

ウシ体外受精における媒精処理者の違いが 融解後凍結精子の運動性に及ぼす影響

○庄司 圭佑・宜保 敬也・近藤 伸一・佐々木 涼・白石 一馬・武久 正也
塚田このみ・平野 政子・小山 久一・堂地 修
(酪農学園大学)

諸言

凍結精子は融解後における運動性保持時間が液状保存精子や新鮮精子のそれよりも短い²⁾。このことから、体外受精において凍結精子を用いて媒精処理を行う際はできる限り迅速にかつ適正に操作する必要がある。

凍結精子を用いて媒精処理を行なう場合、融解、精子洗浄、受精能誘起および濃度調整を行って使用する。この処理の工程は処理者の経験により処理時間に差が生じ、精子が適正温度(38~39℃)以下の室温(20℃程度)に長時間曝され、精子の運動性や生存率に影響が受けると考えられる。

そこで本研究では、ウシ体外受精の際に熟練者および初心者で媒精処理を行ない、処理時間を測定し、媒精処理においてどの工程で時間を費やすのかということ調べた。また、両者の処理時間の差による処理後の精子の運動性を比較するため、精子運動能自動解析装置(以下、IVOS、HTM-IVOS Ver.10.6、Hamilton-Thorn)を用いて解析を行ない、媒精処理者の違いが融解後凍結精子の運動性に及ぼす影響も検討した。

材料および方法

1. 媒精処理

1) 精子の洗浄

実験には1頭の黒毛和種雄牛の凍結精液を用いた。凍結精液は37℃の温湯に30秒間浸漬して融解した。融解した精液はTakahashiらの方法⁵⁾に準じて、パーコール溶液(17-089-01、GE Healthcare Bio-Sciences AB)および10倍濃度のBO液を用い、90%パーコール溶液を作製した。さらに、45%パーコール溶液は1倍濃度のBO液と90%パーコール溶液を同量加えて作製した。精子の重層は、15mlのプラスチック遠沈管(Corning)に45%パーコール溶液を入れたのち90%パーコール溶液を底に入れ、45%パーコールの上に精液を470μl重層した。重層した精液は2000rpmで20分間遠心分離を行なったのち、上清をアスピレーターで吸引、除去した。

2) 精子の受精能誘起法

精子の受精能誘起法には、Brackett and Oliphantの方法¹⁾を一部修正して用いた。すなわち、パーコールで洗浄した精子に10mMヒポタウリン(H-1384、Sigma)およびノボヘパリン(A138、持田製薬)を添加した精子洗浄液を6ml加え、1800rpmで5分間遠心分離を行ない、上清をアスピレーターで吸引、除去した。

3) 精子濃度調整

洗浄後の精液は、マイクロピペットで混和して均一にし、50μlを3%NaCl溶液が4950μl入った遠沈管に入れ、100倍希釈した精子沈査液を作製した。精子数はトーマ血球計算盤(2計算室タイプ、エルマ)を用いてカウントしそれを4回反復して平均値を求め、精子処理液の添加量を算出した。

精子処理液は、ヒポタウリンおよびノボヘパリン添加BO液を用い、 6×10^6 /mlの濃度に調節したのち、さらに等量の20mg/mlウシ血清アルブミン(以下、BSA; A-4378、Sigma)添加BO液を加えて最終濃度を 5×10^6 /mlに調整し、精子浮遊液とした。

2. 媒精処理工程における時間計測の設定

工程①

精液を 37℃ の温湯に 30 秒間浸漬して融解後、あらかじめ 45 および 90% パーコール溶液を重層しておいたプラスチック遠沈管内の 45% パーコールの上に精液を 470 μ l 重層する。

工程②

重層した精液は 2000 rpm で 20 分間遠心分離を行なったのち、上清をアスピレーターで吸引、除去する。精子の受精能誘起法は、パーコールで洗浄した精子に 10 mM ヒポタウリンおよびノボヘパリンを添加した精子洗浄液を 6 ml 加え、1800 rpm で 5 分間遠心分離を行ない、上清をアスピレーターで吸引、除去する。

