— 短 報 —

Percoll 密度勾配遠心法での遠心分離結果に及ぼす
精子活力の影響戸津川清・萱場猛夫*・大澤有子*・上野宏樹**
須藤信也**・富樫 稔**

東北大学医学部, 仙台市 980

* 山形大学農学部, 鶴岡市 997

** 山形県立養豚試験場, 酒田市 998-01

(1989 年 3 月 22 日 受付)

ヒトの X および Y 精子の分離が可能であることが報告^{1,2)}されて以来, Percoll 密度勾配遠心法を用いての精子分離が注目されて来た。本方法による利点は, Percoll が細胞に無毒であり, 密度 1.13 g/ml まで浸透圧を増加させることなく任意の密度勾配に調整しうる点にある。しかし, 使用する精液の性状や遠心条件等により分離結果に差を生ずることがあり^{3,4)}, その応用には多くの問題を残しており, 詳細な検討が求められている。

著者らはこれまで Percoll 法による豚精液の分離および F-body 小体の検出について報告^{5,6)}したが, さらに遠心条件による分離結果の差異を解明するため, 供試精液の精子活力と遠心分離について比較検討した。

材料および方法

試験には, 山形県立養豚試験場で飼育し, 定期的に精液を採取している成雄豚(デュロック種 1 頭, 体重 250 kg およびランドレース種 1 頭, 体重 230 kg) から採取した濃厚部精液を使用した。前報^{5,6)}と同様に H-8 液で精液を洗浄した後, Kiev 液で精子濃度 3 億/ml になる

ように調整した。調整後, 精子活力 85% の精液を冷蔵庫 (4℃) および冷凍室 (-20℃) 内に入れ, 精子活力が 50% および 0 になるまで 1~2 時間保存した。

7 層の Percoll 密度層 (1.12~1.06) を作成し, 最上層に 1.0 ml の精子試料 (活力, 85%, 50%, 0) を重層した。遠心分離は, 1,100 rpm, 30 分で行ない, 遠心分離直後に各分画を 0.5 ml 回収し, 鏡検後, 精子濃度を測定した。すべての操作は 21±1℃ の室内で行なった。

結果および考察

Percoll 密度勾配遠心法を応用した X および Y 精子の分離に関する研究の問題点として, 供試する精液の精子活力により分離結果が異なる点に着目し, この点を解明する目的で, 人為的に精子活力を低下させた精液を

図 1 供試精液の精子活力による遠心分離後の分画の違い

Effects of the motility of boar spermatozoa on the separation using percoll density gradient centrifugation.

K. TOTSUKAWA, T. KAYABA*, Y. OHSAWA*, H. UENO**, S. SUTO** and M. TOGASHI**

Faculty of Medicine, Tohoku University Sendai-shi, 980

* Faculty of Agriculture, Yamagata University, Tsuruoka-shi, 997

** Yamagata Prefectural Experiment Station of Swine Husbandry, Sakata-shi, 998-01

表 1 遠心分離後の各分画における精子の濃度および活力

精 液 (精子活力)	遠 心 後 の 精 液 性 状	分 画							
		1	2	3	4	5	6	7	8
I (85 冊)	濃度 (億/ml)	—	—	—	—	1.0±0.7*	0.4±0.1	0.8±0.3	1.8±0.7
	精子活力 (冊)	—	—	—	—	54.1±18.2	59.4±11.2	74.5±4.1	81.8±3.7
II (50 冊)	濃度 (億/ml)	—	—	<0.4	0.7±0.3	1.5±0.5	0.7±0.4	<0.4	<0.4
	精子活力 (冊)	—	—	15.0±17.3	40.0±11.5	55.0±5.8	48.0±5.0	55.0±5.8	50.0±8.2
III (0)	濃度 (億/ml)	—	—	0.5±0.1	1.2±0.3	2.3±0.6	—	—	—
	精子活力 (冊)	—	—	0	0	0	—	—	—

* 平均値±標準偏差

用いて比較検討した。

その結果は、図1 (I～III) および表1に示す通り遠心分離後の分離パターンは供試精液の精子活力により明らかな差異を示した。すなわち、精子活力85冊の精液では、第5～第8分画の4つの層、活力50冊の精液では、第4～第6分画の3つの層、活力0の精液では、第3～第5の3つの層において高濃度の精子層が形成された。また、各分画層の様態は精子活力が85冊の場合と50冊および0の場合では明らかな違いを示した。すなわち、精子活力85冊の場合には、密度層と密度層の界面に均一なリング状の分画層を形成したが、50冊および0の場合には、試験管の一方の方向に凝集した塊り状に形成した。後者の分画層の顕微鏡所見では、精子と精子が互いにかみ合っている像が認められた。

精子活力85冊の精液の場合の主な4つの分画層中の精子濃度は0.4～1.8億/mlであり、下部の第7および第8分画層において、活力の高い精子(75～82冊)が認められた。他方、第5および第6分画層の精子活力は平均54冊および59冊で、層が上になるに従って低下する傾向を示した。

活力50冊の精液の場合の分離分画は、第4～第8分画層において40冊～55冊の精子活力を示し、各層において著しい差は認められなかった。この場合の精子濃度は0.4～1.5億/mlであった。

活力0の精液の分離では、精子は第3～第5分画層に集中し、第5分画層が最も高い濃度(2.3億/ml)を示した。3つの分画中に分布する未熟精子、奇形精子および正常精子の割合は、第3・第4分画では未熟精子と奇形精子が多く、平均2～3%認められたが、第5分画層は正常精子で占められていた。

以上、精子活力85冊、50冊および0の精液を用いて、

Percoll 密度勾配遠心法による遠法分離を比較検討した結果、死滅精子は上部の第3～第5分画に、活発な前進運動精子は第6～8分画の下部に集中することが明らかになった。従って、精子活力の低い精液を使用すると、分離分画層の高精子濃度の位置が上部に留まり、分離結果に差異を生ずる原因になることになる。大谷³⁾らも、遠心分離後に回収した分画に含まれる精子濃度に個体差が生じることを報告しているが、著者らは個体差よりむしろ採取した精液の性状の違いが分離結果に反映するものと思ふ。故に、Percoll 法においては、精子活力の低いもの、奇形精子や未熟精子の多いもの、また浮遊物等の多いものの使用は極力避ける必要があり、この点分離後の人工授精のことと併せて考慮すべきであると考える。

著者らは前報^{5,6)}において、精子活力の高い精液(85冊)を使用することにより、安定した分離成績を得ることができると、さらに、分離後の下部2分画層のF-bodyの割合を低くすることにより、得られる産子の雌の比率を高めることが期待されることを報告した。

文 献

- 1) 兼子 智・押尾 茂: 細胞工学, 3, 605-611.
- 2) IZUKA, R., KANEKO, S., AOKI, R. and KOBAYASHI, T.: Human Reprod, 2, 573-575, 1987.
- 3) 大谷 悟・山川宏人・西田司一・松本徹郎・長嶋比呂志・加藤康彦・尾川昭三: 家畜繁殖誌, 34, 31-38, 1988.
- 4) 樹田博司: 畜産の研究, 41, 1013-1016, 1987.
- 5) 戸津川清・萱場猛夫・上野宏樹・須藤信也・富樫稔: 日豚会誌, 25, 42-44, 1988.
- 6) 戸津川清・萱場猛夫・大澤有子・上野宏樹・須藤信也・富樫 稔: 日豚会誌, 25, 147-152, 1988.