

ラット精子凍結保存法の開発

Development of cryopreservation method for rat spermatozoa

柏崎 直巳、中務 胞*、紫野 正雄.

Naomi Kashiwazaki, Ena Nakatsukasa, Masao Shino.

麻布大学 獣医学部 動物応用科学科

動物繁殖学研究室

〒229-8501 相模原市淵野辺

*現所属: (株)トランスジェニック

〒860-0802 熊本市中央街 2-11

Laboratory of Animal Reproduction, Department of Animal Science and
Biotechnology, School of Veterinary Medicine,
Azabu University.

Fuchinobe, Sagami-hara, 229-8501 Japan.

*Present address: Transgenic Co., 2-11 Chuohgai, Kumamoto, 860-0820 Japan.

Here we report development of a reliable cryopreservation method for rat epididymal spermatozoa. Motility and membrane integrity of rat spermatozoa frozen with various concentrations (0, 3.0, 6.0%) of glycerol and with or without 0.7% Equex Stem as cryoprotective agents were investigated. We also evaluated the ability of cryopreserved spermatozoa to generate normal offspring by intrauterine insemination. The percentages of sperm membrane integrity were significantly higher ($p < 0.01$) in samples frozen without glycerol than in those with 3.0% glycerol. Although 0.7%

Equex Stem in freezing media without glycerol or with 3.0% glycerol, did not influence rates of sperm motility after freezing/thawing, the rate of membrane integrity of sperm frozen without glycerol were improved ($p < 0.05$) by the presence of 0.7% Equex Stem. Therefore rat spermatozoa used in this procedure were frozen in media containing 23% egg yolk, 8% lactose monohydrate and 0.7% Equex Stem, at pH 7.4 adjusted with 10% Tris(hydroxymethyl)aminomethane solution. Thirteen females were inseminated into the top of both uterine horn lumen with post-thaw sperm. Forty-one normal living offspring were obtained from 9 inseminated females. These results indicate that rat frozen/thawed sperm can generate normal offspring by intrauterine insemination.

Key Words: ラット、精子、凍結、子宮内人工授精

緒言

ラットは、基礎医学・生物学・農学における実験動物としてマウスと同様に広範に使用される重要な動物である。また、糖尿病、パーキンソン病、アルツハイマー病などのモデル動物ばかりでなく、多くのトランスジェニックラットも作製されるようになった。これらの貴重なラットの遺伝資源保存法として、ハプロイド(haploid genome)の精子の凍結保存は非常に重要である。われわれは、ラット精巢上体精子をEquex Stem (OEP)を含む卵黄・ラクトース液をもちいて凍結し、融解精子を子宮角上部へ注入(子宮内人工授精)することにより産子を誕生させることに成功した¹⁾。本稿ではこのラット凍結精液保存法の開発について記述した。ラット精子凍結保存法の開発にあたり、ブタの生殖細胞および胚が低温に対して高い感受性を示す²⁾ことから、ブタの精子凍結希釈液をその基本液として採用した。さらにラット精子に対する遠心分離処置の

影響を調べたところ、この処置が精子の運動性や原形質膜正常性を低下させることから¹⁾、凍結融解の過程で精子に対する遠心分離処置を施さないようにした。

材料および方法

(ラットおよび精子採取)

麻布大学附置生物科学研究所で光周期 12 時間(6:00–18:00 に明期)で飼育されているラットをもちいた。精子採取には 64 匹の成熟(15–30 週齢)SD (Jcl: SD) 雄を、偽妊娠を誘起するための精管結紮雄には 16 匹の 15 週齢以上の BN (BN/Sea) を、子宮内人工授精には 59 匹の成熟(8–18 週齢)雌ラット Wistar (Jla: Wistar)をもちいた。……

成熟雄ラットを頸椎脱臼により安楽死させた。その雄から精巢上体尾部を摘出し、35 mm プラスチックシャーレ・3.0 ml の精子凍結一次希釈液(表 1)・に入れた。この一次希釈液は、卵黄 23%、ラクト

ース8%を含む液に抗生物質を添加し、10% Tris(hydroxymethyl)aminomethaneにより pH. 7.4 に調整したものである。これらの精巢上体尾部を眼科先刀で細切し、精子を浮遊させた。精子濃度はトーマ氏血球計算板をもちいて測定した。

(精子の凍結)

