



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	牛精子の凍結乾燥
Author(s)	根井, 外喜男; NEI, Tokio; 永瀬, 弘 他
Citation	低温科学. 生物篇, 19, 107-115
Issue Date	1961-12-20
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/17656">https://hdl.handle.net/2115/17656</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	19_p107-115.pdf



## 牛 精 子 の 凍 結 乾 燥\*

根 井 外 喜 男

(低温科学研究所 医学部門)

永 瀬 弘

農業技術研究所 家畜部)

(昭和36年7月受理)

### I. 緒 言

Polge ら<sup>1)</sup>により考案された家畜精子の凍結保存法は、一般組織、細胞の長期保存に劃期的な発展をもたらした。特に牛の人工授精分野に於ける応用にはまことにめざましいものがある。

凍結に耐えて生存する精子に、保存法として更に有利な凍結乾燥法が適用出来るか否かは極めて興味ある問題であると同時に、実用の面で人工授精の分野に貢献するところも大きいと思われた。従ってこの分野の研究に従事する者は誰でも一応之を試みたいと考えるのであろうが、他の多くの動物細胞と同様、凍結乾燥に成功することには困難が予想された。

家畜精子の凍結乾燥に関する報告は、Polge<sup>1)</sup>のニワトリ精子について行った実験以来、現

第 1 表 牛精子の凍結乾燥に関する過去の報告例

人 名 (年)	動 物	凍 結	希 釈 液	乾 燥	復 水	結 果
Polge <sup>1)</sup> (49)	鶏	予備凍結 (-79°C)	リングル氏液 20%グリセリン	-25°C 3 時 間 90% の 脱 水	蒸 溜 水	各視野で運動, 51%最良
Sherman <sup>2)</sup> (54)	人	" (-65°C)	原液グリセリン	-65°C 26~48 時 間	蒸 溜 水 ロ ッ ク 氏 液	死 滅
Leid <sup>3)</sup> (55)	牛	"	卵 ク 液 10%グリセリン	-79°C徐々に上 昇 4~5 日 間		微かに運動
Sherman <sup>4)</sup> (57)	牛	" スライド上に凍結	卵 ク 液			死 滅
Bialy <sup>5)</sup> (57)	牛	" (-79°C)	卵 ク 液 7.5%グリセリン	硝 子 瓶 スライド, グラス 6~14 時 間	蒸 溜 水	微かに運動, 7% 以上脱水不可
Albright <sup>6)</sup> (58)	牛	" (-51°C)	ミ ル ク 10%グリセリン	44 分 間	3%フラクトース 溶 液	5~10%生存
Yushchenko <sup>7)</sup> (57~59)	牛 ウサギ	" (-78°C)	卵ク液グリセリン ペンタン, フレオン		蒸 溜 水	15~20%生存 (18~20ヵ月後) ウサギ受胎
Meryman <sup>8)</sup> (59)	牛	自動凍結 (-30°C)	ミ ル ク 卵 ク 液	5~6 分	ミ ル ク 卵 ク 液	40~50%生存受胎

\* 北海道大学低温科学研究所業績 第593号

在まで相当数にのほり<sup>2-9)</sup>、最近では受胎に成功したという報告<sup>7-9)</sup>もある。これら既往の報告をまとめると第1表の通りである。

表に見られるように、その殆んどのは、グリセリンを稀釈精液中に添加して予備凍結した後かなり長時間を要して乾燥させる方法で、得られた成績は Yushchenko<sup>7)</sup>を除いていずれも精子が死滅するか、生存していてもごく低率を示すに過ぎなかった。

ただ、最近報告され、しかも受胎に成功したといわれる Meryman<sup>8)</sup>の方法だけは、後に述べるように、かなり他と異なったもので、乾燥の機構の上からも興味深いものがある。

著者らは、この問題について、かねてから大きな関心をよせていたが、今回 Meryman の方法の検討を中心として実験する機会を得たので、その成績をとりまとめて報告する。

