

学位論文
Doctor's Thesis

マウス精子凍結乾燥法の開発に関する研究
(The study for freeze-drying of mouse spermatozoa)

金子 武人
Takehito Kaneko

熊本大学大学院医学研究科博士課程生理系専攻資源開発学
指導：中潟 直己 教授

2005年度

目次

第一章 導入

- 1 要旨 . . . 4
- 2 発表論文リスト . . . 6
- 3 謝辞 . . . 7
- 4 略語 . . . 8

第二章 序論 . . . 9

第三章 材料及び方法

- 1 フリーズドライ用保存液の pH がマウス精子に与える影響
について . . . 13
- 2 異なる温度条件下で保存したフリーズドライ精子の受精能
について . . . 26
- 3 航空輸送後のフリーズドライ精子の受精能の変化について . . . 28
- 4 精巣内精子および精巣上体尾部精子のフリーズドライ
に対する耐性について . . . 31

第四章 結果

- 1 フリーズドライ用保存液の pH がマウス精子に与える影響
について . . . 33
- 2 異なる温度条件下で保存したフリーズドライ精子の受精能
について . . . 37
- 3 航空輸送後のフリーズドライ精子の受精能の変化について . . . 42
- 4 精巣内精子および精巣上体尾部精子のフリーズドライ
に対する耐性について . . . 44

第五章 考察

- 1 フリーズドライ用保存液の pH がマウス精子に与える影響
について . . . 48
- 2 異なる温度条件下で保存したフリーズドライ精子の受精能
について . . . 49
- 3 航空輸送後のフリーズドライ精子の受精能の変化について . . . 50
- 4 精巣内精子および精巣上体尾部精子のフリーズドライ
に対する耐性について . . . 51

第六章 結語 . . . 53

第七章 引川文献 . . . 56

第四章 結果

- 1 フリーズドライ用保存液の pH がマウス精子に与える影響
について . . . 33
- 2 異なる温度条件下で保存したフリーズドライ精子の受精能
について . . . 37
- 3 航空輸送後のフリーズドライ精子の受精能の変化について . . . 42
- 4 精巣内精子および精巣上体尾部精子のフリーズドライ
に対する耐性について . . . 44

第五章 考察

- 1 フリーズドライ用保存液の pH がマウス精子に与える影響
について . . . 48
- 2 異なる温度条件下で保存したフリーズドライ精子の受精能
について . . . 49
- 3 航空輸送後のフリーズドライ精子の受精能の変化について . . . 50
- 4 精巣内精子および精巣上体尾部精子のフリーズドライ
に対する耐性について . . . 51

第六章 結語 . . . 53

第七章 引川文献 . . . 56

第一章 導入

1. 要旨

マウス精子凍結乾燥（フリーズドライ）法は、冷蔵庫（4℃）での保存、常温簡易輸送の実現性が高く、保存・輸送ともに液体窒素が必要不可欠である従来の凍結保存法に比べて経済的なメリットを持つ。本研究は、マウス精子受精能を高率に長期間保持することのできるフリーズドライ法の開発を目的とした。フリーズドライ後の精子染色体の断片化およびこれら精子と受精した卵子のその後の発生を指標に、フリーズドライ用保存液の調製、特に pH の変化（pH9.0 から 6.0）がマウス精子に与える影響、保存温度（-70、-20、+4 及び +24℃）が精子受精能に与える影響について検討した。また、簡易輸送を目的としたフリーズドライ精子の常温での海外航空輸送を行い、輸送中の精子受精能への影響について検討した。さらに、成熟途中精子をフリーズドライすることで、精子核構造の状態と精子のフリーズドライに対する耐性との関係について検討した。その結果、以下のことが明らかとなった。

1. pH を 9.0、8.0、7.4 及び 6.0 に調整した保存液でフリーズドライされたマウス精子は、弱酸性（pH6.0 及び 7.4）に調整した保存液よりも弱アルカリ性（pH8.0 及び 9.0）に調整した保存液において安定した保存が可能であることが明らかとなった。また、55 日間の長期保存後も精子の保存状態は極めて安定していた。
2. フリーズドライ精子を -70、-20、+4 及び +24℃ で保存し、その後の受精能について検討した結果、+4℃ 以下で保存したフリーズドライ精子にお

いて、保存期間中（5 ヶ月間）の精子染色体へのダメージは確認されなかった。一方、+24℃で保存したフリーズドライ精子は、3 ヶ月目に染色体の崩壊が始まり、5 ヶ月日にはほとんどの精子の染色体がダメージを受けていた。さらに、-20 及び+4℃で保存したフリーズドライ精子は17 ヶ月間の長期保存においても、精子染色体への大きなダメージは確認されず良好に保存されていた。

3. フリーズドライ精子は常温での海外航空輸送後も輸送前と同程度の受精能を保持しており、正常な繁殖能力を備えた産子を得ることができた。
4. 精巣内精子の染色体は、フリーズドライに対して耐性が低かったが、フリーズドライ前の Diamide 処理によりその耐性は有意に向上した。一方、フリーズドライに対して高い耐性を示す精巣上体尾部精子は、フリーズドライ前の DTT 処理によりその耐性は著しく低下した。フリーズドライに対するマウス精子の耐性は、精子の成熟度及び成熟過程においてヒストンからプロタミンに置換される精子核内のタンパク構造が強く関係していることが明らかとなった。

本研究により、長期保存が可能なマウス精子フリーズドライ法は確立され、新規精子保存法としての応用が期待される。また、フリーズドライ精子は常温で国際輸送が可能であることから、今後の研究の継続による保存法の改良により、将来のマウス遺伝資源授受に大きく貢献できるものである。

2. 発表論文リスト

- (1) Relation between storage temperature and fertilizing ability of freeze-dried mouse spermatozoa. (2005)

Comparative Medicine 55, 142-146.

Kaneko, T., Nakagata, N.

- (2) Tolerance of the mouse sperm nuclei to freeze-drying depends on their disulfide status. (2003)

Biology of Reproduction 69, 1859-1862.

Kaneko, T., Whittingham, D.G., Overstreet, J.W., Yanagimachi, R.

- (3) Effect of pH value of Freeze-drying solution on the chromosome integrity and developmental ability of mouse spermatozoa. (2003)

Biology of Reproduction 68, 136-139.

Kaneko, T., Whittingham, D.G., Yanagimachi, R.

3. 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究に終始ご指導とご教示を賜りました熊本大学生命資源研究支援センター 動物資源開発研究部門 中潟直己教授に深甚の謝意を表します。

University of Hawaii, Institute for Biogenesis Research 柳町隆造教授にはフリーズドライ法に関する数多くの技術的なご助言を頂きました。心から深謝の意を申し上げます。

また、中潟研究室の皆様には、実験に関する多大なご協力を頂きました。深く感謝申し上げます。

最後に、現在まで常に惜しめない支援と寛大な精神で私を見守り続けて下さった父と母に心から感謝致します。

4. 略語

EDTA : Ethylene glycol-bis (beta-aminoethyl ether) -*N, N, N', N'*-tetraacetic acid

PMSG : Pregnant mare serum gonadotropin

hCG : Human chorionic gonadotropin

ICSI : Intracytoplasmic sperm injection

PVP : Polyvinyl pyrrolidone

FBS : Fetal bovine serum

第二章 序論

現在、医学・生物学研究は遺伝子レベルでの高次機能解析が急速に進められており、モデル動物の利用は研究を遂行する上で必要不可欠である。特にマウスは扱いやすく利用性が高いため、トランスジェニック、ノックアウトおよびミュータントマウスといった新規マウス系統が世界中で爆発的な勢いで作出されている。通常、作出されたマウスは自然交配により系統が維持されるが、作出量に対する飼育室の許容量不足、飼育コストの増加等、研究者への負担を重くしているのが現状である (Knight and Abbott, 2002)。配偶子保存は、これら新規マウス系統を効率的に保存することのできる方法の一つである。現在、配偶子は液体窒素中で保存されるのが主流であり、長期間の保存も可能である。また、保存された配偶子は液体窒素を介した病原性微生物の感染も認められず、安全に系統を維持することのできる方法である (Kyuwa et al., 2003)。既に、国内外における数カ所の施設で大規模な配偶子凍結によるマウス遺伝資源の保存業務が行われている (Sztein et al., 2000; Glenister and Thornton, 2000; Nakagata, 2000)。

精子においては、1個体から1度に大量 ($1 \sim 3 \times 10^7$ 精子) に回収することが可能であり、その保存法の開発は1990年前半に日本人研究者を中心に先駆的に行われ (Okuyama et al., 1990; Tada et al., 1990; Yokoyama et al., 1990; Takeshima and Nakagata, 1991)、凍結保護物質であるラフィノースおよびスキムミルクのみを用いた単純な保存液で保存できることが明らかとなった (Nakagata and Takeshima, 1992)。さらに、開発されたマウス精子凍結保存法は、多くの系統およびトランスジェニック系統への応用が可能であることが示されたことから (Nakagata and Takeshima, 1993; Nakagata et al., 1995;

Nakagata, 1996)、不足していた飼育スペースは確保され飼育コストも大幅に軽減された。しかしながら、凍結保存法は保存容器中の液体窒素の継続的な監視・補充および特殊な液体窒素容器（ドライシッパー）を必要とする輸送等、専門の施設以外では施行し難い問題が残されている。

