

## 不凍タンパク質添加によるマウス精巢上体尾部 由来冷蔵精子を用いた体外受精操作の検討

木我敬太<sup>1</sup>、栗田佳織<sup>1\*</sup>、西村愛美<sup>2</sup>、東佳澄<sup>1</sup>、  
中川隆生<sup>3</sup>、岸昌生<sup>4</sup>、上島達朗<sup>5</sup>、西宮佳志<sup>5</sup>、  
津田栄<sup>5</sup>、細井美彦<sup>1,2,6</sup>、安齋政幸<sup>6</sup>

### 要 約

本研究では成熟 B6D2F1 マウスの精巢上体尾部由来精子を用いた冷蔵保存を行い、その後、冷蔵精子の評価および体外受精操作について検討した。精巢上体尾部精子を、各種保存液 50  $\mu$ L (R18S3、R18、R18+AFP III 1mg/mL) 中で 4°C にて冷蔵保存した。加温後のそれらの運動性は、精子運動解析装置 (IVOS: ニッコー・ハンセン (株)) を用いて、保存期間 1 ~ 5 日を評価し、R18+AFP III の保存液では、5 日目においても 52% の運動性を保持していた。精子細胞膜損傷は LIVE/DEAD sperm viability kit を用いて評価し、R18S3 と R18+AFP III は 5 日目の細胞膜完全性の保持率は共に 48% であった。受精能の確認では、常法により採卵し冷蔵精子と受精させた。また、一部の卵子卵丘複合体は透明帯穿孔処理を行い、冷蔵精子と受精させた。透明帯穿孔処理後の卵子との体外受精結果は冷蔵保存後 3 日目の冷蔵精子において 37% (46/126) の受精率であった。冷蔵保存後 5 日目においても 2% (4/162) の受精率を確認できた。

以上の結果より、マウス精子の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

人工授精や体外受精の実用化による家畜精液の凍結保存が開発されて以来<sup>1)</sup>、様々な哺乳動物にも精子凍結保存に関する研究が進展している<sup>2)</sup>。マウスにおいては、遺伝資源の保存および飼育管理の省力化の観点などから精子の凍結保存<sup>3,4)</sup>が報告されており、これらのマウス精子の凍結保存方法は、氷晶形成による細胞膜損傷を防ぐため、凍結保護物質として細胞内透過型の低分子保護剤や細胞内非透過型で高分子な糖類やスキムミルクなどを用いる場合、あるいはそれらを組み合わせた凍結保存操作がほとんどである。しかし、マウス精子の凍結保存技術には系統差を生じ<sup>5)</sup>、特に、C57BL/6 系統においては、細胞膜損傷が著しいことが示されている<sup>6)</sup>。また、スキムミルクを凍結保護物質に用いる場合、カゼインミセルの巨大分子が精子の生存性を妨げるため、代替物質の必要性が研究されている<sup>7)</sup>。

私達は、生殖細胞の冷蔵保存を目的に、細胞膜を強力に保護して延命効果を発揮する小分子量ペプチドをモデルにした、魚類由来不凍タンパク質 (Antifreeze Protein, 以下、AFP III) を用いてマウス精子の冷蔵保存を試み、精子運動能を有していることを確認した<sup>8)</sup>。そこで本実験では、AFP III を用いたマウス精子の冷蔵保存における体外受精操作を検討した。

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. 近畿大学大学院生物理工学研究科 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

3. 株式会社紀和実験動物研究所 〒640-1473 和歌山県海南郡紀美野町毛原宮 486

4. 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

5. 産業技術総合研究所生物プロセス研究部門 〒062-8517 北海道札幌市豊平区月寒東 2 条 17-2-1

6. 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

\* 現、JA 邑楽館林 〒374-8611 群馬県館林市赤生田町 847

## 材料および方法

### (1) 供試動物

本実験に用いた系統として、B6D2F1（日本エスエルシー（株））成熟雄マウスの精子を冷蔵保存に供試した。また、それら冷蔵精子を用いた受精能の確認には、成熟齢に達した C57BL/6J（（株）紀和実験動物研究所）雌マウスを供試した。なお、本実験に際して、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) 冷蔵保存液の調整

