

人工授精に於ける Hyaluronidase に関する研究

(4). 牡牛精液の受精力に対する Hyaluronidase 製剤の効果

和田 宏・竹原 宏*・湯原正高

Studies on Hyaluronidase in the Artificial Insemination

(4) Effect of Hyaluronidase Preparation on the Fertility of Bull Semen.

Hiroshi WADA, Hiroshi TAKEHARA* and Masataka YUHARA

To study the practical value of hyaluronidase preparation in the artificial insemination of the cattle, the following four experiments were carried out, and according to the results of these and those reported in the previous reports, discussion was made on the effect of hyaluronidase preparation in the artificial insemination.

For the hyaluronidase preparation "Sprase" was used.

(1) Experiments are summarized as follows.

Experiment I;

Forty-seven services were made to 35 Holstein cows. In 34 services of them, Sprase of 2,000 v. r. u. or 5,000 v. r. u. dissolved in 1 cc. of normal saline was put into the cervix about 20 to 30 minutes before insemination. The rest 13 services were the control and in which Sprase was not injected. No appreciable effect of the preparation on the fertility was not obtained (table 1).

Experiment II;

Sixty-one of Holstein cows that had the first calving were inseminated by the semen diluted 1:3 with fresh egg yolk. Of 39 cows which did not conceive from the first service though they had normal reproductive organs and were free from any disturbances in their genital tracts, 26 cows were inseminated by the semen diluted as above mentioned with Sprase of 5,000 v. r. u. per one cc. added. The number of services that they received were 45. The rest 13 normal cows were the control, and received 22 services (table 2). Conception was determined by rectal palpation. Fertility was about 58% in both groups respectively. These insemination records were shown in table 3. Consequently, effect of adding hyaluronidase on the fertility of bull semen was not recognized.

Naturally, there was no effect on the sex of the young.

Experiment III;

* 岡山県立中国酪農講習所 技師

The semen from 3 Holstein bulls was diluted with egg yolk-glucose-citrate diluter and 5,000 v. r. u. of Sprase was added to the semen diluted seven times, 10,000 v. r. u. of Sprase to the semen diluted fifty times, and 40,000 v. r. u. of Sprase to the semen diluted seventy times respectively. In the test, the cows were inseminated by the semen treated and the total number of services was 71. In the control, cows were inseminated by semen without Sprase and the total number of services was 123. There was no effect of hyaluronidase preparation on the fertility in this experiment either (table 4).

Experiment IV ;

Thirty-two semen samples were obtained from 4 bulls (3 Holsteins and one of the Japanese Black breed). No correlation between the semen-hyaluronidase and fertility could be found, and this is to be expected from the results in above experiment (table 5).

(2) Sprase of 40,000 v. r. u. was put into the cervix of a cow about 5 minutes before insemination. In spite of ovulation having occurred as judged by the rectal palpation and in spite of insemination having been tried in 3 estrus periods with such a dosage as 40,000 v. r. u., she failed to conceive.

(3) From the results obtained in this study, effect of hyaluronidase preparation in the artificial insemination of cattle cannot be recognized. The evidences, reported by other investigators, supporting the conclusion are given below and discussion has been made as follows.

a). Hyaluronidase preparation added to semen in amount which results in no decrease of viability and motility of spermatozoa is not absorbed by the spermatozoa.

b). In the normal semen, spermatozoa seemed to possess the enzyme in an amount sufficient to play its role and it seems not necessary to add the preparation.

c). It has been reported that amongst the ungulates the corona radiata cells disappear soon after ovulation. The absence of these cells has been recorded for the cow (Hartman et al., 1931; Evans and Miller, 1935, and Hamilton and Laing, 1946). There have been similar records for the sheep, the pig and the horse. Therefore the dissolution of the corona radiata cells may be not an essential premise for fertilization in these animals.

d). It has been observed in the mouse and in the rat that spermatozoa penetrate into the ovum with the follicle cells attached to it.

(4) But the present writers do not completely deny roles of hyaluronidase in fertilization. According to the suggestion given by Yamane (1952), we should have to see much of meaning in hyaluronidase after penetration into the ovum by spermatozoa as well as before the penetration.

哺乳類の卵管卵子を囲繞する Corona radiata や Follicle cell は hyaluronic acid を含む粘稠物質で纏結されており, hyaluronidase [以下 H-ase とす] はこの hyaluronic acid を depolimerize してその粘度を減じ, 周囲の細胞を分散させて卵子を裸出せしめて精子との選合を可能ならしめるものと解釈されている. この様な見解に基づきヒトまたは家畜に於いて H-ase の応用による受胎率の増進, または一部, 不妊症の対策として多くの実験が行われている. 今までに報告せられた H-ase を用いての授精試験は, 此の酵素を精液に対し直接添加するものと授精または性交前に子宮頸管内に注入するものとの二つに分けられる.