凍結乾燥（フリーズドライ）法は、液体窒素を用いない保存方法の一つとして挙げられる。フリーズドライ法とは、含水物を凍結状態にした後、水分を直接水蒸気（昇華）にさせ、除去する方法であり、成分、香り、生物・生化学活性を損なわずに保存することが可能であることから食品、医薬品分野で利用されている。精子をフリーズドライする試みはヒト（Sherman, 1954）、ウシ（Bialy and Smith, 1957; Nei and Nagase, 1961; Singh and Roy, 1967; Keskinetepe et al., 2002）においては以前より行われており、最近ではウサギ（Liu et al., 2004）、ブタ（Kwon et al., 2004）において試みられている。マウス精子においても、フリーズドライの物理的なダメージに対して耐性があり、フリーズドライ後もその受精能が維持されていることが報告されている（Katayose et al., 1992）。1998年には、フリーズドライしたマウス精子から正常な産子が得られたことにより、フリーズドライ法を新しいマウス精子保存法として応用できる可能性が示唆された（Wakayama and Yanagimachi, 1998）。その後、フリーズドライ法の改良は行われている（Kusakabe et al., 2001）が確立にはまだ不十分であり、より詳細な研究が必要であると考えられる。

残念ながら現在の方法では、フリーズドライ後の精子に運動性は確認されていない。卵細胞質内精子注入法（Intracytoplasmic Sperm Injection: ICSI）は運動性の低い、あるいは示さない精子や体外受精をするには不十分な量の精子から正常な子孫を作製するための画期的な技術として知られている。この技術は、Uehara & Yanagimachi（1976, 1977）が精子を直接卵子内に導入し受精

が完成することを証明したのをきっかけに、医、畜産および実験動物学の分野において産子を作製する技術へと発展していった。ICSIによる産子作出の成功例は、ウサギ (Hosoi et al., 1988)、ウシ (Goto et al., 1991)、ヒト (Palermo et al., 1992)、ヒツジ (Catt et al., 1996)、ウマ (Cochran et al., 1998)、ネコ (Pope et al., 1998)、サル (Hewitson et al., 1999)、ブタ (Martin, 2000)、ハムスター (Yamauchi et al., 2002)、ラット (Hirabayashi et al., 2002) と多くの動物種において報告され、安定した技術として利用されている。マウスにおいては、卵子が物理的な刺激に対して感受性が高く、精子導入の際のガラスピペット挿入時に容易に損傷してしまうことから、技術確立が困難であった。1995年にKimura & Yanagimachiはピエゾマイクロマニピュレーターを開発し、精子導入時の卵子へのダメージを極端に減少させることに成功し、産子の作出を可能にした。その後ICSIの技術的改良が行われ (Kuretake et al., 1996)、ICSIによるマウスの産子作出技術の効率を向上させた。またICSIは、運動性を示さない精子から産子を獲得するだけでなく、1卵子に対して1精子のみで受精させることが可能な技術であるため、限りある遺伝資源の有効利用にも大きく貢献するものである。

このように、ICSIを利用したマウス精子フリーズドライ法は、液体窒素不要、低コスト、簡易保存・輸送、そして資源を有効に利用できるマウス系統保存法であり、その技術の確立は画期的である。本研究は、長期間効率的に受精能力を保持することのできるマウス精子フリーズドライ法を開発することを目的とし、以下の課題について検討した。

- フリーズドライ用保存液の pH がマウス精子に与える影響について
- 異なる温度条件下で保存したフリーズドライ精子の受精能について
- 航空輸送後のフリーズドライ精子の受精能の変化について
- 精巣内精子および精巣上体尾部精子のフリーズドライに対する耐性について

第三章 材料及び方法

供試動物

本実験には、12 週齢以上の B6D2F1 (C57BL/6 × DBA/2) ハイブリッド雄マウスおよび 8~12 週齢の同系統雌マウスを用いた。8~16 週齢の ICR クローズドコロニー雌マウスは 2 細胞期胚移植用に使用した。全てのマウスは、微生物学的に統御された環境下において、午前 7 時から午後 7 時までの明期、午後 7 時から午前 7 時までの暗期、温度 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ および湿度 $54 \pm 1\%$ の条件下で飼育した。本実験は、熊本大学動物実験指針およびハワイ大学動物実験指針に従って行った。

1. フリーズドライ用保存液の pH がマウス精子に与える影響について

(1) フリーズドライ用保存液の作製

50 mM EGTA、50 mM NaCl および 10 mM Tris-HCl から成る溶液をフリーズドライ用保存液とし、1M HCl あるいは 1M NaOH の添加により pH を 9.0、8.0、7.4 および 6.0 に調整した。フリーズドライ用保存液は $0.22\mu\text{m}$ フィルターで濾過滅菌後、それぞれ 1ml ずつマイクロチューブに分注し 37°C に加温した。

(2) マウス精巣上体尾部精子のフリーズドライ

B6D2F1 雄マウスは頸椎脱臼による安楽死後、精巣上体尾部を摘出した。精巣上体尾部中の精細管の一部を小直剪刀を用いて切開し、尖鋭ピンセットを

用いて精子塊を採取した。精子塊は、1ml のフリーズドライ用保存液が入ったマイクロチューブ底部に導入し 10 分間 37℃ で静置した。800 μ l の上清を回収後、少量をスライドガラスに滴下し顕微鏡下で精子の形態学的観察を行った。精子懸濁液は、100 μ l ずつ 8 本の 2ml フリーズドライ用ガラスアンプルに分注した。精子懸濁液の入ったガラスアンプルは液体窒素中に 20 秒間浸漬後、凍結乾燥機（図 1）に装着した。30-33 $\times 10^{-3}$ hPa 陰圧下で 4 時間乾燥した後（図 2）、ガスバーナーを用いてアンプルを陰圧下で封入（図 3）、4℃ で一定期間保存した。

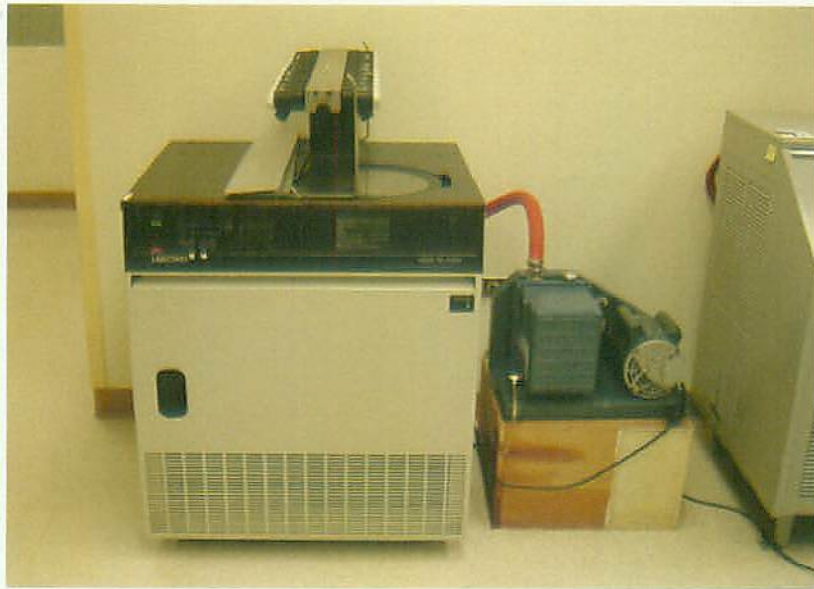


図 1 : 凍結乾燥機

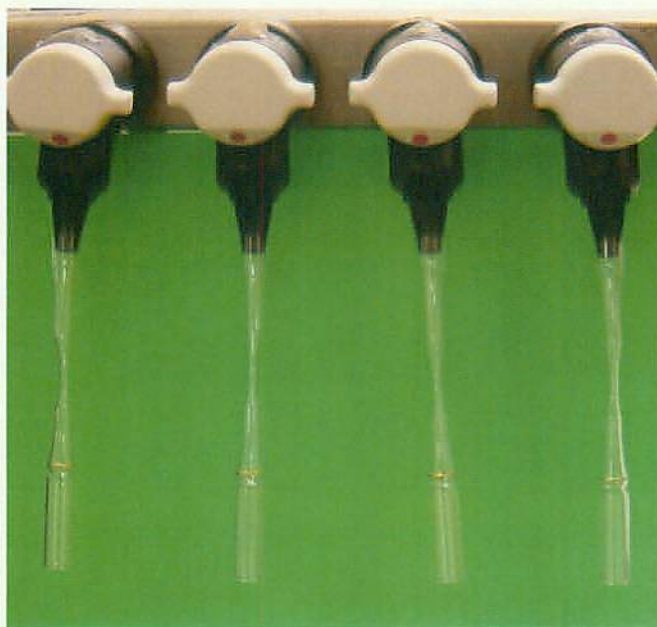


図 2 : 凍結乾燥機へのアンプルの装着



図 3 : 凍結乾燥精子アンプル

(3) 未受精卵子の採取

B6D2F1 雌マウスは過排卵誘起のため、5 単位の PMSG、その 48 時間後に 5 単位の hCG を腹腔内に投与した。hCG 投与後 13~15 時間に頸椎脱臼による安楽死後、卵管を摘出した。35mm 組織培養用ディッシュに Hepes 添加 CZB (H-CZB) メディウム (Kimura and Yanagimachi, 1995) の 50 μ l ドロップを作製しミネラルオイルで被覆した。摘出した卵管はミネラルオイル中に導入し、卵管膨大部より卵子-卵丘細胞複合体を回収した。卵子-卵丘細胞複合体を H-CZB メディウム中に移動し、0.1% ヒアルロニダーゼを用いて卵丘細胞を剥離した。卵丘細胞が剥離された未受精卵子は洗浄後、H-CZB メディウム中で室温保持した。

