

## 女性性器分泌液の精子の運動, 生存時間, 速度, O<sub>2</sub> up take に及ぼす影響について

### The Study on the Effect of Various Fluids of Female Genital Organs on the Oxygen uptake, Motility, Velocity and Preservation of Human Sperms

千葉大学医学部産科婦人科学教室(主任 御園生雄三教授)

佐藤 文彦 Fumihiko SATO

**概要** 精子は女性々器を上昇するに際して受精能を獲得し, 受精が成立すると言われている. Hammer & Williams (1963) 等によれば, 家兎精子を家兎子宮内で培養した場合, 或いは雄鶏精子を雌鶏卵管内で培養した場合, それぞれ射精直後の精子に比較して約2~4倍の酸素消費量の上昇がみられ, 射精直後の精子に比べ妊娠率が高まると報告している. しかしヒト女性々器分泌液による精子の酸素消費量の変動についての報告は少ない. 私は各種女性々器分泌液による精子の酸素消費量の変化を中心として, 精子の運動率, 生存時間, 速度の変化を観察し, 受精現象に対する女性々器分泌液の影響についての一面を検討し, 次の結果を得た.

- 1) 精子の酸素消費量は従来 Warburg 検圧計により測定されていたが, 本実験ではガスクロマトグラフィによる非気相下で, 一定溶存酸素中の精子の酸素消費量をみたもので検圧法の値より $\frac{1}{3}$ ~ $\frac{1}{6}$ 低かった.
- 2) 各種分泌液一定量の溶存酸素量は, 卵管液を最高に血清, 卵胞液, 子宮分泌液, 腹水, 精液の順に少なかった.
- 3) 各種女性分泌液添加後における精子の運動率, 速度, 生存時間への影響は血清において最も強く, 次いで卵胞液, 腹水と続き, 卵管液, 子宮液ではそれらより劣る傾向を示した.
- 4) 各種女性分泌液添加後の精子の酸素消費量と運動率との間には一定の関係を見出すことは出来なかったが, 各種分泌液添加後の酸素消費は血清と卵胞液において最も高い値を示した.
- 5) 以上の結果から精子の受精能, 受精現象について勿論結論的な事は言えないが, Kurzrok (1953) 等が言う様に, 卵胞液が排卵と同時に卵管に取込まれ, 卵管液と相まって受精現象に何か影響を持つかの様な印象を受けた.

### 緒 言

受精現象が起こるまでに, 精子は腔, 頸管, 子宮, 卵管とそれぞれ物理的, 生化学的性状を異にする環境を通過して, 卵子と合流しなければならない. しかしヒト女性性器分泌液中における精子の動態についての報告は少ない.

動物においては卵管分泌液中での精子の受精能に関する研究に Chang (1951) 等がいる. 彼らは家兎およびラットを用い, 射精精子あるいは副睾丸内精子を, 排卵直前および直後の卵管内に注入して受精率を検討した. その結果, 精子が受精能を獲得するには, 子宮内あるいは卵管内で, 何ら

かの影響を受けることが必要であり, それは精子の maturation とは異なるものであることを明らかにした. そしてそれを capacitation と呼んだ. また Perloff (1955), Lutwak (1954), Olds (1957), 岩城 (1959) らの卵胞液の組成, Huggins (1942), Hotchkiss (1944), 久布白 (1959) 等の ph についての研究があり, 一方頸管粘液の化学的組成の分析に関しては Pommerenke (1951) 等の報告があるが, 分泌液が精子の運動率, 速度, 生存時間, 酸素消費等におよぼす影響についての報告は少ない. しかし Kurzrok (1953) が第1回国際不妊症大会において, 卵胞液という題の下に卵胞液

の果す役割について発表しているが、それによると、排卵時に卵と共に取り込まれた卵胞液が卵管を経て頸管にまで達し、精子は、それに沿って上昇し、これより栄養を取り、精子の生存時間、運動率等を良くするというものである。

