

マストミス精子の凍結保存法の検討
Development of a method for cryopreservation of
mastomys spermatozoa

向井一真¹、平田淳也^{1,2}、増田圭基¹、小浦美奈子³、
鈴木 治³、高野 薫³、野口洋子³、山本美江³、
松田潤一郎³、太田昭彦¹

Kazuma Mukai¹, Junya Hirata^{1,2}, Keiki Masuda¹,
Minako Koura³, Osamu Suzuki³, Kaoru Takano³, Yoko Noguchi³,
Yoshie Yamamoto³, Junichiro Matsuda³, Akihiko Ohta¹

¹ 明治大学農学部

214-8571 神奈川県川崎市多摩区東三田 1-1-1

² 現・名古屋大学

³ 国立感染症研究所・獣医科学部

¹ School of Agriculture, Meiji University, 1-1-1 Higashimita, Tama-ku,
Kawasaki 214-0033, Japan

² Present: Nagoya University

³ Department of Veterinary Science, National Institute of Infectious Diseases

Mastomys (*Mastomys coucha*) is a rodent which has been used as an laboratory animal in biomedical researches such as oncology, parasitology and epidemiology. In this study, we attempted to develop a suitable method for the cryopreservation of mastomys sperm. Four sugars (sucrose, lactose, trehalose and raffinose), egg yolk and surface-active agents (Equex Stem, SDS) were examined as cryoprotectants for the mastomys sperm cryopreservation. Spermatozoa from cauda epididymides of mastomys were transferred into different cryoprotectants containing solutions and the sperm suspension was loaded into plastic straw and frozen in LN₂ vapor for 5 mins before being plunged into LN₂. The frozen sperm suspension was thawed in 37°C water and was diluted with incubation media at 37°C to evaluate sperm motility. When the spermatozoa frozen in the solution of various

concentration of cryoprotectants alone or combined, the highest sperm motility (20%) after freezing/thawing was obtained using the solution containing 18% raffinose, 25% egg yolk, 0.7% Equex Stem. Fertilizability of the frozen/thawed mastomys spermatozoa is under investigation.

Key Words: マストミス、精子、凍結保存、精子運動率

緒言

アフリカ原産のマストミスは、マウスやラットと同類の齧歯目ネズミ科に属する動物である。この動物は、1940年代に実験動物化されてから¹⁾、腫瘍学や寄生虫学、疫学といった様々な研究分野で用いられてきた。また、マストミスは多くの近交系が確立されているほか、毛色変異などの遺伝的多様性が認められるため、遺伝資源としても興味深い。現在、我々は数系統のマストミスを維持しており、繁殖生物学的応用を目指した研究を行っている。

実験動物の系統維持や供給体制の確立、繁殖学的見地などから配偶子の凍結保存は大変重要なことである。中でも、精子の凍結保存は1匹の雄から大量の精子サンプルを採取することが可能で、様々な手法により多数の卵母細胞と受精させることができるという利点を有している。さらに、配偶子の状態で凍結することは、それらの組み合わせ次第で遺伝的多様性をもたせることを可能とし、接合体の凍結保存に比べて優れている。

今回、マストミスの実験動物としての有用性向上および系統維持を目的として、精子凍結保存法開発の検討を行ったので報告する。

材料および方法

供試動物

供試動物には、国立感染症研究所で飼育、継代されているMCC（シャモア色）、MST（野生色）、RI-7（シャモア色）の近交系3系統の4～8ヶ月齢成熟雄マストミスを用いた。飼育室は $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ に維持し、明期14時間、暗期10時間（5:00時点灯）とした。飼料（CMF, γ 線照射飼料、オリエンタル酵母工業）と水は自由摂取させた。

精子採取

成熟雄マストミスを頸椎脱臼により安楽死させた後、精巢上体尾部を摘出した。精巢上体尾部は眼科用バサミを用いて切開し、切開部から精子を排出した。25Gの注射針で精子塊を掬い取り、35mmプラスチックディッシュ

(FALCON) に用意した凍結保存液 50 μ l に室温で浮遊させた (精子濃度 $1-3 \times 10^7/\text{ml}$)。

精子の凍結

凍結保存液に精子を 2 分浮遊させた後、その精子懸濁液 20~30 μ l を 0.25ml プラスティックストローに封入した。ストローを液体窒素気相下で 5 分間保持して予備凍結を行い、液体窒素に投入した。凍結ストローは液体窒素中に 24 時間以上保存し、融解実験に用いた。

精子の融解

凍結精子の融解は、凍結ストローを 37°C の温水中に 10 秒維持することで行った。融解した精子ストローの精子懸濁液を 35mm プラスティックディッシュに回収し、精子懸濁液 1 μ l を 200 μ l の精子培養メディウムに添加した (精子濃度 $0.5-1.5 \times 10^5$)。凍結-融解精子は、37°C の温度条件下で培養した。

