Cryopreservation of Mouse Spermatozoa

Tsutomu TAKESHIMA, Naomi NAKAGATA*,
and Shyoso OGAWA**

Imamichi Institute for Animal Reproduction, 1103 Fukaya, Dejima-mura, Niihari-gun, Ibaraki 300-01, *Central Laboratory of Medical Sciences, Division of Pathology, Juntendo University School of Medicine, 2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, and **Laboratory of Animal Reproduction, Faculty of Agriculture, Meiji University, 1-1-1 Higashimita, Tama-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 214, Japan

(Received 6 March 1991/Accepted 11 June 1991)

The spermatozoa of cauda epididymis of mature mice were suspended in 3% skim milk in distilled water supplemented with 12, 15, 18 or 21% (W/V) raffinose. The suspension of spermatozoa were frozen in liquid nitrogen gas for 10 min, then stored in liquid nitrogen (-196°C). The frozen suspensions of spermatozoa were thawed by rapid warming in water bath at room temperature. For removing the cryopreservative solution, a pair of syringes connected with a three stop cock and a filter unit (pore size 0.45μ) were used. Highest sperm motility was obtained after 1 hr of thawing from the cryopreservative solution containing 18% raffinose and 3% skim milk. These cryopreserved spermatozoa were used for fertilization in vitro. The proportion of pronuclear oocytes was 35.9% (74/206) 6 hr after insemination, and the proportion of 2-cell embryos was 33.6% (42/125) 28 hr after insemination. All 2-cell embryos were transferred to the oviducts of pseudopregnant recipients and 45.2% (19/42) developed to normal young. — KEY WORDS : cryopreservation, in vitro fertilization, mouse spermatozoa, raffinose, skim milk

---

マウス精子の凍結保存

竹島 勉・中潟直己*・尾川昭三**

財団法人動物繁殖研究所

*順天堂大学医学部共同研究室

**明治大学農学部家畜繁殖学研究室

小実験動物としてのマウスは、畜産、遺伝、免疫および医学等の分野で基礎的な実験に多く用いられ、現在、その系統（近交系、ミュータント系、トランスジェニック系等）は膨大な数になっている。これらの系統を維持管理することは労力および施設面で大きな負担を生じるため、配偶子や胚の凍結による系統保存が必要になる。マウス胚の凍結保存は whittingham ら [7] が成功して以来、多くの研究がなされ実用化されている。一方、マウス精子の凍結保存は著者らが第17回日本実験動物学

会で Raffinose を主成分とした凍害保護物質で成功して以来、奥山ら [2]、多田ら [4]、横山ら [8] により種々の改良を加えた報告がされているにすぎない。本報告では、マウス精子の凍結保存法を簡易化し、系統維持への実用化を目的として、保存液の作製、凍結—融解および保存液の除去法について検討した。

材料および方法

凍結保存液：Reffinose (和光純薬) 12, 15, 18 および 21 % にそれぞれ Skim Milk (Difco) 3 % となるように蒸留水に加え、60℃ の水温中で溶解した。これを超遠心機 (10,000 g) で15分間遠心分離してカゼインミセルを除去し、その上清を0.45 μ のディスポーザブル・フィルターユニット (Millipore, SLHA 025 OS) を用いて濾過滅菌した。濾過滅菌した保存液を小試験管に分注して、-80℃ で保存し、実験前に室温に戻して使用した。

精子採取：ICCR 系マウス (10~15週齢) 雄の精巣上体尾部4個を Organ tissue culture dish (Falcon 3037) 内の0.4 ml の保存液に入れ、眼科用ハサミで細切した後、Organ tissue culture dish を約1分間、円を描くように回転し、精子を精巣上体管から保存液に拡散させて採取した。保存液内に均一に拡散した精子浮遊液を0.5 ml のサンプリングチューブ (Sarstedt, 72.699 S, Nümbrecht, Germany) に約0.1 ml ずつ分注し、凍結保存に供した。

凍結操作：精子液の入ったサンプリングチューブを密栓してホルダー (Fig. 1) に固定し、50 ml のディスポーザブル注射筒の先端に発泡スチロールを詰め作製した

凍結用キャニスター (Fig. 1) に入れ、液体窒素液面に浮かし、10分間静置した。その後、凍結用キャニスターを液体窒素中に沈め、10分後、ホルダーに固定したままサンプリングチューブを保存用キャニスターに移し、1~7日間、液体窒素中で保存した (室温より-196℃まで30~40℃/min の速度で冷却)。

