

マウス精巢上体尾部精子の常温保存:精子生存性へ影響する

因子の探索

Room Temperature Storage of Mouse Epididymal Spermatozoa:  
Exploration of Factors Affecting Sperm Survival

佐藤 正宏

Masahiro Sato

東海大学総合医学研究所分子発生科学部門

〒259-1193 神奈川県伊勢原市望星台

The Institute of Medical Sciences, Tokai University, Bohseidai, Isehara,  
Kanagawa 259-1193, Japan

Tel.: +81-463-93-1121 ext. 2692; fax: +81-463-94-8524; E-mail address:  
masasato@is.icc.u-tokai.ac.jp

---

To explore optimal conditions for *in vitro* sperm survival, we examined the effects of several media used for murine egg culture and IVF [including M16, M2, PB1, TYH and CZB] on motility of spermatozoa stored at 22°C under paraffin oil. Of media tested, M2 medium, that had been adjusted to pH 7.2 by adding HEPES, was found to be the best. Addition of various concentrations of HEPES to TYH did not improve sperm survival, suggesting that HEPES (and probably neutral pH) do not enhance survival of murine sperm. Since M16 has higher amounts of bicarbonate than M2 (25 vs. 4.15 mM), four variations of M16 media containing 4.15, 8.30, 16.60 or 33.20 mM bicarbonate were prepared and tested. The modified M16 media with 4.15 to 16.60 mM bicarbonate yielded good sperm survival comparable to M2 medium, while relatively high concentrations of bicarbonate (ranging from 16.60 to 33.20 mM) were deleterious to isolated sperm, suggesting the need for a minimum level of residual bicarbonate. However, the mechanism by which the lifespan of spermatozoa is extended remains unknown. The *in vitro* fertilizing abilities of spermatozoa left in M2 medium for 1, 3

and 5 d at 22°C were 52.5, 21.8 and 7.0%, respectively, when the cleavage rate to the two-cell stage was examined. Transfer of two-cell embryos produced *in vitro* with spermatozoa stored for 1, 3 and 5 d at 22°C resulted in production of fetuses with efficiencies of 42.5, 23.4 and 12.5%, respectively, which were lower than that of embryos derived from *in vitro* fertilization with fresh spermatozoa (68.1%). In conclusion, spermatozoa kept in M2 medium for up to 5 d at 22°C can fertilize oocytes.

Key words: 精巣上体、受精、*in vitro* fertilization、精子、マウス

## 緒言

*in vitro* fertilization (IVF) medium 中でのマウス精子の短期間液状保存は、精子を遠方の研究所へ輸送する、人工授精や IVF での繰り返しの insemination においても有効な方法と言える。特に前者は都合が良く、1) 精子の微生物モニタリング（面倒且つ、時間がかかる）の必要がなく、2) 凍結精子で産仔を得る方法（凍結精子の解凍、続く IVF）が回避出来る等の利点を備える。我々のこれまでの研究では、TYH medium<sup>1)</sup> でマウス精子を懸濁し、室温（常温、22°C）で3日間 CO<sub>2</sub> ガス供給無し conditions で放置すると、精子は充分生存しており、且つ受精能を保持していることを見出した<sup>2)</sup>。この場合、1日間で精子懸濁液の pH は pH 6.8-7.1 に一時的に低下したが、2日目には徐々に上昇した。この一時的な pH の低下は、精子の代謝性副産物によるものと思われる。pH の上昇は、保存後 2-3 日目において精子の死滅の

劇的増加と密接な関係があるように見えた<sup>2)</sup>。

精巣上体尾部精子へ影響する最も明らかな因子は pH とされる。例えば、無脊椎動物、脊椎動物精子の高い活力は、pH がアルカリ側に移行した場合に起こるとされる<sup>3),4)</sup>。そこで、我々は精子を室温で保存した際の pH 変動が精子の質（精子機能低下に導く）に影響すること、pH 7.5 以下に pH を維持することが *in vitro* での精子生存性に重要と考えた。HEPES<sup>5)</sup> は重炭酸緩衝液の pH 変化を抑えることが知られているので、HEPES を THY medium に加え、edium の pH が中性に維持されること、及び HEPES 自体の有益性を探った。medium の pH 以外にも、精子を懸濁する希釈液のタイプも精子の液状保存には重要と指摘される<sup>6)</sup>。例えば、Tris 緩衝液やリン酸緩衝液系は家兎、牛、羊等で採用されている<sup>6)</sup>。ヒト精子の場合、IVF culture medium が採用されている<sup>7)</sup>。哺乳類精子、特に



家畜精子の液状保存には、市販の medium が多く使用されている。その中には、例えば、卵黄を含む medium、細胞の温度ショックを和らげる醤油ベースの脂質蛋白を含む medium もある。マウス精子の常温保存の場合もこれら市販の medium を検討する方向性も考えられるが、マウス精子の液状保存の現時点での未開拓性を考慮した場合、先ず目先の課題をこなすことを主眼に置いた。