精子の運動率

精子運動率の判定は、1 サンプルあたり総数 300 以上の精子をカウントし、頭部運動を示す精子を運動精子として算出した。

実験 1: 耐凍保護剤としての糖の種類と濃度選択

凍結保存液として、スクロース水溶液、ラクトース水溶液、トレハロース水溶液 (それぞれ最終濃度 3, 6, 12, 24% w/v)、ラフィノース水溶液 (最終濃度 2.25, 4.5, 9, 18% w/v) を用い、糖の種類と濃度差に対する凍結-融解精子の運動率変化を検討した。凍結-融解精子は、M16 メディウムを用いて、37°C、5% CO₂ の大気下で培養した。

実験 2: 凍結保存液への卵黄と界面活性剤添加の影響

凍結保存液は、18% (w/v) ラフィノース水溶液をベースに、さらに卵黄 {最終濃度: 25% (v/v)} と界面活性剤 {SDS (0-4%), Equex Stem (宮崎化学薬品, 0-2.8%)} を添加して、凍結-融解精子の運動率の変化を調べた。凍結-融解精子は、予備実験において最も成績の良かった Whittingham メディウム を改変した rAIM (Table.1) を用いて、37°C、大気相下で培養した。

統計解析

凍結-融解精子運動率の経時的変化は、精子運動率に角度変換を施した値で Scheffe あるいは Fisher の PLSD による post-hoc test を用いて有意性を検討した。その他の条件は、観察時間ごとに Student's *t*-test によって有意性を判定した。

Table.1 Composition of a medium for rat artificial insemination (rAIM)

	mM
NaCl	114.0
KCl	2.70
HEPES (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	20.0
C ₆ H ₁₂ O ₆	5.50
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	0.36
Sodium pyruvate	0.10
Streptomycin sulfate	0.1 mg/ml
Penicillin G potassium	100 unit/ml
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.49
NaHCO ₃	25.0
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1.80
BSA	3 mg/ml

結果

実験 1: 耐凍保護剤としての糖の種類と濃度選択

凍結保存液中の糖の種類と濃度が凍結-融解精子の運動率に及ぼす影響を Table.2 に示した。検査した二糖類（スクロース、ラクトース、トレハロース）では、それぞれ 12% (w/v) の濃度で凍結-融解精子運動率が高かった。三糖類（ラフィノース）では、18% (w/v) の濃度で運動精子率が高く、これらは二糖類と比較しても最も成績が良かった。全ての実験群において、前進運動を示す精子は認められなかったが、最も高い運動率を示した 18% (w/v) ラフィノース水溶液を凍結保存液のベースとして

採用した。

実験 2: 凍結保存液への卵黄と界面活性剤添加の影響

凍結保存液中への卵黄 {最終濃度: 25% (v/v)} と界面活性剤 (SDS あるいは Equex Stem) の添加が凍結-融解精子の運動率に及ぼす影響を Table.3 に示した。18% (w/v) ラフィノース水溶液に卵黄のみを添加したとき、精子運動率はほとんど変化しなかった。しかしながら、卵黄と共に界面活性剤の SDS や Equex Stem を添加することで、精子運動率は改善した。SDS は 2.0% (v/v) の濃度で最も高い精子運動率を示し、Equex Stem は 0.7% (v/v) と 1.4% (v/v) の濃度で高い運動率を示した。界面活性剤の濃度に関わらず、融解後 0~60 分の間では各実験群の精子運動率に有意差は認められなかった。しかし、融解後 90 分以降では 0.7% (v/v) Equex Stem 添加群の精子運動率が、全濃度の SDS 添加群や 0 および 0.35% (v/v) Equex Stem 添加群の精子運動率に比べて有意に高かった。また、精子の運動性も新鮮精子と同様の前進運動を示した。

Table.2 Effect of Saccharide as a cryoprotectant

Saccharides	Conc. (%, w/v)	Sperm motility (%) after thawing					
		0 min	15 min	30 min	60 min	90 min	120 min
Sucrose	3.0**	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	6.00**	0.1±0.2	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	12.00	0.9±0.7	0.0±0.1	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	24.00**	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Lactose	3.00**	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	6.00*	0.4±0.2	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	12.00	1.8±1.3	0.3±0.3	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	24.00**	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Trehalose	3.00**	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	6.00	1.4±2.3	0.0±0.0	0.1±0.1	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	12.00	3.4±2.1	0.7±0.9	0.2±0.3	0.1±0.1	0.0±0.0	0.0±0.0
	24.00	1.8±1.1	0.2±0.2	0.0±0.1	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Raffinose	2.25**	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	4.50**	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	9.00*	0.3±0.3	0.1±0.1	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	18.00	6.9±2.7	2.2±0.4	0.4±0.8	0.3±0.3	0.0±0.0	0.0±0.0

Means ± S.D. Experiments were replicated three times.