工程③

遠心分離後の精液は、マイクロピペットでゆっくりと混和して精子濃度が均一になった所で 3% NaCl 溶液が入った遠沈管に入れ、100 倍希釈の精子沈査液を作製する。その後、トーマ血球計算盤に載せる。

工程④

トーマ血球計算盤を用い、精子数をカウントし平均値を求める (4 反復)。

工程⑤

精子数の平均値から、精子処理液の添加量を計算し精子浮遊液を作製する。

媒精処理を上記の①～⑤の工程に区分けし、各工程の時間をストップウォッチを用いて測定した。

3. 媒精処理者の設定

媒精処理操作は熟練者 2 名および初心者 4 名で行い、各 1 回ずつ媒精処理を行った。また熟練者および初心者の区分けとして、熟練者は通常の媒精処理操作に要する時間が 60 分程度の者、初心者は 70～80 分程度の者とした。

4. 解析条件

IVOS による解析は、媒精処理により作製した精子浮遊液を 3 等分にし、それを媒精処理終了から 0、60 および 120 分ごとに 10 μ l ずつ採取し、38.5℃ に加温したマクラーチャンバーで解析を行なった。また 60 および 120 分に採取する検体は解析開始まで 38.5℃ に設定したインキュベーター内で保温した。IVOS の設定条件およびウシ精子用解析条件は、李ら⁴⁾ の報告に準じて行なった。

5. 解析項目

解析項目は精子生存率 (Motile)、前進運動精子率 (Progressive)、精子平均運動速度 (VAP)、精子頭部の振り幅 (ALH) および振り回数 (BCF) の 5 項目について解析した。

結 果

熟練者および初心者の媒精処理時間の平均値を表 1 に、精子解析の各項目を図 1～5 に示した。

媒精処理時間の合計は熟練者で 58 分、初心者で 76.8 分と熟練者が初心者よりも 18.8 分早い値を示した。工程ごとの処理時間では、精子数をカウント後、平均値を求め、精子処理液の添加量を計算し精子浮遊液を作製する工程④および⑤で熟練者が初心者よりも顕著に早かった。

精子生存率は媒精処理後 0 分では、熟練者 80% および初心者 57.6%、60 分で 54.0%、46.2%、120 分で 38.8%、26.7% と熟練者で高く、初心者で低くなる傾向がみられた。前進運動精子率においても同様に時間の経過とともに低下を示した。精子平均経路速度、精子頭部の振り幅および振り回数では、熟練者の値がやや高くなったものの、保温時間の経過とともに顕著な低下はみられなかった。

表 1. 媒精処理各工程における熟練者および初心者の処理時間の平均値

処理者	工程①	工程②	工程③	工程④	工程⑤	計 (分間)
熟練者	7 ± 1.4 *	29 ± 0.0	7 ± 0.0	10 ± 2.8	5 ± 1.4	58 ± 5.7
初心者	9.3 ± 2.5	30.5 ± 3.4	8.8 ± 2.6	18.8 ± 5.7	9.5 ± 2.4	76.8 ± 6.2

