

新規な凍結保存法を用いた凍結前後のマウス精子における
前培養および遠心分離処理が精子活力に与える影響
Effect of pre-incubation and centrifugation before and after
freezing on the motility of mouse spermatozoa frozen by a new
method for cryopreservation

多田 昇弘

Norihiro Tada

順天堂大学医学部アトピー疾患研究センター

113-8421 東京都文京区本郷 2-1-1

Atopy Research Center, Juntendo University School of Medicine

2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421, Japan

Cryopreserved mouse spermatozoa are beginning to be used to meet the demand of a reliable cost-effective method for maintaining the rapidly expanding numbers of strains or lines of mutant mice including genetically modified mice (transgenic/knockout mice). However, mouse spermatozoa are highly sensitive to cryodamage, which has impeded their cryopreservation in the past. Successful and reproducible cryopreservation has proven to be a difficult problem. Furthermore, the underlying factors responsible for success or failure are mostly obscure. Several contributors to these difficulties have been identified. Therefore, in this study, we compared the effect of the new freezing method using freezing container "BICELL" and the pellet method for cryopreservation of mouse spermatozoa on sperm motility, and also the cryoprotection provided by permeating (glycerol) or nonpermeating (raffinose) compounds for freezing mouse spermatozoa. We found that a high percentage of progressively motile spermatozoa was obtained by using BICELL with 18% raffinose+1.75% glycerol in PB1 as a freezing solution, and mouse spermatozoa are extremely susceptible to the mechanical

stress associated with centrifugation to remove cryoprotectants. We also could obtain the results of continuing sperm motility up to 2 hours after thawing when mouse spermatozoa was frozen by using BICELL or the pellet method with the freezing solution containing 18% raffinose+1.75% glycerol or 18% raffinose only. These results suggest that use of freezing container "BICELL" is an effective alternative method for cryopreservation of mouse spermatozoa.

Key words : マウス、精子、凍結保存、細胞用凍結処理容器、精子活力

緒言

分子遺伝学における数多くの知見は、遺伝子改変マウスを使用することによって成されたものである。今日、種々の研究に有用であるとして選抜・開発された外来遺伝子を有するトランスジェニックマウスおよびそれらのマウスをベースにした数多くの近交系やコンジェニック系マウスが存在している。新たに作製された、これらのトランスジェニックマウスおよびノックアウトマウスの系統化には、莫大な数の繁殖・維持が必要とされている。しかし、遺伝子改変マウスにおける莫大な繁殖コロニーの維持や拡大を達成するためには、かなりの労力、費用等が必要になる。このような事を是正するためには、配偶子や初期胚の凍結保存が個体として繁殖・維持するより労力、費用が削減できるものと思われる。

ここ数年の間にマウスにおける凍結保存技術は、初期胚の **embryo bank** に代わって精子の凍結保存に関する多くの試みが成されるようになってきた。その理由として、1) 雄マウスの精巣上体尾部から得られる精子の

採取は、卵管を灌流して初期胚を得る方法より容易であること、2) 1匹の雄マウスから得られた精子で数100個の未受精卵を受精させることができること、3) ごく少数の雄マウスから採取された精子を凍結保存しておけば、系統を再度確立するための材料としては十分であること、4) 体外受精における凍結保存精子の利用は、他の機関へ生体として輸送することなしに、適当な時期に直ちに輸送することが可能であり、効率的な受精卵の生産が可能であること、更に、5) 近年、注目されている **large scale ENU-mutagenesis project** において、マウス精子の凍結保存は、極めて重要な位置を占めていること、等が上げられる。

ヒト及びウシにおける精子の凍結保存が成功してほぼ50年を経過しているにもかかわらず、マウス精子の凍結保存はつい最近までその成功例が見られなかった。1990年、多田ら²⁾により初の成功例が報告されて以来、**raffinose** を凍害保護物質として数多くの報告がなされている^{3) -10)}。しかし、今までに報告されたマウス精子

の凍結保存法は、凍結—融解精子の生存性において各系統間で著しい差があることが指摘されており、遺伝子改変マウス等のライン維持に適用する場合の障害になっている。また、マウス精子の凍結保存は、融解後の精子の生存性及び体外受精成績に関して、実施している研究機関によってかなり異なっているのが現状である。更に、我々が開発したドライアイスペレット法は、凍結保存液に精子を浸漬した懸濁液をドライアイス上の小孔に直接滴下するもので、微生物感染等の問題が生じる可能性がある。そこで、本実験では、ドライアイスペレット法に代わり得る凍結方法を開発することを目的として実施した。

