

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

山梨大学大学院
医工農学総合教育部
博士課程学位論文

2023年3月

伊藤 大裕

目次

序章

1. 精子保存の意義	4
2. 精子の凍結保存技術と乾燥保存技術、及びその課題	4
3. 精子の凍結乾燥保存技術	5
4. 凍結乾燥精子の課題	6

第1章 凍結乾燥精子に対するトレハロースの保護効果の検証と最適濃度の決定

1-1 序論	9
1-2 材料および方法	10
1-3 結果	
1-3-1: 凍結乾燥処理直後の発生率	20
1-3-2: 1週間室温保存後の凍結乾燥精子の発生率	24
1-3-3: 1ヶ月間室温保存後の凍結乾燥精子の発生率	27
1-3-4: 多系統マウスの凍結乾燥精子に対するトレハロースの保護効果	31
1-3-5: 凍結乾燥精子のDNAに対するトレハロースの保護効果	34
1-4 考察	36

第2章 ガラスアンプル瓶を用いずにシート状の凍結乾燥精子を作製する方法の検討

2-1 序論	38
2-2 材料および方法	40
2-3 結果	
2-3-1: 材質の違いによる精子回収率	47
2-3-2: 材質ごとの1ヶ月保存後の発生率	49
2-3-3: 薬包紙の上で凍結乾燥処理した精子のDNA損傷率	52
2-3-4: シート保存した凍結乾燥精子の保存期間の経過に伴う発生率の推移	56
2-4 考察	60

第3章 室温での精子シート保存技術の実用化に向けた試み

3-1 序論	63
3-2 材料および方法	64
3-3 結果	
3-3-1: シートをはがきに貼り付けて郵便配達した精子からの個体作出	67
3-3-2: シートの種類の違いによる1週間室温保存後の発生率	69
3-3-3: 脱酸素剤と除湿剤の効果	71
3-3-4: 多系統マウス精子の室温シート保存	74
3-3-5: 脱酸素剤と除湿剤から切り離れた後に1ヶ月間室温保存したマウス精子の発生率	76
3-4 考察	80

総括	8 1
論文目録	8 5
論文内容の要旨	
和文	8 7
英文	8 9
謝辞	9 2
参考文献	9 3

序章

1. 精子保存の意義

哺乳類の精子は、遺伝資源として広く保存されている。動物を個体のまま生かしておくことができれば、体外に採取した精子の利用や交配によって次世代を産出することが可能である。しかし、動物個体は叫喚に伴い、交配による次世代の作出ができなくなる¹。また、個体や実験系統によっては繁殖能力を持たない場合もある^{2,4}。また、実験動物の管理や実験で生じ得る苦痛、及び飼育数は必要最小限に抑えられるべきである(引用)。そのため、配偶子としての精子の保存技術、及び発生工学技術は常に研究が進められてきた⁵。

精子保存の実用例について、畜産業においては、現在ほぼ100%のウシは凍結保存されている精子から人工授精によって産まれており、生産効率の高い安定した畜産や育種を可能にしている^{6,7}。生殖補助医療においては、たとえば男性が癌を発症した場合、症状の悪化や放射線治療を受診する前に精子を保存しておくことで、治療後も癌転移や放射線治療の影響を受けていない自らの健全な精子から子を授かることができる⁸。研究においては、世界中で絶えず作出される遺伝子改変系統の維持において精子の保存技術は欠かすことができない⁹。また、地球上で多くの動物種が絶滅の危機に瀕しており、生物多様性を維持するためには、希少種を含めた生物の精子の保存が有用である¹⁰。このように精子の体外操作技術は、我々の生活や生態系の根幹を支えている¹¹。

だが、動物個体から取り出された精子は、温度条件や培地組成などを厳密に整えた適切な環境でなければ、体外培養が難しいことが知られる¹²⁻¹⁵。そのため、精子を新鮮な状態で長期間保つには、生理機能や細胞機能を停止させた状態を維持することが必要である。

2. 精子の凍結保存技術と乾燥保存技術、及びその課題

精子の体外長期保存に最も用いられているのは、凍結保存技術である。最初の成功例は、Luyet と Hodapp が1938年に報告したカエルの精子を液体空気で保存する方法¹⁶だが、哺乳類をはじめ他の動物種では成功しなかった。しかし、凍結液にグリセリンを混ぜて凍結融解したニワトリの精子が生き返ることを Polge らが報告し¹⁷、のちにはジメチルスルホキシドの有用性が報告¹⁸されて以来、多くの細胞の凍結保存技術が開発されてきた¹⁹。初期の凍結温度はドライアイスの温度(-79℃)で実験されていたが、より長期間安定した凍結保存を行うために液体窒素がやがて用いられるようになった。

ヒトを含む様々な動物種の精子に対しても、凍結保存技術が開発され、利用と最適な方法の開発に向けた研究が続けられている^{20,21}。マウス精子の凍結保存は、1990年以降さまざまな方法が報告され²²⁻²⁶、なかでもラフィノースとスキムミルクを含有した凍結液を利用した方法^{27,28}は再現性や融解後の精子の生存率に優れ²⁹⁻³²、融解後に泳いで卵子と受精し、高い成績で仔を作出することができるため、世界中の人工授精や体外受精に広く利用される方法となった^{9,33,34}。

保存容器にはプラスチック製の専用ストローが最も多く用いられるが、個々の精子を凍結するチャンバーや、エッペンチューブを用いた簡便な方法が近年開発されている^{35,36}。また精子が動かない場合は、顕微授精技術³⁷により胚を作出することができる^{38,39}。

ところが、液体窒素は1リットルあたり280円程度で高価なうえ気化しやすい。そのため、上記のように液体窒素を利用する場合、維持費用は高額である。また、作業者は、換気が十分に行われる部屋での安全に配慮した作業が義務づけられているが、凍傷や窒息など不慮の事故も想定される。凍結状態を維持したまま精子を運び出すためには、十分量の液体窒素が必要で、専門の運搬業者を手配する必要がある。しかし、世

界の国や地域によっては液体窒素の用意が困難で、保存や輸送を適切に行うことができない。そして最も大きな課題は、震災などにより道路の分断や停電が発生し、液体窒素の供給源や供給路が確保できずに液体窒素の供給が停滞してしまった場合、すべての精子を失う恐れがあることである。液体窒素が自動供給される施設では、すべてのシステムが停止した場合、実に多くの精子を失う危機に直面する。人の手によって補充される場合、蓋の閉め忘れや補充のし忘れも起こり得る。いずれの事故に対しても多くの施設でバックアップの対策がとられているが、液体窒素の供給そのものが途絶えてしまう。東日本大震災発生時には、東北地方で凍結保存されていた精子が東海地方まで急遽搬送することで対策がとられた。このような課題は、超低温を維持しなければならないために生じることから、凍結保存ではどうしても解決することができない課題である。またこのような維持費用や管理の課題は、冷凍庫を用いた場合でも同様の事態が生じ得る。

精子の長期保存の実用化に向けては、乾燥保存技術も開発が進められている。主な乾燥方法は蒸発乾燥⁴⁰⁻⁴⁷や対流乾燥⁴⁸⁻⁵³に分類されるが、近年はマイクロ電磁波乾燥^{54,55}や真空乾燥^{56,57}による精子の処理方法も開発されており、用いられている動物種も様々である^{58,59}。いずれも、精子を超低温以外で保存し、先に述べた液体窒素による凍結保存の課題を克服するために開発が試みられている。Liuらはマイクロ電磁波乾燥技術によって2年間室温保存した乾燥マウス精子から産仔が得られたことを報告した⁶⁰。しかし、産仔までの胚の発生能を調べられた例は一部で、またいずれも胚盤胞期までの発生率は低い^{40,43,44,49-50,53-57}ため、改良が続けられている。多くの文献で塩化リチウム容器の使用や4°C以下の温度管理などの保存条件が設けられているため、超低温での管理が不要になったとしても、最適な保存環境を保つには、電気やガス、試薬など液体窒素およびタンクに代わる別の保存設備と特殊容器の管理、そして温度維持が必要である。