ヒトに就ては Morieard (1946) は前者の方法で Kurzrok (1946) は後者の方法で, かなり良い成績を得ている. 極く少数例ではあるが本邦では高島 (1951) や渡辺 (1952) の肯定的報告がある. Rowland (1944) はそのままでは受精させ得ない様な稀釈精液でも H-ase の添加により受精させ得ることを家兎で実証し, 此の酵素添加により精子濃度は普通の場合の稀釈度の 1/6 で足りると云っている.

これに反し Seigler (1947) はヒトにつき受精上に於ける H-ase の効果を否定しており, また Change (1947) は家兎で此の酵素は受精と無関係であり, 家兎精液中の受精有効成分は, その上清にあると云っている.

Sallman and Birkeland (1947) は H-ase の濃度に有効な閾値があり, 閾値以上は却つて有害であると報じ Johnston and Mixner (1950) は牛に於いて酵素濃度と受胎率は全く無関係であると云っている. 最近, 高嶺等 (1954) は不妊牛に於ける受胎増進に対する H-ase の効果の肯定的報告をしている. その他, 子宮又は頸管粘液中での H-ase の意義に関しても種々の報告がある. 斯くの如く H-ase の受精に於ける意義, 効果に関しては必ずしも見解が一致していない.

筆者等も昭和27年以來, 牛の人工授精に於ける H-ase の応用効果に関する二, 三の実験を行ったので, その成績を報告し, 且つその応用価値に対する検討を加え度い.

実 験 方 法

H-ase 製剤を用いて三種類の授精試験を行い, また別に測定した精液につき, その精液 H-ase と受胎率の間の相関係数を求めてみた. 本研究に於いて用いた H-ase 製剤は持田製薬の辜丸性 H-ase 製剤である Sprase であった. 而してその酵素単位 V. U. M. は筆者等が精液 H-ase などの測定にあたり用いた粘度低減単位 v. r. u. と一致するものである.

〔I〕第1試験, 子宮頸管内注入 H-ase の受胎上の効果に関する試験

これは岡山市内に多数のホルスタイン種乳牛を繋養する K 牧場の協力を得て昭和27年8月2日より同年9月24日までの間に行つたものである.

供試精液は K 牧場繋養の牡牛1頭から膣内採取法によつて採り, それを新鮮卵黄で2倍に稀釈し, さらに注入前にリングル氏液で2倍, 都合4倍に稀釈した. 此の稀釈精液を発情末期の最適期と思われる時期に子宮頸管内に注入した. Sprase は1回に 2,000 V. U. M. または 5,000 V. U. M. を使用し, これを1cc. の生理的食塩水に溶かして精液注入前 20~30 分に頸管内に注入した. 41頭のホルスタインまたはホ種系牝牛に延56回の授精を行つたが後日検査により卵巣囊腫その他の蕃殖障害及び異常発情であつたものを除外して, 結局35頭の正常牛について行つた延47回の授精について成績を求めた.

これらのうち, 同一日に発情した牛の一部から公平に1~2頭を選んで対照とし, これには

Sprase を注入しなかつた、而してその回数は13回であつた。従つて Sprase を注入したのは34回で、そのうち14回は、2,000 V. U. M. の酵素を、残りの20回は5,000 V. U. M. の酵素を夫々1回に使用した。

授精後2～3カ月のうちに発情の到来しないものをもつて受胎とみなして受胎成績を求めた。

〔Ⅱ〕第2試験、低倍率稀釋精液に添加せる H-ase の受胎上の効果に関する試験

これは岡山県邑久郡畜産農業協同組合の協力のもとに昭和27年11月27日から同28年2月11日までの間に行つたものである。

供試精液は同協同組合繋養のホルスタイン種牝牛から横取式人工膈法で採取したもので精子活力は何れも80%以上のもののみであつた。採取精液は新鮮卵黄2:精液1の割合、即ち3倍に稀釈して保存した。授精直前に上記稀釈精液1cc. に対し Sprase を5,000 V. U. M. 添加して子宮頸管内に注入した。授精後2カ月目に直腸検査により妊否を判定し、また分娩後は一応参考の爲に産犢の性別も調査した。

供試牝牛として先づ61頭の初産のホルスタイン牝牛を選び Sprase を用いないで普通の人工授精を行つた。そのうち1回の人工授精で受胎した16頭及び後日検査の結果、異常発情その他卵巣、生殖器疾患のあるもの6頭を除外し、結局第1回の授精で受胎しなかつた39頭の牝牛を実験に供した。このうち13頭は対照として普通の人工授精を実施し、他の26頭は試験区として Sprase を添加した精液で人工授精を行つた。対照区、及び試験区の授精回数は夫々22回及び45回であつた。

〔Ⅲ〕第3試験、高倍率稀釋精液に添加せる H-ase の受胎上の効果に関する試験

この試験は岡山県岡山種畜場の協力のもとに昭和27年8月1日から翌年1月18日までにホルスタイン種牝牛に対し行つたものである。

供試精液は同種畜場繋養のホルスタイン種牝牛3頭から擬牝台、人工膈法により採取し、採取後、常法に従つて卵黄グルコチトラートで稀釈し、5～6°C. に冷蔵し、用に臨んでその1cc. 宛を子宮頸管内に注入した、同一の精液を試験用と対照用に区分し、試験用のものは稀釈時に Sprase を添加した。添加酵素量は稀釈精液1cc. に対し5,000 V. U. M. 10,000 V. U. M. または40,000 V. U. M. とした。