冷蔵保存液の作製には、マウス精子凍結保存<sup>9)</sup>に用いられている R18S3 を基本保存液とし、ラフィノース（Wako : D-Raffinose Pentahydrate, 180-00012）を飽和限界濃度である 18% を滅菌蒸留水に溶かした保存液（以下、R18）、R18 に AFP III を 1mg/mL 量添加した保存液（以下、R18+AFP III）を調整した。

### (3) 精子の採取と冷蔵保存操作

B6D2F1 雄マウス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 マルチディッシュ（Nunc: 176740）の各ウェルにそれぞれの保存液 50  $\mu$ L を入れ、摘出した精巣上体尾部組織を細切し、精子を溶出させた。この得られた各精子懸濁液全量を凍結チューブ（住友ベークライト（株）：MS-4501G）へ移し、毎分 0.6°C の下降温度で 4°C まで冷却し、その後 4°C 下にて最長 5 日間冷蔵保存を行った。

### (4) 精子運動性評価

運動性の評価については、精子運動解析装置（IVOS : ニッコー・ハンセン（株））を用いて評価した。評価に供する冷蔵精子懸濁液は、凍結チューブ内から 2  $\mu$ L 採取し、修正 HTF 培地（アーク・リソース（株））へ導入した後、30 分間培養した。培養後、専用のスライドガラスにカバーガラスを被せ、精子懸濁液を 10  $\mu$ L 滴下し、前進運動精子、低速運動精子、停止精子を評価した。

### (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（Invitrogen : L7011）を用いた。まず遮光チューブ内にて 40 倍希釈 SYBR14 溶液に各保存精子サンプルを 3  $\mu$ L 添加した後、37°C にて 10 ~ 15 分インキュベートした。続いて、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）にて観察を行い、蛍光色素が精子頭部における細胞膜の完全性について評価した。

### (6) マウス冷蔵精子を用いた体外受精操作

体外受精操作は豊田らの方法にほぼ準じて行った<sup>10)</sup>。保存した冷蔵精子懸濁液 2  $\mu$ L を、予め 37°C、5% 炭酸ガスインキュベーター内で通気しておいた修正 HTF 培地<sup>11)</sup>へ入れ、約 30 分の前培養を行った。雌マウスについては常法に従い、過剰排卵処置後、卵管膨大部を摘出し、解剖針を用いて卵子卵丘複合体を前培養後のマウス冷蔵精子の入った修正 HTF 培地へ導入した。また、一部の卵子卵丘複合体を常法に従い、卵丘細胞を除去し、その後、0.25M Sucrose（アーク・リソース（株））へ移し、細胞質収縮処理<sup>12)</sup>を行った。続いて、収縮した卵子の透明帯にレーザー穿孔装置を用いて、波長 : 1, 480 nm、出力 : 300 mw、照射時間 : 200  $\mu$  sec. の穿孔条件で透明帯穿孔<sup>13)</sup>を行った。透明帯穿孔後、修正 HTF 培地にて卵子

の洗浄を行い、前培養後のマウス冷蔵精子の入った修正 HTF 培地へ導入した。受精後 6 時間以降に卵子の洗浄を行い、KSOM 培地<sup>14)</sup>へ移し、雌雄両前核を確認後、引き続き 37℃、5%炭酸ガスインキュベーター内にて培養し、2 細胞期胚へ発生させた。

## 結 果

図 1 には、精子運動解析装置を用いて得られた結果を示した。各保存液においても保存期間が経つにつれ、運動性の低下傾向が認められた。R18S3 と R18+AFP III は共に保存 5 日目においても高い運動性を維持していた。しかし、R18 単体においては運動性の低下が保存 4 日目以降に著しく認められた。

