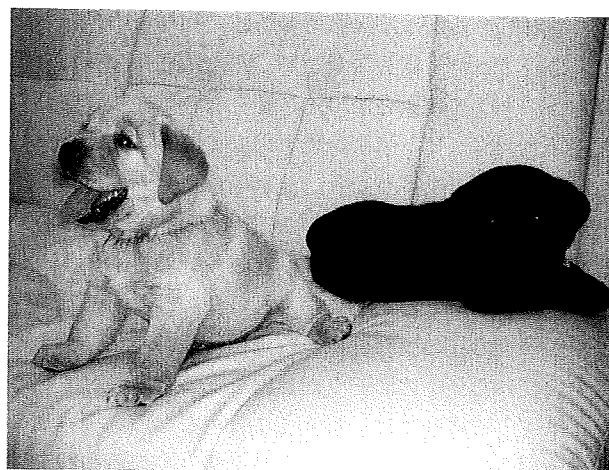


ることは現実的ではないので、国内に補助犬繁殖のセンター機能をもつ研究機関の存在が望まれるところである。ヒト用膀胱鏡を用いた経子宮頸管人工授精法は、比較的容易に技術習得が可能であること、また、イヌに対する鎮静処置や補助者を必要しないことから、フィールドにおいてもきわめて実用的な授精法であると考えられる。凍結融解精液を用いた人工授精では、新鮮精液に比較して受胎率、および産仔数が低い傾向が認められるが、この原因は人工授精技術そのものではなく、精子を提供する雄の違いによるものである。すなわち、授精機会の違いよりもむしろ、個体の違いによる精液性状の差異に起因すると思われる受胎率の差異が顕著であった [1]。低受胎率を示す（耐凍能が低い）精子の受精能力の向上のための凍結融解方法の改良や新規技術、たとえば、卵細胞質内精子注入法の開発が必要であろう。

また、これまでのイヌ精子の凍結保存は、煩雑な操作と時間を要するので、フィールドでの凍結を可能とするような、より簡便な凍結保存法が求められている。イヌ精子の凍結保存には、鶏卵の卵黄が用いられているが、昨今のトリインフルエンザの蔓延により、卵黄を含む試料の輸出入が制限される場合があり、イヌの凍結精子もこの例外ではない。事実、筆者らは、トリインフルエンザの発生を理由にイギリスとフィンランドがニワトリ生体由来材料を含む試料、すなわちイヌ凍結精子の輸出を一時差し止め、輸入不能になったことを経験し、急速凍結融解法を用いない、より化学的組成の明確な凍結保護剤の開発に取り組んでいる。これまでに、マウス精子の超急速凍結保存法に用いられている凍結保護剤の組成を改良し、0.3M グルコースと3% スキムミルクのみから構成される凍結保存液を用いた凍結融解後のイヌ精子の運動性が、従来の卵黄を用いた凍結融解法と比較して、同等かそれ以上を示す凍結保存法を開発し、この方法による凍結融解精子由来の産仔を得ることに成功している [3]。

イヌ胚の初期発生

他の動物と比較して、イヌの繁殖生理の理解が遅れていることは前述したが、初期胚の発生に関する知見も例外ではなく、情報が限られていた。イヌにおいては、LH サージ後6～10日目に受精卵子は2細胞期に発生し、LH サージ後11～12日目に子宮に移動すること [4, 5]、また、ビーグル犬においては、LH サージ後8～9日に



世界で初めて得られたイヌ凍結融解胚由来の産仔

胚盤胞に発生することが報告されているが [6]、胚の凍結保存および胚移植研究を進めるにあたっては、犬種間で着床前の発生速度に差異が認められるか否かを含めた、より詳細な情報が必要であった。これまで、補助犬に汎用されているラブラドルリトリバーの着床前の胚発生に関する検討は、ほとんどなされていなかったことから、筆者らは、発情兆候を示したメスの血中プロゲステロンレベルをモニターすることによってLH サージ日を推定し、LH サージ後の種々の日数に人工授精を行い、摘出した生殖器をかん流することによってLH サージ後の日数と胚の発生ステージ、および胚の局在部位との関係を観察することから着手した。これまでに75頭の雌を用いて観察した結果、ラブラドルリトリバーにおいては、胚の卵管から子宮への移動は、LH11日目から始まり、約24時間を費やして子宮に達すること、そして、LH14日目までに、すべての胚は子宮に移動することが明らかとなった。また、胚は、LH10から13日目までには桑実胚に、LH14日目までには胚盤胞に発生することが明らかとなっており [7, 未発表]、イヌ胚の着床前の発生速度には、品種間によって差異が存在する可能性が示唆された。

イヌ胚の凍結保存法および胚移植法の開発

盲導犬候補犬の避妊手術前に人工授精を施して胚を回収し、これを凍結保存することは、卵巣の凍結保存と双壁をなす遺伝子資源の有効利用方法であると考えられる。これまでに、マウス胚の凍結保存液であるDAP213およびクライオトップを用いたイヌ卵母細胞の超急速凍

結融解を試みた結果、良好な凍結融解後の生存性が得られている [8]。しかしながら、これまでイヌ新鮮胚を外科的に移植した後に産仔を得ることに成功した事例は報告されているが、イヌ凍結融解胚の移植後の産仔への発生は、まったく成功例がなかった。最近になって、筆者らは、ガラス化保存後のイヌ胚を受容雌の子宮内に人工授精と同様にヒト用膀胱鏡を用いて非外科的に移植した結果、2頭の受容雌から、それぞれ、2頭の生存産仔を得ることに成功している [未発表]。胚移植時における移植胚の発生ステージは、受容雌の妊娠日齢より1~2日先行させることが必要かもしれない。また、一般に、凍結融解後の胚の生存性は、割球の体積の小さい、より発生の進んだ発生ステージが良好であると解されているが、筆者らの経験では、桑実胚よりもむしろ8細胞期や16細胞期胚が凍結融解後の生存性に優れている傾向を認めている。しかし、この原因は明らかではない。いずれにしても、この成功によって、雌側からの人工繁殖による育種改良も可能になったことから、盲導犬の育成への貢献が期待されることである。今後は、胚の着床率の向上を目指した胚の凍結融解方法の改良や胚の非外科的回収法の開発によって、実用化への道が開かれるものと思われる。

盲導犬のバイオバンクの構築

国内外の盲導犬の個体情報のみならず、凍結精子・胚等のバンキングを行い、これらの情報を広く公開することによって国内外の遺伝子資源の需要に対応する体制の構築が進められている。このバンキングにおいては、盲導犬の生殖細胞のみならず、盲導犬のゲノムDNA、血清、病歴、家系などについても保存とデータベース化(K9バイオバンク)し、ユーザーが必要な情報へのアクセスと有効活用が可能となることを目的としている。

これまでに、データベースの要件、すなわち表記言語(英語表記を原則とし、コメント等の項目に英語以外の言語を入力・閲覧できるようにした)、データ(犬の基本データ(ID, 機関, 管理番号, 犬名, 生年月日, 性別, 現在の状態(訓練犬, 盲導犬, 繁殖犬など), 犬種, 体色)その他の犬情報(稟性, 健康診断記録, 遺伝的性質, 写真)交配データ(父犬, 母犬, 発情日, 交配日, 交配形態, 交配時間など)出産データ(出産日, 死産数など)盲導犬育成団体情報, データベース利用者情報), 機能(登録・修正機能, 検索機能, 掲示板機能, 閲覧(表示)について詳細を検討したデータベースが完成している。イヌ個体情報のデータベースは、盲導犬飼育施設が保有するイヌ個体情報を登録・閲覧・検索・集計するこ

とのできるデータベースである。現在のところ、本サイトの利用はID登録した12機関に限られており一般公開はしていない。データベースサーバは帯広畜産大学に設置し、各機関はインターネット経由でサーバーにアクセスして所属機関のデータの登録・編集を行うことができるほか、他機関の情報を閲覧・検索することができる。個体情報は「基本情報」「交配記録」「出産記録」の3部構成で、これらの情報を使って交配や出産結果の集計をしたり、訓練成功率や近交係数の算出、また発情日の予想などもできるようになっている。また、「リソース管理データベース」と連結するために、個体情報の中に精子、卵子、組織などのリソース情報を格納することができる。

リソース管理データベースは、イヌの凍結精子、凍結卵子・胚、組織などのバイオリソースを保存管理・提供するためのデータベースである。サンプルの入出庫状況、また利用者情報などをWeb上で管理できる仕組みになっている。

おわりに

適切な資質を有する盲導犬の安定的な提供は、視覚障害者の経済社会への一層の進出、貢献を促すものであり、わが国の安心・安全で快適な社会の構築に貢献する波及効果も具備している。盲導犬の繁殖生理および人工繁殖研究の成果は、優良盲導犬の育成のみならず、介助犬や聴導犬などの補助犬あるいは麻薬探知犬、検疫犬、災害救助犬等の資質向上にも寄与すると考えられることから、国内の安心・安全で快適な社会の構築への寄与のみならず、大きな国際貢献も果たすものと考えられる。

引用文献

1. Suwa Y, Abe Y, Lee DS, Ueta YY, Suzuki H (2009) Individual fertility differences in the frozen-thawed spermatozoa among semen donor in the Labrador Retriever. *Reprod Med Biol* in press.
2. Wilson MS (2001) Transcervical insemination techniques in the bitch. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 31, 291-304.
3. Abe Y, Lee DS, Sano H, Akiyama K, Ueta YY, Asano T, Suwa Y, Suzuki H (2008) Artificial insemination with canine spermatozoa frozen in a skim milk/glucose-based extender. *J Reprod Dev* 54, 290-294.
4. Concannon PW, Lein DH (1989) Hormonal and clinical correlates of ovarian cycles, ovulation, pseudopregnancy and pregnancy in dogs. In: Kirk R (ed) *Curr Vet Ther Small Anim Pract*, vol.10. Philadelphia, WB Saunders Company, pp. 1269-1282.
5. Johnston SD, Kustritz MVR, Olson PS (2001) Canine pregnancy. In: Johnston SD, Kustritz MVR, Olson PS (eds) *Ca-*

- nine and feline theriogenology. Philadelphia, WB Saunders, pp.66-104.
6. Tsutsui T, Hori T, Okazaki H, Tanaka A, Shiono M, Yokosuka M, Kawakami E (2001) Transfer of canine embryos at various developmental stages recovered by hysterectomy or surgical uterine flushing. *J Vet Med Sci* 63, 401-405.
 7. Abe Y, Suwa Y, Ueta YY, Suzuki H (2008) Preimplantation development of embryos in labrador retrievers. *J Reprod Dev* 54, 135-137.
 8. Abe Y, Lee DS, Kim SK, Suzuki H (2008) Vitrification of canine oocytes. *J Mamm Ova Res* 25, 32-36.

