

## Wistar系ラット精巢上体尾部精子を用いた冷蔵保存方法の検討

伊藤 慧<sup>1</sup>、岸 昌生<sup>2</sup>、西村 愛美<sup>1</sup>、中川 隆生<sup>3</sup>、  
永井 匡<sup>4</sup>、栗田 佳織<sup>1</sup>、入谷 明<sup>5</sup>、安齋 政幸<sup>5</sup>

### 要 約

本研究では Wistar 系ラットの精巢上体尾部由来精子を用いた冷蔵保存について検討した。ラット精巢上体尾部精子を、各種保存液（R18S3、マルベリーⅢ、それぞれを混合した 1：1 稀釈液、2：1 稀釈液）中で 4℃にて冷蔵保存した。加温後のそれらの運動性は、運動性指数および SQA-V よりにて評価した。運動性指数では 1：1、2：1 稀釈液で 14 日間運動性を保持した。SQA-V では SMI（精子自動性指数）値を用いて評価し、1：1、2：1 稀釈液で 7 日間自動運動性を確認した。精子頭部における膜損傷の有無を LIVE/DEAD Sperm Viability Kit を用いて評価し、2：1 稀釈液において 7 日目の正常膜保持精子率は 40% であった。受精能の確認では、常法により過剰排卵処置を施した幼若雌ラットの卵子を透明帯除去後、冷蔵保存精子と共に受精させた。この結果、7 日間保存した精子にて 1：1 稀釈液では、20%（17/86）、2：1 稀釈液では 30%（36/122）の精子侵入率であった。これらの結果から、Wistar 系ラットの精子冷蔵保存は、低率ではあるが受精能を保持し、冷蔵保存が可能であることが示された。

### 緒 言

精子の保存技術は、Polge によりグリセリンの凍結防止効果が発見されたことで家畜やヒトの精子凍結保存が次々と成功し、発展してきた<sup>1)</sup>。しかし、マウスの精子においてはグリセリンの凍結防止効果があまり認められず<sup>2)</sup>、その後 3 糖類である Raffinose を主成分とした保存液を用いた精子凍結保存の成功例が発表された<sup>2,3,4)</sup>。このような精子の保存方法として現在、液体窒素での超低温下の凍結保存が普及されているが、ラットでの精子凍結保存技術に関する報告は少なく、ラットの精子は他の種の精子よりも遠心分離や、浸透圧、pH などの生理学的、物理的ストレスに過敏であり<sup>5,6)</sup>、凍結保存操作およびその後の体外受精などによる受精卵作製には技術の習熟に時間を要し、凍結保存操作についてはさらに実用化に向けた技術改良が必要と考えられる<sup>5)</sup>。一方、精子の冷蔵保存または液状保存の研究は、ブタ<sup>7,8)</sup>をはじめ、ヒツジ<sup>9)</sup>、ウシ<sup>10)</sup>、ヤギ<sup>11)</sup>などの種で行われている。冷蔵保存精液の利用は、家畜種の中で唯一凍結能が低く、4℃でも傷害を受け易いブタにおいて実用化されている。欧米各国では、人工授精用の精液の保存・輸送は主として 15℃で実施され、ブタ精液稀釈液は様々な稀釈液が販売されるに至っている。<sup>12,13)</sup>。そこで本研究ではラット精子を凍結保存と比べて操作が簡易な冷蔵保存で行い、その後の生存性における各保存溶液の効果を検討した。

1. 近畿大学生物理工学部 遺伝子工学科 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

2. 近畿大学生石農場 〒643-0531 和歌山県有田郡有田川町楠本 1643-21

3. (株) 紀和実験動物研究所 〒640-1473 和歌山県海草郡紀美野町毛原宮 486

4. (株) 日本医化器械製作所 〒550-0002 大阪府大阪市西区江戸堀 1-22-38

5. 近畿大学先端技術総合研究所 〒642-0017 和歌山県海南市南赤坂 14-1

## 材料および方法

### (1) 供試動物

本実験に用いた系統として WistarHannover/Rcc (日本エスエルシー (株))、9～10 週齢に達した成熟雄を精子の冷蔵保存に供試した。また、それらの受精能の確認には 3～4 週齢の同系統ラットを供試した。なお、実験の立案および動物の飼養については、近畿大学動物実験規定に準じて行った。