また精子の酸素摂取率については、Old & Vandemark (1957) らが牛精子について、酸素摂取率を測定しているが、それによると、卵胞液、卵管分泌液、頸管粘液、子宮内液の順に摂取率が低下すると述べている。また Hammer & Williams (1963) は家兎精子を家兎子宮内で培養した場合、あるいは雄鶏精子を雌鶏卵管内で培養した場合、夫々の射精直後の精子に比較して、約2~4倍の酸素摂取率の上昇がみられ、射精直後の精子では受精率が0であつたが培養後では18%あつたと報告している。

しかし、これらはいずれの場合にもヒト以外の動物についての報告であり、ヒト精子についての報告はすくない。女性性器分泌液ヒト精子への影響をみるための *in vitro* で女性性器分泌液を添加し、運動率、生存率、速度、および酸素消費等を測定し、血清と比較検討したので報告する。

#### 実験材料および実験方法

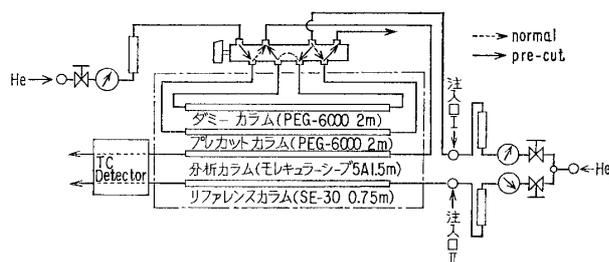
##### 1) 実験材料

ヒト精液については千葉大産婦人科不妊外来にて明らかに女性側に不妊因子を認め、精液検査において、精子数、運動率等が正常と思われるものを選び実験に供した。また卵胞液、卵管液、子宮分泌液は開腹症例より採取した。これらはすべて排卵期と思われる時期のものを選んだ。血清は外来患者より無差別に、頸管粘液は基礎体温表より、排卵前後と思われる時に一般外来患者より採取した。

##### 2) 実験方法

a) 精子浮遊液は精液一定量にリングル氏液等量を加え、2,000回転、5分間遠沈し、これを2回くりかえして作製した。観察は小試験管にリングル精子浮遊液 0.2ccを取り、各分泌液を 0.1cc加え室温に放置し、検査毎に攪拌して、その一滴を

図1 溶存酸素量測定の流れ図



スライドガラス上に滴下し、運動率、速度等を顕微鏡下で観察した。

b) 運動率の算定には、100コの精子を数え、そのうち非活動精子数を求め、精子数-非活動精子数/精子数×100として出した。また速度は *ocular micrometer* にて1秒間に5ミクロンのマスをいくつ横切るかで算定し、活性度の高い精子を5つ選び、その平均値を求めた。なお細菌の繁殖を阻止するために各試験管にペニシリン粉末10mgを加えた。

c) 酸素消費量測定には図1に示すような流れ図を持ったガスクロマトグラフィーを使用した。これは試料を注入口Iより注入し、プレカットカラムにてガス類と水とを十分に分離したのち、ガス類だけを吸着カラムに通し、酸素と窒素を分離した後、熱伝導度型検出器にて測定させる。途中吸着剤に水が入ると、ほとんどの場合、不可逆的に吸着し、吸着剤は著るしく劣化する。そこでプレカット内の水をバックフラッシュしてガスクロ系外に放出する。

##### d) 酸素消費量および溶存酸素の算出法

リングル、精液を等量入れ、2,000回/秒、5分間遠沈し、これを2~3回くりかえす。上澄 $1/2$ を捨て、1cc当りの精子数が $70\sim 80 \times 10^6$ 程度で、運動率80%以上のものを使用した。この精子浮遊液0.5ccにリングル氏液0.5ccおよび各分泌液0.2ccを加え、その上にうすく硫動パラフィンを覆せる。この中より *microsyringe* にて25  $\mu$ lを取りガスクロに注入する。図2においてaおよびcは $O_2$ のピークを、bおよびdは $N_2$ のピークを示す。 $N_2$ は同サンプルにおいては不変とみてa/bは各時間における溶存酸素に比例するので試料中