LIVE/DEAD sperm viability kit を用いた、精子細胞膜の正常性検査結果を図 2 に示した。運動性の解析結果と同様に保存期間の経過に伴い、精子頭部における細胞膜完全性が失われる傾向を認めるものの、R18S3 と R18+AFP III は共に保存 5 日目においても、高い精子細胞膜保護効果を発揮していることが示された。しかし、R18 単体では保存 2 日目までは良好な細胞膜完全性を維持していたが、保存 3 日目以降になると著しく低下した。

図 3 には、0.25M Sucrose にて細胞質収縮処理を施した後、レーザー穿孔装置を用いた透明帯穿孔後の生存卵子像を示した。この方法により得られた透明帯穿孔処理後の卵子の生存率は、100% (413/413) と極めて高率であった。

各種保存液で 3 日間保存したマウス冷蔵精子を用いた体外受精操作および透明帯穿孔処理を行った卵子との体外受精結果の一例を表 1 に示す。冷蔵保存に用いた基準液 R18S3 においては、4% (6/138) の受精率であり、R18+AFP III はほぼ同等な受精率 (4%; 6/141) を示した。また、レーザー穿孔装置による透明帯穿孔処理後の卵子との体外受精操作では、受精率が 37% (46/126) であり、生殖補助技術の適用により受精率の向上が認められた。