(4) 卵細胞質内精子注入法 (ICSI)

フリーズドライ精子の入ったアンプルは開封後、100 μ l の超純水を用いて精子を復水した。2~3 μ l の精子懸濁液を、12%PVP を含む H-CZB メディウム中に懸濁した。形態学的に正常な精子 (図 4) を直径 10 μ m (内径 7 μ m) のインジェクション用ガラスピペットで吸引し、新しい 12%PVP を含む H-CZB メディウム中に移動した。頭部と尾部の結合部付近がインジェクション用ガラスピペットの先端部にくるように精子を吸引し、ピエゾマイクロマニピュレーター (図 5) により頭部と尾部を切断した。頭部のみを再びガラスピペットに吸引し、未受精卵子を導入した H-CZB メディウム中に移動した。未受精卵子は直径 100 μ m のホールディング用ガラスピペット (先端内径 10 μ m) で吸引保持し、その反対側からインジェクション用ガラスピペットを未受精卵子内に注入、精子を卵子内に導入した (図 6)。精子を導入した卵子は CZB メディウム (Chatot

et al., 1989; Chatot et al., 1990) 中で、37℃、5%CO₂ および 95%空気環境下の
インキュベーター内で培養した。

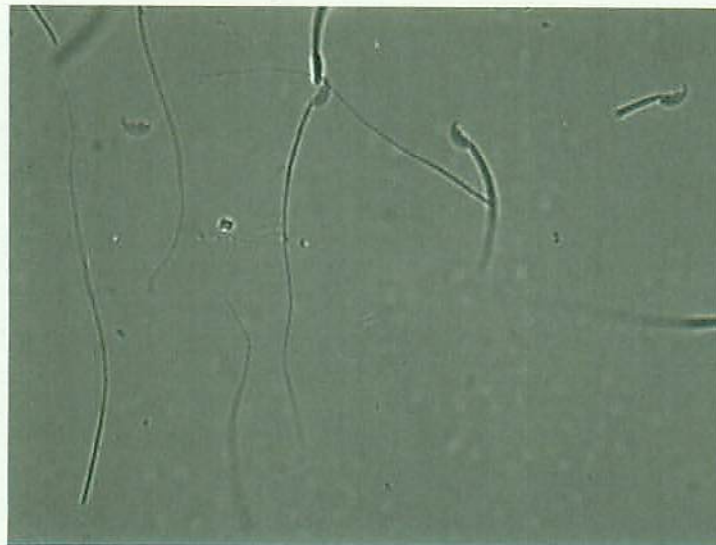


図4：復水後のマウス精子



図5：ピエゾマイクロマニピュレーター

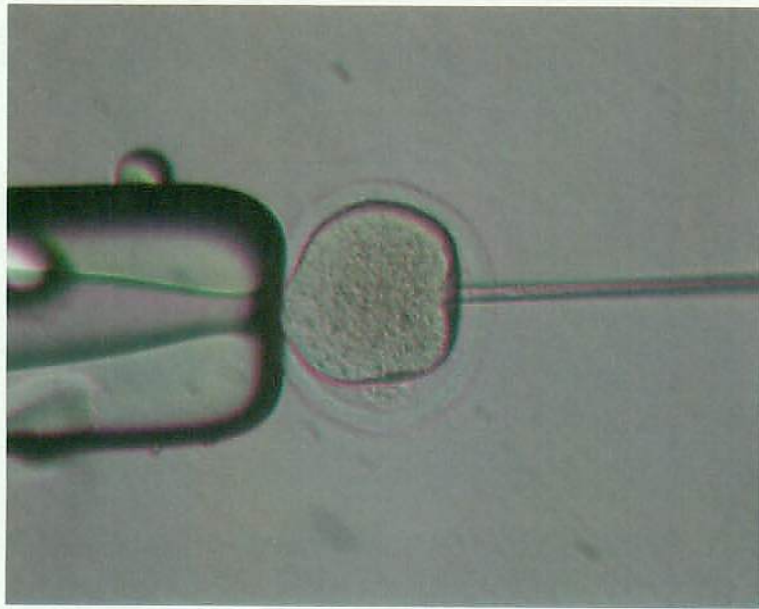


図 6 : ICSI

(5) 染色体解析

染色体の標本作製は Kishikawa et al. (1999) 及び Tateno et al. (2000) が既に報告している方法に準じて行った。精子導入後 5 時間に、雌雄両前核を形成している受精卵を選別した。受精卵は 0.006 $\mu\text{g/ml}$ ビンブラスチンを含む CZB メディウム中で 19~21 時間培養し、第 1 卵割中期で発生を停止させた。発生を停止した受精卵は、0.5%プロナーゼにより透明帯を溶解し、その後低張液 (30% FBS+1%クエン酸) に浸漬した。受精卵はスライドガラス上に固定、乾燥させ (Kamiguchi and Mikamo, 1986)、5%ギムザ溶液により染色した染色体を観察した。20 本の染色体が 2 対確認できたものを正常卵と判定した (図 7)。

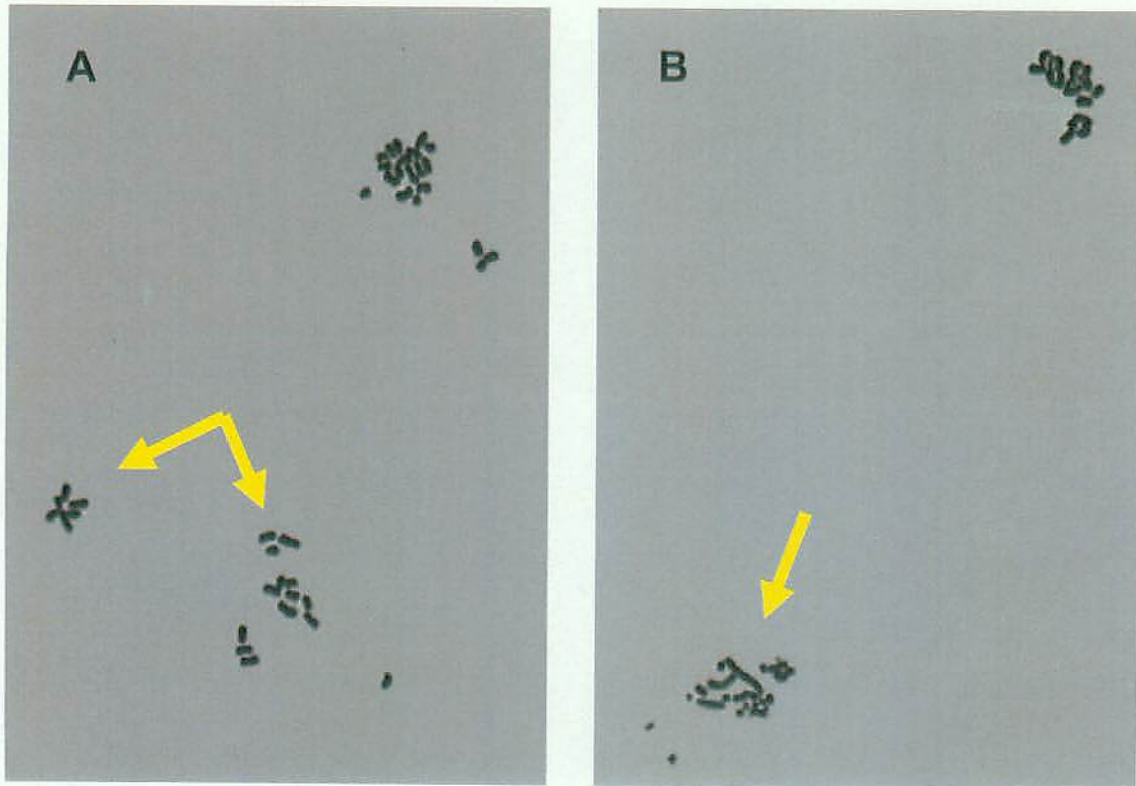


図7：受精後の卵子の染色体解析
(A) 正常な染色体を持つ精子と受精した卵子
(B) 断片化した染色体を持つ精子と受精した卵子

(6) 胚培養および胚移植

雌雄両前核を形成している受精卵は、CZB メディウム中で 37℃、5%CO₂ および 95%空気環境下のインキュベーター内で胚盤胞まで培養した。さらに、2細胞期まで発生した一部の胚は、胚移植の前日に精管結紮雄マウスと同居させ偽妊娠状態になった ICR 雌マウスの卵管内に移植した (Nakagata, 1992)。妊娠 15 日目にマウスは頸椎脱臼により安楽死させ、子宮内の胎児数および着床痕数を確認した。