5,000 V. U. M. 添加の場合の供試精液は12例で、授精回数は試験区26回対照区37回であつた。これら精液の稀釈度は試験区及び対照区とも同一にし精液原液を平均略7倍稀釈にした。10,000 V. U. M. 添加の場合の供試精液は14例でその授精回数は試験区24回、対照区、54回であつた。供試精液のうち対照区用のものは精液原液を平均略7倍に稀釈し、試験区用のものに限る精子濃度をさらに略1/7にした。

即ち試験区用の精液の精子濃度は原精液のそれからみると略1/50になり、対照区用の精液のそれからみると略1/7になつてゐるわけである。

40,000 V. U. M. 添加の場合の供試精液は6例であり、その授精回数は試験区21回、対照区32回であつた。これらの精子濃度は、対照区用のものは原精液のその平均、略1/7であり、試験区用のそれは原精液のその略1/70であつた即ち試験区の精子濃度は対照区のその1/10にしたわけである。

此の試験に於いて試験区合計71回、対照区合計123回の授精が実施されたが、その後、2、3カ月の中に発情の徴候のないものをもつて受胎とみなした。

〔Ⅳ〕精液の H-ase とその受精率の相關

筆者等は蒸留水で稀釈した無処理精液の H-ase を McClean の方法を僅かに変更した粘度法

で測定し、之を精液 H-ase (semen-hyaluroindase) と称したことは、既に報告⁽²¹⁾した通りである。

此の研究の目的のために用いた精液は岡山県岡山種畜場繋養のホルスタイン種3頭、黒毛和種1頭、計4頭の種牡牛から採取したものである。昭和28年4月16日から翌年3月9日までの間に H-ase を測定した精液のうちの32例につき各精液の採取後5時間に於ける精液 H-ase 力価と受胎率の間の相関係数を求めた。これらの精液は卵黄-葡萄糖-枸橼酸緩衝液で略10倍に稀釈して用いられたがその総授精回数は167回であつた。その受胎率は授精後60乃至90日に於ける発情の再来しないことをもって判定した。

なほ精液のうち5例、授精回数にして17回は黒毛和種のものであり、他は全部ホルスタイン種のものであつた。

試験成績及び考察

授精に先だつて子宮頸管内に H-ase を注入した場合の第1試験の結果は第1表に示した。この第1試験の受胎成績は全般的に悪いが、これはK牧場は搾乳専業の牧場で平素よりあまり受胎率が良くなかつた上に、夏季の受胎率の最も悪い時期に試験が実施された爲である。

少数例で決定的なことは云えないが試験区の2,000 V. U. M. 注入区と5,000 V. U. M. 注入区の受胎率の間に差はみられない。これだけの結果からみると対照区よりも試験区の方が受胎率が良くなつてゐる。併しながら H-ase を注入した試験区の受胎率も一般の人工授精の受胎率に比べて決して良好とは云えない。頸管内への H-ase の応用により Kurzrock や高嶺はそれぞれヒト及び不妊牛で、ある程度の効果の肯定的報告をしている。筆者等の行つた第1試験の結果からは H-ase の効果を肯定することは出来ない。

Table 1. Effect on fertilization of hyaluronidase preparation put into the cervix of cow about 20 to 30 minutes before insemination.

Group	Amount of hyaluronidase preparation, injected	Services	Nonreturns	Fertility(%)
Treatment	2,000 v. r. u.	14	6	43
	5,000 v. r. u.	20	9	45
	Total	34	15	44
Control		13	4	30

(1) For the hyaluronidase preparation, "Sprase" was used in this study. It is a testicle hyaluronidase preparation of the Mochida Pharmaceutical Mfg. Co., Ltd. and furnished sufficiently by the same company.

(2) One cc. of the semen diluted 1:4 was inseminated into the cervix in each service in above experiment.

(3) Fertility estimates were based on the percentage of nonreturns to services, after a 60- to 90-day period following service.

This is common to table 4 and table 5.

稀釈度の比較的低い精液に H-ase を添加した第2試験の結果は第2表に示した。これに於ては対照区、試験区ともに受胎率は殆んど同様に58%前後であり、その間に差異はない。各牝牛に対する授精回数と受胎の関係及び補足的に調査した産犢の性別等は第3表に示した。もとより例

数が少ないので得られた結果から H-ase の効果に関して即断することは許されないが、少くともこれだけの結果からすると精液に添加した此の程度の H-ase により受胎率の増加を期待する

Table 2. Effect on fertilization of hyaluronidase preparation added to the semen of lower dilution.

Group	Cows	Services	Nonreturns	Fertility(%)	Sex of the young ♀ : ♂ : (?)
Treatment	26	45	26	59	10 : 13 : (3)
Control	13	22	13	58	9 : 3 : (1)

(1) One cc. of the semen diluted 1 : 3 was used in each service.