盲導犬の人工繁殖

鈴木 宏志

帯広畜産大学原虫病研究センター

Reproductive bio-technology for the guide dog for the blind

Suzuki Hiroshi

National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

抄 録

我が国における盲導犬の慢性的不足は、社会文化的背景を含め種々の要因が関与すると思われるが、育種・繁殖学的見地からは、その極めて特徴的な育成システムが盲導犬不足を助長する要因のひとつであると考えられる。すなわち、盲導犬は雌雄ともに避妊・去勢を受けた後に訓練を開始するために、優秀な盲導犬であってもその遺伝子を繁殖によって次世代に伝える術がない。この育成システムは、優秀な遺伝子を廃棄することに等しく、育種概念に逆行するものと思われる。最近、この問題を克服すべく、生殖工学の応用による盲導犬の人工繁殖技術の開発、そして、その効果を最大限に発揮させるための、盲導犬のDNAレベルにおける適性評価系ならびに遺伝子資源バンクの構築が試みられている。

キーワード：イヌ、人工授精、移植、受容雌、凍結保存

Abstract

Although guide dogs make a remarkable contribution to the quality of life of the blind people, many countries suffer from an acute shortage of guide dogs such that not all those who need them are able to be supplied. One of the important challenges from the point of view of animal and veterinary science as well as social welfare is to establish a stable and effective breeding and reproduction system for guide dogs for the blind. Although the development and extension of assisted reproductive techniques such as artificial insemination, embryo transfer and in vitro fertilization has been remarkable, in canines, it is not as successful as other mammalian species such as mice, pigs, cows and humans. In this review, recent advances of cryopreservation of sperm, embryo and ovary, analysis of personality related genes and bio-bank in guide dogs for the blind are described.

Keywords : Guide dog, Artificial insemination, Embryo transfer, Recipient, Cryopreservation

I. 序論

我が国の盲導犬は、現在、約1000頭が実働しているが、盲導犬希望者は約4800人、潜在的希望者も加えるとその需要は約7800人と推定されている。年間の盲導犬供給数は全国で130頭程度であり、ここ数年、横ばい状態が続いている。身体障害者補助犬の導入によって自立と社会参加を果たし得る障害者は数多く存在しており、その普及には、社会的受け入れ体制の整備とともに、良質な補助犬の育成体制の整備が不可欠である。

我が国においても、盲導犬、聴導犬、介助犬など、いわゆる補助犬の社会生活へのアクセス保障のみならず、補助犬の育成や使用者の責務までに踏み込んだ法整備が開始された。しかしながら、生物学、獣医学的な観点から補助犬の適切な活用および育成を支えようとするアプローチはほとんど見られない。社会生活の多様化、医療の発達あるいは超高齢化社会の到来によって、補助犬の用途が細分化されてきている現状を鑑みた場合、各種補助犬に要求される能力とその適合犬種の選定のための行動学、遺伝学的研究や補助犬の社会への浸透を確保するためのイヌ由来の人畜共通感染症に関する公衆衛生学的研究を含めた、新しい視点からのいわゆる「イヌ学」を総合的に推進する必要がある。しかしながら、その基礎となる遺伝子資源の確保、保存、利用のための繁殖生理学、特に生殖工学的研究の立ち遅れがこれを阻んでいる。イヌの繁殖生理に関する研究は、世界的にも進んではないが、我が国の水準も決して高いとは言えず、早急なキャッチアップが必要である。

盲導犬の安定的、効率的繁殖は、最も重要な課題のひとつであるが、現在、全国の盲導犬訓練施設で使用されている繁殖犬はわずかに180頭余りで、優れた雌雄の繁殖犬の確保が困難であること、外国から導入した繁殖犬の質が不安定であること、盲導犬の合格率(適格犬数率)が低いなどの問題を抱えている。このため、雌雄の組み合わせを配慮した交配などによって質の良い盲導犬を供給する試みが個々になされているが、抜本的な解決策ではない。また、盲導犬は雌雄ともに避妊・去勢を受けた後に訓練を開始するために、優秀な盲導犬であってもその遺伝子を繁殖によって次世代に伝える術がない。歴史の浅い他の補助犬の育成、利用に至っては、適切な犬種の選定、繁殖システムなどについて、手探りの状態が続いている。さらに、我が国に導入されているラブラドルリトリバーについては、補助犬としては不適格な股関節形成不全症や進行性網膜萎縮などの重篤な遺伝性疾患

のキャリアーが高頻度で存在するといわれており、今後の補助犬の繁殖育成を鑑みた場合、緊急に対処を要する状況にある。

繁殖の目標は、より少ない労力と費用で、最大の受胎率とリッターサイズを得ることである。特に、遺伝子資源に乏しい(繁殖犬の数が少ない)補助犬集団にとって、交配後の空胎(不妊)は事業計画に大きな影響をおよぼすので、交配適期の適切な把握が必要となる。繁殖コロニーの適正な規模の維持は重要な事項ではあるが、繁殖犬数をいわずらに増加させるのは、経費負担の増大にもつながることから適当とは思われない。したがって、自然交配のみならず、人工授精、受精卵移植などの人工繁殖技術の導入・開発によって、より高度な効率化が必要であると思われる。本稿では、生殖工学の応用による盲導犬の人工繁殖技術の開発、およびその効果を最大限に発揮させるための、盲導犬のDNAレベルにおける適性評価系ならびに遺伝子資源バンクの構築について述べる。

II. 本論

1. 人工授精

イヌの凍結精子による人工授精は、1950年代から研究されており、現在、オーストラリア、アメリカ、イギリス、ニュージーランド、フィンランドなどの盲導犬協会・盲導犬事業所においては実用的な応用を果たしている。我が国においては、2002年に盲導犬の繁殖に凍結精子を用いた人工授精の成功例が得られ、現在では実用化を果たしている¹⁾。

自然交配においては、精液は膣内に射出されるが、凍結融解精子の運動性は新鮮射出精子と比較して劣るので、凍結融解精子を用いた人工授精においては、融解した精子を子宮体部に注入することが望ましい。補助犬に汎用されるラブラドルリトリバーのような大型犬では、解剖学的に膣が長いので子宮頸管を通過して子宮体部に精子を注入するには、適切なカテーテルを準備することが必要である。Norwegianカテーテルと呼ばれている金属製のカテーテルは、元来、キツネの人工授精のために開発されたものであるが、これは比較的小型の動物の腹部を触診しながらガイドして子宮頸管を通過するには適当であるが、大型犬への妥当性は乏しい。その点、1992年にWilsonが開発したヒト用の膀胱鏡を用いた経子宮頸管人工授精法は、カテーテルの先端をモニターで観察しながら実施するので、技術的にも容易で確実性が高い²⁾。術者はカテーテルの先端が頸管を通過したことをモニターで確認してから、カテーテル内の凍結融解精

子を子宮体部に注入することが可能である。ヒト膀胱鏡を用いた経子宮頸管人工授精法の問題点は、用いる機械が比較的高価であることと思われる。国産の膀胱鏡ではシース（鞘）部の長さが不足しており、大型犬の人工授精に用いることは困難であり、ドイツのストルス社製の膀胱鏡を輸入することが必要である。交配頻度がそれほど高くない比較的小規模の補助犬事業所に数百万円もする膀胱鏡を準備することは現実的ではないので、国内に補助犬繁殖のセンター機能を持つ研究機関の存在が望まれるところである。

筆者らの経験では、ヒト用膀胱鏡を用いた経子宮頸管人工授精法の導入・開発に際して、3回目の試行で受胎例が得られた。したがって、本法は比較的容易に技術習得が可能であること、また、イヌに対する鎮静処置や補助者を必要しないことから、フィールドにおいても極めて実用的な授精法であると考えている。凍結融解精液を用いた人工授精では、新鮮精液に比較して受胎率、および産仔数が低い傾向が認められたが、この原因は人工授精技術そのものではなく、精子を提供する雄の違いによるものであることが明らかとなっている。すなわち、凍結精子を使用した13頭の雄の個別の人工授精による受胎率は0～100%（平均42%）であり、授精機会の違いよりもむしろ、個体の違いによる精液性状の差異に起因すると思われる受胎率の差異が顕著であった¹⁾。将来的には、低受胎率を示す（耐凍能が低い）精子の受精能力の向上のための新規技術、例えば、卵細胞質内精子注入法³⁾の開発が必要であろう。

2. イヌ精子の凍結保存法

—超急速凍結保存法の開発—

イヌ精液の採取は用手法が一般的である。射出される精液は3つの分画に分けられる。第1分画は、前立腺由来と思われるもので比較的少量であるが、イヌによっては5ml以上になる場合がある。この分画は、透明で細胞を含まない。通常、この分画は陰茎を押し込む行動を示している間に射出される。第2分画は精巣上体尾部に貯蔵されていた精子に富む精液である。第2分画の量は1～4mlで、乳白色を呈する。この分画は陰茎を押し込む行動の間あるいはその直後に射出される。第3分画は透明な前立腺分泌液である。イヌ精子の凍結保存には再現性の高い安定した幾つかの方法が開発されている。イヌ精子の凍結保存に際しての凍結保護剤として汎用されているのは卵黄とグリセロールを含む緩衝液である。これらの物質は、凍結融解過程における低温感作や細胞の破壊を防止するために添加されている。卵黄は細胞外に存

在して保護作用を発揮する。その有効成分は低比重リポタンパク質(LDL)で、最終濃度を20%とするのが精子の凍結融解後の運動性の維持に最適といわれている。グリセロールは低分子であるので細胞内に浸透して、細胞内の水分と結合し、細胞内の氷晶形成を抑えるとともに緩慢な脱水を助けるものと考えられており、最適な濃度は4%といわれている。第2分画を遠心分離した後に凍結保護剤で稀釈し、低温ショックを回避するために凍結に先立って冷却する(平衡)。最適な平衡時間は定まっていないが、一般的に、冷蔵庫温度(4～5℃)までに冷却するのに1～3時間を要する。平衡後に凍結用ストローに充填し、液体窒素蒸気中に曝露した後に、液体窒素中に浸漬する。冷却速度は用いる凍結保護剤、緩衝液やサンプルの量によって様々である。急激に凍結した場合には、細胞内に氷晶が形成され、精子は破壊される。また、凍結速度が緩慢過ぎる場合には、浸透圧勾配が細胞の脱水、凝縮を形成する。最適な凍結速度は、報告によって、サンプルが-15℃に達するまで1.89～5℃/min、次いで-100℃に達するまで10～20℃/minと大きな幅がある。融解速度は凍結速度と同様に精子の融解後の生存性にとって重要な要因である。ストローを75℃の恒温水槽に6秒間浸漬した場合と37℃の恒温水槽に30秒間(0.25ml容ストローの場合)、あるいは60秒間(0.5ml容ストローの場合)浸漬した場合で、融解後の精子の運動性に差異は認められていないが、イヌ精子では、一般的に、後者のより緩慢な融解法が用いられている。凍結融解によって、前進活発運動を示す精子の割合は50～60%に減少する。凍結融解精子の生存性は、新鮮精子と比較して劣る。雌犬の健康状態、授精の時期、精子の注入部位にもよるが、1億から1億5000万の生存精子を注入した場合、75%かそれ以上の受胎率が期待できる⁴⁾。