2. 異なる温度条件下で保存したフリーズドライ精子の受精能について

(1) マウス精巣上体尾部精子のフリーズドライ

B6D2F1 雄マウスは頸椎脱臼による安楽死後、精巣上体尾部を摘出した。精巣上体尾部中の精細管の一部を小直剪刀を用いて切開し、尖鋭ピンセットを用いて精子塊を採取した。精子塊は、pH8.0 に調製した 1ml のフリーズドライ用保存液が入ったマイクロチューブ底部に導入し、実験 1 (2) と同様の方法でフリーズドライ精子を作製した。フリーズドライ 4 時間後に、 $37\text{-}41 \times 10^{-3} \text{hPa}$ 陰圧下でアンプルを封入した。

(2) フリーズドライ精子の保存および保存庫内の温度測定

アンプルは、 -80 、 -20 、 $+4$ 及び $+24^\circ\text{C}$ でそれぞれ 1 週間以内、1、3 および 5 ヶ月間保存した。フリーズドライ精子を保存する庫内 (-70 、 -20 、 $+4$ 及び $+24^\circ\text{C}$) の温度変化は 8 時間の測定を 3 回繰り返し、平均、最高及び最低温度を算出した。

(3) 卵細胞質内精子注入法 (ICSI)

各保存温度で一定期間保存したフリーズドライ精子は、 $100 \mu\text{l}$ の超純水を用いて復水した。実験 1 (4) と同様に ICSI を用いて過排卵誘起により得られた B6D2F1 マウスの未受精卵子内に精子頭部を導入した。精子を導入した卵子は CZB メディウム中で、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ および 95% 空気環境下のインキュベーター内で培養した。

(4) 染色体解析および胚移植

精子導入後 5 時間に、雌雄両前核を形成している受精卵を選別し、実験 1 (5) と同様の方法で染色体解析を行った。さらに、2 細胞期まで発生した胚を偽妊娠状態になった ICR 雌マウスの卵管内に移植し、妊娠 19.5 日に産子への発生を検討することで、フリーズドライ精子の受精能を評価した。

3. 航空輸送後のフリーズドライ精子の受精能の変化について

(1) マウス精巣上部尾部精子のフリーズドライおよび航空輸送

B6D2F1 雄マウスは頸椎脱臼による安楽死後、精巣上部尾部を摘出した。精巣上部尾部中の精細管の一部を小直剪刀を用いて切開し、尖鋭ピンセットを用いて精子塊を採取した。精子塊は、pH8.0 に調製した 1ml のフリーズドライ用保存液が入ったマイクロチューブ底部に導入し、実験 1 (2) と同様の方法でフリーズドライ精子を作製した。フリーズドライ 4 時間後に、 $30\text{-}33 \times 10^{-3} \text{hPa}$ 陰圧下でアンプルを封入した。アンプルは、1 日あるいは 8.5 ヶ月間 4℃で保存された後、コンポートエアシートで包装し、輸送箱に梱包した (図 8)。アンプルは国際宅配便業者によりアメリカ合衆国 (ハワイ州) から日本へ 4 日間で輸送された。到着したアンプルは、4℃で 9 日間保存された後、再び日本からハワイへ 3 日間で輸送された。到着したアンプルは再び 4℃で 3 ヶ月間保存された。

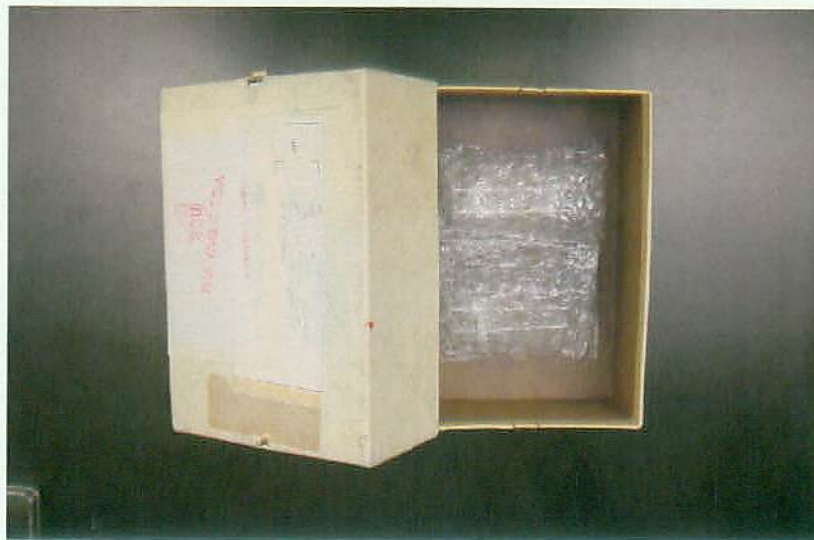


図8：フリーズドライ精子と輸送箱

(2) 卵細胞質内精子注入法 (ICSI)

輸送後のフリーズドライ精子は 100 μ l の超純水を用いて復水され、実験 1 (4) と同様に ICSI を用いて過排卵誘起により得られた B6D2F1 マウスの未受精卵子内に精子頭部を導入した。精子を導入した卵子は CZB メディウム中で、37℃、5%CO₂ および 95% 空気環境下のインキュベーター内で培養した。

(3) 胚移植

精子導入後 5 時間に、雌雄両前核を形成している受精卵を選別した。胚の培養を継続し、2 細胞期まで発生した胚を偽妊娠状態になった ICR 雌マウスの卵管内に移植し、妊娠 19.5 日目に産子への発生を検討することで輸送後のフリーズドライ精子の受精能を評価した。

4. 精巣内精子および精巣上体尾部精子のフリーズドライに対する耐性について

(1) マウス精巣内精子の採取

B6D2F1 雄マウスは頸椎脱臼による安楽死後、精巣を摘出した。精巣は表面の脂肪および血液を除去した後、精巣表面を小直剪刀を用いて切開し精細管を露出させた。精細管の数カ所を小直剪刀で切開し、尖鋭ピンセットを用いて精子塊を回収した。精子塊は、pH8.0 に調整した 1 ml のフリーズドライ用保存液の入った組織培養用ディッシュに懸濁し 30 分間室温で静置した。フリーズドライ用保存液の一部には、1 および 3 mM Diamide あるいは 1 mM DTT を添加した。

(2) マウス精巣上体尾部精子の採取

B6D2F1 雄マウスは頸椎脱臼による安楽死後、精巣上体尾部を摘出した。精巣上体尾部中の精細管の一部を小直剪刀を用いて切開し、尖鋭ピンセットを用いて精子塊を採取した。精子塊は、pH8.0 に調整した 1ml のフリーズドライ用保存液の入ったマイクロチューブ底部に導入し 30 分間室温で静置した。フリーズドライ用保存液の一部には、1 mM Diamide あるいは 1 および 10 mM DTT を添加した。

(3) 精子のフリーズドライおよび ICSI

実験 1 (2) と同様の方法で精巣内精子および精巣上体尾部精子をそれぞれ

れ4時間フリーズドライし、 $30\text{-}39\times 10^{-3}\text{hPa}$ 陰圧下でアンプルを封入した。アンプルは、4℃で5ヶ月間まで保存された。一定期間保存した後、100 μl の超純水を用いて復水したフリーズドライ精子は、実験1（4）と同様にICSIを用いて過排卵誘起により得られたB6D2F1マウスの未受精卵子内に精子頭部を導入した。精子を導入した卵子はCZBメディウム中で、37℃、5%CO₂および95%空気環境下のインキュベーター内で培養した。

（4）染色体解析および胚移植

精子導入後5時間に、雌雄両前核を形成している受精卵を選別し、実験1（5）と同様の方法で染色体解析を行った。さらに、2細胞期まで発生した胚を偽妊娠状態になったICR雌マウスの卵管内に移植し、妊娠19.5日目に産子への発生を検討することで、フリーズドライ精子の受精能を評価した。

第四章 結果

1. フリーズドライ用保存液の pH がマウス精子に与える影響について

pH を 9.0、8.0、7.4 および 6.0 に調整した保存液でフリーズドライした精子の染色体解析について表 1 に示した。新鮮精子においては、pH の違いによる染色体の断片化は見られなかった。しかしながら、フリーズドライ後の精子においては弱酸性 (pH6.0 : 7.4 = 26 : 35%) に調整した保存液よりも弱アルカリ性 (pH8.0 : 9.0 = 67 : 46%) に調整した保存液において染色体が高率に保持された。26 から 55 日間の長期保存後も染色体の断片化の進行は見られなかった。

表 2 において、ICSI 後受精したほとんどの卵子が pH の違いに関わらず 2 細胞期にまで発生した。2 細胞期から胚盤胞までの発生においては、弱酸性 (pH6.0 : 7.4 = 10 : 25%) に調整した保存液よりも弱アルカリ性 (pH8.0 : 9.0 = 58 : 61%) に調整した保存液でフリーズドライした精子由来の受精卵の発生が良好であった。28 から 56 日間の長期保存後も胚盤胞までの発生率に変化は見られなかった。

得られた受精卵の移植後の発生においても、弱酸性に調整した保存液よりも弱アルカリ性に調整した保存液でフリーズドライした精子由来の受精卵において良好な成績が得られた (表 3)。

フリーズドライ精子を 4℃で短期間 (7-8 日まで) あるいは長期間 (26-56 日間) 保存した時の精子染色体および受精能への影響に差はなく、保存期間が精子に与える影響は見られなかった。