材料と方法

精巢上体尾部精子の採取

生後9—15週齢のICR系雄マウス（日本クレア）を頸椎脱臼した後、2個の精巢上体尾部を摘出した。これらの精巢上体尾部2個を室温下にて35mmプラスチックディッシュ（suspension culture dish; Nunc）内に滴下した250 μ lの凍結保存液（18% raffinose + 1.75% glycerol in PB1¹¹⁾、18% raffinose in PB1）のドロップ中に移し、眼科用ハサミを用いて細切した。細切後、10分間室温下で静置させることにより、均一な精子懸濁液を作成した後、2個の精巢上体尾部を懸濁液より除去した。なお、マウスは12

時間照明—12時間消灯（8：00—20：00照明）、温度22 \pm 1 $^{\circ}$ C、湿度50 \pm 10%のバリアの環境下で飼育し、実験は順天堂大学医学部動物実験指針にもとづいて実施された。

精子の凍結保存

精子懸濁液を50 μ lずつクライオチューブ（Nunc）に注入した後、予めドライアイスにて-70 $^{\circ}$ Cに冷却しておいた細胞用凍結処理容器（バイセル；日本フリーザー）中に入れ、2時間静置させた。冷却後、それらのクライオチューブを液体窒素中に投入した。一方、従来のマウス精子の凍結方法、即ち、同様に250 μ lの精子懸濁液を作製し、50 μ lずつドライアイス上の小孔（直径5mm、深さ3mm）に滴下した。1時間静置させた後、凍結したペレットをクライオチューブに入れ、液体窒素中に投入した。これらのクライオチューブは、融解まで3—4週間液体窒素中で保存した²⁾。

凍結精子の融解

クライオチューブを40 $^{\circ}$ Cの温湯中に2分間浸漬することにより融解した。融解後、直ちにパラフィンオイルで覆った300 μ l TYH medium¹²⁾のドロップ中に10 μ lの精子懸濁液を添加し、培養を行い、精子活力を倒立顕微鏡下で観察した。また、残りの精子懸濁液は1.5ml Eppendorf tubeに移し、室温下で10,000rpm、5分間の遠心分離

を行った後、50 μ l の TYH medium を sperm clot に加え再懸濁させた。これらの精子懸濁液から 10 μ l を取り、300 μ l TYH medium のドロップ中に添加し、精子活力を確認した。

上記の凍結—融解法を用いて以下の実験を行った。

1. 前培養および遠心分離処理が凍結—融解精子の活力に与える影響

TYH medium 中に精子を懸濁させた後、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ in air の条件下で30分間前培養した。前培養後、遠心分離 (10,000 rpm, 5 min) を行い、sperm clot に 18% raffinose+1.75% glycerol または 18% raffinose を含む保存液 250 μ l を各々加え、精子懸濁液を作製した。これらの懸濁液をドライアイスの小孔に 50 μ l ずつ滴下し、凍結した。また、前培養を行わずに、18% raffinose+1.75% glycerol または 18% raffinose を含む保存液中で10分間静置させた精子懸濁液についても同様に凍結した。7日間保存した後、融解し、精子活力を確認した。

2. 凍結処理容器“バイセル”およびドライアイスペレット法によって凍結された精子活力の確認

18% raffinose+1.75% glycerol または 18% raffinose を含む保存液に各々浸

漬した精子をバイセルおよびドライアイスペレット法にて各々凍結した。その際、凍結する過程で、室温 (RT)、-60 $^{\circ}$ C および -196 $^{\circ}$ C (LN₂) において各々 TYH medium で希釈あるいは融解後、TYH medium で1時間培養を行い、精子の活力を確認した。

3. 融解後の遠心分離処理が凍結—融解精子の活力に与える影響

実験 2 . と同様に、18% raffinose+1.75% glycerol または 18% raffinose を含む保存液に各々浸漬した精子をバイセルおよびドライアイスペレット法にて各々凍結した。融解後、精子懸濁液 10 μ l を直接 TYH medium 300 μ l のドロップに添加し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ in air の条件下で30分間培養した。一方、同様に融解した精子懸濁液について遠心分離 (10,000 rpm, 5min) を行った後、sperm clot に TYH medium を 50 μ l 加えた。その後、この精子懸濁液から 10 μ l 取り、同様に TYH medium 300 μ l のドロップに添加し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ in air の条件下で30分間培養した。これらの培養した精子懸濁液について倒立顕微鏡下にて精子活力を観察した。

