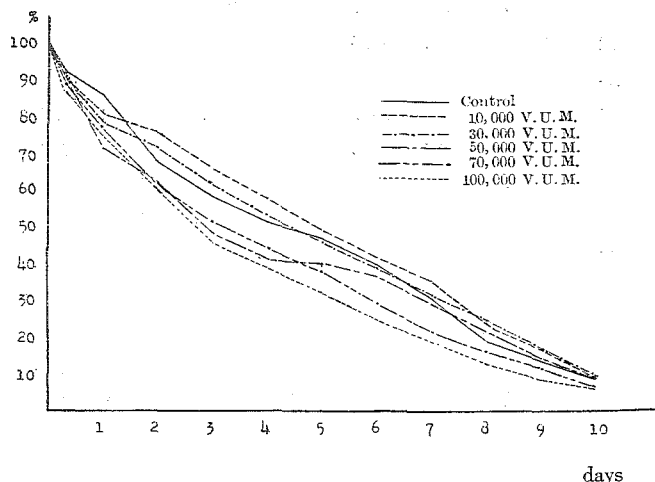
\* Disadvantage for the control.

これによつてみると対照区と試験各区との間に於いて、それらの平均値に推計学上有意の差 ( $P < 0.05$ ) があるとは云えない。併し乍ら P の値からして 30,000V. U. M. 以下では精子の活力は対照区に比し劣らない傾向が認められ、また 70,000V. U. M. 以上になると活動精子は減少する傾向が認められる。100,000V. U. M. になると此の関係は明らかになり、添加後120時間に於ける P の値は 0.2~0.1 であつた。

## (3) 50倍稀釈精液に対する高単位 H-ase 添加

此の実験に於いては、9例の精液に対し 50,000V. U. M. のスプレーゼを添加し、4例の精液に対して 100,000V. U. M. のスプレーゼを添加した。その活動精子百分率の平均値並にその指数を一括して第4表に示した。

Fig. 2. Effect of added hyaluronidase on the spermatozoa motility.  
(Dilution 1 : 5, low dosage of hyaluronidase, storage at 6° C.)



Initial mean percentage of motile spermatozoa was plotted as 100%.

Table 4. Effect of hyaluronidase on the mean percentage of motile spermatozoa in semen which was diluted 1:50.

Hours after adding	Control		Hyaluronidase dosage V. U. M. / cc. 50,000		Control		Hyaluronidase dosage V. U. M. / cc. 100,000	
	mean % of motile sperm.	ratio	mean % of motile sperm.	ratio	mean % of motile sperm.	ratio	mean % of motile sperm.	ratio
Initial	83.0	100.0	83.0	100.0	82.0	100.0	82.0	100.0
8	73.0	88.0	79.1	95.3	75.7	92.3	77.9	94.9
12	70.9	85.4	78.5	94.5	68.5	83.5	73.5	89.6
24	70.7	85.1	77.6	93.4	54.6	66.5	59.9	73.0
48	67.6	81.4	76.0	91.5	50.5	61.5	50.7	61.8
72	48.6	58.6	60.9	73.3	46.6	56.8	47.4	57.8
96	38.0	45.8	40.8	49.2	38.4	46.8	40.1	48.9
120	32.9	39.6	32.7	39.3	35.9	43.8	35.8	43.7
144	25.4	30.7	21.2	25.5	31.9	38.9	28.5	34.8
168	18.5	22.2	13.1	15.8	24.4	29.8	17.6	21.4
192	16.4	19.8	10.3	12.4	14.9	18.2	12.9	15.7
216	13.9	16.7	7.3	8.7	8.9	10.9	8.3	10.1
240	7.5	9.0	3.6	4.3	6.7	8.2	6.5	7.9

H-ase 添加後、略5日位までに於いて、10万単位区は対照区と殆んど差はなかつたが、5万単位区は対照区よりも精子の活力が勝つていた。然し5日以後に於ては何れの場合も対照区に比し精子の活力は劣る様に思われた。併し勿論、活力の減少は推計学上有意のものではなかつた。

なお僅か2例ではあつたが、20倍稀釈精液に対する添加 H-ase の精子に対する影響を観察したが50倍稀釈精液に於けると略同様な結果であつた。また3例の精液につき、5倍稀釈38°C. 保存で添加 H-ase の精子に対する影響を観察したが、此の場合対照区も試験区も略10時間で精子はその活動性を失い、両者の間に於ける差は殆んどみられなかつた。

James E. Johnston & John P. Mixner (1951) は種々の量の H-ase 及び Hyaluronic acid を稀釈牡牛精液に加えて、それらが精子に及ぼす影響を観察している。その実験に於ては0.05cc. の精液が H-ase を加えた稀釈液1cc. と混合されているからその稀釈倍率は略20倍である。その結果、稀釈した牡牛精液1cc. 当り40mg までの H-ase は大きな影響を与えないが Hyaluronic acid は稀釈精液1cc. につき8mg 以上は精子の活動性の抑制を來たすことを報告している。此の場合、精液の PH は殆んど変化がなかつたが、その際示される高い粘度が活動性に影響を及ぼしたかも知れないことを附言している。

前述の James E. Johnston 等の用いた Hyaluronidase は Schering equivalent にして1mg 当り43TRU (Turbidity Reducing Unit 濁度低減単位) の力価の製品であつた。筆者等の用いた持田の H-ase は略15mg で100,000V. U. M. のものであつた。いま、たゞちに両者の力価を比較することは困難ではあるが、Schering equivalent 43TRU の製品40mg は V. U. M. に換算して、おそらく数万単位をくだらないものと想像される。