表1 pHを調整した保存液でフリーズドライした精子と受精した卵子の染色体解析

精子	保存期間	保存液の pH	解析卵子数	正常な染色体を持つ
				卵子数 (%) [range]*
新鮮	—	9.0	22	17 (77) [67- 86]
		8.0	24	21 (88) [78-100]
		7.4	30	24 (80) [73-100]
		6.0	15	13 (87) [78-100]
フリーズドライ	7日まで	9.0	37	17 (46) [20- 67]
		8.0	42	28 (67) [61- 75] ^{a,b}
		7.4	29	10 (35) [20- 63] ^a
		6.0	19	5 (26) [14- 33] ^b
フリーズドライ	26-55 日間	9.0	47	31 (66) [57- 79] ^{c,d}
		8.0	50	38 (76) [60- 83] ^{e,f}
		7.4	37	13 (35) [20- 67] ^{c,e}
		6.0	22	4 (18) [15- 22] ^{d,f}

* %=正常な染色体を持つ卵子数/解析卵子数

有意差あり： a, $p < 0.05$; b and c, $p < 0.01$; d, e and f, $p < 0.005$

表2 pH を調整した保存液でフリーズドライした精子と受精した卵子の体外での発生

精子	保存期間	保存液 の pH	受精 卵子数	2 細胞期胚 数 (%) [†]	桑実胚数 (%) [†]	胚盤胞数 (%) [range] [†]
新鮮	-	9.0	59	59 (100)	57 (97)	52 (88) [82-100]
		8.0	64	60 (94)	57 (95)	54 (90) [70-100] ^{h,j}
		7.4	46	45 (98)	44 (98)	33 (73) [67-81] ^h
		6.0	80	77 (96)	75 (97)	58 (75) [64-86] ⁱ
フリーズ ドライ	8 日まで	9.0	57	54 (95)	47 (87) ^a	33 (61) [25-69] ^{j,k}
		8.0	62	59 (95)	54 (92) ^{b,c}	34 (58) [54-80] ^{l,m}
		7.4	70	59 (84)	42 (71) ^{c,d}	15 (25) [18-44] ^{i,l,n}
		6.0	91	81 (89)	43 (53) ^{a,b,d}	8 (10) [7-20] ^{k,m,n}
フリーズ ドライ	28-56 日間	9.0	65	63 (97)	59 (94) ^e	43 (68) [40-100] ^{o,p}
		8.0	79	78 (99)	77 (99) ^f	54 (69) [56- 80] ^{q,r}
		7.4	67	61 (91)	55 (90) ^g	17 (28) [19- 46] ^{o,q}
		6.0	62	55 (89)	36 (66) ^{e,f,g}	12 (22) [16- 38] ^{p,r}

[†] % = 2 細胞期胚数/受精卵子数

[†] % = 桑実胚数あるいは胚盤胞数/2 細胞期胚数

有意差あり: *d, h, i, n* and *o*. $p < 0.05$; *c*, $p < 0.01$; *a, b, e, f, g, j, k, l, m, p, q* and *r*. $p < 0.005$

表3 pHを調整した保存液でフリーズドライした精子と受精した卵子の移植後の発生

精子	保存期間	保存液 の pH	受精 卵子数	2細胞期 胚数 (%) [†]	移植 胚数	着床胚数 (%) [†]	胎仔数 (%) [range] [†]
新鮮	—	9.0	37	37 (100)	37	32 (87)	23 (62) [30-91]
		8.0	36	34 (94)	34	30 (88)	28 (82) [67-100]
		7.4	31	31 (100)	31	27 (87)	19 (61) [25-78]
フリーズ ドライ	7日まで	9.0	38	35 (92)	35	26 (74) ^a	14 (40) [20-69]
		8.0	60	58 (97)	58	46 (79) ^b	27 (47) [24-61] ^e
		7.4	44	37 (84)	37	14 (38) ^{a,b}	9 (24) [17-40] ^e
フリーズ ドライ	26-55日間	9.0	49	48 (98)	48	45 (94) ^c	22 (46) [20-65] ^f
		8.0	62	61 (98)	61	51 (84) ^d	30 (49) [38-60] ^g
		7.4	44	40 (91)	40	24 (60) ^{c,d}	7 (18) [12-33] ^{f,g}

[†] % = 2細胞期胚数/受精卵子数

[†] % = 着床胚数あるいは胎仔数/2細胞期胚数

有意差あり: *d* and *e*, *p* < 0.05; *f*, *p* < 0.01; *a*, *b*, *c* and *g*, *p* < 0.005

2. 異なる温度条件下で保存されたフリーズドライ精子の受精能について

フリーズドライ精子を-70、-20、+4 及び+24℃で保存している庫内の温度変化を表 4 に示した。各温度で保存したフリーズドライ精子の染色体解析について表 5 に示した。温度条件にかかわらず全ての実験区において、ICSI 後の卵子は高率に生存し (56-82%)、生存卵子の 87%以上が受精した。+4℃以下で保存したフリーズドライ精子において、5ヶ月間までの保存期間で保存中の精子染色体へのダメージは確認されなかった。一方、+24℃で保存されたフリーズドライ精子は、3ヶ月目に染色体の崩壊が始まり、5ヶ月目にはほとんどの精子の染色体がダメージを受けていた。

-80、-20 及び+4℃で 5ヶ月間保存したフリーズドライ精子と受精した卵子から正常な産子が得られた。しかしながら、+25℃で 5ヶ月間保存したフリーズドライ精子と受精した卵子からは産子が得られず、胚は着床すらしていなかった (表 6)。

さらに、-20 及び+4℃で保存したフリーズドライ精子は 17ヶ月間の長期保存においても、精子染色体への大きなダメージは確認されず良好に保存されていた (表 7)。

表4 フリーズドライ精子を保存する庫内の温度変化

設定温度 (°C)	平均温度 (°C) [range]	最高温度 (°C) [range]	最低温度 (°C) [range]
-70	-69.6 [-70.4 - -68.2]	-66.5 [-68.2 - -65.4]	-70.1 [-70.9 - -68.8]
-20	-22.1 [-26.4 - -19.3]	-15.5 [-25.5 - -9.3]	-22.9 [-26.4 - -20.6]
+4	+4.3 [+4.0 - +4.8]	+8.5 [+7.8 - +8.9]	+3.9 [+3.7 - +4.0]
+24	+24.3 [+23.6 - +25.2]	+25.0 [+24.2 - +25.9]	+23.1 [+22.7 - +23.6]

表5 異なる温度で保存したフリーズドライ精子と受精した卵子の染色体解析

保存温度 (℃)	保存期間 (月)	精子導入 卵子数	生存卵子 数 (%) *	受精卵子 数 (%) †	解析 卵子数	正常な染色体を 持つ卵子数 (%) ‡
-70	1週間	77	58 (75)	54 (93)	39	26 (67) ^a
	1	61	50 (82)	48 (96)	44	25 (57)
	3	78	54 (69)	52 (96)	45	17 (38) ^b
	5	63	46 (73)	41 (89)	39	17 (44)
-20	1週間	79	52 (66)	50 (96)	33	16 (49)
	1	58	40 (69)	38 (95)	32	18 (56)
	3	80	63 (79)	62 (98)	56	25 (45)
	5	75	47 (63)	47(100)	45	16 (36)
+4	1週間	80	61 (76)	57 (93)	29	18 (62)
	1	58	43 (74)	39 (91)	34	23 (68)
	3	77	43 (56)	43(100)	41	25 (61)
	5	70	49 (70)	45 (92)	30	19 (63)
+24	1週間	95	63 (66)	61 (97)	49	22 (45) ^c
	1	62	48 (77)	46 (96)	37	19 (51) ^e
	3	74	42 (57)	39 (93)	29	6 (21) ^f
	5	73	55 (75)	48 (87)	29	1 (3) ^{d,f}

* %=生存卵子数/精子導入卵子数

† %=受精卵子数/生存卵子数

‡ %=正常な染色体を持つ卵子数/解析卵子数

有意差あり： a vs. b, c vs. d and e vs. f = $p < 0.05$

表6 異なる温度で5ヶ月間保存したフリーズドライ精子と受精した卵子の移植後の発生

保存温度 (℃)	精子導入 卵子数	生存卵子 数 (%) *	受精卵子 数 (%) †	2細胞期 移植胚数 (%) ‡	着床胚数 (%) † #	産子数 (%) †
-70	71	55 (78)	54 (98)	51 (94)	26 (51) ^a	12 (24) ^c
-20	88	69 (78)	64 (93)	58 (91)	26 (45) ^a	15 (26) ^c
+4	59	47 (80)	46 (98)	43 (94)	20 (47) ^a	9 (21) ^c
+24	82	66 (81)	64 (97)	53 (83)	0 (0) ^b	0 (0) ^d

* %=生存卵子数/精子導入卵子数

† %=受精卵子数/生存卵子数

‡ %=2細胞期移植胚数/受精卵子数

†† %=着床胚数あるいは産子数/2細胞期移植胚数

着床胚数=産子数+着床痕数

有意差あり： a vs. b and c vs. d = $p < 0.005$

表7 -20 あるいは +4°C で 17 ヶ月間保存したフリーズドライ精子と受精した卵子の染色体解析

保存温度 (°C)	精子導入 卵子数	生存卵子数 (%) *	受精卵子数 (%) †	解析卵子数	正常な染色体を持つ 卵子数 (%) ‡
-20	37	31 (84)	30 (97)	24	10 (42)
+4	31	21 (68)	21 (100)	17	10 (59)

