

牛精子のacrosome capの形態的变化に関する2・3の知見

白山勝彦*

Observations on morphological changes of acrosome cap
in bull spermatozoa.

Katsuhiko SHIRAYAMA

目次

材料と方法

1. 精子活力・生存率の判定
2. ユオジン染色による精子の生死鑑別
3. 精子のacrosome capの染色法等による形態異常の分類
4. 結果の有意性の検定
5. その他

実験成績ならびに考察

- I 射出直後の牛精子(とくに夏季以外)のacrosome cap形態異常率と精子生存率との関連
- II 夏季不妊雌牛にみられるacrosome capの形態異常と、従来の分類による奇形精子との関連
 1. 夏季における貯養液の推移
 2. acrosome capの形態異常と従来の分類による奇形精子との関連
- III 凍結過程の各温度で取り出した牛精子のacrosome capの形態的变化

- 要約 参考文献
謝辞 写真説明

結言

牛精子の形態は光学顕微鏡的に頭部、頸部、中片部および尾部の4部に大別され、その全長は65ミクロン¹⁾とされている。このうち頭部は細胞核に相当する部分²⁾であり、その前半は帽子状の構造物でおおわれており、この部分をacrosomic system³⁾、acrosome⁴⁾、acrosome cap⁵⁾あるいは尖体と呼んでいる。(写真1)

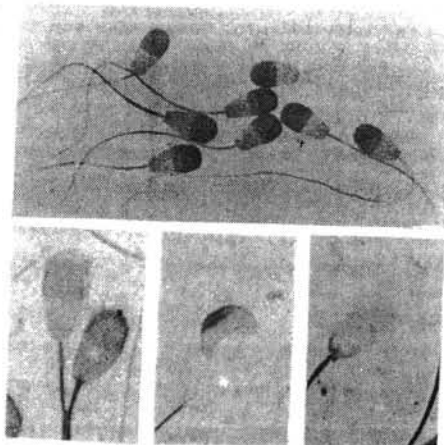


写真 1

- 上：正常な形態の牛精子と、acrosome cap
(頭部前半の濃染部分)
下左：acrosome capの膨化
下中：単体で遊離したacrosome cap
下右：acrosome capが欠損した精子頭部

* 畜産部

このような帽子状の構造物すなわちacrosome capの機能については、卵膜せん孔器説⁷⁾、あるいはヒアルロニダーゼの存在部位説⁸⁾などの仮説が提起されているが、人工授精の応用面においてもacrosome capを欠除した精子の出現率が18%を越える牛は受胎能力が低いとする報告⁹⁾があり、このほかacrosome capの形態異常と不妊とのあいだに関連のあることが多くの報告¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾によって強調されており、これらのことから、acrosome capが受精に際して重要な役割を演ずることは想像にたかなくない。

人工授精の実務において精液の良否を判定するために各種の性状検査が行われ、精子の形態検査も重要な項目の1つに挙げられているが、acrosome capの形態の検査については、それ自体がきわめて不安定な精子構造であるために、大きな関心が持たれていながら適確な検査は困難とされていた。

しかし、最近にいたり大沼氏¹³⁾らによってacrosomic systemの形成過程が詳しく調べられ、それに基づく検査方法が確立され、さらにその形態異常の持つ意義などが解明されるに及んで、acrosome capの形態検査がきわめて容易に行なえるようになった。

筆者はこれまでに「精子に対する温度衝撃の影響」¹⁴⁾について一連の研究を進めてきたが、たまたまこの研究のなかで、とくに牛精子のacrosome capは少なくとも0℃までの寒冷衝撃では形態的にきわめて変化しにくいものであることを明らかにしたが、このほかのいわゆる人工授精の実務のなかで考えられる種々な条件下における形態的变化の有無については、明らかにすることができなかった。

そこでこの点についての2・3の知見を得るために、1つには関東以西で問題とされている、夏季の暑熱による造精機能の低下、すなわちSummer Sterilityの雄牛から得た精子について、また他方では、急速に実用化が

進みつつある凍結精液について、その凍結過程にある精子を取り出して acrosome cap の形態を観察し、これを精子の生存率あるいは従来からいわれている精子の奇形率と関連させて検討を試みた。

なお、以下に述べる成績の概要の一部はすでに

日本臨床獣医学会（近畿）、昭和43年8月25日
和歌山市。

凍結精液研究会、昭和44年9月3日、松山市。

において口演発表し、その大要が関係学会誌に掲載されているものも含まれており、これに未発表の知見を加えて報告するものであることを、あらかじめお断わりしておきたい。

材料と方法

精液は、本所、畜産部（旧、畜産試験場）に飼養しているホルスタイン種および黒毛和種の雄牛から人工腔によって採取したものをを用いた。

採取した精液は、35°～37°Cの温湯を入れた保温器に入れ、20°Cの恒温室内で約1時間を要して同室温まで緩慢に下降し、一方、実験に用いる器具、薬品類はすべて実験日の前日に20°Cの恒温室に持ち込んでおき、精液が20°Cにまで下降するのを待って等温条件下で実験を開始できるようにした。

1. 精子活力・生存率の判定： 精子の活力・生存率の判定は、可検精液を静かに且つ十分に混和したのち、あらかじめ37°～38°Cに加温してある精液性状検査板（農研式）に1白金耳の精液をおき、カバーガラスをかけ400倍の鏡下で数視野につき行ない、その平均値をもって可検精液の数値とした。

精子活力・生存率の表記は、西川氏¹⁵⁾の方法にしたがってつぎの5段階に分け、その運動を示す精子の率を、算用数字をもって左側に併記した。

- 卅…最活発前進運動。 卅…活発前進運動。
- 十…緩慢前進運動。 土…旋回又は振子運動。
- 一…運動停止。

また、精子生存指数への換算は同じく西川氏¹⁵⁾の方法にしたがって、上述の活力記号に下記に示す一定の数値を与え、これを各記号の示す精子の率に乘じ、これらの和を100で除したのもをもって、その精液の生存指数とした。

2. エオジン染色による精子の生死鑑別： 上述の精子活力・生存率の検査結果が、客観性にやゝ乏しいという欠点を補足するため、Lasley¹⁶⁾らの方法に準拠して、下記の染色液を用いて精子を染色し、500個の精子についてその不染率を算出し、前記の活力検査によって得た値と併せて精子の生存率を判定する手段とした。

水溶性エオジン (Y)	2g
M/8 磷酸ソーダ (Na ₂ HPO ₄)	80.4ml
M/8 磷酸カリ (KH ₂ HPO ₄)	19.6ml

染色はすべて原精液を用いて行ない、一時的な希釈あるいは保存液を添加したのものについての染色は行なわなかった。精液と染色液の量的割合は1:1～1:4としスライドガラス上でよく混和したのち塗抹し、加温乾燥後直ちに、硫酸銅液をとおした400倍、明視野の鏡下で検査し、不染のものを生存精子、染色したものを死滅精子とした。また精子頭部の1/2がエオジンに淡染し不染、染色の区分を明確に識別し得ないいわゆる「中間系」のものについては、すべて染色精子として取り扱った。

