

やましろ ひであき

氏名（本籍地） 山城 秀 昭

学位の種類 博士（農学）

学位記番号 農博第 966 号

学位授与年月日 平成 21 年 3 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項

研究科，専攻 東北大学大学院（博士課程）農学研究科応用生命科学専攻

論文題目 ラット精子凍結保存法の開発に関する研究

博士論文審査委員 （主査）教授 佐藤 英 明

教授 豊水 正 昭

教授 西森 克 彦

論文内容要旨

第1章 緒論

ラットはそのゲノム配列が明らかにされ、遺伝と環境の両面で厳密な制御が可能であることに加え、適度な大きさと高い適応能力から、生体機能モデルや疾患モデルとして利用される重要な実験動物である。また、数百系統に及ぶ遺伝子改変ラットが作製され、今後もその数と利用は加速度的な勢いで増加することが予想される。このような背景の中、ラット遺伝資源の効率的確保、安定した供給や保存のため、国内外における数カ所の施設で大規模なラットの生体あるいは胚凍結による遺伝資源の保存が行われている。しかし、遺伝資源の保存において必要不可欠な精子の凍結保存技術は未だ実用化に至っていない。それ故、ラット精子の凍結保存技術の開発は急務となっており、その技術が実用可能になれば、開発の意義は計り知れない。

ラット精子の凍結保存法については、2001年 Nakatsukasa et al. (*Reproduction*, 122, 463-467) によりラクトース卵黄保存液が開発され、融解後 10%前後の運動性の精子を子宮に注入し、産子を得ている。この報告がラット凍結精子による産子作出に関する初めての成功例であるが、妊娠率は未凍結の場合に比較して有意に低い。その後、クローズドコロニー、近交系、ミュータント、トランスジェニックおよび GFP ラット精子を、ラクトース卵黄保存液を用いて凍結保存し、人工授精により産子を獲得したと報告しており、開発された精子凍結保存法は、遺伝的背景の異なる系統への応用が可能であるとしている (Nakatsukasa et al., *Comparative Medicine*, 53, 639-641, 2003)。しかし、凍結融解後の精子の生存性、運動性および受精率が極めて低いという問題を有しており、さらに、保存精子を用いた体外受精や胚移植は未だ成功した報告はない。以上のように、2008年においても、ラット精子の凍結保存法は実用化されておらず、その凍結保存法の開発は重要な研究課題として残っている。

そこで本研究では、新たな発想によるラット精子凍結保存法の開発と凍結精子による人工授精と体外受精技術の確立を目的として実験を行った。

第2章 ラット精子凍結保護液の開発

本章では、凍結保護や凍害防止効果が高いラット精子の凍結保護液を開発することを目的とした。まず、マウス精子の凍結保護剤として用いられている糖類のラフィノースを凍結保護剤として用い、それを基盤に保存液の改良を図ることにした。そのため、実験1では、卵黄を含む超純水、PBS あるいは修正クレブス-リンガー重炭酸液 (modified Krebs-Ringer Bicarbonate ; mKRB) に異なる濃度のラフィノースを添加した溶液を 1 次希釈液として用いた。2 次希釈液は、それぞれ 1 次希釈液と同様の溶液を等量加え、液体窒素中に精子を凍結した。凍結精子は 37°C の温水で融解し、運動性を測定し、先体の正常性は FITC-PNA で観察した。実験 2 では、実験 1 の結果で融解後の精子の運動性が認められた

濃度のラフィノースを含む卵黄-mKRB 保存液を 1 次希釈液として、2 次希釈に凍結保護剤として最も一般的に利用されている細胞膜透過性のグリセロール、あるいは Nakatsukasa らがラット精子の凍結保護剤に用いた Equex STM が融解後の運動性および先体の正常性に及ぼす影響について検討した。実験 3 に、ラフィノース以外の糖類（トレハロース、ラクトース、フラクトースおよびグルコース）を添加した卵黄-mKRB 保存液を 1 次希釈液として用い、2 次希釈液はそれぞれ Equex STM を添加した溶液を用いた。その後、凍結融解精子の運動性、先体の正常性、および 37°C で 3 時間加温した場合の運動性の経時的変化に及ぼす影響について調べた。

その結果、いずれの濃度のラフィノースを超純水、および PBS（卵黄含）に添加した場合、凍結融解後の精子の運動性は認められなかった。しかし、0.1M ラフィノースを卵黄-mKRB 溶液に添加した場合、融解後に精子の運動性が認められ、先体の正常性も高い値を示した（表 1、図 1）。2 次希釈液の凍結保護剤として用いたグリセロール添加区においては、いずれの濃度においても融解後の精子の運動性および先体の正常性はグリセロールを添加していない区の値に比較して低下した（表 2. A）。一方、1.5% Equex STM を凍結保護物質として用いた場合、融解後の精子の運動性および先体の正常性は添加していない区の値に比較して有意に高い値が認められた（表 2. B）。糖類の比較では、ラフィノースおよびトレハロースを添加した卵黄-mKRB 保存液を用いて精子を凍結すると、融解後の運動性および先体の正常性は、ラクトース、フラクトースおよびグルコースを添加した区の値に比較して高い値を示した（表 3）。ラフィノース添加区の融解後の精子の運動性は、3 時間加温した後においても他の処理区の値に比較して高い値を維持した（図 2）。

以上の結果から、ラット精子の 1 次および 2 次希釈液の基盤となる凍結保護液として、0.1 M ラフィノースを卵黄-mKRB 溶液に添加した保存液を用いて精子を凍結した場合、融解後において最も良い成績が得られた。また、2 次希釈液の凍結保護剤としてグリセロールの有効性は認められなかったが、1.5% Equex STM を用いた保存液は、融解後の運動性を向上させ、先体の正常性も高い値を示すことが明らかになった。さらに、糖類の比較においては、ラフィノースがラット精子の凍結保存には有効であることが明らかにされた。これらのことから、第 2 章にて開発された凍結保存液は、凍結保護や凍害防止という課題を克服し、エネルギー基質であるグルコース、ピルビン酸および乳酸を含む mKRB 溶液を基本とした保存液を用いたことで、凍結前の精子のエネルギー代謝が維持あるいは促進され、精子運動のエネルギー源である合成 ATP 量が高められ、その ATP が融解後の運動再開に利用された可能性があることが推察された。以上のことから、凍結前に精子の運動能や代謝能の促進に関与するエネルギー基質やその作用機序が解明できれば、融解後の精子の運動性と生存性が改善できることが示唆された。

第3章 精子運動能およびエネルギー利用・供給の解明による凍結保存液の改良・開発

本章では、まず、ラフィノース・卵黄-mKRB 保存液に含まれるグルコース、ピルビン酸および乳酸に着目し、エネルギー基質として最良なものを選抜することと、その最適濃度を決定することを目的に、グルコース、ピルビン酸および乳酸のいずれかが、採精後の運動性、エネルギー代謝活性やミトコンドリア機能の指標である酸素消費量、および凍結融解後の運動性に及ぼす影響について検討した。さらに、精子の運動能を制御するエネルギー源、すなわち ATP の保存液への添加が、採精後の運動性、酸素消費量および凍結融解後の運動性や生存性に及ぼす影響についても検討した。