(2) Conception was determined by rectal palpation.

Table 3. The insemination records of cows mentioned in table 2.

Group	Cow no.	Service					Sex of the young
		1st	2nd	3rd	4th	5th	
Treatment	1	×	○				♂
	2	×	○				♀
	3	×	×	○			♂
	4	×	○				♀
	5	×	×	○			♂
	6	×	×	○			♂
	7	×	○				♂
	8	×	○				?
	9	×	○				♀
	10	×	×	×	○		♂
	11	×	×	○			♂
	12	×	×	○			♂
	13	×	×	○			♀
	14	×	×	○			♂
	15	×	×	×	×	○	?
	16	×	×	×	○		♀
	17	×	○				♂
	18	×	○				♀
	19	×	×	×	○		♂
	20	×	○				♀
	21	×	○				♀
	22	×	×	○			♀
	23	×	×	○			♂
	24	×	○				♀
	25	×	○				♂
	26	×	×	○			?

Group	Cow no.	Service					Sex of the young
		1st	2nd	3rd	4th	5th	
Control	27	×	×	○			♀
	28	×	○				♀
	29	×	×	○			♀
	30	×	×	○			♀
	31	×	×	×	○		♂
	32	×	×	○			♂
	33	×	○				?
	34	×	○				♀
	35	×	×	×	○		♀
	36	×	○				♀
	37	×	×	○			♂
	38	×	○				♀
	39	×	○				♀

○ Conceived × Not conceived

At the first service, hyaluronidase preparation was not added to the semen in the treatment

ことは出来ない様に思われる。従つて勿論、産仔の性別等に対しても何等影響のないことは調査結果によつても明らかである。

また、異狀牛即ち授精後、検査の結果、明らかになつた卵巢囊腫牛 5 頭、永久黄体残存牛 1 頭は受胎率の計算から除外したことは前述した通りであるがこのうち、卵巢囊腫牛 3 頭、永久黄体残存牛 1 頭、計 4 頭に対し 1 cc 当り 5,000 V. U. M. の H-ase を添加した精液で延 10 回の授精を行つたことになつたがこれらは当然無効であつた。

H-ase を添加した比較的高倍率稀釈精液をもつて行つた第 3 試験の結果は第 4 表に示した。此の実験は盛夏の候のものも含まれており受胎率は望はましいものではなかつた。

第 3 試験 A に於ては略 7 倍稀釈精液に対し、種々の精子濃度の精液 1 cc. に対し Sprase 5,000 V. U. M. を添加したのであるが、試験区、対照区夫々 26 回及び 37 回の授精に於いて両者とも受胎率は夫々、略 43% で両区の間に差はみられなかつた。

第 3 試験 B に於ては試験区の精子濃度は対照区の精子濃度（原精液の平均略 1/7）の略 1/7 であつた。精子濃度の点では不利であつたにもかかわらず試験区の方が却つて受胎率が良かつた。

第 3 試験 C に於ては精子濃度が対照区の 1/10 の精液に 1 cc. 当り 40,000 V. U. M. の H-ase を添加したのであるが、試験区及び対照区の受胎率は夫々 38% 及び 56% で対照区の方が多少優れている様に思われた。

併し乍ら各精液につき、夫々、試験区及び対照区の受胎率を角変換して統計処理を行つたところ第 3 試験 A, B 及び C の各区に於いて各々の精液の受胎率の平均値に於ける試験区と対照区の間を差を検定した処、P の値は次の様になり夫々の区に於いて対照区と試験区の間有意差はな

Table 4. Effect on the fertilization of hyaluronidase preparation added to the semen of higher dilutions.

Expt.	Hyaluronidase dosage per cc.	ejaculates	Group	Rate of dilution	services	nonreturns	Fertility (%)
A	5,000 v. r. u.	12	Treatment	1 : 7	26	11	42
			Control	1 : 7	37	16	43
B	10,000 v. r. u.	14	Treatment	1 : 50	24	14	58
			Control	1 : 7	54	22	42
C	40,000 v. r. u.	6	Treatment	1 : 70	21	8	38
			Control	1 : 7	32	18	56
Total		32	Treatment		71	33	45
			Control		123	56	46

One cc. of the diluted semen was used in each service.