3. 精子の acrosome cap の染色法並びに形態異常の分類

： 染色方法並びに形態異常の分類は、大沼氏¹⁷⁾の方法にしたがってつぎのとおりとした。

染色法…精液を塗抹、風乾したのち、オルト液で1時間固定し、ついで下記の染色液で1～2時間染色した。

ギムザ液 (メルク)	3 ml
0.1 M 磷酸緩衝液	2 ml
蒸溜水	35 ml

acrosome cap の検査は、1,500～2,000倍の鏡下で500個の精子について行なった。

形態異常の分類…形態異常はつぎの6者に分類した。

前縁濃染…頭部の前縁に沿って不規則に濃染する部分が発生したもの。

膨化…赤道帯以外の acrosome cap がふやけたもの、および離脱や崩壊の像を示すもの。

欠損…acrosome cap が完全に離脱したり、崩壊したとみなされるもの。

染色異常…頭部全体が異常に濃染するもの。あるいは染色性が不均一のもの。

形成不全…acrosome cap が折れ返ったもの。または一部が肥厚するもの。あるいは顆粒状に突出するもの。

その他 …上記のいずれにも属さないもの。

4. 結果の有意性の検定： 有意性の検定は、一定数（1例について500個の精子）のなかに出現したエオジン染色精子、あるいは acrosome cap の形態異常精子の実数について、「2元配置法」¹⁸⁾によるF検定を行なった。

5. その他： 上記以外の実験方法の細部についてはそれぞれの実験成績の前段に記述した。

実験成績ならびに考察

1 射出直後の牛精子(とくに夏季以外の)のacrosome cap形態異常率と精子生存率との関連

この実験は、健康な雄牛から射出された精子について、acrosome capの形態異常率の平均的数値を知るとともに、それらの数値が顕微鏡下で直接観察し得る運動精子

の割合すなわち運動精子率、あるいは染色によって生死鑑別を行なった精子の死滅率とのあいだに関連があるかどうかについて、おおよその知識を得るために行なわれた。

精液性状が安定していると考えられる2月から4月にかけて採取した牛精液について、精子のacrosome capの形態異常率を調べた成績は表1に示される。

Table 1. Percentage of spermatozoa with abnormal acrosome cap in ejaculated semen

射精直後の牛精子のacrosome cap 異常率

Name of Bull 雄牛名	% of ejaculate 例数	% of motile sperm. 運動精子率	% of sperm stained with eosin エオジン染色精子率	Spermatozoa with abnormal acrosome cap							
				Total 計	Swell 膨化 + ++ +++			Loss 欠損	Unusual staining 染色異常	Malform 形成不全	Others その他
		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
I	1	70	37.8	4.8	1.0	0.9	0	2.0	0.9	0	0
P	1	85	11.7	1.6	0.4	0.4	0	0.8	0	0	0
	2	85	10.9	2.9	0.9	0.5	0	1.4	0.1	0	0
	3	85	11.4	7.0	6.2	0.6	0	0.2	0	0	0
T	1	80	12.7	1.7	0.3	0.4	0	0.9	0.1	0	0
D	1	75	37.5	9.3	1.6	0.4	0	6.5	0.5	0.3	0
ST	1	70	30.7	7.1	0.5	1.4	0	4.7	0.1	0.4	0
L	1	85	11.7	2.1	0.4	0.1	0	1.2	0.2	0.2	0
	2	85	13.1	6.4	2.6	0.1	0	2.5	1.1	0.1	0
C	1	75	17.6	5.9	4.0	0	0	1.6	0.1	0.1	0.1
BA	1	80	12.5	7.7	2.6	0.3	0	4.8	0	0	0
	2	80	12.4	4.5	1.6	0.4	0.1	2.3	0	0.1	0
BC	1	85	16.1	10.3	3.0	0.8	0.2	4.3	0.8	1.2	0
	2	75	16.6	12.9	4.3	1.3	0.1	3.9	2.0	1.2	0.1
BK	1	85	16.4	2.8	0.4	0.1	0	2.0	0.2	0.1	0
BF	1	85	14.4	4.0	0.7	0.3	0.1	2.7	0.1	0.1	0
	2	85	7.0	4.8	1.7	0.3	0.1	2.0	0.4	0.3	0
BN	1	85	9.0	4.8	0.8	0.6	0	2.8	0.5	0.1	0
BG	1	85	17.9	4.8	2.2	0.5	0	1.2	0.8	0.1	0
Total & Ave. 計と平均	13頭 19例	70~ 85	7.0~ 37.8	5.53	1.82	0.45	0.09	2.51	0.42	0.23	0.01
					2.36						

13頭19例から得たacrosome cap異常率の平均は5.53%であった。この値は、さきに大沼氏¹⁷⁾が5頭24例の牛について調べた異常率の平均が14.3%であったのに比べて、やや下回る傾向がみられたがこれはおそらく牛の個体差にもとづく差異と考えられる。形態異常の大部分は、膨化と欠損に由来するものであり、それ以外の異常はきわめて低率であった。このことは前出の大沼氏の報告と傾向を同じくするものである。

つぎに、運動精子率あるいはエオジン染色精子率と、

acrosome cap異常率との関連をみると、表に明らかなごとく、運動精子率が70~85%の比較的良好な性状を示す精液ではacrosome cap異常率とのあいだに特異的な変化は認められない。また、エオジン染色精子率との関連をみても、いずれの例においてもacrosome cap異常率はエオジン染色精子率を下回っていることが知られる。

HANCOCK¹⁹⁾によれば、ニグロシン-エオジンに染まる精子の割合が8.0~22.9%という比較的低率の場合にはacrosome capが欠損している精子の出現率は0.25~

6.08%であったが、染色精子率が45.0~50.3%という比較的高率を示す場合、上述のcap欠損精子率も、25.20~33.13%に増加し、このことから、acrosome cap欠損精子出現率と死滅精子率とのあいだに関連のあることを報告している。

また大沼氏¹⁷⁾も、精子の運動停止率が75%という不良な精液ではacrosome cap異常率も73.9%と高い値を示した例があったことを報告している。

以上のことから、精液性状が極端に不良な場合には、acrosome cap異常率もかなり増加するが、従来の方法による精液性状検査によって、人工授精の実用に供し得

ると判断される良好な精液では、そのacrosome cap異常率は死滅精子の出現率と同程度あるいはそれを下回ると考えて大きな誤りはないものと考えられる。

なお、上記の死滅精子率との関連を検討するもうひとつの方法として、採取後の原精液に寒冷衝撃を与えた場合について両者の関連を調べた。

寒冷衝撃の方法は、原精液0.8mlをザーリの色素計用試験管に入れ、35℃に10分間加温し、直ちに0℃の水中に10分間投入したのち、20℃に再加温する方法がとられた。その結果は表2に示される。

Table 2. Relationship between morphological changes of acrosome cap and stained spermatozoa as assessed by eosin-staining method after cold shock