### (2) 冷蔵稀釈液の調整

冷蔵稀釈液の作製には、マウス精子凍結保存に用いられている R18S3 (アーク・リソース(株)) およびブタ液状精液の低温保存に用いられるマルベリーⅢ (富士農場) を基本液とした。この各保存液それぞれ同量を混合した稀釈液 (以下、1:1 稀釈液)、R18S3 とマルベリーⅢを 2:1 に混合した稀釈液 (以下、2:1 稀釈液) を冷蔵保存操作に用いた。なお、それぞれの稀釈液は、使用直前に保存操作ウェル (Nunc: 176740) 内で混合し使用した。また、各稀釈液における浸透圧測定は、(株)日本医化器械製作所に委託し、浸透圧計 (ARKRAY: M-6040) を用いて測定を行ったところ、R18S3 では 507.0mOsm、マルベリーⅢでは 327.7mOsm、1:1 稀釈液では、407.7mOsm、2:1 稀釈液では、431.7mOsm であった。さらに、作成した稀釈液の pH はそれぞれ 6.7、7.1、6.9、6.8 であった (表 1)。

表 1 : 各冷蔵保存稀釈液の浸透圧および pH 測定成績

サンプル	浸透圧 (mOsm)	pH
R18S3	507.0	6.7
マルベリーⅢ	327.7	7.1
1:1 稀釈液	407.7	6.9
2:1 稀釈液	431.7	6.8
m-HTF	305.3	7.9

### (3) 精子の採取と冷蔵保存操作

WistarHannover/Rcc 雄ラットから摘出した精巣上体尾部を濾紙上で血液や体液を除去した。続いて、4well ディッシュの各ウェルにそれぞれの稀釈液を 1 mL 入れ、摘出した精巣上体尾部組織を細切することで、精子を懸濁させた。この各精子懸濁液を凍結チューブ (住友ベークライト(株): MS-4501G) へ全量移し、15℃にて 1 時間予備冷蔵を行った後、4℃下にて最長 14 日間冷蔵保存を行い運動能の評価を検討した。

### (4) 精子運動性評価

運動性の評価は、精液性状検査板を用いて運動性指数<sup>14)</sup>を評価し、さらに SQA-V 精子特性分析機 (株) ジャフコ、以下、SQA) による精子自動性指数 (以下、SMI 値) で評価した。いずれの評価に供する冷蔵精子懸濁液は、凍結チューブ内から 10  $\mu$ L 採取し、mHTF 培地<sup>15)</sup>へ添加した後、1.5 時間培養した。培養後、精液性状検査板へ精子を含む培地中から 10  $\mu$ L 滴下し、カバーガラスを被せて観察した。一方、SQA での SMI 値の評価も同様に培養し、精子を含む培地中から 20  $\mu$ L を専用のチャンバーに吸引し評価した。

### (5) 精子細胞膜の完全性の評価

精子細胞膜の完全性の評価は、LIVE/DEAD Sperm Viability Kit<sup>5, 16)</sup>を用いた。まず遮光チューブ内にて30倍希釈SYBR14溶液に各保存精子サンプルを100  $\mu$ L添加した後、37°Cにて10～15分インキュベートした。インキュベート後、Propidium Iodate solutionを5  $\mu$ L添加し、再び10～15分インキュベートした。その後、精子サンプルを共焦点蛍光顕微鏡 (Leica:DMI6000B)にて膜の完全性について評価した。