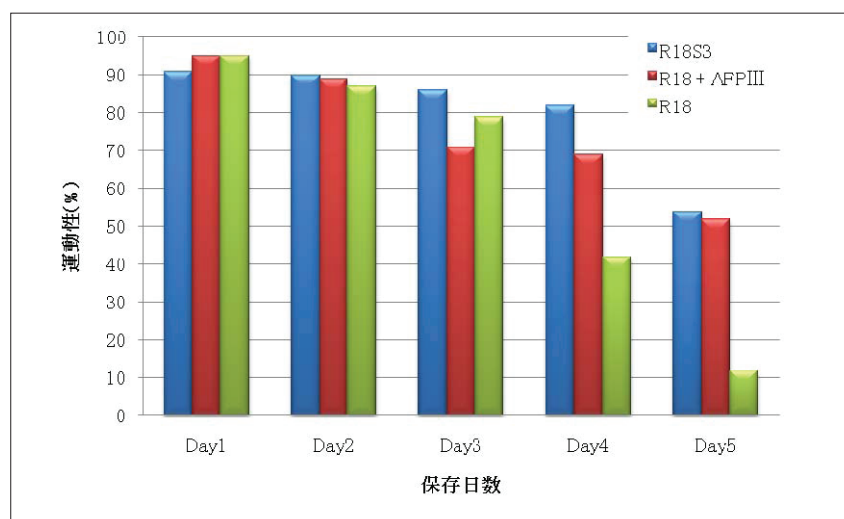


図 1. 精子運動解析装置を用いた各冷蔵保存液における精子運動性評価

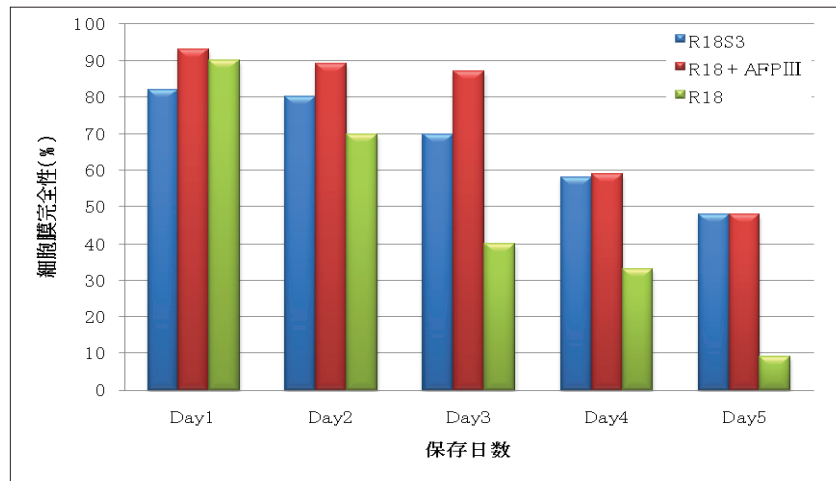


図 2. LIVE/DEAD Sperm Viability Kit を用いた各冷蔵保存液における精子細胞膜完全性の評価

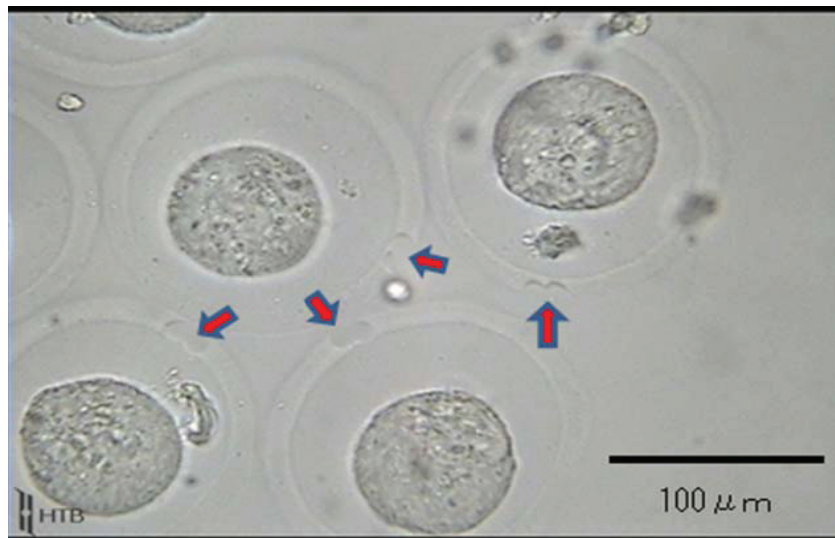


図 3. 細胞質収縮処理後、透明帯穿孔卵子の観察像

表 1. 冷蔵保存 3 日間における各保存液を用いた体外受精成績の一例

保存液および処理	供試卵子数	受精卵子数 (%)	2 細胞期発生数 (%)
R18S3	138	6 (4) <sup>a</sup>	4 (67)
R18+AFPIII	141	6 (4) <sup>a</sup>	5 (83)
R18	98	6 (6) <sup>a</sup>	3 (50)
R18+AFPIII, 透明帯穿孔処理	126	46 (37) <sup>b</sup>	38 (83)

a, b 間に有意差有り (P<0.05)



## 考 察

現在、精子の低温下における保存技術は、卵黄成分を基本としてウシ精子を用いた 5℃での冷却操作を検討したところ、冷却時間が精子細胞膜の流動性を変化させ、精子運動性および受精能の改善に有効であると考えられている<sup>15)</sup>。またブタ精子において、15℃あるいは 5℃低温下で数時間放置することによって、低温下における抵抗性を獲得し凍結後に回収した精子の運動性を保持することが認められている<sup>16)</sup>。今回、私達が供試した不凍タンパク質 (AFP) には、細胞膜表面に不凍タンパク質が結合することで、氷核の成長を効果的に抑制する機能や低温下における細胞を保護する効果そして細胞の生存性を飛躍的に高める機能が認められている<sup>17, 18)</sup>。これらのことから、R18+AFP III 保存液中にある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および AFP III が精子細胞膜表面に吸着することで細胞膜保護効果を発揮し、運動性の低下を抑制したと考えられた。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>。さらに C57BL/6 系統の凍結精子においては、体外受精時に透明帯を通過<sup>6)</sup>できず、これは凍結時に多くの精子が凍結障害により受精率の低下を招いている。本実験においても保存経過が長期になると、体外受精率の低下および精子が透明帯に接着しているが通過できないものが多く認められた (未発表)。このことは、冷蔵精子運動性の低下も含め透明帯接着表面タンパクも関与しているものと思われる。また、冷蔵保存したマウス精子は、経時的に精子運動性の低下が示され、生殖補助技術を用いることにした。1995 年に Kimura ら<sup>20)</sup> が卵細胞質内精子注入法 (Intracytoplasmic sperm injection ; ICSI)、2002 年には Kawase ら<sup>21)</sup> がピエゾ圧電素子による透明帯穿孔 (Zona-pellucida incision using piezo-micromanipulator ; ZIP) によって、運動性の悪い精子でも卵細胞質内へ侵入させることが可能となり、受精率を向上させることが試みられてきた。しかし、これらの生殖補助技術には、マイクロマニピュレーター操作が必要であり、高度な技術力と設備が要求される。そのため、今回はマイクロマニピュレーター操作を必要としないレーザー穿孔装置を用いた。しかし、レーザー穿孔装置は透明帯穿孔時に、レーザー照射による熱の発生が卵子細胞質のタンパク質を変性させ、発生率および産子獲得を低下させることが知られている<sup>13, 22)</sup>。今回は 0.25M シュークロースを用いて細胞質収縮処理<sup>12)</sup>を行い照射熱による影響を軽減させることにより受精率の改善のみならず、今後は初期胚の発生能を確認することにより、本技術の確立を検討する予定である。