融解および融解後の保存液の希釈・除去：液体窒素保管器からサンプリングチューブを取り出し、室温水槽に静置して融解した (3~5分, 50~80℃/min の速度で融解)。サンプリングチューブ内の精子液が完全に融解したことを確認した後、2 ml の HTF 液 [3] を予め吸引しておいた 2.5 ml ディスポーザブル注射筒 (テルモ) に精子液をすべて吸引した。注射筒の先端に0.45 μ のディスポーザブル・フィルターユニットと三方活栓 (TOP, 9 H 03 Y) および三方活栓中央の接続部に5 ml の HTF 液を吸引した 5 ml のディスポーザブル注射筒 (テルモ) を装置し (Fig. 2), 以下の操作を行なった。三方活栓のコック C を止め、2.5 ml の注射筒を完全に押し出した後 (液の流れ A → B), 三方活栓のコック B を止め、5 ml の注射筒より2.5 ml の注射筒内へ、2 ml の HTF 液を静かに注入した (液の流れ C → A)。この操作を2回行なった後、0.6 ml の HTF 液を2.5 ml の注射筒に吸引し (液の流れ C → A), ディスポーザブル・フィルタ

Fig. 1. Freezing of mouse spermatozoa

① The sperm suspension (0.1 ml) was transferred into a sampling tube. ② The freezing canister was kept 10 min in LN₂ gas. ③ The freezing canister was plunged directly into LN₂. Then, the sampling tube with the holder was moved from the freezing canister to the preserving canister.

Fig. 2. Dilution of sperm suspension after thawing

① The sperm suspension was filtered by pushing the upper syringe after closing C cock (A flowing to B). ② 2 ml of fresh HTF medium was withdrawn into the upper syringe by pushing the lower syringe after closing B cock (C flowing to A). ③ This procedure was repeated once more.

ーユニットを2.5 mlの注射筒から取り外した。得られた精子液を0.2 mlずつパラフィンオイル下の0.2 mlのHTF液に注入し、体外受精用精子懸濁液を作製した(3,000~4,000精子/ μ l)。これを1時間、炭酸ガス培養装置(37℃, 5% CO₂, 95%空気)内でインキュベートした後、精子の運動性を37℃に加温したスライドガラス上にて鏡検した。

体外受精：体外受精は豊田ら[7,8]の方法に従った。すなわち、5 IU PMSGと5 IU hCGを48時間間隔で腹腔内投与したICR系雌マウス(8~12週齢)の卵管膨大部よりhCG注射後、16~17時間に卵子を採取した。この卵子を1.5時間前培養した精子懸濁液内に導入し、体外受精を行なった。卵子の観察は授精後6時間にホルマウント標本を作製して行ない、一部の卵子について

はさらに22時間の培養を続け、2細胞期への発生について観察した。

胚の移植：授精28時間後に2細胞期へ発生した胚を精管結紮雄と交配したC57BL/6N雌の卵管内に偽妊娠第一日目に移植し、新生仔への発生について検討した。

成 績

Fig. 3に12, 15, 18および21% Raffinoseに3% Skim Milkを加えた保存液で凍結—融解後、1時間培養した精子の運動性を示す。すべての実験群で精子の約半数に運動性が認められ、精子活力の評価は運動性を呈している精子に対する前進運動精子数の割合として算出した。その結果、18% Raffinose+3% Skim Milkの実験群では、前進運動精子の割合が約60%であり、他の実験群を上回っていた。Table 1に、この精子を用いて体外受精した受精成績を示す。凍結精子を用いて体外受精した卵子の受精率は35.9% (74/206)であり、対照群の92.9% (104/112)と比べて低値を示していたが、多精子侵入卵は認められなかった。

Table 2に、18% Raffinose+3% Skim Milkで凍結した精子を用いて体外受精した卵子の2細胞期への発生率を示す。2細胞期胚への発生率は、凍結精子で33.6% (42/125)、対照群で90.4% (47/52)であった。Table 3に、この2細胞期胚を偽妊娠雌に移植した成績を示す。凍結群で2細胞期に発生した42個の胚を4匹の偽妊娠雌に移植した結果、3匹が妊娠し19匹(45.2%)の新生仔が得られた。対照群では、46個の胚を3匹に移植し、全例が妊娠し、23匹(50.0%)の新生仔が得られた。

考 察

家畜では、ウシ精子の凍結保存に18% Raffinoseを

Fig. 3. The motility of frozen-thawed mouse spermatozoa R: Raffinose SM: Skim Milk

Table 1. The fertilization rate in vitro by frozen-thawed mouse spermatozoa 6 hr after insemination

Sperm	No. of oocytes examined	No. of oocytes fertilized*		
		Total (%)	Monospermic	Polyspermic
Fresh (Control)	112	104 (92.9)	97	7
Frozen-thawed	206	74 (35.9)	74	0