先述のように、我々の現在の興味は、1) pH 変動が常温保存マウス精子の生存性にどのように影響するか、2) HEPES 自体がその保存に良い効果を発揮するのではないかという可能性である。今回、TYH medium を基本に据え、HEPES-based THY medium、IVF や着床前胚の培養に使用される各種 medium を検討した。ここで用いた medium は、CZB<sup>8)</sup>、M2<sup>9)</sup>、M16<sup>10)</sup>、TYH 及び様々な濃度で HEPES を含む TYH medium 等の重炭酸緩衝液及び磷酸緩衝液である PB1<sup>11)</sup>である。TYH medium の組成は、M16 medium のそれと似ているが、幾つかの成分は若干異なる。M16 は一般的にマウス 2 細胞期胚の発生を支える培養液である。CZB medium は M16、TYH の組成とほぼ同じであるが、グルコースを欠く。M2 medium は CO<sub>2</sub> 不在下で培養液の pH を中性に保つ HEPES を含むが、浸透圧を調整す

るため M16 に比べ NaHCO<sub>3</sub> の量が低い。PB1 は Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) に基づく単純な medium であるが、その成分の殆どは、TYH、M16、CZB と共通する。PB1 はその pH が通常の気相下では中性故、胚の灌流による単離、その洗浄に使われている。

## 材料と方法

### 精巢上体尾部精子の単離

成体 B6C3F1、ICR、C57BL/6N、C3H/HeN マウス (10-16 週令) から精巢上体尾部精子を単離するため、4 個の精巢上体尾部を 400  $\mu$ L TYH medium [four-well multi dish (No. 17640, Nunc Inc.) 内パラフィン油でカバー] 内で細片化し、精子を 1.5 時間、37°C にて capacitation を誘発させた。この精子懸濁液を "original sperm suspension" とした。精子数を Burkert-Turk 血球計算盤で計測した。

精子濃度が *in vitro* 下で保存された精子の活力にどのような影響を与えるかを試験するため、様々な精子濃度 ( $4 \times 10^4$  -  $4 \times 10^2$  精子/ $\mu$ L) をもつ懸濁液 (TYH medium に希釈; 最終容量は 200  $\mu$ L) を 1.5-mL Eppendorf tube にいれ、パラフィン油でカバー後、室温にて 7 日間まで保存した。

各種の精子懸濁用 medium における精子の常温保存後の精子活力を検討

すべく、"original sperm suspension"を各種 medium に最終容量 100  $\mu\text{L}$ 、 $4 \times 10^3$  精子/ $\mu\text{L}$  となるように希釈した。用いた medium は、CZB, M2, M16, TYH, PB1, TYH 派生体[TYH-HEPES (12.5 mM), TYH-HEPES (25.0 mM) and TYH-HEPES (37.5 mM)と称する；それぞれ、TYH medium に HEPES を最終濃度 12.5、25.0、37.5 mM となるように添加]及び M16 派生体[M16/ $\text{NaHCO}_3$  (4.15 mM), M16/ $\text{NaHCO}_3$  (8.30 mM), M16/ $\text{NaHCO}_3$  (16.60 mM) and M16/ $\text{NaHCO}_3$  (33.20 mM)と称する；それぞれ、重炭酸なしの M16 medium に sodium bicarbonate を最終濃度 4.15、8.30、16.60、33.20 mM となるように添加]である。TYH 派生体の pH は、15  $\mu\text{L}$  の液を pH meter (pH Boy; Sindenkagaku, Tokyo, Japan) を用いて測定した。TYH-HEPES (12.5 mM), TYH-HEPES (25.0 mM)、TYH-HEPES (37.5 mM)の pH は、それぞれ 7.0、7.2、7.4 であった。medium はミリポアフィルター (孔径 0.2 mm) で濾過滅菌し、4°C 保存した。各液の浸透圧の測定は、Vogel 社の OM 801 osmometer を用いた。

IVF、続くレシピエントへの胚移植には、"original sperm suspension"を M2 あるいは TYH medium に  $4 \times 10^4$  精子/ $\mu\text{L}$  となるように希釈し、この希釈液 (200  $\mu\text{L}$ ) をパラフィン油で被い、1.5-mL Eppendorf tube にて室温で 5 日

間まで保存したものを用いた。この場合、全ての tube に対しては 5% $\text{CO}_2$  で充填することはしない。

#### 精子活力の測定

精子単離後 0, 1, 3, 5, 7 日目に常温保存した精子を TYH medium に希釈し、直ちに精子活力を測定した。その測定は顕微鏡下でその動きを観察することにより決定した。200 個以上の精子を検討した。