本実験は 1960 年 3 月から 7 月にかけて行われたもので、そのうち特に 3 月 18 日に採取された試料に於いてのみ乾燥後の生存率に好成绩が得られただけで、その外に幾度同様の実験をくりかえしても好結果が得られなかった。Meryman からの私信によっても追試の困難なことをみとめており、しかも、その理由が何によるのか不明である旨を述べているので、乾燥のために精子が死滅する因子を確かめたいと思い、いろいろの条件での吟味を試みたものである。

## II. 実験方法

人工臙によって採取した精子を直ちに 10~20 倍に稀釈、温度ショックを避けて徐々に 4°C に冷却しながら研究室に運んで使用した。

稀釈液の組成は、卵黄クエン酸ソーダ液、即ち 3% クエン酸ソーダ液にニワトリの卵黄 20% 量を加えたもの(以下卵ク液と称する)、及び加熱脱脂粉乳、即ち雪印乳業製脱脂粉乳 10% 液を 93°C、10 分加熱したもの(以下加熱脱脂乳と称する)である。

稀釈の操作は、グリセリン濃度 7% 以下の場合、精液の採取直後に最終倍率まで稀釈し、7% 以上の濃度ではグリセリンを含まない液で予備稀釈を行い 4°C に冷却した後、5~7 回に分割、10 分間隔でグリセリンを含む液を添加した。

供用種雄牛は北海道立家畜人工授精所に繋養中のホルスタイン種 7 頭で、使用した精液は採取時の活力が 75% 以上活潑な前進運動を示し、精子数 9 億/ml 以上のものを選んだ。

結果の判定は、加熱盤上の精子の運動状況を顕微鏡で観察する従来の方法によって行い、生存率を基準とした。精子活力の表示方法は一般に人工授精分野で行われている方法によった<sup>10)</sup>。

乾燥は Meryman の方法を中心とし、その他いろいろの方法を工夫した。今 Meryman が行った方法を記すと

1. 卵ク液(又は加熱牛乳)で 20 倍に稀釈
2. 稀釈精液をナイロンガーゼに浸し、ガラス容器に吊り下げて、真空ポンプに連結する。真空ポンプの排気量は 27 cu.ft/min である。
3. 減圧を開始すると、稀釈精液は水分の蒸発に伴い、急激に温度が低下して凍結し、そ

のまま乾燥する。

その過程は 25°C から 3 秒で -10~-15°C まで低下し、ここで凍結が起って温度は -5~-6°C に上昇する。

その後 5 秒以内に -30°C に達した後、温度は徐々に上昇し、5~6 分で乾燥は終了する。

4. 復水は最初の稀釈液を使用する。

以上の方法により、復水後の精子生存率は 40~50% で、受精にも成功したという。

又この方法が成功するためには、ごく限定された条件をみたす必要があり、機械の排気能力従ってサンプルの冷却速度及び乾燥速度が重要な要因であるといっている。

著者らの使用した真空乾燥機は放射状の多岐管式のものでポンプの排気量は 100 l/min 到達真空度は  $3 \times 10^{-3}$  mmHg であった。

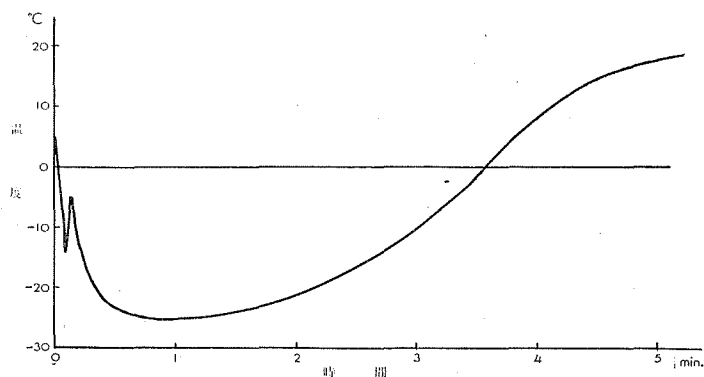
Condenser として液体窒素を使用した。サンプルを入れるガラス容器は容量 50 ml のもので、種々の生物試料の凍結乾燥に使用しているものである<sup>11)</sup>。

