

#### 様式4（公表用）

氏名	伊藤 大裕
博士の専攻分野の名称	博士（生命工学）
学位記番号	医工農甲 第118号
学位授与年月日	令和5年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
専攻名	統合応用生命科学専攻
学位論文題目	凍結乾燥マウス精子のシート保存技術の開発と長期保存の試み
論文審査委員	主査 教授 若山 照彦
	教授 岸上 哲士
	教授 幸田 尚
	教授 黒澤 尋
	助教 若山 清香
	准教授 石内 崇士

## 学位論文内容の要旨

凍結乾燥精子は、液体窒素などを使わずに室温保存できる。ところが凍結乾燥精子を顕微授精した胚の産仔率は、新鮮精子を用いた場合と比較して著しく低下する。また、凍結乾燥精子の室温保存には真空状態のガラスアンプル瓶の使用が必須であったが、アンプル瓶の作製ミスや落下による破損が原因で保存に失敗する恐れがある。本論文では、この2つの課題は精子の凍結乾燥保存技術の実用化を妨げると考え、マウス精子を用いて解決を試みた。

第1章では、細胞の凍結保護や乾燥耐性を持つ生物体内で利用されるトレハロースを、精子懸濁液に0, 0.1, 0.5, 2.0 M 添加し、精子の凍結乾燥保存における最適濃度および保護効果を検討した。はじめに、凍結乾燥処理直後の精子を用いて産仔率を調べた結果、いずれのトレハロース濃度を添加した場合であっても産仔率に変化はなかった。ところが、0.5 M トレハロースを添加して作製した凍結乾燥精子を1ヶ月以上室温保存すると、0 M 区に対し胚盤胞率、産仔率が共に改善した。この改善は、近交系のマウス精子を室温で3ヶ月保存した場合に顕著に得られた（C57BL/6N: 8% vs. 26%、C3H/He: 11% vs. 26%、129/Sv: 6% vs. 28%、それぞれ0 M 区と0.5 M 区の産

#### 様式4（公表用）

仔率)。次に、凍結乾燥精子の低産仔率の主原因は DNA 損傷であると考えられているため、B6N 系統の凍結乾燥精子を、作製直後と 3 ヶ月間室温保存した後にそれぞれ顕微授精し、雄性前核の免疫染色によって蛍光強度から  $\gamma$ -H2A.x の発現を調べた。その結果、トレハロース 0 M 区と 0.5 M 区の輝度に差はなかったため、トレハロースによる産仔率の改善効果は、精子 DNA の損傷軽減によるものではないことが示された。以上の結果より、0.5 M トレハロースは凍結乾燥マウス精子の長期室温保存において、精子 DNA 以外の因子を保護したことで産仔率は改善したことが示唆され、この働きは近交系マウス精子において顕著に得られることが明らかとなった。また、ガラスアンプル瓶にどうしても残ってしまう空気や水分は、室温保存中に精子の質を少しずつ劣化させる可能性が示唆され、トレハロースはその劣化を防ぐ働きをしていると考えられた。

第 2 章では、ガラスアンプル瓶を一切使わず、その代わりにプラスチックシートを使うことで、空気や水分を含まず、なおかつ割れない精子の保存技術の開発を試みた。凍結乾燥処理を行うための精子懸濁液の受け皿には薬包紙、プラスチックシート、ラップフィルム、和紙、オブラート、濾紙を使用した。各材質は液体窒素の液面に浮かべ、精子懸濁液はその上に滴下して 10 分間凍結処理した後、真空乾燥機に移して 6 時間の乾燥処理を行った。凍結乾燥処理後、精子を載せた受け皿をラミネートシートに挟んで保存した。まず  $-30^{\circ}\text{C}$  で数日から 1 ヶ月間保存した精子を用いて、加水後の精子回収率、DNA 損傷率、顕微授精後には産仔までの発生率を調べた。その結果、薬包紙を受け皿として使用した場合の精子は回収率が高く、また DNA 損傷率や顕微授精後の胚発生率は、ガラスアンプル瓶で保存した凍結乾燥精子の成績と同程度であり、産仔を得ることに成功した(産仔率 21%)。そのため、凍結乾燥精子は薬包紙とラミネートシートを用いて作製することができた(以下シート精子と呼ぶ)。次に、シート精子を  $-30^{\circ}\text{C}$  で 1~3 日間、1 週間、1 ヶ月間、3 ヶ月間、室温で 1 日、3 日間、1 週間保存した後に顕微授精胚を作製し、各温度の保存日数の経過に伴う発生率の推移を調査した。その結果、シート精子を  $-30^{\circ}\text{C}$  で保存した場合、受精率や 2 細胞期までの発生率および産仔率は、3 ヶ月間保存しても低下せず、健康な産仔が得られた。一方、室温で保存した場合、発生率は保存日数の経過に伴い低下し、最長で 3 日間保存した精子から産仔を作出することに成功したが、1 週間保存したシート精子からは産仔を得られなかった。

第 3 章では、シート精子の実用化に向けて、まずシート精子を簡便に輸送できるかどうか検証した。従来の精子の運搬には、液体窒素タンクやドライシッパーなどの特殊容器が必要で特別料金がかかるだけでなく、気化した窒素の充満による窒息や超低温に

## 様式 4 (公表用)

よる怪我の恐れが作業者に伴うためである。シート精子は厚さ 0.2 mm で、3 日間であれば室温保存できたため、本章ではシート精子を、はがきに貼り付けてポストに投函し、山梨県内、あるいは千葉-山梨県間の一般郵送を実施した。対照区のシート精子は郵送と同期間、研究室内で室温保管した。山梨県内及び千葉-山梨県間の郵送はいずれも 2 日以内に完了した。その結果、全ての区で産仔が得られ、郵送した精子の産仔率（山梨県内： 4%、千葉-山梨県： 7%）は、研究室で室温保管した対照区の精子の産仔率（3%）と差がなかった。そのためシート精子は、従来の凍結精子の輸送にかかったコストや手間、リスクを省き、一般郵便で簡便に輸送できる技術として応用できた。