乳酸を含まない保存液では、採精後の精子の運動性、酸素消費量、および融解後の運動性が乳酸を含む保存液で処理したそれらの値に比較して低い値を示した (図 3. A,B)。また、乳酸の最終濃度が 32.37 mM になるように、ラフィノース・卵黄-mKRB 保存液に添加した場合、採精後の精子の運動性は、乳酸を添加していない区の値に比較して有意に高い値が認められ、融解後の運動性も最も高い値を示した (図 4. A)。さらに、32.37 mM 乳酸を添加した区の酸素消費量は、乳酸を含まない区の値に比較して高い値を示した (図 4. B)。一方、1.85 mM ATP を乳酸添加ラフィノース・卵黄-mKRB 保存液に添加した場合、融解後の運動性が著しく向上することが認められ (図 5. A)、1.85 mM ATP を添加した区の採精後の酸素消費量は、対照区の値に比較して有意な差は認められなかったが、高い値を示す傾向が認められた (図 5. B)。1.85 mM ATP を添加した区の凍結融解後の運動性は、ATP 無添加区の値に比較して、3 時間加温した後においても有意に高い運動性が維持された (図 6)。

次に、ラット精子における乳酸を介した精子運動能およびエネルギーの利用と供給について解明することを目的として、保存液に含まれる乳酸の有無、あるいはグルコースの取り込みを阻害する 2-Deoxy-Dglucose (2DG)、乳酸脱水素酵素 (LDH-C) を阻害するオギザメート(OX)を添加した場合の採精後の運動性、酸素消費量に及ぼす影響と LDH-C の局在を明らかにするため免疫蛍光染色法により解析した。

その結果、乳酸存在下において、採精後 3 時間加温したときの運動性および直線速度は、高い値で維持され、酸素消費量も高い値を示した (図 7. A,B)。高い濃度の 2DG (3 mM) を添加した場合において、運動性および酸素消費量は、対照区の値に比較して有意に低い値を示した (図 7. C)。一方、乳酸非存在下で異なる濃度の 2DG を添加した場合、採精直後の運動性および酸素消費量は、いずれの濃度においても対照区の値に比較して有意に低い値を示した (図 7. D,F)。乳酸の有無に関わらず、LDH-C を OX により阻害した場合、採精後の精子の運動性は、対照区の値に比較して有意に低い値を示した (図 8. A,D)。高い濃度の 2OX (3 mM) を乳酸を含む希釈液に添加した場合、採精後の酸素消費量は、対照区の値に比較して有意に低い値を示した (図 8. C)。興味深いことに、乳酸存在下で精子運動パターンにも変化が観察された。すなわち、乳酸が希釈液に存在すると、中片部を大きく

屈曲させ、頭部の振幅が大きい運動精子が多く観察された (図 9. A)。さらに 3 時間加温すると、頭部の振幅が小さくなり、直線速度が著しく活性化された状態の運動精子が観察された (図 9. B)。しかし、乳酸が希釈液に存在しないと、鞭毛主部のみを主に使い前進する精子や前進するのが困難な精子も観察された (図 9. C,D)。LDH-C 抗体により精子の LDH-C を蛍光免疫染色した結果、鞭毛主部に局在するのではなく、頭部の先端部と中片部のミトコンドリアに局在していた (図 10)。

本章の結果、乳酸の最終濃度が 32.37 mM になるように、ラフィノース・卵黄-mKRB 保存液に添加した場合、凍結前の精子の運動性および酸素消費量が促進され、融解後の運動性が向上することが認められた。さらに、1.85 mM ATP を保存液に添加すると、融解後の運動性および生存性が著しく向上することが明らかにされた。また、乳酸が保存液に存在することで、中片部のミトコンドリアに局在する LDH-C により酸素消費量が向上され、その結果、中片部の屈曲が増し、頭部の振幅が大きい精子の運動が維持されることが明らかにされた。以上の結果、ラット精子において乳酸は、グルコースやピルビン酸と比較し、エネルギー基質として ATP 合成のためミトコンドリアに取り込まれ、LDH-C によりピルビン酸に分解され、酸化的リン酸化に利用されたのではないかと推察された。さらに、外因性の ATP も精子の運動能および耐凍能を著しく向上させる因子であることを明らかにした。以上のことより、ラット精子凍結保存においては、凍結前に精子の運動能や代謝能を向上させた乳酸および ATP を保存液に添加することが重要で、さらに、精子の運動制御に関与する活性化因子を突き止めることができれば、融解後の運動性と生存性が改善できることが強く示唆された。

第 4 章 精子運動活性化因子の検索による凍結保存液の改良・開発

前章までの結果で、乳酸は、ラット精子のエネルギー基質として ATP 合成のためミトコンドリアにおける呼吸系での利用に用いられ、さらに、外因性の ATP も精子の運動能を著しく向上させる因子であることを明らかにした。一方、ATP は、鞭毛軸糸に存在するダイニン ATPase により加水分解され、そのエネルギーが微小管に作用することは知られている。微小管の運動の調節機構は、種の違いによって様々な経路が考えられ、不明瞭な点が多いが、精子内の Ca^{2+} 濃度や cAMP のレベルが関与していると報告されている。そこで本章では、ラット精子の運動能を促進させる作用のある活性化因子を検索し、凍結精子の運動性や生存性をさらに向上させることを目的とした。まず、精子内カルシウムイオン濃度を上昇させる作用があるイオノマイシンを、ATP を含まない、あるいは含めた乳酸・ラフィノース・卵黄-mKRB 保存液に添加した場合の凍結精子の運動性に及ぼす影響を検討した。次に、精子内の cAMP レベルを高く維持する作用がある膜透過性のアナログ dibutyryl cyclic AMP (dbcAMP) を、ATP を含まない、あるいは含めた乳酸・ラフィノース・卵黄-mKRB 保存液に添加した場合の凍結精子の運動性および先体の正常性に及ぼす影響した。

さらに、イオノマイシンおよび dbcAMP がミトコンドリアでの酸化的リン酸化反応に関与しているか否かを調べるため、それらの因子を ATP・乳酸・ラフィノース・卵黄-mKRB 溶液に添加した場合の精子の酸素消費量に及ぼす影響についても検討した。

その結果、高い濃度のイオノマイシン (2 μM) を乳酸・ラフィノース・卵黄-mKRB 保存液に添加した場合、凍結前後の精子の運動性は低下した (表 4. A)。また、ATP を含む保存液にイオノマイシンを添加した場合の凍結前後の精子の運動性は、イオノマイシンを添加していない区の値との間には有意な差は認められなかったが、1 μM のイオノマイシン添加区の融解後の運動性は、対照区の結果に比較して高い値を示す傾向が認められた (表 4. B)。dbcAMP を乳酸・ラフィノース・卵黄-mKRB 保存液に添加した場合の凍結前後の精子の運動性は、dbcAMP を含まない区の値に比較して有意に低い値を示した (表 5. A)。一方、100 μM dbcAMP を、ATP を含む乳酸・ラフィノース・卵黄-mKRB 保存液に添加した場合、採精後と融解後の精子の運動性は $43.3 \pm 2.8\%$ と最も高い値を示し (表 5. B)、3 時間加温した後の運動性、直線速度、および頭部振幅は、dbcAMP を添加していない処理区の値に比較して有意に高い値を維持することが認められた (図 14)。イオノマイシンおよび dbcAMP を添加した区の酸素消費量は、対照区の値に比較して有意な差は認められなかった (図 15)。