4. 融解後の培養時間に伴う精子活力の推移

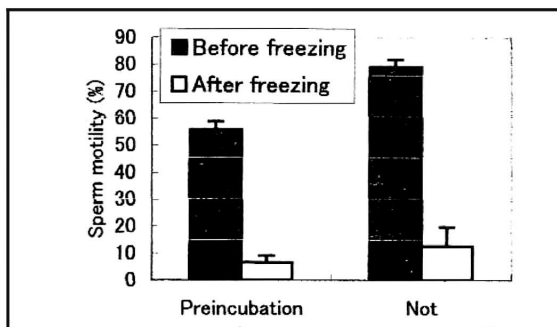
実験 2 . と同様に、18% raffinose+1.75% glycerol または 18%

raffinose を含む保存液に各々浸漬した精子をバイセルおよびドライアイスペレット法にて各々凍結した。融解後、精子懸濁液について遠心分離 (10,000 rpm, 5min) を行った後、sperm clot に TYH medium を 50 μ l 加え精子を懸濁させた。これらの精子懸濁液 10 μ l を直接 TYH medium 300 μ l のドロップに添加し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ in air の条件下で1-3時間培養し、精子活力の推移を観察した。

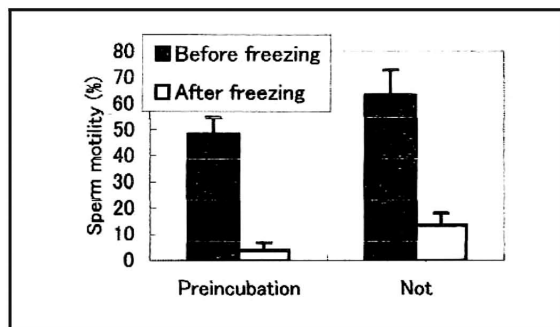
結果

前培養および遠心分離処理が凍結-融解精子の活力に与える影響 (図1)

精子を凍結保存する前に予め培養を行った場合、凍結前の精子活力は、前培養を行わずに凍結した場合に比べ、低下することがわかった。また、同様の傾向が、凍結-融解後の精子にも認められた。従って、TYH medium から凍結保存液に精子を浸漬する際に、遠心分離処理を行うが、その処理が精子の活力低下に關与していることが示唆された。なお、18% raffinose+1.75% glycerol または 18% raffinose を含む保存液間での前培養、遠心分離処理に対する精子活力への影響は、ほとんど差が認められなかった。



18% raffinose + 1.75% glycerol



18% raffinose

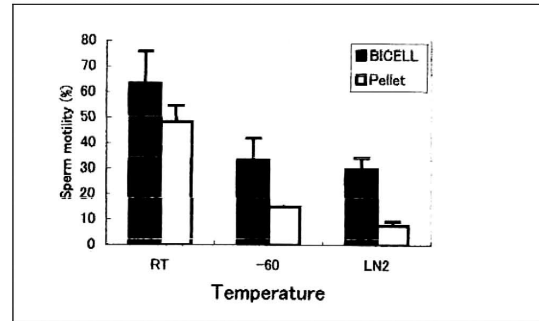
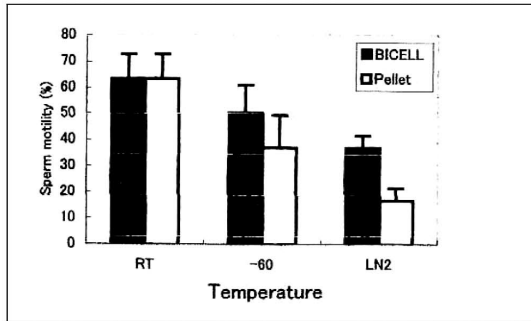
図1. ドライアイスペレット法によって凍結されたマウス精子における凍結前の前培養および遠心分離処理が精子活力に与える影響

凍結処理容器“バイセル”およびドライアイスペレット法によって凍結された精子活力の確認 (図2)

バイセルによる凍結およびドライアイスペレット法を用いて凍結保存すると、室温、-60 $^{\circ}$ Cおよび-196 $^{\circ}$ C (LN2)

のいずれの温度域においてもバイセルによる凍結の方が、融解後の精子活力が良好であることがわかった。また、18% raffinose+1.75% glycerol または 18% raffinose を含む保存液間で精子活力を比較した場合、18% raffinose+1.75% glycerol を含む保存