したがって、特殊な保存環境を必要としない簡便な動物精子の長期保存技術はまだ開発の段階にある。

3. 精子の凍結乾燥保存技術

凍結乾燥による保存の概念は古く、13世紀にまで遡りイモの保存のために利用されていた。その後1900年代はじめには細胞を脱水によって保存するようになったが、細胞の凍結乾燥技術は、1935年にヒト血清や細菌、ウイルスなどを用いてFlosdorfとMuddが最初に報告している^{61,62}。精子の凍結乾燥（フリーズドライ）保存技術に関する研究について、Polgeらによる1949年の報告では、5割の精子が生き返ったと記されているが、受精能までは調べられていなかった¹⁷。その後、ヒトやウシの精子を用いて実験が繰り返されたが⁶³⁻⁶⁸、再現性や実用性に乏しかった。だが、1998年にハワイ大学のWakayamaらがマウス精子を用いて再現性の高い方法を世界で初めて報告した⁶⁹。精子の先体や細胞膜は壊れてしまい、運動能は失われていたが、精子の活性化因子は残っており、高度に凝集した精子の核は非常に頑強であったため、精子頭部を顕微授精により卵子に注入すると、卵子の減数分裂が再開し、前核が形成され正常な個体へと胚発生が進んだ。その後、ヒト^{70,71}やヒツジ^{72,73}、ブタ^{74,75}、ウシ^{76,77}、そしてイヌ⁷⁸やネコ^{79,80}など多くの動物種⁸¹においても凍結乾燥技術に関する研究が進められるようになり、これまでにラット⁸²やハムスター⁸³、ウサギ⁸⁴、ウマ⁸⁵では産仔の作出が報告されている。

食品の凍結乾燥は1958年には開発が始まり⁸⁶、インスタント食品は現在では室温で取り扱われ、長期保存されるようになったが、凍結乾燥精子の室温保存が可能な期間は、近年まで数ヶ月が限界だった⁸⁷⁻⁹⁰。しかし、2018年の先行研究において、真空ガラスアンプル瓶を用いることで、精子を特別な保存設備を用いずに机の引き出しで、保存成績が低下することなく1年以上保存することに初めて成功した⁹¹。さらに凍結乾燥精子は、新鮮精子や凍結精子には耐えられないような高温（150°C）に曝された後でも産仔が得られることが明らかとなった⁹²。哺乳類の発生への宇宙放射線の影響を調べる実験では、超低温保存を必要としない凍結乾燥精子が世界で初めて実験試料として採用され、最長6年間国際宇宙ステーションで保存された精子

の解析結果から、宇宙環境・放射線にさらされた精子からも個体が得られ繁殖できること、哺乳類精子は宇宙で理論上 200 年保管できることも明らかになっている^{93,94}。したがって、精子の凍結乾燥保存技術は、従来の凍結保存技術よりも、保存上の安全性や利便性に優れた遺伝資源の保存技術としての価値の高さが示されている。

もし多様な動物種の精子を、凍結乾燥技術によって、安心かつ簡便に、場所を問わず保存できるようになれば、畜産や研究、生殖補助医療現場が抱える保存に関する、温度管理や維持費用、作業者の安全性の確保など多くの課題を解決することができ、絶滅危惧種を含む地球上の動物精子の半永久的な保管は、従来よりも強く現実味を帯びるだろう。

未成熟精子細胞や体細胞、胚性幹細胞から次世代やクローン個体を作成する技術⁹⁵⁻¹⁰¹もまた、発生工学の発展を支えてきた技術であり、最近では、凍結乾燥保存した円形精子細胞（未成熟精子細胞）や卵丘細胞（体細胞）から個体を作成することにも成功している^{102,103}。未成熟精子細胞であれば若齢もしくは不妊のオス個体であっても、また体細胞であれば性別を問わない点や、絶滅危惧種に指定されるような動物であっても直接触れることなく細胞を回収することができるため、凍結乾燥技術を成熟精子以外の細胞に応用できる点は、遺伝資源としてより多くの細胞を残すことができる点で優れる。

しかしいずれの細胞に関しても、その産仔率は凍結乾燥以前に新鮮な細胞を使った場合であっても低く、改善に向けた研究が進められており¹⁰⁴⁻¹⁰⁷、凍結乾燥技術の実用化に向けた改良には主に成熟精子が用いられている¹⁰⁸⁻¹¹⁰。

4. 凍結乾燥精子の課題

凍結乾燥精子の先体や細胞質には構造の崩壊がみられ、運動能は損なわれているにもかかわらず、ほぼすべての精子において活性化能や前核形成能は保たれている⁶⁹。しかしながら、そのうちの一部の精子しか、個体までの発生能力は維持されていない。凍結乾燥精子の産仔率は、世界で初めて保存に成功してから 20 年以上が経ついまなお 2 割程度にとどまり（図 0a）⁹¹、新鮮精子や凍結精子の産仔率と比較すると著しく低い。実験動物に利用し確実に個体を得るには、必要数の胚を作成し、作出した胚を扱うための時間と労力、費用を充てる必要がある。発情周期や妊娠期間は動物種によって異なるが、長期間を要する場合や倫理が絡む場合、一度の妊娠で確実に個体が得られる可能性が低いと実用化には至らない⁶。そのため、この低産仔率は、精子の凍結乾燥保存技術の実用化を妨げる大きな要因である。主な原因に精子核の損傷が考えられており^{69,111}、これまでにキレート剤や糖を利用した精子の保護が試みられている。キレート剤である EDTA や EGTA を含有する培地で作製した凍結乾燥精子は、DNA の断片化や顕微授精後の染色体異常が抑制されることが報告されている^{75,112}。また、キレート剤のほか、トレハロースやスクロースなどの二糖類やロスマリン酸は、DNA 損傷や酸化の抑制効果が報告されている^{72,113-115}。ヒツジの精子を用いた先行研究では、段階的に温度を下げ凍結処理を行うことで、アクロソームの損傷や胚盤胞期までの発生率を改善できることが報告されている¹¹⁶。ところが、新鮮精子と同程度の産仔率まで改善することに成功した例はまだ報告されていない。つまり、凍結乾燥処理を受けた精子については、産仔率の低下のメカニズムを含め解明されていない部分が多く⁸⁹、この課題は全ての哺乳類精子に共通しており、最適な保護剤や保存溶液が決定されていない。

凍結乾燥精子の実用化を妨げる別の課題として、保存に使われるガラスアンプル瓶には破損の恐れがあることが挙げられる（図 0b）。ガラス瓶は、ワインの保存にも用いられるように、内容物の長期保存中の劣化を防ぐためには信頼のある保存容器だが、例えば地震発生時や作業中の不意な落下、及びガラス瓶同士の衝突は、アンプル瓶の破損を招く可能性がある。凍結乾燥精子の 1 年以上の長期保存には、ガラスアンプル瓶内の高真空状態を保つことが重要であることが分かっており、空気や水分の混入は精子の質を著しく低下

