

ラット精巣上体精子の液状保存

Liquid storage of rat epididymal spermatozoa

紫野 正雄、奥田 泰士、大谷 悟、尾川 昭三*、柏崎 直巳
Masao SHINO, Yasushi OKUDA, Satoru OHTANI, Shyoso OGAWA*
and Naomi KASHIWAZAKI

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 相模原市渕野辺
Laboratory of Animal Reproduction, Department of Animal Science and
Biotechnology, School of Veterinary Medicine,
Azabu University
Fuchinobe, Sagamihara, 229-8501 JAPAN

*生殖工学（研）会、（株）ノーベル本社
〒160-0023 東京都新宿区西新宿
The Society for the Study of Reproduction Engineering, Nishi-Shinjyuku,
Shinnjyu-ku, Tokyo, 160-0023 JAPAN

緒言

ラットは、医学・農学・生物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 (1)、パーキンソン病 (2)、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 (3-7)

も作製されるようになった。さらに最近、N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) 投与による突然変異誘導によるノックアウトラットの作製例も報告された (8)。ラット遺伝資源の効率的な保存法として、精子の超低温保存法の開発が期待されてきたが、2001 年に Nakatsukasa *et al.* (9) により精巣上

ラット精子の液状保存

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、繁殖能力が正常な産子作製が報告された。しかし、このラット凍結融解精子の子宮内人工授精成績は、新鮮精子を用いた場合と比較して低い（9）。ラット遺伝子資源保存の点では、精子の液体窒素中での超低温保存法が要求されるが、貴重なラットを広範に利用する点からは、精液の液状保存法が開発されれば、宅配便などの輸送システムの発展、普及にともない、この保存法がより有効な手法になるものと考えられる。

本研究は、ラット精巣上体精子液状保存法の開発を目的に、ラット精子の 5℃および 15℃感作後の精子の運動性および運動精子が存在する期間について調べた。さらに、この保存培地中への緑茶抽出物の添加が、保存後の精子の運動性および運動精子が存在する期間に与える影響についても調べた。

材料および方法

（ラット精子および未受精卵子の採取）

46 匹の成熟雄および 40 匹の成熟雌（18-30 週齢）の Wistar (Jla: Wistar) ラットをもちいた。これらは麻布大学附置生物科学研究所にて光周期 12 時間（6:00-18:00 に明期）

の環境下で飼育した。精子の採取は、雄ラットを頸椎脱臼により安楽死させ、精巣上体尾部を摘出して直径 35 mm プラスチックシャーレ 中の 3.0 ml の保存液 中にて細切して精巣上体精子を採取した。ただちに、この精子浮遊液中の精子運動率、精子濃度、精子奇形率を調べ、精子運動率が 50%以上、精子奇形率 10%以下のものを実験にもちいた。精子の運動率は、精液性状検査板をもちいて 100 倍の顕微鏡下にて評価した。

雌ラットに eCG（セロトロピン 1000 単位：帝国臓器製薬株式会社）50 IU を腹腔内へ投与し、その 48 時間後に hCG（プベローゲン 3000 単位：三共株式会社）50 IU を腹腔内投与することで過剰排卵誘起処置を施した。この hCG 投与 16 時間後にラットを頸椎脱臼により安楽死させ、卵管を摘出し、mKRB (10) にて灌流することにより未受精卵子を回収した。

（精子の液状保存）

精子保存液として、4.0% (W/V) グルコース、3.0% (W/V) スキムミルク（スキムミルク、雪印）、溶液を 70℃の温水中で 20 分間湯煎し室温に冷却後、ペニシリン G カリウム (Sigma) 70 mg/ml、硫酸ストレプトマイシン (Sigma) 50 mg/ml を添加し、pH を NaHCO_3 にて pH 7.4 に調整した後、2,200 g で 5 分間遠心分離した上清を液状保存液としてもちいた。ラット精子を含む液状保存液

0.4 ml をキャップ付き 1.5 ml チューブに入れ、このチューブをアルミホイルで遮光して 15℃のインキュベーターもしくは 5℃の冷蔵庫内で保存した。

(実験 1: 緑茶抽出物添加が液状保存後の精子運動性に与える影響)