かつた。

Expt. A P : 0.4~0.3

Expt. B P : 0.6~0.5

Expt. C P : 0.4~0.3

授精試験では牝牛の状態を完全に一樣にすることは困難であり少数例の統計処理を、そのまま信用することは危険であると思われるが、これらの実験の結果、50乃至70倍くらいに稀釈した精液に精子の活力を減退させない程度に H-ase を添加した場合、7倍くらいに稀釈した対照区との間に於いて受胎率に有意差のないことが示された。

稀釈液の種類によつて異なることではあるが、T. P. Verevkina & P. N. Statkin や A. N. Volkov または E. P. Karashev が GPC~3 または GPC~4 を用いて稀釈と牛の精液の受精力の関係を試験した成績によれば精液の原液または16倍以下の稀釈に比し、32倍または64倍稀釈の場合の受精率の方が前者よりも若干優れているか、または少くとも前者に劣らないことを示している⁽⁶⁾。従つて筆者等の実験の受精率に於いて7倍稀釈の対照区と50乃至70倍に稀釈し H-ase を添加した試験区の間には差がないが、之を直ちに H-ase の効果に帰し、それにより受精率の低下が防止せられたと断定することは出来ない。筆者等が得た受胎率は牛の一般の人工授精に於けるそれに比して決して優れたものではなく、むしろ低い位である。以上の様なことから第3試験に於ても添加 H-ase の効果を肯定することは出来ない。

第4試験の結果は一括して第5表に示した。

32例の精液で行つた167回の授精に於いて71頭が受胎し平均受胎率は42%であつた。

精液 H-ase と受胎率の間の相関係数 (r) は次の様になつた。

$r=0.114$ P : 0.6~0.5

従つて精液 H-ase と受胎率の間には何の関係もないことが明らかになつた。これは Johnston and Mixner の成績と一致し、上述の第1乃至第3試験の成績を裏付ける様に思われる。

Table 5. The relation of fertility of bull semen to the level of semen-hyaluronidase.

Name of bull.	Date on which semen was obtained.	5-hr. semen-hyaluronidase level, v. r. u./cc.	services.	nonreturns.	Fertility. (%)
King Done	4/16/53	192,088	4	3	75.0
	4/20/53	66,607	5	3	60.0
	6/ 5/53	110,569	4	2	50.0
	6/17/53	76,408	9	6	66.6
	6/23/53	93,610	6	1	17.8
	8/ 4/53	94,047	3	1	33.3
	8/10/53	82,117	7	1	14.2
	9/ 5/53	130,000	5	2	40.0
	9/ 1/53	101,250	6	2	33.3
	10/19/53	92,250	4	2	50.0
	12/10/53	80,750	6	3	50.0
	12/18/53	107,000	10	5	50.0
	11/10/53	87,082	3	2	66.6
	9/ 9/53	120,000	4	2	50.0
	2/20/54	125,229	8	5	62.5
	3/ 8/54	103,840	2	1	50.0
King Gemima	6/19/53	101,034	6	1	17.8
	6/25/53	100,668	4	2	50.0
	8/ 6/53	113,395	5	2	40.0
	9/ 3/53	155,000	7	3	42.8
	9/11/53	114,250	4	3	75.0
	9/15/53	94,750	7	2	28.5
	1/21/54	116,850	9	3	33.3
Carnation Imperial	5/28/53	91,032	6	1	17.8
	6/21/53	111,758	8	2	25.0
	8/ 2/53	107,864	5	2	40.0
	2/28/54	127,771	3	2	66.6
Chine*	6/22/53	87,737	2	2	100.0
	7/ 3/53	78,951	2	1	50.0
	8/ 4/53	96,457	6	2	33.3
	8/18/53	103,242	5	1	20.0
	3/ 9/54	78,823	2	1	50.0
Total			167	71	42.0

* An asterisk represents the bull of Japanese Black breed.

The correlation coefficient of 0.150 ($P: 0.6-0.5$) was obtained between the semen-hyaluronidase level and the fertility.

筆者等は前報⁽²¹⁾に於いて精液中の H-ase を精漿 H-ase と精子 H-ase に分け、精子 H-ase をさらに分けて活性又は表在性 H-ase と内在性又は潜在性 H-ase とし、筆者等の云う精液 H-ase は精漿 H-ase と活性精子 H-ase の合計であることを示した。さらに活性精子 H-ase と潜在性精子 H-ase の比は略 4:6 であり、精子 H-ase は精液 H-ase の略 1.5 倍の酵素力価をもっており、潜在性精子 H-ase 自体が精液 H-ase と略、同量であり、精漿 H-ase は採取後 5 時間に於いて精液 H-ase の 1/2 乃至 1/3 であることを明らかにした。

また同じく前報⁽²⁰⁾に於いて添加 H-ase は 60,000 V. U. M. くらいでは殆んど精子に吸着されず 120,000 V. U. M. くらいの添加では、その若干が精子に吸着せられるが、これらの添加量は何れも精子の正常の活力の維持の限界を超えている。従つて添加 H-ase により有効的に精子 H-ase の量を増えることが出来ないとするのが至当であること証した。

精液の中の H-ase が受精に関与するとしても之を単に *Corona radiata* の分散と云う観点からする受精前期のみならず、山根 (1952) の示唆する如く受精後期に就いても H-ase の作用を考えるべきであろうと思われる。受精前期に作用するものは精液 H-ase であろうし、受精後期に作用するとすれば主として精子 H-ase であり特に潜在性精子 H-ase は重要な役割を果たすものと思推せられる。然しながら添加 H-ase が精子に吸着されないと考えられる以上、受精後期に於ける添加の効果を期待することは無理の様に思われる。