させてしまう。そのため、ガラスアンプル瓶は常に衝撃から保護する必要があり、クッション材などで覆うとかさばってしまう。また、ガラスアンプル瓶は、瓶ごとのロット差が大きく、保存されていた凍結乾燥精子の質は、アンプル瓶を割って初めてわかる。したがって質の高いアンプル瓶を得るには、多くのアンプル瓶を保存する必要があるにもかかわらず、せっかく保存していても実際には使えない可能性があることやかさばってしまうことも課題の1つとして挙げられる（図0c）。

本研究では、哺乳類精子を特殊な保存設備や条件を伴わず、安全かつ簡便に、長期間室温保存する技術の実用化に向けて、凍結乾燥保存技術における低産仔率の改善や保存容器の改良を試みることにした。

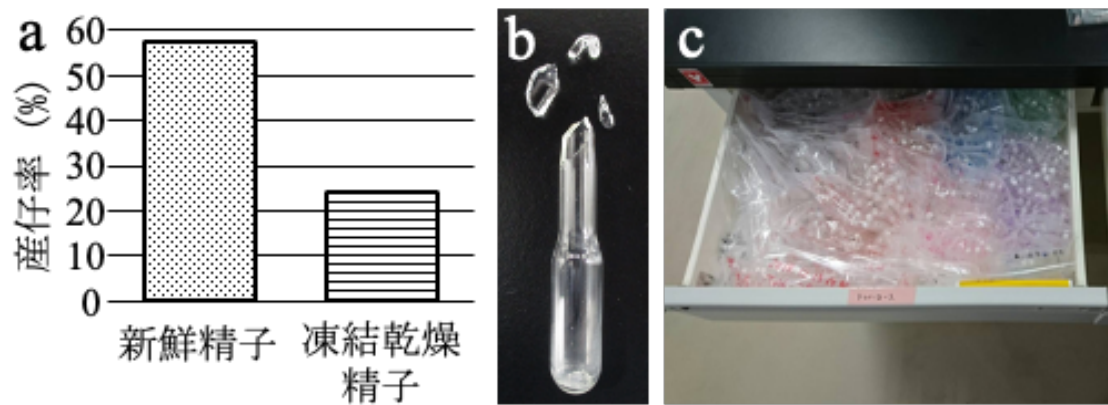


図0 凍結乾燥精子が抱える実用化に向けた課題

- (a) マウス精子は一度凍結乾燥処理するだけで、顕微受精胚の産仔率は新鮮精子と比較して著しく低下する。
 (b) アンフル瓶はガラス製のため保存中に割れてしまう恐れがある。(c) アンフル瓶を大量に保存すると場所を広くとってしまう。

第1章

凍結乾燥精子に対するトレハロースの保護効果の検証と最適濃度の決定

1-1 序論

凍結乾燥処理した精子から再現高くマウスの産仔が得られるようになったのは、Wakayama と Yanagimachi による 1998 年の報告⁶⁹以来である。運動能は失われていたが、高度に凝集した精子の核は非常に頑強であったため、精子頭部を顕微授精³⁷により卵子に注入すると、産仔が得られた。

近年は、真空のアンプル瓶に保存しておくことで室温（机の引き出しの中）⁹¹や宇宙空間^{93,94}、 $-196\sim+150^{\circ}\text{C}$ の極限温度下⁹²でも保存できることが明らかとなってきた。

これまでにマウス以外でラットやハムスター、ウサギ、ウマの凍結乾燥精子から産仔の作出が報告されている⁸²⁻⁸⁵。ところが、いずれの種においても凍結乾燥精子の産仔率は新鮮精子と比較して著しく低下し、この課題は 20 年以上未解決のままである。

その原因のひとつに染色体の異常が示唆されており、キレート剤を用いた精子の前処理による染色体異常の抑制などが報告されているものの¹⁰⁹⁻¹¹⁷、新鮮精子由来の顕微授精胚と同程度の産仔率に至る凍結乾燥技術は開発されていない。

本章では、非還元性の二糖であるトレハロースを用いることで、低産仔率の改善を試みた。トレハロースは、精子をはじめとする細胞の凍結保存において、氷晶の抑制や細胞膜の安定を目的とした保護剤として広く用いられている¹¹⁸⁻¹²¹。凍結保護剤にはジメチルスルホキシドやエチレングリコールなどの不凍液もよく用いられるが乾燥しない。一方、トレハロースは白色の粉末で簡単に乾燥する。

精子に対するトレハロースの効果を調べた先行研究において、Men らはブタ精子を用いて凍結乾燥処理後の DNA 損傷を抑制することを報告している¹¹³。また、Liu らは、蒸発乾燥処理したマウス精子について、塩化リチウム瓶内での 2 年間の室温保存にトレハロースを用いて成功している⁸⁴。我々の先行研究では、凍結乾燥状態のマウス精子は、トレハロースを添加することで 150°C までの高温耐性を示すようになることを明らかにした⁹²。このように、トレハロースは凍結乾燥精子に対し何らかの保護作用を持つことが示されており、最適濃度や使用方法を決定することができれば、精子の凍結乾燥保存の成績を改善できることが予想できる。

また、トレハロースは、微生物体内でも発見されており、クマムシなどが乾燥しても加水後に生命活動を再開する際に利用されることが報告されている¹²²。加えて、トレハロースは凍結保護剤や乾燥保護剤としてのほたらしのほか、抗酸化剤としての役割も報告されている¹²³。

以上の理由から本章では、0, 0.1, 0.5, 2.0 M のトレハロースを添加し、凍結乾燥精子に対する保護効果を検討した。トレハロースが凍結乾燥処理そのもののダメージから精子を保護するのかを調べるためには、作製直後の凍結乾燥精子として作製後 -30°C で 1 日保存した精子を顕微授精に用いることにした。また、室温保存の影響からトレハロースは凍結乾燥精子を保護しているのかを調べるために、1 週間および 1 ヶ月間室温で保存した凍結乾燥精子を顕微授精に用いた。また、保護効果が認められた場合、最も改善効果が大きかった濃度を最適濃度として決定することにした。

さらに、C57BL/6N (B6N) や C3H/He, 129/Sv といった近交系マウスは遺伝子改変マウスの作製¹²⁴や次世代シーケンスを用いた全ゲノム解析に広く使われ、これらの系統の精子や卵子、受精卵の凍結保存技術は系統維持において極めて重要な役割を果たすほか、発生工学の実験で扱いやすい交雑系の C57BL/6N × DBA2 (BDF1) など、多系統のオスマウスの精子を用いた場合であっても、トレハロースはマウス凍結乾燥精子の保護剤として幅広く用いることができるか検証することにした。

1-2 材料及び方法

1-2-1 マウス

ICR 系統はメスマウスとオスマウスともに、日本エスエルシー株式会社より購入、一部は自家繁殖により得られたマウスを使用した。BDF1、B6N、C3H/He、及び129/Sv 系統のオスマウスは、SLC 社より購入した。実験終了後は、全てのマウスを実験に使用したその日のうちに頸椎脱臼もしくは二酸化炭素の吸引により安楽死させた。全ての実験は、「動物の保護及び管理に関する法律」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」および山梨大学の定める規程により設置されている動物実験専門委員会の審査を経たのち、動物愛護と安全について細心の配慮をもって行った。

1-2-2 培地

凍結乾燥処理前の精子の前培養に HTF 培地¹²⁵ (表 1-1) を用いた。Tris-EGTA 培地^{109,117,126} は精子の凍結乾燥処理に用いた (表 1-2)。Hepes-CZB 培地³⁷ (表 1-3) は顕微授精を含む卵子の体外操作に、CZB 培地¹²⁷ (表 1-4) は卵子もしくは顕微授精胚の 37°C、5%CO₂ インキュベーター内での培養にそれぞれ用いた。