寒冷衝撃後のエオジン染色精子と acrosome cap の形態的变化との関連

Animal 動物	No. of samples 例数		Control (non-treated) 対照	Cooled slowly ^{a)} to 0c 0℃~緩慢冷却	Cold-shocked to 0c for 10 min. 0℃, 10分間 寒冷衝撃
Bull 牛	12 ejac. from 6 Bulls 6頭12例	% of stained sperm. エオジン染色精子率	11.2	19.4	77.7 ^{**}
		% of abnormal acrosome cap acrosome cap異常率	5.9	6.7	12.0

Note: a) About 2 hours
約2時間

** Significant statistically from unshocked control (P<0.01)
無処理の対照区との差は統計的に有意

まず、エオジン染色精子率についてみると、0℃まで緩慢に下降することによってその値はやゝ増加したが、対照との差は有意のものではなかった。しかし、0℃へ急冷して10分間おいたものでは染色精子率は77.7%に著増し、対照との差は1%以下の危険率で有意のものと認められた。このことから35℃から0℃へ急冷した精子にみられるエオジン染色精子率の増加は、単に温度を0℃に下降させたために起こったものではなく、温度の急変すなわち寒冷衝撃によって惹起されたものであることは明らかである。

一方、acrosome cap形態異常率についてみると、対照区の値が5.9%であったのに比べて、寒冷衝撃を与え

たものでは12.0%と僅かに増加したが、対照との差は有意のものではなく、かつ、その形態異常もacrosome capの辺縁が平滑さを欠く程度の軽微な変化を示すにすぎなかった。

これまでに、寒冷衝撃後のacrosome capの形態を観察したものとしては、大沼氏¹⁷⁾の報告がある。氏は、あらかじめ0℃に冷却しておいた試験管に30℃の精液0.5mlを徐々に滴下する方法で寒冷衝撃を与えたが、その結果はacrosome capの輪郭が鮮明さを欠く程度の変化しか認められなかったとしている。

これらのことから考えると、寒冷衝撃によって精子が死滅した場合でも、牛精子のacrosome capはきわめて

変化しにくい構造を持っているものと考えられる。

Ⅱ 夏季不妊雄牛にみられる acrosome cap の形態異常と、従来の分類による奇形精子との関連

夏季に高温が持続することによって、しばしば精液中の精子活力・生存率が低下し、精子濃度が減少するいわゆる「夏季不妊」(Summer Sterility) の現象については、すでに牛、羊、山羊、うさぎなどで認められており、かつ奇形精子率が増加することも報告されている。²⁰⁾

このような夏季の造精機能障害雄牛にみられる高率の奇形精子の出現は、夏季の暑熱による陰囊皮温の上昇もその原因の1つであろうと考えられ、造精機能障害によって奇形精子が増加した場合、精子の acrosome cap の形態にもなんらかの変化があるものと考えられるが、とくに Summer Sterility の雄牛について acrosome cap の形態について調べた報告はみることができない。

そこで、夏季に採取した牛精液について、おなじ夏季の条件下でも、とくに精液性状の悪化がみられない個体と比較しながら、acrosome cap の形態異常をしらべ、これらの異常が精子の生存性、あるいは従来からいわれ

ている奇形精子とのあいだでどのような関連があるかを知らうとした。

実験は昭和39年2月から9月までと、昭和41年7月から9月までのあいだに行なわれた。

1. 夏季における陰囊皮温の推移

陰囊皮温は体温よりも4~5℃低いのが正常とされ、⁶⁾ それ以内の温度差に上昇すると造精機能に悪影響があるといわれている。

三重県では7月から9月にかけて30℃を越える日が多く、かつ日中の高温持続時間も長い。したがって、かかる高温の持続が体温と陰囊皮温との差にも影響を及ぼすであろうことが予測されたので、7月から10月まで週2回、精液採取の直前に体温と陰囊皮温の測定を行なった。測定にはテルモファイナー(仁丹K. K.)を用い、10~15秒の測定時間内でメーターの指針の振れが止まったときの温度をもって、それぞれの温度とした。

測定結果は表3に示される。

Table 3. Difference between body temperature and scrotal temperature in bulls

牛における体温と陰囊温との差

Date	% of bulls	Body temp. (°C)	Scrotal temp. (°C)	Differences (°C)	Date	% of bulls	Body temp. (°C)	Scrotal temp. (°C)	Differences (°C)
月日	例数(頭)	体温	陰囊温	差	月日	例数(頭)	体温	陰囊温	差
Jul. 1	5	38.24	33.18	5.06	Aug. 30	6	38.33	33.35	4.98
5	4	38.32	32.77	5.55	Sep. 2	6	38.53	32.66	5.87
8	4	38.65	33.37	5.28	6	6	38.26	32.31	5.96
12	5	38.18	32.92	5.26	9	6	38.30	32.36	5.94
15	5	38.41	33.90	4.51	17	4	38.30	32.25	6.05
19	5	38.60	33.87	4.73	20	6	38.83	31.20	7.63
22	5	38.23	33.14	5.09	23	6	37.98	31.51	6.47
26	5	38.46	33.54	4.92	27	6	38.65	32.52	6.13
29	5	38.52	34.14	4.38	30	6	38.65	32.23	6.42
Aug. 2	5	38.28	34.32	3.96	Oct. 4	6	38.52	32.58	5.95
5	5	38.27	33.53	4.74	7	6	38.30	31.86	6.44
9	6	38.36	33.96	4.40	11	6	38.34	32.11	6.23
12	6	38.46	34.22	4.24	14	6	38.45	32.13	6.32
16	6	38.35	33.73	4.62	18	6	38.43	32.02	6.41
19	5	38.25	33.58	4.67	21	6	38.43	31.76	6.67
23	6	38.42	34.20	4.22	25	6	38.38	31.70	6.68
26	5	38.20	33.18	5.02	28	6	38.55	32.21	6.34
Total & Ave. 187 samples from 12 bulls							38.39	32.91	5.48

12頭の雄牛について測定した187例の平均は、体温（直腸温）が38.39℃、陰囊皮温は32.91℃であって、その差は5.48℃であった。また、測定期間中の外気温の最高は35.4℃であったが、この場合も含めて期間中の体温が39℃を超えることはなかった。

つぎに陰囊皮温についてみると、7、8月はおおむね33~34℃台で推移したが、比較的冷涼期となる9月下旬から10月にかけては、31~32℃台と僅かに低くなった。これらの推移を、外気温の変化と関連づけて一括図示すれば図1のとおりである。