この精子浮遊液を 15℃のインキュベーターに 30 分放置し、その後さらに 5℃

の冷蔵庫内で 30 分冷却した。この精子浮遊液に同一冷蔵庫内で同様に冷却した精子凍結二次希釈液 (Table 1.) 3.0 ml を添加した。この希釈精液約 0.2 ml を 0.25 ml プラスチックストローに封入後、液体窒素液面上 2 cm に 10 分間放置することにより予備凍結し、その後、ストローを液体窒素中に投下して凍結した。凍結したストローは液体窒素中で1週間以上保存し、実験にもちいた。

Table 1. Compositions of diluent for freezing rat epididymal spermatozoa

Diluent component	1 st diluent	2 nd diluent
Egg yolk	23.0%	23.0%
Lactose	8.0%	8.0%
Equex Stem (OEP)*	--	1.4%
Penicillin G potassium salt	1,000 iu/ml	1,000 iu/ml
Streptomycin sulfate	1.0 mg/ml	1.0 mg/ml

*: Nova Chemical Sales, Inc., MA, USA

(精子の融解)

凍結精子の融解は、凍結したストローを 37.0℃の温水中で振盪しておこない、BSA を 0.4%添加した 1.0 ml の R1ECM³⁾ 中にストロー中のサンプルを注入することにより希釈した。そしてこの融解精液を 37.0℃の CO₂ インキュベーターにて培養した。

(精子の運動率および原形質膜正常率)

精子運動率は 37℃に加温した精液性

状検査板(富士平工業)をもちい、100 倍顕微鏡下にて評価した。精子原形質膜正常性は Live/Dead Sperm Viability Kit (Molecular Probes Inc., OR, USA)による 2 重蛍光染色法にて調べた。この kit により、原形質膜に損傷を受けた精子頭部は propidium iodide により赤からオレンジ色に、精子原形質膜が正常なものは SYBR-14 により緑色に染色される。1 つのサンプルあたり 300 以上の精子を 200 倍の蛍光顕微鏡下にて観察し、精子原

形質膜正常率を求めた。

(子宮内人工授精)

成熟雌ラット 59 匹は、精管結紮をおこなった BN 雄ラットとの交尾により偽妊娠を誘起させた。すなわち、雌ラットを発情周期 0 日目(発情前期)の 16:00-22:00 まで精管結紮雄と同居させ、22:00 にプラグを確認した場合、23:00 までの間に外科的に人工授精をおこなった。ペントバルビタールナトリウム投与による麻酔下の雌ラットの子宮角上部に 23G 注射針により小穴をあけ、そこから 50 μ l (精子数 $1-3 \times 10^6$) の精液を注入した。

(新鮮精子)

子宮内人工授精にもちいる新鮮精子(非凍結精子)は SD ラットの精巣上体尾部を 3.0 ml の R1ECM 中で細切し、その精子懸濁液 0.2 ml を 1.0 ml の R1ECM で希釈することにより作製した。

(実験 1:精子凍結希釈液中のグリセリン、EquexStem の検討)

精子凍結希釈液中のグリセリンおよび Equex Stem が融解直後の精子運動率および精子原形質膜正常率に与える影響を調べた。二次希釈液中のグリセリン濃度を 0、6.0 および 12.0% とした。すなわち、凍結時における最終グリセリン濃度は 0、3.0 および 6.0% とした。さらに、これらのグリセリン濃度における 0.7% Equex Stem 添加の有無についても検討した。

(実験 2:凍結融解精子による子宮内人工授精後における胚盤胞の回収)

実験 1 の結果に基づき、ラット凍結融解精子の受精能力を調べるために、偽妊娠誘起させた雌ラットへ子宮内人工授精をおこない、その後の胚盤胞への発育について調べた。精子凍結希釈液は、そのグリセリン濃度を 0 および 3.0% とし、さらに 0.7% Equex Stem を添加および無添加とした。これらの凍結希釈液をもちいて精子を凍結し、融解直後の精子運動率を調べた。そして、これらの融解精子を雌ラットへ人工授精した。授精後の翌日を Day 1 とし Day 4.5 に子宮および卵管を灌流することにより胚回収を試みた。ラットの Day 4.5 における胚の回収では、受精およびその後の胚発生が正常であれば胚盤胞の発育段階の胚が回収される。回収胚数に対する胚盤胞数の割合(胚盤胞率)を調べた。また対照として、新鮮精子をもちいて同様に人工授精と胚回収をおこなった。

(実験 3:凍結融解精子の子宮内授精後の胎子への発育)