性器内に注入された色素や染色精子が交尾によつて生ずる卵管や子宮の運動により卵管上部に達することが知られている。併しおそらくは性的感動を伴わないであろうと思われる人工授精に於いて、その様な生理的作用を必ず伴うかどうか疑問であるが、若しその様なことがあれば添加 H-ase は精漿と共に卵管上部の受精の場にまでも達するわけである。

本実験に於て 40,000 V. U. M. 程度以下の添加により受胎率の向上は望めなかつたし、勿論、用量による差異も認められなかつた。また既述のものとは別に邑久郡に於て直腸検査で診断して排卵の確実なホルスタイン種の牝牛 1 頭に対し人工授精前 5 分に 40,000 V. U. M. の H-ase を頸管内に注入したが 3 回とも受胎効果はなかつた。

10,000 V. U. M. の H-ase は前報⁽¹⁹⁾により略、精子 1 億の精液 H-ase に匹敵する。精液原液の精子数を 10 億と仮定すれば 10 倍稀釈精液 1 cc. 中の精液 H-ase は略 10,000 V. U. M. となる。従つて 10,000 V. U. M. の酵素の添加は即ち酵素量を略、倍増することになるわけで、何程かの効果の期待も可能と思われる。然るに望ましい受胎成績が得られなかつたことは添加酵素が受精の場に達しなかつたか、精子が本来、充分の量の酵素を有しており添加酵素が効力を発揮する余地がなかつたか、または酵素そのものが受胎増進上の効果を欠くかの何れかであろう。

Leonard & Kurzrok (1945) は白鼠卵は牛睾丸 H-ase 0.1~0.5mg. で略 1 時間内に裸出されると報じており、また大谷⁽⁷⁾ は家兎卵につき大量の H-ase で数分以内に裸出するが 0.01mg. の小量 (之は 0.0045 cc. の人の精液 即ち 1 回射精量の 略 1/600 に相当する) でも約 2 時間後には *Zona Pellucida* の一部は裸出することを観察している。従つて極く微量の酵素でも受精の機会を増すものであり、稀釈した場合でも本来の精子 H-ase で必要限度を超えて充分の余裕があり、正常精液では H-ase の添加などは全く不必要なことではあるまいかと思われる。

McClellan & Rowland (1942), Fekete & Duran-Reynals (1943) や Pincus (1930) その他の研究者の提唱した H-ase の意義からすれば受精前期に於ける *Corona radiata* の分散が H-ase の主たる役割であろうと解釈せられる。事実、卵管卵子が常によく発達した *Corona radiata* で囲まれていることはウサギ (Gregory, 1930; Pincus and Enzmann, 1932) モルモット (Squir, 1932) ラツテ (Gilchrist and Pincus, 1932) マウス (Lewis and Wright, 1935) ネコ (Hill

and Tribe, 1924) イヌ (Evans and Cole, 1931) ヒト (Allen et al., 1930; Hamilton, 1944) などで観察されている。

然るに一方 Leonard etc. (1947), Austin (1948), Lewis & Wright (1935) 等はラツテまたはマウスで卵胞細胞の分散前に精子が Perivitelline space に侵入していることを報告しており, また卵が卵胞細胞に囲まれたまま精子の侵入を受けていることを Bowman (1951) はラツテに就て, Amoroso はネコに就て略同様なことを観察している。従つて他の動物は別として, 之等の動物では Follicle cells や Corona radiata の分散が受精の必須前提条件であるとする諸説に疑問を生ずることになる。

また有蹄類の或るものでは Corona radiata は排卵後, 間もなく消失するものであり, ウシ (Hartman et al., 1931; Evans and Miller, 1935; Hamilton and Laing, 1946) ヒツジ (Assheton, 1898; Mckenzie and Allen, 1933; Clark, 1934; Mckenzie and Terrill, 1937) ブタ (Assheton, 1898; Corner and Amsbaugh, 1917; Heuser and Streeter, 1929) 及びウマ (Amoroso et al., 1939; Hamilton and Day, 1945) では Corona radiata 欠除が報告せられている。

H-ase は Zona pellucida または Vitelline membrane に対して作用するかも知れないが, 上述の事が事実なら follicle cells や Corona radiata が分散せねば受精出来ないと云うことは論拠が薄弱になる様に思われる。批判はあるが, Swyer (1947)⁽⁶⁾ は家兎の卵子の Corona radiata を分散させるものは H-ase ではなくて子宮から生産せられる他の因子に基づくこと云つてゐる。Yielding (1951) はイヌの関節嚢内への H-ase の注入により関節液の Na や K 等の電解質が著るしく増量することを報告している。全く想像の域を脱しないが H-ase が生殖器粘膜表面で略同様な影響を与え組織の透過性を高めることにより電解質のみならず他の酵素や有機物の滲出を助け之が間接に生殖現象になんらかの影響を及ぼすこともあるかも知れない。

精子と卵子が合一し着床するまでには精子の条件, 卵子の条件, それらの通路となる性導管の条件, 受精卵の着床を全うせしめる条件など多くの要因が関与しており, 妊娠と診断されるのは着床卵が完全な發育した場合であるから, それには一層多くの要因が関与することになる。従つてたとえ H-ase に受胎増進上の効果があるとしても, その率は比較的低いものとなるであろう。