### (6) ラット透明帯除去卵子との体外受精による受精能の検定

体外受精操作は、Toyodaらの方法を若干修正した<sup>17)</sup>。即ち、幼若雌ラット腹腔内へ30単位のPMSG (妊馬血清性腺刺激ホルモン:三共ライフテック株)を腹腔内投与し48時間後に30単位のhCG (ヒト絨毛性腺刺激ホルモン:あすか製薬株)を腹腔内投与することで得られた過剰排卵卵子を0.1%ヒアルロニダーゼ溶液下にて卵丘細胞を除去した。次に酸性タイロード溶液にて透明帯を除去後、前培養を行った精子懸濁液を含むmHTF培地に導入した。受精後6時間以降に卵子の洗浄を行い、mR1ECM胚培養培地<sup>18)</sup>に移し、雌雄両前核を確認後、引き続き37°C、5%炭酸ガスインキュベーター内にて培養した。

## 結 果

Wistarラット精巣上体尾部由来精子に各精子希釈液を用いて最長14日間まで冷蔵保存を行い、その後の精子運動性指数を図1に示した。いずれの希釈保存液においても冷蔵1日目で運動性指数は低下し、マルベリーⅢにおいてそれが顕著にみられた。R18S3では冷蔵3日目まで比較的良好な運動性を示し、6日目まで運動性を保持した。マルベリーⅢでは、低い運動性ではあるが冷蔵8日目まで運動性を保持した。1:1希釈液、2:1希釈液では冷蔵10日目まで運動性を保持し、それら希釈液は、僅かではあるが最長14日間運動性を保持していた。

図2には、各種冷蔵保存精子におけるSQAを用いた自動性指数評価成績を示した。R18S3およびマルベリーⅢではSMI値が冷蔵5日以内において低値を示したが、混合希釈液においては、それら単一の基本液よりSMI値が高値を示すことが確認され、僅かではあるが1:1希釈液では最長7日間の運動性を保持した。

各種冷蔵保存液が保存日数における精子細胞膜への損傷にあたえる影響を図3に示した。いずれの基本液あるいは希釈液共に冷蔵7日目まで正常な精子細胞膜を有していることが示され、さらにR18S3とマルベリーⅢを混合した希釈液を用いることで、より安定的に精子細胞膜の正常性が保持されていることが確認された。

図4には、透明帯除去卵子を用いた各種冷蔵保存精子との体外受精による受精能評価成績を示した。精子運動性指数および精子自動性指数評価において良好な成績を示したR18S3, 1:1希釈液および2:1希釈液におけるそれらの受精率は、冷蔵1日目で100% (43/43)、26% (12/46)そして96% (74/77)であった。さらに、これらの基本液および希釈液は冷蔵7日目まで精子侵入を認めた〔4% (4/110), 20% (17/86), 30% (36/122)〕。