しかしながら、これまでのイヌ精子の凍結保存は、煩雑な操作と時間を要するので、フィールドでのラブラドルレトリバー精子の凍結を可能とするより簡便な凍結保存法が求められている。また、イヌの凍結精子の凍結保存には、上述のように鶏卵の卵黄が用いられているが、昨今のトリインフルエンザの蔓延により、卵黄を含む試料の輸出入が制限される場合があり、イヌの凍結精子もこの例外ではない。従って、卵黄を用いない、より化学的組成の明確な凍結保護剤の開発が急務となってきた。筆者らはこれまでに、マウス精子の超急速凍結保存法に用いられている凍結保護剤の組成を改良し、0.3Mグルコースと3%スキムミルクのみから構成される凍結保存液を用いた凍結融解後のイヌ精子の運動性が、従来の卵黄を用いた凍結融解法と比較して、同等かそれ以上を示

す凍結保存法を開発し、この方法による凍結融解精子由来の産仔を得ることに成功している⁵⁾。今後の実用化に期待したい。

3. 親子鑑別法の開発

人工授精を用いる場合には、サンプルの取り違い等の懸念に対処するため、得られた産仔の親子鑑定が必要となる。American Kennel Clubは1981年から凍結精子由来の産仔の登録を認めており、1999年以降は精子を凍結している雄のDNA登録を要求している。Japan Kennel Clubでも2008年から凍結・冷蔵保存精子由来の産仔の登録を父母と産仔のDNA登録と親子鑑別を条件に認めるようになった。また、雄の後代検定を効率的に実施するためには、1頭の雌に複数の雄由来の精子を注入して産仔を得て (Heterospermic Insemination)、それらの産仔の能力検定を行うことが望ましい。これを可能とするためには、サテライトマーカーを用いたDNA診断による親子鑑別法が有効である。

イヌにおける既存の親子鑑定法に用いられているマイクロサテライトマーカー16個について、対立遺伝子とその頻度、識別能、異型接合度、多型情報含有値、平均排除率、総合排除率を盲導犬雄集団48頭を用いて算出した結果、これら16個のマーカーにおける総合排除率 (ある集団において父親でない男が否定される確率であり、ヒトにおける13~15個のマイクロサテライトマーカーを用いた市販の親子鑑定キットによる総合排除率は0.999999程度である。この値が高いシステムほど、親子鑑定には有効である。)では、0.9997024と十分な鑑定精度には至らなかった。この原因として、盲導犬コロニーが近縁集団であることが考えられた。そこで、より多型性に富むサテライトマーカーの選抜・追加の必要性を考え、新たにラブラドルリトリバーで高多型性マーカーとして報告されている既知のマーカー7個を追加し、合計23個のマーカーによる親子鑑定法を構築した。その結果、総合排除率は0.999949にまで高まり、盲導犬における高精度な親子鑑定システムが実用化されている (Uetaら、未発表)。

4. 人工授精における授精適期の判別法

イヌにおいては受胎可能な交配期間は7日間におよぶので、一般的には、メスが発情徴候を示す間に1回あるいは2回交配することによって妊娠に至る。しかしながら、最も効率的な繁殖 (受胎率やリッターサイズ) を考えると、排卵後2~4日に交配するのが適切と考えられる。一般的には、発情前期開始12日後頃、あるいは発情開始

後2~3日目に排卵する。しかしながら、発情前期に入ってから7~22日目に排卵したことを示唆する報告もある。したがって、排卵時期の適切な予測のためのモニタリングが必要である。イヌは排卵2~3日前にプロゲステロン値が上昇するという特徴をもっているため、発情前期および発情期における血中プロゲステロン濃度を測定することによって、交配適期を予測することが可能である。発情休止期、および発情前期のほとんどの期間において、プロゲステロン値は1ng/mlを下回っている。しかし、排卵前のLHサージの直前に1ng/mlを越え、発情期の間に継続的上昇し、LHサージ後15~30日目までには15~90ng/mlにまで達する。排卵時のプロゲステロン濃度は、4~10ng/mlである。排卵3日前から排卵4日後までの間のただ1回の自然交配で95%を超える受胎率が期待できるといわれている。また、1回の交配あるいは人工授精の場合には、排卵後2日間あるいはプロゲステロン値が4~10ng/mlに達した後の2日間が最も適切であるともいわれている。排卵時 (LHサージ後2~3日目) のプロゲステロン濃度は、一般的に4~10ng/mlであるが、個体差も大きいので注意が必要である。また、プロゲステロン濃度には、2倍程度の日内変動が存在することが知られているので、血液採取の時間を考慮することも重要である。排卵および卵子の成熟時期の予測のために、LHサージの時期を測定することは有効である。通常、排卵はLHサージ後2~3日目、卵子の成熟と受精はLHサージ後4~6日目に起る。発情期に徐々に上昇するプロゲステロン値とは異なり、LHサージは24時間以内の現象である。したがって、1日1回の採血では、LHサージが起ったか否かの判断が困難な場合が生じる。プロゲステロン値が2ng/mlを超えている場合には、すでにLHサージが起こったと考えてよい⁶⁾。

イヌの排卵時期の適切な把握は、人工繁殖の再現性の確保には重要な課題である。ホルモンレベルと内視鏡検査像を指標とした授精適期の判定法の開発を試みた結果、発情期の終わりが近づくに連れ子宮外口と膣粘膜は浮腫と充血が強くなることが明らかとなったが、内視鏡像は授精適期の参考にはなるものの、単独での利用は正確性を欠くことから、血中のプロゲステロン値との併用が必要と考えられた。筆者らの経験では、血中プロゲステロン濃度が2ng/mlを越えた日をLHサージと推定することによって、授精適期が再現性高く把握可能である。

雌犬の同一発情期に、複数の雄由来の精子を使用し (Heterospermic insemination)、サテライトマーカーを用いた親子鑑定を行うことで、得られた産仔の父親を同定した結果、推定LH4~7日に凍結精子を使用して受胎せ

ず、推定LH7～8日に新鮮精子を使用して受胎し産仔数も多く得られた。このことから、排卵期間は相当長く、発情期後半に受精能を保持している卵子の存在も多いと考えられた。これらの結果から、授精適期を推定LH6～8日に設定するのがより適切と考えられた¹⁾。一発情期で複数頭の雄由来の産仔を得ることにより、空胎を回避できるばかりでなく、雄犬別の産仔に対する評価が効率的に実施可能となり、育種改良スピードが飛躍的に向上することが期待できると思われる。

5. 卵巣や精巣の凍結保存および卵巣移植技術の開発

盲導犬は雌雄ともに避妊・去勢を受けた後に訓練を開始するという極めて特徴的な育成システムがとられており、例え、優秀な盲導犬であってもその遺伝子を次世代に伝える術がないという問題を抱えている。そこで、避妊手術時に摘出した卵巣を凍結保存しておき、その遺伝子資源を有効に利用可能な繁殖システムの構築が試みられている。

ガラス化法にて凍結したイヌ卵巣を組織学的に検査した結果、凍結融解後の卵巣は、組織学的に正常であった。さらに、凍結融解イヌ卵巣を、免疫不全マウスの卵巣嚢内に異種移植し、凍結融解後のイヌ卵巣の生存性を検討したところ、すべてのマウスでイヌ卵巣とマウス卵巣の生着が認められている⁷⁾。これらのことから、凍結融解後のイヌ卵巣が生着しており、その機能を発揮する可能性があると考えられる。現在、凍結融解イヌ卵巣のラブラドルトリバーの卵巣嚢内への同種移植が試みられており、その成果が期待されている。しかしながら、ヒトを含めた哺乳動物の卵巣移植においては、移植された卵巣組織に血流が回復する前の48時間に多くの卵胞が失われることが知られており、これはイヌ卵巣においても例外ではない⁸⁾。最近、この移植後の卵胞の消失を抑制しようとする試みがなされており、糖鎖を除去したエリスロポエチン（アシアロ化エリスロポエチン）の投与が、凍結融解イヌ卵巣の移植後の卵胞数維持に効果的に働くことが報告されている⁹⁾。

また、去勢術によって摘出された精巣についても、卵巣と同様な凍結保存が試みられており、凍結融解後に免疫不全マウスの皮下に移植された精巣片の生殖細胞の分化能の検討がされている。

6. イヌ胚の初期発生

他の動物と比較して、イヌの繁殖生理の理解が遅れていることは前述したが、初期胚の発生に関する知見も例外ではない。イヌ、特に、ラブラドルトリバーの着

床前の胚発生に関する検討はほとんどなされておらず、胚移植などの人工繁殖技術開発を困難とさせている。最近、筆者らは、発情兆候を示したメスに人工授精を行い、摘出した生殖器をかん流することによってLHサーージ後の日数と胚の発生ステージ、および胚の局在部位との関係を観察した。その結果、胚の卵管から子宮への移動は、LH11日目から始まり、約24時間を費やして子宮に達すること、そして、LH13日目までに、すべての胚は子宮に移動することが明らかとなった。また、胚は、LH11から13日目までには桑実胚に、LH14日目までに胚盤胞に発生することが明らかとなっている¹⁰⁾。

7. イヌ胚の凍結保存法および胚移植法の開発

避妊手術前に人工授精を施して胚を回収し、これを凍結保存することは、卵巣の凍結保存と双壁をなす遺伝子資源の有効利用方法であると考えられる。これまでに、マウス胚の凍結保存液であるDAP213およびクライオトップを用いたイヌ胚あるいは卵母細胞の超急速凍結融解を試みた結果、良好な凍結融解後の生存性が得られている¹¹⁾。また、凍結融解胚を受容雌の子宮内に人工授精と同様にヒト用膀胱鏡を用いて非外科的に移植した結果、生存産仔を得ることに成功している（Abeら、未発表）。この成功によって、雌側からの人工繁殖による育種改良が可能になったことから、盲導犬の育成への貢献が期待されることである。今後、胚の非外科的回収法の開発が望まれることである。

8. 補助犬のSpecific Pathogenの設定と検査系の開発

エンドユーザーに安全で安心な補助犬を供給するためには、特に、人獣共通感染症に着目した盲導犬・補助犬のSpecific Pathogenの設定と検査系の開発、運用が求められる。盲導犬を育成する際に問題となる人獣共通感染症としては、ブルセラ症、レプトスピラ症、ライム、エキノコックス、狂犬病等があげられるが、特にブルセラ症、レプトスピラ症の原因菌であるブルセラ属菌、レプトスピラはイヌの精液中にも混入することが知られており、イヌの繁殖に障害となるが、精液中におけるこれらの病原体の検出法は開発されていなかった。最近、これらの病原体を含んだイヌの精液からDNAを抽出し、PCR法によって両菌のDNAを同時に10²個まで検出できる系が開発されている。また、既存のイヌのブルセラ症の血清学的診断法は抗原として全菌体を使用しているため非特異反応が多く、反応時間が24時間と判定までに長時間を要していた。そこで、より特異的な迅速診断法を構築するために、特異抗原を加熱抽出することにより菌体から