* %=生存卵子数/精子導入卵子数

† %=受精卵子数/生存卵子数

‡ %=正常な染色体を持つ卵子数/解析卵子数

3. 航空輸送後のフリーズドライ精子の受精能の変化について

航空輸送後のフリーズドライ精子を導入した卵子は、ICSI後の生存率および2細胞期への発生率は、4℃で保存した精子を導入した卵子と比較して、有意な差は認められなかった。得られた2細胞期胚は移植後42%が正常な産子にまで発生した。これら産子は、成熟後正常な繁殖能力が確認された（表8）。

表8 航空輸送後のフリーズドライ精子と受精した卵子の移植後の発生

アンプル	輸送前の保存	輸送後の保存	受精卵子数	2細胞期	
	期間 (4℃)	期間 (4℃)		移植胚数	産子数 (%)*
A	1日	3ヶ月	25	24	7 (29)
B	8.5ヶ月	3ヶ月	31	28	15 (54)
計			56	52	22 (42)

アンプル作製日：(A) 2002年7月8日、(B) 2001年10月24日

2002年7月9日ハワイ発－常温航空輸送－2002年7月13日日本着
日本で4℃保存

2002年7月22日日本発－常温航空輸送－2002年7月25日ハワイ着

* %=産子数/2細胞期移植胚数

4. 精巣内精子および精巣上体尾部精子のフリーズドライに対する耐性について

精巣内精子をフリーズドライした時の染色体解析の結果を表 9 に示した。新鮮精巣内精子においては、受精した卵子の 90%以上が正常な染色体を保持していた。Diamide 未添加の保存液でフリーズドライした精巣内精子においては、わずか 3%の精子の染色体が保持されたのみであった。しかしながら、1 および 3 mM Diamide を添加した保存液でフリーズドライした精巣内精子は、それぞれ 50%および 52%の精子の染色体が保持された。一方、1 mM DTT を添加した保存液でフリーズドライした精巣内精子の全てにおいて染色体の崩壊が認められた。

精巣上体尾部精子においては、1mM Diamide を添加した保存液でフリーズドライしても正常な染色体を持つ精子の増加は認められなかった(表 10)。一方、1 および 10 mM DTT を添加した保存液でフリーズドライした時、正常な染色体を持つ精子の数は 42%および 35%と有意に減少した($p < 0.05$)。

1 mM Diamide を添加した保存液でフリーズドライし、1ヶ月間保存した精巣内精子を導入した卵子は、Diamide 未添加の保存液でフリーズドライした精子を導入した卵子よりも有意に産子にまで発生した ($p < 0.005$)。さらに、産子への発生率は 5ヶ月間保存したフリーズドライ精子においても1ヶ月間保存したものと差は見られなかった(表 11)。

表9 DiamideあるいはDTT処理後にフリーズドライした精巣内精子と受精した卵子の染色体解析

濃度	精子	解析卵子数	正常な染色体を持つ 卵子数 (%) [range]*
無添加	新鮮	46	43 (94) [91-96] ^a
	フリーズドライ	66	2 (3) [0-6] ^b
Diamide	(1mM) 新鮮	53	48 (91) [82-95] ^a
	(1mM) フリーズドライ	42	21 (50) [43-58] ^c
	(3mM) フリーズドライ	29	15 (52) [50-53] ^c
DTT (1mM)	フリーズドライ	32	0 (0) ^b

* %=正常な染色体を持つ卵子数/解析卵子数

有意差あり：a vs. b, a vs. c, b vs. c= $p < 0.005$

表10 DiamideあるいはDTT処理後にフリーズドライした精巣上体尾部精子と受精した卵子の染色体解析

濃度	精子	解析卵子数	正常な染色体を持つ 卵子数 (%) [range]*
無添加	新鮮	44	39 (89) [88-89] ^a
	フリーズドライ	40	28 (70) [69-71] ^a
Diamide (1mM)	フリーズドライ	44	31 (71) [68-72] ^a
DTT (1mM)	フリーズドライ	66	28 (42) [35-50] ^b
	フリーズドライ	57	20 (35) [24-42] ^b
(1mM)	新鮮	70	58 (83) [80-86] ^a

* %=正常な染色体を持つ卵子数/解析卵子数

有意差あり : a vs. b= $p < 0.05$

表 1 1 Diamide 処理後にフリーズドライした精巣内精子と受精した卵子の移植後の発生

濃度	精子	受精卵子数	2細胞期移植胚数	着床胚数 (%) [range] [‡] [¶]	産子数 (%) [range] [‡]
無添加	新鮮	56	55	47 (86) [84-88] ^a	40 (73) [63-88] ^d
無添加	フリーズドライ	79	72	2 (3) [0-9] ^b	2 (3) [0-9] ^e
Diamide (1mM) [*]	フリーズドライ	70	67	38 (57) [50-69] ^c	15 (22) [16-39] ^f
Diamide (1mM) [†]	フリーズドライ	48	44	22 (50) [43-56] ^c	9 (21) [14-31] ^f

サンプル保存期間 (4℃) (*) 1ヶ月、(†) 5ヶ月

[‡] % = 着床胚数あるいは産子数 / 2細胞期移植胚数

[¶] 着床胚数 = 産子数 + 着床痕数

有意差あり : a vs. b, a vs. c, b vs. c, d vs. e, d vs. f, e vs. f = $p < 0.005$

第五章 考察

1. フリーズドライ用保存液の pH がマウス精子に与える影響について

フリーズドライ用保存液がマウス精子に与える影響について検討するため、保存液の pH を 9.0、8.0、7.4 および 6.0 に調整し、これら保存液を用いてフリーズドライされた精子の受精能について検討した。その結果、フリーズドライ後のマウス精子は弱アルカリ性 (pH8.0) の保存液において染色体が高率に保持され (表 1)、これら精子由来の胚の胚盤胞および産子への発生においても弱酸性 (pH7.4 および 6.0) の保存液でフリーズドライした精子由来の胚と比較して有意に高かった (表 2 および 3)。

精子核は物理的ダメージに対して耐性を示すことが明らかになっている (Yanagida et al., 1991; Wakayama et al., 1998; Cozzi et al., 2001) が、フリーズドライ後の精子においてはその構成成分、特に細胞膜に大きなダメージを受けている (Wakayama and Yanagimachi, 1998)。さらに復水後、尾部が頭部から切り離された精子が多く観察された (図 4) ことから、フリーズドライのダメージは細胞膜のみならず精子全体に影響を与えていると考えられる。しかしながら、本実験において全てではないものの、フリーズドライされた精子の染色体および受精能は保持されていた (表 1-3) ことから、一部の精子核はフリーズドライの与えるダメージに耐性を示し、さらに全ての試験区においてフリーズドライ精子を導入した卵子のほとんどが 2 細胞期に発生したことから (表 2 および 3)、精子由来卵子活性化因子 (Sperm-borne oocyte-activating components; SOAF) はフリーズドライによってダメージを受けなかったと考えられる (Wakayama and Yanagimachi, 1998; Kusakabe et al., 2001)。

弱アルカリ性の保存液で高率に精子染色体が保持された原因の一つとして、精子内に存在すると考えられているエンドヌクレアーゼが関係していると思われる。エンドヌクレアーゼの一つである DNase I の最適 pH は 7.0 であり pH5.0-6.0 で最も安定している (Kunitz, 1950)。このことから、保存液中にエンドヌクレアーゼが存在するのであれば、弱アルカリ性の保存液、さらにはキレート剤である EGTA の添加がエンドヌクレアーゼの活性を抑制し、精子がフリーズドライにより細胞膜にダメージを受けたにも関わらず、精子核に大きな影響を受けなかったと考えられる。

2. 異なる温度条件下で保存されたフリーズドライ精子の受精能について

マウス精子フリーズドライ法の最大の利点は、冷蔵庫（4℃）での長期保存である。さらに、常温での安定した保存は低コストの簡易輸送を実現するものである。本実験は、保存温度がフリーズドライ精子の受精能に与える影響について検討するため、フリーズドライ精子を異なる温度条件下で一定期間保存し、その後の受精能について経時的に評価した。その結果、フリーズドライ精子は 4℃以下の低温環境下において、長期間の保存が可能であり、-20 及び 4℃で保存したフリーズドライ精子においては、17 ヶ月間の長期保存が可能であることが示された（表 7）。一方、+24℃で保存したフリーズドライ精子においては、3 ヶ月目に精子染色体の崩壊が始まり、5 ヶ月目にはほとんどの精子の染色体がダメージを受けており、これら精子由来の胚は移植後、着床すらしなかった（表 5 および 6）。