ガーゼはナイロン、ポリエチレン、木綿の 3 種を用い、乾燥する際は、上記ガラス容器の底に 2 本の針金を渡しておき、その上にガーゼをのせ乾燥機にとりつけて真空にしたのである。又試料の温度の測定には銅・コンスタンタン熱電対を使用し、乾燥度の測定には記録式真空重量計<sup>12)</sup>を使用した。この装置は、天秤と光学系を組合せたもので、サンプル中の乾燥過程が自動的に印画紙上に記録される。

### III. 実験成績

#### I. 減圧式自動凍結乾燥法

方法の項で述べたように、ガーゼに精液を 1 滴とり、ガラス容器に入れて乾燥機に接続し急激に真空にすると、凡そ 5 秒で -10~-13°C まで低下し、ここで過冷却が破れて温度は急激に -5°C くらいまで上昇した。そして再び低下し 30 秒ほどで -20~-25°C に達する。その後漸次温度は上昇しほぼ 5 分で室温まで戻った。その経過は第 1 図に示す通りである。

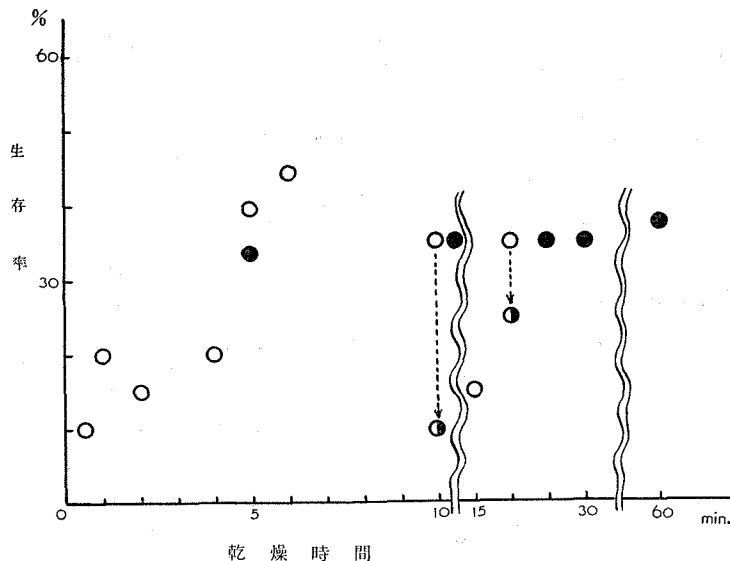


第 1 図 減圧自動凍結乾燥過程の温度曲線

## 1. 成功したと思われる例

3月18日の採取例に於いてのみ、乾燥後にかなり高率に生存をみとめた。ガーゼにのせて減圧自動凍結乾燥し、稀釈及び復水には卵ク液—卵ク液又はグリセリン加卵ク液—グリセリン加卵ク液の組合せを用いたものである。

1) 乾燥時間： その結果は第2図に示すように、乾燥時間が短く、まだ充分乾いていないと思われるものでは、やや生存率が低い、5~6分のものでは最高で40~45%の生存率を示



第2図 成功例に於ける乾燥時間と生存率

○：卵ク液 ●：グリセリン加卵ク液 ↓：24時間保存

し、その後またやや低下の傾向があった。この乾燥した試料を室温で24時間デシケーター内に保存したところ、活力はかなり低下した。グリセリンを加えたものでは、35%前後のほぼ一定した値を示した。

