

微生物汚染リスクの低いラット精子凍結保存液を開発 —凍結融解精子から体外受精で産仔作出に成功—

概要

京都大学大学院医学研究科 守田昂太郎 特定助教（研究当時、現：理化学研究所バイオリソース研究センター研究員）、浅野雅秀 同教授（研究当時、現：同研究員）、理化学研究所バイオリソース研究センター 持田慶司 特別嘱託技師、小倉淳郎 同副センター長、井上貴美子 同室長らの共同研究グループは、卵黄などを含まない化学的組成が明らかなラット精子用の凍結保存液を開発し、この保存液で凍結したラット精子を用いて、体外受精により効率よく産仔を得ることに成功しました。従来のラットの精子凍結には、凍結保護効果が古くから知られている鶏の卵黄や細胞毒性の高い試薬が用いられていました。特に卵黄の使用には、サルモネラ菌¹⁾などによる汚染リスクがあり、成分もロット毎に異なるため再現性にも問題がありました。当研究グループは、卵黄や細胞毒性の高い物質を用いず、様々な凍結保護剤²⁾の効果を検討し、凍結融解後のラット精子の運動性や細胞膜の損傷を調べることで、化学的組成が明らかな凍結保存液の開発に成功しました。この凍結保存液で凍結したラット精子を融解後、体外受精に用いたところ、卵子の約70%が受精しました。さらに、得られた受精卵を胚移植したところ、移植した受精卵の約36%から産仔が得られ、実用的な繁殖成績を示しました。

本研究成果は、2026年9月16日に、国際学術誌「*Biology of Reproduction*」にオンライン掲載されました。



作成者：守田昂太郎（イラストの生成に OpenAI ChatGPT Images 2.5 を使用）

1. 背景

遺伝子改変技術³⁾の進歩により、マウスやラットは現在、生命科学・医学研究に欠かせない実験動物となっています。しかし、その飼育には多くの費用とスペースが必要なため、研究終了後には、受精卵や精子を凍結し、貴重な遺伝子資源として液体窒素中で長期保存します。ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) ラット⁴⁾を運営している京都大学のグループは、国内外の研究機関とラット系統の授受を生体で行うことが多く、もし凍結精子による輸送が主流になれば、生体輸送に伴う微生物汚染のリスクと輸送コストを低減することができます。マウスの生殖工学技術⁵⁾は長年にわたって発展し、多くの研究者が利用する汎用性のある技術として確立しており、凍結精子での輸送は頻繁に行われています。しかし、ラットの生殖工学技術の開発はなお発展途上にあり、受精卵や精子の凍結保存についても更なる技術開発が進められています。特に現在用いられているラットの精子凍結液は、鶏の卵黄を含むことからサルモネラ菌などの汚染リスクがあります。また、詳細な組成が市販品のため非公開で細胞毒性のある **Orvus ES Paste (OEP)**⁶⁾を含むことに加え、卵黄の成分はロット毎に異なるため、再現性にも懸念がありました。これらの問題を解決するために、当研究グループは、卵黄や OEP を用いずに化学的組成が明らかなラット精子の凍結保存液の開発に取り組みました。

2. 研究手法・成果

従来のラットの精子凍結保存液はラクトース⁷⁾水溶液に卵黄と OEP を加えた組成ですが、新しい凍結保存液の作製では、最初に、ラクトース水溶液のみで精子を凍結し、融解後の精子の運動性を調べ、最適なラクトース濃度を検討しました。次に、様々な凍結保護剤 (OptiPrep⁸⁾、エチレングリコール⁹⁾など) について濃度や組み合わせを変えて添加し、ラット精子の凍結融解後の運動性が最も高い組み合わせを見出しました。また、細胞膜の保護剤として知られるセリシン¹⁰⁾を加えることで精子の先体¹¹⁾への損傷が軽減されることも確認しました。さらに、精子の運動性を活性化させる ATP¹²⁾や dbcAMP¹³⁾を添加して融解後の精子の運動性が改善されることも確認しました。

本研究で開発した凍結保存液を用いてラット精子を液体窒素中に保存し、その後融解して雌ラットから採取した新鮮卵子と体外受精を行ったところ、約 70% の受精率が得られました。新鮮精子を用いた受精率 (約 90%) よりも低い値でしたが、実用的な受精成績が得られました。次に、この受精卵を雌ラットの卵管に移植したところ、新鮮精子から作製した受精卵と差はなく、移植した受精卵の 36% から産仔を得ることができました。本研究で開発した微生物汚染リスクの低い化学的組成が明らかな凍結保存液を用いて効率よく受精卵や産仔が得られたことから、この成果により、遺伝子改変ラット系統を凍結精子として授受し、体外受精によって産仔を作出する方法が、より安全で安定した技術として普及することが期待されます。