表1 各種分泌液, リンゲル, 血清中における酸素消費量

hour	1 ppm	2 ppm	3 ppm	4 ppm	5 ppm
serum	0.85±0.13	1.95±0.06	3.13±0.13	3.82±0.1	4.2±0.04
follicular fluid	0.75±0.1	1.7±0.1	2.38±0.2	3.28±0.2	3.58±0.1
oviduct fluid	0.52±0.1	1.25±0.2	1.67±0.1	2.1±0.08	2.4±0.06
uterine secretion	0.53±0.11	0.9±0.02	1.3±0.1	1.75±0.2	2.0±0.1
cervical fluid	0.83±0.15	1.7±0.1	2.2±0.13	3.0±0.1	3.3±0.1
ascites	0.35±0.1	0.58±0.08	0.95±0.1	1.23±0.05	1.6±0.08
Ringer	0.48±0.1	0.75±0.06	1.1±0.09	1.35±0.1	1.6±0.09

図2 酸素消費量および溶存酸素の算出法

O<sub>2</sub> up take 測定

リンゲル・精液を当量入れ  
2000回/sec・5分遠沈  
これを2~3回くりかえす

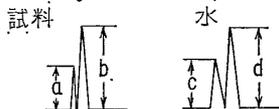
上澄1/2を捨てる

Count 70~80×10<sup>6</sup>/cc  
Motility 80%以上

精子浮遊液0.5ccにリンゲル0.5cc  
各分泌液0.2ccを加える

その上に流動パラフィンを入れる

microsyringeにて25ulを取りガスクロに注入



N<sub>2</sub>は同サンプルにおいては不変とみる  
a/bは各時間における溶存酸素に比例する  
Control 25°C 水中の溶存酸素 8 ppm  
試料中のO<sub>2</sub> = a/b × d/c × 8 (ppm)

の溶存酸素は次の式にて算出される。

$$O_2 = a/b \times d/c \times 8 \text{ ppm}$$

8 ppm : 蒸留水 (25°C) 中の溶存酸素量

### 実験成績

#### 1) 精子の酸素消費量および各分泌液の溶存酸素量

表1は各分泌液およびリンゲル, 血清添加後における精子の酸素消費量を経時的に表わしたもので, 図3はそれをグラフに示したものである。血清において最も高く, 添加後1時間で0.85±0.13 ppmを示し, 次いで卵胞液, 頸管粘液と続き, 卵管液, 子宮液と低下し, 腹水添加後においては, リンゲルのみのものよりむしろ少ない傾向を

図3 表1をグラフで示したもの

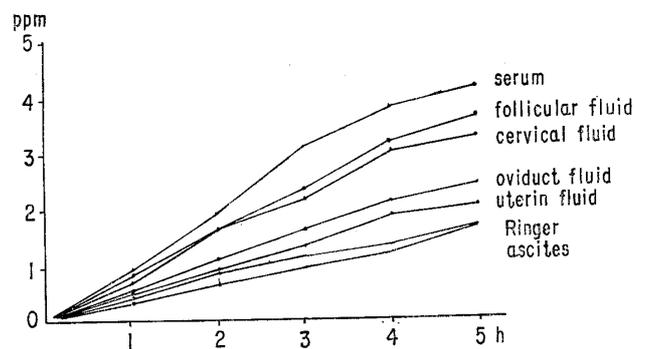


表2 各種分泌液中の溶存酸素

follicular fluid	10.5±0.4 ppm
tubal secretion	11.4±0.1
serum	10.4±0.16
uterine secretion	8.9±0.12
Ringer	9.2±0.1
ascites	8.2±0.23
cervical mucus	9.0±0.2
semen	8.5±0.16

示している。いずれも4時間までは経時的にはその増加を示すがその後はいくぶんその増加が軽減する傾向を示した。Durward & Vandemark(1957)が Warburg 検圧法にて, 牛の精子について行なった結果においても血清を除くと卵胞液が最も高い値を示すと報告しているが, 本実験にても, それとほぼ同じ傾向を示した。

表2は溶存酸素を示したもので, 卵管液において最も高く, ついで血清, 卵胞液, 子宮液, 腹水の順であった。卵管液の溶存酸素が最も高いことは, 卵子と精子が合流して, 新個体を作る場であることを考えると, 酸素の要求量は当然高まることが予想され合目的な事かもしれない。