液の方が融解後の精子活力が良好になる傾向を示した。



18% raffinose + 1.75% glycerol

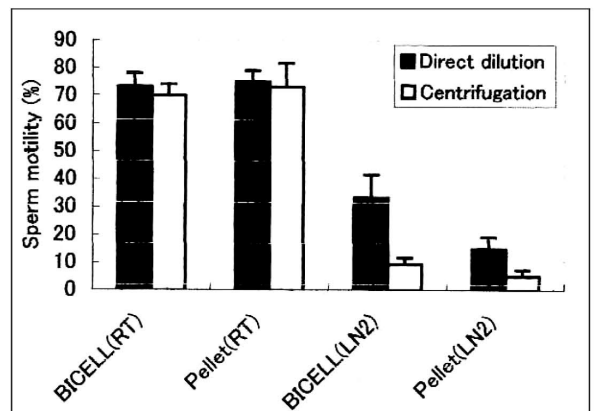
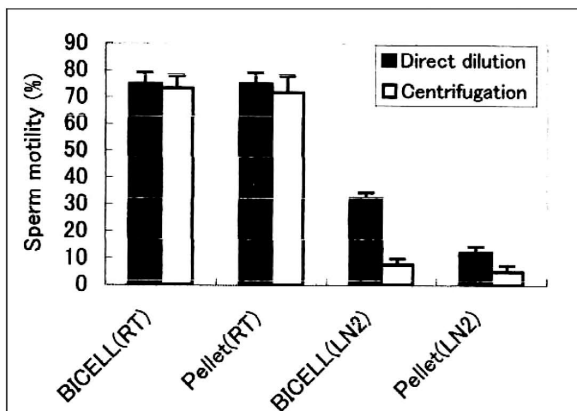
18% raffinose

図2. バイセルによる凍結法およびドライアイスペレット法を用いて凍結したマウス精子の各温度域における融解後の精子活力

融解後の遠心分離処理が凍結—融解精子の活力に与える影響 (図3)

合の精子活力を直接 TYH medium にて希釈した場合と比較した。その結果、いずれの保存液を用いた場合でもバイセルを用いて凍結した方が融解後の精子活力は良好であった。また、精子の凍結—融解後、遠心分離処理を行うと、精子活力が低下することがわかった。

18% raffinose+1.75% glycerol および 18% raffinose を含む保存液で各々バイセルによる凍結およびドライアイスペレット法により凍結せしめた精子を融解後、遠心分離処理を行った場



18% raffinose + 1.75% glycerol

18% raffinose

図3. 融解後の遠心分離処理が凍結—融解精子の活力に与える影響

融解後の培養時間に伴う精子活力の推移 (図4)

バイセルを用いた凍結およびドライアイスペレット法によって凍結した精子について融解後、1-3時間培養することに伴う精子活力の推移を比較検討した。バイセルを用いて精子を凍結した場合、融解後の精子活力は、培養2時間目までほとんど変化しないが、培養2時間以降漸次低下することがわかった。また、保存液を 18% raffinose+1.75% glycerol にすると融解後の精子活力は、18% raffinose を

含む保存液と比べ良好であることが示された。一方、ドライアイスペレット法では、18% raffinose+1.75% glycerol を含む保存液の場合、バイセルを用いた凍結と同様に、融解後の精子活力は培養2時間目までほとんど変化しなかったが、18% raffinose を含む保存液では、培養1時間目から精子活力が低下することがわかった。更に、バイセルを用いた凍結およびドライアイスペレット法間における融解後の精子活力は、バイセルを用いた方が良好であることが示された。

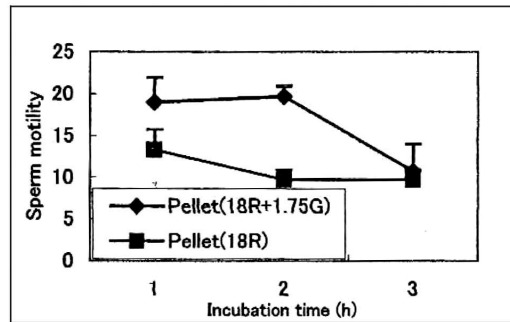
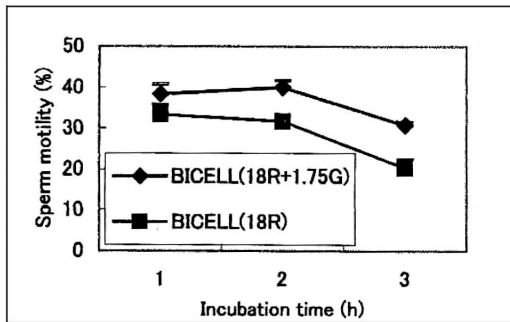


