

ラット精巢上体精子凍結保存法の改善

奥田 泰士¹, 添田 智子¹, 前泊 直樹¹
猪俣 智夫², 柏崎 直巳¹, 紫野 正雄¹

麻布大学 ¹ 動物繁殖学研究室, ² 実験動物学研究室

【目 的】

ラット精巢上体精子凍結保存法の改善を目的に、凍害保護物質(OEP)の添加法、精巢上体精液のストロー封入のタイミングおよび精液冷却速度を検討した。凍結融解精子は、運動精子率および精子原形質膜正常率を調べた。

【方 法】

ラット精巢上体尾部精子を、1) 0.7%OEP添加卵黄液中で採取し、0.25 ml プラスチックストローに封入後、15℃と5℃でそれぞれ15分間冷却して凍結する方法(改良法)、および2)精巢上体尾部を35 mmシャーレの卵黄液中で細切して15℃と5℃でそれぞれ30分間冷却し、さらに1.4%OEP添加卵黄液を等量加えてから0.25 ml プラスチックストローに封入した後、凍結する方法(従来法)を比較した。融解は37℃の温水中でおこない、37℃に加温した1 ml のKRBで希釈した。融解精子は融解の直後と2時間後に運動精子率

と精子原形質膜正常率を調べた。精子原形質膜正常率は、2重蛍光染色(propidium iodide, SYBR-14)により評価した。

【結 果】

凍結融解直後の運動精子率は、改良法で $6.1 \pm 2.2\%$ 、従来法では $5.7 \pm 2.6\%$ であった。しかし、融解2時間後における運動精子率は、改良法($16.1 \pm 7.4\%$)が従来法($6.1 \pm 2.2\%$)より有意に($p < 0.01$)高かった。精子原形質膜正常率は、融解直後および融解2時間後で、改良法($22.1 \pm 9.1\%$ および $20.9 \pm 8.3\%$)が従来法($9.3 \pm 3.3\%$ および $7.6 \pm 3.4\%$)より有意に($p < 0.005$)高かった。以上の結果から、本研究の改良法によるラット精巢上体精子凍結保存法、すなわちOEP添加卵黄液中で精巢上体を細切し、ストローに封入後に冷却する方法により、凍結融解後の運動精子率と精子原形質膜正常率が改善されることが明らかになった。