表3 血清添加時の精子の運動率

例	0	10	20	30	40	50	60	70	hours
	%	%	%	%	%	%	%	%	80
1	80	56	38	24	19	14	6	0	%
2	76	52	32	23	16	11	4	2	0
3	64	43	29	16	11	7	2	0	
4	73	41	26	12	8	6	3	0	
5	46	51	29	13	8	5	2	0	
6	74	50	35	29	18	14	6	2	0
7	81	52	40	23	16	9	4	0	
8	84	50	38	21	18	8	3	0	
9	74	49	31	19	12	4	2	0	

表4 卵胞液添加時の精子の運動率

例	卵胞液量	0	10	20	30	40	50	60	70	hours
	cc	%	%	%	%	%	%	%	%	%
1	0.12	76	45	30	1	11	8	2	0	0
2	0.1	81	50	28	11	2	0	0	0	0
3	0.13	62	38	30	14	5	2	0	0	0
4	0.2	69	50	36	26	15	10	4	0	0
5	0.14	78	70	40	26	11	8	2	0	0
6	0.1	57	42	26	11	4	2	0	0	0
7	0.15	51	40	18	13	8	2	0	0	0
8	0.18	73	37	20	13	5	2	2	0	0
9	0.2	69	43	21	12	6	3	0	0	0
10	0.12	71	52	34	23	12	8	2	0	0
11	0.16	65	48	31	23	10	4	2	0	0
12	0.1	61	41	26	16	11	5	3	0	0

表5 卵管液添加時の精子の運動率

	0	10	20	30	40	50	60	70	hours
	%	%	%	%	%	%	%	%	%
1	70	30	15	10	5	0	0	0	0
2	72	32	10	2	0	0	0	0	0
3	78	28	12	6	2	0	0	0	0
4	65	35	16	9	3	2	0	0	0
5	67	21	16	7	2	0	0	0	0
6	73	36	18	8	3	0	0	0	0
7	67	30	16	5	2	0	0	0	0

2) 各分泌液および血清、腹水添加後における精子の運動率、生存時間

表3は血清添加後の精子の運動率を示したもので、運動率の半減時間は20時間で、生存時間は60~70時間である。表4は卵胞液添加後を示したもので運動率の半減時間は10~20時間で生存時間はおよそ60時間であった。卵胞液の量即ち卵胞の

表6 子宮液添加時の精子の運動率

例	0	10	20	30	40	50	60	hours
	%	%	%	%	%	%	%	70
1	73	33	18	10	4	0	0	0
2	70	32	16	8	3	0	0	0
3	61	28	11	4	0	0	0	0
4	64	27	14	3	0	0	0	0
5	72	32	13	5	2	0	0	0
6	75	36	25	13	5	0	0	0
7	68	31	14	7	0	0	0	0
8	66	34	21	10	3	0	0	0
9	72	29	20	7	2	0	0	0
10	71	28	19	10	4	0	0	0
11	65	21	12	4	0	0	0	0

表7 頸管粘液添加時の精子の運動率

例	頸管液	0	10	20	30	40	50	hours
	cc	%	%	%	%	%	%	60
1	0.32	72	21	15	2	0	0	0
2	0.25	68	16	2	0	0	0	0
3	0.3	52	30	11	0	0	0	0
4	0.2	72	28	6	0	0	0	0
5	0.24	72	20	10	2	0	0	0
6	0.12	66	22	8	0	0	0	0
7	0.1	69	21	8	2	0	0	0
8	0.26	74	36	12	3	0	0	0
9	0.15	65	18	8	0	0	0	0
10	0.21	68	20	6	0	0	0	0
11	0.14	61	11	2	0	0	0	0
12	0.2	70	31	12	2	0	0	0

表8 生理的腹水添加時の精子の運動率

例	0	10	20	30	40	50	60	hours
	%	%	%	%	%	%	%	70
1	75	50	20	14	6	2	0	0
2	81	48	12	4	2	0	0	0
3	64	53	21	11	4	2	0	0
4	66	45	18	11	5	2	0	0
5	67	51	29	13	4	2	0	0
6	71	49	28	10	3	0	0	0

大きさと運動率、生存時間とは一定の関係がない。表5は卵管液添加後のもので、運動率の半減時間は10時間で、生存時間は30~50時間で血清に比べおよそ半分である。表6は子宮分泌液添加後のもので運動率、半減時間も卵管液添加後と大差ない。表7は頸管粘液添加後のもので運動率の