* : 平均値 ± 標準偏差

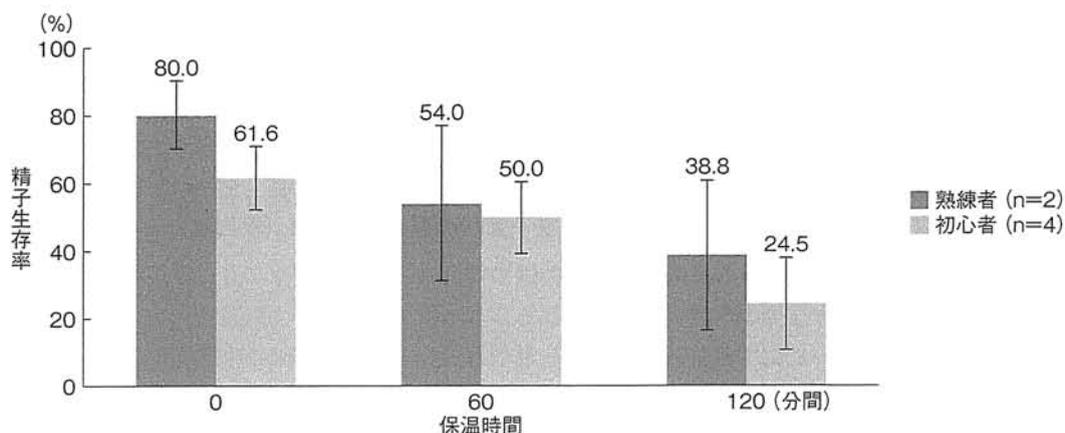


図 1. 媒精処理者の違いによる精子生存率の比較 (平均値)

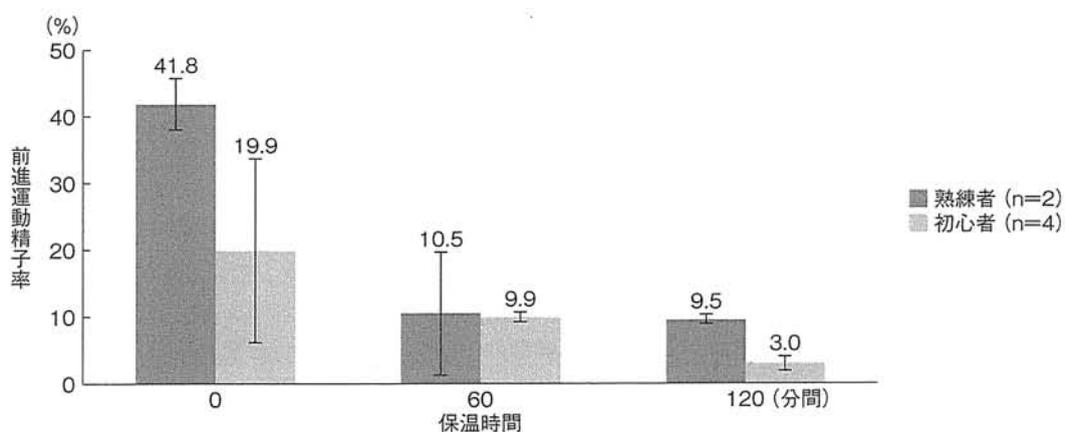


図 2. 媒精処理者の違いによる前進運動精子率の比較 (平均値)

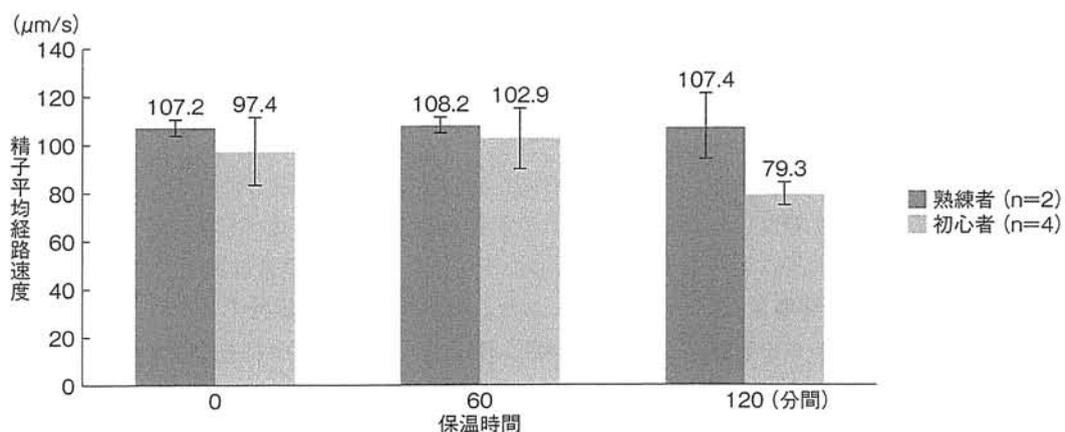


図 3. 媒精処理者の違いによる精子平均経路速度の比較 (平均値)