#### 精子細胞膜の解析

6-carboxylfluorescein diacetate (6-CFDA)及び propidium iodide (PI)を用いた 2 重染色法 (Harrison and Vickers<sup>12)</sup>) を用い、細胞膜の損傷程度を蛍光顕微鏡で観察した。

#### *in vitro* 受精能の検討

IVF、続く輸卵管への胚移植 (egg transfer, ET) の方法は、Tada et al.<sup>13)</sup>、Hogan et al.<sup>14)</sup> に準拠した。

過剰排卵処理 B6C3F1 ♀マウス (3-4 週令) から濾胞細胞付き卵母細胞を採取し、これを 300  $\mu\text{L}$  TYH medium ドロップ (パラフィン油でカバー) 内に置いた。新鮮 B6C3F1 精子 (capacitation 処理済み) をコントロール (0 d) に据えた。M2 あるいは TYH medium に 1、3、5 日間常温で放置した精子 ( $4 \times 10^4$  精子/ $\mu\text{L}$ ) を精子の最終濃度が  $1-2 \times 10^3$

精子/ $\mu\text{L}$  となるように、直接 TYH medium ドロップに投じた。37°C、6 時間加温後、正常な形態を示す卵母細胞のみを取り出し、M2 medium で 3 回洗い、Terasaki microtest plate (No. 5260, Nunc Inc.) 上の M16 medium (パラフィン油でカバー) にて更に 20 時間培養した。翌日 2 細胞期へ達した胚の数を数え、更に 5 日間培養し、胚盤胞への発生率を調べた。2 細胞期胚の幾つかは偽妊娠レシピエントマウス (E 0.5; 膣栓が確認された日を E 0.5 と規定) の輸卵管へ移植した。移植後、E 12.5 で開腹し、胎仔数を数えた。

### 統計解析

*in vitro* 受精率, *in vitro* での胚盤胞への発生率を $\chi^2$  解析で調べた。各グループの実験は異なる日に 2 回繰り返した。 $P < 0.05$  で統計的有意差ありと判定した。

### 結果

常温保存された精子の生存性は、精子濃度が高い場合、良好である

図 1 に示されるように、 $4 \times 10^4$  精子/ $\mu\text{L}$  濃度の精子を保存した場合、最も生存率は高かった。 $4 \times 10^2$  精子/ $\mu\text{L}$  濃度の精子の場合、活力は急速に減退した。この結果は、高濃度で精子を保存することが精子の常温保存に有効で

あることを示す。似たような関係はまた精子膜の保存性についても言えた (図 1)。

特に、 $4 \times 10^3$  精子/ $\mu\text{L}$  濃度で保存した場合、精子活力の低下はそれ程急激ではなく、適当な状態で下降した (図 1)。これは、常温で精子を保存し、経時的にその活力をモニターする場合に好都合と思われた。従って、以下の実験では、 $4 \times 10^3$  精子/ $\mu\text{L}$  の精子濃度で常温保存した。

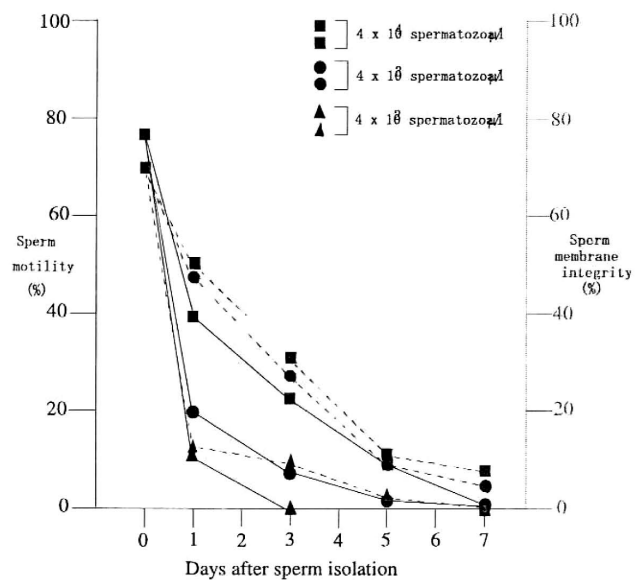


Fig. 1. Motility (shown by solid symbols) and plasma membrane integrity (shown by shaded symbols) of B6C3F1 spermatozoa at concentrations of  $4 \times 10^4$  (squares),  $4 \times 10^3$  (circles) or  $4 \times 10^2$  (triangles) spermatozoa/ $\mu\text{L}$  stored at room temperature. Epididymal spermatozoa that had been incubated in TYH medium for 1.5 h at 37°C were diluted with TYH medium to final concentrations of  $4 \times 10^4$  to  $4 \times 10^2$  spermatozoa/ $\mu\text{L}$ . The sperm suspension was left for up to 7 d, and both sperm motility and plasma membrane integrity were examined at the time points indicated. The left ordinate indicates the percentage of spermatozoa exhibiting active motility. The right ordinate indicates the percentage of spermatozoa with an intact plasma membrane. Each point represents the average from two replicates.