試薬 #カタログ番号	pH: 7.4 mg/100 ml
(ストック)	
NaCl [Wako] #191-01665	581.7
KCl [Wako] #163-03545	35.0
KH ₂ PO ₄ [Wako] #169-04245	5.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O [nacalai tesque] #21003-75	5.0
NaHCO ₃ [Wako] #191-01305	210.0
Phenol Red sodium salt [SIGMA-ALDRICH] #P4758-5G	適量
(エネルギーソース)	
D(+)-Glucose [Wako] #049-31165	50.0
Pyruvic Acid Sodium Salt [Wako] #594-10442	3.6
Sodium DL-lactate, Synthetic [SIGMA] #L7900-100ML	400 μL
Penicillin G Potassium Salt [Wako] #194536	10.0
Hypotaurine [SIGMA] #H1348-1G	11.0
Albumin, Bovine Serum, Fraction V, Crystalline [Millipore] #12657-5GM	300.0
CaCl ₂ · 2H ₂ O [Wako] #031-00435	30.0

表 1-2 Tris-EGTA 培地組成		pH: 8.0
試薬	#カタログ番号	mL/100 mL
50 mMEGTA 溶液 [SIGMA]	#E3889-25G	25
100 mM Tris-HCl 溶液 [Wako]	#312-90061	25
Trehalose · 2H ₂ O [Wako]	#206-18455	適宜

表 1 - 3 Hepes-CZB 培地組成

pH: 7.4

試薬	mg/100 mL
NaCl [Wako] #191-01665	476.0
KCl [Wako] #163-03545	36.0
KH ₂ PO ₄ [Wako] #169-04245	16.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O [nacalai tesque] #21003-75	29.0
NaHCO ₃ [Wako] #191-01305	42.0
EDTA · 2Na [Wako] #343-01861	4.0
Phenol Red sodium salt [SIGMA] #P4758-5G	適量
HEPES sodium salt [SIGMA] #H8651-100G	520.0
D(+)-Glucose [Wako] #049-31165	100.0
Pyruvic Acid Sodium Salt [Wako] #594-10442	3.0
Sodium DL-lactate, Synthetic [SIGMA] #L7900-100ML	0.53 mL
Penicillin G Potassium Salt [Wako] #194536	5.0
L-Glutamine [SIGMA] #G8540-100G	15.0
Streptomycin [ICN Biomedicals Ins.] #194541	7.0
CaCl ₂ · 2H ₂ O [Wako] #031-00435	30.0
PVA [SIGMA] #P8136-250G	10.0

表 1-4 CZB 培地組成 pH: 7.4

試薬	mg/100 mL
(ストック)	
NaCl [Wako] #191-01665	476.0
KCl [Wako] #163-03545	36.0
KH ₂ PO ₄ [Wako] #169-04245	16.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O [nacalai tesque] #21003-75	29.0
NaHCO ₃ [Wako] #191-01305	211.0
EDTA · 2Na [Wako] #343-01861	4.0
Phenol Red sodium salt [SIGMA] #P4758-5G	適量
(エネルギーソース)	
D(+)-Glucose [Wako] #049-31165	100.0
Pyruvic Acid Sodium Salt [Wako] #594-10442	3.0
Sodium DL-lactate, Synthetic [SIGMA] #L7900-100ML	0.53 mL
L-Glutamine [SIGMA] #G8540-100G	15.0
Penicillin G Potassium Salt [Wako] #194536	5.0
Streptomycin [ICN Biomedicals Ins.] #194541	7.0
Albumin, Bovine Serum, Fraction V, Crystalline [Millipore] #12657-5GM	5 mg/mL
CaCl ₂ · 2H ₂ O [Wako] #031-00435	25.0

1-2-3 凍結乾燥精子の作製

頸椎脱臼したオスマウスから精巢上体尾部を採取した。脂肪や血を除去した後、指でつまみながらハサミで切れ込みを入れ、得られた高濃度の精子液をピンセットで回収し、エッペンドルフチューブに分注した 750 μL の HTF 培地中に懸濁した。37°C、5%CO₂ インキュベーター内で 30 分間～1 時間の前培養を行ったのち、培地中に拡散した精子の濃度および運動性を調べ、上澄み 500 μL を回収し、5,000 rpm で 10 分間遠心処理を行った。遠心後、上清を取り除き、精子のペレットを 200 μL の Tris-EGTA 培地（トレハロースを含まない）に懸濁させた。この後、各トレハロース濃度（0, 0.1, 0.5, 2.0 M）の Tris-EGTA 培地を 450 μL 入れたエッペンドルフチューブに 50 μL ずつ分注し、精子を懸濁させたのち、ガラスアンプルに 1 本あたり 50 μL ずつ分注した。精子懸濁液の分注後、凍結乾燥処理は、液体窒素を用いた 1 分間の凍結処理と、FDU-2200 凍結乾燥機器（EYELA 社）による 6 時間の真空乾燥処理を行ったのち、ガスバーナーを使ってガラスアンプルのくぼみを真空環境下で溶接することにより封入した（図 1-1 a-c）。

1-2-4 凍結乾燥精子の保存

全てのアンプルは実験に使用するまで、小さなプラスチックの袋にしまって-30°Cで1日、もしくは室温で1週間、1ヶ月間、3ヶ月間保存した（図 1-1 f, g）。



図1-1 凍結乾燥精子の作製工程

(a) 凍結乾燥機 (FDU-2200、東京理科器械)。(b) 凍結乾燥機から伸びたゴムチューブの先に精子懸濁液を注入したガラスアンプルを取り付ける。(c)凍結処理は液体窒素を用いて1分間行った。(d) 真空バルブをVENTにすると通気でき、VAC.にするとアンプル内の真空乾燥状態を保つことができる。真空バルブをVAC.にひねり、6時間の真空乾燥処理を行った。(e) 乾燥処理後、アンプルの窪みをバーナーで10秒ほど熱して密封した。(f) 凍結乾燥精子が入ったガラスアンプルは小さな袋に入れて、(g) 一部のアンプル瓶は机の引き出しで保管した。

1-2-5 テスラコイルリークディテクターを用いたアンプル内の残存空気検出

ガラスアンプル瓶の真空判定には、テスラコイルリークディテクター（サンヨー電子株式会社）（図1-2 a, b）を取扱説明書に従って使用した。テスラコイルの先端は、ガラスアンプルに近づけるとアンプルに向かって空気中に放電し、アンプル瓶の内部が光らない場合は大量の空気が含まれていることを示し（テスラ陰性）（図1-2c）、光った場合は高真空状態が保たれていることを示す（テスラ陽性）（図1-2d）。テスラ陰性のガラスアンプル瓶で保存された精子は、シート状に凝集し顕微授精が困難なほか卵子に顕微注入できたとしても劣化しており受精しないため、実験にはすべてテスラ陽性のガラスアンプル瓶のみを用いた。