ラット液状保存精液に、緑茶抽出物 (GTE) を 0, 0.5 および 1.0% (v/v) 添加し、5℃および 15℃にて保存し、24 時間ごとに加温せずにその運動精子率を観察して運動精子存在日数を比較した。この GTE は、粉碎した緑茶 1.0 g を 10.0 ml の乳酸リンゲル液 (ソルラクト、テルモ株式会社) 中に入れ、65–70℃の温水中で 20 分間、湯煎抽出した。この液を 760 g で 15 分間遠心分離し、えられた上清をフィルターで濾過して調整した。

(実験 2: 5 日間液状保存後におけるラット精子の同種卵子透明帯への付着試験)

ラット精子を GTE 0% および 1.0% 添加した保存液にて 5 日間、5℃および 15℃で保存した。精子濃度を $5 \times 10^6/\text{ml}$ として 2 時間 37.5℃, 5% CO_2 , 95% 空気, 湿度飽和の条件下でプレインキュベートした。その後、同種

未受精卵子 (排卵卵子) の入った 100ml の mKRB 中に精子濃度が $5 \times 10^5/\text{ml}$ となるようにして 5 時間 37.5℃, 5% CO_2 , 95% 空気、湿度飽和の条件下で媒精した。媒精後、卵子を 5–6 回ピペッティングし、卵子透明帯に付着する精子が存在するかどうかを 200 倍の倒立顕微鏡にて観察した。

(統計処理)

精子運動率は数値を arcsine 変換後に t 検定により試験区間の有意差の有無の検定をおこなった。運動精子存在日数は、 t 検定により有意差の有無を検討した。卵子透明帯への精子付着率は、 χ^2 検定により有意差の有無を検討した。

結果

(実験 1: 緑茶抽出物添加が液状保存後の精子運動性に与える影響)

5℃および 15℃でのラット精子液状保存後の運動精子率の推移を図 1 に示す。液状保存 3 日後におけるラット液状精液の運動精子率は、GTE 0% 区、0.5% 区および 1.0% 区で各々、5℃では $30.0 \pm 2.7\%$, $30.6 \pm 3.6\%$ および $31.3 \pm 3.0\%$ 、15℃では $19.4 \pm 2.2\%$, $15.7 \pm 2.0\%$ および $20.0 \pm 2.8\%$ であった (表 1)。