以上の結果より、100 μM dbcAMP を、ATP を含む乳酸・ラフィノース・卵黄-mKRB 保存液に添加すると、酸素消費量の向上は認められなかったが、採精後および凍結融解後の精子の運動性や生存性が著しく向上することが認められた。このことは、dbcAMP が精子のミトコンドリアでの酸化的リン酸化反応の促進に関与したものではなく、精子内の cAMP のレベルの向上が、ATP を分解するダイニン ATPase を活性化し、凍結前の精子の運動性を促進させ、その結果、融解後の運動性や生存性を向上させたと推察された。以上のことより、精子のエネルギー基質である乳酸、エネルギー源である ATP、さらに精子運動活性化因子の dbcAMP を組み合わせた保存液を用いて凍結すると、ラット精子の耐凍能が飛躍的に向上することが示された。

第 5 章 保存精子の受精能および受胎能の評価

本章では、前章で新規に改良・開発した ATP・dbcAMP 添加 乳酸・ラフィノース・卵黄-mKRB 保存液を用いて凍結した精子の受精能および受胎能の評価と高い受精率を得られるラット体外受精培地の改良・開発することを目的とした。まず、現行のラット体外受精および体外発生法が、新鮮、あるいは凍結精子を用いた場合の受精率と胚の発生率に及ぼす影響について検討した。次に、前章までの実験において、保存液中に ATP と dbcAMP が含まれることにより凍結前の精子の運動性が向上することが示された。この結果を踏まえると、受精培地に ATP と dbcAMP を添加することにより、受精前の精子の運動性を活性化させ、新鮮あるいは凍結精子を用いた体外受精においても卵子への精子侵入率や受精率

向上に繋がる可能性がある。そこで、受精培地への ATP および dbcAMP 添加が体外受精率と胚の体外発生率に及ぼす影響についても検討した。さらに、新鮮および凍結精子を用いた子宮内人工授精を行い、それら精子の受胎能を評価した。

その結果、新鮮精子を用いて従来の方法にて体外受精率および発生率を検討した結果、精子侵入卵子率は、55.5%、前核形成率は 48.6%であり、胚盤胞期胚への発生率は 22.6%であった。一方、受精培地に ATP および dbcAMP を添加した場合、精子侵入卵子率、前核形成率、胚盤胞期胚への発生率は、それぞれ 75.7%、66.7%、33.7%であり、ATP・dbcAMP 無添加区とこの両者間に有意な差が認められた (表 6)。次に、凍結融解精子を ATP および dbcAMP 添加培地にて体外受精を行い、受精率および胚盤胞期への発生率を調べたところ、卵子への精子侵入が認められ(3.9%)、また、胚盤胞期胚への発生も認められた(0.9%)。凍結保存精子を用いて子宮内人工授精による産子率について検討した結果、対照区である新鮮精子を移植した場合、6 匹中 3 匹 (50%) の正常な妊娠 17 匹の産子が認められた。しかし、保存精子を用いて精子を移植した 27 匹全てにおいて、正常な妊娠および産子を得られていない (表 7)。

以上の結果より、ラット新鮮精子を用いた体外培養系には、受精培地に ATP・dbcAMP を添加すると著しく受精率および発生率が向上されることが明らかにされた。また、凍結精子を用いた場合においても、その有効性は認められた。しかし、保存精子を用いた人工授精においては産子を獲得することはできていない。これらのことから、本研究の成果を基礎とし、さらなる改良を行うことにより、より受精可能な精子の凍結保存法が開発されると確信している。

第 6 章 総括

ラット精子の凍結保存法を開発することを目的に、精子凍結保護液の開発、精子運動能およびエネルギー利用・供給の解明、精子運動活性化因子の検索による凍結保存液の改良・開発、さらに、保存精子の受精能および受胎能の評価を検討した。得られた主な結果は以下の通りである。

1. 概知のラクトース卵黄保存液に代わる新たなラット精子の 1 次および 2 次希釈液の基盤となる凍結保存液として、ラフィノース添加卵黄-mKRB 保存液を開発し、2 次希釈液の凍結保護剤として Equex STM を用いた保存液を開発した。
2. 乳酸の最終濃度が 32.37 mM になるように、ラフィノース・卵黄-mKRB 保存液に添加した凍結保存液を改良した。さらに、これを基に精子のエネルギー源である ATP を添加した乳酸・ラフィノース添・卵黄-mKRB 保存液を開発した。また、ラット精子において乳酸は、中片部のミトコンドリアに局在する LDH-C により酸素消費が促進され、

その結果、中片部の屈曲が増し、頭部の振幅が大きい精子の運動が維持されることを明らかにした。

3. ラット精子の凍結保存には、エネルギー源である ATP を保存液に添加し、さらに精子内の cAMP 濃度を上昇させる効果のある dbcAMP を同時に添加することにより、融解後の運動性、および生存性の向上に有効な dbcAMP・ATP・乳酸・ラフィノース・卵黄-mKRB 保存液を開発した。
4. ラット新鮮精子を用いた体外受精および培養法には、受精培地に ATP および dbcAMP を添加することにより、受精率および胚の発生率が著しく向上されることを明らかにした。さらに、体外受精培地を改良することにより、凍結精子の受精能を向上させることが可能であることを示した。しかし、保存精子を用いた人工授精において産子を獲得することはできていない。

本研究において開発されたラット精子凍結保存法は、耐凍能が極めて低いラット精子を用いた体外受精においても有効な技術であり、この技術がさらに改良されれば、人工授精においても有効な技術となる可能性があり、ラット遺伝資源の維持・保存技術として広く普及するものと期待される。

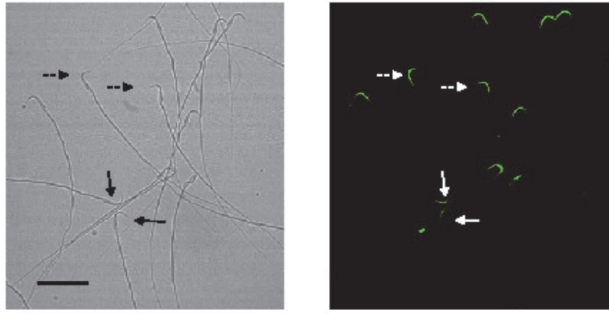


Figure 1 Photographs of rat sperm acrosomes stained with FITC-PNA

The sample field of image A was obtained with a laser confocal microscope. The sample field of image B was obtained with a fluorescence microscope.

—→ : Intact acrosome
 - - - -> : Partially damaged
 Scale bar = 30µm.

Table 1 Effect of raffinose dissolved in distilled, deionised water, PBS or mKRB containing 20% egg yolk on the motility and acrosome integrity of frozen-thawed rat sperm.

Basic medium	Raffinose concentration (M)	Sperm motility (%)		Post-thawing intact acrosome(%)
		After collection	Post-thawing	
Distilled, Deionised water	0	0±0 ^a	0±0	74.3±2.7
	0.1	0±0 ^a	0±0	75.6±2.3
	0.2	74.0±2.0 ^b	0±0	76.6±1.3
PBS	0	92.6±2.3 ^a	0±0	68.3±3.7
	0.1	88.3±1.6 ^a	0±0	72.0±1.5
	0.2	61.6±4.4 ^b	0±0	74.0±3.0
mKRB	0	93.3±1.6 ^a	6.0±0.5 ^a	82.0±1.5
	0.1	90.0±2.8 ^a	15.6±7.2 ^a	86.0±2.0
	0.2	78.3±4.4 ^b	4.6±1.4 ^b	83.0±3.4

Values are mean ± SEM (n=3). ^{a-b} Different superscripts within the same column denote significant differences ($P < 0.05$).