3. 波及効果、今後の予定

本研究で開発した凍結保存液は、化学的組成が明かで微生物汚染のリスクが低く、市販試薬のみで調製できるため、再現性の高いラット精子の凍結保存が可能になります。マウスに比べてラットの生殖工学技術は遅れていましたが、この凍結保存液で凍結したラット精子は、実用的な体外受精率と産仔への発生率を示したことから、この凍結保存液が新しい選択肢として普及することが期待されます。NBRP ラットの事業においても、採取が容易な精子を凍結保存することにより、凍結精子でのラット系統の授受と体外受精による産仔作出を推進することで NBRP 事業の効率化が期待できます。しかし、新鮮精子*や卵黄を含む凍結保存液で凍結した精子**を用いるよりも体外受精率が若干低い (従来の 80-95% に対して約 70%) ため、今後更なる凍結保存液および体外受精技術の改良が必要であり、様々な系統でも利用できるかどうかを検討することが重要です。

*Honda A. et al., 2019 Efficient derivation of knock-out and knock-in rats using embryos obtained by in vitro fertilization. Scientific Reports 9: 11571. doi: 10.1038/s41598-019-47964-1.

**Nakagata N. et al., 2020 Establishment of sperm cryopreservation and in vitro fertilisation protocols for rats. Scientific Reports 10: 93. doi: 10.1038/s41598-020-60648-5.

4. 研究プロジェクトについて

AMED ナショナルバイオリソースプロジェクト（NBRP）基盤技術整備プログラム

研究課題名：ラット生殖工学基盤技術開発によるリソース保存の効率化と新規利用者の拡大

課題番号：JP19km0210167, JP20km0210167

<用語解説>

1) サルモネラ菌

鶏卵を含め、自然界に広く分布し、ヒトや動物に感染すると下痢や発熱などの症状を引き起こす細菌です。

2) 凍結保護剤

凍結時の細胞内氷晶形成などによる細胞の損傷を防ぐために用いられる成分です。

3) 遺伝子改変技術

ゲノム編集技術などを用いて、受精卵の標的遺伝子を欠損・改変し、遺伝子改変個体を作製する技術です。

4) ナショナルバイオリソースプロジェクト（NBRP）ラット

NBRP はライフサイエンス研究に欠かせない実験動物などの生物遺伝資源（バイオリソース）を国が戦略的に収集・保存・提供する文部科学省の事業です。2002 年から京都大学ではラットの本事業を継続して担当しています。

5) 生殖工学技術

精子や卵子、受精卵、着床前の胚を体外で培養・操作して、体外受精や凍結保存、胚移植などにより繁殖効率を向上させる技術の総称です。

6) Orvus ES Paste (OEP)

ラウリル硫酸ナトリウムを主成分とする陰イオン界面活性剤配合ペーストです。

7) ラクトース

哺乳類の乳に含まれるグルコースとガラクトースが結合した二糖類（乳糖）です。

8) OptiPrep

60%のイオジキサノール水溶液で、適切な条件下で氷結晶の形成を抑える効果があります。

9) エチレングリコール

水の凝固点を下げて凍結するのを防ぐ凍結保護剤です。

10) セリシン

カイコ（蚕）の繭からシルクを精練する過程で得られるタンパク質で、マウスの精子の先体を凍結によるダメージから保護する働きがあります。

11) 先体

精子頭部を囲む袋状の構造物で、受精に必要な酵素などが含まれています。

12) ATP

アデノシン三リン酸の略で、すべての生物の細胞内でエネルギーの受け渡しを行う物質です。精子の運動性を活性化させます。

13) dbcAMP

ジブチリル cAMP の略で、cAMP（細胞内の情報伝達物質）の細胞膜を通過できる類似体です。受精能の獲得や精子の活性化にも関わります。

<研究者のコメント>

卵黄を使わない実用的なラットの精子凍結保存液は今までに報告がなく、開発には多くの困難があり、研究が思うように進まず、何度も諦めそうになりました。それでも、多くの方々に支えていただきながら研究を続け、今回の成果に繋げることができました。凍結精子を用いて実際に受精卵や産仔が得られた時は何より嬉しく、忘れられない瞬間となりました。ご支援、ご協力いただいた皆様に心より感謝いたします。（守田昂太郎）

<論文タイトルと著者>

タイトル：Development of a chemically defined cryopreservation solution for rat sperm and production of offspring by in vitro fertilization

ラット精子用の化学的組成が明らかな凍結保存液の開発と体外受精法による産仔の産生

著者：Kohtaro Morita, Keiji Mochida, Ayumi Hasegawa, Shunya Ihashi, Kento Morita, Saki Wajima, Miho Kohara, Tadashi Sankai, Arata Honda, Kimiko Inoue, Atsuo Ogura, Masahide Asano
守田 昂太郎、持田 慶司、長谷川 歩未、井橋 俊哉、森田 健斗、和島 沙季、小原 実穂、山海 直、本多 新、井上 貴美子、小倉 淳郎、浅野 雅秀

掲載誌：*Biology of Reproduction* DOI：10.1093/biolre/ioag200