

## ゼラチンスライド法による家兎子宮および 膣内精子のアクロシン活性の観察

小山久一\*・鈴木 太\*

### The Acrosin Activity in Rabbit Spermatozoa Recovered from Uterine Horn and Vagina by Gelatin Substrate Film Method

Hisaichi KOYAMA\* and Hutoshi SUZUKI\*

#### 緒 言

精子頭部に含まれるアクロシンはトリプシン様酵素で、卵子透明帯を溶解する作用があり、精子の卵子内進入の最終段階で重要な役割を果たすことが知られている<sup>1,2,11)</sup>。アクロシンは精子が雌生殖道内で受精能を獲得し、先体反応を起こした後に放出されるといわれている<sup>2)</sup>。しかし雌生殖道内環境がアクロシン活性に与える影響については殆ど検討されていない。

一方、アクロシン活性の検出法については Propping ら<sup>13)</sup>、Ginsberg ら<sup>8)</sup> および Ficsor ら<sup>5,6)</sup> がゼラチンを塗布したスライドガラスに精子を塗抹し、精子頭部周囲に形成されるハローにより観察できることを報告している。

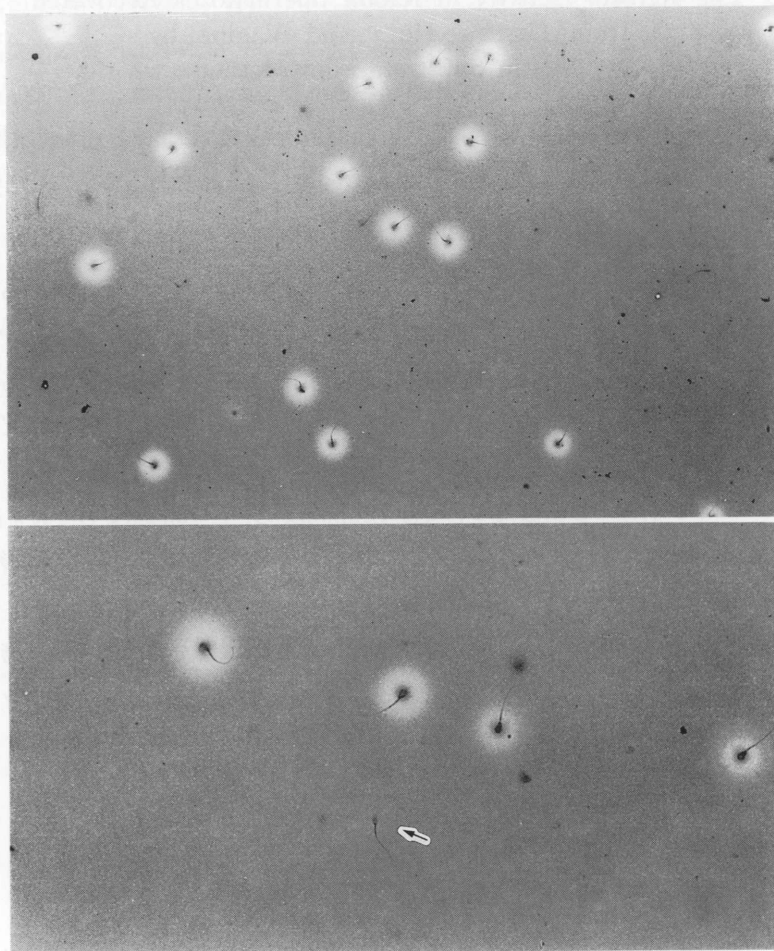
本研究では、雌生殖道内環境が精子のアクロシン活性に影響を及ぼすものと考え、交配後の家兎子宮および膣より精子を回収し、ゼラチンスライド法によりアクロシン活性を観察した。

