

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号： 3 2 6 6 1
研究種目： 奨励研究
研究期間： 2020 ~ 2020
課題番号： 2 0 H 0 1 0 5 1
研究課題名 精液処理法が精子DNA損傷率に及ぼす影響

研究代表者

天野 賢治 (Amano, Kenji)

東邦大学・その他部局等・胚培養士

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 480,000 円

研究成果の概要：生殖補助医療において受精能力の高い精子を選別することは重要であり、運動性良好精子を回収する方法としてはswim up法とパーコール密度勾配遠心法がある。それぞれの処理方法がDNA損傷率に与える影響を調べるため、処理前後のDNA断片化率をTUNEL法を用い測定した。その結果、swim up法処理後のDNA断片化率は処理前とほとんど変わらなかったが、パーコール密度勾配遠心法処理後はDNA断片化率が高く、swim up法の方が優れている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、生殖補助医療における精液処理方法の違いが精子DNA損傷率に与える影響について調べ、swim up法がパーコール密度勾配遠心法より優れている可能性を示唆する結果を得た。二つの処理方法は共に精子運動率を増加させるが、見た目には分からないDNA損傷率に関して、同一検体を用いて比較することにより違いがあることを示した。今回の成果は、生殖補助医療において精液処理方法を選択する上で有用な情報となることが期待される。

研究分野： 分子生物学

キーワード： 精子 DNA損傷率 DNA断片化率 swim up法 パーコール密度勾配遠心法

1. 研究の目的

生殖補助医療において、受精能力の高い精子を選別することは重要である。精子の受精能力には精子の数と運動性が重要な要素であるが、それらは酸化ストレスや活性酸素種の影響を受けることが知られている。また、酸化ストレスはDNA損傷を惹起する要因であることも知られており、DNA損傷があるほど受精能と胚発生能は低下する。

運動性良好精子を回収する方法としてはswim up法とパーコール密度勾配遠心法がある。Swim up法は遠心分離で回収した精子を培養液下層に注入し、上層に泳いできた精子のみを回収するため運動率は100%に近いが、回収率は低い。一方、パーコール密度勾配遠心法は成熟精子の比重が重いことを利用して遠心分離後に沈殿した精子を回収するため、swim up法と比べ回収率は高いが、運動率があまり上がらない症例もある。また、遠心操作がDNA損傷率を増加させることが報告されており、DNA損傷の観点からはswim up法の方が勝るとの報告もあるが、どちらの方法においても処理後のDNA損傷率が増加する症例もあれば減少する症例もあるとの報告もある。臨床の現場では、より受精能力の高い精子を選別する必要があり、どちらの方法がより適しているかの見極めは重要である。そこで本研究課題では、swim up法とパーコール密度勾配遠心法の処理前後でDNA損傷の程度を同一検体で比較することにより、運動率、回収率、DNA損傷率に影響を及ぼす原精液の所見や処理方法に何らかの関連が見られるかどうかを検討することを目的とした。

2. 研究成果

東邦大学医療センター大森病院リプロダクションセンターで不妊治療を受ける夫婦のうち、本研究への参加を文書をもって同意した者を対象とした。不妊治療及びそれに付随した精液検査の目的で、マスターベーションにより採取した精液に対して、標準診療として精液検査を実施し、精子濃度、運動率を測定した。その後、医療廃棄物として廃棄される余剰精液を本研究の検体とした。DNA損傷率は、TUNEL法を用いフローサイトメトリーにより

DNA断片化率を測定することにより行った。半量をswim up法、残りの半量をパーコール密度勾配遠心法により処理し、処理後のDNA損傷率、精子濃度、運動率を測定した。統計解析はt検定を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

10検体を用い解析を行ったところ、原精液のDNA断片化率は $19.4 \pm 1.7\%$ であり、swim up法処理後($18.6 \pm 3.1\%$, $p = 0.830$)とほぼ同程度であった(図1)。一方、パーコール密度勾配遠心法処理後は $27.9 \pm 3.8\%$ であり、有意差は認められなかったが、原精液($p = 0.064$)或いはswim up法処理後($p = 0.075$)と比べて高い傾向であった(図1)。

運動率に関しては、原精液($64.2 \pm 3.5\%$)に対してswim up法処理後は $97.2 \pm 0.7\%$ ($p = 4.15 \times 10^{-6}$)、パーコール密度勾配遠心法処理後は $89.2 \pm 2.0\%$ ($p = 3.41 \times 10^{-8}$)と有意に高い値であった(図2)。また、swim up法処理後とパーコール密度勾配遠心法処理後の比較では、swim up法処理後の方が有意に高い値であった(図2; $p = 0.002$)。

また、処理後の精子回収率は、swim up法処理後は $1.9 \pm 0.5\%$ 、パーコール密度勾配遠心法処理後は $3.0 \pm 0.4\%$ であり、有意差は認められなかった($p = 0.109$)。このことから、運動性が高く、DNA損傷率が低い受精能力の高い精子を回収する方法としてはswim up法の方が優れている可能性が示唆された。ただ、検体数が10検体と少ないため、今後も継続して解析を行っていく必要があると考える。

図1 DNA断片化率(%)

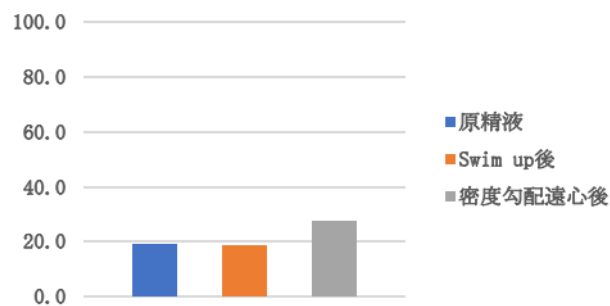
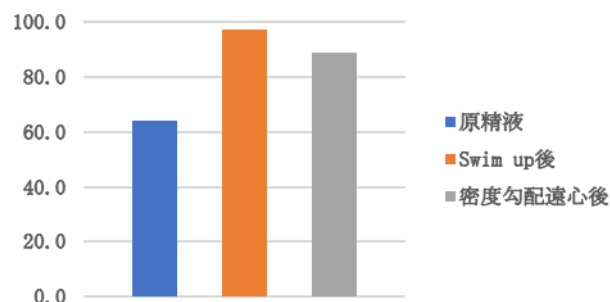


図2 運動率(%)



主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

研究組織（研究協力者）

氏名	ローマ字氏名
----	--------