図4 血清と卵胞液添加時における比較  
上より順に運動率, 速度, 酸素消費量

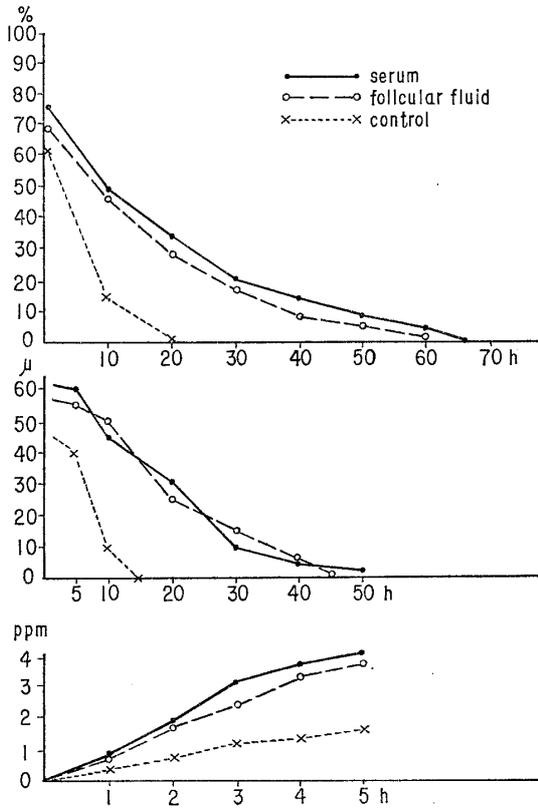


図5 血清と卵管液添加時における比較  
上より順に運動率, 速度, 酸素消費量

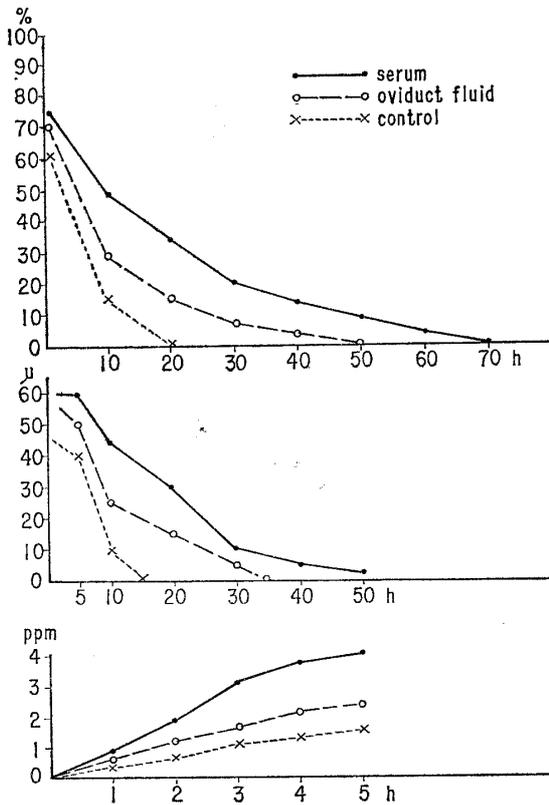


図6 血清と子宮液添加時における比較  
上より順に運動率, 速度, 酸素消費量

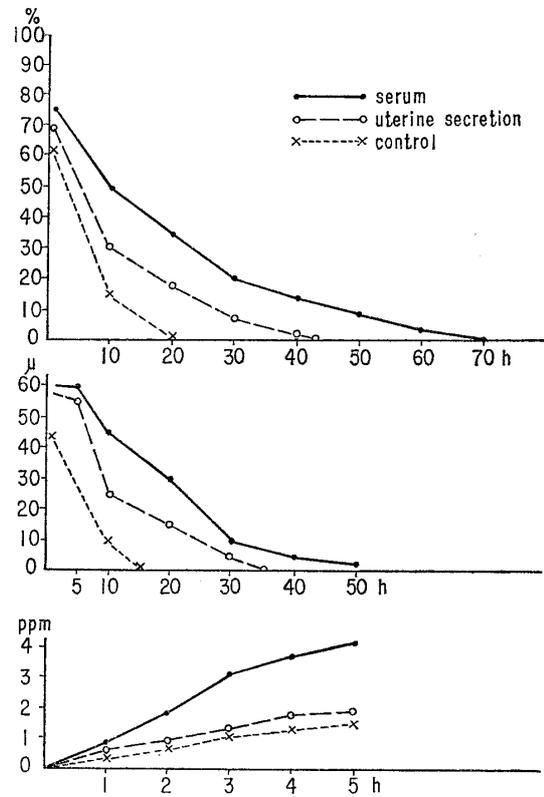