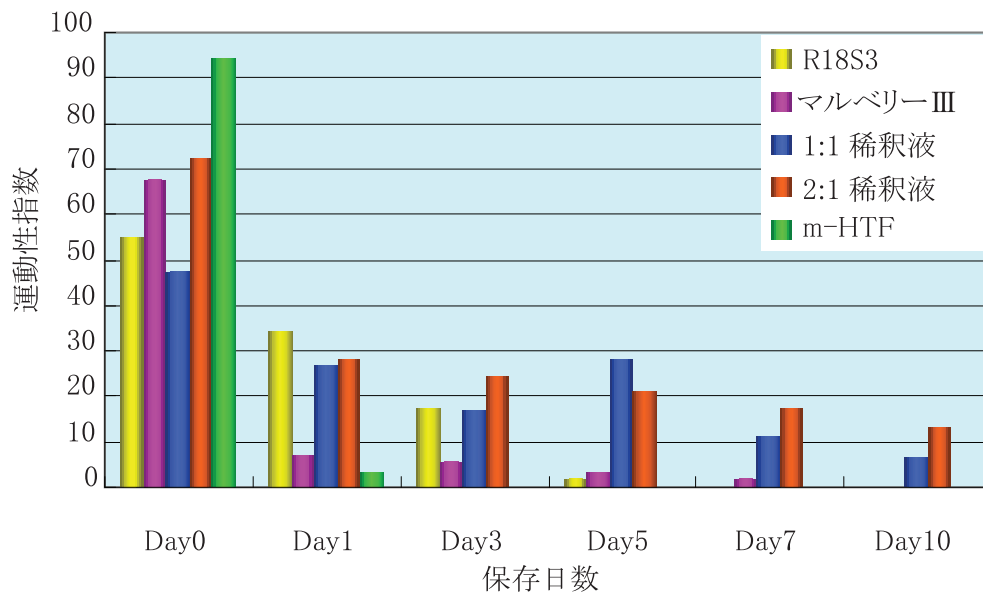


図 1 : 精液性状検査板による各種冷蔵保存精子の運動性指数評価

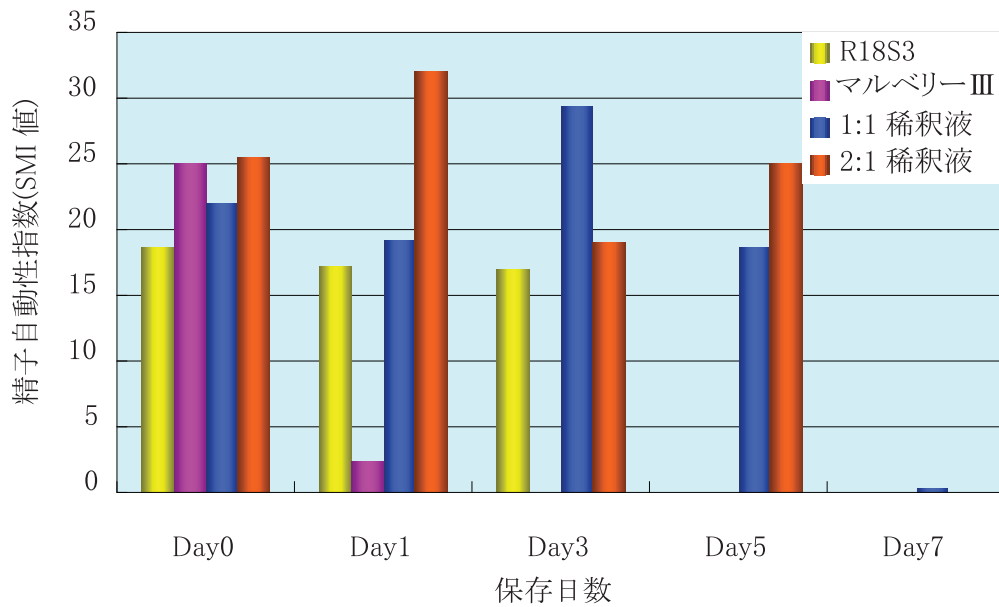


図 2 : SQA-V 装置による各種冷蔵精子の精子自動性指数評価

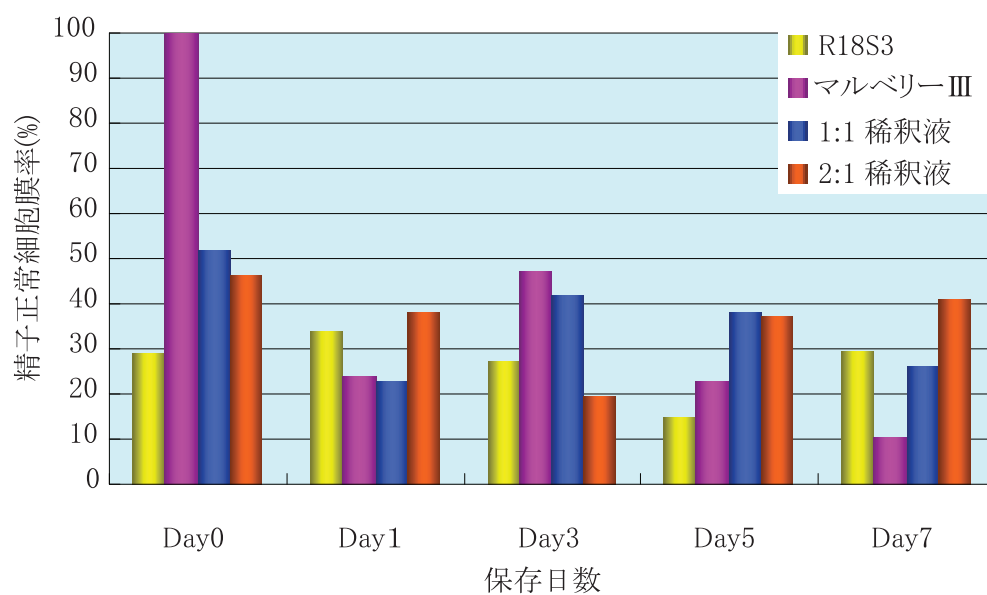


図 3 : LIVE/DEAD Sperm Viability Kit による精子細胞膜正常性評価

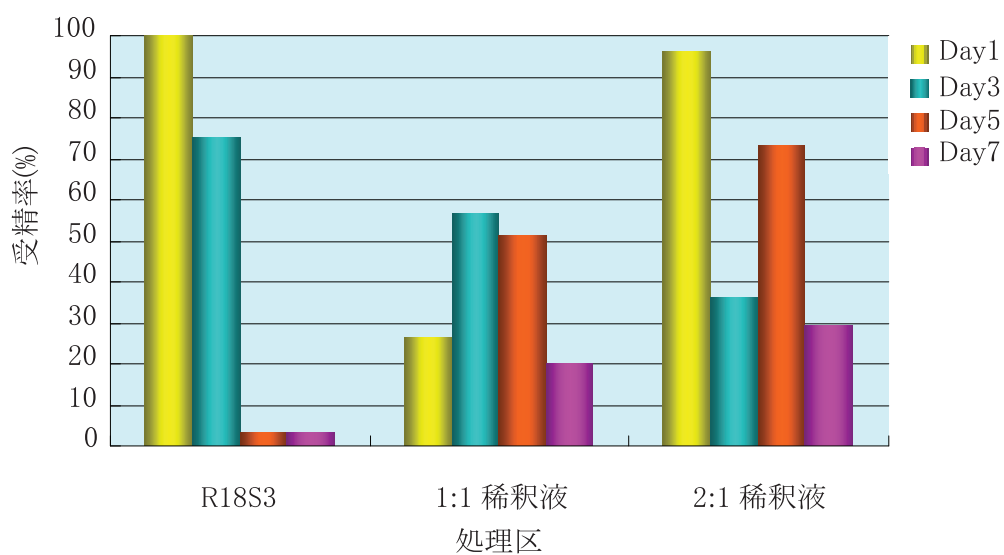


図 4 : 各種冷蔵精子を用いた保存日数による体外受精評価

## 考 察

哺乳類の精子の運動は、精子基部に存在するミトコンドリアでの好気呼吸と解糖によって ATP を生成し、それを供給することで鞭毛の運動性を得ている。Fuller S.J. らは、4℃への冷却がマウス精子に与える影響について検討したところ、4℃下マウス精子は約 30% の運動性の減少がみられた<sup>19)</sup>。Yamashiro らは、ラット精子凍結保存にて mKRB 卵黄稀釈液にピルビン酸、ラクトース、グルコースを含む保存液下での凍結操作は、ATP 合成能力を通して得られ、それは精子の代謝において影響力を持ち、凍結障害に大きな耐久性を保持した<sup>20)</sup>。さらに、各種糖類を含む精子凍結操作は、ラフィノースを含む保存液で最も良い結果が得られ、ラフィノースが精子表面に付着し、冷却の間精子へのエネルギー供給と細胞膜の保護を有していた<sup>20)</sup>。