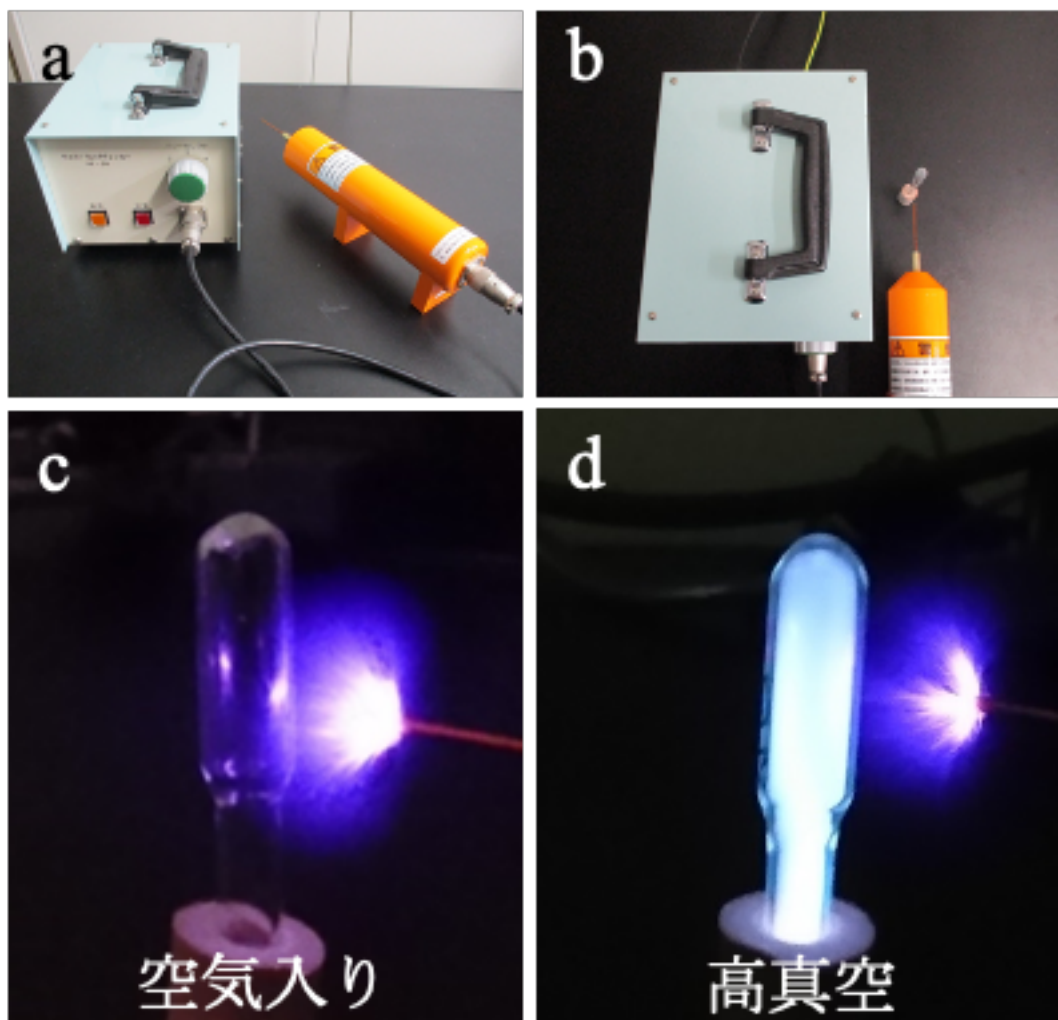


図1-2 テスラコイルリークディテクターによる真空アンプル瓶の検出

(a) 電気の強さ（パワーセレクト）は“3”を用いた。(b) ゴムチューブを切ったものにガラスアンプルを差し込んで立て、金属露出部の先端から放出される火花を近づけた。(c) アンプル内に空気が入っているとアンプル内は光らない。(d) アンプル内が真空状態であればアンプル内が光る。

1-2-6 卵子の用意

採卵に用いる ICR メスマウスに、妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG) を 7.5 IU、48 時間後にヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) を 7.5 IU を腹腔内注射し、過排卵を誘起させた。hCG 注射から 14-16 時間後にマウスから卵管を採取し、卵管膨大部をピンセットで裂いて卵子卵丘複合体を取り出した。ヒアルロニダーゼを加えた HEPES-CZB 培地に卵子卵丘複合体を移し、卵子から卵丘細胞を剥がした。裸化卵子は CZB 培地で数回洗ったのち、培養用ディッシュ内の CZB 培地に移した。

1-2-7 顕微授精および胚移植

凍結乾燥精子は、50 μ L の蒸留水を加水し混ぜた直後に顕微操作ディッシュの PVP ドロップに 1-2 μ L 加えピンセットでよくかき混ぜた。顕微授精にはピエゾマイクロマニピュレーターを用い、従来の方法に従って行った³⁷。精子を注入針で回収し卵子へ注入したのち、生存した卵子は CZB 培地中で 37°C、5%CO₂ で培養した。顕微授精から 6 時間後前核を確認した。雌雄両前核を観察できた胚を正常な受精胚とみなし、2 細胞期での卵管移植または胚盤胞期までの 4 日間の発生観察に用いた。

胚移植は、顕微授精の翌日に 2 細胞期胚を、移植の前日に精管結紮マウスと交配させて膣栓が確認された偽妊娠雌マウスの卵管に、1 卵管あたり 10 個程度の 2 細胞期胚を移植した。移植後 18.5 日で帝王切開を行い、得られた産仔の蘇生後、産仔数の確認及び産仔と胎盤の重量の測定を行った。

1-2-8 γ -H2A.x 染色

H2A.x は、ヒストン H2A の損傷箇所を指す。H2A.x のリン酸化が生じた箇所を γ -H2A.x と呼び、DNA 二本鎖切断の損傷修復マーカーとして細胞内で働き、様々な修復および細胞周期チェックポイントタンパク質を呼び込む¹²⁸。 γ -H2A.x シグナルは、雄性前核における DNA 二本鎖切断のマーカーとして用いた。また、ヒストン H3K9me2 シグナルは、雌性前核の識別のために使用した。顕微授精から 10 時間後に正常に雌雄両前核を形成した前核期胚を、0.2%TritonX を含む 4%パラホルムアルデヒドで 20 分間固定し、一晩可溶化処理した。翌日、ブロッキングバッファーで 1 次抗体を 500 倍希釈した溶液中に、固定胚を一晩浸漬した。1 次抗体には anti-phospho-H2AX (Ser139) rabbit polyclonal antibody (Millipore-Merck、カタログ番号: 07-164) および anti-histone H3 (dimethyl K9) mouse monoclonal antibody (Abcam、カタログ番号: mAbcam 1220) をそれぞれ 500 倍希釈で使用した。2 次抗体には、Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (Molecular Probes、カタログ番号: A-11001) 及び Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes、カタログ番号: A-11031) を用いた。DNA は 2 μ g/mL の DAPI (Molecular Probes、カタログ番号: D1306) で染色した。

1-2-9 統計処理

発生率及び産仔率はカイ二乗検定により評価し、p 値が 0.01 未満の場合、統計的に有意な差が認められることに定めた。

1-3 結果

1-3-1 凍結乾燥直後の精子の発生率

トレハロース (図 1-3a) を添加して凍結乾燥したガラスアンプル瓶内の精子懸濁液の様子を観察したところ、凍結乾燥試料特有の多孔質構造¹²⁹が確認されたが (図 1-3b)、トレハロースの有無による、加水後の精子の形態に変化はみられなかった (図 1-3c, d)。

まず、凍結乾燥処理のダメージによる精子への影響を調べるため、作製直後 (-30°Cで1日保存) の凍結乾燥精子を用いて顕微授精を行った。0.1 M、0.5 M トレハロース添加区において、胚盤胞率及び産仔率ともに改善傾向が見られたが、有意な差はなかった (胚盤胞率: 0.1 M、0.5 M トレハロース添加区 47-57% vs. トレハロース無添加区 46%、産仔率: 0.1 M、0.5 M トレハロース添加区 33-43% vs. トレハロース無添加区 25%) (表 1-5、1-6)。