* Oocytes at Telophase II with enlarged sperm head (s) in vitellus, or oocytes with male and female pronuclei

Table 2. Development of 2-cell embryos from the oocytes fertilized by frozen-thawed mouse spermatozoa 24 hr after insemination

Sperm	No. of oocytes examined	No. of oocytes developed to 2-cell embryos (%)
Fresh (Control)	52	47 (90.4)
Frozen-thawed	125	42 (33.6)

Table 3. Development to live young of 2-cell embryos from the oocytes fertilized by frozen-thawed mouse spermatozoa after transfer to pseudopregnant recipients

Sperm	No. of recipients used	No. of embryos transferred	No. of animals which delivered live young	No. of live young		
				♀	♂	Total (%)
Fresh (Control)	3	46	3	14	9	23 (50.0)
Frozen-thawed	4	42	3	8	11	19 (45.2)

用い、良好な成績が認められている [1]。しかし、マウス精子では、Raffinose のみでは耐凍効果は不十分であり、これに Skim Milk, Glycerol あるいは DMSO を添加することで耐凍効果が向上することが報告されている [2, 4, 8]。本実験では、3% Skim Milk を含む 12, 15, 18 および 21% Raffinose 濃度で凍結した精子の融解後の運動性は、18% Raffinose が最も良好であり、その精子の体外受精における受精率は、授精後 6 時間で 35.9%, 2 細胞期での検査で 33.6% であった。この成績は、対照群に比較して低値であったが、マウス精子の凍結保存に有効であることを示している。従って、第 17 回日本実験動物学会で著者らが Raffinose を主成分とした保存液を用い、マウス精子の凍結保存を報告した成績とほぼ同様な結果であった。しかし、本実験では、次の点に改良を加えてある。すなわち、1) 試薬用 Skim Milk を用い、Raffinose とともに蒸留水に溶解後、超遠心分離で巨大分子のカゼインミセルを除去した上清を保存液とすることで、均一化した保存液を作製した。2) 凍結操作では、液体窒素保管器内で液体窒素ガスに 10 分間静置後、液体窒素に浸漬するという簡易で短時間の二段階急速凍結法を用いた。3) 融解後、ディスポーザブル・フィルターユニットおよび三方活栓を用い、無菌的に、かつ短時間で凍害保護物質を除去した。これらの工夫により、凍結から融解後の精子操作を簡易化し、精子に与える悪影響を軽減できたと考える。従って、今後、凍

結・融解精子の受精率を向上させることにより、精子の凍結保存の実用性がより高まるものとする。

要 約

12, 15, 18, 21% の Raffinose (W/V) に 3% Skim Milk を加えた保存液を用いマウスの精巢上体尾部精子を凍結保存した。凍結は試料を室温から液体窒素ガス中に 10 分間静置後、液体窒素内に浸漬する急速冷却法を用いた。融解は、試料を液体窒素から取り出し、室温水槽に静置することにより行なった。融解した精子浮遊液を注射筒内に吸引後、注射筒先端に 0.45 μ のディスポーザブル・フィルターユニットと三方活栓を装置し、濾過することにより保存液を除去した。その結果、18% Raffinose に 3% Skim Milk を添加した保存液で凍結保存した精子が、融解後 1 時間の運動性で最も優れていた。この精子を用いて体外受精を行ない、授精 6 時間後の受精率および 28 時間後の 2 細胞期への発生率は、それぞれ 35.9% (74/206) および 33.6% (42/125) であった。また、2 細胞期胚を受容雌の卵管内に移植し、45.2% (19/42) が新生仔として得られた。

本研究の一部は文部省科学研究費補助金 (No. 57771578, 57771720) によるものである。本研究に御協力いただいた明治乳業株式会社、中央研究所、米久保明氏に対し感謝致します。

文 献

- [1] 永瀬 弘 (1975). 牛精子に対する凍害防止剤の種類とその効果—錠剤法を利用する凍害防止剤の検索—. 農林省畜産試験場年報, **15**, 109-132.
- [2] 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および人工授精試験. 日本受精着床学会誌, **7**, 116-119.
- [3] Quinn, P., Kerin, J. F., and Warnes, G. M. (1985). Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertility and Sterility*, **44**, 493-498.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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 II. 精子侵入時期に及ぼす精子体外培養の効果. 家畜繁殖誌, **16**, 152-157.
- [7] Whittingham, D. G., Leibo, S. P., and Mazur, P. (1972). Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C . *Science*, **187**, 411-414.
- [8] 横山峯介・秋葉久弥・勝木元也・野村達次 (1990). 凍結保存マウス精子の体外受精による正常産仔の作成. 実験動物, **39**, 125-128.