今回、精子運動性の評価を運動性指数および SMI 値にて検討したところ、いずれも、基本液 (R18S3、マルベリーⅢ) 単一では、同様の保存期間で低値を示す傾向が認められたものの、それらを用いた混合稀釈液においては、運動性を比較的長期間保持する傾向が示された。さらにラット精子運動能解析ソフト Rat Toxicology を用いて (ニッコー・ハンセン(株): HTM-TOX IVOS)、同様に各冷蔵精子が保存日数におよぼす影響を、精子総合運動性および精子前進運動性について評価した結果、混合稀釈液では単一保存基本液と比較し、いずれの評価においても運動性を長期に保持していた (未発表)。これは、単一保存基本液に含まれるグルコースあるいはラフィノースが精子細胞の代謝に係るエネルギー源となり、さらにラフィノースは精子細胞膜の保護の役割も担うことで運動性の低下を抑制したと考えられた。

Nishizono らは、マウスの精子凍結保存において融解後に受精能に系統差を生じる C57BL/6 系での形態学的検査を行った結果、凍害作用による頭部に著しい損傷を認めた<sup>21)</sup>。ラット凍結精子は物理的ストレスに敏感であり、Nakatsukasa らは、遠心処理による物理的ストレスを与え、細胞膜の損傷を確認している<sup>5)</sup>。一方、マウス精子において 4℃への冷却は細胞膜およびアクロゾームの著しい損傷は認められなかった<sup>19)</sup>。Varisli らも冷蔵におけるアクロゾームの損傷を観察しているが、単純に冷蔵における損傷は観察されなかった<sup>22)</sup>。これらのことから、本実験における冷蔵精子は、その後の長期保存において、保存液単一では細胞膜損傷の増加を示し、混合稀釈液を用いることにより低減されると思われた。