Table 2 Effect of different concentrations of glycerol (A) and Equex STM (B) added to 0.1 M raffinose-mKRB egg yolk extender on sperm motility and acrosome integrity.

(A)				(B)			
Glycerol concentration (%)	Sperm motility (%)		Post-thawing intact acrosome(%)	Equex STM concentration (%)	Sperm motility (%)		Post-thawing intact acrosome(%)
	After collection	Post-thawing			After collection	Post-thawing	
0		9.0±1.0 ^a	85.0±1.7 ^a	0		11.0±2.0 ^a	84.6±2.4 ^a
1	89.3±0.6	5.6±1.2 ^a	78.6±3.4 ^{ab}	1	89.3±0.6	23.3±6.6 ^{ab}	87.0±1.0 ^{ab}
2		4.6±0.3 ^b	76.0±3.0 ^b	1.5		39.3±2.3 ^c	89.3±0.6 ^b
4		5.0±1.1 ^{ab}	71.6±2.0 ^b	2		28.3±4.4 ^{bc}	86.3±0.8 ^{ab}
8		1.0±0.5 ^c	71.6±0.8 ^b				

Values are mean ± SEM (n=3), respectively. ^{a-c} Different superscripts within the same column denote significant differences ($P < 0.05$).

Table 3 Effect of different sugars added to the mKRB-egg yolk extender on sperm motility and acrosome integrity.

Sugar	Sperm motility (%)		Post-thawing intact acrosome(%)
	After collection	Post-thawing	
Raffinose	91.0±2.0	38.0±4.1 ^a	86.3±0.8 ^a
Trehalose	91.6±2.0	34.3±2.3 ^a	85.3±0.8 ^{ab}
Lactose	91.0±2.0	22.6±5.3 ^b	81.3±1.3 ^{bc}
Fructose	91.0±2.0	9.3±0.6 ^c	78.0±1.0 ^{cd}
Glucose	91.6±2.0	7.0±1.0 ^c	75.0±2.8 ^d

Values are mean ± SEM (n=3). ^{a-d} Different superscripts within the same column denote significant differences ($P < 0.05$).

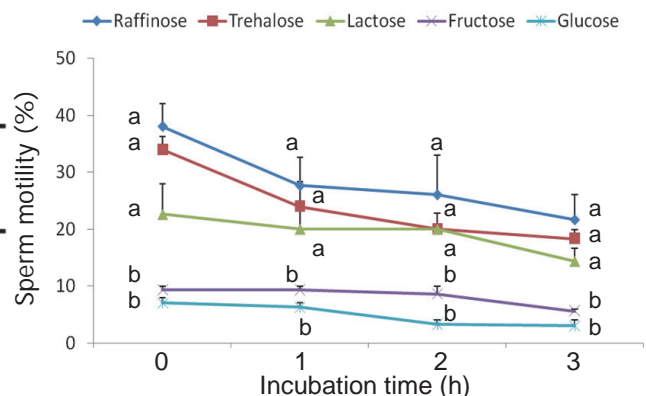


Figure 2 Motility of frozen-thawed sperm which were frozen in different sugars dissolved in an mKRB-egg yolk, and then subjected to a thermal resistance test at 37°C. Values are the mean ±SEM (n=3). ^{a-b} Different superscripts within the same column denote significant differences ($P < 0.05$).

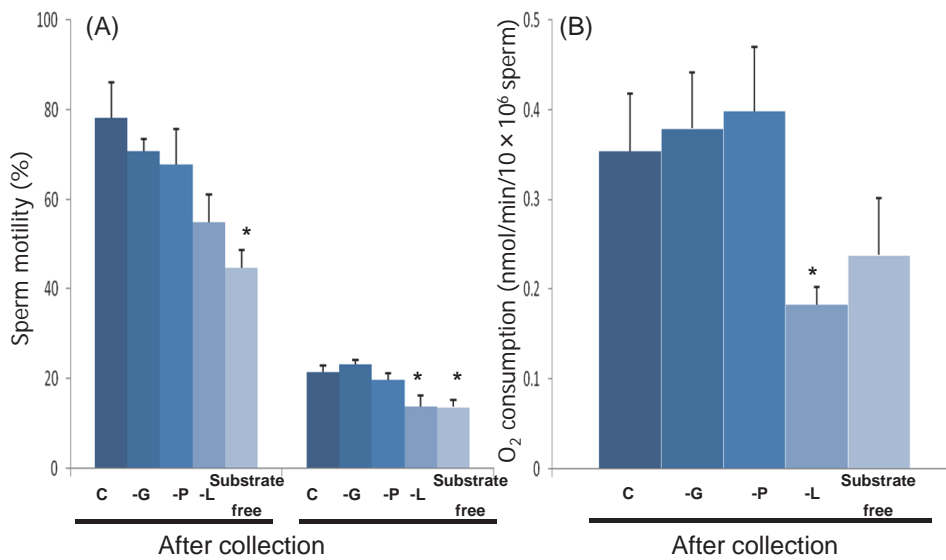


Figure 3 Effect of substrates in raffinose-mKRB egg yolk extender with or without glucose, pyruvate and lactate on the after collection and post-thawing sperm characteristics (A) and oxygen consumption of after collected sperm during incubation at 37°C for 10 min (B). Indicates C; control, G; glucose, P; pyruvate, L; lactate. Values are mean ± SEM (n=5), respectively. Statistical difference ($P < 0.05$) in comparisons to control are marked (*).

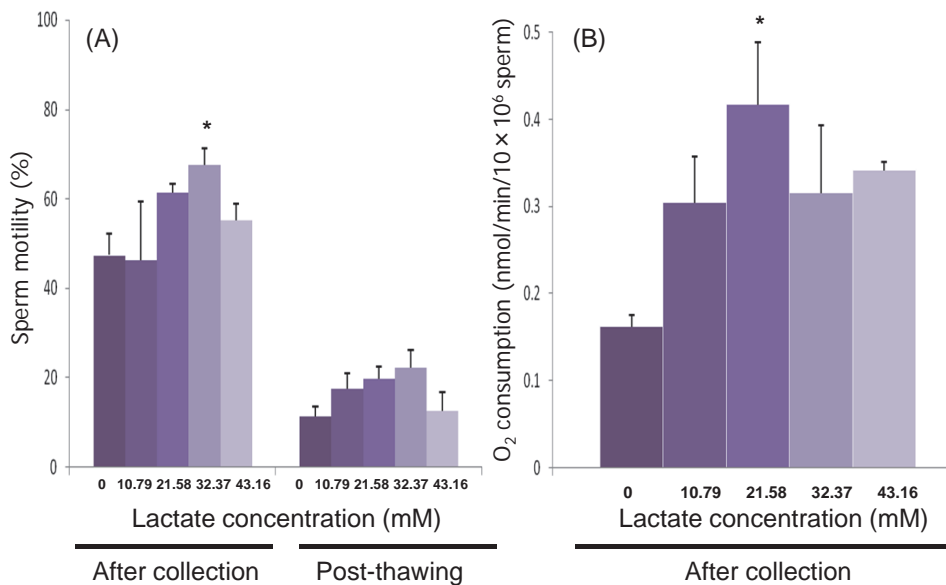


Figure 4 Effect of different concentrations of lactate in raffinose-mKRB egg yolk extender on the after collection and post-thawing sperm characteristics (A) and oxygen consumption of after collected sperm during incubation at 37°C for 10 min (B). Values are mean ± SEM (n=5), respectively. Statistical difference ($P < 0.05$) in comparisons to control are marked (*).