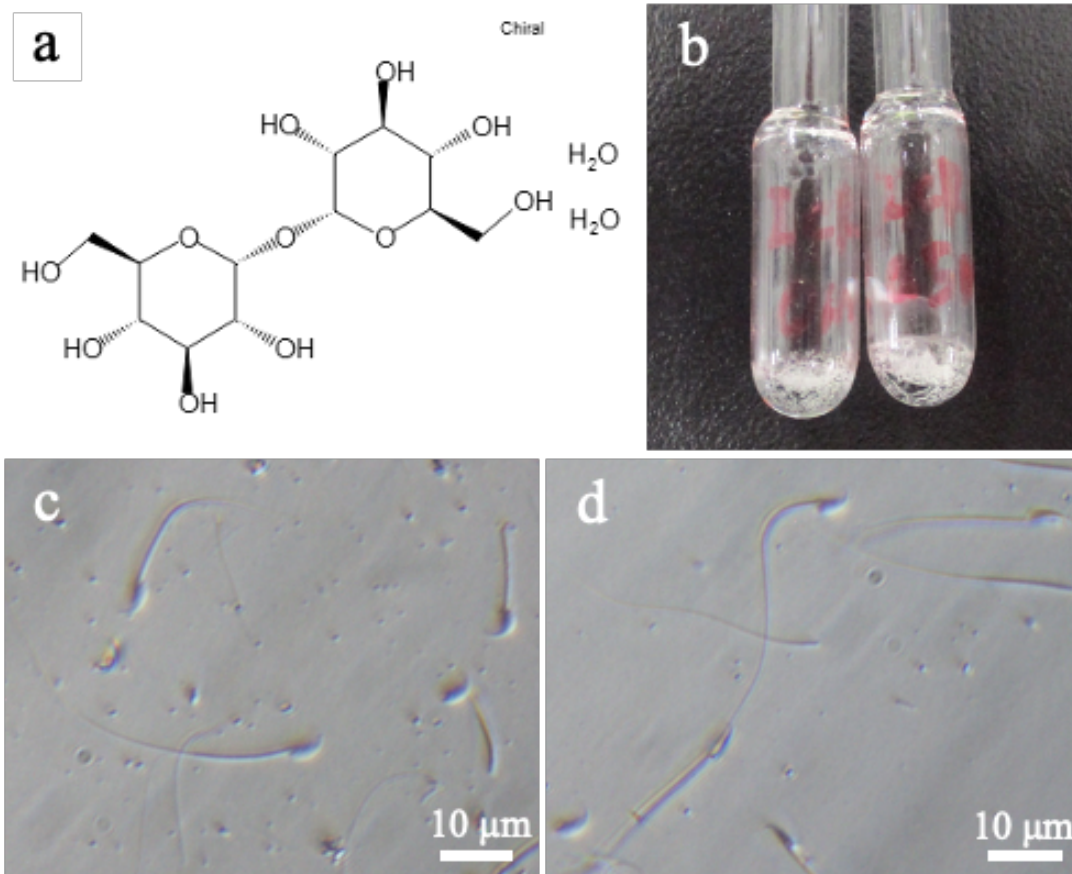


図1-3 トレハロースを添加して作製した凍結乾燥精子

(a) 本実験に使用したトレハロース二水和物の構造式を示す。出典：富士フィルム和光純薬株式会社、<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/product/detail/W01W0120-1845.html>。(b) 左：0 M トレハロース、右：0.5 M トレハロースを添加して凍結乾燥処理した精子懸濁液の様子。(c) 0 M トレハロース、(d) 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、凍結乾燥直後（ -30°C で1日保存した後）にガラスアンプル瓶を割って加水し、観察した様子。どちらの区にもしっぽ付きの精子や頭と尾が離れた精子が見られる。

表1-5 凍結乾燥直後の（1日冷凍保存した）精子を用いた顕微受精胚の発生率

トレハロース 濃度	供試 卵数	受精卵数 (%)	各ステージへの胚発生数			
			2細胞期 (%)	4-8細胞期 (%)	桑実期 (%)	胚盤胞期 (%)
0M	44	41 (93)	35 (85)	31 (76)	22 (54)	19 (46)
0.1M	43	42 (98)	37 (88)	34 (81)	30 (71)	24 (57)
0.5M	48	43 (90)	36 (84)	30 (70)	26 (60)	20 (47)
2.0M	36	36 (100)	36 (100)	28 (78)	25 (69)	25 (69)

受精率は、供試卵数に対する受精卵数の割合を表す。

各ステージへの胚発生率は、受精卵数を母数として算出した。

表 1-6 凍結乾燥直後の（1日冷凍保存した）精子を用いた顕微受精胚の産仔率

トレハロース 濃度	供試 卵数	受精卵数 (%)	2細胞期胚数 (%)	移植胚数 (レシピエントの匹数)	産仔数 (%)
0M	79	73 (92)	56 (77)	56 (4)	14 (25)
0.1M	70	64 (91)	56 (88)	56 (4)	24 (43)
0.5M	64	61 (95)	51 (83)	51 (4)	17 (33)
2.0M	65	63 (97)	58 (92)	58 (4)	14 (24)

受精率は、供試卵数に対する受精卵数の割合を表す。

2細胞期への胚発生率は、受精卵数を母数として算出した。

産仔率は、移植胚数に対する産仔数の割合を表す。

1-3-2 1週間室温で保存した凍結乾燥精子の発生率

次に、室温保存中の精子に対するトレハロースの保護効果を検証するため、1週間室温で保存した凍結乾燥精子を用いて顕微授精を行い、胚盤胞率及び産仔率の比較を行った結果、有意な差は得られなかったが、胚盤胞率、産仔率はともに0.5 M トレハロース添加区において高い傾向がみられた(胚盤胞率:53% vs. 36-43%、産仔率:35% vs. 15-17%) (表1-7、1-8)。

表 1-7 1 週間室温で保存した凍結乾燥精子を用いた顕微授精胚の発生率

トレハロース 濃度	供試 卵数	受精卵数 (%)	各ステージへの胚発生数			
			2細胞期 (%)	4-8細胞期 (%)	桑実期 (%)	胚盤胞期 (%)
0 M	47	46 (98)	43 (93)	33 (72)	28 (61)	19 (41)
0.1 M	36	35 (97)	32 (91)	23 (66)	23 (66)	15 (43)
0.5 M	52	49 (94)	43 (88)	39 (80)	36 (73)	26 (53)
2.0 M	41	36 (88)	29 (81)	22 (61)	20 (56)	13 (36)

受精率は、供試卵数に対する受精卵数の割合を表す。

各ステージへの胚発生率は、受精卵数を母数として算出した。

表 1-8 1 週間室温で保存した凍結乾燥精子を用いた顕微授精胚の産仔率

トレハロース 濃度	供試卵数	受精卵数 (%)	2 細胞期胚数 (%)	移植胚数 (レシピエントの匹数)	産仔数 (%)
0M	35	35 (100)	27 (77)	27 (3)	4 (15)
0.1M	35	35 (100)	35 (100)	35 (3)	6 (17)
0.5M	46	46 (100)	40 (87)	40 (3)	14 (35)
2.0M	63	61 (97)	50 (82)	34 (4)	5 (15)