実験 2 の結果に基づき、ラット凍結融解精子の人工授精による産子の作製を試みた。精子凍結希釈液としては、1) 3.0%グリセリンおよび 0.7% Equex Stem を含むもの、2)グリセリン無添加で 0.7% Equex Stem を含むもの、3)グリセリンおよび 0.7% Equex Stem を含まないもの、をもちいて精子を凍結した。これらの凍結融解精子を雌ラットへ人工授精した。授精後の翌日を Day 1 として Day 22 にこれらの雌ラットの剖検をおこない、胎子が確認されたものについては、これらを摘出し、一部の摘出胎子はあらかじめ用意

しておいた里親に哺育させた。

結果

(実験 4:凍結精子由来個体の繁殖能力)

凍結精子由来個体の繁殖能力を調べるために、実験 3 でえられた凍結精子由来個体の繁殖試験をおこなった。凍結精子由来のラットが、雄では 12 週齢、雌では 10 週齢となった以降に、それぞれ 10 週齢のウイスター系雌ラットおよび 12 週齢のウイスター系雄ラットと交配させ、その繁殖性について調べた。

(実験 5:凍結融解精子を子宮内人工授精させた雌ラットの自然分娩および保育能力)

外科的に人工授精した雌ラットの自然分娩および哺育の能力を調べるために、6 匹の雌に対して凍結融解精子をもちいて子宮内人工授精をおこなった。人工授精の結果、妊娠した雌の自然分娩およびその哺育能力について観察した。

(統計処理)

精子運動率および精子原形質膜正常率ならびに授精後の妊娠率は one-way ANOVA をもちいて試験区間の有意差の有無を検討した。また、一腹あたりの胎子数は、Student の t 検定により試験区間の有意差の有無を検討した。なお、平均値には標準誤差を付して表した。

(実験 1)

ラット精子凍結希釈液中のグリセリンおよび Equex Stem が融解後の精子運動率および精子原形質膜正常率に与える影響を Table 2 に示す。凍結希釈液中の 0.7% Equex Stem 存在下において、3.0% グリセリン添加は凍結融解後の精子運動率に有意な差が認められなかったが、6.0% グリセリン添加は凍結融解後の精子運動率を有意に ($P < 0.05$) 低下させた。また、グリセリン濃度 0% および 3.0% 区内での Equex Stem 添加の有無による凍結融解後の運動精子率には差は認められなかった。凍結融解後の精子原形質膜の正常率では、0.7% Equex Stem の存在が無添加のものと比較して有意に ($P < 0.05$) 高い値を示した。

(実験 2)

凍結融解希釈液中の 3.0% グリセリンおよび 0.7% Equex Stem の存在が融解後における精子の受精能力に及ぼす影響を子宮内人工授精後の胚盤胞への発育で評価した。融解後における精子運動率は、実験 1 と同様な傾向を示した。これらの融解精子をもちいて授精をおこない Day 4.5 における胚回の収成績を Table 3 に示す。回収胚における胚盤胞率は、グリセリン無添加・Equex Stem 添加区でその他の凍結精子の授精区よりも有意に ($P < 0.05$) 高い値を示した。しかし、この値は、新鮮精子の授精区の 80.0% と比較すると有意に ($P < 0.05$) 低かった。

Table 2. Effect of glycerol concentrations and presence of 0.7% Equex Stem in freezing diluent on post-thaw motility of rat epididymal spermatozoa

Glycerol □□□□□□□□□□	Presence of 0.7% Equex Stem	% of post-thaw sperm motility	% of post-thaw sperm membrane integrity
0%	+	4.6±0.5 ^a	9.2±3.9 ^c
	-	4.7±0.2 ^a	5.1±4.0 ^{df}
3%	+	4.3±0.6 ^a	2.8±0.9 ^e
	-	3.4±0.5 ^{a, b}	1.3±1.1 ^{eg}
6%	+	2.9±0.4 ^b	0.8±1.4 ^{eg}

Means ± SEM,

^{a-g} Values with different superscription within a column differ significantly ($p < 0.05$)

Table 3. Intrauterine insemination of female rats with epididymal spermatozoa cryopreserved either with or without 3% glycerol and 0.7% Equex Stem

Inseminated sperm	Cryoprotective agents		% of sperm motility	Total number of collected embryos	Number of collected Day 4.5 blastocysts (%)
	glycerol	0.7% Equex Stem			
Non-frozen			75.0±7.7 ^a	95 ^a	79 (80.0 ^a)
Frozen-thawed	0%	-	9.6±1.5 ^b	44 ^b	2 (4.6 ^b)
	0%	+	9.0±3.3 ^b	47 ^b	31 (66.0 ^c)
	3.0%	+	7.0±1.2 ^b	17 ^c	2 (11.8 ^b)
	3.0%	-	5.0±0.0 ^c	20 ^c	0 (0 ^e)

^{abcde} Values with different superscriptopn within a column differ significantly ($P < 0.05$).