**M2 medium** はマウス精子の液状保存には最適である

capacitation 誘起後、B6C3F1 精子を M2、M16、PB1、TYH、CZB 等の各種 medium に最終濃度が  $4 \times 10^3$  精子/ $\mu\text{L}$  となるよう、約 10 倍に希釈し、パラフィン油下、常温で 7 日間まで保存した。0, 3, 5, 7 日間保存した精子の活力を図 2 に示す。検討した medium の中で、M2 medium が最も良好な結果を示した。例えば、M2 medium で 3 日間保存された精子は約 15% の生存性を示したが、他の medium に保存されたものは、5% 以下であった (図 2)。

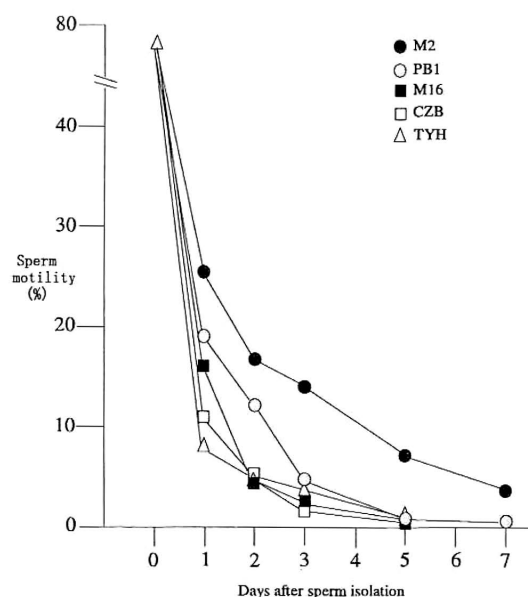


Fig. 2. Motility of B6C3F1 spermatozoa stored in various media at room temperature. Epididymal spermatozoa that had been incubated in TYH medium for 1.5 h at 37°C were diluted (approximately 10-fold) in each medium to a final concentration of  $4 \times 10^3$  spermatozoa/ $\mu\text{L}$ . The sperm suspension was left for up to 7 d, and sperm motility was examined at the time points indicated. The left ordinate indicates the percentage of spermatozoa exhibiting active motility. Each point represents the average from two replicates.

**HEPES** はマウス精子の *in vitro* での生存性延長には効果がない

HEPES が単離した B6C3F1 精巣上体尾部精子の *in vitro* 生存に対し有益な効果を示すかどうかを検討した。TYH medium で 1.5 時間、37°C 処理により精子に capacitation 誘起した後、精子懸濁液を TYH 派生体 [TYH-HEPES (12.5 mM) (253 mosmol), TYH-HEPES (25.0 mM) (273 mosmol), TYH-HEPES (37.5 mM) (323 mosmol)] に希釈し、 $4 \times 10^3$  精子/ $\mu\text{L}$  精子を含む希釈液を 7 日間まで常温保存し、経時的に精子活力を調べた。その結果を図 3 に示す。どの TYH 派生体で保存した場合でも、TYH medium で保存した場合と同様なレベルで精子活力の低下が認められた。

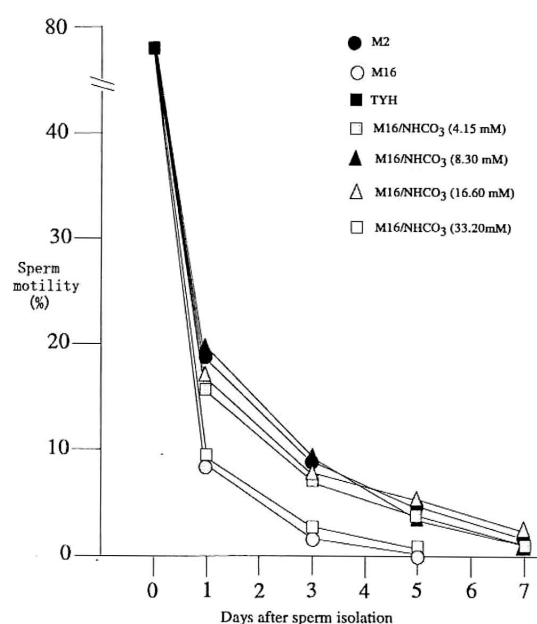


Fig. 4. Motility of B6C3F1 spermatozoa stored in various media including M16 derivatives at room temperature. Epididymal spermatozoa that had been incubated in TYH medium for 1.5 h at 37°C were diluted (approximately 10-fold) with each medium to a final concentration of  $4 \times 10^3$  spermatozoa/ $\mu\text{L}$ . The sperm suspension was left for up to 7 d, and sperm motility was examined at the time points indicated. The left ordinate indicates the percentage of spermatozoa exhibiting active motility. Each point represents the average from two replicates.