* P<0.05, ** P<0.01 (vs 18.00% raffinose solution)

考察

マウスなど齧歯類の精子凍結保存液には耐凍保護剤として糖類が広く用いられている^{2,3)}。今回、耐凍保護剤としての糖類およびその濃度の検討を行った結果、検討した糖類の中では18%(w/v)ラフィノース水溶液で高い凍結-融解精子の運動率が得られた。精子の凍結保存の成功において、凍結保存液の浸透圧が重要な要因であることが

良く知られており、糖類はその浸透圧調整に関与している。18%(w/v)ラフィノース溶液の浸透圧は約 400Osm/kg に相当し、これは報告されているマウスの精子凍結保存に最適な浸透圧と一致している²⁾。

Table.3 Effect of addition of Egg Yolk and Detergents as a cryoprotectant.

Detergents	Conc. (%,v/v)	Sperm motility (%) after thawing					
		0 min	15 min	30 min	60 min	90 min	120 min
18%(w/v) Raffinose [†]	0.00	6.9±1.9	3.8±2.4	3.2±1.4	4.9±0.9	2.6±1.3	1.8±1.3
SDS	0.00	5.2±6.5	3.6±4.4	4.5±4.9	5.0±4.0	2.3±0.9**	2.9±1.8**
	0.50	9.9±13.7	7.8±9.1	9.8±6.6	9.2±9.1	5.8±2.3**	5.5±2.0**
	1.00	11.8±13.5	6.7±9.0	8.9±6.8	9.0±7.6	5.2±1.0**	4.3±2.4**
	2.00	18.6±3.1	15.7±5.1	17.9±6.6	14.9±6.9	7.7±2.0*	6.4±5.0**
	4.00	10.1±9.1	8.7±9.8	10.1±8.8	7.4±6.7	4.5±3.3**	4.7±4.9**
Equex Stem	0.00	5.7±6.2	4.4±5.6	4.7±6.4	4.4±6.3	4.5±4.1**	5.7±5.5**
	0.35	6.2±3.7	3.5±3.3	7.3±6.4	5.9±4.3	7.3±2.1*	7.2±2.5**
	0.70	13.9±6.8	10.3±7.7	13.2±9.2	14.3±8.1	16.2±5.5	20.2±4.6
	1.40	12.1±2.2	10.0±3.2	15.0±8.2	15.2±5.2	17.0±4.7	19.2±4.2
	2.80	7.1±6.2	9.1±6.3	11.2±6.4	11.0±4.4	13.5±4.8	13.9±5.2

Means±S.D. Experiments were replicated three times for each treatment.

18%(w/v) raffinose + 25%(v/v) Egg Yolk solution used as a cryoprotectant.

[†] 18%(w/v) raffinose solution used as a cryoprotectant

* P<0.05, ** P<0.01 (vs 0.70% Equex Stem group)

マストミス精子の形態学的特徴は、ラット精子とよく似ている。そのため、ラット精子の凍結保存液⁴⁾に用いられている卵黄と界面活性剤の添加によるマストミス凍結-融解精子の運動率への影響を検討した。その結果、18%(w/v) ラフィノース水溶液に卵黄 {最終濃度 : 25%(v/v)} と Equex Stem {最終濃度 : 0.7%(v/v)} を添加した際に、顕著に凍結-融解精子の運動率が改善した。卵黄の添加によって凍結-融解精子の運動率が増加したことは卵黄の精子原形質膜保護作用によるものと考えられる⁴⁾。また、界面活性剤 Equex Stem の精子へ

の直接作用については定かではないが、凍結保存液内での卵黄の懸濁作用を有しており、その結果として卵黄の精子原形質膜保護作用を促進しているものと推定される⁴⁾。

以上のように、マストミス精子では、18%(w/v) ラフィノース、25%(v/v) 卵黄、0.7%(v/v) Equex Stem 水溶液を凍結保存液に用い、液体窒素保存前の予備凍結時間 5 分、融解温度 37℃、融解時間 10 秒の条件で凍結-融解し、37℃、大気相下で rAIM を用いて培養することで、最大 20%の凍結-融解精子運動率と良好な運動性を示す精子を得ることに成功

した。これらの凍結-融解精子は、マス トミスの人工授精や体外受精に使用可能であることが期待される。 現在、この凍結-融解精子の受精能判定の研究を継続中である

文献

1. Davis DHS, Oettlé AG. :The multimamate mouse *Rattus (Mastomys) natalensis* Smith: A laboratory-adapted African wild rodent. *Proc. Zool. Soc. Lond.* 131, 293-299, 1958.
2. An TZ, Iwakiri M, Edashige K, Sakurai T, Kasai M. :Factors affecting the survival of frozen-thawed mouse spermatozoa. *Cryobiology*. 40, 237-249, 2000.
3. Sztein JM, Noble K, Farley JS, Mobraaten LE. :Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*. 41, 28-39, 2001.
4. Nakatsukasa E, Inomata T, Ikeda T, Shino M, Kashiwazaki N. Generation of live rat offspring by intrauterine insemination with epididymal spermatozoa cryopreserved at -196°C . *Reproduction*. 122, 463-467, 2001.