ラット精子の液状保存

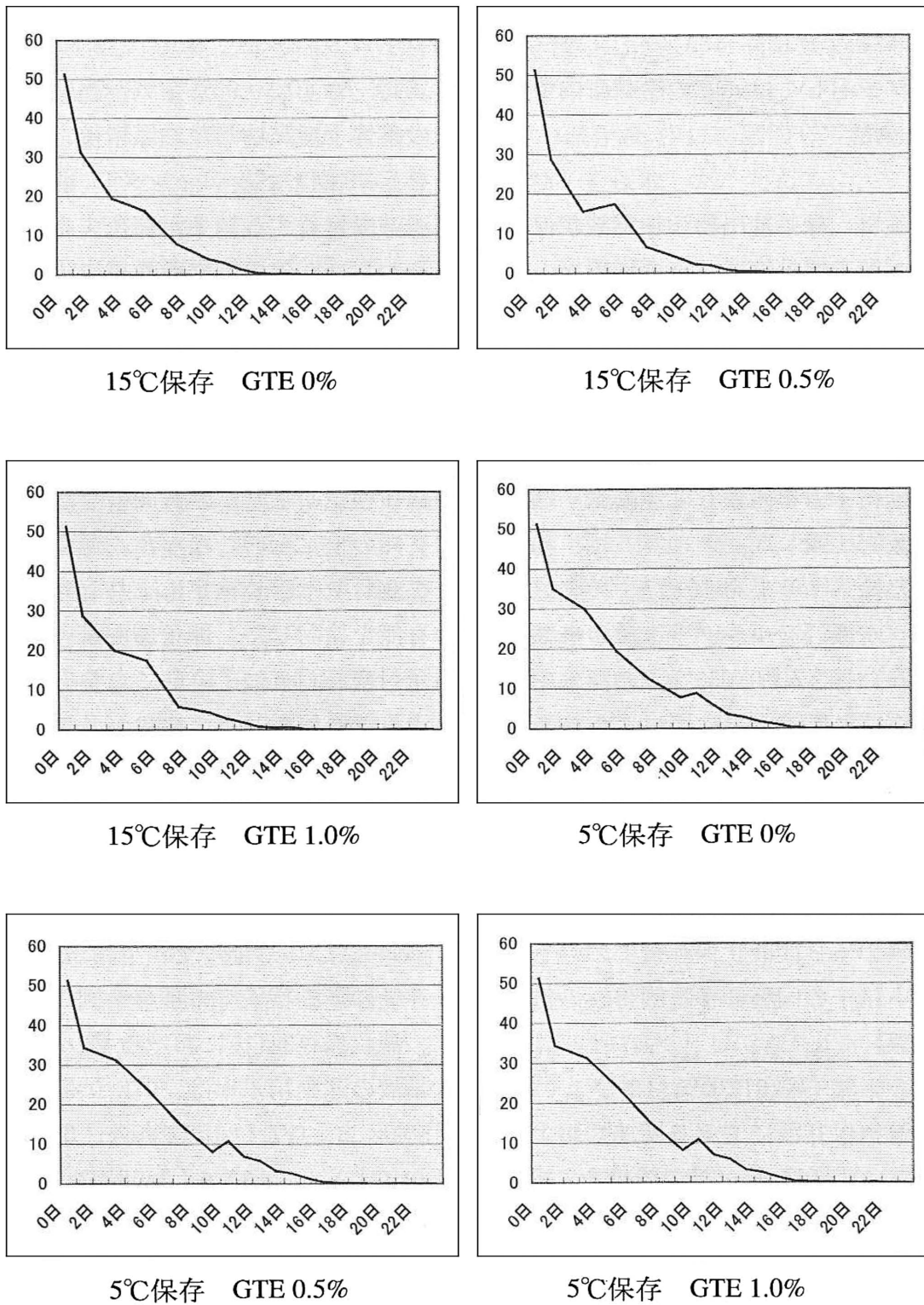


図 1 : GTE 添加保存液による 5°Cおよび 15°Cでのラット液状保存精子の運動精子

保存5日後における運動精子率は、5℃では GTE 0%区、0.5%区および1.0%区で、各々 $19.4 \pm 2.7\%$ 、 $21.9 \pm 3.5\%$ 、および $23.8 \pm 2.6\%$ 、15℃では $16.3 \pm 2.1\%$ 、 $17.5 \pm 1.6\%$ および $17.5 \pm 1.3\%$ であった。また、平均運

動精子存在日数は、GTE 0%区、0.5%区および1.0%区において各々、5℃で17.1日、18.4日および19.0日、15℃では、12.8日、13.1日および14.6日であった。保存後の運動精子率は、保存3日目において15℃でGTE 1.0%区が

表1：GTE 添加保存液による5℃および15℃でのラット液状保存精子の保存後3日目および5日目の運動精子率

保存温度	保存液 GTE 濃度	運動精子率	
		保存 3 日	保存 5 日
5℃	GTE 0%	$30.0 \pm 2.7\%^a$	$19.4 \pm 2.7\%^e$
	GTE 0.5%	$30.6 \pm 3.6\%^a$	$21.9 \pm 3.5\%$
	GTE 1.0%	$31.3 \pm 3.0\%^a$	$23.8 \pm 2.6\%^f$
15℃	GTE 0%	$19.4 \pm 2.2\%^b$	$16.3 \pm 2.1\%$
	GTE 0.5%	$15.7 \pm 2.0\%^{bc}$	$17.5 \pm 1.6\%$
	GTE 1.0%	$20.0 \pm 2.8\%^{bd}$	$17.5 \pm 1.3\%^g$

a vs b, c vs d, e vs f, f vs g: $P < 0.05$

0.5%区より有意に ($P < 0.05$) 運動精子率が高く、GTE 0%区、0.5%区および1.0%区のすべての試験区で、保存温度5℃が15℃に比べ有意に ($P < 0.05$) 運動精子率が高かった。また、保存5日目の運動精子率では、保存温度5℃においてGTE 1.0%区が0%区より有意に ($P < 0.05$) が高く、GTE 1.0%区において、5℃が15℃に比べ有意に ($P < 0.05$) 高かった (表1)。