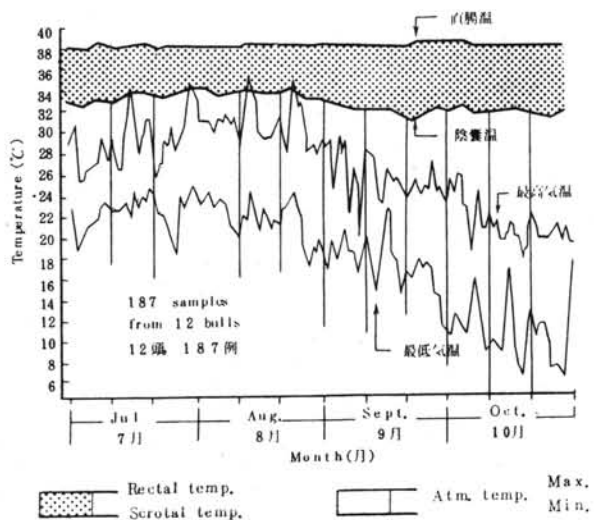


Fig. 1. Effect of atmospheric temperature on scrotal temperature
陰囊温に及ぼす外気温の影響

図から知られるように、高気温が続く時期には、直腸温と陰囊皮温との差が僅かに短縮される。しかし、かゝる微妙な陰囊皮温の変化が、精液性状とくに acrosome cap の形態的变化に及ぼす影響は、後述されるように個体によって、あるいは同じ個体であっても採取ごとにかんがりの変異が認められる。

2. acrosome cap の形態異常と従来の分類による奇形精子との関連

従来、わが国では精子の acrosome cap の形態異常は奇形として取り上げられていなかった。これは冒頭に述べたように適確な検査方法がなかったことも、その理由の一つとして考えられ、したがって、夏季不妊雄牛から得た精液について acrosome cap の形態を調べた報告もみることができない。この実験は、夏季に高温が持続する時期に採取した精液について、acrosome cap の形態を調べ、その形態異常と従来の分類による奇形精子との関連を知るとともに、精子の生存性とどのような関連があるかを知るために行なわれた。

ここでいう「従来の奇形」の分類は西川氏²¹⁾の方法によったが、分類上の手段として精子の頭部から尾部へかけて精査し、1個の精子で仮りに頭部と尾部に奇形の認められるものは、頭部から順にすなわち頭部奇形だけを

とってその項に分類し、尾部奇形の項には入れず、1個の精子が重複して分類されることを避けた。

夏季に採取した牛精液は、個体によって精液性状に著しい差異があり、また同一個体であっても採取ごとに性状が著しく変化するものが少なくない。そこで、精子の形態を観察するにあたって、まず射出直後の精子生存性を考慮に入れ、図2に示すように4群に分け、それぞれのグループで得たサンプルについて観察を行なった。

Group	No. of samples	Sperm motility index just after collection
グループ	例数	採取直後の精子生存指数
A	6	Over 80
B	4	Over 70
C	6	Under 70
D	3	Under 25

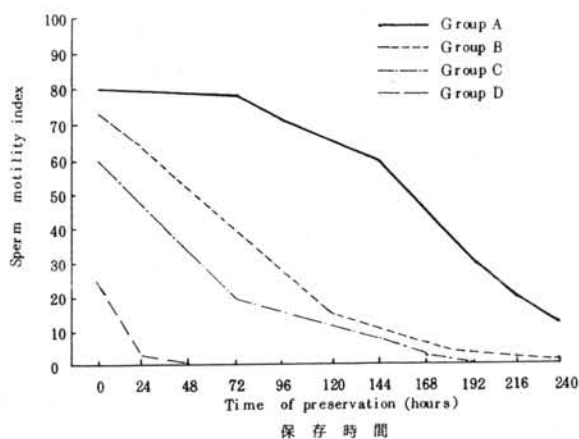


Fig. 2. Comparison of sperm viability during storage in summer
夏季における保存に伴う精子生存性の推移
(Semen was diluted 5 times with egg-yolk citrate, and stored at 4°C.)

まずはじめに、このようにして区分した4つのグループの精液を、卵黄緩衝液で5倍に希釈し、4℃で10日間保存して毎日1回精子の活力、生存率を調べた。各グループで得られた例数について、精子生存指数の平均値の推移を示すと図2のとおりであり、採取直後の生存指数が80以上の良好な精液では約1週間は充分実用に供し得る生存性を示し、かつ10日間保存したあとも全精子が運動を停止することはなかったが、射出直後の生存指数が低くなるにしたがって保存による生存性も短縮され、とくに採取直後の生存指数が25以下のD群にあっては、わずか2日間で全精子が完全に運動を停止した。

つぎに、上記4群の採取直後の精子について、従来の分類による奇形精子と、acrosome cap 形態異常精子との関連を調べた。その結果を一括表示すれば表4のとおりである。

Table 4. Relationship between deformed spermatozoa and spermatozoa with abnormal acrosome cap

奇形精子（従来の分類による）と acrosome cap 異常精子との関連

Group	Morphological appearance of acrosome cap acrosome cap の形態		Spermatozoa with abnormal acrosome cap acrosome cap 形態異常精子					Total 計	
			Normal 正常	Swell 膨化	Loss 欠損	Unusual stain-ability 染色異常	Malform 形成不全		Others その他
	Old classification 従来の分類	Kind of deformity 奇形の種類							
A	Normal 正常		90.7 %	4.2 %	0.8 %	— %	0.2 %	— %	95.9 %
	Kind of deformity 奇形の種類	Abnormal head 頭部奇形	1.2	0.1	0.5	0.2	0.1	—	2.1
		Slender pear-like 細長梨状 Others その他	0.8	0.2	0.1	0.2	0.1	—	1.4
	Kind of deformity 奇形の種類	Abnormal neck 頸部奇形	—	—	—	—	—	—	—
		Abnormal connecting-piece 接続部奇形	—	—	—	—	—	—	—
		Abnormal tail 尾部奇形	0.5	—	0.1	—	—	—	0.6
		Others その他	—	—	—	—	—	—	—
	Total 計		98.2	4.5	1.5	0.4	0.4	—	100.0
B	Normal		65.1	4.6	3.5	0.1	2.5	—	75.8
	Kind of deformity 奇形の種類	Abnormal head 頭部奇形	10.4	2.5	3.5	1.1	1.7	—	18.9
		Slender pear-like 細長梨状 Others その他	1.4	0.5	1.6	0.8	0.6	—	4.9
	Kind of deformity 奇形の種類	Abnormal neck 頸部奇形	—	—	—	—	—	—	—
		Abnormal connecting-piece 接続部奇形	—	—	—	—	—	—	—
		Abnormal tail 尾部奇形	0.4	—	—	—	—	—	0.4
		Others その他	—	—	—	—	—	—	—
Total 計		77.3	7.3	8.6	2.0	4.8	—	100.0	
C	Normal		56.6	2.6	2.2	0.1	0.4	—	61.9
	Kind of deformity 奇形の種類	Abnormal head 頭部奇形	17.8	3.4	7.8	0.8	2.5	—	32.3
		Slender pear-like 細長梨状 Others その他	0.7	0.9	1.1	1.3	0.6	—	4.6
	Kind of deformity 奇形の種類	Abnormal neck 頸部奇形	—	—	—	—	—	—	—
		Abnormal connecting-piece 接続部奇形	—	—	—	—	—	—	—
		Abnormal tail 尾部奇形	0.6	0.4	0.2	—	—	—	1.2
		Others その他	—	—	—	—	—	—	—
Total 計		75.7	7.3	11.3	2.2	3.5	—	100.0	
D	Normal		15.2	3.3	9.0	—	1.1	—	28.6
	Kind of deformity 奇形の種類	Abnormal head 頭部奇形	10.3	2.0	18.8	4.7	5.6	0.2	41.6
		Slender pear-like 細長梨状 Others その他	3.0	3.1	9.2	2.6	1.5	—	19.4
	Kind of deformity 奇形の種類	Abnormal neck 頸部奇形	—	—	—	—	—	—	—
		Abnormal connecting-piece 接続部奇形	—	—	—	—	—	—	—
		Abnormal tail 尾部奇形	5.0	2.1	3.3	—	—	—	10.4
		Others その他	—	—	—	—	—	—	—
Total 計		33.5	10.5	40.3	7.3	8.2	0.2	100.0	