2) 復水液： 4°Cに24時間保存したものを乾燥し、復水液として卵ク液とグリセリン加卵ク液の比較を行ってみたが、後者の方がはるかに成績がよく20%台の生存率を示していた。

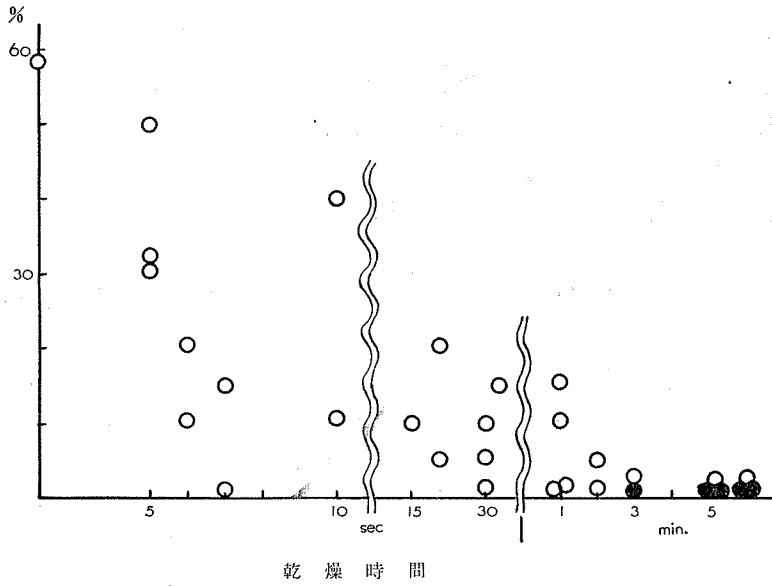
3) ガーゼの種類： ポリエチレン、ナイロン、木綿の3種のガーゼの比較では差はなかった。

以上の成績は3月18日に採取した精液についてのみ得られたもので、後日同一個体からの精液について幾度も同じ実験をくりかえしてみたが、遂に再び成功するに至らなかった。

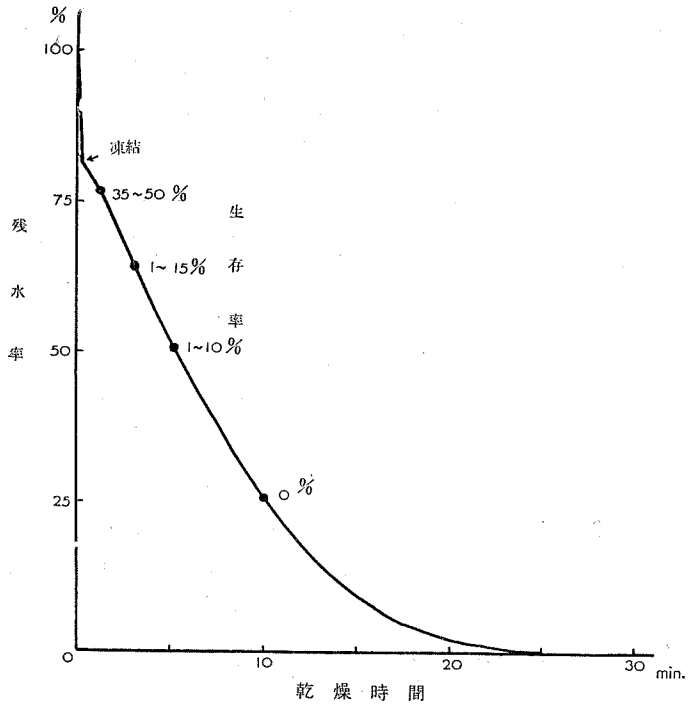
## 2. 乾燥過程についての検討 (不成功例)