図7 血清と頸管粘液添加時における比較  
上より順に運動率, 速度, 酸素消費量

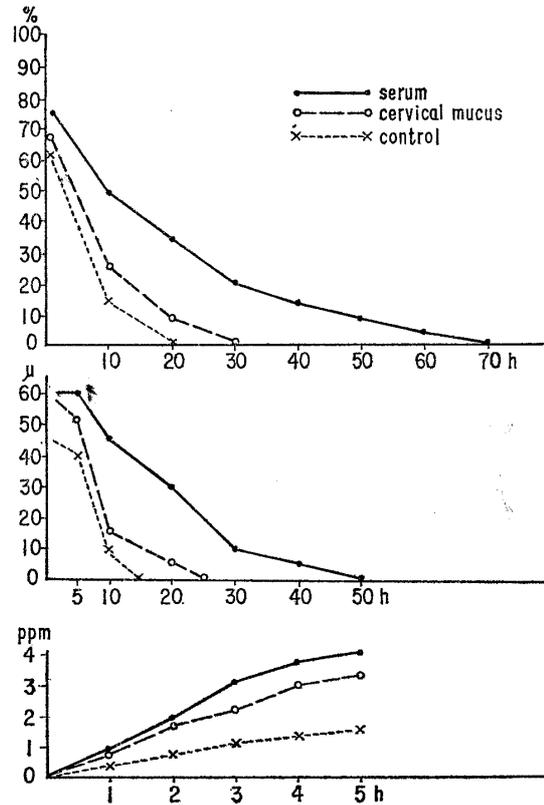
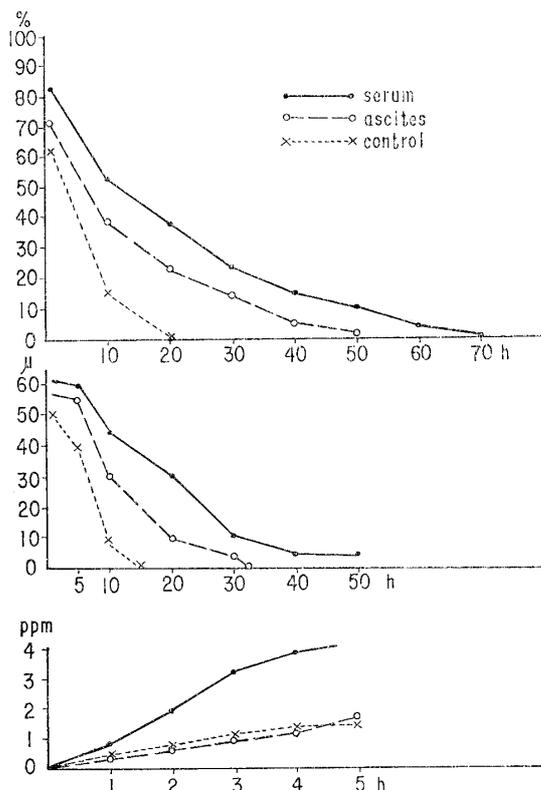


図8 血清と生理的腹水添加時における比較  
上より順に運動率，速度，酸素消費量



半減時間は5時間で血清に比べ $1/4$ ，生存時間は30時間で血清の約半分であった。表8は正常と思われる生理的腹水添加後のもので，運動率の半減時間は15時間であり，生存時間は40～50時間であった。