重炭酸濃度が比較的低い方が精子の常温保存に適している

M2 medium では HEPES が含まれる以外に、M16 medium と主に異なるものは、重炭酸濃度である。M2 と M16 はそれぞれ重炭酸を 4.15、25 mM 含んでいる。重炭酸濃度が高いと精子の *in vitro* 生存に害作用を与えると思われる。そこで、B6C3F1 精子 ( $4 \times 10^3$  精子/ $\mu\text{L}$ ) を capacitation 誘起後、M16 派生体[M16/NaHCO<sub>3</sub> (4.15 mM) (240 mosmol), M16/NaHCO<sub>3</sub> (8.30 mM) (243 mosmol), M16/NaHCO<sub>3</sub> (16.60 mM) (258 mosmol), M16/NaHCO<sub>3</sub> (33.20 mM) (282 mosmol)] にて常温保存し、経時的に精子活力を調べた。その結果

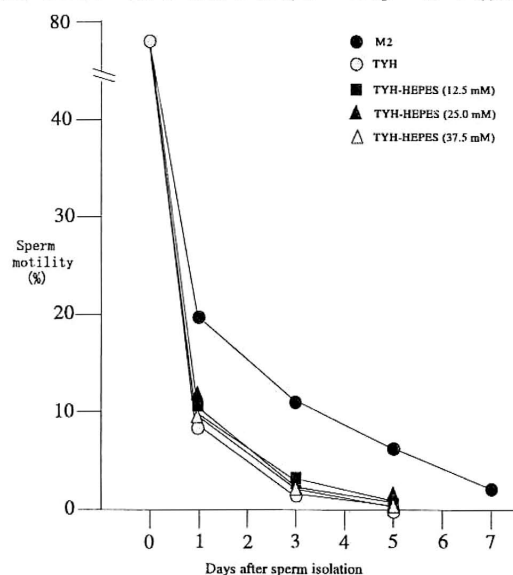


Fig. 3. Motility of B6C3F1 spermatozoa stored in various media including TYH derivatives at room temperature. Epididymal spermatozoa that had been incubated in TYH medium for 1.5 h at 37°C were diluted (approximately 10-fold) with each medium to a final concentration of  $4 \times 10^3$  spermatozoa/ $\mu\text{L}$ . The sperm suspension was left for up to 7 d, and sperm motility was examined at the time points indicated. The left ordinate indicates the percentage of spermatozoa exhibiting active motility. Each point represents the average from two replicates.

を図 4 に示す。M16/NaHCO<sub>3</sub> (4.15 mM), M16/NaHCO<sub>3</sub> (8.30 mM), M16/NaHCO<sub>3</sub> (16.60 mM) で保存した精

子活力は、M2 medium で保存した場合の活力とほぼ同程度であったが、M16/NaHCO<sub>3</sub> (33.20 mM) で保存した場合、M16 medium で保存した場合と同程度に精子活力は低下した。

### 精子常温保存下におけるマウスの系統差

次に、マウス精子の常温保存下での生存性は、マウスの遺伝的背景に左右されるかどうかを検討した。TYH medium で各種系統 (B6C3F1, ICR, C57BL/6N, C3H/HeN) から得た精子を 1.5 時間、37°C 処理で capacitation を誘発後、M2 あるいは PB1 medium に希釈した。希釈精子 ( $4 \times 10^3$  精子/ $\mu\text{L}$ ) は常温 5 日間まで保存され、経時的に活力を調べた。その結果を図 5 に示す。B6C3F1 精子が 4 種の系統を調べた中で最高の生存性を示し、ICR 精子がその次であった。C57BL/6N、C3H/HeN 精子は似たような生存性の低下を示した。PB1 medium で精子を保存した場合、ICR、B6C3F1 精子は C57BL/6N、C3H/HeN 精子よりもやはり高い生存性を示した (図 5)。