得る方法が開発されている。加熱抽出抗原をラテックスビーズに固着させて急速凝集反応用の抗原として利用することによって、ブルセラ症陽性および陰性の血清がラテックスビーズの凝集の有無で迅速かつ明確に区別される¹²⁾。

筆者らの最近の調査によると、我が国のペット犬におけるブルセラ菌の抗体陽性率は3%程度で、ある県では10%にも上ることから、今後、補助犬集団におけるブルセラを含めた上述の病原体のコントロール体制の整備が求められるところである。

9. 進行性網膜萎縮症の遺伝子診断

進行性網膜萎縮症 (PRA) は、光受容器障害を伴った網膜の変性により網膜が萎縮する遺伝性の症候群であり、視力の低下から全盲という重篤な障害を起こす疾患である。PRAは犬種によって様々な症状や進行度、発症年齢を示すため、その臨床症状や原因遺伝子の違いなどにより、早発性の *rcd1*、*rcd2*、*rd* や、遅発性の *pred*、*XLPR*A など、いくつかの型に分類されている。ラブラドルトリバーでも PRA が確認されており、この犬種の PRA は遅発性の進行性桿体一錐体異形成タイプ (*pred*: progressive rod cone degeneration) であることが明らかとなっており、原因は *PRCD* 遺伝子の変異であることが報告されている¹³⁾。したがって、補助犬が、訓練をへて実働してから発症し、失明することとなるので、その損失は決して小さくない。遺伝様式は、常染色体上の劣性遺伝である。現在のところ治療法のない PRA を予防するためには、繁殖犬の遺伝子診断が有益である。*PRCD* 遺伝子変異の有無については、DNA を PCR によって増幅して制限酵素断片長多型 (RFLP) 解析することによる診断が可能となっている。筆者らは、合計 187 頭の盲導犬集団について *PRCD* 遺伝子の RFLP 解析を行ったところ、約 4% のキャリア個体の存在を確認した。キャリア個体同士の交配を避ければ、次世代に発症個体が得られることはない。しかし、ペット集団におけるラブラドルトリバーにおいては、臨床的には PRA と診断されたにもかかわらず、RFLP 解析では *PRCD* の変異が認められなかった個体が観察されていることから、*PRCD* の変異以外が PRA 発症の原因となっている可能性もあり、注意が必要である。

10. 性格関連遺伝子の多型と盲導犬適性との関連

我が国の盲導犬あるいは麻薬探知犬の訓練後の合格率は 30~40% と低率である。訓練士の要員に限度がある以上、適性に乏しい候補犬を増産、育成しても補助犬事

業への貢献は低いものと考えられる。盲導犬としての適性は性格によるところが大きく、遺伝的な要因も関与しているといわれている。そこで、繁殖犬あるいは補助犬候補の性格、訓練性能を事前に検索可能とする技術開発が望まれるところであるが、この目的には個体の性格を司る分子の解析が適当と考えられる。

個体の性格はドーパミンやノルアドレナリンなどのモノアミン類の分泌、代謝を規定している分子の相互作用に支配されていることが知られており、性格関連遺伝子の遺伝子多型 (個体差) が性格傾向に影響を及ぼすものと考えられる。そこで、性格形成に関与しているといわれている遺伝子の多型と盲導犬適性との関連性を、盲導犬および非盲導犬 (不合格犬)、それぞれ、約 100 例の DNA サンプルを血液あるいは口腔粘膜細胞から調整し、7 遺伝子の 15 多型について遺伝子型頻度の解析が試みられている。対象とした遺伝子は、ドーパミン D4 受容体 (*DRD4*)、モノアミン酸化酵素 B (*MAOB*)、チロシン水酸化酵素 (*TH*)、ドーパミン β -水酸化酵素 (*DBH*)、カテコール-O-メチル基転移酵素 (*COMT*)、セロトニン受容体 1B (5-*HTR1B*)、およびグルタミン酸輸送体 (*GLT-1*) であったが、これらのうち *COMT*、5-*HTR1B* および *GLT-1* に存在する合計 5 種類の一塩基多型について、盲導犬群と非盲導犬群の間の遺伝子型頻度に統計学的に有意な差が認められた。さらに興味深いことに、これら 5 種類の遺伝子多型について、盲導犬群で頻度の高い遺伝子型すべてを持つイヌの合格率は約 80% であったが、頻度の高い遺伝子型を全く持たないイヌの合格率は 10% にすぎないという成績であった¹⁴⁾。これらの成績は、性格関連遺伝子の遺伝子多型が、盲導犬適性の指標となり得ることを示していると思われるが、環境を異にする海外の盲導犬を含めた解析規模の拡大によって、より詳細な情報が提供されるものと考えられる。

5-*HTR1B* の一塩基多型 A157C について一般のラブラドルトリバーでは C アレルは存在しないことおよび G246A における遺伝子型については、一般のラブラドルトリバーでは G/G の頻度が高いことが報告されている¹⁵⁾、解析対象となった盲導犬・非盲導犬群においては、それぞれ A/C および G/A の遺伝子型頻度が高い傾向が認められたことから、これらの遺伝子型が何らかの表現型に反映しており、盲導犬候補犬を選ぶにあたって、積極的に選択されたものと推察される。また、*GLT-1* においては、一塩基多型 T471C の遺伝子型は、一般のラブラドルトリバーでは C/C の頻度が高いことが報告されている¹⁶⁾。しかし、盲導犬・非盲導犬群においては、T/T が優勢であることから、盲導犬コロニー

においては何らかの指標による選抜によってT/Tの遺伝子型頻度が上昇したものと考えられる。今後、性格に関する表現型と遺伝子多型との関連性についての解析の進展が待たれるところである。これらの多型を利用することによって、盲導犬の合格率の向上に大きく寄与することが期待される。

11. ラブラドルレトリバー比較ゲノム地図の作成

遺伝子解析により優良犬を選別し、盲導犬合格率を向上させるとともに、イヌの性格や遺伝的疾患の理解を進めるためには、ゲノム情報の取得が必要不可欠である。現在、ゲノム基盤情報を提供することを目的として、ラブラドルレトリバーのゲノムBACライブラリーの構築およびBACクローン整列によるゲノム地図の作成が進められている。すでに、BACライブラリーから約97000クローンの両末端配列が決定され、決定された両末端配列からベクターおよび低精度な配列を除去後、国際コンソーシアムで解読されたボクサー犬のゲノム配列（概要配列）と比較照合され、各クローンがイヌ（ボクサー犬）染色体上にマップされて公開されている（<http://clb.gsc.riken.jp>）。これによると、全末端配列の約80%がマップされており、被覆度（ボクサー犬ゲノム配列に対するカバー率）は約86.1%である。

12. 盲導犬の遺伝子バンクの構築

国内外の盲導犬の凍結精子・胚のバンキングを行ない、これらの情報を広く公開することによって国内外の遺伝子資源の需要に対応する体制の構築が進められている。このバンキングにおいては、盲導犬種の生殖細胞のみならず、盲導犬のゲノムDNA、血清、病歴、家系などについても保存とデータベース化（K9バイオバンク）し、ユーザーが必要な情報へのアクセスと有効活用が可能となることを目的としている。

これまでに、データベースの要件、すなわち表記言語（英語表記を原則とし、コメント等の項目に英語以外の言語を入力・閲覧できるようにした）、データ（犬の基本データ（ID機関、管理番号、犬名、生年月日、性別、現在の状態（訓練犬、盲導犬、繁殖犬など）、犬種、体色）その他の犬情報（稟性、健康診断記録、遺伝的性質、写真）交配データ（父犬、母犬、発情日、交配日、交配形態、交配時間など）出産データ（出産日、死産数など）盲導犬育成団体情報、データベース利用者情報）、機能（登録・修正機能、検索機能、掲示板機能、閲覧（表示）について詳細を検討したデータベースが完成している。イヌ個体情報のデータベースは、盲導犬飼育施設が保有するイヌ個体情報を

登録・閲覧・検索・集計することのできるデータベースである。現在のところ、本サイトの利用はID登録した12機関に限られており一般公開はしていない。データベースサーバは帯広畜産大学に設置し、各機関はインターネット経由でサーバーにアクセスして所属機関のデータの登録・編集を行うことができるほか、他機関の情報を閲覧・検索することができる。個体情報は「基本情報」「交配記録」「出産記録」の3部構成で、これらの情報を使って交配や出産結果の集計をしたり、訓練成功率や近交係数の算出、また発情日の予想などもできるようになっている。また、「リソース管理データベース」と連結するために、個体情報の中に精子、卵子、組織などのリソース情報を格納することができる。

リソース管理データベースは、イヌの凍結精子、凍結卵子・胚、組織などのバイオリソースを保存管理・提供するためのデータベースである。サンプルの出入庫状況、また利用者情報などをWeb上で管理できる仕組みになっている。

III. 結語

適切な資質を有する盲導犬の安定的な提供は、視覚障害者の経済社会への一層の進出、貢献を促すものであり、我が国の安心・安全で快適な社会の構築に貢献する波及効果も具備している。盲導犬の繁殖生理および人工繁殖研究の成果は、優良盲導犬の育成のみならず、介助犬や聴導犬などの補助犬あるいは災害救助犬の資質向上にも寄与することから、国内の安心・安全で快適な社会の構築への寄与のみならず、大きな国際貢献も果たすものとする。

今後、盲導犬の遺伝子バンクについては、アジアの拠点としての成長が期待される。さらに、行動学、公衆衛生学、育種繁殖学を含めた、新しい視点から補助犬に関する総合的な研究を推進するために、盲導犬の遺伝子バンクを基礎とした補助犬繁殖育成研究センター事業へ発展させ、盲導犬のみならず、介助犬、聴導犬を含めた補助犬の優良遺伝子の供給源として内外への貢献を果たすことも期待したい。特に、補助犬の適切な養成と日常的な社会参加を充実させるための優良遺伝子の確保とその有効利用に関する研究、およびイヌ由来の人畜共通感染症の調査研究を、それらの対策を含めて推進することが必要であるとする。また、これら一連の研究は、これまでの臨床中心のライセンス教育から、実学的研究基盤に基づいた社会福祉、障害者支援に資するための獣医学教育への変革の礎となるものと考えられる。