採取直後の精子生存指数が80以上であって、且つ保存後の精子生存性も良好であったA群では、形態異常率の平均は僅かに9.3%であって、そのうち acrosome cap の形態異常は、「従来の奇形」と重複するものを含めても6.8%にしかすぎず、このことから、夏季であっても射精直後の精子生存指数が高く保存性も良好な個体の精液では、acrosome cap の形態異常もきわめて少ないということが云えよう。

つぎに、射出直後の精子生存指数が70以上であって保存に伴って比較的早く生存性が衰退したB群では、形態異常率の合計は34.9%であってかなりの増加が認められた。とくにこの場合、acrosome cap には形態的な異常がありながら従来の分類では正常精子として取り扱われていたものが10.7%あったということは、これまでに acrosome cap の形態異常が奇形として取り上げられていなかっただけに注目すべきことであるかもしれない。また、表から明らかなように細長梨状の頭部をもった精子が18.9%に増加し、一方、acrosome cap の形態異常は膨化と欠損に由来するものが15.9%を占めたが、両者の重複異常は比較的少なかった。このことは精液性状がさほど悪化していない時期における雄牛の夏季不妊を早期に発見するためには、acrosome cap の膨

化と欠損精子の出現にかなりの注意を払うべきであることを示しているのかも知れない。

射出直後の精子生存性が不良であって活力検査による精液性状の面からも明らかに夏季不妊と認められたC群およびD群では、精子生存指数が低下するにしたがって従来の奇形精子に acrosome cap の形態異常が重複するものが漸増する傾向を示し、とくに細長梨状頭部をもった精子に acrosome cap の欠損するものが多発する傾向が認められた。

acrosome cap の形成不全は、射出直後の精子生存指数が低下するのに伴って漸増する傾向がみられ、精液性状のもっとも悪かったD群では8.2%にまで増加した。かかる形成不全は精子完成が障害されるために起こってくるものであり、¹⁷⁾ 且つD群で観察した形成不全のなかには acrosome cap が肥厚(3.7%)あるいは突出(1.5%)しているものが、反転(2.2%)あるいは舌状(0.8%)を示す形成不全よりも多く出現したことから考えてこのようなグループに含まれる雄牛では、すでにかなり強度の精子完成障害が起こっているものと考えられる。

以上、夏季に得た牛精液について、これまでに得られた成績の一部に例数を加え、これを、夏季以外の精液性状がもっとも安定していると考えられる時期のそれと比較すると表5のとおりである。

Table 5. Relationship between percentage of motile spermatozoa and percentage of spermatozoa with abnormal acrosome cap

精子生存率と acrosome cap 異常精子率との関連

Season 季節(月)	% of Samples 例数	Sperm motility index 精子生存指数	Spermatozoa with abnormal acrosome cap acrosome cap の形態異常					
			Total 計	Swell 膨化	Loss 欠損	Unusual stain- ability 染色異常	Malform 形成不全	Others その他
Feb. to Apr.	19 ejaculates from 13 bulls	80-85	5.5	2.4%	2.5%	0.4%	0.2%	0.01%
Jul. to Sep.	16 ejaculates from 9 bulls	Over 70	16.5	6.2	6.5	1.3	2.5	0
Jul. to Sep.	10 ejaculates from 6 bulls	25-70	41.9*	12.4	21.0*	5.1	3.4	0
Jul. to Sep.	3 ejaculates from 2 bulls	Under 25	66.5*	10.5	40.3*	7.3	8.2	0.2

Note: * ... P < 0.05

2月から4月までのあいだで、精子生存指数が80～85の範囲にあった19例についてしらべた acrosome cap の形態異常率の平均は5.5%であった。

これに対して、7月から9月までのあいだで、生存指数が70以上のサンプルについてしらべた異常率の平均は16.5%であり、前者との差は有意のものとはいえなかったが、膨化と欠損が増加する傾向が認められた。また同じ時期に生存指数が20～70の範囲にあったものでは異常率の平均は41.9%に著増し、生存指数が80以上のグループにみられる acrosome cap 異常率との差は統計的に有意 ($P < 0.05$) であり、同様の有意な差が生存指数20以下のサンプルでも認められた。

また、形態異常の内訳をみると、射精直後の精子生存性が低下するのに伴って、acrosome cap 欠損精子の有意 ($P < 0.05$) な増加が認められた。

採取した精子の活力・生存率が低く、あるいは奇形率が高いために受胎に支障があると認められる精液は、法の定むるところにしたがってこれを人工授精の用に供することはできない。しかし、これまでに述べてきた acrosome cap の形態異常は、わが国ではいまだ奇形として取り扱われていない。

しかしながら、例えばさきに掲げた表4の中のB群にみられるように、従来の奇形の分類では奇形として取り扱われない精子のなかに、acrosome cap に異常を認めるものが10.7%あったということは注目すべきことであり、とくにこの場合、採取直後の精子生存指数が70以上という、少なくとも精子生存性の面からだけでは「不良な精液」とは言い得ない材料から得られた数値であることに着目しなければならない。つまり、かかる acrosome cap の単独異常を奇形として取り扱わない従来の検査方法に従った場合、形態異常はその分だけ低く評価されることになる。

Hancock¹⁹⁾ は、牛精液について死滅精子率と cap 欠損率との関連を調べた結果、両者間に有意 ($P < 0.001$) の相関があり、このことから、精子頭部の露出は精子の死を意味するとしている。氏のいう "cap" とはその報告の内容からみて、こゝに本文で述べている acrosome cap と同じものを指しているものと思われる。また、acrosome cap の膨化については、その輪郭が鮮明さを欠く程度の軽微な変化から、acrosome cap の側縁にいたるまで全体にわたって強度に膨化するものなど、種々の変化がみられるが、このように膨化した acrosome cap は、やがては離脱あるいは崩壊の運命をたどるものと考えられる。²²⁾

以上のことから、acrosome cap の膨化あるいは欠損した精子が受胎能力を低下させる原因の一部分を占める

ということは容易に推測し得るところであり、このような考え方は、射出直後の精子生存性が低いものでは、acrosome cap 欠損精子が有意 ($P < 0.05$) に増加するという事実(表5)からも肯定し得よう。