図4. 融解後の培養時間に伴う精子活力の推移

考 察

本研究において、凍結する前にマウス精子を前培養することにより、融解後の精子活力は前培養を行わずに凍結した場合と比べ低下することがわかった。おそらく、前培養による精子活力の亢進および遠心分離処理に伴って凍結-融解後の精子活力が低

下したものである。Taoら¹³⁾が指摘しているように低温下でマウス精子を採取して凍結することによって融解後の精子活力が室温下で採取された精子に比べ高いことから、凍結前に精子活力を抑えた状態で凍結することが融解後の精子活力を維持する重要な要因になっていることを示唆している。また、本研究では、マウス

精子の新しい凍結法として市販の凍結処理容器“バイセル”を用いて凍結—融解精子の活力についてドライアイスペレット法と比較した。-60°Cおよび-196°Cの温度域において各々バイセル、ドライアイスにて凍結した精子を融解すると、いずれの温度域においてもバイセルによる凍結の方が融解した精子の活力は良好であった。また、2種類の保存液、即ち、18% raffinose+1.75% glycerol 液および18% raffinose 液で凍結方法による精子活力の差異を検討した結果、18% raffinose+1.75% glycerol 液で良好な精子活力が得られることがわかった。このことから、ドライアイスペレット法に比べ、より緩慢な凍結が可能なバイセルを用いて精子を凍結した場合は、細胞膜透過性のある glycerol が凍結過程において凍害保護の役割を果たしている可能性がある。基本的には、raffinose は細胞膜透過性がないので、急速凍結時に有効であると思われる。即ち、Glycerol は、その束一性により溶液の氷点を効果的に下げ各温度域での氷晶形成量を減らし、細胞内外の塩濃度の濃縮を抑えること、および raffinose は氷点を降下させて細胞外の塩濃度の増大を抑制させ、細胞膜を安定化させる働きを反映しているものと思われる。

凍結—融解された精子を体外受精に供する場合、凍害保護物質の存在が、その後の受精に影響を及ぼすか否か議論されるところである。おそらく、凍結—融解精子から凍害保護物質を

除去せずに媒精した場合、受精の場合ある medium 中に凍害保護物質も添加することになり、受精成績に何らかの影響を与えることが懸念される。そこで、我々は、凍結—融解後の精子懸濁液を遠心分離することによって raffinose および glycerol を除去した後、精子活力を確認した。その結果、2種類の保存液（18% raffinose+1.75% glycerol, 18% raffinose）および2種類の凍結方法（バイセル凍結法、ドライアイスペレット法）のいずれの場合でも凍結—融解精子は、遠心分離処理によって精子活力は低下することがわかった。以前、我々が18% raffinose+1.75% glycerol を用いたドライアイスペレット法で同様な結果を得ている⁸⁾が、これらの遠心分離処理精子を用いて体外受精すると、遠心分離をしない精子に比べ受精成績が改善されることを見出している。このことから、raffinose および glycerol が凍結—融解精子の受精能に何らかの影響を及ぼしていることが示唆されるが、その詳細は不明である。現在、バイセルを用いて凍結した精子について融解後、遠心分離処理を施した後に体外受精を行い、受精率を確認しているところである。

凍結—融解された精子が培養後、活力を維持できる時間を明らかにすることは、体外受精を行う上で極めて重要である。マウスの場合、capacitation が誘起されるまでは1—1.5時間を要することが知られており¹²⁾、凍結—融解精子を用いての体外受精の場では、

1時間以上の精子活力を維持させ、**capacitation**を誘起させる必要がある。そこで、我々はバイセルを用いた凍結法とドライアイスペレット法を用いて2種の凍結保存液（18% **raffinose**+1.75% **gluceronol**, 18%**raffinose**）について凍結—融解後の精子活力の持続時間を確認した。その結果、バイセルを用いた凍結で、2種の保存液のいずれにおいても培養後、2時間までは、精子活力を維持できることがわかった。しかし、ドライアイスペレット法においては、18%**raffinose**を保存液として用いると、培養1時間目から精子活力が低下することが示された。従って、18%**raffinose**+1.75%**glycerol**を保存液としてバイセル凍結法、ドライアイスペレット法のいずれを用いても**capacitation**誘起まで凍結—融解精子の活力が低下することなく培養が可能であることがわかった。