文献

- 1) SUWA, Y., ABE, Y., LEE, D. S. et al., (2009) Individual fertility differences in the frozen-thawed spermatozoa among semen donor in the Labrador Retriever. *Reprod Med Biol*, in press.
- 2) WILSON M. S., (2001) Transcervical insemination techniques in the bitch. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 31, 291-304.
- 3) KAWASE, Y., IWATA, T., TOYOD, Y. et al., (2001) Comparison of intracytoplasmic sperm injection for inbred and hybrid mice. *Mol Reprod Dev*, 60, 74-78.
- 4) JOHNSTON, SD, KUSTRITZ, M. V. R, OLSON, P. S, (2001) Breeding management and artificial insemination of the bitch. In : *Canine and feline theriogenology*. Philadelphia : WB Saunders, pp. 41-65.
- 5) ABE, Y., LEE, D. S., SANO, H. et al., (2008) Artificial insemination with canine spermatozoa frozen in a skim milk/ glucose-based extender. *J Reprod Dev*, 54, 290-294.
- 6) JOHNSTON, SD, KUSTRITZ, M. V. R, OLSON, P. S, (2001) Canine pregnancy. In : *Canine and feline theriogenology*. Philadelphia : WB Saunders, pp. 66-104.
- 7) ISHIJIMA, T., KOBAYASHI, Y., LEE, D. S. et al., (2006) Cryopreservation of canine ovaries by vitrification. *J Reprod Dev*, 52, 293-299.
- 8) ISHIJIMA, T., ABE, Y., SUZUKI, H. (2009) Follicular loss of the cryopreserved canine ovary after xenotransplantation. *J Mamm Ova Res*, 26, 61-65.
- 9) SUZUKI, H., ISHIJIMA, T., MARUYAMA, S. et al., (2008) Beneficial effect of desialylated erythropoietin administration on the frozen-thawed canine ovarian xenotransplantation. *J Assist Reprod Genet*, 25, 571-575.
- 10) ABE, Y., SUWA, Y., YANAGIMOTO, U. Y. et al., (2008) Preimplantation development of embryos in labrador retrievers. *J Reprod Dev*, 54, 135-137.
- 11) ABE, Y., LEE, D. S., KIM, S. K. et al., (2008) Vitrification of canine oocytes. *J Mamm Ova Res* 25, 32-36.
- 12) WATARAI, M., KIM, S., YAMAMOTO, J. et al., (2007) A rapid agglutination assay for canine brucellosis using antigen coated beads. *J Vet Med Sci*, 69, 477-480.
- 13) ZANGERL, B., GOLDSTEIN, O., PHILP, A. R. et al., (2006) Identical mutation in a novel retinal gene causes progressive rod-cone degeneration in dogs and retinitis pigmentosa in humans. *Genomics*, 88, 551-563.
- 14) 鈴木宏志, 植田佳子 (2007) 盲導犬を科学するー盲導犬適性を左右する遺伝子がわかってきた. *遺伝*, 61, 4-6.
- 15) MASUDA, K., HASHIZUME, C., OGATA, N. et al., (2004) Sequencing of canine 5-hydroxytryptamine receptor (5-HTR) 1B, 2A, 2C genes and identification of polymorphisms in the 5-HTR1B gene. *J Vet Med Sci*, 66, 965-972.
- 16) OGATA, N., HASHIZUME, C., MOMOZAWA, Y. et al., (2006) Polymorphisms in the canine glutamate transporter-1 gene : identification and variation among five dog breeds. *J Vet Med Sci*, 68, 157-159.

Pronuclear formation of freeze-dried canine spermatozoa microinjected into mouse oocytes

Hiroyuki Watanabe · Tomoyoshi Asano ·
Yasuyuki Abe · Yutaka Fukui · Hiroshi Suzuki

Received: 11 August 2009 / Accepted: 8 October 2009 / Published online: 24 October 2009
© Springer Science + Business Media, LLC 2009

Abstract

Purpose The aim of the present study was to investigate the fertilizing capacity of fresh, frozen-thawed and freeze-dried canine spermatozoa.

Methods After canine spermatozoa were injected into mouse oocytes, the rates of oocyte activation, male pronuclear formation and chromosomal aberrations were investigated.

Results The rates of oocyte activation were comparable (90.6–100%), no matter the sperm type injected. The percentage of male pronuclear formation was higher ($P < 0.001$) in the freeze-dried spermatozoa (92.3%) than the fresh (61.5%) and frozen-thawed (69.2%) spermatozoa. However, the chromosomal damage in the oocytes injected with freeze-dried spermatozoa was higher (72.9%; $P < 0.001$) than with fresh (26.9%) and frozen-thawed (21.4%) spermatozoa.

Conclusions These data indicate using mouse oocytes that freeze-dried canine spermatozoa may potentially fertilize canine oocytes although chromosomal damage is frequently generated.

Keywords Dog · Chromosome · Freeze-drying · Intracytoplasmic sperm injection · Spermatozoa

Capsule Canine spermatozoa can be freeze-dried with oocyte activating and male pronuclear forming capacity.

H. Watanabe · Y. Fukui
Department of Food Production Science,
Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine,
Obihiro 080-8555, Japan

T. Asano · Y. Abe · H. Suzuki (✉)
National Research Center for Protozoan Diseases,
Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine,
Inada-cho,
Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan
e-mail: hisuzuki@obihiro.ac.jp

Introduction

Cryopreservation of spermatozoa has enabled the cost effective preservation and long-distance transportation of genetic resources. As one of the cryopreservation methods in mammalian spermatozoa, freeze-drying has been applied in mouse [1–8], rat [9, 10], rabbit [11], bull [12], boar [13, 14] and human [15] spermatozoa. An advantage in freeze-drying is to store the spermatozoa without the use of liquid nitrogen for a long period. However, freeze-dried spermatozoon must be microinjected into an oocyte to be fertilized, because it is no longer motile. Since the chromosomal integrity of these spermatozoa is impaired [7], methodological optimization of freeze-drying is still an essential issue for successful sperm preservation [15–17].

Canine species are bred worldwide as companion animals and working dogs, including guide dogs for the blind. Assisted Reproductive Technologies (ARTs) in canines, e.g. artificial insemination [18, 19], in vitro fertilization [20, 21] and somatic cell nuclear transfer [22, 23], has been steadily progressing. ARTs seems to have led to the more efficient production of capable working dogs, and may be further advanced by successful preservation of canine spermatozoa. However, to the best of our knowledge, canine spermatozoa have never been freeze-dried. Activation of oocytes by sperm, subsequent formation of male pronucleus (MPN) and their chromosomal integrity can be considered as indicators for fertilizing ability of spermatozoa. Furthermore, these indicators can be monitored by microinjection into mouse oocytes in mouse [24, 25], whale [26] and human [27, 28] spermatozoa.

We report here that freeze-dried canine spermatozoa microinjected into mouse oocytes were able to activate oocytes and form MPN.

Materials and methods

Reagents and media

All chemicals were purchased from Wako Pure Chemical Industries Ltd. (Osaka, Japan) unless specifically stated. The culture medium for mouse oocytes after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) was Chatot-Ziomek-Bavister (CZB) [29] supplemented with 5.56 mM D-glucose and 4 mg/ml bovine serum albumin (fraction V; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Mouse oocyte collection and microinjection were performed in a modified CZB supplemented with 20 mM Hepes-Na, 5 mM NaHCO₃, and 0.1 mg/ml polyvinyl alcohol (cold water soluble; Sigma-Aldrich) in place of bovine serum albumin (H-CZB). Sperm preparation was performed in modified Toyoda-Yokoyama-Hoshi (TYH) medium [30] supplemented with 20 mM Hepes, 5 mM NaHCO₃, and 0.1 mg/ml polyvinyl alcohol in place of bovine serum albumin (H-TYH). The pH value of both H-CZB and H-TYH was adjusted to approximately 7.4.

Animals

(C57BL/6 J×DBA/2)F1 (B6D2F1) mice (CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan) were used to collect the oocytes. Also, spermatozoa were recovered from a Labrador Retriever in our colony. Animal care and all experiments were performed according to the Guiding Principles for the Care and Use of Research Animals of Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine.

Preparation of oocytes and spermatozoa for ICSI

B6D2F1 female mice, 7–11 weeks of age, were superovulated by i.p. injection of 10 IU equine chorionic gonadotrophin (Asuka Pharmaceutical, Tokyo, Japan) followed by injection of 10 IU human chorionic gonadotrophin (Asuka Pharmaceutical) 48 h later. The oocytes recovered from the oviducts between 14 and 16 h after human chorionic gonadotrophin injection were denuded of their cumulus cells by treatment with 0.1% (w/v) bovine testicular hyaluronidase (Sigma-Aldrich) in H-CZB. The denuded oocytes were repeatedly rinsed in CZB medium and kept at 37°C under 5% CO₂ in the same medium until ICSI.

Sperm collection, freezing and freeze-drying procedures

The ejaculated spermatozoa were collected by digital manipulation [31] into a sterile tube (Corning, NY, USA). The first and third fractions (seminal plasma) of the ejaculates were discarded. The sperm-rich second fraction of the ejaculates was used for the experiments. One each of

the ejaculates was subjected to a cryopreservation, freezing or freeze-drying, as described below.

Spermatozoa were frozen by using the commercially available semen extender, AndroMed (Minitüb, Tiefenbach, Germany), following the supplier recommended methods. Briefly, the semen was diluted with AndroMed and cooled to 4°C for 3 h. Then, the sperm suspension was loaded into a 0.25 ml straw, and kept in an atmosphere of liquid nitrogen vapor, i.e. placed horizontally 6 cm above the surface of liquid nitrogen in a closed styrene foam box (21.0 cm×13.0 cm×13.0 cm), for 15 min. The straws were plunged into liquid nitrogen and stored up to 3 months. When thawing, the straws were immersed into water bath at 37°C and immediately used for ICSI. Percentage of motile spermatozoa after thawing was 46.2%.

Freeze-drying was performed as reported by Kawase et al. [5]. Briefly, the spermatozoa were placed in EGTA Tris-HCl-buffered solution (50 mM EGTA, 50 mM NaCl and 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) [17] and kept at 37°C for 10 min. The sperm suspensions (250 µl) were transferred into the amber vacuum vial for freeze-drying (V-2B; Nichiden-rika Glass, Kobe, Japan). The vials were plunged into liquid nitrogen for 5 min and then transferred to a programmable freeze-dryer (BETA2–16; Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen, Osterode am Harz, Germany) that had been precooled to –30°C. The freeze-drying conditions consisted of primary drying at a pressure of 0.37 mbar and secondary drying at a pressure of 0.001 mbar. Since the freeze-dried spermatozoa can be kept indefinitely at –80°C or below [4], the vials were stored at –80°C for up to 1 month. The freeze-dried spermatozoa were rehydrated by adding 250 µl of milli-Q water, and immediately used for ICSI.