各種冷蔵保存精子を用いた透明帯除去卵子との体外受精による受精能の検討において、冷蔵 5 日目以降に R18S3 で保存した精子より、混合稀釈液で保存した精子の侵入率が高い割合を示し、受精能を保持していることが示された。マウスにおいて 4℃への冷却は細胞膜での受精獲得様の変化が起こることが報告されている<sup>19)</sup>。本実験では安定的に精子運動性を保持していた 1:1 稀釈液および 2:1 稀釈液は、精子細胞膜の正常性においても長期保存の効果が R18S3 と比較して良好であり、この細胞膜正常性がその後の長期保存において、受精能獲得や卵子細胞膜融合後における核膜崩壊と前核形成を可能にしたと考えられる。

ラット精子の凍結保存あるいは冷蔵保存については未だ確立された技術がなく、さらなる改良が必要である。今回、ブタ精液稀釈液とマウス精子凍結保存液を混合することで精子運動性の保持が可能であることを示した。近年、マウスにおいては、初期胚の凍結保存に代わる方法として冷蔵保存技術による短期保存および冷蔵輸送を可能にした<sup>23)</sup>。また、精子においても冷蔵保存技術が精力的に研究されつつある<sup>24)</sup>。本研究におけるラット精子の冷蔵保存技術の構築は、今後、生殖細胞の短期保存系およびバイオリソースとしての簡易輸送化において有用な技術を提供できることが示唆された。

## 謝 辞

本研究を進めるにあたり、数々の御協力と御助言を頂いた、日本エスエルシー株式会社 竹中 慎氏、京都大学医学研究科動物実験施設 滝澤明子博士、株式会社ジャフコ 森田浩史氏、ニッコー・ハンセン株式会社 冨田憲太郎氏、アーク・リソース株式会社 柳 美穂氏、川辺敏晃氏に心より感謝申し上げます。