精子染色体の崩壊の原因は、精子内に存在するエンドヌクレアーゼ活性に

よって引き起こされると考えられている (Stephan et al., 1996; Maione et al., 1997; Sakkas et al., 2002)。本実験において、保存液および精子懸濁液中のエンドヌクレアーゼの検出を試みたがその量は検出限界以下であった。もし、精子内あるいは保存液中に極微量のエンドヌクレアーゼが存在するのであれば、フリーズドライにより細胞膜にダメージを受け、核が露出した精子はエンドヌクレアーゼの影響を極めて受けやすいと考えられる。しかしながら、これらエンドヌクレアーゼの活性は低温環境下において抑制されるため、4℃以下で保存したフリーズドライ精子の染色体へのエンドヌクレアーゼの影響は軽減され、+24℃で保存したフリーズドライ精子の染色体は保存中にその影響を受けたと推測される。

3. 航空輸送後のフリーズドライ精子の受精能の変化について

航空輸送後のフリーズドライ精子は、4℃の一定温度ではない常温環境下に短期間放置されたにも関わらず、輸送前と同程度の受精能を保持しており、これら精子と受精した卵子は正常な繁殖能力を備えた産子にまで発生した(表 8)。実験 2 の結果から、フリーズドライ精子は+24℃で1ヶ月間保存できることから、本実験程度の期間内であればフリーズドライ精子の受精能は輸送中に考えられる温度変化に影響されないと考えられる。通常、液体窒素により凍結された精子の輸送はドライシッパー (Nagy et al., 2003) やドライアイス (Okamoto et al., 2001) が必要不可欠である。本実験により、フリーズドライ精子はドライシッパーやドライアスを必要としない低コストでの輸送が可能であり、さらには国際間の授受も容易に行えることが示された。

4. 精巣内精子および精巣上体尾部精子のフリーズドライに対する耐性について

マウス精子のフリーズドライに対する耐性に必要な条件を探索するため、精子核の構造が異なる精巣内精子と精巣上体尾部精子をフリーズドライし、その耐性を比較した。その結果、未成熟の精巣内精子の染色体は、フリーズドライに対して耐性が低かったが、フリーズドライ前の Diamide 処理によりその耐性は有意に向上した（表 9）。一方、フリーズドライに対して耐性の高い成熟した精巣上体尾部精子は、フリーズドライ前の DTT 処理によりその耐性は著しく低下した（表 10）。精巣内で作られた精子は、精巣上体尾部に到達するまでの間に精子頭部に存在するタンパク質であるヒストンがプロタミンに置換され、-SH 結合から-SS-結合となり精子核はより強固なものになる（Bedford and Calvin, 1974; Kosower et al., 1992）。-SH 結合を持つ未熟な精巣内精子は、Diamide により-SS-結合に置換されたため、フリーズドライに対して耐性を示したと考えられる。しかしながら、精巣内精子の全てが-SH 結合を示すのではなく、約 10% の精巣内精子は既にプロタミンに置換されている（Kosower et al., 1992）。Diamide 未処理の精巣内精子由来の胚の 3% が産子にまで発生したのはこのためであると考えられる（表 11）。一方、-SS-結合で強固な精巣上体尾部精子は DTT 処理により-SS-結合が一時的に-SH 結合に置換された。このため、フリーズドライに対する耐性が著しく低下したと考えられる。本実験により、マウス精子のフリーズドライに対する耐性は精子核の構造が大きく関与していることが明らかとなった。マウス精子の凍結保存においては、精液（Songsasen and Leibo, 1998）あるいは精巣上体尾部（Nakagata, 2000）からの十分に成熟した精子を確保することが必須であった。過去のフリーズドライ研究においても十

分に成熟している精巣上体尾部精子が用いられてきた (Wakayama and Yanagimachi 1998; Kusakabe et al., 2001)。本研究により、Diamide 処理をすることで精巣内精子のフリーズドライが可能であることが明らかになったことから、遺伝子改変の結果として生じる生殖系への影響や疾患により精液中や精巣上体に精子を持たない雄の遺伝資源の保存に応用することができると考えられる。

第六章 結語

医学・生物学研究の急速な発展に伴い、研究上扱いやすいマウスの利用性は年々高くなっている。このため、トランスジェニック、ノックアウトおよびミュータントマウスといった新規マウス系統が世界中で爆発的な勢いで作出されている。これに反比例するように作出量に対する飼育室の許容量不足、飼育コストの増加等、研究者への負担を重くしているのが現状である (Knight and Abbott, 2002)。配偶子保存は、自然交配により維持されていたマウス系統を効率的に保存することのできる方法の一つであり、この利用により飼育スペースは確保され飼育コストも大幅に軽減された。現在の主流である液体窒素を用いた配偶子保存は液体窒素を介した病原性微生物の感染のない (Kyuwa et al., 2003) 安全な系統の長期保存を実現している。特に精子は、1 個体から 1 度に大量 ($1\sim 3 \times 10^7$ 精子) に回収することが可能であり、その保存も凍結保護物質であるラフィノースおよびスキムミルクのみを用いた単純な保存液で高率に保存することが可能である (Nakagata and Takeshima, 1992)。既に国内外において配偶子凍結によりマウス遺伝資源が保存されている (Sztein et al., 2000; Glenister and Thornton, 2000; Nakagata, 2000) が、これらを供給する上で保存容器中の液体窒素の継続的な監視・補充およびドライシッパーを要する輸送等、専門の施設以外では施行し難いいくつかの問題が残されている。

これに対して、精子をフリーズドライする試みは、冷蔵庫 (4℃) で保存ができる経済的な方法として他種において以前より行われている (Sherman, 1954; Bialy and Smith, 1957; Nei and Nagase, 1961; Singh and Roy, 1967; Keskinetepe et al., 2002; Liu et al., 2004; Kwon et al., 2004)。マウス精子においてもフリーズドライの物理的なダメージに対して耐性があり (Katayose et al.,

1992)、正常な産子が得られたことから(Wakayama and Yanagimachi, 1998)、フリーズドライ法を新しいマウス精子保存法として応用する研究が進められた(Kusakabe et al., 2001)。マウス精子フリーズドライ法の確立は、配偶子保存の経済的メリット、簡易輸送の実現、さらにはICSI(Kimura & Yanagimachi, 1995; Kuretake et al., 1996)の利用による限りある遺伝資源の有効利用にも大きく貢献する画期的な技術である。本研究は、長期間効率的に受精能力を保持することのできるマウス精子フリーズドライ法を開発することを目的とし、その結果、以下のことが明らかとなった。

- pH8.0 に調整したフリーズドライ用保存液の使用
- 4℃でのフリーズドライ精子の長期保存
- 短期間の常温航空輸送の実現
- 十分に成熟した精巢上体尾部精子の利用
- 精巢内精子の Diamide 処理によるフリーズドライに対する耐性の向上

本研究により、精子は十分に成熟した、すなわちプロタミンへの置換により核がより強固になった状態において pH8.0 に調整したフリーズドライ用保存液中でフリーズドライされた時に、高率に受精能を保持できることが明らかとなった。また、フリーズドライ精子は 4℃において長期保存することが可能であり、17 ヶ月間の長期保存を実現した。フリーズドライ精子は、+24℃での 1 ヶ月間の保存、さらには短期間の常温航空輸送後においても高率に受精能を保持していたことから、本研究において開発されたマウス精子フリーズドライ法は、新しい精子保存法として確立され、低コストの精子輸送法としても応用可能である。精子保存の最終目標は、常温での長期保存である。今後、研究の継続に

よる保存法の改良、さらには新しい保存法の開発は、マウス遺伝資源を有効に保存する上で極めて重要であると考ええる。

第七章 引用文献

1. Knight, J., Abbott, A. (2002) Mouse genetics: Full house. *Nature* 417, 785-786.
2. Kyuwa, S., Nishikawa, T., Kaneko, T., Nakashima, T., Kawano, K., Nakamura, N., Noguchi, K., Urano, T., Itoh, T., Nakagata, N. (2003) Experimental evaluation of cross-contamination between cryotubes containing mouse 2-cell embryos and murine pathogens in liquid nitrogen tanks. *Exp. Anim.* 52, 67-70.
3. Sztein, J.M., Farley, J.S., Mobraaten, L.E. (2000) In vitro fertilization with cryopreserved inbred mouse sperm. *Biol. Reprod.* 63, 1774-1780.
4. Glenister, P.H., Thornton, C.E. (2000) Cryoconservation--archiving for the future. *Mamm. Genome* 11, 565-571.
5. Nakagata, N. (2000) Cryopreservation of mouse spermatozoa. *Mamm. Genome* 11, 572-576.
6. Okuyama, M., Isogai, S., Saga, M., Hamada, H., Ogawa, S. (1990) In vitro fertilization (IVF) and artificial insemination (AI) by cryopreserved spermatozoa in mouse. *J. Fertil. Implant* 7, 116-119.