#### 材料および方法

供試材料は、交配後の雌家兎 18 羽の子宮および膣より精子を回収し用いた。雌家兎は発情の良好なものを選び、雄家兎 2 羽または 3 羽と交配し、直ちに hCG 20 IU を耳静脈より投与した。子宮および膣精子は、交配後 4 時間、6 時間、8 時間、10 時間、12 時間および 24 時間目に生殖道を摘出 37°C に加温した PBS (pH 7.4) 0.5 ml を灌流して回収した。

\* 酪農学科，家畜繁殖学研究室  
Department of Dairy Science (Animal Reproduction), Rakuno Gakuen University, Ebetsu,  
Hokkaido 069, Japan

ゼラチンスライドの作製およびアクロシン活性の反応は Propping ら<sup>13)</sup>の方法に準じて行った。すなわち、50°Cで溶解した5%ゼラチン液0.1 mlをスライドガラス上に滴下し、45×25 mmの広さに均一に塗布、氷上で固化後、5°Cの低温下で風乾し、10%ホルマリンを含む50%エタノール液で固定した。ついで7%アンモニアで処理後、再び風乾した。アクロシン反応は0.2%ハイアミンEDTA・NaOH液で処理したゼラチンスライドに回収精液20  $\mu$ lを塗抹し、室温で5分間の風乾後、37°Cの湿室内で15分間、30分間および60



**Fig. 1.** Acrosin activity of rabbit spermatozoa (recovered from uterus) on gelatin substrate film slide. The photograph at the top was taken at  $\times 25$  magnification of the light microscope. Acrosin activity, specific for the sperm head (sperm with halo), is easily observed with toluidine blue stain. The bottom photograph taken at  $\times 50$  magnification. Four active sperms with high acrosin activity and 1 inactive sperm (arrow) are shown.

分間静置し反応させた。反応後、30%ホルマリン液で4°C、15分間固定し、水洗後、0.8%トルイジンブルー溶液(pH 10)で4°C、30分間の染色を施した。

アクロシン活性は倍率100倍の顕微鏡下でハローが平均してみられる部位を選び、供試精液当たり200の精子を観察し、精子頭部周囲に形成されたハローから反応率を求め、また接眼移動測微計を用いハロー直径を測定した。

統計処理法は、反応率では角変換後の数値による2元配置分散分析を行い、ハロー直径ではBartlett法による分散の検定後、DuncanまたはStudentのt検定を行った。

## 結 果

アクロシン活性はFig. 1に示す通り、精子頭部周囲にゼラチン薄膜が消化され、トルイジンブルーに染色されない明るいハローとして観察された。回収精子のアクロシン活性は、反応率をTable 1、ハロー直径をTable 2にまとめ、平均値±S.E.で示した。

### 1. 反応時間別比較

アクロシン活性は反応時間15分間より観察され、一般に37°Cにおける反応時間が長くなるに伴い増加傾向を示し、反応率およびハロー直径ともに反応時間60分間で最も高い値

**Table 1.** Acrosin activity of spermatozoa (haro reaction) recovered from the rabbit uterine horns and vaginae after mating

Time of sperm recovery after mating (hours)	Incubation time at 37°C (minutes)		
	15	30	60
Uterine spermatozoa	(%)	(%)	(%)
4	64.8±1.8 <sup>a)</sup>	67.3±2.5	70.3±0.7
6	71.7±2.9	77.3±4.0	79.5±1.3**
8	—	—	78.7±1.3**
10	64.2±4.3	71.6±1.3	75.5±2.0
12	—	—	75.5±1.4
24	59.3±3.8	66.8±1.3	73.8±2.4
Vaginal spermatozoa			
4	51.2±3.2	53.3±0.7	62.5±1.3
6	55.2±2.4	61.2±1.7	63.2±1.9
8	—	—	64.5±0.8
10	52.3±1.4	56.3±0.4	58.5±0.3
12	—	—	64.0±1.5
24	48.0±0.8	60.2±5.2	59.7±5.7

a) Values are mean±s.e. for 3 does.

\*\* Values are significantly different from those at 4 hours (P<0.01).