受精率は、供試卵数に対する受精卵数の割合を表す。

2 細胞期への胚発生率は、受精卵数を母数として算出した。

産仔率は、移植胚数に対する産仔数の割合を表す。

1-3-3 1ヶ月間室温で保存した凍結乾燥精子の発生率

続いて、トレハロースを懸濁させて作製した凍結乾燥精子を室温で1ヶ月間保存したのち、1-3-2と同様の実験を行った。0.1 Mおよび0.5 Mトレハロース添加区の胚盤胞率は、トレハロース無添加区に対し有意に改善した(63%及び56% vs. 29%) (表1-9、図1-4a-d)。産仔率も同様に、0.5 Mトレハロースを添加すると最も高い成績が得られた(47% vs. 17-27%) (表1-10、図1-4e)。だが、2.0 Mトレハロースを添加すると胚盤胞率、産仔率ともに成績は低下する傾向がみられた。以上の結果から、長期的な室温保存における凍結乾燥精子に対するトレハロースの最適濃度は0.5 Mとして、以下に続く実験は行った。

表 1-9 1ヶ月間室温保存した凍結乾燥精子を用いた顕微授精胚の発生率

トレハロース 濃度	供試 卵数	受精卵数 (%)	各ステージへの胚発生数			
			2細胞期 (%)	4-8細胞期 (%)	桑実期 (%)	胚盤胞期 (%) [*]
0M	57	55 (96)	45 (82)	30 (55)	23 (42)	16 (29) ^a
0.1M	46	40 (87)	35 (88)	30 (75)	26 (65)	25 (63) ^b
0.5M	96	90 (94)	76 (84)	61 (68)	61 (68)	50 (56) ^b
2.0M	40	37 (93)	29 (78)	25 (68)	20 (54)	14 (38)

受精率は、供試卵数に対する受精卵数の割合を表す。

各ステージへの胚発生率は、受精卵数を母数として算出した。

*: 胚盤胞率について、異なる文字は0M区に対し有意な差があることを示す(P<0.01)。

表 1-10 1ヶ月間室温保存した凍結乾燥精子を用いた顕微受精胚の産仔率

トレハロース 濃度	供試 卵数	受精卵数 (%)	2細胞期胚数 (%)	移植胚数 (レシピエントの匹数)	産仔数 (%)
0M	91	88 (97)	69 (78)	60 (5)	13 (22)
0.1M	56	51 (91)	45 (88)	44 (4)	12 (27)
0.5M	41	38 (93)	33 (87)	32 (3)	15 (47)
2.0M	64	58 (91)	52 (90)	46 (5)	8 (17)

受精率は、供試卵数に対する受精卵数の割合を表す。

2細胞期への胚発生率は、受精卵数を母数として算出した。

産仔率は、移植胚数に対する産仔数の割合を表す。

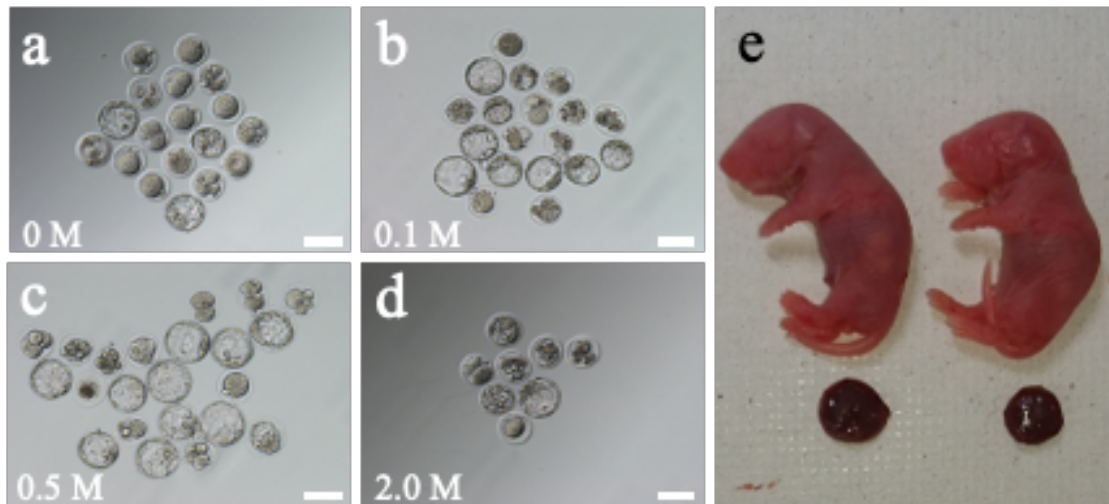


図1-4 室温保存した凍結乾燥精子から得られた胚盤胞と産仔

(a) 0 M、(b) 0.1 M、(c) 0.5 M、(d) 2.0 M のトレハロースを添加して1ヶ月間室温で保存した凍結乾燥精子を使って得られた胚盤胞。スケールバー：100 μ m。(e) 0.5 M トレハロースを添加して1ヶ月間室温保存した凍結乾燥精子を顕微授精に使用し、得られた産仔。

1-3-4 多系統マウスの凍結乾燥精子に対するトレハロースの保護効果

凍結乾燥精子を室温で3ヶ月間保存したのち、顕微授精により得られた胚の産仔率を調べた。ICR系統において、0.5Mトレハロースの添加による産仔率の改善はみられなかった(0M:18% vs. 0.5M:18%) (表1-11)。しかし、BDF1系統やC3H/He系統の凍結乾燥精子では、0.5Mトレハロースを添加した場合に、有意な差はなかったが、産仔率に改善傾向がみられた(0M:14% vs. 0.5M:32%及び0M:11% vs. 0.5M:26%、それぞれBDF1系統及びC3H/He系統)。この傾向は、他の近交系系統のマウス精子を使った場合顕著にみられ、0.5Mトレハロースを添加した場合、産仔率はB6N系統で26%、129/Sv系統で28%であり、いずれの系統においてもトレハロース無添加区の産仔率(8%及び6%)に対し有意に改善した(図1-5)。

表 1-1 1 3 ヶ月間室温で保存した凍結乾燥精子を用いた顕微授精胚の産仔率

系統	トレハロース	供試卵数	受精卵数 (%)	2細胞期胚数 (%)	移植胚数 (レシピエントの匹数)	産仔数 (%)*
ICR	-	87	81 (93)	67 (83)	67 (6)	12 (18)
	+	79	70 (89)	57 (81)	57 (6)	10 (18)
BDF1	-	52	37 (71)	22 (59)	22 (3)	3 (14)
	+	42	34 (81)	25 (74)	25 (3)	8 (32)
B6	-	122	108 (89)	72 (67)	72 (7)	6 (8) ^a
	+	125	119 (95)	91 (76)	91 (7)	24 (26) ^b
C3H	-	117	108 (92)	88 (81)	87 (6)	10 (11)
	+	113	100 (88)	81 (81)	81 (6)	21 (26)
129	-	79	67 (85)	51 (70)	51 (4)	3 (6) ^a
	+	93	87 (94)	68 (78)	68 (4)	19 (28) ^b