大多数の哺乳類の無精卵は輸卵管末端部に達すると Corona cells は剝離するし細胞自体内に於ける変化によりそれらの分散がもたらされると云うことも唱えられている⁽⁹⁾。活動精子の存在は Corona cells の分散を助けるが, 併し無精卵でも, 自然にそれらの細胞は崩壊することが観察されているので, 精子は必ずしも必要な要因とはならない様でもある。また山根(1930, 1935)の実験から H-ase でなくても Pancreatin の様な proteolytic enzyme でも Corona cells は分散する様に思われる。透明帯に貫入し之を通過するに種々問題はありと思はれるが, それに要する H-ase は本来の精子 H-ase で量的に充分であるのではあるまいか。

以上要するに本実験に於ては H-ase の正常な精液への添加または子宮頸管内への注入による受胎効果を認めることが出来なかつた。その理由に就いては上述の如く考察された。併し乍ら精液中に, 斯くも多量の H-ase が存在する以上, その生理的意義を否定するものではない。

ただこれまでの様に Corona radiata の離開のみにその意義を置かず, 山根⁽¹⁷⁾の示唆する如く第二極小体の放出, 従つて受精完了まで即ち受精後期に於ける意義を一層重視せねばならないのではあるまいか。また精子の活力衰退が精子からの H-ase の遊離を伴うことを, これまでの実験が示している以上, 精子の活力を旺盛に保ち, 受精の場及び卵内に, より多くの H-ase を

もたらしことが受胎率向上にとつて最も必要なことと思われる。

総 括

牛の人工授精に於ける H-ase 製剤の実際的価値を研究する爲に次の4つの試験を行つた。それらや前報で得られた結果に基づいて、人工授精に於ける H-ase 製剤の効果に関する論議を行つた。H-ase 製剤としては Sprase を用いた。

(1) 試験を要約すれば次の如くである。

第Ⅰ試験. 子宮頸管内注入 H-ase の受胎効果

35頭のホルスタイン牝牛に対し、計47回の授精を行つた。その中、34回は受精前20~30分に2,000 v. r. u. または5,000 v. r. u. の Sprase を1 cc. の生理的食塩水に溶かして子宮頸管内に注入した。残りの13回は対照区とし H-ase の注入を行わなかつた(第1表)。受胎に対し H-ase 製剤の評価すべき効果は得られなかつた。

第Ⅱ試験. 低倍率稀釈精液に添加せる H-ase 製剤の受胎効果

新鮮卵黄で3倍に稀釈した精液で61頭の初産のホルスタイン牝牛に対し授精を行つた。

生殖器は正常であり何等蕃殖障害はなかつたが第1回の授精で受胎しなかつた39頭の牝牛の中、26頭を試験区とし、上記稀釈精液1 cc. に対し50,000 v. r. u. の Sprase を添加した精液で授精し、その回数は45回であつた。残りの13頭の正常牛を対照区とし H-ase を添加しない精液で授精し、その回数は22回であつた。受胎は直腸検査によつて診断した(第2表)。両群に於ける受胎率は何れも略58%であり、此の実験に於ても牝牛精液の受胎力に対し H-ase の添加効果はなかつた。これらの蕃殖記録は第3表に示した。

当然ではあるが、産犢の性に対しても何等の影響もなかつた。

第Ⅲ試験. 高倍率稀釈精液に添加せる H-ase 製剤の受胎効果

卵黄—葡萄糖—枸橼酸緩衝液でホルスタイン牝牛精液を稀釈し、7倍稀釈精液に対しては5,000 v. r. u., 50倍稀釈精液に対しては10,000 v. r. u., 70倍稀釈精液に対しては40,000 v. r. u. の Sprase を添加した。

試験区では、上述の如く処理した精液で授精し、その回数は計71回であつた。対照区は Sprase を添加しない精液で授精し、その回数は計123回であつた。此の試験に於ても亦 H-ase 製剤の受胎に対する効果は認められなかつた(第4表)。

第Ⅳ試験. 精液 H-ase と受胎率の相関

4頭の牝牛(ホルスタイン種3頭、黒毛和種1頭)から32例の精液を得た(第5表)。それらの精液 H-ase 力価と受胎率の間には相関関係は見出されなかつた。此の事実は前述の実験の諸結果から期待せられることである。

(2) 授精前5分に1頭の牝牛の子宮頸管内に40,000 v. r. u. の Sprase を注入した。直腸検査による排卵の診断にもかかわらず、此の用量に於てさえも、3回とも受胎しなかつた。

(3) 此の研究に於ける諸結果から、牛の人工授精に於ける H-ase 製剤の効果を認めることは出来なかつた。此の結論を支持する様に思われる他の研究者の報告した例証を挙げ、論議を行つた。

a). 精子の生存や活力の減退を來たさない量では、H-ase 製剤を加えても精子に吸収されない。

b). 正常精液に於ては精子は, その役割を演ずるに全く充分な酵素をもっている様に思われ, 製剤の添加は必要でない様に思われる.

c). 有蹄類では排卵後間もなく, 放線冠細胞が消失することが報告されている. 牛に就いてはこれらの細胞の欠除が報告されている (Hartman et al., 1931; Evans and Miller, 1935; Hamilton and Laing, 1946). 同様なことがヒツジ, ブタ及びウマでも記述されている. そこで放線冠細胞の分散はこれらの動物に於ては受精の前提必須条件ではない様である.

d). ラツテやマウスに於ては濾胞細胞で囲まれたままの卵子に精子が侵入しているのが観察されている.