夏季において、射出直後の精子生存指数が70以下の場合、acrosome cap の形態異常は有意 ($P < 0.05$) に増加したが、一方、生存指数が70以上であって精子生存性の面からみただけでは比較的良好的な精液であっても、acrosome cap の形態異常が高率に増加しているものもあり、しかもかかる精液では保存に伴って精子生存率の急速な低下が認められる(図2)ので、人工授精の実務において、とくに注意しなければならない点である。

と同時に、acrosome cap の形態異常率を個体ごとに前もって適確に把握しておき、時期別の推移について注意を払うならば、雄牛の夏季不妊をかなり早期に発見することが可能であろう。

Ⅱ 凍結過程の各温度で取り出した牛精子の acrosome cap の形態的变化

牛精子をドライアイス-アルコールを用いていわゆる polge の方法²³⁾ で凍結した場合、凍結過程で精子に重大な損傷を与えるとされている温度すなわち「危険温度」に関しては、かなり以前に polge が、凍結、融解後の精子生存性の面から²⁴⁾ -15°C ～ -20°C のあいだであることを報告して以来、精子生存性に関してはすでにかかりの報告²⁵⁾²⁶⁾²⁷⁾²⁸⁾²⁹⁾ がなされており、さらにごく最近に³⁰⁾ いたって丹羽、吉田、西川氏らは、代謝機能の面からこの問題を調べ、 -20°C ～ -30°C の温度域で牛精子の呼吸能が阻害されること、また -20°C ですでに解糖能が著しく阻害されること、などを明らかにしている。そして2.3の報告ではかかる危険温度域で受けた精子生存性の低下あるいは代謝機能の阻害が、それ以下の温度では相加的に増加することがないという点でおおむね一致している。

かように、凍結過程の危険温度についての研究は、ごく一部で代謝機能に関する研究がなされているほかは、精子の生存性を対象とした研究が大部分であり、筆者のしらべた範囲では、凍結過程の牛精子について、acrosome cap の形態的变化をしらべた報告はみることができない。

精子は凍結される過程で、周囲溶液の氷晶形成など種々な物理的障害を受けると予測されているところから、その acrosome cap を形態学的にしらべることが意義のあることと考えられる。

そこで、 $+4^{\circ}\text{C}$ から -19.6°C までの各温度で取り出した牛精子の acrosome cap の形態をしらべ、形態異常の増加が如何なる温度域で起こってくるかを知るととも

に、凍結処理によって運動性を失った精子の割合とどのように関連するかを知らうとした。

採取した精液は30℃の条件下で凍結用セナミンA液を用いて希釈し、約2時間を要して4℃まで冷却したのち、同B液を10分間隔で5回に分けて添加し、最終の精子濃度が1ml当たり1億以上であるようにした。

精液は、1mlづつを16本のストロー精液管に分注し、閉封し、18～20時間のグリセリン平衡を行なったのち、うち12本は+4℃から-15℃までを毎分2℃、-15℃から-79℃までは毎分8℃の割合でドライアイス-アルコールを用いて凍結し、アルコール槽の温度が0°、-10°、-20°、-30°、-40°および-79℃に達したときに2本づつを取り出し、他の2本は、西川、宮本、入谷氏ら³¹⁾の「窒素ガス簡易急速凍結法」で凍結し、液体窒素中に5分間投入したのち取り出し、それぞれを20℃の水中で融解した。のこりの2本は4℃のまま静置し、また原精液のままなんらの処理も加えなかったものをそれぞれ「対照」とした。融解した精液は0.1Mの磷酸緩衝液(以下、緩衝液と略記)を用いて洗滌した。すなわち、2mlの融解精液に20℃の等温条件下で4mlの緩衝液を添加し、静かに混和したのち約500Gで10分間遠心分離し、上澄液を捨

て、これにもとの量になるまで緩衝液を添加して再び洗滌操作を反復したのち、その沈渣にごく少量の緩衝液を加えて静かに混和した。

この洗滌処理は、精子の acrosome cap の染色性を良好ならしめるために行なわれ、緩衝液の添加および遠心回転などの処理は、それらの処理によって acrosome cap を形態的に損傷することがないと考えられる予備的な実験結果にもとづいて行なわれた。

また、acrosome cap の形態の分類にあたって、「膨化」をつぎの3段階に細分した。

- + ... acrosome cap の輪郭が鮮明でなく波状になったもの、あるいはしわ状の濃染部分が認められるもの。
- ++ ... 頭部の前縁に沿って acrosome cap に淡染する部分が生じたもの。
- +++ ... acrosome cap が全体にわたって膨化するものおよび離脱、崩壊の像を示すもの。

凍結過程の各温度で取り出し、融解後洗滌した精子の生存指数と acrosome cap の形態異常率の平均を一括して示せば表6のとおりである。

Table 6. Morphological changes of acrosome cap in bull spermatozoa picked out at various temperatures in freezing process

凍結過程の各温度で取り出した牛精子の acrosome cap の形態的变化

Temp. reached (°C) 到達温度(°C)	Sperm motility index 精子生存指数	Spermatozoa with abnormal acrosome cap (形態異常)							
		Total 計	Swell 膨化 + ++ +++			Loss 欠損	Unusual stain-ability 染色異常	Malform 形成不全	Others その他
Control (Untreated)	81.2	6.67%	4.07%	0.7%	0.12%	1.30%	0.40%	0.05%	0%
+ 4 ^{a)}	80.6	8.98	4.65	1.05	0.30	2.30	0.55	0.08	0
0 ^{a)}	80.6	10.38	7.20	0.65	0.10	1.97	0.44	0.02	0
-10 ^{a)}	77.2	12.60	8.42	1.02	0.17	2.57	0.40	0.02	0
-20 ^{a)}	56.2	19.42**	13.95	1.75	0.55	2.62	0.45	0.10	0
-30 ^{a)}	43.4	26.05**	17.15	2.17	1.55	4.75	0.38	0.05	0
-40 ^{a)}	35.4	32.55**	23.49	2.55	1.57	4.47	0.45	0.02	0
-79 ^{a)}	37.2	29.68**	22.15	2.60	0.88	3.63	0.42	0	0
-196 ^{b)}	50.9	30.50**	15.61	2.80	1.17	10.47	0.40	0.05	0

a) Semen was frozen in a dry ice-alcohol bath. (The rate of freezing was a drop of 2°C in temperature per minute from 4 to -15°C, and a drop of 8°C per minute in temperature from -15°C to -79°C.) ドライアイス-アルコール槽内で凍結。

b) Semen was frozen rapidly in liquid nitrogen vapour. 液体窒素ガス中で急速凍結。

Means of 8 ejaculates from 4 bulls **: P < 0.01

4頭8例平均。

まず精子生存指数の推移についてみると、原精液になんらの処理も加えなかった「対照区」の生存指数は8.1.2であり、これに精液希釈、グリセリン添加、洗滌などの処理を加えた「4℃区」の場合でも8.0.6であって、ほとんど変化を認めない。