## 謝 辞

本実験に関して、精子運動解析装置 (IVOS) の評価に適切なお助言を賜りました、ニッコー・ハンセン株式会社、岸禎一氏に感謝申し上げます。また、株式会社紀和実験動物研究所、東雅志氏には、実験動物の飼養と管理に関してアドバイスを賜りました。ここに感謝申し上げます。

## 参 考 文 献

1. Polge C. (1952). Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at 79 degrees C. *Nature*. 69:626-627.
2. Barbas J P., Mascarenhas R D. (2009). Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank*. 10:49-62.
3. 安齋政幸、細井美彦、松本和也、佐伯和弘、入谷明. (2005). マウス胚・配偶子の凍結保存技術. *日本胚移植学雑誌*. 27:123-131.

4. Nakagata N. (2000). Cryopreservation of mouse spermatozoa. *Mamm Genome*. 11:572-576.
5. N. Nakagata and T. Takeshima. (1993). Cryopreservation of Mouse Spermatozoa from Inbred and F1 Hybrid Strains. *Exp Anim*. 42:317-320.
6. H Nishizono., M Shioda., T Takeo., T Irie., N Nakagata. (2004). Decrease of Fertilizing Ability of Mouse Spermatozoa after Freezing and Thawing is Related to Cellular Injury. *Bio Reprod*. 71:973-978.
7. C Koshimoto and P Mazur. (2002). The Effect of the osmolality of sugar-containing media, the type of sugar, and the mass and molar concentration of sugar on the survival of frozen-thawed mouse sperm. *Cryobiology*. 45:80-90.
8. 安齋政幸、栗田佳織、西村愛美、木我敬太、東佳澄、中川隆生、岸昌生、細井美彦、西宮佳志、津田栄。(2011)。不凍タンパク質添加によるマウス精巢上体尾部由来精子の低温保存に与える効果。日本実験動物技術者協会平成 22 年度三支部交流会講演要旨集。
9. N Nakagata and T Takeshima. (1992). High fertilization ability of mouse spermatozoa diluted slowly after cryopreservation. *Theriogenology*. 37:1283-1291.
10. 豊田裕、横山峯介、星冬四郎。(1971)。マウス卵子の体外受精に関する研究 I。精巢上体精子による受精成績。家畜繁殖誌。16:147-151。
11. 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。43:25-29。
12. Anzai M., Nishiwaki M., Yanagi M., Nakashima T., Kaneko T., Taguchi Y., Tokoro M., Shin S. W., Mitani T., Kato H., Matsumoto K., Nakagata N., Iritani A. (2006). Application of lazer-assisted zona drilling to in vitro fertilization of cryopreserved mouse oocytes with spermatozoa from a subfertile transgenic mouse. *J Reprod Dev*. 52:601-606.
13. 西村愛美、大本夏未、西山有依、柳美穂、三谷匡、細井美彦、入谷明、安齋政幸。(2010)。C57BL/6系未成熟卵子を用いた成熟後におけるレーザー穿孔処理・体外受精方法の検討。近畿大学先端技術総合研究所紀要。15:27-36。
14. Biggers J. D., McGinnis L. K., Raffin M. (2000). Aminoacids and preimplantation development of the mouse in protein – free potassium simplex optimized medium. *Bio Reprod*. 63:281-293.
15. 酒井幹子、田内静花、菊池浩生、橋爪力、榎田博司 (1998)。凍結前 5℃放置がウシ精子の細胞膜の流動性に及ぼす影響。日本胚移植学雑誌。20:121-127。
16. Maxwell WM, Johnson LA. (1997). Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation. *Mol Reprod Dev*. 46:408-418.
17. Y Yeh and R. E Feeney. (1996) : Antifreeze proteins:Structures and mechanisms of function. *Chemical Reviews*. 92:601-617.
18. B Rubinsky., A. Arav., G L. Fletcher. (1991). Hypothermic protection – A fundamental property of “Antifreeze” proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 180:566-571.
19. T Takeo and N Nakagata. (2010). Mouse sperm cryopreservation and effective embryo production using cryopreservation C57BL/6 mouse sperm. *J Mamm Ova Res*. 27:70-78.
20. Y Kimura and R Yanagimachi. (1995). Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol Reprod*. 52 : 709-720.
21. Y Kawase., T Iwata., O Ueda., N Kamada., T Tachibe., Y Aoki., K Jishage., H Suzuki. (2002). Effect of partial incision of the zona pullucida by piezo-micromanipulator for in vitro fertilization using frozen-