3) 各分泌液添加後における精子の運動率，生存時間，速度および酸素消費量と血清添加後におけるものとの比較。

図4は血清と卵胞液添加後における比較で運動率，生存時間，速度ともほとんど変わらず酸素消費量についても大差なく対照の約2～3倍を示している。図5は血清と卵管液添加後における比較で，運動率の半減時間は血清20時間，卵管液9時間，生存時間は血清70時間，卵管液50時間と血清に比べいく分悪く，速度は対照と血清との中間ぐらいである。酸素消費はリンゲルより，いく分高いが，血清に比べると2～3倍低い値を示す。図6は血清と子宮分泌液添加後における比較で，半減時間は血清の約 $1/2$ で8時間，生存時間は43時間

と血清の70時間に比べ，かなり悪く，速度においては5～10時間の間に半分に低下し，酸素消費量は血清の約 $1/2$ で対照よりわずかに高い程度であった。図7は血清と頸管粘液添加後における比較で，運動率の半減時間は頸管粘液中において7時間と血清の $1/3$ で，生存時間においても血清の $1/2$ と低下し，速度は10時間目頃よりかなり低下する。しかし酸素消費量は血清よりやや低い程度である。図8は血清と生理的腹水添加後における比較で，腹水中の半減時間は13時間，生存時間は比較的長く50時間である。酸素消費量は対照とほとんど変らない値を示している。

#### 総括並びに考案

受精現象が成立するには，排卵された卵が卵管に取り込まれることは勿論のこと，射精された精子が頸管，子宮，卵管と上昇し，受精の場である卵管膨大部に至ることが必要条件である。精子は途中，種々の環境を通過せねばならない。その各通過場所における溶存酸素量は精子の呼吸や代謝等に対して影響があるものと思われる。これに関する報告はほとんどみられない。本実験における溶存酸素量の測定結果は卵管液において最も高く，ついで血清，卵胞液の順であった。卵管液中では精子は多くの酸素を必要とすることを Hammer & Williams (1963) が家兎精子について報告しておりその組成分析では Lutvak Mann (1962) が，その中には多量の bicarbonate を含み，それが精子の呼吸を刺激すると報告している。各分泌液中における精子の酸素消費量は Durward & Vandemark (1957) の牛精子についての実験結果によると卵胞液，卵管液，リンゲル氏液，頸管粘液，子宮液の順に低下していると述べている。しかしヒトにおける本実験では精子の酸素消費量は卵管液よりむしろ卵胞液，頸管粘液の方が高い傾向を示した。また Chang & Walton (1940) はヒツジ精子で運動性と呼吸との間には相関関係を認めているが，本実験からは相関関係はみられなかつた。精子は好氣的解糖および嫌氣的解糖を行なつて運動エネルギー等を得ていることが知られているが，リンゲル浮遊精子でも一定の割合で呼吸を続け，運動を行なつていることが Lardy & Philips (1954) によつて確かめられている。

この際精子は内部に含まれている基質を利用して酸化を行なっており、その基質について彼らはリン脂質と考えた。その後 Hartree & Mann (1959) により、リン脂質の大部分はコリンラズマロゲンであることが確かめられた。また一般に哺乳類動物の精子は、細胞外の物質も利用する。例えばグルコース、フルクトース、マンノースのような解糖系に入る糖、およびソルビット、グリセリン、乳酸、ピルビン酸、酢酸、ある種の脂肪酸、アミノ酸の一部を好氣的に利用するが、これらの物質は精漿中や雌の生殖器中に含まれている。その他呼吸を刺激する因子として $\text{pH}$ 、イオン、滲透圧等が考えられるが、血清、卵胞液中には呼吸を刺激する因子が多い様に思われた。精子の女性の器内における生存時間については頸管内における5時間から30日以上、また子宮内においては20時間から7日間、卵管内においては10日から14日間とさまざまな報告がみられ、また女性性器内における精子妊孕性保存期間についても2日より30日までと色々である。一方卵胞液中における精子の運動率、生存時間等も *in vitro* にて観察されており、それらは対照よりも延長すると報告されている。本実験においても、ほぼ同様に60~70時間の間であつた。また卵胞液については Kurzrok (1953) 等は排卵時に卵と共に取り込まれた卵胞液が卵管、子宮、頸管へと下降し、一方、腔に射精された精子が卵胞液に触れ、賦活されて、卵管へ進入すると報告している。また岩城 (1959) は thoma の血球計算板を使用して、卵胞液の精子に対する趨化性の研究を行ない、リンゲル氏液にはみられないが卵胞液に趨化性があると報告している。本実験においても、卵胞液は血清について精子の運動、生存率等に影響を与え受精現象になにか関係があるように推察された。その他の分泌液についても同様に対照より、運動、生存率等が良好な結果を得た。これは松井 (1960) の子宮内膜、卵管内膜の抽出液によるものとほぼ同様の結果であつた。頸管液についても本実験にては対照より延長していた。女性性器中を精子が上昇するに当り各種分泌液の影響を受けな