が得られた。とくにハロー直径では子宮ならびに腔精子の4時間, 8時間, 10時間および24時間において60分間と他の反応時間との間に有意の差が得られた ( $P < 0.01$ )。

## 2. アクロシン反応率

アクロシン反応率は, 子宮内精子では59.3~79.5%, 腔内精子では48.0~64.5%を示し, 子宮内精子でやや高くなる傾向がみられた。交配後時間別比較では時間経過に伴う反応率の変動は少なかったが, 一般に交配後6時間または8時間で高値を示し, 以後漸減する傾向がみられ, 子宮内精子の60分間反応では4時間と6時間および8時間の間に有意の差が得られた ( $P < 0.01$ )。

## 3. ハロー直径

ハロー直径は子宮内精子では17.6~46.5  $\mu\text{m}$ , 腔内精子では14.8~40.9  $\mu\text{m}$ を示し, 腔内精子に比べ子宮内精子で有意に大きいことが認められた ( $P < 0.05$ )。ハロー直径は子宮内精子では交配後時間経過に伴い増大し, 24時間では逆に減少する傾向を示した。すなわち, 反応時間60分間では4時間34.7  $\mu\text{m}$ から8時間46.5  $\mu\text{m}$ と急増し ( $P < 0.01$ ), ついで12時間44.8  $\mu\text{m}$ から24時間37.6  $\mu\text{m}$ と減少した ( $P < 0.01$ )。またこのような傾向は腔内精

**Table 2.** Mean halo diameters of 200 spermatozoa recovered from the rabbit uterine horns and vaginae after mating

Time of sperm recovery after mating (hours)	Incubation time at 37°C (minutes)		
	15	30	60
Uterine spermatozoa	( $\mu\text{m}$ )	( $\mu\text{m}$ )	( $\mu\text{m}$ )
4	22.9 $\pm$ 1.3 <sup>a)</sup>	28.6 $\pm$ 0.6	34.7 $\pm$ 1.2
6	26.5 $\pm$ 1.2	31.8 $\pm$ 0.7 <sup>**</sup>	38.4 $\pm$ 1.3
8	—	—	46.5 $\pm$ 1.4 <sup>**</sup>
10	27.4 $\pm$ 2.5	33.6 $\pm$ 1.2 <sup>**</sup>	40.9 $\pm$ 1.0 <sup>**</sup>
12	—	—	44.8 $\pm$ 1.9 <sup>**</sup>
24	17.6 $\pm$ 1.3 <sup>**b</sup>	26.8 $\pm$ 0.4 <sup>**b</sup>	37.6 $\pm$ 1.1 <sup>**c</sup>
Vaginal spermatozoa			
4	16.7 $\pm$ 0.2	20.7 $\pm$ 0.6	27.1 $\pm$ 1.0
6	17.2 $\pm$ 2.6	25.1 $\pm$ 0.4 <sup>**</sup>	31.6 $\pm$ 0.3 <sup>**</sup>
8	—	—	40.9 $\pm$ 0.4 <sup>**</sup>
10	22.7 $\pm$ 1.7	28.1 $\pm$ 1.0 <sup>**</sup>	34.1 $\pm$ 0.7 <sup>**</sup>
12	—	—	34.6 $\pm$ 1.5 <sup>**</sup>
24	14.8 $\pm$ 0.3 <sup>**b</sup>	22.5 $\pm$ 1.5 <sup>**b</sup>	32.4 $\pm$ 2.2

a) Values are mean $\pm$ s.e. for 3 does.

\*\* Values are significantly different from those at 4 hours ( $P < 0.01$ ).

\*\*b Values are significantly different from those at 10 hours ( $P < 0.01$ ).

\*\*c Values are significantly different from that at 12 hours ( $P < 0.01$ ).