ICSI procedure

Before injection, a batch of 15 oocytes was transferred into a droplet (5 µl) of H-CZB, which had been prepared beside a sperm-containing droplet in the ICSI chamber covered with paraffin oil (Merck Japan, Tokyo, Japan). A spermatozoon was aspirated into the injection pipette tail first in H-TYH containing 10–12% polyvinyl pyrrolidone (molecular weight: 360000; Nacalai Tesque, Kyoto, Japan), and the tail was cut at the mid-piece by applying a few piezopulses. The tail-cut spermatozoon was individually injected into a mouse oocyte according to the method of Kimura and Yanagimachi [32]. The ICSI series of experiments was finished within 1 h of sperm preparation. Thereafter, the injected oocytes were washed with CZB and transferred into a droplet (30 µl) of the same medium covered with paraffin oil at 37°C under 5% CO₂ in air for cultivation.

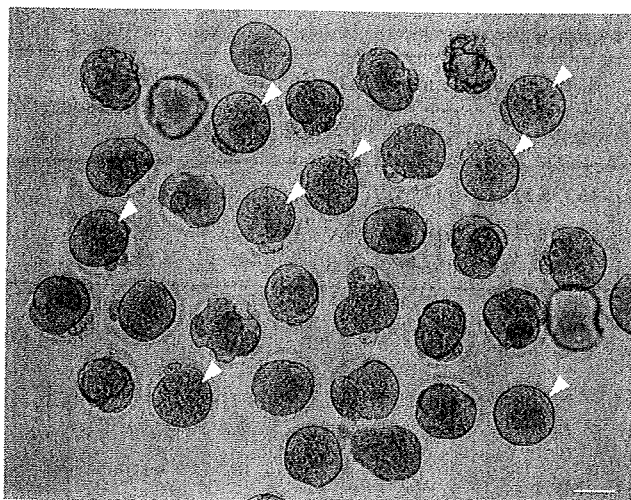
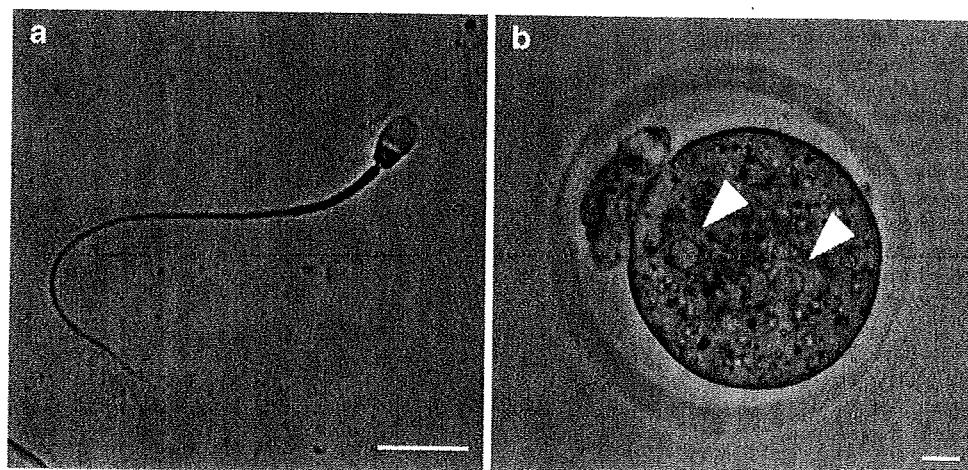


Fig. 1 Mouse oocytes injected with frozen-thawed canine spermatozoa at 6 h after ICSI. Arrowheads indicate morphologically normal oocytes. Only morphologically normal oocytes are examined to evaluate the fertilizing capacity of canine spermatozoa. Bar=50 μ m

Chromosome preparation of one-cell oocytes

Six hours after ICSI, the rate of normal morphological oocytes was observed. The deformed oocytes were discarded and morphologically normal oocytes (Fig. 1) were transferred to CZB containing 0.02 μ g/ml vinblastine sulfate to inhibit the first cleavage division. At 19–21 h after ICSI, they were treated with 0.5% protease (Kaken Pharmaceuticals, Tokyo, Japan) in Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free Dulbecco's phosphate buffered saline to digest the zona pellucida. Then, they were maintained in hypotonic solution consisting of equal volumes of 1% (w/v) sodium citrate and 30% (v/v) fetal calf serum (Gibco-BRL, Grand Island, NY) for 10 min at room temperature. These samples were prepared by the gradual-fixation/air drying method [33]. The slides were conventionally stained with 2% Giemsa (Merck) in buffered saline (pH 6.8) for 10 min.

Fig. 2 Freeze-dried spermatozoon **a** and the oocytes fertilized with freeze-dried spermatozoa **b**. Arrowheads indicate male or female pronucleus. Bar=10 μ m



Statistical analysis

All experiments were repeated three to five times. The chi-square test or Fisher's exact probability test was used for analyses. Differences were considered significant when the *P* value was less than 0.05.

Results

Freeze-dried spermatozoa are represented in Fig. 2a. The results of oocyte activation, MPN formation and chromosomal integrity are summarized in Table 1. When fresh, frozen-thawed and freeze-dried spermatozoa were injected into mouse oocytes, the proportions of morphologically normal oocytes after 6 h of ICSI significantly changed ($P < 0.001$) to 29.6, 59.1 and 100% of oocytes, respectively. Almost all oocytes (90.6–100%) were activated successfully, no matter which of the three sperm types was injected. On the other hand, the rate of MPN formation was significantly higher ($P < 0.001$) in the freeze-dried spermatozoa (92.3%; Fig. 2b) than the fresh (61.5%) and frozen-thawed (69.2%) spermatozoa. The chromosomal integrity was analyzable in a range of 86.4 to 93.4% (Fig. 3). Chromosomal damage was significantly increased ($P < 0.001$) in the freeze-dried spermatozoa compared with the fresh and frozen-thawed spermatozoa (Table 1).

Discussion

It is well known that the fertilizing capacity of mammalian sperm can be assessed using rodent oocytes [34–36]. Moreover, the spermatozoon chromosomes in a variety species can be easily visualized using these oocytes in combination with ICSI techniques [25–28]. Therefore, the present study carried out an assessment of

Table 1 Fertilizing capacity of fresh, frozen-thawed and freeze-dried canine spermatozoa microinjected into mouse oocytes

Type of sperm	No. examined*	Morphologically normal oocytes (%)**	No. fixed†	Activated oocytes (%)	Status of paternal nuclei (%)			No. MPN analyzed	Normal chromosome (%)
					MPN‡	DSH	CSH		
Fresh	108	32 (29.6) ^a	26	25 (96.2)	16 (38.5) ^a	10 (38.5) ^a	0 (0)	15	11 (73.3) ^a
Frozen-thawed	235	139 (59.1) ^b	117	106 (90.6)	81 (69.2) ^a	34 (29.1) ^a	2 (1.7)	70	55 (78.6) ^a
Freeze-dried	179	179 (100) ^c	169	169 (100)	156 (92.3) ^b	13 (7.8) ^b	0 (0)	144	39 (27.1) ^b

MPN, male pronucleus, DSH, decondensed sperm head, CSH, condensed sperm head

^{a-c} Within a column, values without a common superscript differ ($P < 0.001$)

* No. of surviving oocytes after sperm injection

** The oocytes were observed at 6 h after ICSI

† Only morphologically normal oocytes were fixed 19–21 h after ICSI

‡ The paternal nuclei in the pronuclear and first mitotic stages were judged as MPN

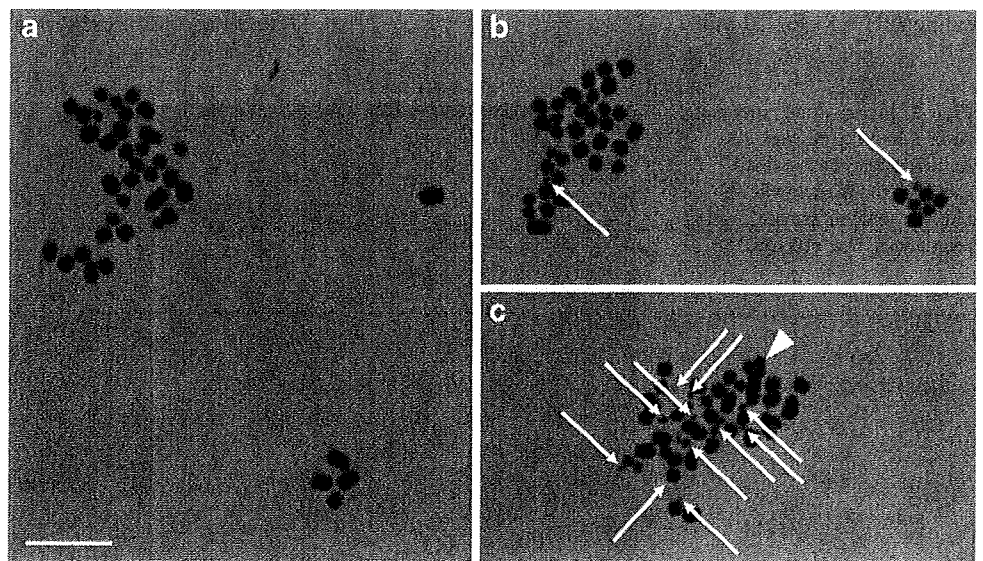
the fertilizing capacity of canine spermatozoa using mouse oocytes.

As shown in Table 1, freeze-dried canine spermatozoa were as capable of fertilization as fresh and frozen-thawed spermatozoa. When freeze-dried canine spermatozoa were injected into mouse oocytes, a majority of the nuclei transformed into the MPN. The value was obviously higher than in the other groups. A possible reason is that the plasma membrane of the freeze-dried spermatozoa was completely destroyed [7, 11, 15], which could lead to a more rapid contact between the sperm nuclei and the ooplasm.

Mouse oocytes are hypersensitive to the acrosome enzyme in spermatozoa: mouse oocytes injected with acrosome-intact bull and boar spermatozoa or acrosomal enzyme(s) undergo deformation and never reach the 2-cell stage [37]. In our preliminary experiments, paternal nuclei in all of the deformed oocytes at 19–21 h after ICSI entered arrest at the time of decondensation or pronuclear forma-

tion. They never reached the first mitotic stage (data not shown), suggesting that acrosomal contents in spermatozoa are disturbed the progress of fertilization. Therefore, the deformed oocytes were discarded and the remainder, morphologically normal oocytes, was utilized for the assessment of the fertilizing capacity (Fig. 1). Kimura et al. [24] demonstrated that sperm perinuclear material contained a necessary substance (sperm-borne oocyte activating factor: SOAF) to activate the oocytes, and that the SOAF activity could be analyzed using mouse oocytes. As shown in Table 1, it seems that the SOAF activity in canine spermatozoa was not species-specific, and was maintained even when the spermatozoa were freeze-dried. However, a portion of the mouse oocytes injected with freeze-dried and sonicated bull spermatozoa did exhibit an abnormal pattern of calcium oscillations [12]. For a conclusive assessment of the successful oocyte activation, the calcium oscillation pattern induced by freeze-

Fig. 3 Chromosomes spread from freeze-dried canine spermatozoa injected into mouse oocytes. **a** Normal chromosome set. The haploid chromosome number of canine spermatozoa is 39. Minor **b** and multiple **c** chromosome aberrations. Arrows indicate the chromosomal or chromatid fragmentations. The arrowhead represents reciprocal translocation. Bar = 10 μ m



dried canine spermatozoa remains a subject for future investigation.