通常、液体窒素の蒸気で精子を凍結する方法が行われているが、蒸気をチューブあるいはストローに接触させる程度によって、その温度が微妙に異なり、当然、冷却速度が変わることによって、結果として融解後の精子活力に影響が出てしまい、再現性に欠ける場合がある。また、ドライアイスペレ

ット法では、直接、ドライアイスの小孔に精子を含む保存液を滴下することにより、微生物汚染の可能性が懸念される。バイセルは通常の移植性腫瘍細胞や培養細胞の凍結に用いられており、プログラムフリーザを用いなくても比較的冷却速度がコンスタントに維持でき、細胞の高い生存性が得られている。また、ランニングコストが不要で、ルーチンとして簡便に精子を凍結する場合にも極めて有用であると思われる。また、バイセルにクライオチューブを入れた状態で、-80℃下で輸送することも可能である。このように、本研究から比較的簡便でしかも再現性よくマウス精子を凍結可能なバイセルを用いた凍結保存法を開発することができた。また、本法を用いた場合には凍結保存液として18%**raffinose**+1.75%**glycerol**が有効であることが再認識できた。今後、本法を用いてマウス精子を凍結せしめ、融解後の精子について体外受精および受精卵の移植を行うことにより受精成績や受精後の発生能について検討する。また、遺伝子改変マウス・ラットを含む疾患モデル動物精子についても本法による凍結保存を試みる予定である。

文 献

1. Marschall S., Huffstadt U., Balling R. and Hrabe de Angelis M. : Reliable recovery of inbred mouse lines using cryopreserved spermatozoa. *Mammal. Genome* 10, 773-776, 1999.
2. Tada N., Sato M., Yamanoi J., Mizorogi T., Kasai K. and Ogawa S. :

- Cryopreservation of mouse spermatozoa in the presence of raffinose and glycerol. *J. Reprod. Fert.* 89, 511-516, 1990.
3. Yokoyama M., Akiba H., Katsuki M. and Nomura T. : Production of normal young following transfer of mouse embryos obtained by *in vitro* fertilization using cryopreserved spermatozoa. *Exp. Anim.* 39, 125-128, 1990.
 4. Takeshima T., Nakagata N. and Ogawa S. : Cryopreservation of mouse spermatozoa. *Exp. Anim.* 40, 495-497, 1991.
 5. Nakagata N. and Takeshima T. : Cryopreservation of mouse spermatozoa from inbred and F1 hybrid strains. *Exp. Anim.* 42, 317-320, 1993.
 6. Szein J.M., Schmidt P.M., Raber J. and Rall W.F. : Cryopreservation of mouse spermatozoa in a glycerol/raffinose solution. *Cryobiology* 29, 736-737, 1992.
 7. Penfold L.M. and Moore H.D.M. : A new method for cryopreservation of mouse spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 99, 131-134, 1993.
 8. Tada N., Sato M., Amann E. and Ogawa S. : Effect of pre-freezing equilibration and post-thawing centrifugation on the fertilizing capacity of frozen mouse epididymal spermatozoa. *Cryo-Letters* 14, 195-206, 1993.
 9. Tada N., Sato M., Kasai K. and Ogawa S. : Successful *in vitro* and *in vivo* development of cryopreserved mouse oocytes fertilized by cryopreserved mouse epididymal spermatozoa. *J. Reprod. Dev.* 40, 65-70, 1994.
 10. Nakagata N. : Use of cryopreservation techniques of embryos and spermatozoa for production of transgenic (Tg) mice for maintenance of Tg mouse lines. *Lab. Anim. Sci.* 46, 236-238, 1996.
 11. Whittingham D.G. : Embryo banks in the future of development genetics. *Genetics* 78, 395-402, 1974.
 12. Toyoda Y., Yokoyama M. and Hoshi T. : Studies on the fertilization of mouse eggs *in vitro*. I. *In-vitro* fertilization of eggs by fresh epididymal sperm. *Jap. J. Anim. Reprod.* 16, 147-151, 1971.
 13. Tao J., Du J., Kleinhans F.W., Critser E.S., Mazur P. and Critser J.K. : The effect of collection temperature, cooling rate and warming rate on chilling injury and cryopreservation of mouse spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 104, 231-236, 1995.