(実験 3)

凍結融解精子の授精後の Day 22 胎子

への発育能力について検討した。この結果を Table 4 に示す。融解精子の授精に

においてグリセリン無添加・Equex Stem 添加区が妊娠率、胎子数において他の試験区よりも有意に($P<0.01$) 高かった。しかしながら、このグリセリン無添加・Equex Stem 添加区の成績は、実験2の胚盤胞

への発育率と同様に、新鮮精子の授精区より有意に($P<0.01$) に低い値を示した。凍結融解精子由来の摘出胎子の一部(20匹)を里親に離乳まで哺育させたところ、19匹が離乳に至った。

Table 4. Results of intrauterine insemination with cryopreserved rat epididymal sperm with or without 3% glycerol and 0.7% Equex Stem

Inseminated sperm	CPAs		% of sperm motility	Pregnancy (%)	Total number of day-22 fetuses	Litter size	
	% of glycerol	0.7% Equex Stem				In pregnant females	In all inseminated females
Non-frozen sperm			75.0 ± 7.7^a	13/13 (100) ^c	145	11.2 ± 2.2^g	11.2 ± 2.2^k
Frozen sperm	0	+	9.0 ± 3.3^b	9/13 (69.2) ^d	41	4.6 ± 4.9^{hi}	3.2 ± 4.6^{ln}
	0	-	9.6 ± 1.5^b	5/12 (41.7) ^e	13	2.6 ± 1.4^h	1.1 ± 2.3^l
	3	+	7.0 ± 1.2^b	3/13 (23.1) ^f	4	1.0 ± 0^{hj}	0.2 ± 4.3^{lm}

CPAs: Cryoprotective agents,

^{a-m} Values with different superscription within a column differ significantly :

a vs. b: $p<0.001$, c vs. d, e, f: $p<0.01$, g vs. h: $p<0.01$, i vs. j: $p<0.05$, k vs. l: $p<0.001$, n vs. m: $p<0.05$

(実験 4)

実験 3 でえられた凍結融解精子由来個体の繁殖能力を調べたところ、すべての個体が繁殖能力を有していた。これらの交配により平均 13.5 匹の産子がえられた。また、離乳後のこれらの産子はすべて外見上の異常は認められなかった。このことより、凍結融解精子由来の個体の繁殖性は正常であることが確認された。

(実験 5)

凍結融解精子を外科的に子宮内人工授精した雌ラットの分娩および哺育能力について調べた。グリセリン無添加・Equex Stem 添加の精子凍結希釈液にて精子を凍結し、その融解精子を・6 匹の雌に授精させたところ、4 匹が妊娠した。この 4 匹すべてが自然に分娩した。産子数はそれぞれ 8、5、3 および 1 匹で、1 匹のみ分娩し

た雌を除く、3匹の雌ラットが産子を離乳まで哺育した。1匹のみ分娩した雌の産子は生後2日目で死亡した。

考察

本研究で使用したラット精子凍結希釈液は、ブタ精子凍結希釈液⁴⁾を基本液としてもちいた。ブタの精子は低温および凍結に対して感受性が高く、精液の凍結保存がウシよりも難しいとされている。したがって、ブタ精子凍結希釈液は他の動物精子の精子凍結希釈液よりも凍結融解過程で生じる損傷から精子を保護する能力がより高いのではないかと考え、ラット精子の凍結希釈液に採用した。この精子凍結希釈液に含まれる卵黄はウシ、ブタなどの家畜における精子の凍結に広くもちいられており、それらの凍結融解精子の受精能も明らかになっている。卵黄は精子に対するコールドショックや精子原形質膜の正常性を保護する働きを有する⁵⁾。本研究ではこの卵黄ベースの精子凍結希釈液をラット精子用に改変するため、凍結希釈液中のグリセリン濃度および0.7% Equex Stemの有無がラット精子の凍結融解後の精子運動性、精子原形質膜正常性および人工授精後の受精能力に及ぼす影響を調べた。精子に対するグリセリンの凍結保護作用はPolge⁶⁾により発見され、凍害保護物質として哺乳動物の精子および初期胚を含む様々な細胞の凍結にもちいられてきた。しかし本研究では、ラット精子凍結希釈液へのグリセリン添加は、凍結融解後の運動精子率、精子原形質膜の正常率および受精能力を低下させ、ラットの精子凍結におけ