1) 乾燥時間と生存率との関係： 成功例でみとめたように、グリセリン加卵ク液が稀釈並に復水液として有効なので、これを用いて乾燥過程の吟味を行った。

凍結によって生存率は30~50%となり、その後乾燥と共に急激に低下し、30秒ではほぼ



第3図 不成功例に於ける乾燥時間と生存率



第4図 精液の乾燥曲線と生存率

10% 前後、乾燥の終了する 5 分前後では、殆んど死滅するか、極めて低率の生存しかみとめられなかった (第 3 図)。

2) 乾燥度・(残水量) と生存率との関係: 記録式真空重量計を用いて、減圧自動凍結乾燥による乾燥曲線を求め、同時に、その条件での生存率をしらべた。但しこの装置は前述の乾燥装置に比較してかなり効率が悪く乾燥終了までに 25 分要した。(この乾燥曲線を求める実験以外はすべて前述の放射状多岐管式乾燥装置を使用した。その場合の乾燥終末点は温度曲線上から想像された程度であるから、果して 5 分前後で十分に脱水されていたかどうかはわからない。) 本実験の稀釈液は 6% ブドウ糖加卵ク液で、復水には 10% グリセリンを含む卵ク糖液を用いた。結果は第 4 図に示す通りで、乾燥曲線からわかるように最初の凍結の起るまでの僅か 5 秒内の減圧蒸発で 20% の水分がとられている。その時の生存率は 35~50% で、その後残水量の減少と共に生存率も低下し、全蒸発量の半分の水がとられると 1~10% くらいまで活力はおち、75% 脱水されると、殆んど死滅していることを知った。

## II. 乾燥方法の検討

### 1. 自動凍結法での乾燥速度の検討

Meryman はその論文中、真空ポンプの排気能力が精子の乾燥の成否に大きな影響を与えると述べているので、乾燥方法中特に乾燥速度についての検討を行なってみた。

即ち、排気量 250 l/min と 100 l/min の真空ポンプの比較、コックの開き方を加減して排気速度をおとし、自動凍結の起るまでの時間を長くしたもの、或いは、低真空である程度脱水してから、高真空に切りかえるなど、いろいろと凍結又は乾燥速度を變える検討を行ってみたが、乾燥終了後のものではすべて死滅しており、成功しなかった。

### 2. 予備凍結後乾燥

自動凍結ではなく、通常の予備凍結から始まる凍結乾燥法を行ってみた。

1) アンブル中に卵ク精液 0.1~0.3 ml とり、 $-25^{\circ}\text{C}$  のアルコール槽中に浸して凍結させた後、直ちに乾燥機にとりつけて 30 分間乾燥した。復水には卵ク液を用いたが、結果は全例死滅した。

2) ガーゼに浸したグリセリン加卵ク精液を自動凍結の場合と同じ冷却速度で予備凍結した。凍結だけでそのまま融解したものでは、40% の生存率を示しているが、乾燥を行うと 1 分で 40%、5 分で 1%、20 分のものでは完全に死滅していた。

### 3. 液状よりの乾燥

1) 5 mmHg の真空度に 15 分おいたものは 30% の生存率を示したが、30 分では死滅していた。但し 15 分では十分に乾燥していなかったように思われる。(稀釈は卵ク液、復水はグリセリン加卵ク液)。

### 2) スライド・ガラス上での空気乾燥

血液標本を作ると同じ方法で、カバー・ガラスの一端につけた試料をスライド・ガラス上をすべらせて塗抹標本を作り、空気中でよく振ると極めて短時間に乾く。これに復水液を載せ

てよくかきまぜてからしらべるのである。この時の稀釈・復水両液ともグリセリン加卵ク液であった。

まず3月18日の成功例の試料を塗抹乾燥したものでは、空气中18分間おいたものも、更に、それを真空中に10分間おいて充分脱水したのも、いずれも10%の生存率を示した。

しかし、その後の実験例では、乾燥直後に極めて低率の生存をみとめたものもあるが、(肉眼的観察での乾燥直後であるから、グリセリンを含んだ試料でもあり、まだよく乾いていなかったかもしれない)、そのまま30分以上おいたり、或いは真空中で引き直すと、すべて死滅した。

