

第7回麻布大学 生殖・発生工学セミナー

マウス・ラットの精子および初期胚の新しい保存の試み

尾川 昭三

明治大学名誉教授

家畜やヒトの精子，そして卵子，初期胚の凍結（ガラス化保存を含む超低温）保存法は，改良が進み，広く利用されるに至った。もはや動物精子や初期胚の保存法の開発は新しい研究の対象とならない，と考えられる研究者もいられるかも知れない。しかしながら，受精の場における精子の運動の関与との関連により，また，顕微授精，IVFなどの受精法の開発，そして保存細胞の輸送手段などに対応して，これらの細胞保存法の開発は，今もなお新鮮な研究対象であると考えられる。

2002年から2004年の3回にわたって開催された生殖工学研究会シンポジウムにおいて，動物精子，卵子および初期胚の新しい保存法の開発とその適用について発表がなされ，現時点における新しい方法の統括がなされた。これらのシンポジウムで発表されたもののうち，マウスやラットの精子や初期胚で最近達成された成果について紹介し，それらの適用性について述べる。

1. ラット精子凍結保存の成果：Polgeらのニワトリ（1949）¹⁾ やウシ²⁾ の精子凍結保存成功の発表以来，およそ半世紀の空白を経て，達成された画期的ラット精子凍結保存の成功³⁾ は，実験結果を鋭敏な感覚で評価することによって得られたものである。ともすれば忘れてしまい易い精子性状観察の原点，すなわち顕微鏡下で観察される精子の運動性は，必ずしも本当の運動性，受精能を示すとは限らないことを，銘記すべきである。この報告では，凍害保護剤としてEquex Stem（界面活性剤）を用いており，保存後の精子運動率は10%あるいはそれ以下であったが，子宮角への授精により良好な妊娠率（23-69%）が得られている。

2. マウス精子の凍結乾燥保存：マウス精子の凍結乾燥保存について金子武人（熊本大・生命資源研究支援センター）は，（イ）保存液の組成とpH値が凍結乾燥処置—精子の受精能に大きく影響する可能性があること，（ロ）凍結乾燥後に市販の冷蔵庫に1年間保存したものでも受精し，産仔にまで発生し得ることを示した⁴⁾。これには顕微授精（ICSI）法の適用が必要であり，室温下で長期に保存可能かどうかについては更なる検討が必要であろう。また，この精子凍結乾燥保存では，ブタ精子でも試みられている。中井美智子ら⁵⁾（麻布大・動物繁殖）は，保存後の分離精子頭部を体外成熟卵の細胞質へ顕微注入することにより，処置精子が高い受精能を保持することが認められた。また，この精子頭部を顕微注入された卵を20頭のレシピエントへ移植したところ2頭が妊娠し，そのうち，1頭は流産し，2頭の胎仔が認められた。この研究においても，凍結乾燥後の加水から顕微授精に供するまでの短い時間でも，その時間経過にともない，その発生能が低下する傾向が認められた。

3. マウスおよびラット精子の液状保存：（イ）マウス精子はM2培養液で5日間室温保存可能である。佐藤正宏（東海大・総合医学研）は，3～4日間の22℃保存精子のIVFにより得られた受精卵の移植により，正常な胎仔への発達を認めた⁶⁾。（ロ）奥田泰士ら⁷⁾（麻布大・動物繁殖）は，脱脂粉乳3%+グルコース4%液を基本液として，これに緑茶からのカテキン抽出物（GTE）を添加した液でラット精子を保存した結果，GTE 1.0%，5日間，5℃および15℃保存でそれぞれ23.8%と17.6%の運動精子率が得られた。最長生存日数は，15℃保存よりは5℃保存の

方が2日間程長い傾向を示し、例えばGTE 0.5%液で、15℃では8.7日、5℃保存では11.0日であった。

4. 初期胚の液状保存：マウス桑実胚をM2液に緑茶の結晶エピガロカテキンガレートを添加したもので15℃保存することにより、2日間にわたり発達抑制状態で保存できることが認められた。すなわち、エピガロカテキンガレート1.0 $\mu\text{g/ml}$ 添加液にて添加保存後、M16で培養した結果、60～90%の胚に発達が認められた。

これらの保存法は、さらに検討・修正が加えられることにより、実用上室温条件で短期間、例えば1週間から10日間、有効に保存可能な域に到達することが望まれる。これにより、輸送に極めて有利となり、人工授精やIVFの効率を高め、広範に利用されるであろう。また、胚移植におけるレシピエントとの性周期同期化にも対応し得る利便性であろう。なお、ポリフェノールの生殖細胞液状保存液への添加については、複数のカテキンの添加、細胞保存温度とカテキン添加濃度、細胞保存中でのカテキン活性の低下に対するその補充などについて検討する必要がある。

参考

1) Polge C, Smith AU, Parkes AS. (1949) Revial of

spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 166, 666-668.

- 2) Stewart DL. (1951) Storage of bull spermatozoa at low temperatures. *Veterinary Record* 63, 65-66.
- 3) 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℃. *Reproduction* 122, 463-467.
- 4) 金子武人. (2004) マウス精子の凍結乾燥：新しいマウス精子保存法としての応用. SSRE シンポジウム 講演要旨 p3.
- 5) Nakai M, Kikuchi K, Takizawa A, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Shino M, Kashiwazaki N. (2005) Development in vivo and in vitro of Porcine oocytes fertilized by intracytoplasmic injection of a freeze-dried sperm head. *Reproduction, Fertility and Development* 17, 311.
- 6) 佐藤正宏. (2003) マウス精巢上体尾部精子の常温保存：精子生存率へ影響する因子の探索. *Journal of Reproduction and Engineering* 6, 260-272.
- 7) 奥田泰士, 紫野正雄, 尾川昭三, 柏崎直巳. (2003) ラット精巢上体精子の液状保存. 日本畜産学会第101回大会, 講演要旨集 180.