thawed mouse spermatozoa on the developmental rate of embryos transferred at the 2-cell stage. Biol Reprod. 66:381-385.

22. Obruca A., Strohmer H., Sakkas D., Menezo Y., Kogosowski A., Barak Y., Feichtinger W. (1994). Fertilization and early embryology: Use of lasers in assisted fertilization and hatching. Hum Reprod. 9:1723-1726.

## 英文要旨

Short term storage of Mouse epididymal spermatozoa by  
Antifreeze protein addition at cold temperature

Keita Kiga<sup>1</sup>, Kaori Kurita<sup>1\*</sup>, Manami Nishimura<sup>2</sup>, Kasumi Higashi<sup>1</sup>, Takao Nakagawa<sup>3</sup>,  
Masao Kishi<sup>3</sup>, Tatsuhiro Kamijima<sup>5</sup>, Yoshiyuki Nishimiya<sup>5</sup>, Sakae Tsuda<sup>5</sup>,  
Yoshihiko Hosoi<sup>1, 2, 6</sup>, Masayuki Anzai<sup>6</sup>

## Abstract

The present study was performed to examine the storage of Slc : B6D2F1 mouse epididymal sperm at cold temperature. Afterwards, the evaluation and the *in vitro* fertilization operation of the refrigeration sperm were examined. The cauda epididymal spermatozoa from adult males were preserved with various solutions (R18S3, R18, R18+AFP III 1mg/mL) at 4°C. Sperm motility was assessed by Integrated Visual Optical System (IVOS). R18+AFP III maintained the movement of 52% during 5 days. The integrity of the sperm membrane was determined using Live/Dead sperm viability kit. The percentage of membrane-intact spermatozoa that stored in R18S3 and R18+AFP III was 48% at day 5. Super ovulated eggs were fertilized *in vitro* with various refrigeration sperm. Moreover a part of eggs was treatment of zona drilled, and it was fertilized with the refrigeration sperm. *In vitro* fertilized rate of zona drilled oocyte with refrigeration sperm of 3 days after preserved. The fertilization of the refrigeration sperm of the 5 day of preservation was 2% (4/162). In conclusion were indicate that mouse 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. Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University, Wakayama 649-6493, Japan

3. Kiwa Laboratory Animal Co, Ltd., Wakayama 640-1473, Japan

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

5. Bioproduction Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Toyohira, Sapporo, Hokkaido, 062-8517, Japan

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

\*JA Ouratatebayashi, Tatebayashi, Gunma, 374-8611, Japan