る凍害保護効果は認められなかった。一方、ラット精子凍結希釈液への0.7% Equex Stem添加は、凍結融解後の精子原形質膜の正常率を改善する凍害保護効果が認められた。また、この精子原形質膜の正常率は、融解精子の受精能力を反映していた。すなわち、0.7% Equex Stem添加凍結希釈液で凍結された精子の胚盤胞への発育能力や胎子もしくは産子への発育能力はEquex Stem無添加の精子凍結希釈液で凍結された精子のそれらよりも高いことが示された。このEquex Stemは界面活性剤の一種でブタ精子凍結希釈液に添加されている⁷⁾。

ラット精子の凍結保存が他の動物と比較して困難である理由は不明であるが、同じゲッシ類のマウスの精子においても11年前の1990年以降に産子生産に成功しているに過ぎない¹¹⁻¹⁴⁾。このマウス精子の凍結融解に対する感受性の高さは、家畜の精子と比較して、マウス精子の尾部が長いことに起因しているのではないかと考えられている¹²⁾。ラット精子は、その尾部がマウスよりもさらに長く¹⁶⁾、その原形質膜が物理的傷害に対してきわめて弱い¹⁾ことが明らかになっている。このことが、ラット精子が他の動物の精子と比較し、精子凍結が困難である1つの要因と考えられる。

本研究で開発した方法により、-196℃にて凍結保存したラット精子を子宮内人工授精することにより産子がえられることが明らかになった。また、子宮内へ精子注入する子宮内人工授精は、外科的な手法にもかかわらず、授精された雌ラットが自然分娩し、産子を哺育することも明らかになった。し

たがって、本研究により開発された精子凍結法および子宮内人工授精法の適用により、ラット遺伝資源を効率的に保存することが期待できる。

本研究におけるラット凍結融解精子の子宮内人工授精成績は、新鮮精子をもちいた場合と比較して明らかに低い。

しかし、凍結融解精子の子宮内人工授精により複数の外見上正常で繁殖能力を有する産子をえることができた。今後、このラット精子凍結保存法の改良のためには、精子の冷却速度、凍結希釈液中での有効な凍害保護物質の検索などが必要であろう。

文献

1. Nakatsukasa E., Inomata T., Ikeda T., Shino M., and Kashiwazaki N.: Generation of live rat offspring by intrauterine insemination with epididymal spermatozoa cryopreserved at -196°C . *Reproduction* 122, 463-467, 2001.
2. Nagashima H., Kashiwazaki N., Ashman R., Grupen C. and Nottle M.: Cryopreservation of porcine embryos. *Nature* 374, 416, 1995.
3. Miyoshi K., Kono T. and Niwa K.: Stage-dependent development of rat 1-cell embryos in a chemically defined medium after fertilization in vivo and in vitro. *Biol. Reprod.* 56, 180-185, 1997.
4. Kikuchi K., Kashiwazaki N., Nagai T., Noguchi J., Shimada A., Takahashi R., Hirabayashi M., Shino M., Ueda M. and Kaneko H.: Reproduction in pigs using frozen-thawed spermatozoa from epididymis stored at 4°C . *J. Reprod. Dev.* 45, 345-350, 1999.
5. Benson R. W., Pickett B. W., Komarek R. J. and Lucas J. J.: Effect of incubation and cold shock on motility of boar spermatozoa and their relationship to lipid content. *J. Anim. Sci.* 26, 1078-1081, 1967.
6. Polge C., Smith A. U. and Parkes A. S.: Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164, 666-668, 1949.
7. Pursel V. G., Schulman L. L. and Johnson L. A.: Effect of Orvus ES Paste on acrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen-thawed boar sperm. *J. Anim. Sci.* 47, 198-202, 1978.
8. 奥山 学、磯貝 滋、佐賀 正彦、浜田 宏、尾川 昭三: マウス凍結保存精子の体外受精及び人工授精試験. *日着床会誌* 7, 116-119, 1990.
9. 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.
10. 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.

11. Nakagata N. and Takeshima T.: High ability of mouse spermatozoa diluted slowly after cryopreservation. *Theriogenology* 37, 1283-1291, 1992.
12. Clouthier D. E., Avarbock M. R., Maika S. D., Hammer R. E. and Brinster R. L.: Rat spermatogenesis in mouse testis. *Nature* 381, 418-421, 1996.