#### 4. 稀釈液と復水液の吟味

自動凍結乾燥法で稀釈液にPVPを加えたり、復水液にPVP, Dextran, ミルク・クリームなどを用いたりしてみたが、いずれも不成功に終わった。

### IV. 考 察

従来、精子の凍結乾燥はかなり困難であるといわれており、また事実、我々自身が過去に於いて実際に凍結乾燥を試みて成功しなかった体験をもっているだけに、Merymanの報告には大いに関心がよせられた。

減圧自動凍結乾燥法という簡易な方法は追試も容易であり、実験を開始して間もなくかなりよい成績をあげることができた時には、彼の報告を承認できると思ったが、唯1例だけの成功に終って、その後は如何に条件を変えて工夫してみても、二度と再び好結果を得ることはできなかった。

かねて親交のあるMerymanにその成績を仔細に連絡したところ、返事の私信の中に、他にも追試者は多いが、未だ1人も追試に成功したものはないと述べていた。しかも、それらの人々がMerymanの研究室で実施して成功しているながら、自分の研究室に戻ると失敗すること、またMeryman自身が他の研究室で実施したのではうまくいかないことなどから、彼は最初、その原因は装置の性能によるもので、特に、真空ポンプの排気速度がごく限られた範囲の適当な条件におかれた時のみ成功するものと考えたようである。

しかも、Meryman自身がこの乾燥の成否を司る因子をはっきりつかみたいと思っている努力はらしいが、遂にそれを明らかにすることができず、後には、精液自身の問題、或いはその容器の問題ではないかと考えるようになった。

吾々も亦独自の立場で、精子の乾燥を困難にしている原因を追求したいと考えて、本実験のように、乾燥に関与するいろいろの条件を吟味しながら検討を続けていた。しかし結局は、乾燥が進行して、脱水量が多くなるほど、死滅の度を増すという事実をみとめただけで、所期の目的である乾燥機構の解明には程遠かった。

ただ、Merymanの提唱した方法が適切であり、彼の考え方が正しいとすれば、この減圧自動凍結乾燥法の特徴をもう少しよく分析してみる必要がある。特に本法が通常の予備凍結に続く乾燥法に比較して異色のある点といえば、最初の凍結までの段階であろう。我々の測定に

よれば、減圧による蒸発で、凍結前にその全蒸発量の20%が脱水されていることになる。この一部脱水された試料が、真空ポンプの排気速度によって規制されるある冷却速度の凍結を起し、 $-30^{\circ}\text{C}$ まで冷却されるということが、精子の生存に良い条件を与えるのであるかもしれない。

しかし、それも単なる臆測にすぎず、多くの例では、脱水とともに精子の活力が低下するという事実を経験したのみである。

## V. 結 論

牛精子の凍結乾燥の方法として、Meryman等の減圧自動凍結乾燥法を追試した結果、唯一例に於いて良好な成績をみとめた外、いずれも成功をみるに至らなかった。その1例では5~60分の乾燥で35~45%の生存率を示し、乾燥後室温に24時間放置するとかなり低下した。

その他の例では乾燥の経過とともに活力は低下し、乾燥終了時の5分くらいで殆んど0となった。

凍結や乾燥の速度をいろいろと調節して行っても成績は良くならなかった。

減圧自動凍結の時と同じ冷却速度で凍結したものは40%の生存率であるが、そのまま乾燥を続けるとすべて死滅してしまった。

スライド・ガラスに塗抹し空気乾燥したものは、成功例では10%の生存率であったが、それ以外はすべて死滅した。

稀釈液や復水液の吟味として、PVP, Dextran, ミルク・クリームなどを用いたが効果はなかった。

記録式真空重量計で乾燥過程を測定した結果、最初の減圧蒸発で全蒸発水分の20%が脱水され、脱水量75%で完全に死滅することを知った。

要するに、乾燥条件についていろいろと検討してみたが、乾燥の精子活力に及ぼす因子の本態についてはまだ不明である。

本研究は永瀬が農林水産技術会議による国内留学の規程により低温科学研究所に於いて研究中根井と協力のもとに実施したものである。精液の分譲を頂いた北海道立家畜人工授精所所長以下所員の方々に感謝する。