(4) 併し乍ら筆者等は受精の分野に於ける H-ase の役割を否定するものではない.

山根 (1952) により与えられたる示唆により, 卵に対する精子の貫入後に於ける, H-ase の意義も亦その貫入前に於けると同様に一層重視すべきであろう.

本研究を行うにあたり御援助を賜つた, 岡山県岡山種畜場長幸島忠氏, 岡山県邑久郡畜産農業協同組合技師柴田公夫氏及び岡山市内小林牧場技師吉田清氏に対し, また多量の Sprase の提供を戴いた持田製薬株式会社に対し深謝の意を表する.

文 献

- 1) CHANG, M. C. (1947); Effects of testis hyaluronidase and seminal fluids on the fertilizing capacity of rabbit spermatozoa. Proc. Soc. Exp. Bio. Med., 66, PP. 51~54.
- 2) 原興吉, 石川孝一, 筒井政吉, 門脇博 (1953); Hyaluronidase の添加と受胎率に就いて. 獣医畜産新報. No. 111, P. 469.
- 3) JOHNSTON, J. E. and MIXNER, J. P. (1959); Relationship of hyaluronidase concentration to fertility of dairy bull semen. J. Dairy Sci., 33~11, PP. 847~859.
- 4) 加来道隆 (1951); 拡散因子. 医学書院.
- 5) 加来道隆 (1951); ヒアルロニダーゼの産婦人科領域への応用. 産科と婦人科, 18—4, PP. 19.
- 6) 西川義正 (1944); 家畜人工授精法. 養賢堂, P. 213.
- 7) 大谷善彦 (1951); 受精現象と拡散因子 (Hyaluronidase) 第二報. 日本産科婦人科学会雑誌, 3—2, PP. 69~70.
- 8) PARKES, A. S. (1952); Marshall's physiology of reproduction, Vol. II, PP. 17~18, Longmans, Green And Co. Ltd.
- 9) POMMERENKE, W. T. and ELLENMAE VIRGIVER (1947); Comparison of rates of penetration of unwashed and washed spermatozoa in cervical mucus. Proc. Soc. Exp. Bio. Med., Vol. 66, PP. 161~163.
- 10) SALLMAN, B. and BIRKELAND, J. M. (1950); Interrelationships of spermatozoa count, hyaluronidase titer, and fertilization. Ann. N. Y. Acad. Sci., 52, PP. 1186~1191 (Animal Breeding abstracts, 19—4, PP. 468~469, 1951)
- 11) 柳原仟 (1951); ヒアルロニダーゼと臨床. 医学書院.
- 12) 高嶺浩 (1951); 牛の子宮頸管粘液に対する精子の侵入性とヒアルロニダーゼに就いて. 医学と生物学, 18—2, PP. 62~65.
- 13) 高嶺浩 (1952); 受精とヒアルロニダーゼ及抗ヒアルロニダーゼに就いて. 畜産の研究, 6—6, PP. 373~376.

- 14) 高嶺浩, 樋口三好, 小野寺強, 後藤寿久 (1954); 不妊牛に於けるヒアルロニダーゼの応用試験. 畜産の研究, 8—2, PP. 147~148.
- 15) 高島達夫 (1951); 精液中のヒアルロニダーゼに関する研究. 日本産科婦人科学会雑誌, 3—2, P. 69.
- 16) YIELDING, K. L. and ROSANO, C. L. (1951); Effect of hyaluronidase on electrolytes (sodium and Potassium) of dog synovial fluid. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 78, PP. 54~56
- 17) 山根基信 (1952); 繁殖生理学領域に於ける Hyaluronidase の意義. スブラーゼ文献集, 第二輯, PP. 60~69.
- 18) 和田宏 (1954); 牡牛精液ヒアルロニダーゼの実験的不活性化及びその阻止. 岡山大学農学部学術報告, 4号 PP. 32~42.
- 19) 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. 日本畜産学会報, 25巻, 2~4, PP. 111~117.
- 20) 和田宏, 竹原宏 (1954); 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. 岡山大学農学部学術報告, 5号, PP. 40~47.
- 21) 和田宏, 湯原正高 (1955); 人工授精に於ける Hyaluronidase に関する研究. (3) 精液中に於ける Hyaluronidase の分布及び精子による添加 H-ase の吸収. 岡山大学農学部学術報告, 6号, PP. 20~28.