子においてもほぼ同様に認められた。

## 考 察

ゼラチン薄膜を用いたアクロシン活性の観察は人および数種の動物射出精子について行われ<sup>5-8,10,13-15)</sup>、精子運動性、精子濃度および酸溶性アクロシン活性の測定値との間に高い相関があり<sup>9,14)</sup>、精液検査法として有用なことが認められている。しかし、これら精子のアクロシン活性は反応時間により変動し、検出に必要な反応時間は30分間から12時間まで検討され、一般に最低60分間は必要であると報告されている<sup>5-8,10,13-15)</sup>。本研究に用いた雌家兎生殖道内精子においても安定した反応率とハロー直径を得るには60分間の反応時間が必要と思われた。

家兎精子が完全に受精能を獲得するには子宮内または卵管内で10~11時間を要すると報告されている<sup>3)</sup>。しかし5~6時間でも受精を完全に遂行することは不可能であるが、透明帯を通過することはできるといわれている<sup>3)</sup>。また、Polakoskiら<sup>12)</sup>は精漿にはアクロシン抑制物質が存在するため、射出精子のアクロシン活性の低いことを示し、精子アクロシン活性を高めるには精漿内抑制物質の除去が必要であると報告した。本研究の子宮内精子のアクロシン活性は反応率では6時間、ハロー直径では8時間において高値が得られ、その後10時間および12時間ではやや減少の傾向はあるもののほぼ一定の値で推移した。このようなアクロシン活性の推移は家兎精子の透明帯通過または受精能獲得に要する時間と概ね一致し、子宮内で一定時間滞留した精子は、受精能獲得とともに精漿が除去されアクロシン活性が高まったことを示唆している。また、家兎精子の受精能保有時間は30~36時間といわれている<sup>9)</sup>が、子宮内精子のハロー直径は交配後24時間で顕著に減少し、12時間におけるそれとの間に有意の差が認められた。一般に雌生殖道内で行った受精能を獲得した精子はその後の受精能保有時間は急速に減少することが知られており、家兎子宮内精子のアクロシン活性の低下は受精能保有時間よりも先に起こるものと考えられた。

一方、腔内精子のアクロシン活性は子宮内精子と類似した推移を示し、腔内においてもアクロシン活性の増加することが認められたが、子宮内精子のそれよりも低値であった。Dandekar and Fraser<sup>4)</sup>は家兎卵子の体外受精において、腔内培養精子の受精率は子宮内精子のそれよりも低いことを認めており、腔内環境は子宮に比較し、アクロシン活性を十分に高めることはできないものと考えられた。

以上のように、雌家兎生殖道内精子のアクロシン活性について検討した結果が卵子へ突入する際のアクロシン放出と一致するかどうかは、さらに検討する余地があるものと思われた。

## 要 約

家兎精子アクロシン活性に及ぼす雌生殖道の影響を検討するため、交配後の雌家兎 18 羽の子宮および膈より精子を回収し、スライドガラスに塗布したゼラチン薄膜で観察した。その結果を要約すると次の通りである。

1. アクロシン活性は精子頭部周囲に形成されたハローとしてトルイジンブルー染色により観察でき、37°Cにおける反応時間は 60 分間を必要とした。

2. 子宮内精子のアクロシン反応率およびハロー直径は膈内精子よりも高く ( $P < 0.05$ )、交配後のアクロシン活性は時間経過に伴い増加し、4 時間値に比較し、反応率では 6 時間および 8 時間で、またハロー直径では 8~12 時間で高値を示した ( $P < 0.01$ )。

これらのことから、家兎精子は子宮内に 8~12 時間滞留することにより、アクロシン活性が高くなると考えられる。また、このことは雌生殖道内における受精能獲得に関連する精子の変化によるものと推察された。