As shown in Table 1, the chromosomal integrity in fresh canine spermatozoa was relatively low (73.3%) compared with mouse (91.6% [25]) and human (95.7% [28]) spermatozoa. In our preliminary experiment, when frozen-thawed canine spermatozoa were injected into the double-volume (artificially fused) mouse oocytes, the rates of morphologically normal oocytes and MPN formation improved to 87.5 and 91.8%, respectively. Since mouse oocytes are hypersensitive to acrosomal enzyme, the size (volume) of the cytoplasm of the mouse oocyte might be an important factor for an assessment of fertilizing capability in canine spermatozoa.

The freeze-drying procedure generated chromosomal aberrations in canine spermatozoa (Table 1). Since frozen-thawed spermatozoa did not increase chromosomal damage, one of the reasons for the increased damage is likely to be demembranization in freeze-dried spermatozoa. Sperm nuclei with a defective plasma membrane can easily come into contact with endonuclease, leading to the generation of chromosomal nicks. In the mouse, the chromosomes in 30–60% of the freeze-dried spermatozoa were impaired [3, 7, 15], while the percentage of chromosomally damaged canine spermatozoa was 72.9% in the present study. The chromosomal damage of freeze-dried mouse spermatozoa can be decreased by modifying the pH value of the storage media [17], and by pre-treatment with diamide [3] and EGTA [15]. Therefore, it is expected that optimized conditions will subsequently be established for successful freeze-drying of canine spermatozoa.

References

- Wakayama T, Yanagimachi R. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nat Biotechnol.* 1998;16:639–41.
- Kaneko T, Nakagata N. Relation between storage temperature and fertilizing ability of freeze-dried mouse spermatozoa. *Comp Med.* 2005;55:140–4.
- Kaneko T, Whittingham DG, Overstreet JW, Yanagimachi R. Tolerance of the mouse sperm nuclei to freeze-drying depends on their disulfide status. *Biol Reprod.* 2003;69:1859–62.
- Kawase Y, Araya H, Kamada N, Jishage K, Suzuki H. Possibility of long-term preservation of freeze-dried mouse spermatozoa. *Biol Reprod.* 2005;72:568–73.
- Kawase Y, Tachibe T, Jishage K, Suzuki H. Transportation of freeze-dried mouse spermatozoa under different preservation conditions. *J Reprod Dev.* 2007;53:1169–74.
- Kawase Y, Hani T, Kamada N, Jishage K, Suzuki H. Effect of pressure at primary drying of freeze-drying mouse sperm reproduction ability and preservation potential. *Reproduction.* 2007;133:841–6.
- Kusakabe H, Szczygiel MA, Whittingham DG, Yanagimachi R. Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:13501–6.
- Ward MA, Kaneko T, Kusakabe H, Biggers JD, Whittingham DG, Yanagimachi R. Long-term preservation of mouse spermatozoa after freeze-drying and freezing without cryoprotection. *Biol Reprod.* 2003;69:2100–8.
- Kaneko T, Kimura S, Nakagata N. Offspring derived from oocytes injected with rat sperm, frozen or freeze-dried without cryoprotection. *Theriogenology.* 2007;68:1017–21.
- Hochi S, Watanabe K, Kato M, Hirabayashi M. Live rats resulting from injection of oocytes with spermatozoa freeze-dried and stored for one year. *Mol Reprod Dev.* 2008;75:890–4.
- Liu JL, Kusakabe H, Chang CC, Suzuki H, Schmidt DW, Julian M, et al. Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits. *Biol Reprod.* 2004;70:1776–81.
- Abdalla H, Hirabayashi M, Hochi S. The ability of freeze-dried bull spermatozoa to induce calcium oscillations and resumption of meiosis. *Theriogenology.* 2009;71:543–52.
- Kwon IK, Park KE, Niwa K. Activation, pronuclear formation, and development in vitro of pig oocytes following intracytoplasmic injection of freeze-dried spermatozoa. *Biol Reprod.* 2004;71:1430–6.
- Nakai M, Kashiwazaki N, Takizawa A, Maedomari N, Ozawa M, Noguchi J, et al. Effects of chelating agents during freeze-drying of boar spermatozoa on DNA fragmentation and on developmental ability in vitro and in vivo after intracytoplasmic sperm head injection. *Zygote.* 2007;15:15–24.
- Kusakabe H, Yanagimachi R, Kamiguchi Y. Mouse and human spermatozoa can be freeze-dried without damaging their chromosomes. *Hum Reprod.* 2008;23:233–9.
- Kaneko T, Nakagata N. Improvement in the long-term stability of freeze-dried mouse spermatozoa by adding of a chelating agent. *Cryobiology.* 2006;53:279–82.
- Kaneko T, Whittingham DG, Yanagimachi R. Effect of pH value of freeze-drying solution on the chromosome integrity and developmental ability of mouse spermatozoa. *Biol Reprod.* 2003;68:136–9.
- Abe Y, Lee DS, Sano H, Akiyama K, Yanagimoto-Ueta Y, Asano T, et al. Artificial insemination with canine spermatozoa frozen in a skim milk/glucose-based extender. *J Reprod Dev.* 2008;54:290–4.
- Suwa Y, Abe Y, Lee DS, Yanagimoto-Ueta Y, Suzuki H. Individual fertility differences in the frozen-thawed spermatozoa among semen donors in the Labrador Retriever. *Reprod Med Biol.* 2009;8(3):125–29.
- Otoi T, Shin T, Kraemer DC, Westhusin ME. Influence of maturation culture period on the development of canine oocytes after in vitro maturation and fertilization. *Reprod Nutr Dev.* 2004;44:631–7.
- Rodrigues Bde A, dos Santos LC, Rodrigues JL. Embryonic development of in vitro matured and in vitro fertilized dog oocytes. *Mol Reprod Dev.* 2004;67:215–23.
- Lee BC, Kim MK, Jang G, Oh HJ, Yuda F, Kim HJ, et al. Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature.* 2005;436:641.
- Kim S, Park SW, Hossein MS, Jeong YW, Kim JJ, Lee E, et al. Production of cloned dogs by decreasing the interval between fusion and activation during somatic cell nuclear transfer. *Mol Reprod Dev.* 2009;76:483–9.
- Kimura Y, Yanagimachi R, Kuretake S, Bortkiewicz H, Perry AC, Yanagimachi H. Analysis of mouse oocyte activation suggests the involvement of sperm perinuclear material. *Biol Reprod.* 1998;58:1407–15.
- Tateno H, Kamiguchi Y. Evaluation of chromosomal risk following intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol Reprod.* 2007;77:336–42.
- Watanabe H, Tateno H, Kusakabe H, Matsuoka T, Kamiguchi Y, Fujise Y, et al. Fertilizability and chromosomal integrity of frozen-thawed Bryde's whale (*Balaenoptera edeni*) spermatozoa intracytoplasmically injected into mouse oocytes. *Zygote.* 2007;15:9–14.

27. Rybouchkin AV, De Sutter P, Dhont M. Unprotected freezing of human spermatozoa exerts a detrimental effect on their oocyte activating capacity and chromosome integrity. *Zygote*. 1996;4:263–8.
28. Watanabe S. Frequent structural chromosome aberrations in immotile human sperm exposed to culture media. *Hum Reprod*. 2004;19:940–7.
29. Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JL, Torres I. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *J Reprod Fertil*. 1989;86:679–88.
30. Toyoda Y, Yokoyama M, Hoshi T. Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro: I. In vitro fertilization of eggs by fresh epididymal sperm (in Japanese). *Jpn J Anim Reprod*. 1971;16:147–51.
31. Johnston SD, Root Kustritz MV, Olson PN. Semen collection, evaluation, and preservation. In: Kersey R, LeMelledo D, editors. *Canine and feline theriogenology*. Philadelphia: Saunders; 2001. p. 287–306.
32. Kimura Y, Yanagimachi R. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol Reprod*. 1995;52:709–20.
33. Mikamo K, Kamiguchi Y. A new assessment system for chromosomal mutagenicity using oocytes and early zygotes of the Chinese hamster. In: Ishihara T, Sasaki MS, editors. *Radiation-Induced Chromosome Damage in Man*. New York: Alan R. Liss; 1983. p. 411–32.
34. Yanagimachi R, Yanagimachi H, Rogers BJ. The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol Reprod*. 1976;15:471–6.
35. Lee JD, Kamiguchi Y, Yanagimachi R. Analysis of chromosome constitution of human spermatozoa with normal and aberrant head morphologies after injection into mouse oocytes. *Hum Reprod*. 1996;11:1942–6.
36. Rybouchkin A, Dozortsev D, Pelinck MJ, De Sutter P, Dhont M. Analysis of the oocyte activating capacity and chromosomal complement of round-headed human spermatozoa by their injection into mouse oocytes. *Hum Reprod*. 1996;11:2170–5.
37. Morozumi K, Yanagimachi R. Incorporation of the acrosome into the oocyte during intracytoplasmic sperm injection could be potentially hazardous to embryo development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:14209–14.

—Note—

Effect of Zona Incision by Piezo-Micromanipulator (ZIP) on *In Vitro* Fertilization in 21 Transgenic Mice Lines

Yosuke KAWASE¹⁾, Takanori TACHIBE¹⁾, Toshio HANI¹⁾, Hiromi TATEISHI¹⁾,
Kou-ichi JISHAGE¹⁾, and Hiroshi SUZUKI²⁾

¹⁾Chugai Research Institute for Medical Science, 1–135 Komakado, Gotemba, Shizuoka 412-8513 and
²⁾Research Unit for Functional Genomics, National Research Center for Protozoan Diseases,
Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, 2–13 Inada-cho, Obihiro,
Hokkaido 080-8555, Japan

Abstract: Zona incision using a piezo-micromanipulator (ZIP) has been demonstrated to be effective for *in vitro* fertilization (IVF) using cryopreserved C57BL/6 spermatozoa. In this study, ZIP oocytes inseminated with frozen-thawed genetically modified C57BL/6J or FVB mice spermatozoa (21 lines) showed fertilization rates of 22–75% and live fetus rates of 8–49%. In 6 of the lines, the fertilization rates for oocytes compared with ZIP (42–75%) were significantly higher than that of nontreated oocytes (0–50%). Using only 90 oocytes for IVF with ZIP, 5 breeding pairs were produced from cryopreserved genetically modified mice spermatozoa. Our results indicate that application of the ZIP technique is effective for IVF using cryopreserved genetically modified mouse spermatozoa.