凍結による精子生存性の明らかな低下は、-20℃に達したときに認められ、その後-40℃までは温度が低くなるにしたがって生存指数も漸次低下する傾向が認められた。しかし、-40℃以下は、-79℃まで温度を下げてこれに伴って生存指数がさらに低下することはなかった。このことは、前述の凍結速度で凍結した場合の精子の生存性に対する危険温度域がおおむね-20℃から-40℃の範囲にあることを示しており、これまでになされている前出の諸報告と一致している。

また、窒素ガスによる急速凍結は、ドライアイス-アルコールによる凍結法に比べて、かなり高い精子生存性が得られることはすでに明らかにされているが³¹⁾、この実験においても後者の方法による精子生存指数が3.7.2であったのに比べて、前者のそれは5.0.9%であり、明

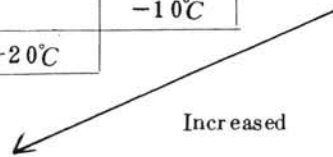
らかに高い値が得られた。

つぎに acrosome cap の形態異常率の推移についてみると、「4℃区」では「対照区」に比べて異常率が僅かに増加する傾向がみられたが、異常率の差は統計的に有意のものではなかった。したがって、精液希釈、グリセリン添加あるいは洗滌など、この実験でとられた一連の処理が、以下に述べる異常率の増加の有無を論ずるうえで、結果の判断を大きく誤らせる要因となることはないと考えられる。

この観点にたつて、各温度で取り出した場合の異常率の推移をみると、0℃および-10℃では異常率に僅かな増加がみられたが、対照との差はいずれも有意のものではなかった。しかし、-20℃で取り出した精子の形態異常率の平均は1.9.4.2%であり、対照との差は有意 ($P < 0.01$) であり、異常の大部分は acrosome cap の軽度の膨化に由来するものであった。ついで-30℃および-40℃で取り出したものでは形態異常の漸増が認められ、表7に示されるように、-20℃から-30℃へ、-30℃から-40℃へかけての異常率の増加は

Table 7. Tests of significance between temperature on increase of spermatozoa with abnormal acrosome cap
acrosome cap の形態異常精子の増加についての温度間の差の有意性の検定

P < .01	P < .01	P < .01	P < .01	P < .01				Control
P < .01	P < .01	P < .01	P < .01	P < .01				+4℃
P < .01	P < .01	P < .01	P < .01	P < .01				0℃
P < .01	P < .01	P < .01	P < .01					-10℃
P < .01	P < .01	P < .01	P < .05					-20℃
P < .05								-30℃
								-79℃
								-196℃
								-40℃



いずれも統計的に有意のものと認められ ($P < 0.05$) またいずれの場合も異常の大部分は acrosome cap の膨化に由来するものであったが、acrosome cap の欠損例が僅かに増加する傾向も認められた。

しかし、-40℃以下は、-196℃まで温度を下げて、これに伴って acrosome cap の形態異常が有意に増加するというのではなく、このことはさきの精子生存指数の推移で認められた所見と傾向を同じくするものであって興味深い。

-196℃に凍結後、融解した精子では、acrosome cap 欠損精子の出現率が-79℃区に比べていくぶん増加したが、これが-196℃という極低温へ下げたことによるのみ招来されたものであるか否かについては、さらに詳細な検討が必要と考えられる。なぜならば、膨化した精子の acrosome cap がやがては崩壊の運命をたどるものであることは、すでに大沼氏¹⁷⁾ならびに著者²²⁾が豚精子を用いての実験で明らかにしているところであり、かりに牛精子でも acrosome cap の膨化が、離脱あ

あるいは崩解に先立って起こる形態的变化の一つであるとすれば、acrosome cap の欠損精子の増加に併行して膨化¹⁹⁾あるいは卍のものなどもそれなりに増加してよいはずである。しかし、少なくとも今回の実験結果からだけではそのような一連の傾向は認められないので、さらに実験を重ねたうえで明確な結論を得たい。

以上のことから、この実験で用いた凍結速度で牛精子を凍結した場合、凍結過程における acrosome cap の形態異常の増加は、 -20°C から -40°C の範囲で起こってくることは明らかであり、且つ、それ以下の温度に下げても形態異常率が相加的に増加するものではないことも明らかである。

つぎに、通常の精子活力・生存率検査法によって運動を停止していた精子の割合を運動停止精子率とし、これに前述の acrosome cap 形態異常率の推移を対比させて両者の推移を比較すると図3のとおりである。

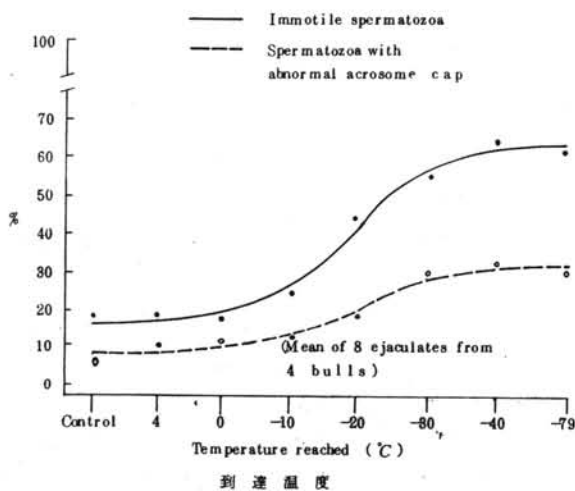


Fig. 3. Relationship between immotile spermatozoa and morphological changes of acrosome cap during freezing process
運動停止精子率と acrosome cap 形態異常精子率との関連

運動停止精子率は -20°C から -40°C の温度域で著しく増加するが、これに併行して acrosome cap の形態異常率も漸増する傾向がみられる。しかし、その値は前者のそれをかなり下回るかたちで推移しており、凍結過程の各温度を通じて acrosome cap に形態的变化を認める精子の割合は、運動を停止した精子のほぼ半数にすぎないことが知られる。

これまで、凍結後の牛精子について acrosome cap の形態異常と生存性との関連づけて述べた報告はみるこ

とができない。

射出直後の原精液について調べたものとしては、Hancock¹⁹⁾の報告があげられるが、この場合も acrosome cap 欠損精子の出現率は、エオジンに染まる精子の割合よりもかなり低い値を得ている。また、大沼氏¹⁷⁾は牛の精液を 5°C に保存し、保存日数が経過するにつれて精子生存率が低下するが、これに伴って acrosome cap の膨化を主徴とする形態異常が増加することを認めている。保存液中に添加されている卵黄が、温度の急変による障害から牛精子をきわめて効果的に保護することも明らかにされている²²⁾。

以上のことから考えると、この実験においても、凍結過程の各温度で取り出した精子の運動停止率と acrosome cap の形態異常率が関連するところから、一方では、acrosome cap の形態異常の大部分が凍結によって生存性を失った精子の死後変化像であろうことは容易に推測されるが、他方では、形態異常の大部分が軽度の膨化を主徴とするものであること、さらには図3にみられるように、形態異常精子率が運動停止精子率をかなり下回ったことなどから考えて、牛精子の acrosome cap は、現行の凍結方法による、 -196°C までの冷却という処理に対しても、光学顕微鏡的にはかなり変化し難い構造を持っているものと考えられる。

