

第6回麻布大学 生殖・発生工学セミナー

ラット精巢上体精子の凍結保存方法の開発

中務 胞

株式会社 トランスジェニック

近年、マウスでは突然変異、トランスジェニックおよびノックアウト動物が多くの研究室で作製され、シンプルかつ安価であることから、精子凍結保存により、それら系統の保存に実用化されている(Nakagata N. et al.; 1992)。一方、ラットにおいても突然変異やトランスジェニックなどの系統が増加しており(Festing M.F.W.; 1993, Charreau B. et al.; 1996)、その効率的な系統保存法の確立が急務となっている。従来、ラットの系統保存においては胚の凍結保存が用いられてきた。しかし、トランスジェニック動物の場合、導入された遺伝子が次世代に伝達されればよく、採取法および数の点でも精子の凍結保存が極めて有利であることから、精子の凍結保存確立が望まれてきた。

そこで私達は1999年より、ラット精子の凍結保存に関する研究開発を開始した。始めに、ラット凍結精液保存法の開発を目的にマウス精子凍結用培地R18S3 (Raffinose 18%, Skim milk 3%) (Takeshima T. et al.; 1991) を用いてラット精子の凍結をおこなった。その結果、融解後の精子は若干の運動性を有しているものの、融解30分後には運動性が全て失われていた。ラット凍結精子保存溶液の開発と同時に、ラット精子が遠心分離などの物理的傷害に弱いことを遠心回数と運動精子率ならびに精子細胞膜の正常性を調べることにより明らかにした。そこで、遠心、ピペッティングなどの物理的傷害を精子に与えないように、耐凍性が低いといわれているブタ精子凍結用培地として使用されている卵黄液(23% egg yolk, 8% lactose monohydrate)をTris (Hydroxymethyl) aminomethaneにてpH.7.4に調整し、抗生物質を添加した溶液)を用いてラット精子の凍結を試みた。この

実験により、最終濃度0.7%のEquex Stmを添加した卵黄液がラット精巢上体精子の凍結に適していることを見いだした。そして、この凍結保存溶液を使用し、Jcl:SD (Sprague-Dawley) 精巢上体精子を凍結保存して、1週間以上液体窒素中で保存し、凍結融解後の精子を偽妊娠誘起した雌ラットの子宮内に注入して、複数の産子を得ることに成功した(Nakatsukasa E. et al.; 2001)。しかし、未確定な因子を多く含んでいる卵黄液に変わるラット精子凍結保存用培地の開発は微生物学的側面からも必要である。そこで、マウス精子凍結用培地であるR18S3を改良したR12S3 (Raffinose 12%, Skim milk 3%)にてSDラット精子を凍結し、融解後、偽妊娠誘起した雌ラットの子宮角上部に注入し、産子を得ることに成功した(未発表)。しかしながら、妊娠率53%、分娩率26%および一腹あたりの胎子数は1, 2匹と低いことより、ラット精子凍結用培地の改良には至らなかった。次に、その他系統のラット (Closed colonies [Jcl: Wistar], inbred [BN/Crj, F344/Ducrl, LEW/Crj, Long-Evans and WKY/NCEj], mutant [Zitter and Tremor] および transgenic [human A-transferase and green fluorescent protein]) についても卵黄液を基本とした凍結用培地にて精子を凍結保存し、それらを用いて人工授精をおこない全ての系統で産子を作出することに成功した (Nakatsukasa E. et al.; 2003)。

現在、ラット精子凍結キットの開発を目的とし、長期室温保存可能なラット精子凍結用培地の開発をおこなっている。

本セミナーでは、これまでに得られたラット精子の凍結保存に関するデータを紹介すると同時に、皆

様とラット精子の凍結保存の問題点について討議したい。

文献

- Charreau, B., L. Tesson, J.P. Soulillou, C. Pourcel, and I. Anegon. 1996. Transgenesis in rats: technical aspects and models. *Trans. Res.* 5: 223-234.
- Festing, M.F.W., 1993. *International index of laboratory animals* (6th edition). Lion Litho Ltd., Carshalton, Surrey.
- Nakagata, N. 1996. Use of cryopreservation techniques of embryos and spermatozoa for production of transgenic (Tg) mice and for maintenance of Tg mouse lines. *Lab. Anim. Sci.* 46:236-238.
- Nakatsukasa, E., T. Inomata, T. Ikeda, M. Shino, and N. Kashiwazaki. 2001. Generation of live rat offspring by intrauterine insemination with epididymal spermatozoa cryopreserved at -196°C . *Reprod.* 122: 463-467.
- Nakatsukasa, E., N. Kashiwazaki, A. Takizawa, M. Shino, K. Kitada, T. Serikawa, Y. Hakamata, E. Kobayashi, R. Takahashi, M. Ueda, T. Nakashima, and N. Nakagata. 2003. Cryopreservation of spermatozoa from closed colonies, and inbred, spontaneous mutant, and transgenic strains of rats. *Comparative Med.* 53: 639-641.
- Takeshima T., N. Nakagata, and S. Ogawa. 1991. Cryopreservation of mouse spermatozoa. *Jikken Dobutsu.* 40: 493-497.