## マウス精子の常温保存

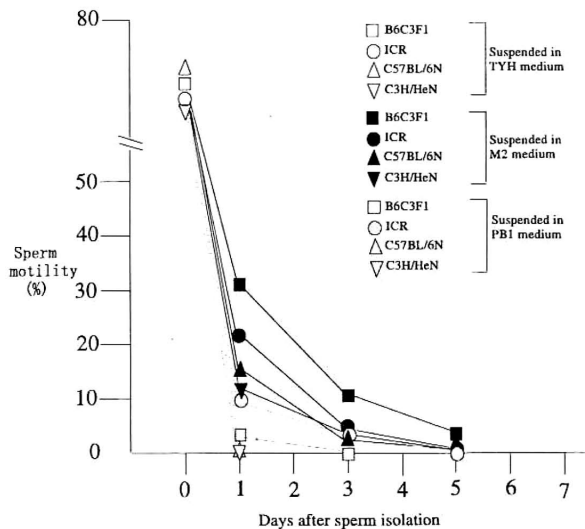


Fig. 5. Motility of spermatozoa from various strains stored in M2 or PB1 medium at room temperature. Epididymal spermatozoa that had been incubated in TYH medium for 1.5 h at 37°C were diluted (approximately 10-fold) with each medium to a final concentration of  $4 \times 10^3$  spermatozoa/ $\mu\text{L}$ . The sperm suspension was left for up to 5 d, and sperm motility was examined at the time points indicated. The left ordinate indicates the percentage of spermatozoa exhibiting active motility. Each point represents the average from two replicates.

### 常温で 5 日間まで保存した精子の *in vitro* 受精能、これら精子で受精した卵母細胞の *in vivo* 発生率

B6C3F1 精子を 0, 1, 3, 5 日間常温で保存した時の *in vitro* 受精能の結果を表 1 に示す。B6C3F1 精子を capacitation 誘起後、これを直ちに IVF に付じた (単離後 0 d)。残りの精子は TYH あるいは M2 medium に最終濃度  $4 \times 10^4$  精子/ $\mu\text{L}$  となるように希釈し、これを常温で 5 日間まで保存した。IVF は保存から 1, 3, 5 日目に行った。 *in vitro* 受精率は、新鮮精子 (単離後 0 d) の場合、85.3%であったのに対し、TYH medium で 1, 3, 5 日間保存された精子では、それぞれ 42.4, 7.8, 0%であった。似た傾向は、精子を M2 medium にて保存し

た場合も見られたが、受精率は TYH medium で保存された場合よりも良好であった (52.5 vs. 42.4%, 21.8 vs. 7.8%, 7.0 vs. 0%)。常温で 1, 3, 5 日間保存された精子から受精した胚の胚盤胞への *in vitro* 発生率は、TYH で保存した精子の場合、75.0、22.2、0%、M2 medium で保存した精子の場合、79.3, 36.4, 12.5% で新鮮精子の場合 (95.1%) に較べ明らかに低値であった (表 1)。これは、精子保存期間の延長は、胚発生率を低下させる要因となることを示す。

次いで、常温で 1, 3, 5 日間保存した精子で IVF を行って得た胚の *in vivo* 発生率を調べるため、IVF 後 1 日目に 2 細胞期に発生したものを集め、偽妊娠レシピエント輸卵管へ移植した。1 日間保存した精子の場合、得られた 82 個の 2 細胞期胚を 7 匹のレシピエントへ移植した結果、5 匹が妊娠し、22 匹 (42.3%) の正常な妊娠中期胎仔を得た (表 2)。常温で 3, 5 日間保存された精子の場合、それぞれ *in vivo* 発生率は、23.4, 12.5%であった (表 2)。これらから、M2 medium で 5 日間まで常温で精子を保存した場合、その精子の受精により生じた胚は *in vivo* で正常に発生することが判った。

**Table 1** *In vitro* fertilizing ability of B6C3F1 epididymal spermatozoa stored for 0 to 5 d at room temperature

| Storage condition | No. of experiments | No. of normal two-cell embryos/ no. of total embryos examined (%) | Normal blastocysts developing <i>in vitro</i> from normal two-cell embryos (%) |
|-------------------|--------------------|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| 0-d TYH           | 3                  | 81/95 (85.3)                                                      | 95.1                                                                           |
| 1-d TYH           | 3                  | 36/85 (42.4)*                                                     | 75.0*                                                                          |
| 1-d M2            | 3                  | 63/120 (52.5)*                                                    | 79.3*                                                                          |
| 3-d TYH           | 3                  | 9/115 (7.8)**                                                     | 22.2**                                                                         |
| 3-d M2            | 3                  | 22/101 (21.8)**                                                   | 36.4**                                                                         |
| 5-d TYH           | 3                  | 0/95 (0)**                                                        | 0                                                                              |
| 5-d M2            | 3                  | 8/115 (7.0)**                                                     | 12.5**                                                                         |

**Table 2** *In vivo* developmental rate of oocytes fertilized by B6C3F1 epididymal spermatozoa kept in M2 medium for up to 5 d at 22°C

| Storage condition | No. of recipients used | No. of pregnant recipients | Total no. of two-cell embryos transferred | Normal fetuses at E 12.5 (%) |
|-------------------|------------------------|----------------------------|-------------------------------------------|------------------------------|
| 0-d               | 7                      | 5                          | 75                                        | 68.1                         |
| 1-d               | 8                      | 5                          | 82                                        | 42.3*                        |
| 3-d               | 6                      | 4                          | 76                                        | 23.4**                       |
| 5-d               | 7                      | 4                          | 73                                        | 12.5**                       |