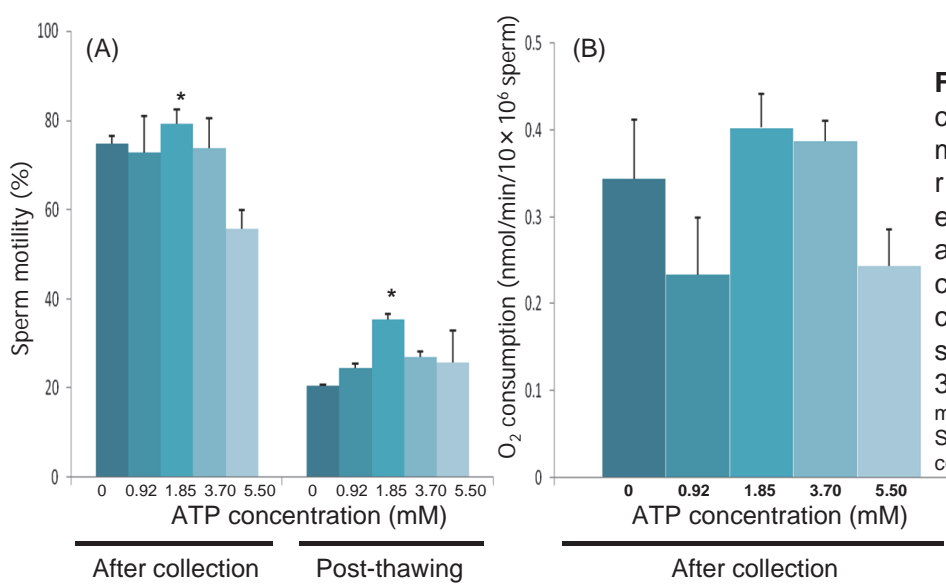


Figure 5 Effect of different concentrations of ATP in 32.37 mM lactate containing raffinose-mKRB egg yolk extender on the after collection and post-thawing sperm characteristics (A) and oxygen consumption of after collected sperm during incubation at 37°C for 10 min (B). Values are mean ± SEM (n=5), respectively. Statistical difference ($P < 0.05$) in comparisons to control are marked (*).

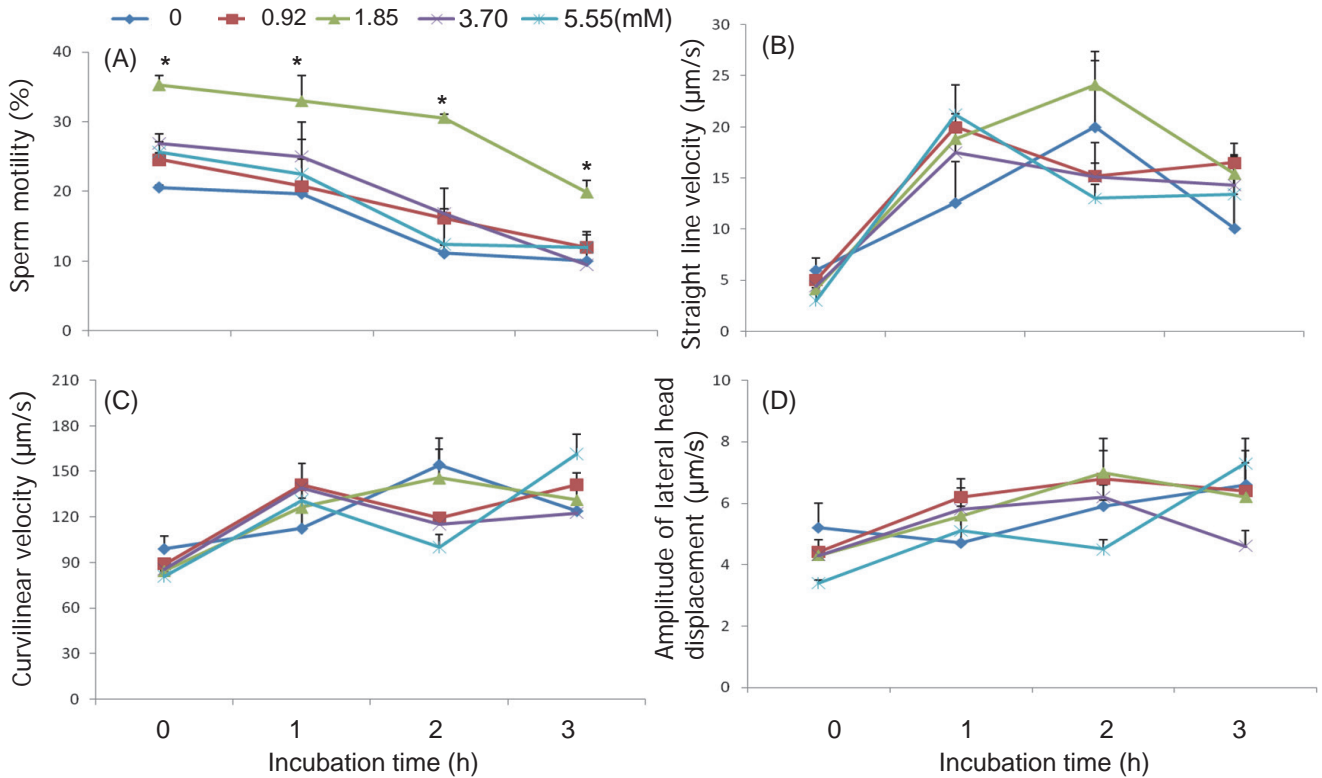


Figure 6 Effect of different concentrations of ATP in 32.37 mM lactate containing raffinose-mKRB egg yolk extender on the post-thawing sperm motility (A), straight line velocity (B), curvilinear velocity (C), and amplitude of lateral head displacement (D) during incubation at 37°C for 3 h. Values are mean \pm SEM (n=3). Statistical difference ($P < 0.05$) in comparisons to control are marked (*).