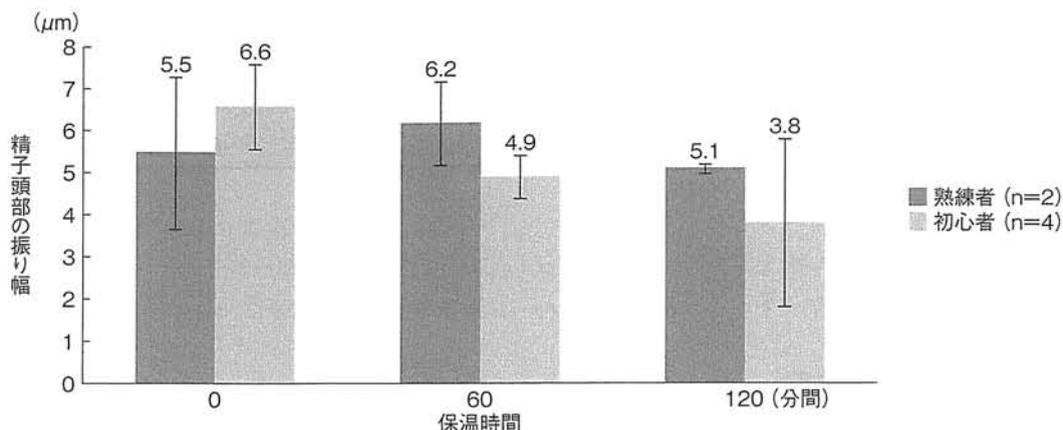


図 4. 媒精処理者の違いによる精子頭部の振り幅の比較 (平均値)

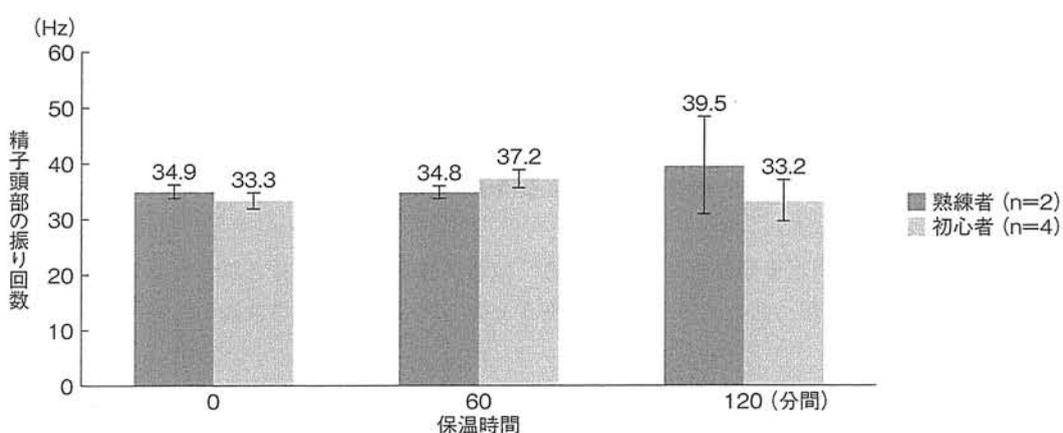


図 5. 媒精処理者の違いによる精子頭部の振り回数の比較 (平均値)

考 察

熟練者および初心者の媒精処理時間は、工程④で熟練者の 10 分に対し、初心者で 18.8 分および工程⑤で熟練者の 5 分に対し初心者の 9.5 分と顕著な差がみられた。工程④では、おもに精子数のカウントを行なう工程であり、初心者はこの工程でカウントごとに精子数が大きく異なり、カウントのやり直しを行ない、それによって時間が大幅にかかったことが理由として挙げられる。精子数が合わないのは、遠沈管内の精子を上手く混和できていないことが原因であると考えられた。

