

長期保存された遺伝子改変ウサギ凍結精子の受精能の検討

西島和俊¹、山口慎二¹、森本正敏²、渡辺照男¹、北嶋修司¹

¹佐賀大学総合分析実験センター、²熊本保健科学大学リハビリテーション学科

【背景と目的】 遺伝子工学、生殖工学技術の進歩により、多くの遺伝子改変動物が作製され、生物学、医学研究の分野で広く用いられている。このような実験動物をバイオリソースとして維持・保存する必要性が高まり、その手段として個体による系統維持のほか、凍結胚・凍結精子の保存が行われている。

佐賀大学ではヒト病態モデル動物として、遺伝子改変ウサギを開発すると共に、その維持・保存に取り組んできた。ウサギは射出精液の採取が容易であることから、凍結精子による系統の保存が最も効率的であると考えられる。液体窒素中に保存された凍結精子は半永久的に保持できるとされるが、遺伝子改変ウサギにおいて、長期にわたる凍結保存の信頼性については検討されていない。そこで、現在長期保存中の遺伝子改変ウサギの凍結精子の受精能について検討した。

【材料および方法】 約 5 年 7 カ月間凍結保存されていたヒトリゴ蛋白リパーゼ (hLPL) 遺伝子導入ウサギの精子を用いた。精液は人工膺により採取し、精子数、精子運動率を計測後、運動精子数を 600×10^6 個/mL となるように調整した。調整した精液を 20% Egg-yolk HEPES extender (EYH) で希釈後、 $-0.2^\circ\text{C}/\text{分}$ の速度で室温から 5°C まで冷却した。精液をストローに充填し、 4°C に 30 分、液体窒素蒸気中に 15 分間静置後、液体窒素中に浸漬して保存した。凍結精液の溶解はストローを 37 度の温湯中に 30 秒浸漬することにより行った。融解した精液中の精子数、精子運動率を計測後、運動精子数が 40×10^6 個/mL となるように調整し、 $0.5\text{mL}/\text{匹}$ を未経産メス日本白色種ウサギ 5 匹に人工授精した。受精能の評価は、人工授精後の妊娠率、平均リッターサイズ、離乳率を指標とした。

【結果および考察】 人工授精に用いた凍結融解後の精子の運動率は 36.3% で、同サンプルを凍結後ただちに融解した時の運動率 (41.7%) に比較して顕著な下降は見られなかった。人工授精した 5 匹の内 3 匹が妊娠・出産した (妊娠率 60.0%)。平均リッターサイズは 5.3 匹、離乳率は 87.5% であった。離乳仔ウサギはオス 10 匹とメス 5 匹で、PCR によるジェノタイピングの結果、オス 6 匹とメス 2 匹が hLPL 遺伝子陽性であった。同じ種オスウサギの新鮮精子を人工授精 (10×10^6 個/匹) した場合には、妊娠率が 62.5%、平均リッターサイズが 6.6 匹、離乳率が 75.8% であった。

本研究では人工授精で用いた精子の量が異なるため、凍結精子と新鮮精子の受精能を直接比較することは出来ないが、5 年 7 カ月間凍結保存された精子でも良好な受精能を維持していることが明らかとなった。