

平成 22 年 5 月 27 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20700367

研究課題名（和文） 齧歯類精子の室温保存法開発に関する基礎的研究

研究課題名（英文） Study on sperm preservation at room temperature in the rodents

研究代表者

金子 武人（KANEKO TAKEHITO）

熊本大学・生命資源研究・支援センター・助教

研究者番号：30332878

研究成果の概要（和文）：

精子の室温保存法の開発は、バイオリソース事業において革新的な技術である。現在、室温保存実現に最も近い精子保存法はフリーズドライ法であると言える。フリーズドライ法は、液体窒素を必要としない低コストでの保存・簡易輸送が可能な方法である。本研究では、ラットにおけるフリーズドライ法の開発を目的とした基礎的研究を行った。その結果、ラット精子はフリーズドライ後 4 ヶ月で 1 年間の保存後も高い受精能を保持しており、これら精子と受精した卵子から正常な産子を得ることができた。また、精子クロマチンの正常性が室温での長期保存に重要なファクターであることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Sperm preservation at room temperature is a powerful tool for bio-resource projects. Freeze-drying is a method which can preserve and transport sperm at room temperature without using liquid nitrogen. We studied preservation of sperm at room temperature by using freeze-drying. The fertility of freeze-dried sperm was maintained after preservation for 1 year at 4 °C. Offspring was obtained from oocytes fertilized with these sperm. Moreover, this study was described that normality of sperm chromatin is an important factor to preserve sperm at room temperature.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：実験動物学

科研費の分科・細目：実験動物学・凍結保存

キーワード：マウス、ラット、精子、保存、ICSI

1. 研究開始当初の背景

精子の室温保存法の開発は、バイオリソース事業において革新的な技術である。現在、室温保存実現に最も近い精子保存法はフリーズドライ法であると言える。

フリーズドライ法は、液体窒素を必要としない低コストでの保存・簡易輸送が可能な方法である。このため、精子フリーズドライ法の開発に関する研究は、現在多くの動物種において盛んに行われている。研究代表者もマウスを中心に多くの研究報告を行ってきた。精子フリーズドライ法の研究に用いられている動物種の中でもマウスは詳細に検討されており、現在フリーズドライしたマウス精子においては、冷蔵庫（4℃）において安定した受精能を保持できることが明らかとなっている。

しかしながら、他の動物種においては長期保存成功の報告例はなく、またマウスを含め4℃以上、すなわち室温で保存可能な動物種の成功例も報告されていないのが現状である。このため、精子室温保存法の開発に関する研究は、バイオリソース事業にとって重要な課題である。

フリーズドライ保存法は、液体窒素を用いた従来の凍結保存法に代わる革新的な技術であり、4℃以上すなわち室温での長期保存の実現はマウスのみならず多くの動物種における遺伝資源保存に有効な技術であると言える。

2. 研究の目的

本研究は、実験動物として汎用性の高い齧歯類における精子フリーズドライ保存法の開発および室温での長期保存を確立するための基礎的研究を行うことを目的とした。本研究により精子室温保存法の実用化に向けたアプローチを行った。

特にラットにおいては、マウスと比べて研究・技術開発が不十分であるため、本研究においてはラット精子におけるフリーズドライ法の開発について重点的に行った。本研究における実験として、

- (1) ラット精子のフリーズドライ後の受精能の評価
- (2) フリーズドライ精子の経時的クロマチン解析

を行うことにより、フリーズドライ精子の室温保存を可能にするファクター検出について重点的に研究を行った。

3. 研究の方法

- (1) 齧歯類精子のフリーズドライ後の受精能の評価

成熟した雄ラットの精巣上体尾部より採取した精子を、Tris および EDTA からなるフリーズドライ用保存液 (Kaneko et al., 2006) に懸濁した後フリーズドライを行った (Kaneko et al., 2003)。フリーズドライ後の精子は4℃で4日以内、6ヶ月および1年間保存した (図1)。

一定期間保存したフリーズドライ精子は、卵細胞質内精子注入法 (ICSI) を用いて過排卵誘起した雌ラットより採取した未受精卵子内に導入した (図2)。ICSI後の卵子は体外で培養を行い、その後の2細胞期への発生を検討した。