## 参 考 文 献

1. Polge C. (1952) Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at 79 degrees C. *Nature*. 69; 626-7.
2. Tada N, Sato M, Yamanoi J, Mizorogi T, Kasai K, and Ogawa S. (1990) Cryopreservation of mouse spermatozoa in the presence of raffinose and glycerol. *J.Reprod.Fert.* 89; 511-516.
3. 奥山 学、磯貝滋樹、佐賀正彦、浜田 宏、尾川昭三. (1990) マウス凍結精子の体外受精及び人工授精試験. *日本受精着床学会雑誌*. 7; 116-119.
4. Yokoyama M, Akiba H, Katsuki M, and Nomura T. (1990) Production of Normal Young Following Transfer of Mouse Embryos Obtained by in vitro Fertilization Using Cryopreserved Spermatozoa. *Exp. Anim.* 39; 125-128.
5. Nakatsukasa E, Inomata T, Ikeda T, Shino M, Kashiwazaki N. (2001) Generation of live rat offspring by intrauterine insemination with epididymal spermatozoa cryopreserved at 196 °C. *Reproduction*. 122; 63-467.
6. Wei Si, James D. Benson, Hongsheng Men, John K. Critser. (2006) Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on the motility, plasma membrane integrity and acrosomal integrity of rat sperm. *Cryobiology*. 53; 336-348.
7. 山口昇一郎、村上徹哉. (2008) 豚液状精液における簡易冷蔵保存技術. *福岡県農業総合試験場研究報告*. 27; 65-69.
8. Shimatsu Y, Uchida M, Niki R, and Imai H. (2002) Liquid Storage of Miniature Boar Semen. *Exp. Anim.* 51 (2) ; 143-147.
9. S. Salamon, W.M.C. Maxwell. (2000) Storage of ram semen. *Anim. Reprod.Sci.* 62; 77-111.
10. Vishwanath R, Shannon P. (2000) Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim.Reprod. Sci.* 62; 23-53.
11. Xu C.L, Zhou J.B, Zhao B.T, Lan G.C, Luo M.J, Chang Z.L, Sui H.S and Tan J.H. (2009) Liquid Storage of Goat Semen in Chemically Defined Extenders. *Reprod Dom Anim.* 44; 771-778.
12. Vyt P, Maes D, Dejonckheere E, Castryck F, and Van Soom A. (2004) Comparative Study on Five Different Commercial Extenders for Boar Semen. *Reprod Dom Anim.* 39; 8-12.
13. Mark J. Estienne<sup>1</sup>, Allen F. Harper and Jennifer L. Day. (2007) Characteristics of sperm motility in boar semen diluted in different extenders and stored for seven days at 18°C. *Biol.Reprod.* 7; 221-231.
14. 入谷 明、正木淳二、横山 昭 編. (1999) 最新家畜家禽繁殖学 第7版 pp.150.
15. 宮地志織、安齋政幸、古田祐奈、柳 美穂、中島竜之、川辺敏晃、金子武人、中瀨直己. (2008) 各種系統由来ガラス化保存透明帯穿孔卵子を用いた体外受精の検討. *実験動物技術*. 43.1; 25-29.
16. Okuda Y, Seita Y, Hisamatsu S, Sonoki S, Shino M, Masaoka T, Inomata T, Kamijo S, and Kashiwazaki