Key words: frozen-thawed spermatozoa, IVF, ZIP

The number of labs creating and studying transgenic and knockout mice has risen steadily since the technique was developed in the late 1980s. Around 3,000 knockout strains have become available and the number is growing exponentially [8]. Cryopreservation of mouse spermatozoa has been widely applied to the maintenance of transgenic and knockout lines to cut down on breeding space, time, and cost [8]. However, the fertility of cryopreserved spermatozoa from some inbred strains such as the C57BL/6 which is strain commonly used in transgenic and mutagenesis studies is extremely poor [4, 10, 15]. There are reports that methods of zona-pellucida dissection, partial zona-pellucida dissection (PZD) [9], partial zona-pellucida incision by piezo-micromanipulator (ZIP) [5], and laser-assisted zona drilling [3] are

effective in increasing fertility rates. Especially, ZIP in combination with *in vitro* fertilization (IVF) using cryopreserved C57BL/6J transgenic spermatozoa dramatically improved fertilization rates and subsequent embryonic development [5]. IVF with ZIP (ZIP/IVF) is also an effective assisted reproductive technique (ART) for reproduction of infertile transgenic mice with low-motility spermatozoa [6]. We reported this technique 7 years ago and here we report the results of the application of ZIP/IVF in the breeding and conservation of 21 lines of transgenic mice at our laboratory over the past 7 years.

The mice (C57BL/6J, FVB, and ICR) used to make the transgenic mice were purchased from CLEA Japan, Inc. (Tokyo, Japan). These transgenic mice did not con-

(Received 21 January 2009 / Accepted 17 March 2009)

Address corresponding: H. Suzuki, Research Unit for Functional Genomics, National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, 2–13 Inada-cho, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan

tain modified reproductive tissue-specific genes and were able to mate naturally. The mice were housed in polycarbonate cages and maintained under a specific pathogen-free environment in light-controlled (lights on from 05:00 to 19:00) and air-conditioned (temperature, $24 \pm 1^\circ\text{C}$; humidity, $50 \pm 10\%$) rooms. The mice had free access to standard laboratory chow (CE-2, Clea Japan). The Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of Chugai Pharmaceutical reviewed the protocols and confirmed that the animals used in this study were cared for and used under the Guiding Principles for the Care and Use of Research Animals promulgated by IACUC.

Mature females were induced to superovulate by an intraperitoneal injection of 5 IU equine chorionic gonadotrophin (eCG; Serotrophin, Teikokuzoki Co., Tokyo, Japan) followed 48 h later by an injection of 5 IU human chorionic gonadotrophin (hCG; Puberogen, Sankyo Co., Tokyo, Japan). Freshly ovulated oocytes were collected from the oviducts 15–16 h after the hCG injection. The oocytes for ZIP/IVF were treated with 0.1% hyaluronidase (280 U/mg; H-3506, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) in TYH medium [16] to remove cumulus cells. As a control, cumulus-intact (nontreated) oocytes were used in conventional IVF [9].

Frozen-thawed spermatozoa, collected from the cauda epididymis of mature males of the same strain, were prepared using the method described by Nakagata *et al.* [9]. The spermatozoa were dispersed from two tails of the epididymides into 100 μl of cryopreservation solution. The sperm suspension was then divided into 10 aliquots, and 10 μl of each aliquot was placed in a plastic straw (volume, 0.25 ml; Fujihira Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan) which was then heat-sealed. The straws were then cooled by placing them into the neck (gas layer) of a liquid nitrogen container (volume, 2 l; Iuchi Seieido Co., Ltd., Osaka, Japan) for 10 min, then plunged into liquid nitrogen and stored before thawing.

To thaw the sperm, the frozen plastic straws were immersed in a water bath for 15 min at 30°C . Approximately 2 μl of thawed sperm suspension was added to 400 μl of TYH medium. After incubation of the frozen-thawed spermatozoa for 30 min at 37°C (for ZIP/IVF [5] and conventional IVF [9]) under 5% CO_2 in air, the ZIP oocytes and freshly collected oocytes with cumulus

cells were separately introduced into TYH medium containing frozen-thawed spermatozoa. Fertilization was defined by the number of embryos that had developed to the 2-cell stage 24 h after insemination. All zygotes were cultured in Whitten's medium [17] containing 100 μM EDTA [1] up to the 2-cell stage in 5% CO_2 in air at 37°C and subsequently transferred into the oviduct of pseudopregnant ICR recipients (CLEA Japan, Tokyo) on 0.5 days post-coitum (dpc) as described previously [12]. The recipients were euthanized at 19.5 dpc to determine the number of implantation sites and of term fetuses.

For the ZIP procedure, a holding pipette was prepared from a glass capillary tube (G1, Narishige, Tokyo, Japan), which was heated and pulled using an automatic electromagnetic pipette puller (P-197, Sutter Instruments, Novato, CA). The end of the pipette (about 80 μm in diameter) was polished using a microforge (De Fonbrune, Beaudouim, France).

The ZIP pipette was prepared from a glass capillary tube (Sutter Instruments) using a pipette puller (Sutter Instruments) and had a blunt end [7]. The outer and inner diameters of the tip of the ZIP pipette were approximately 7 and 5 μm , respectively. A small volume (about 0.5 μl) of mercury was introduced into the ZIP pipette from its proximal end. The pipette was connected to the Fluorinert (F77, Sumitomo 3M Co., Tokyo, Japan)-filled syringe system of the piezo electric actuator (Model PMM 150 FU; Prime Tech, Ibaraki, Japan) which was attached to a micromanipulator (Leica, Wetzlar, Germany).

The ZIP procedure was essentially the same as described previously [5]. The zona pellucida was incised by the micropipette through the application of piezo pulses (controller setting: speed 2, intensity 2) while the pipette was moved along the surface of zona pellucida. The length of the incision made in the zona pellucida using ZIP was approximately 26 μm , representing about 1/12 of the perimeter of the zona pellucida of a mature mouse oocyte (approximately 314 μm) [5]. After IVF as described, all zygotes were cultured until the 2-cell stage in Whitten's medium [17] containing 100 μM EDTA [1] in 5% CO_2 in air at 37.0°C . Fertilization was defined by the number of embryos that had developed to the 2-cell stage 24 h after insemination.

Data presented in this study were analyzed statisti-

Table 1. Effect of ZIP on the fertility of transgenic mouse freeze-thawed spermatozoa and subsequent embryo transfer

Line	Strain	Treatment	No. of fertilized / No. of inseminated oocytes (%)	No. of implantation sites / No. of embryos transferred (%)	No. of live fetuses / No. of embryos transferred (%)
A	C57BL/6J	ZIP	222/300 (74)*	123/205 (60)	70/205 (34)
		Non	5/20 (25)	3/5 (60)	2/5 (40)
B	C57BL/6J	ZIP	277/626 (44)*	172/277 (62)	104/277 (38)
		Non	15/85 (18)	7/15 (47)	4/15 (27)
C	C57BL/6J	ZIP	158/367 (43)	75/157 (48)*	31/157 (20)
		Non	15/30 (50)	0/15 (0)	0/15 (0)
D	C57BL/6J	ZIP	203/292 (70)*	120/202 (59)	58/202 (29)
		Non	1/34 (3)	Not done	Not done
E	C57BL/6J	ZIP	184/245 (75)*	93/184 (51)*	51/184 (28)
		Non	19/69 (28)	4/19 (21)	3/19 (16)
F	C57BL/6J	ZIP	184/440 (42)*	135/151 (89)	74/151 (49)
		Non	0/36 (0)	Not done	Not done
G	FVB	ZIP	131/279 (47)*	65/131 (50)	42/131 (32)
		Non	11/61 (18)	4/11 (36)	3/11 (27)

* $P < 0.05$, compared to the control (non-treated).

cally by the chi-square test and Tukey's test for nonparametric multiple comparisons. In all statistical tests, the difference was considered significant when P was < 0.05 .

The fertilization rates were higher in ZIP/IVF (42–75%) than in conventional IVF in 6 of 7 lines; lines A–F had a C57BL/6J genetic background and line G had a FVB genetic background (Table 1). However, the embryos produced by conventional IVF from line C, the line that did not show a higher fertilization rate using ZIP/IVF, failed to produce any live born pups after embryo transfer. In line C there might be abnormally fertilized oocytes including, for example, parthenogenetic oocytes. However, the abnormal fertilization could not be confirmed because an embryo was defined as fertilized at the 2-cell stage 24 h after insemination in this study. Overall, 20–49 and 27–40% of the 2-cell embryos developed to term following ZIP/IVF and conventional IVF, respectively. Lines C, D, and F produced live fetuses following ZIP/IVF but not from conventional IVF.

Figure 1 shows the overall efficiency of mouse production after ZIP/IVF and conventional IVF using frozen-thawed spermatozoa. In 3 lines (B, E from C57BL/6J and G from FVB) of transgenic mice, the overall efficiency of ZIP/IVF was significantly greater than conventional IVF ($P < 0.05$). The FVB/N mouse strain has a low sperm concentration but high fertility, which is

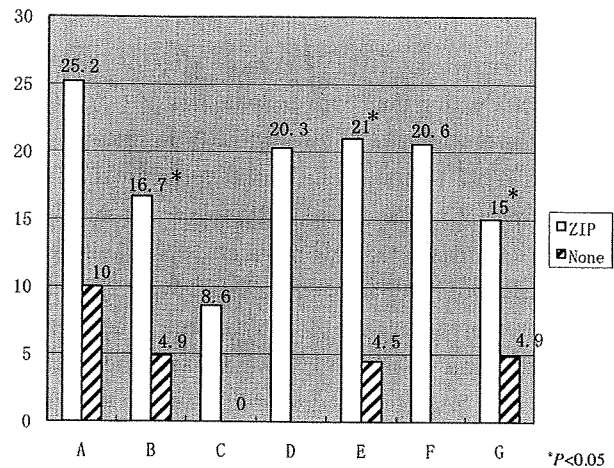


Fig. 1. The overall efficiency of mouse production by means of ZIP/IVF and conventional IVF. Efficiency rates were 8.6–25.2% using ZIP/IVF. In lines B, E, and G, the overall efficiency was 16.7, 21.0, and 15.0%, respectively, with ZIP/IVF, higher than values for conventional IVF (4.9, 4.5, and 4.9%, respectively). The overall efficiency of lines D and F using conventional IVF could not be calculated because of the small number or lack of oocytes fertilized and thus not transferred.

maintained through the freezing process [13]. In this study, the overall efficiency using cryopreserved FVB transgenic spermatozoa was improved by using ZIP/IVF. The number of live born pups from 100 ZIP oocytes determined the overall efficiency. Figure 1 clearly indicates that, with cryopreserved C57BL/6J and FVB trans-