7. Tada, N., Sato, M., Yamanoi, J., Mizorogi, T., Kasai, K., Ogawa, S. (1990) Cryopreservation of mouse spermatozoa in the presence of raffinose and glycerol. *J. Reprod. Fertil.* 89, 511-516.
8. Yokoyama, M., Akiba, H., Katsuki, M., Nomura, T. (1990) Production of normal young following transfer of mouse embryos obtained by in vitro fertilization using cryopreserved spermatozoa. *Exp. Anim.* 39, 125-128.
9. Takeshima, T., Nakagata, N., Ogawa S. (1991) Cryopreservation of mouse spermatozoa. *Exp. Anim.* 40, 493-497.
10. Nakagata, N., Takeshima, T. (1992) High fertilizing ability of mouse spermatozoa diluted slowly after cryopreservation. *Theriogenology* 37, 1283-1291.
11. Nakagata, N., Takeshima, T. (1993) Cryopreservation of mouse spermatozoa from inbred and F1 hybrid strains. *Exp. Anim.* 42, 317-320.
12. Nakagata, N., Ueda, S., Yamanouchi, K., Okamoto, M., Matsuda, Y., Tsuchiya, K., Nishimura, M., Oda, S., Koyasu, K., Azuma, S., Toyoda, Y. (1995) Cryopreservation of wild mouse spermatozoa. *Theriogenology* 43, 635-643.
13. Nakagata, N. (1996) Use of cryopreservation techniques of embryos and

spermatozoa for production of transgenic (Tg) mice and for maintenance of Tg mouse lines. *Lab. Anim. Sci.* 46, 236-238.

14. Sherman, J.K. (1954) Freezing and freeze-drying of human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 5, 357-371.
15. Bialy, G., Smith, V.R. (1957) Freeze-drying of bovine spermatozoa. *J. Dairy Sci.* 40, 739-745.
16. Nei, T., Nagase, H. (1961) Attempts to freeze-dry bull spermatozoa. *Low Temp.* 19, 107-115.
17. Singh, S.G., Roy, D.J. (1967) Freeze-drying of bovine semen. *Indian J. Vet. Sci.* 37, 1-7.
18. Keskinetepe, L., Pacholczyk, G., Machnicka, A., Norris, K., Curuk, M.A., Khan, I., Brackett, B.G. (2002) Bovine blastocyst development from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Biol. Reprod.* 67, 409-415.
19. Liu, J.L., Kusakabe, H., Chang, C.C., Suzuki, H., Schmidt, D.W., Julian, M., Pfeffer, R., Bormann, C.L., Tian, X.C., Yanagimachi, R., Yang, X. (2004) Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits. *Biol. Reprod.* 70, 1776-1781.

20. Kwon, I.K., Park, K.E., Niwa, K. (2004) Activation, pronuclear formation, and development in vitro of pig oocytes following intracytoplasmic injection of freeze-dried spermatozoa. *Biol. Reprod.* 71, 1430-1436.
21. Katayose, H., Matsuda, J., Yanagimachi, R. (1992) The ability of dehydrated hamster and human sperm nuclei to develop into pronuclei. *Biol. Reprod.* 47, 277-284.
22. Wakayama, T., Yanagimachi, R. (1998) Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nat. Biotechnol.* 16, 639-641.
23. Kusakabe, H., Szczygiel, M.A., Whittingham, D.G., Yanagimachi, R. (2001) Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 13501-13506.
24. Uehara, T., Yanagimachi, R. (1976) Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. *Biol. Reprod.* 15, 467-470.
25. Uehara, T., Yanagimachi, R. (1977) Behavior of nuclei of testicular, caput and cauda epididymal spermatozoa injected into hamster eggs. *Biol. Reprod.* 16, 315-321.

26. Hosoi, Y., Miyake, M., Utsumi, K., Iritani, A. (1988) Development of rabbit oocytes after microinjection of spermatozoon. Proc. 11th Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. 3, 331-333.
27. Goto, K., Kinoshita, A., Takuma, Y., Ogawa, K. (1990) Fertilisation of bovine oocytes by the injection of immobilised, killed spermatozoa. Vet. Rec. 127, 517-520.
28. Palermo, G., Joris, H., Devroey, P., Van Steirteghem, A.C. (1992) Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet 340, 17-18.
29. Catt, S.L., Catt, J.W., Gomez, M.C., Maxwell, W.M., Evans, G. (1996) Birth of a male lamb derived from an in vitro matured oocyte fertilised by intracytoplasmic injection of a single presumptive male sperm. Vet. Rec. 139, 494-495.
30. Cochran, R., Meintjes, M., Reggio, B., Hylan, D., Carter, J., Pinto, C., Paccamonti, D., Godke, R.A. (1998) Live foals produced from sperm-injected oocytes derived from pregnant mares. J. Equine Vet. Sci. 18, 736-740.
31. Pope, C.E., Johnson, C.A., McRae, M.A., Keller, G.L., Dresser, B.L.

- (1998) Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 53, 221-236.
32. Hewitson, L., Dominko, T., Takahashi, D., Martinovich, C., Ramalho-Santos, J., Sutovsky, P., Fanton, J., Jacob, D., Monteith, D., Neuringer, M., Battaglia, D., Simerly, C., Schatten, G. (1999) Unique checkpoints during the first cell cycle of fertilization after intracytoplasmic sperm injection in rhesus monkeys. *Nat. Med.* 5, 431-433.
33. Martin, M.J. (2000) Development of in vivo-matured porcine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. *Biol. Reprod.* 63, 109-112.
34. Yamauchi, Y., Yanagimachi, R., Horiuchi, T. (2002) Full-term development of golden hamster oocytes following intracytoplasmic sperm head injection. *Biol. Reprod.* 67, 534-539.
35. Hirabayash, M., Kato, M., Aoto, T., Sekimoto, A., Ueda, M., Miyoshi, I., Kasai, N., Hochi, S. (2002) Offspring derived from intracytoplasmic injection of transgenic rat sperm. *Transgenic Res.* 11, 221-228.
36. Kimura, Y., Yanagimachi, R. (1995) Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol. Reprod.* 52, 709-720.

37. Kuretake, S., Kimura, Y., Hoshi, K., Yanagimachi, R. (1996) Fertilization and development of mouse oocytes injected with isolated sperm heads. *Biol. Reprod.* 55, 789-795.
38. Chatot, C.L., Ziomek, C.A., Bavister, B.D., Lewis, J.L., Torres, I. (1989) An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 86, 679-688.
39. Chatot, C.L., Lewis, J.L., Torres, I., Ziomek, C.A. (1990) Development of 1-cell embryos from different strains of mice in CZB medium. *Biol. Reprod.* 42, 432-440.
40. Kishikawa, H., Tateno, H., Yanagimachi, R. (1999) Chromosome analysis of BALB/c mouse spermatozoa with normal and abnormal head morphology. *Biol. Reprod.* 61, 809-812.
41. Tateno, H., Kimura, Y., Yanagimachi, R. (2000) Sonication per se is not as deleterious to sperm chromosomes as previously inferred *Biol. Reprod.* 63, 341-346.
42. Kamiguchi, Y., Mikamo, K. (1986) An improved, efficient method for analyzing human sperm chromosomes using zona-free hamster ova. *Am. J. Hum. Genet.* 38, 724-740.

43. Nakagata, N. (1992) Embryo transfer through the wall of the fallopian tube in mice *Jikken Dobutsu* 41, 387-388.
44. Yanagida, K., Yanagimachi, R., Perreault, S.D., Kleinfeld, R.G. (1991) Thermostability of sperm nuclei assessed by microinjection into hamster oocytes. *Biol. Reprod.* 44, 440-447.
45. Wakayama, T., Whittingham, D.G., Yanagimachi, R. (1998) Production of normal offspring from mouse oocytes injected with spermatozoa cryopreserved with or without cryoprotection. *J. Reprod. Fertil.* 112, 11-17.
46. Cozzi, J., Monier-Gavelle, F., Lievre, N., Bomsel, M., Wolf, J.P. (2001) Mouse offspring after microinjection of heated spermatozoa. *Biol. Reprod.* 65, 1518-1521.
47. Kunitz, M. (1950) Crystalline desoxyribonuclease. II. Digestion of thymus nucleic acid (desoxyribonucleic acid). The kinetics of the reaction. *J. Gen. Physiol.* 33, 363-377.
48. Stephan, H., Polzar, B., Rauch, F., Zanotti, S., Ulke, C., Mannherz, H.G. (1996) Distribution of deoxyribonuclease I (DNase I) and p53 in rat testis and their correlation with apoptosis. *Histochem. Cell Biol.* 106, 383-393.

49. Maione, B., Pittoggi, C., Achene, L., Lorenzini, R., Spadafora, C. (1997) Activation of endogenous nucleases in mature sperm cells upon interaction with exogenous DNA. *DNA Cell Biol.* 16, 1087-1097.
50. Sakkas, D., Moffatt, O., Manicardi, G.C., Mariethoz, E., Tarozzi, N., Bizzaro, D. (2002) Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol. Reprod.* 66, 1061-1067.
51. Nagy, A., Gertsenstein, M., Vintersten, K., Behringer, R. (2003) Cryopreservation, rederivation, and transport of mice. *Manipulating the Mouse Embryo, A laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 599-628.
52. Okamoto, M., Nakagata, N., Toyoda, Y. (2001) Cryopreservation and transport of mouse spermatozoa at -79 degrees C. *Exp. Anim.* 50, 83-86.
53. Bedford, J.M., Calvin, H.I. (1974) The occurrence and possible functional significance of -S-S- crosslinks in sperm heads, with particular reference to eutherian mammals. *J. Exp. Zool.* 188, 137-155.
54. Kosower, N.S., Katayose, H., Yanagimachi, R. (1992) Thiol-disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. *J. Androl.* 13, 342-348.

55. Songsasen, N., Leibo, S.P. (1998) Live mice from cryopreserved embryos derived in vitro with cryopreserved ejaculated spermatozoa. *Lab. Anim. Sci.* 48, 275-281.