## 文 献

- 1) Polge, C., Smith, A. U. and Parkes, A. S. 1949 Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, **164**, 666.
- 2) Sherman, J. K. 1954 Freezing and Freeze-drying of human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, **5**, 357-371.
- 3) Leidl, W. 1956 Experiments in freeze-drying of bull semen. Proc. III. Intern. Congr. Animal Reprod. (Cambridge).
- 4) Sherman, J. K. 1957 Freezing and freeze-drying of bull spermatozoa. *Am. J. Physiol.*, **190** 281-286.

- 5) Bialy, G. and Smith, V. R. 1957 Freeze-drying of bovine spermatozoa. *J. Dairy Sci.*, **40**, 739-745.
- 6) Albright, J. L., Erb, R. E. and Ehlers, M. H. 1958 Freeze-drying bovine spermatozoa. *J. Dairy Sci.*, **41**, 206-207.
- 7) Yushchenko, N. P. 1957 Demonstration of the possibility of storing mammalian spermatozoa in the dried state. *Proc. Lenin. Acad. Agr. Sci.*, **22**, 37-40. (in Russian)
- 8) Meryman, H. T. and Kafig, E. 1959 Survival of spermatozoa following drying. *Nature*, **184**, 470-471.
- 9) 永瀬 弘, その他 1959 昭和 34 年春畜産学会発表要旨.
- 10) 西川義正 1956 家畜人工授精法. 養賢堂.
- 11) 根井外喜男, 他 3 名 1960 凍結乾燥に於ける乾燥の機構 IV. 乾燥過程での試料中の部位による含水率と菌生残率との関係について. *低温科学, 生物篇*, **18**, 83-89.
- 12) 吉本千禎・千葉重雄・根井外喜男 1957 記録式真空重量計の試作. *低温科学, 生物篇*, **15**, 72-74.

### Résumé

Meryman and Kafig's procedure, drying the material in the frozen state following self-freezing by evaporation in vacuum, was duplicated, but in spite of repeated trials success was obtained in only one case. The result showed 35-45% motility after 5-60 minutes of drying time, while the percentage of motility decreased as drying proceeded in unsuccessful experiments. Therefore, several experiments were made to determine what special ingredients might affect the motility of spermatozoa subsequent to freeze-drying.

Although the rate of freezing or drying was changed by controlling the speed of pumping, the results obtained continued to be unsuccessful.

Semen frozen at the same rate of cooling as in self-freezing by evaporation and thawed rapidly showed high percentage of motility.

Ordinary freeze-drying procedure which began with pre-freezing was also carried out, but all cells were damaged on reconstitution.

A drop of semen was smeared on a glass slide and dried in air. This was not freeze-drying, but 10% of the reconstituted cells in the smeared preparation of successful case proved to be motile.

Besides the egg yolk citrate or egg yolk citrate glycerol extender, 40% PVP, 20% dextran solution and cows milk cream were used as reconstituting materials, but successful results were not obtained.

Water removal from the preparation during the drying process was measured by using a recording vacuum torsion balance attached to the freeze-drying apparatus. About 20% of the total water content to be dehydrated was evaporated before self-freezing occurred and all cells were damaged before 75% of the water was dehydrated.

In conclusion, it is noted that successful results were obtained only once in a number of experiments repeatedly carried out on freeze-drying of bull semen. Attempts to discover the important factor affecting cell survival in freeze-drying were made, but it is not yet evident what the critical element may be.