要 約

体外に射出された牛精子の acrosome cap の形態を調べるために、精子をオルト液で固定し、緩衝ギムザ液で染色した。

主なる結果はつぎのごとくであった。

I 射出直後の牛精子(とくに夏季以外の)の acrosome cap 形態異常率

1. 13頭19例についてしらべた牛精子の acrosome cap 形態異常率の平均は 5.53% であった。
2. 形態異常の内訳は、膨化 2.36%、欠損 2.51%、染色異常 0.42%、形成不全 0.23%、および、その他 0.01% であった。

3. 寒冷衝撃を与えた牛精子について acrosome cap の形態を調べたが、形態異常の有意な増加は認められずエオジンに染まる精子の有意な増加とは関連が認められなかった。

II 夏季における牛精子の acrosome cap の形態異常

1. 夏季であっても射出直後の精子生存指数が 80 以上の良好な精液では、acrosome cap の形態異常率の平均(5頭6例)は 6.8% であった。
2. 夏季において射出直後の精子生存指数が 70 以下のものでは、指数が低くなるにしたがって acrosome

capの形態異常率も有意($P < 0.05$)に増加し、且つ従来の分類でいう奇形精子と重複するものが多く出現した。

3. 夏季において射出直後の精子生存指数が25以下のきわめて不良な精液では、従来の奇形分類でいう「細長梨状頭部」に「acrosome capの欠損」が重複する精子が高率に認められた。

4. 夏季において射出直後の精子生存指数が70以下のものでは、acrosome capの形態異常のうち、とくにacrosome cap欠損精子が有意($P < 0.05$)に増加した。

Ⅱ 凍結過程の各温度で取り出した牛精子の acrosome cap の形態的变化

1. acrosome capの形態異常精子率の有意な増加($P < 0.01$)は、 -20°C で取り出した精子で認められ、 -40°C までは温度の低下に伴ってacrosome capの軽度の膨化を主徴とする形態異常が漸増した。しかし、以下 -79°C あるいは -196°C まで温度を下げて形態異常がさらに相対的に増加することはなかった。

2. 上記の温度域におけるacrosome cap形態異常率の増加は、精子生存性の低下と関連する傾向が認められたが、凍結過程の各温度を通じてacrosome capに形態異常を認める精子の割合は、融解後に運動を停止している精子のほぼ半数にしかすぎなかった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、実験計画の設定にあたってご指導をいただいた京都大学教授西川義正博士に深甚の謝意を表す。

さらに精子のacrosome capの検索については現北里大学助教授大沼秀男博士から直接ご指導いただく機会を得た。ここに記して懇切なご指導に対しお礼を申し上げる。

おわりに、ご校閲を賜った室賀利正副参事に深甚の謝意を表す。

なお、本報文中の実験成績Ⅱについては、昭和43年8月25日、和歌山市で開催された日本臨床獣医学会(近畿)にその一部を口演発表し、優秀研究として賞を受けた。発表にあたって貴重な助言をいただいた県農業技術センター小林健二畜産部長に謝意を表し、実験の遂行に協力を惜しまれなかった繁殖衛生研究室の諸氏に心からお礼の言葉を申し述べる。

引用文献

- 1) WHITE I. G: Anim. Breed. Abst. 26 109, 1958.
- 2) 西川義正: 家畜人工授精法, 104, 東京養賢堂 1956.
- 3) LEBLOND, C. P & Y. CLERMONT: Amer. J. Anat. 90, 167, 1952.
- 4) BOWEN, R. H: Anat. Rec. 28, 1, 1924.
- 5) BEDFORD, J. M: J. Reprod. Fertil. 6 245, 1963.
- 6) 星 冬四郎(編): 繁殖学辞典 東京文永堂 1968.
- 7) WALDEYER, W: Handbuch der vergleichenden und experimentellen Entwicklungslehre der Wirbeltiere, Jena, 1906.
- 8) AUSTIN, C. R: J. Reprod. Fertil., 1 310, 1960.
- 9) BLOM, E: Fertil. & Steril., 1, 223, 1950.
- 10) HANCOCK, J. L: Vet. Rec., 61, 308, 1949.
- 11) HANCOCK, J. L: Exp. Biol., 30, 50, 1953.
- 12) DONALD, H. P. & J. L. HANCOCK: J. Agr. Sci., 43, 178, 1953.
- 13) 大沼秀男, 西川義正, 藤崎尚徳: 家畜精子の acrosomic system に関する研究。畜試研報 Ⅱ1, 135, 1963.
- 14) 白山勝彦: 未発表, 1970
- 15) 西川義正: 家畜人工授精法, 99, 養賢堂, 東京 1951.
- 16) LASLEY, J. F., EASLEY, G. T., and McKENZIE, F. F: Anat. Rec., 82, 167, 1942.
- 17) 大沼秀男: 畜試研報 Ⅱ3, 105, 1963.
- 18) 鳥居敏雄, 高橋眺正, 土肥一郎: 医学・生物学のための推計学, 東京大学出版会, 東京, 1954.
- 19) HANCOCK, J. L: J. Exp. Biol., 29, 445, 1952.
- 20) 広江一正, 富塚常夫, 花田 章: 昭和39年度日本畜産学会報告, 1964.
- 21) 西川義正: 家畜人工授精法, 107 養賢堂, 東京 1951.
- 22) 白山勝彦: 学位論文, 54, 1970.

- 23) POLGE, C., & ROWSON L. E. A: Rep. 2nd int. Congr. Anim. Repro., 1952.
- 24) POLGE, C. (1953): (西川義正, 家畜人工授精法, 545, 養賢堂, 東京, 1956. から引用)
- 25) O, DELL, W. T., ALMQUIST, J. O., and L. A. MARSH: J. Dairy Sci., 41, 79. 1958.
- 26) LARSON, G. L., & E. F. GRAHAM: A. I. Digest, 7, 6, 1959.
- 27) 丹羽太左衛門, 和出 靖, 副島昭彦: 昭和35年度日本畜産学会報告, 1960.
- 28) DAVIS, I. S., BRATTON, R. W., and R. H. FOOTE: J. Dairy Sci., 46, 333. 1963.
- 29) YASSEN, A. M., & R. H. FOOTE: J. Dairy Sci., 50, 893, 1967.
- 30) 丹羽皓二, 吉田重雄, 西川義正: 凍結精液研究会報 23, 1967.
- 31) 西川義正, 宮本 元, 入谷 明: 昭和41年度日本畜産学会報告, 1966.

写真説明

1. 正常な acrosome cap をもった精子 (acrosome cap の形態異常)
2. 前縁濃染
3. 膨化(+)
4. 膨化(++)
5. 膨化(+++)
6. 離脱過程にある acrosome cap
7. 欠損(左の精子)
8. 染色異常(上の精子)
9. 形成不全・反転(上の精子)