また、工程⑤では精子処理液の添加量を計算し、精子浮遊液の作製を行う工程であり、精子処理液の添加量の計算に時間がかかり過ぎたためと考えられる。

以上のことから、媒精処理を行なう際には迅速にかつ適正なマイクロピペットの混和技術の訓練が重要であると考えられる。

IVOS による精子の解析では、精子生存率は熟練者で高く初心者で低い値を示した。また、前進運動精子率においても同様に、精子生存率と類似した傾向が認められた。初心者が熟練者と比べて低い値となった理由は、初心者の処理時間が長かった工程④において、精子数をカウントしているときの精液は精子濃度調整前であるため、BSA を含まない BO 液に長時間曝されたことが挙げられる。精子は運動能を維持するために内在性および外在性の物質を代謝して運動エネルギーを獲得しているため⁶⁾、BSA 不在の BO 液中にある精子は脂肪酸等の基質をうまく代謝できていない状態にあると考えられる。精子の運動は、呼吸や解糖により ATP が鞭毛へ運ばれ、加水分解を経て滑走機構と同様の機構により運動しているため⁶⁾、代謝に必要な物質の輸送を助長する BSA を含んだ BO 液へ早めに混和させる必要があると考えられた。

精子平均経路速度、精子頭部の振り幅および振り回数の値は熟練者および初心者ともに保温時間の経過にともなう顕著な低下がみられなかった。しかし、これらの数値は低く、多くの精子は頭部を弱く左右に振りながら前進している様子が窺えた。従って、融解後の精子を用いた体外受精では受精能獲得 (capacitation) を経てハイパーアクチベーション (hyperactivation) が起きるまでの時間すなわち媒精処理終了から少なくとも 5~6 時間³⁾ は頭部の動きを低下せずに、ほぼ一定に保てるよう、精子処理時間を短縮する必要があると考えられた。

要 約

本研究では、ウシ体外受精において熟練者および初心者で媒精処理を行ない、処理時間を測定し、媒精処理においてどの工程で時間を費やすのかを調べた。また、処理時間の差から精子の運動性を比較するため、精子運動能自動解析装置 IVOS を用いて解析し、それぞれが処理した精液の精子運動性に及ぼす影響を検討した。熟練者および初心者の媒精処理では、精子数のカウントおよび媒精処理液の作製で両者との間で顕著な差がみられた。

精子の解析では、精子生存率および前進運動精子率において熟練者と初心者との間で差がみられた。これらの結果から処理者間の差を小さくするには、初心者側の媒精処理の訓練が必要であり、特にマイクロピペットによる精液の混和技術の練習を重点的に行なう必要があると考えられた。処理時間を短くすることで、その後の精子生存率および前進運動精子率の改善に繋がり、それが体外受精による受精率においても向上し胚発生率の向上へと繋がると推察された。

参考文献

- 1) Brancnett, B. G., Oliphant, G., 1975. Capacitation of Rabbit Spermatozoa in vitro. Biol. Reprod. 12: 260-274.
- 2) 柏崎直巳 2010 家畜の繁殖技術, 人工授精と精液の保存 [動物生殖学, 佐藤英明編], pp193-206. 朝倉書店. 東京.
- 3) 内藤邦彦 2010 哺乳類の生殖, 受精と初期胚の発生 [動物生殖学, 佐藤英明編], pp90-103. 朝倉書店. 東京.
- 4) 李玉田. 1996. ウシ凍結精液性状の改善に関する研究とくに精子運動能自動解析装置による精子の運動性の解析. 1996 年度酪農学園大学大学院酪農学研究科家畜繁殖学研究室修士論文. 1-36.
- 5) Takahasi, Y., Hisinuma, M., Matsui, M., Tanaka, H., Kanagawa, H. 1996. Development of in vitro matured/fertilized bovine embryos in a chemically defined medium: Influence of oxygen concentration in the gas atmosphere. J. Vet. Med. Sci., 58: 897-902.
- 6) 高坂哲也 2010 哺乳類の生殖, 雄の生殖 [動物生殖学, 佐藤英明編], pp41-66. 朝倉書店. 東京.