### 考察

いくつかの medium を検討した中で、M2 medium が精子の常温保存の場合、最も良い精子懸濁用 medium であることが判明した（図 2 参照）。M2 medium は HEPES を含むので、HEPES あるいは中性 pH 自体が精子の生存性

延長に關与するのではないかと考えられた。そこで、HEPES を含む TYH 派生体での精子の生存性を調べた結果、HEPES の有益性は確認されなかった（図 3 参照）。従って、HEPES 及び中性 pH は精子の生存性には影響しないだろうと結論された。



本研究では、比較的高濃度の重炭酸 (16.60 - 33.20 mM) が精子生存性へ害作用を示すことを明らかにした (図 4 参照)。Bartlett and Van Demark<sup>15)</sup> は牛精子の液状保存の場合、50 mM の重炭酸濃度は 25 mM のそれに比べ生存性に良い効果があることを述べている。この結果は我々のものとは異なるように見えるが、用いた生物種、保存条件、等で結果は変動することは当然と思われる。しかし、重炭酸が精子活力に影響を与える点では共通している。興味深いことに、重炭酸は精子機能に重要な役割を果たすとされる。例えば、マウス精子の場合、capacitation や先体反応は重炭酸が無いと進行しない<sup>16),17)</sup>。また、Okamura et al.<sup>18)</sup> は精巣上体尾部の精漿は重炭酸が極度に低いことから、重炭酸が精巣上体尾部における精子の不動態を保持する重要な因子ではないかとしている。ブタ、ラット、マウスの精巣上体精子に重炭酸を添加することにより、精子活力の迅速且つ顕著な促進が引き起こされる<sup>18),19)</sup>。

PB1 medium は今回調べた中では精子の *in vitro* 生存性を延長させる medium としては二番目に良いものであった (図 2 参照)。しかし、今回 PB1 のマウス精子生存性延長効果についての詳細解析は着手していない。

興味深いことに、Fuller and Whittingham<sup>20)</sup> は、マウス精子を 3 種の medium (HT6, DPBS、D3) で懸濁

し、これを 4°C、4 時間保存し、その後、37°C に戻し、精子の受精能を検討した時、リン酸緩衝液系の DPBS が最も良いと結論した。この意味では、PB1 も精子常温保存の際、良い精子懸濁液となり得る可能性もあるので、更なる研究が必要かもしれない。

高い浸透圧も精子活力に悪影響を与える可能性がある。しかし、我々の今回の観察では、323 mosmol という高い浸透圧を示す TYH-HEPES (37.5 mM) で懸濁した場合と 246 mosmol の TYH medium で懸濁した場合とで、精子の活力低下は似たパターンをとることが判った (図 3 参照)。従って、精子の常温保存中の生存性は、今回用いた浸透圧の範囲では影響を受けないと思われる。

常温保存された精子の IVF の場合、精子を何も選別せず直接 IVF ドロップに投じている。常温保存精子は活発に動く精子とそうでない精子との混在なので、例えば、swim-up 法等で運動性のある精子を選別し、その精子の数をコントロールし、IVF に付すなら、液状保存の *in vitro* 受精能に与える効果をより正確に検討出来るかもしれない。本研究では重炭酸、リン酸ベースの medium というごく限られた数のものしか検討していない。例えば、Tris 系の緩衝液も家畜精子の保存液として利用されているが、それも検討項目の一つと言える。マウス精子の IVF に使われる HTF (HEPES-buffered synthetic

human tubal fluid medium)<sup>21)</sup>も TYH medium と比較してどうなのか興味深い。

精子懸濁液に加える試薬も精子の液状保存には重要と思われる。例えば、卵黄やその他の高分子物質、例えば、スキムミルク、全乳、ココナッツミルク等は精子の温度ショックを和らげる効果がある<sup>22)</sup>。活性化酸素も精子に害作用を与えるので、抗酸化物質の添加も重要な検討項目と思われる。

精子の代謝速度を低下させることも精子の寿命を延長させる要因と成り得る。実際、幾つかの種では精子を低温 (5°C) で維持すると精子生存性が上がるという報告がある<sup>22)</sup>。しかし、マウス精子の場合、5°C での保存は常温保存に比べ、良い効果は得られなかった<sup>2)</sup>。代謝阻害剤を使う方法もある。例えば、Norman et al.<sup>23)</sup>は pH を下げることがを提唱している。pH 低下により代謝活性が低下することを酸素消費量、乳酸値、精子活力測定から見出している。しかも、その効果は可逆的で、pH を 5.76 から 7.45 に上げると、軽い休眠状態から急速に活動状態へと移行した<sup>23)</sup>。