運動精子存在日数では、5℃においてGTE添加濃度1.0%区が0%区と比べ有意に ($P < 0.05$) その延長が認められた。さらに、GTE 0%区、0.5%区および1.0%区のすべての試験区で、保存温度5℃が15℃より有意に ($P < 0.05$) 運動精子存在日数が延長した。

(実験2：5日間液状保存精子の卵子透明帯付着試験)

液状保存5日後におけるラット液状

ラット精子の液状保存

精子の同種卵子透明帯への付着試験の成績を表2に示す。精子の透明帯付着率は、5℃保存において、GTE 0%区および1.0%区でそれぞれ、11.6% (5/43)、6.5% (3/46)、15℃保存においては、13.0% (6/46)、2.0% (1/50)

で、保存温度の間に有意な差は認められなかった。しかし、15℃保存においてGTE 0%区に比べ1.0%区の精子付着卵子率が有意に ($P<0.05$) 低下した。

表 2: GTE 0%および 1.0%添加保存液により 5 日間保存したラット精子の同種卵子透明帯への付着試験

保存温度	保存液 GTE 濃度	卵子透明帯精子付着率
		(保存 5 日目)
5℃	GTE 0%	11.6% (5/43)
	GTE 1.0%	6.5% (3/46)
15℃	GTE 0%	13.0% (6/46) ^a
	GTE 1.0%	2.0% (1/50) ^b

a vs b: $P<0.05$

考察

本研究において、ラット精巣上体精子を 3%スキムミルク、4%グルコース溶液にて 5℃および 15℃で液状保存することにより、運動精子率を 5℃で 30%以上 15℃においても 15.0%以上を 3 日間維持させることが可能であった。また、5℃保存においては、運動精子が 17 から 19 日間存在することが確認された。この際に、液状保存液への GTE 1.0%の添加が運動精子存在日数を延長させる効果が認められた。また、ラット精

子液状保存においてその保存温度は 5℃が 15℃よりも運動精子存在日数が長いことが明らかになった。この GTE 添加が運動精子の存在日数を延長させる効果については、その機序は不明であるが、GTE にはカテキンが多く含まれることから、その抗酸化作用等が精子の運動性の維持に影響したのかもしれない。ブタ精子の液状保存においても保存液への抗酸化作用のある hypotaurine を添加することにより、酸化に対して保存精子の運動性を改善させることが報告されている (11)。ラット精子に対するこの GTE の効果につい

ては、さらなる研究が要求される。

これまでにラット液状保存精子については、尾川と鈴木 (12) によりその保存液が検討されており、ラット肝臓もしくは脳の homogenate diluent をもちいて 5℃で保存すると、各々、最長 11 日もしくは 8 日間、運動精子が認められている。さらに、これらの保存液をもちいて 0℃付近にて保存すると、その日数はさらに長くなり、各々、最長 24 日もしくは 16 日間であったことが報告されている (12)。マウスでは、精巣上体そのものを 5℃で 8 日間保存し、IVF により受精が確認され、また、2 日間保存した精巣上体からの精子による IVF-ET により、マウスが作製されている (13)。

家畜においては現在でも、人工授精技術を広範に応用するために、ウシ

(14) やブタ (15) の液状保存精液が利用されている。これらの液状保存精液の利用可能な保存期間は、5 日間前後である。すなわち、5 日間前後の液状 (低温) 保存後の精子は受精能を保持しているということである。本研究のラット液状保存精子については、その受精能については検討されていないが、5 日間保存された精子が同種卵

子透明帯に付着する能力を有していることが明らかになった。

結論として、ラット精巣上体精子を 3% スキムミルク、4% グルコース溶液にて 5℃および 15℃で液状保存することにより、運動精子率を 5℃で 20% 前後、15℃で 15.0% 前後、5 日間維持させることが可能で、保存精子は同種卵子透明帯への付着能力も維持している。また、ラット精子液状保存においてその保存温度が 15℃より 5℃の方が精子運動性を長く維持させ、5℃保存において保存液に GTE を 1.0% 添加することにより運動精子存在日数が延長することが明らかになった。