- N. (2007) Fertility of Spermatozoa Cryopreserved with 2% Asetamide or Glycerol through Artificial Insemination in the Japanese White Rabbit. *Exp. Anim.* 56 (1) ; 29-34.
17. Toyoda Y and Chang M.C. (1974) Fertilization of rat eggs in vitro by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer. *J.Reprod.Fert.* 36; 9-22.
18. Oh S, Miyoshi K, and Funahashi H. (1998) Rat Oocytes Fertilized in Modified Rat 1-Cell Embryo Culture Medium Containing a High Sodium Chloride Concentration and Bovine Serum Albumin Maintain Developmental Ability to the Blastocyst Stage. *Biol.Reprod.* 59; 884-889.
19. Fuller S.J. and Whittingham D.G. (1996) Effect of cooling mouse spermatozoa to 4°C on fertilization and embryonic development. *J.Reprod.Fert.* 108; 139-145.
20. Yamashiro H, Han Y, Sugawara A, Tomioka I, Hoshino Y, Sato E. (2007) Freezability of rat epididymal sperm induced by raffinose in modified Krebs-Ringer bicarbonate (mKRB) based extender solution. *Cryobiology.*55; 285-294.
21. Nishizono H, Shioda M, Tkeo T, Irie T, and Nakagata N. (2004) Decrease of Fertilizing Ability of Mouse Spermatozoa after Freezing and Thawing Is Related to Cellular Injury. *Biol.Reprod.* 71; 973-978.
22. Varisli O, Uguz C, Agca C, and Agca Y. (2009) Effect of Chilling on the Motility and Acrosomal Integrity of Rat Sperm in the Presence of Various Extenders. *J Am Assoc Lob Anim Sci.* 48 (5) ; 499-505.
23. Takeo T, Kaneko T, Haruguchi Y, Fukumoto K, Machida H, Koga M, Nakagawa Y, Takeshita Y, Matsuguma T, Tsuchiyama S, Shimizu N, Hasegawa T, Goto M, Miyachi H, Anzai M, Nakatsukasa E, Nomaru K, Nakagata N. (2009) Birth of mice from vitrified/warmed 2-cell embryos transported at a cold temperature. *Cryobiology.* 58; 196-202.
24. Mochida K, Ohkawa M, Inoue K, Valdez Jr D.M, Kasai M, Ogura A. (2005) Birth of mice after in vitro fertilization using C57BL/6 sperm transported within epididymides at refrigerated temperatures. *Theriogenology.* 64; 135-143.



---

## 英文要旨

### Short term storage of Wistar rat epididymal spermatozoa at cold temperature

Kei Ito<sup>1</sup>, Masao Kishi<sup>2</sup>, Manami Nishimura<sup>1</sup>, Takao Nakagawa<sup>3</sup>,  
Tadashi Nagai<sup>4</sup>, Kaori Kurita<sup>1</sup>, Akira Iritani<sup>5</sup>, Masayuki Anzai<sup>5</sup>

#### Summary

The present study was performed to examine the storage of Wistar rat epididymal sperm at cold temperature. The cauda epididymal spermatozoa from adult males were preserved with various solutions (R18S3, Mulberry III, 1 : 1 extender, 2 : 1 extender) at 4°C. Sperm motility was assessed by a hemocytometer of microscopy and SQA-V system. Sperm motility that sperm stored in 1 : 1 and 2 : 1 extenders were maintained for 14 days in estimation of the motility using hemocytometer and in SQA-V assessment of SMI value were maintained for 7 days. The integrity of the sperm membrane was determined using Live/Dead sperm viability kit. The percentage of membrane-intact spermatozoa that stored in 2 : 1 extender was 40% at day 7. Super ovulated eggs were fertilized in vitro with various sperm after eliminated zona pellucida. Result of the percentage of sperm invasion that sperm stored for 7 days were 20% (17/86) at 1 : 1 extender and 30% (36/122) at 2 : 1 extender. In conclusion were indicate that Wistar rat epididymal spermatozoa stored at 4°C maintain fertilization ability, although low rate, and can store at cold temperature.

---

1. Department of Genetic Engineering, Kinki University, Kinokawa, Wakayama, 649-6493, Japan

2. Oishi farm, Kinki University, Aridagawa-cho, Arida-gun, Wakayama, 643-0531, Japan

3. Kiwa Laboratory Animal Co, Ltd., Kebaramiya, Kimino-cho, Kaisou-gun, Wakayama, 640-1473, Japan

4. Nihon Medical & Chemical Instruments Co, Ltd., Edohori, nishi-ku, Oosaka, 550-0002, Japan

5. Institute of Advanced Technology, Kinki University, Kainan, Wakayama, 642-0017, Japan