さらに、2細胞期へ発生した胚は、成熟した偽妊娠雌ラットの卵管内に移植することで、その後の産子への発生について検討した。



図1：フリーズドライ精子

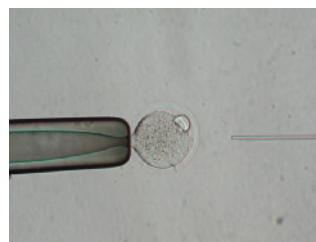


図2：ICSI

- (2) フリーズドライ精子の経時的クロマチン解析

成熟した雄ラットの精巣上体尾部より採取した精子を、Tris および EDTA からなるフリーズドライ用保存液に懸濁した後フリー

ズドライを行った。フリーズドライ後の精子は4 で4 日以内、6 ヶ月および1 年間保存した。

一定期間保存したフリーズドライ精子は、クロマチン解析を行うことにより保存期間ごとにクロマチンへのダメージを受けた精子の割合を算出した。これにより、フリーズドライ精子の保存可能期間について検討を行った。

4. 研究成果

(1) 齧歯類精子のフリーズドライ後の受精能の評価

ラット精子はフリーズドライ後、4 日以内、6 ヶ月および1 年間4 で保存した。一定期間保存したフリーズドライ精子は、ICSIにより過排卵誘起した雌ラットより採取した未受精卵子内に導入した。ICSI後の卵子は体外で培養を行い、その後の2細胞期への発生を検討した。その結果、4日以内、6ヶ月および1年間4で保存した精子と受精した卵子は、68%、72%および56%が2細胞期へ発生した(表1)。

また、これら2細胞期胚を成熟した偽妊娠雌ラットの卵管内に移植することで、その後の産子への発生について検討した。その結果、4日以内、6ヶ月および1年間4で保存した精子と受精した卵子由来の2細胞期胚は、それぞれ14%、17%および16%が正常な産子へ発生した(表2)。

表1

保存期間	供試卵子数	2細胞期胚数(%)
4日以内	53	36(68)
6ヶ月	25	18(72)
1年	34	19(56)

(Kaneko et al., Cryobiology, 2009)

表2

保存期間	移植胚数	産子数(%)
4日以内	36	5(14)
6ヶ月	18	3(17)
1年	19	3(16)

(Kaneko et al., Cryobiology, 2009)

(2) フリーズドライ精子の経時的クロマチン解析

フリーズドライ後4日以内、6ヶ月および1年間4で保存したラット精子はクロマチン解析を行うことにより保存期間ごとにクロマチンへのダメージを受けた精子の割

合を算出した。その結果、4で保存したフリーズドライ精子は、1年間の保存後もダメージを受けた精子の増加は認められなかった。2細胞期胚の移植後の産子への発生率および精子クロマチンの正常性の結果から、ラット精子はフリーズドライ後4で1年間の保存は可能であることが明らかになった。

本研究期間において、ラットフリーズドライ精子の4での長期保存が可能であることが示唆された。また、クロマチンの正常性は保存状態により不安定になることが明らかとなった。このことから、クロマチンの正常性は室温での長期保存に必要なファクターであることが示唆された。

本研究において、ラット精子はフリーズドライ後も高い受精能を保持していることが明らかとなった。また、4での保存においては1年後においてもダメージを受けることなく高い受精能を保持しており、これら精子と受精した胚は正常な産子へ発生することが明らかとなった。精子クロマチンの正常性は、室温での長期保存に必要なファクターであることが明らかとなったことから、精子クロマチンの正常性を維持する技術改良を今後の研究課題とすることで、齧歯類精子の室温保存法実現に向けたアプローチを展開したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Takehito Kaneko, Shinya Kimura, Naomi Nakagata. Importance of primary culture conditions for the development of rat ICSI embryos and long-term preservation of freeze-dried sperm. Cryobiology, 査読有, 58, 293-297, 2009.

[学会発表](計5件)

金子武人 ラット精巣内精子の凍結保存および産子の作出 第56回日本実験動物学会総会 平成21年5月14~16日 埼玉県大宮市 大宮ソニックシティ

Takehito Kaneko. Gamete preservation for resource banking. 21st Annual Scientific Conference & 4th Laboratory Animal Workshop. May 21-22, 2009. Alabang Muntinlupa city, Philippine.

Takehito Kaneko. Resource banking and

fertilization techniques. 21st Annual Scientific Conference & 4th Laboratory Animal Workshop. May 21-22, 2009. Alabang Muntinlupa city, Philippine.

Takehito Kaneko. The development of oocytes injected with freeze-dried rat sperm. Cryo2009: 46th Annual Meeting of the Society for Cryobiology. July 19- 23, 2009. Sapporo, Hokkaido.

Takehito Kaneko. Tolerance to freezing and maintenance of fertilizing ability in rat sperm. Cryo2009: 46th Annual Meeting of the Society for Cryobiology. July 19-23, 2009. Sapporo, Hokkaido.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

金子 武人 (KANEKO TAKEHITO)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・
助教

研究者番号 : 30332878