## References

- 1) Allison, A. C. and E. F. Hartree, 1970. Lysosomal enzymes in the acrosome and their possible role in fertilization. *J. Reprod. Fertil.*, **21**: 501-515.
- 2) Bazer, F. W., R. D. Geisert and M. T. Zavy, 1987. Fertilization, cleavage and implantation. In: *Reproduction in farm animals*, 5th ed. (Hafez, E. S. E. ed.), 210-228. Lea & Febiger, Philadelphia.
- 3) Bedford, J. M., 1972. Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biol. Reprod.*, suppl. **2**: 128-158.
- 4) Dandekar, P. and L. Fraser, 1976. A comparison of in-vitro fertilization of rabbit eggs using spermatozoa recovered from the uterus or vagina. *J. Reprod. Fertil.*, **46**: 77-81.
- 5) Ficsor, G., L. C. Ginsberg, G. M. Oldford, R. E. Snoko and R. W. Becker, 1983. Gelatin-substrate film technique for detection on acrosin in single mammalian sperm. *Fertil. Steril.*, **39**: 548-552.
- 6) Ficsor, G., N. M. Salama, K. K. Block, C. L. McIntire and L. C. Ginsberg, 1982. Germ cell-specific decrease of proteolytic activity, sperm motility, and number in mitomycin C-treated mice. *Terat. Carcin. Mutagen.*, **2**: 13-18.
- 7) Gaddum-Rosse, P. and R. J. Blandau, 1972. Comparative studies on the proteolysis of fixed gelatin membranes by mammalian sperm acrosomes. *Am. J. Anat.*, **134**: 133-138.
- 8) Ginsberg, L. C., S. C. Johnson, N. Salama and G. Ficsor, 1981. Acrosomal proteolytic assay for detection of mutagens in mammals. *Mutation Res.*, **91**: 413-418.
- 9) Hafez, E. S. E., 1987. Transport and survival of gametes. In: *Reproduction in farm animals*, 5th ed. (Hafez, E. S. E. ed.), 168-188. Lea & Febiger, Philadelphia.
- 10) 香山文美・佐藤孝道・水野正彦, 1986. ゼラチンフィルムを用いた精子頭部アクロシン活性の不妊症検査における意義. 受精・着床 '85, (飯塚理八, 坂本正一, 鈴木雅洲, 高木繁夫 編), 230-234, 学会誌刊行センター/学会出版センター, 東京.
- 11) McRorie, R. A. and W. L. Williams, 1974. Biochemistry of mammalian fertilization. A.

Rev. Biochem., **43**: 777-803.

- 12) Polakoski, K. L., L. J. D. Zaneveld and W. L. Williams, 1971. An acrosin-acrosin inhibitor complex in ejaculated boar sperm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**: 381-386.
- 13) Propping, D., P. F. Tauber and L. J. D. Zaneveld, 1978. An improved assay technique for the proteolytic activity of individual human spermatozoa. *Int. J. Fertil.*, **23**: 24-50.
- 14) Waibel, R., G. M. Oldford, G. Ficsor and L. C. Ginsberg, 1984. Histochemical evaluation of sodium aurothiomalate inhibition of mouse sperm enzymes. *J. Reprod. Fert.*, **70**: 151-155.
- 15) Wendt, V., W. Leidl and H. Fritz, 1975. The lysis effect of bull spermatozoa on gelatin substrate film methodical investigations. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **256**: 315-323.

### Summary

In order to clarify the effect of female genital tract environment on the acrosin activity of rabbit spermatozoa, spermatozoa, recovered from the uterine horn and vagina of 18 does 4-24 hours after mating, were examined by means of gelatin substrate film technique. The results obtained are as follows.

Acrosin activity of spermatozoa was indicated by an unstained light halo around individual sperm head in the dark back ground due to digestion. The halo first became visible 15 minutes after incubation at 37°C. However, the incubation time of 60 minutes gave the best results.

The activity of uterine spermatozoa was higher than that of vaginal spermatozoa in any time after mating ( $P < 0.05$ ). In 60 minutes incubation, the halo reaction in uterine spermatozoa was significantly higher at 6 and 8 hours ( $P < 0.01$ ) and the halo size was also significantly increased during 8-12 hours ( $P < 0.01$ ) as compared with those of 4 hours after mating. These tendency was decreased gradually over 24 hours.

In conclusion, the maximal acrosin activity of uterine spermatozoa was obtained at 8-12 hours after mating, and this phenomenon seems to be correlated with sperm capacitation in the rabbit.