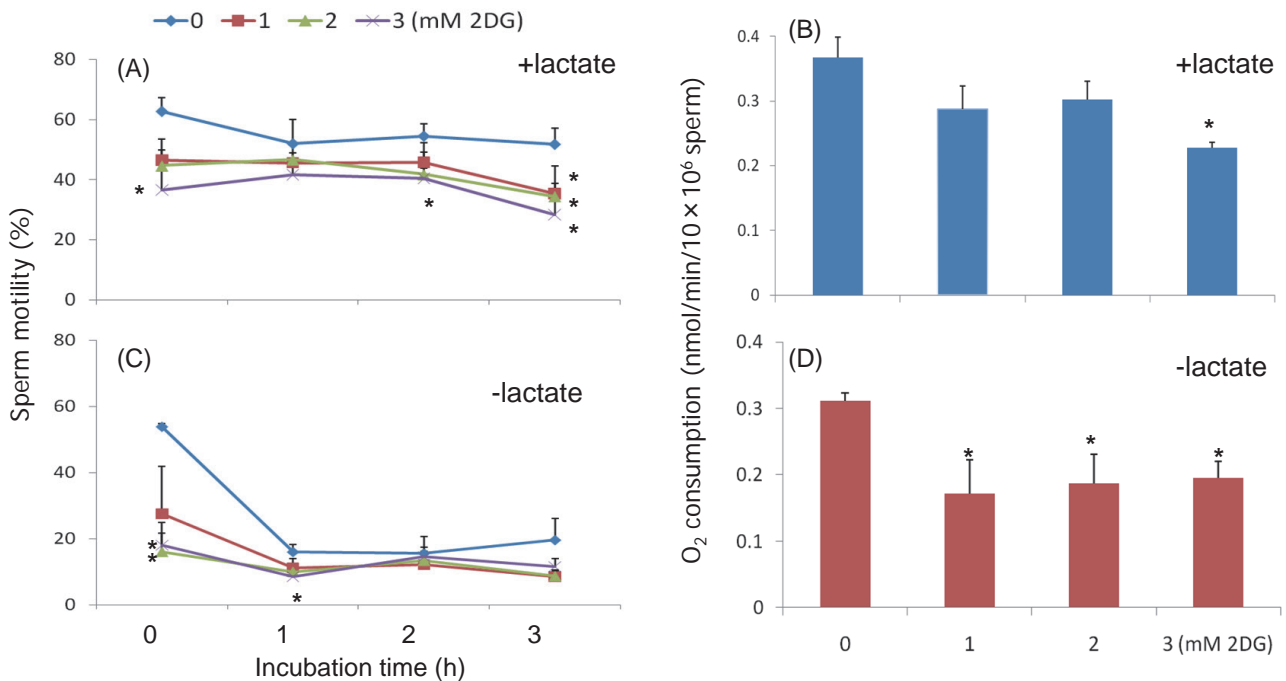


Figure 7 Effect of presence or absence of lactate in raffinose-mKRB egg yolk extender on the after collected sperm motility during 3 h incubation at 37°C (A and C) and oxygen consumption of after collected sperm during incubation at 37°C for 5 min (B and D) by using different concentrations of 2-deoxy-d-glucose (2DG). Values are mean \pm SEM (n=3), respectively. Statistical differences ($P < 0.05$) in comparisons to control are marked (*).

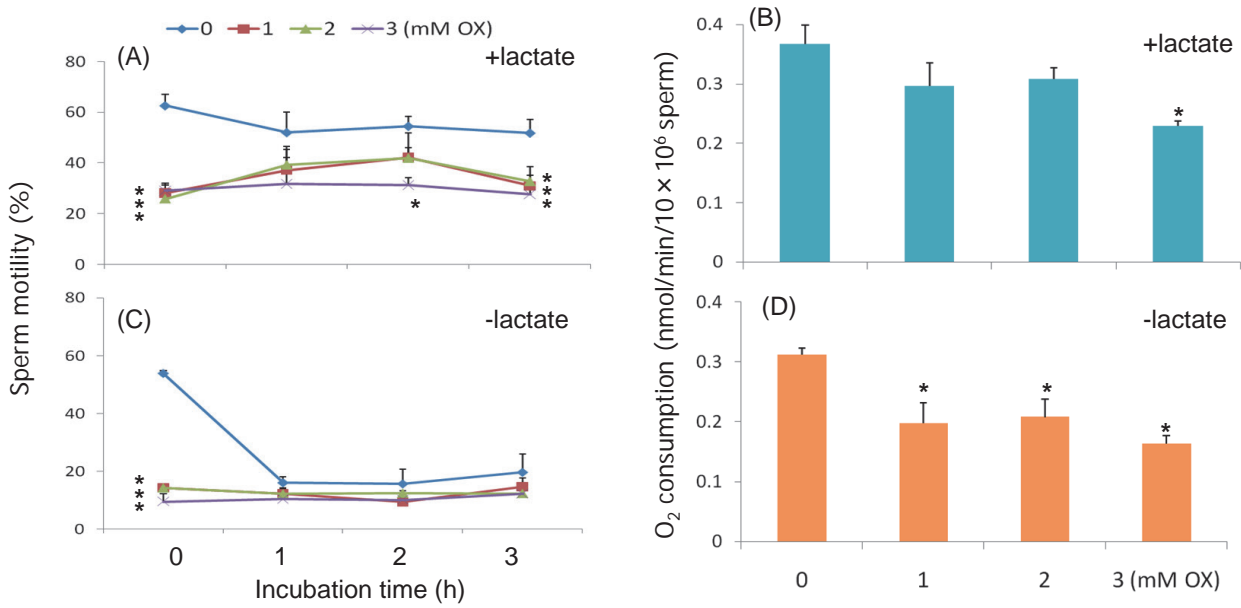


Figure 8 Effect of presence or absence of lactate in raffinose-mKRB egg yolk extender on the after collected sperm motility during incubation at 37°C for 3 h (A and C) and oxygen consumption of after collected sperm during incubation at 37°C for 5 min (B and D) by using different concentrations of sodium oxamate (OX). Values are mean ± SEM (n=3), respectively. Statistical differences ($P < 0.05$) in comparisons to control are marked (*). Measurement was carried out using the same sperm as used in figure 7, respectively.