がら、ある場所では呼吸を刺激されたり、また別の所では運動速度を増したりして、生物学的、化学的、物理的な影響を受けながら卵に近づくものと推測される。本実験結果からすると、運動率、生存時間からみれば血清、卵胞液の方が精漿よりも、又他の分泌液よりも精子の *medium* として好適のようである。又子宮分泌液、卵管液添加ではさほどの  $\text{O}_2$  up take の上昇もみられず、むしろ抑制的に作用し、血清、卵胞液は刺激的に働いている傾向を示した。いずれにしても、これらの結果が生殖という問題にどのような意味を持つかは今後の研究に待たねばならない。

### 結 語

開腹症例より排卵期と思われる時期に採取し得た卵管分泌液、子宮液、頸管粘液、又卵胞液、腹水、および血清を精子遊液に添加し、精子の運動率、生存時間、 $\text{O}_2$  up take の変動を時間的に追究し、上記の結果を得たが、しかし本実験は一連の受精現象に対する女性分泌液の影響の一面を観察したにすぎない。これら分泌液の詳細な組成分析はもちろんのこと、各組成の精子への影響、又各時期における組成の変化、あるいはホルモン投与、さらには炎症等による影響を追究すべきであろう。

稿を終るにあたり、御指導と御校閲を賜わった恩師御園生雄三教授に深く謝意を表すると共に、直接御教示を頂いた本学産婦人科高野昇講師並びに本学第1生化学麻生芳郎助教授に厚く感謝致します。

尚本論文の要旨は、昭和46年度日本不妊学会総会において発表した。

### 文 献

- 岩城 章 (1959) : 日本不妊会誌 4 : 4, 61.  
 小川繁樹 (1959) : 日本不妊会誌 4 : 1, 42.  
 久布白兼和 (1959) : 日本不妊会誌 4 : 5, 39.  
 高橋美行 (1960) : 日本不妊会誌, 5, 42.  
 松井一郎 (1960) : 日本不妊会誌5, 24.  
 Austin, C.R. and Austin, J. (1951): Sci. Res., 4, 581.  
 Austin, C.R. (1952): Nature, 170, 326.  
 Brechenridge, M.S. and Pommerenke, W.T. (1951): Fertil. and Steril., 2, 1.  
 Chang, M.C. (1951): Nature, 168, 697.  
 Durward Olds and Demark (1957): Am. J. Vet.

- Res., 7, 603.
- Huggins, C., Scott, W.W. and Hemimen, J.H.* (1942):  
Am. J. Physiol., 136, 467—473.
- Hotchkiss* (1944): Fertility in Men, Philadelphia  
J.B. Lippincott (1959): 4, 1, 42; 4, 5, 39.
- Hamner and Williams* (1963): J. Reprod. Fertil.,  
5, 143.
- Hartre, E.F. and Mann, T.* (1951): Biochem. J.,  
71, 423.
- Hartre, E.F. and Mann, T.* (1960): Biochem. J.,  
7, 251.
- Kurzrok, R.* (1953): Fertil. and Steril., 4, 479.
- Lutwak, Mann* (1954): J. Agr. Sci., 44, 477.
- Lardy, H.A. and Phillips, P.H.* (1945): Arch.  
Biochem., 6, 41.
- Olds and Van Demark* (1957): Am. J. Vet. Res.  
48, 603.
- Oldes* (1957): Fertil and Steril., 8, 345.
- Perloff, W.H. and Schuotz, J.* (1955): Fertility and  
Steril, 6, 1.
- Walton and Chang* (1940): Proc. Roy. Soc. B.,  
129, 517.

(No. 2514 昭47・2・7 受付)