次に、1 週間以上の室温保存に成功するための条件を検討し、第 1 章で明らかにした 0.5 M トレハロースの産仔率の改善効果などを利用した結果、実験に使用した全てのマウス系統（ICR、B6C3F1、C57BL/6N 及び C3H/He）の 3 ヶ月間室温保存したシート精子から産仔を得ることに成功した。

動物精子の保存技術は世界中で需要が増すばかりであり、多様性に富む遺伝資源の維持には膨大な個体数の精子の保存が必要になる。シート精子は薄いため、アルバム状の室温管理が実現すれば、コンパクトかつ安価に精子を管理できるようになる。さらに、研究室間の簡便かつ低コストでの実験系統の受渡は、研究の促進に貢献することが考えられる。シート精子の実用化には、凍結乾燥精子の根本的な低産仔率や運動能の消失の解決が今後の課題である。

しかし将来、本方法を用いた精子の輸送技術が悪用された場合、税関でさえ発見が困難なことが予測され、貴重な遺伝資源の違法流出を促進してしまう可能性がある。本方法の実用化には、より長期間保存したシート精子の評価や、国際輸送の検証などの技術改良とともに、保存されている精子の国際登録や、使用記録の義務化など、国際的な法整備が不可欠である。

## 論文審査結果の要旨

本論文は、精子の凍結乾燥技術について、産仔率が新鮮精子よりも著しく低下する点、また従来使われているガラスアンプル瓶は破損し保存に失敗する恐れがある点に焦点を当てている。凍結乾燥技術は現状で唯一、精子を特殊な設備を用いずに長期室温保存でき、複数の動物種の精子に応用されているが、マウス精子を用いた世界初の報告以来、上述の課題はどちらも全ての動物種に共通している。

第 1 章では、凍結乾燥精子を用いた顕微授精胚の産仔率を改善するため、マウス精子の凍結乾燥処理及びその後の室温保存に対し、凍結保護剤のなかでも、クマムシなど乾

#### 様式 4 (公表用)

乾燥性をもつ生物が体内で利用しているとされるトレハロースを添加した。その結果、凍結乾燥精子の根本的な産仔率の低下や、低産仔率の主原因とされる DNA 損傷の改善には至らなかったが、0.5 M トレハロースの存在下で凍結乾燥精子を作製すると、特に室温保存後の近交系マウス精子の産仔率が改善した。

第 2 章では、ガラスアンプル瓶の作製ミスや破損による保存の失敗をなくすため、まだ誰も試みたことのない、凍結乾燥精子をプラスチックシートで保存する方法を考案した。この方法について、ガラスアンプル瓶を一切使わない凍結乾燥方法の確立に向けて、主に精子の回収効率や DNA 損傷率、発生率を評価しながら、苦労した点が多数みられる。結果、精子を薄くて破損の恐れがないプラスチックシートに挟んで、 $-30^{\circ}\text{C}$ では少なくとも 3 ヶ月間、室温では最長で 3 日間保存することに成功した。

第 3 章では、この精子のシート保存技術の応用例として、シート精子をハガキに貼り付け郵便で簡便に送ることが可能か検討した。精子は研究や畜産業のために日々運搬されているが、従来は凍結精子を液体窒素中で運ぶ方法が主流であり、送料はたった 1 本の凍結チューブを送るだけでも高額になっている。だがシート精子をハガキに貼り付けてポストから送ったところ、産仔率が低下することなく、国内郵送した精子から産仔を作出することに成功した。また、シート精子の室温保存期間の延長を目指し、第 1 章で検討したトレハロースを利用しながら方法の改良を試みた。その結果、近交系を含む複数系統のマウス精子を室温で 3 ヶ月以上シート保存することに成功した。今後、これらの手法は精子の保存及び輸送効率を高める可能性を示した一方で、貴重な精子の不正輸出をはじめとした悪用のリスクに備え、実用化には国際法や使用制限を設けることの重要性を主張した。

第 1 章の成果は繁殖分野の国際誌で歴史のある *Journal of Reproduction and Development* に掲載され、掲載年の最優秀論文に選出されたことから世界的にも評価されていると考えられる。また、第 2 章及び第 3 章の一部の成果は科学雑誌 *Cell* の姉妹誌である *iScience* と *STAR Protocols* で発表されている。

最終審査は主査および副査の教員 6 名で行い、伊藤氏に対して厳しい質問を多数行った。副査から本研究の要となるトレハロースの作用機序および系統間で得られる効果に差が生じた理由や、産仔率の低下やロット差、種間差は凍結乾燥処理によってなぜ生じるのか、という質問に対しはっきりと答えることが出来なかった。また、研究者として交流を広げること、新規実験を一から立ち上げる力を伸ばすよう指導を受けた。博士論文については、統計処理の手法の不一致や章ごとのつながりの希薄さ、技術開発以外にメカニズムを理解するための実験と考察の少なさを指摘された。しかし、それらの指摘や質問に伊藤氏は的確に答えており、十分に理解していると思われた。また、伊藤氏は多数の共著論文があり、学会発表も多く行っていた。これらのことを総合的に討論した結果、伊藤氏は博士として十分な知識と技術を有しており、今回の成果は伊藤氏へ博士号を授与するのに値するものであると全員が判断した。