

第8回麻布大学 生殖・発生工学セミナー

マウス精巢上部尾部及び精子の低温保存

多田 昇弘

順天堂大学大学院医学研究科 アトピー疾患研究センター
老人性疾患病態・治療研究センター 遺伝子解析モデル部門

近年、ポストゲノム研究の進展に伴い、個体レベルで遺伝子の機能を探るために遺伝子改変 (GM) マウスの作製及び病態解析が世界的に活発化している。これに伴って、国内外の研究機関の間でこれら GM マウスの授受が増加するとともに、マウスを輸送する機会が飛躍的に増加している。しかし、従来の生体での輸送では、研究機関の間で微生物学的グレードの違いから生体を直接、動物施設に導入することが困難なこと、輸送中に生体への何らかのストレスを与えること、及び遺伝子組換え体として輸送上法的な規制を受けること等の問題が生じている。また、本年9月1日より厚生労働省が制定した「動物の輸入届出制度」が施行されるに伴い、輸出国政府機関が発行した衛生証明書が必要になるため、輸入するまでの手続きがかなり煩雑になることは否めない。このような状況のもと、生体ではなく、凍結あるいは低温保存精子として輸送することによって、このような問題は、ある程度解消されるものと思われる。精子で輸送する利点としては、1) 雄マウスの精巢上部から得られる精子の採取は、卵管から受精卵を得る方法より容易であること、2) 1匹の雄マウスから得られた精子で数100個の未受精卵を受精させることができること、3) ごく少数の雄マウスから採取された精子を保存しておけば、系統を再度確立するための材料としては十分であること、4) 「動物の輸入届出制度」では、精子 (受精卵) は対象外であること、等が上げられる。

ウシ等における精子の凍結保存が成功してほぼ50年を経過しているにもかかわらず、マウス精子の凍結保存はつい最近までその成功例が見られなかった。

1990年、我々のグループにより初の成功例¹⁾が報告されて以来、raffinoseを凍害保護物質として数多くの報告がなされている²⁻⁹⁾。特に中潟らによって、マウス精子の凍結保存におけるraffinoseの有用性が数多く報告・啓蒙され、現在では、世界の主要研究機関で、マウス精子の凍結保存にraffinoseが用いられるようになった。しかし、未だに主要研究機関以外の機関では、精子や受精卵の凍結-融解に関する諸技術を有していない場合が多く、輸送に困難を来す場合がある。できれば、凍結保存よりも技術的に容易な、精子・受精卵の簡易な保存法が開発されれば、輸送に伴う多くの問題が解消されるものと期待されている。そこで、このような目的のために、精子あるいは精巢上部尾部の低温保存に関する研究が行われるようになった。マウス精子の低温保存では、精巢上部尾部をパラフィンオイル中にて4-7℃下で4-8日間保存し、10%前後の受精率が得られている¹⁰⁻¹²⁾。また、精子自体をM2等のmedium中に浮遊させた状態で22℃下にて保存した場合、3日間保存で5%程度の受精率を示し、産仔も得られている^{13,14)}。しかし、これらの方法では、未だ受精率が低く、実用化するためには、更に低温保存期間中において受精能を有する精子の生存性を延長させる必要がある。本講演では、マウス精子の低温保存に関する研究動向について概説するとともに、マウス精子あるいは精巢上部尾部の低温保存に抗酸化剤である緑茶由来ポリフェノールを用いることによって、保存精子の生存性及び受精能が向上し得ることを示す。

文献

- 1) Tada N, Sato M, Yamanoi J, Mizorogi T, Kasai K, Ogawa S. Cryopreservation of mouse spermatozoa in the presence of raffinose and glycerol. *J Reprod Fert*, 89, 511-516, 1990.
- 2) Yokoyama M, Akiba H, Katsuki M, Nomura T. Production of normal young following transfer of mouse embryos obtained by in vitro fertilization using cryopreserved spermatozoa. *Exp Anim*, 39, 125-128, 1990.
- 3) Takeshima T, Nakagata N, Ogawa S. Cryopreservation of mouse spermatozoa. *Exp Anim*, 40, 495-497, 1991.
- 4) Sztejn JM, Schmidt PM, Raber J, Rall WF. Cryopreservation of mouse spermatozoa in a glycerol/raffinose solution. *Cryobiology*, 29, 736-737, 1992.
- 5) Nakagata N, Takeshima T. Cryopreservation of mouse spermatozoa from inbred and F1 hybrid strains. *Exp Anim*, 42, 317-320, 1993.
- 6) Penfold LM, Moore HDM. A new method for cryopreservation of mouse spermatozoa. *J Reprod Fert*, 99, 131-134, 1993.
- 7) Tada N, Sato M, Amann E, Ogawa S. Effect of pre-freezing equilibration and post-thawing centrifugation on the fertilizing capacity of frozen mouse epididymal spermatozoa. *Cryo-Lett*, 14, 195-206, 1993.
- 8) Tada N, Sato M, Kasai K, Ogawa S. Successful in vitro and in vivo development of cryopreserved mouse oocytes fertilized by cryopreserved mouse epididymal spermatozoa. *J Reprod Dev*, 40, 65-70, 1994.
- 9) Nakagata N. Use of cryopreservation techniques of embryos and spermatozoa for production of transgenic (Tg) mice for maintenance of Tg mouse lines. *Lab Anim Sci*, 46, 236-238, 1996.
- 10) Jishage K, Ueda O, Suzuki H. Fertility of mouse spermatozoa from cauda epididymis preserved in paraffin oil at 4 °C. *J Mamm Ova Res*, 14, 45-48, 1997.
- 11) Sankai T, Tsuchiya H, Ogonuki N. Short-term nonfrozen storage of mouse epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, 55, 1759-1768, 2001.
- 12) Mochida K, Ohkawa M, Inoue K, Valdez DM Jr, Kasai M, Ogura A. Birth of mice after in vitro fertilization using C57BL/6 sperm transported within epididymides at refrigerated temperature. *Theriogenology*, 64, 135-143, 2005.
- 13) Sato M, Ishikawa A, Nagashima A, Watanabe T, Tada N, Kimura M. Prolonged survival of mouse epididymal spermatozoa stored at room temperature. *Genesis*, 31, 147-155, 2001.
- 14) Sato M, Ishikawa A. Room temperature storage of mouse epididymal spermatozoa: exploration of factors affecting sperm survival. *Theriogenology*, 61, 1455-1469, 2004.