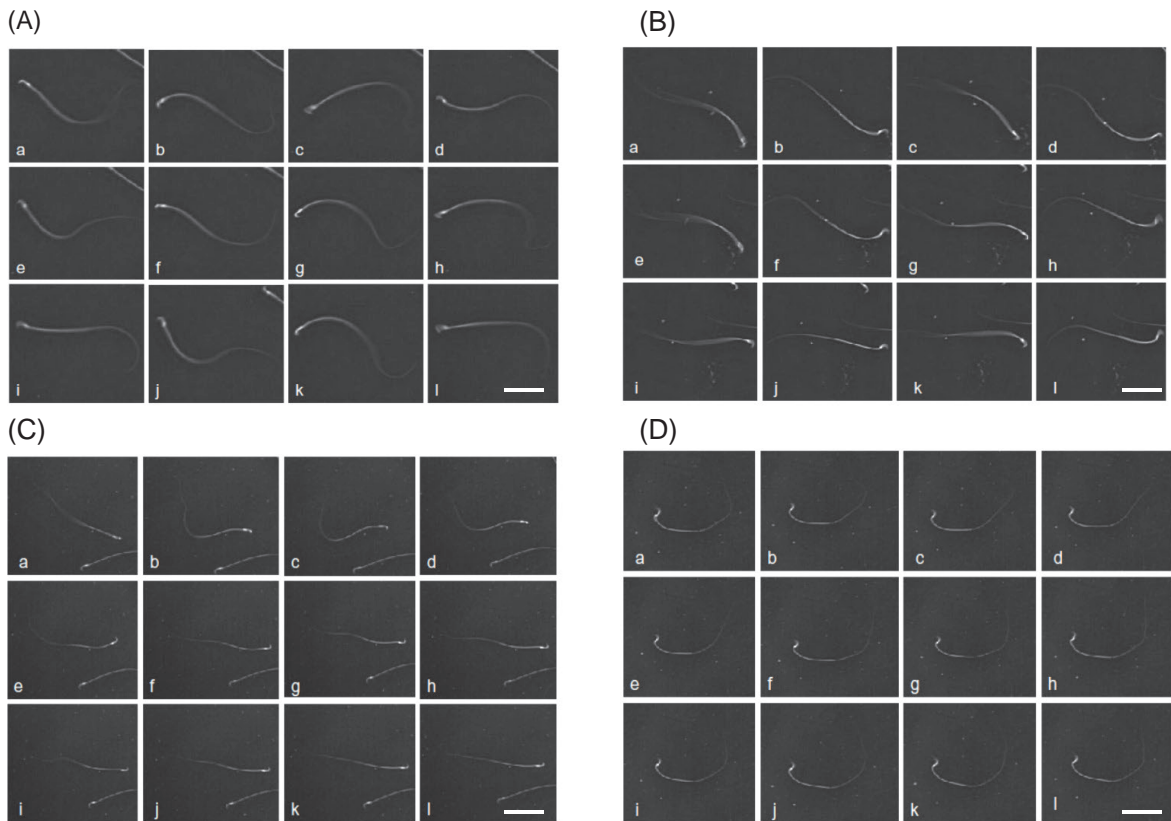


Figure 9 Representative patterns of rat sperm movement which were extended in the presence (A) or absence (B and C) of lactate in raffinose-mKRB egg yolk solution. In D, sperm was incubated at 37°C for 3 h in the lactate containing solution. Panels a to l indicate the turn. Scale bars = 50µm

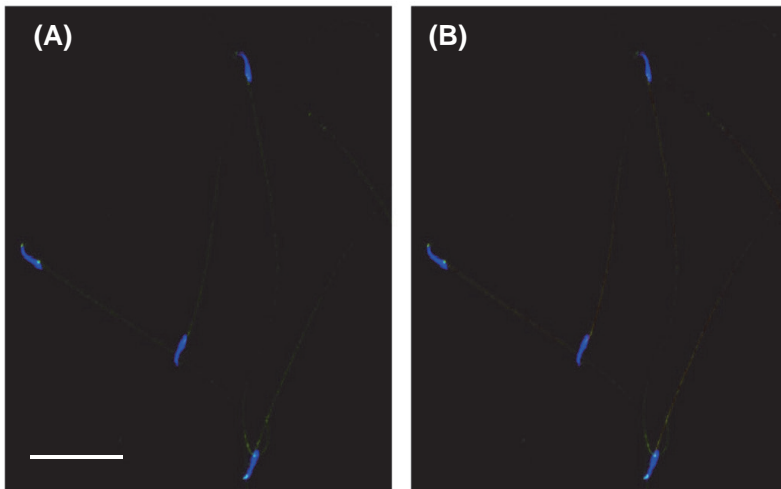


Figure 10 Immunofluorescent localization of LDH-C to the mitochondria of the rat sperm using goat-anti polyclonal antibody. The head of sperm was identified by staining with 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI). The mitochondria of sperm was identified by labeling with Mito Tracker Red CMXRos. (A) Merged images of DAPI with FITC. (B) Merged images of DAPI, FITC, and Mito Tracker. Scale bar = 50 μ m.

Table 4 Effect of different concentrations of ionomycin in lactate-raffinose mKRB egg yolk extender with (A) or without ATP (B) on the motility and acrosome integrity of frozen-thawed rat sperm.

(A)			(B)		
Ionomycine (μ M)	Sperm motility (%)		ATP+ Ionomycine (μ M)	Sperm motility (%)	
	After collection	Post-thawing		After collection	Post-thawing
0	75.0 \pm 4.0	23.6 \pm 4.5	0	73.9 \pm 8.0	31.4 \pm 3.6
0.5	72.5 \pm 6.1	16.8 \pm 3.3	0.5	78.9 \pm 2.4	31.9 \pm 4.7
1	71.5 \pm 6.8	22.5 \pm 1.4	1	77.4 \pm 0.2	35.9 \pm 1.7
1.5	67.8 \pm 5.6	13.6 \pm 2.4	1.5	71.2 \pm 9.9	25.4 \pm 2.4
2	58.2 \pm 15.3	10.9 \pm 5.0	2	76.6 \pm 2.9	27.6 \pm 7.3

Values are mean \pm SEM (n=3), respectively.

Table 5 Effect of different concentrations of dbcAMP in lactate-raffinose mKRB egg yolk extender with (A) or without ATP (B) on the motility and acrosome integrity of frozen-thawed rat sperm.

(A)			(B)			
dbcAMP (μ M)	Sperm motility (%)		ATP+ dbcAMP (μ M)	Sperm motility (%)		Post-thawing intact acrosome (%)
	After collection	Post-thawing		After collection	Post-thawing	
0	69.1 \pm 4.8	17.0 \pm 2.1	0	63.3 \pm 9.1	28.5 \pm 8.3	76.0 \pm 7.8
100	54.6 \pm 6.8	10.2 \pm 1.7 *	100	80.0 \pm 5.8	43.3 \pm 2.8	77.7 \pm 8.2
200	53.0 \pm 2.2 *	15.7 \pm 2.0	200	71.4 \pm 10.7	34.9 \pm 3.3	76.9 \pm 4.6
300	44.8 \pm 1.1 *	9.9 \pm 1.6 *	300	52.5 \pm 15.1	29.0 \pm 3.8	71.4 \pm 8.0
400	42.5 \pm 6.9 *	10.3 \pm 2.2 *	400	29.6 \pm 9.9 *	14.1 \pm 0.9 *	69.3 \pm 7.1

Values are mean \pm SEM (n=3), respectively. Statistical difference ($P < 0.05$) in comparisons to control are marked (*).