筆者等の実験に於ては5倍稀釈精液に対し添加 H-ase は推計学上有意の影響を与えない。併

しながら活動精子の百分率の分散分析により危険率  $P$  の値からして、50,000V.U.M. 位の H-ase は何等悪影響はないが、略此の量を超えると精子の活動を鈍らせる傾向があり、100,000V.U.M. ではそれが比較的明らかになつてくることが判つた。50倍稀釈精液では、10日の観察の前半は対照区に比し H-ase を添加した精液では精子の活力は寧ろ多少優れていた様に思われるが後半は多少劣る傾向がみられた。

要するに 50,000V.U.M. 程度の H-ase の精液への添加は精子の活力の低下を来たし人工授精上有害な作用を及ぼすことはないものと思われる。筆者等の前報<sup>9)</sup>の如く、牡牛精液は精液 H-ase として精子1億当たり略 10,000V.U.M. に相当する酵素作用をもっている。また筆者等の未発表成績によつても精子中には精子 H-ase としてさらに多くの酵素が含まれていることが判つている。従つて 100,000V.U.M. 程度のスプレーゼを用いて酵素そのものにより害作用は考え難い。また筆者等は別の実験に於いて精子の酸素吸収量に及ぼす添加 H-ase の影響を研究したが対照区と H-ase 添加区との間に評価すべき結果は認められなかつた。従つて H-ase は少くとも正常精子の呼吸には大きな影響を与えないものと思われる。また安藤 (1951)<sup>10)</sup>等は成熟ラツテに一定量の Testosterone Propionate を注射した場合は睪丸中の H-ase は増加すると報告している。従つてこれらのことから考えると上述の高単位の H-ase による精子の活力の減少は H-ase の毒性と云うよりも寧ろ多量の酵素製品添加によりて生ずるかも知れない滲透圧の変化か又は酵素製品に含まれている不純物質の影響の何れかによるものではないかと想像せられる。而してこれは単に製品の単位のみではなくその精製度が関係してくるものと思われる。

## 要 約

ホルスタイン種4頭、和牛1頭から成る5頭の牡牛から28例の精液を得た。これらの精液を卵黄クエン酸ソーダ稀釈液で5倍、20倍又は50倍に薄め、之に H-ase 製剤を添加し 6°C. に保存したが3例のみは 38°C. に保存した。H-ase としては持田製薬株式会社の睪丸性 H-ase であるスプレーゼを用いた(その単位は V.U.M. で示される)。此の研究に於て、100V.U.M. から 100,000V.U.M. にいたる種々の量の H-ase を稀釈精液 1 cc. に対し添加した。

精子の活力は顕微鏡標本加温装置を用い 37°C. で懸滴標本につき、本邦で普通に用いられている方法により算定した。

5倍稀釈精液に対し種々の量の H-ase を加え 6°C. に保存したとき、50,000V.U.M. 位の量の H-ase は精子の活力に対し推計学上対照区との間に有意の差を与えなかつた。

併し乍ら、活動精子の百分率の  $t$  検定に於ける  $P$  の値からして略 50,000V.U.M. 以上になると精子の活力は衰える傾向がみられた。

此の活力の減少は 20倍又は 50倍稀釈の場合はあらわれ難い様に思われる。

精子の活力に於ける此の減少は H-ase そのものゝ毒性と云うよりも寧ろ大量の H-ase 製剤添加によりて生ずるかも知れない滲透圧の変化か又は酵素製品に含まれている不純物の影響の何れかによるものの様に思われる。

38°C. に保存した場合は H-ase 添加区も対照区と同様、共に略 10時間で精子は活力を失い両者の間に差はみられなかつた。

以上簡単に要約すれば、稀釈した牡牛精液 1 cc. に対して 50,000V.U.M. 位までの H-ase の量は 6°C. の貯蔵に於いて精子の活動性に対し有意な影響を与えない。従つて、略これ位の H-ase の量を精液に添加しても人工授精に於いて精子に有害ではない。

本実験を行うにあたり、スプラーゼの提供を受けた持田製薬株式会社、並びに精液試料を戴いた岡山県岡山種畜場に深謝すると共に石井彰君の御助力に感謝する。

## 文 献

- 1) 安藤晴弘, 上野福寿, 小林修, 川島良子 (1951); ラツテ羣丸の Hyaluronidase 含有量に及ぼす性腺刺激ホルモン投与の影響について 第24回 日本内分泌学会総会講演要旨 (昭和26年4月)
- 2) 浜野藏之助 (1952); ヒアルロニダーゼと脳下垂体機能 日本産科婦人科学会雑誌. 4巻, 5号, PP. 349~355.
- 3) JOHNSTON, J. E. and MINNER, J. P. (1948); Development of hyaluronidase in bull semen. J. Animal Sci., 7~4, PP. 440~446.
- 4) JOHNSTON, J. E. and MINNER, J. P. (1951); Effects of added hyaluronidase and hyaluronic acid on the motility of bull spermatozoa. J. Dairy Sci., 34~2, PP. 116~118.
- 5) 岡本昌三 (1951); 牛精液のヒアルロニダーゼ添加試験 九州農業試験場畜産部. 昭和 25 年度試験成績, PP. 11~12.
- 7) 高嶺 浩 (1953); ウシの精液保存に伴う Hyaluronidase の消長に就いて 医学と生物学 25 (2), PP. 86~89.
- 8) 和田宏, 竹原宏 (1954); 人工授精に於ける Hyaluronidase に関する研究 (1) 牡牛精液の Hyaluronidase 力価について (日本畜産学会誌三十周年記念号に投稿, 印刷中)