精子の液状保存は保存期間中の精子活力の低下、受精能の低下を抑止出来れば、多大な恩恵が望まれる。それ

故に、液状保存時精子がどのように加齢するか、その生理学的過程への理解が求められる。精子を単離した後、精子の寿命にどんな因子が関与するのかを調べることは、精子の常温輸送、精子生物学の発展に重要な課題である。本研究では、B6C3F1 精子を M2 medium の中で常温で最低 5 日間まではその活力と受精能を保持したまま保存出来ることを示した。しかし、C57BL/6N、C3H/HeN 精子はこのような処置には未だ感受性が高く、幾分か改良 (例えば、M2 medium 以外の他の精子懸濁液を使用する、M2 medium に添加物を添加する、精子の代謝を低減する処置を施す、等) が求められるかもしれない。

### 謝辞

本研究は文部科学省の科学研究費補助金を受けて遂行された。また、本実験への様々な意見、指導を仰いだ櫻井敬之助手 (東海大医学部遺伝子工学実験動物研究センター)、木村穰教授 (東海大医学部基礎医学系) に謝意を表したい。

文献

1. Toyoda Y, Yokoyama M, Hoshi T. Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro. I. In vitro fertilization of eggs by fresh epididymal spermatozoa (in Japanese). *Jpn J Animal Reprod*, 16, 147-151, 1971.
2. Sato M, Ishikawa A, Nagashima A, Watanabe T, Tada N, Kimura M. Prolonged survival of mouse epididymal spermatozoa stored at room temperature. *genesis*, 31, 147-155, 2001.
3. Christen R, Schackmann RW, Shapiro BM. Elevation of the intracellular pH activates respiration and motility of sperm of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *J Biol Chem* 257, 14881-14890, 1982.
4. Acott TS, Carr DW. Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid: II. Interaction of pH and a quiescence factor. *Biol Reprod* 30, 926-935, 1984
5. Good NE, Winget GD, Winster W, Connolly TN, Izawa S, Singh PMM. Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry* 5, 467-477, 1966.
6. Maxwell WMC, Salamon S. Liquid storage of ram semen. *Reprod Fert Dev* 5, 613-638, 1993.
7. Cohen J, Fehilly CB, Walters DE. Prolonged storage of human spermatozoa at room temperature or in a refrigerator. *Fert Steril* 44, 254-262, 1985.
8. Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JL, Torres I. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *J Reprod Fert* 86, 679-688, 1989.
9. Quinn P, Barros C, Whittingham DG. Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. *J Reprod Fert* 66, 161-168, 1982.
10. Whittingham DG. Culture of mouse ova. *J Reprod Fert (Suppl)* 14, 7-21, 1971.
11. Whittingham DG. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. *Nature*, 233, 125-126, 1971.
12. Harrison RAP, Vickers E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fert* 88, 343-352, 1990
13. Tada N, Sato M, Yamanoi J, Mizorogi T, Kasai K, Ogawa S. Cryopreservation of mouse spermatozoa in the presence of raffinose and glycerol. *J Reprod Fert* 89, 511-516, 1990
14. Hogan B, Costantini F, Lacy E. *Manipulating the Mouse Embryo: A*

- Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986.
15. Bartlett FD, Van Demark NL. Effect of diluent composition on survival and fertility of bovine spermatozoa stored in carbonated diluents. *J Dairy Sci* 45, 360-367, 1962.
  16. Lee MA, Storey BT. Bicarbonate is essential for fertilization of mouse eggs: Mouse sperm require it to undergo the acrosome reaction. *Biol Reprod* 34, 349-356, 1986.
  17. Neill JM, Olds-Clarke P. A computer-assisted assay for mouse sperm hyperactivation demonstrates that bicarbonate but not bovine serum albumin is required. *Gamete Res* 18, 121-140, 1987.
  18. Okamura N, Tajima Y, Sugita Y. Decrease in bicarbonate transport activities during epididymal maturation of porcine sperm. *Biochem Biophys Res Commun* 157, 1280-1287, 1988.
  19. Okamura N, Tajima Y, Soejima A, Masuda H, Sugita Y. Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. *J Biol Chem* 260, 9699-9705, 1985.
  20. Fuller SJ, Whittingham DG. Effect of cooling mouse spermatozoa to 4°C on fertilization and embryonic development. *J Reprod Fert* 108, 139-145, 1996.
  21. Quinn P, Warnes GM, Kerin JF, Kirby C. Culture factors affecting the success rate of in vitro fertilization and embryo transfer. *Ann NY Acad Sci* 442, 195-204, 1985.
  22. Vishwanath R, Shannon P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal Reprod Sci* 62, 23-53, 2000.
  23. Norman C, Johnson CE, Porterfield ID, Dunbar RS. Effect of pH on the lifespan and metabolism of bovine sperm kept at room temperature. *J Dairy Sci* , 41, 1803-1812, 1958.