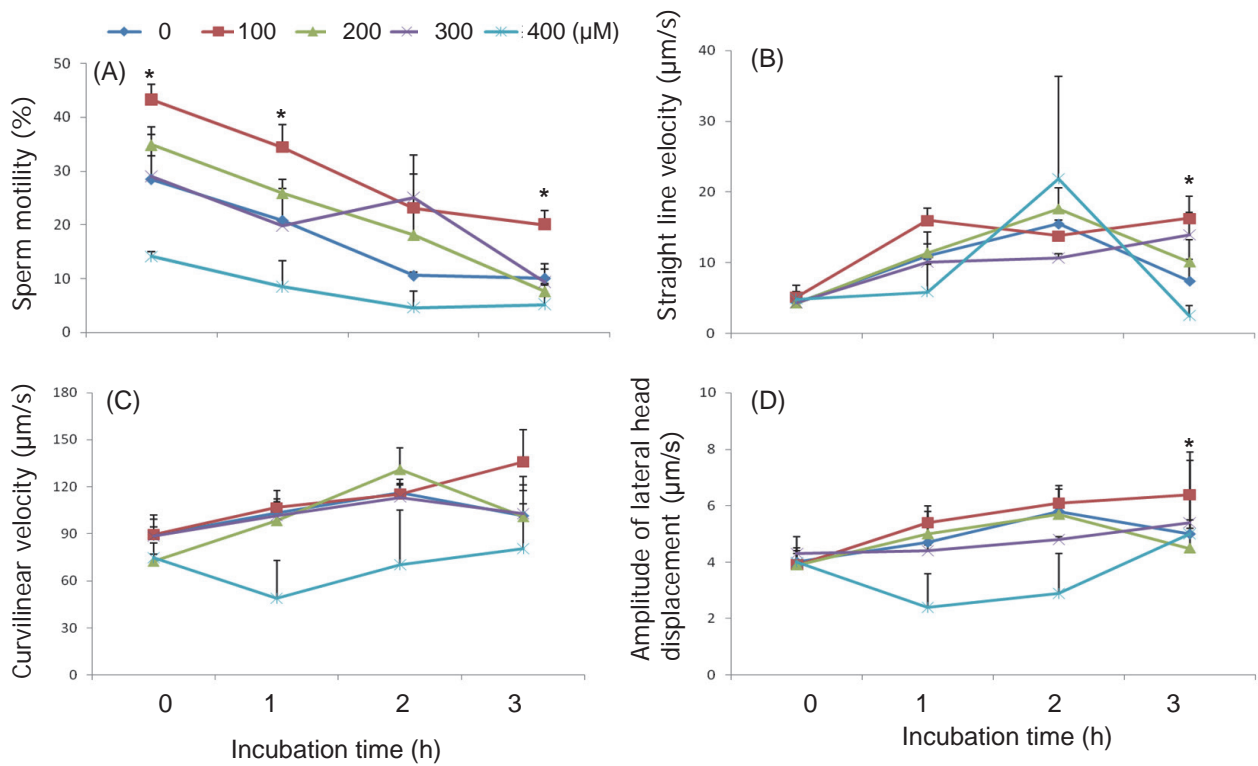


Figure 14 Effect of different concentrations of dbcAMP in ATP and lactate containing raffinose-mKRB egg yolk extender on the post-thawing sperm motility (A), straight line velocity (B), curvilinear velocity (C), and amplitude of lateral head displacement (D) during incubation at 37°C for 3 h. Values are mean ± SEM (n=3). Statistical difference ($P < 0.05$) in comparisons to control are marked (*).

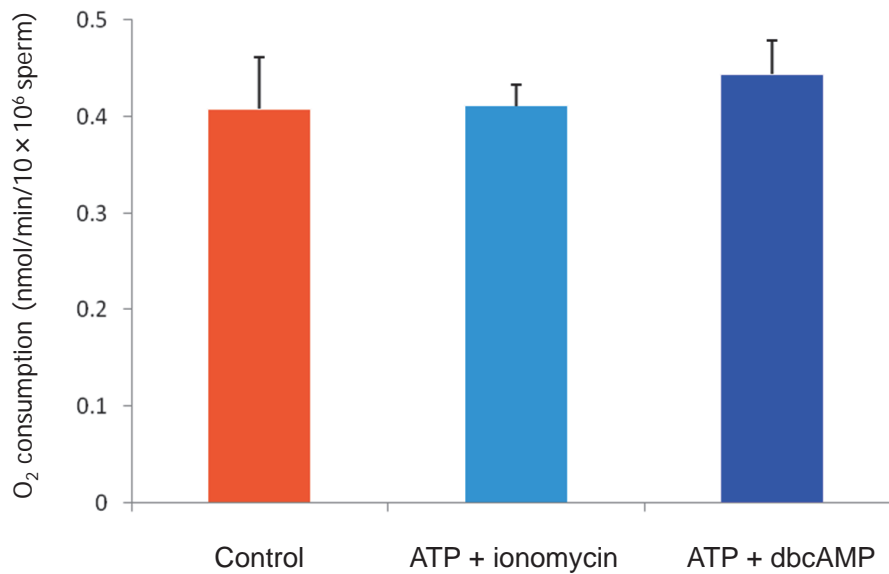


Figure 15 Effect of dbcAMP in ATP and lactate containing raffinose-mKRB egg yolk extender on the oxygen consumption of sperm after collection during incubation at 37°C for 10 min. Values are mean ± SEM (n=3).

Table 6 Development of oocytes after *in vitro* fertilization with fresh and cryopreserved rat sperm.

Sperm	No. (%) ^a of oocytes examined						
	ATP+ dbcAMP	Total	Penetration rate (%)	Pronuclear formation(%) ^b	2-cells(%)	4-cells(%)	Blastocyst (%)
Fresh sperm	-	146	81 (55.5) ^c	71 (48.6) ^c	70 (48.0) ^c	57 (39.0) ^c	33 (22.6) ^c
	+	169	128 (75.7) ^d	113 (66.7) ^d	114 (67.5) ^d	104 (61.5) ^d	57 (33.7) ^d
Frozen sperm	-	132	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	+	102	4 (3.9)	4 (3.9)	4 (3.9)	1 (0.9)	1 (0.9)

^a = Percentage of total number of oocytes examined.

^b = Two pronuclei with a sperm tail.

^{cd} Values with different superscripts within the same column are significantly different ($P < 0.05$).

Table 7 Results of intrauterine insemination with fresh and cryopreserved rat sperm.

Inseminated sperm	No. of pseudopregnant females used	No. of animals that delivered live pups (%) ^a	No. of live pups
Fresh sperm	6	3 (50)	17
Frozen sperm	27	0	0

^a = No. of animals that delivered live pups / No. of pseudopregnant females used × 100

論文審査結果要旨

ラットは適生体機能モデルや疾患モデルとして利用される重要な実験動物である。また、数百系統に及ぶ遺伝子改変ラットが作製され、今後もその数は加速度的な勢いで増加することが予想される。しかし、ラットの効率的維持、安定した供給において極めて重要な技術である精子の凍結保存技術は未だ実用化に至っていない。それ故、ラット精子の凍結保存技術の開発は急務となっており、その技術が実用可能になれば、開発の意義は計り知れない。そこで本研究では、ラット精子凍結保存法の開発と凍結精子による人工授精と体外受精技術の確立を目的として実験を行った。

その結果、(1) 概知のラクトース卵黄保存液に代わる新たなラット精子の1次、および2次希釈液として、ラフィノース・卵黄-修正クレブス-リンガー重炭酸液 (modified Krebs-Ringer Bicarbonate ; mKRB) 保存液を開発し、2次希釈液としてEquex STMを開発した。(2) ラット精子のエネルギー利用と供給に着目し、乳酸を添加したラフィノース・卵黄-mKRB凍結保存液を改良した。さらに、これを基に精子のエネルギー源であるATPを添加した乳酸・ラフィノース・卵黄-mKRB保存液を開発した。(3) 精子運動活性化作用を有する物質に着目し、精子内のcAMP濃度を上昇させる効果のあるdbcAMPを添加したdbcAMP・ATP・乳酸・ラフィノース・卵黄-mKRB保存液を開発した。(4) ラット新鮮精子を用いた体外受精および培養法において、ATPおよびdbcAMPを添加した受精培地を開発し、従来の方法に比較して、高い受精率と胚の発生率を得ることを可能にした。さらに、凍結保存精子においても、開発した受精培地を用いることにより、受精可能であることを証明した。

以上、本研究において開発されたラット精子凍結保存液は、耐凍能が極めて低いとされるラット精子の凍結保存に有効であるばかりではなく、開発した受精培地は凍結保存精子を用いた体外受精においても有効な培地であることを示した。これらのことから、本研究により得られた知見と技術は、ラットの保存及び安定供給のため大きく貢献するものであり、高く評価できる。よって、審査員一同は、博士(農学)の学位授与に値するものと判断した。