文献

1. Fuse, M. T., Yokoi, N., Shinohara, M., Tsujii, H., Kanazawa, M., Kanazawa, Y., Kameda, K. and Taniguchi K.: Genetic analysis for diabetes in a new rat model of nonobese type 2 diabetes, Spontaneously Diabetic Torii rat. *Biochemical and Biophysical Research* 304, 196-206, 2003.
2. Richter, A., Ebert, U., Nobrega, N., Vallbacka, J. J., Fedrowitz, M. and Locher, W.: Immunohistochemical and neurochemical studies on nigral and striatal functions in the circling (ci) rat, a genetic animal model with spontaneous rotational behavior. *Neuroscience* 89, 461-471, 1999.
3. Takahashi, M., Hakamata, Y., Murakami, T., Takeda, S., Kaneko, T., Takeuchi, K., Takahashi, R., Ueda, M. and Kobayashi, E.: Establishment of lacZ-transgenic rats: a tool for regenerative research in myocardium. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 305, 904-908, 2003.
4. Cheng, Z. J., Finckenberg, P., Louhelainen, M., Merasto, S., Tikkanen, I., Vapaatalo, H. and Mervaala, E. M. A.: Cardiovascular and renal effects of cyclooxygenase inhibition in transgenic rats harboring mouse renin-2 gene (TGR[mREN2]27). *European J. Pharmacology* 461, 159-169, 2003.
5. Higuchi, M., Ishizu, A., Ikeda, H., Hayase, H., Fugo, K., Tsuji, M., Abe, A., Sugaya, T., Suzuki, A., Takahashi, T., Koike, T. and Yoshiki, T.: Functional alteration of peripheral CD25+CD4+immunoregulatory T cells in a transgenic rat model of autoimmune diseases. *J. Autoimmunity* 20, 43-49, 2003.
6. Satake, N., Miyagawa, M., Sakurai, J., Mitani, H., Kobayashi, T., Tamura, H. and Hino, O.: *N*-Ethyl-*N*-hydroxyethylnitrosamine (EHEN)-induced renal and hepatocarcinogenesis in the tumor suppressor *Tsc2* transgenic rat. *Cancer Letters* 184, 157-163, 2002.
7. Hakamata, Y., Tahara, K., Uchida, H., Sakuma, Y., Nakamura, M., Kume, A., Murakami, T., Takahashi, R., Hirabayashi, M., Ueda, M., Miyoshi, I., Kasai, N. and Kobayashi, E.: Green Fluorescent Protein-Transgenic Rat: A Tool for Organ Transplantation Research. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 286, 779-785, 2001.
8. Zan, Y., Haag, J. D., Chen, K. S., Shepel, L. A., Wigington, D., Wang, Y. R., Hu, R., Lopez-Guajardo, C. C., Brose, H. L., Porter, K. I., Leonard, R. A., Hitt, A. A.,

- Schommer, S. L., Elegbede, A. F. and Gould, M. N.: Production of knockout rats using ENU mutagenesis and a yeast-based screening assay. *Nat Biotechnol.* 21, 645-51, 2003.
9. 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.
10. Toyoda, Y. and Chang, M. C.: Fertilization of rat eggs *in vitro* by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer. *J. Reprod and Fertil* 36, 9-22, 1974.
11. 中務 胞, 柏崎 直巳, 紫野 正雄: 硫酸鉄とアスコルビン酸によって脂質が過酸化誘起されたブタ精子の 15C 液状保存後の精子生存指数. *日本養豚学会誌* 37, 16-22, 2000.
12. 尾川 昭三, 鈴木 善祐: ラット人工授精に関する研究 II. 精液保存特に臓器 homogenate 保存液について. *家畜繁殖誌* 2, 55-58, 1956.
13. Sankai, T., Tsuchiya, H. and Ogonuki. N.: Short-Term Nonfrozen Storage of Mouse Epididymal Spermatozoa.: *Theriogenology* 55, 1759-1768, 2001.
14. Vishwanath, R. and Shannon, P.: Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim Reprod Sci* 62, 23-53, 2000.
15. Johnson, L. A., Weitze, K. F., Fiser, P. and Maxwell, W. M. C.: Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci* 62, 143-172, 2000.