受精率は、供試卵数に対する受精卵数の割合を表す。

2細胞期への胚発生率は、受精卵数を母数として算出した。

産仔率は、移植胚数に対する産仔数の割合を表す。

*: 産仔率について、異なる文字は系統ごとに有意な差があることを示す(P<0.01)。

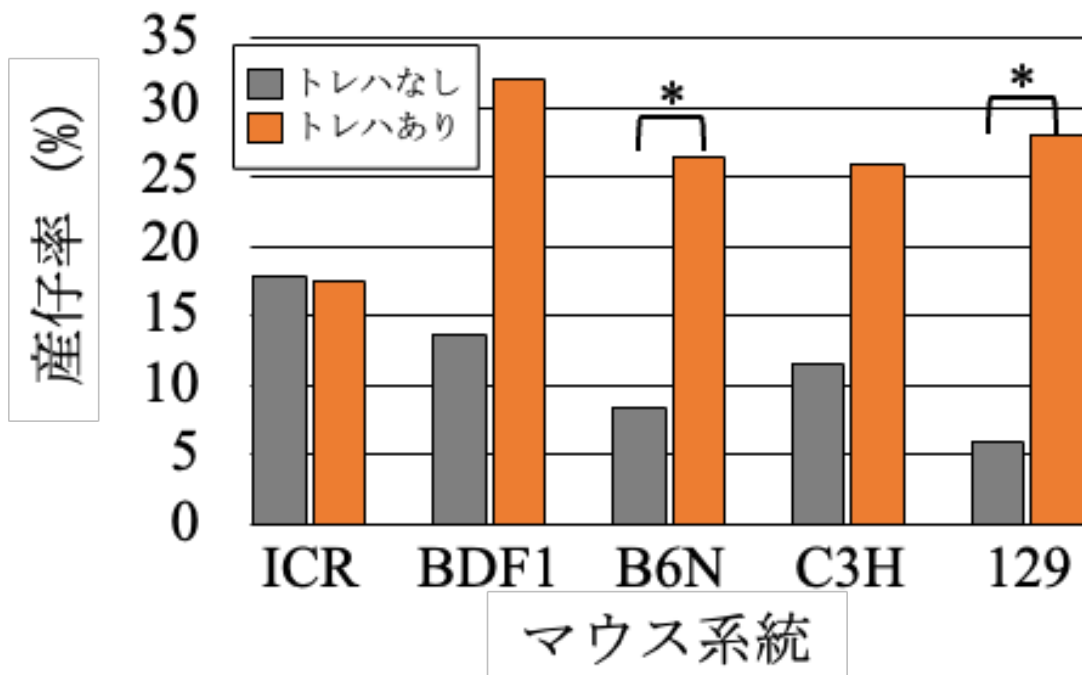


図1-5 多系統の凍結乾燥精子を顕微授精した胚の産仔率

凍結乾燥精子は、精子懸濁液にトレハロースを添加せずに、もしくは0.5Mのトレハロースを添加して系統ごとに作製した。室温で3ヶ月間保存したのち顕微授精に使用し、得られた2細胞期胚を卵管移植した。

*: 系統ごとに、トレハロース添加区、無添加区の間有意な差があることを示す(P<0.01)。

1-3-5 凍結乾燥精子 DNA に対するトレハロースの保護効果

トレハロースの添加により産仔率が改善した理由について、凍結乾燥精子の DNA ダメージを調べるために、B6N 系統の凍結乾燥精子について顕微授精胚の雄性前核に発現した γ -H2A.x を免疫蛍光観察した (図 1-6 a, b)。0.5 M トレハロースが凍結乾燥処理そのもののダメージから精子 DNA を保護する効果があったのかを調べるために作製直後 (1 日保存した) の凍結乾燥精子と、室温長期保存中の精子 DNA の保護効果があったのかを調べるために 3 ヶ月間室温で保存した凍結乾燥精子をそれぞれ用いた。

作製直後の凍結乾燥精子、もしくは 3 ヶ月間室温保存した凍結乾燥精子から得られた雄性前核において、いずれも γ -H2A.x の発現を確認したが、0.5 M トレハロースを添加しても保存期間によらず精子 DNA の損傷率に有意な差はなかった (図 1-6 c, d)。したがって、トレハロースには凍結乾燥処理のダメージからも室温保存によるダメージからも、精子 DNA を保護する働きはなかった。

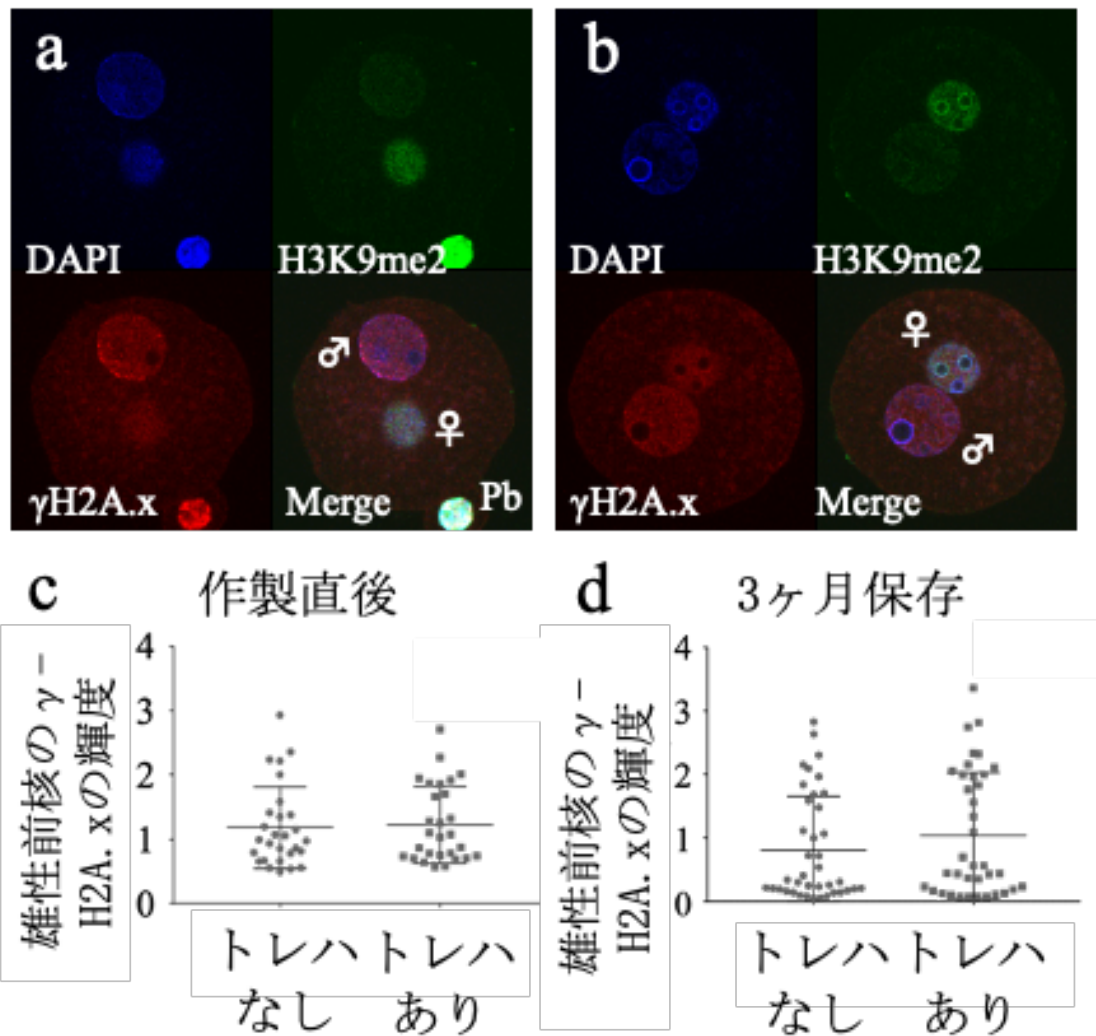


図1-6 雄性前核の γ -H2A.x染色によるDNA損傷の検出

(a) トレハロースを添加せずに、もしくは、(b) 0.5 M のトレハロースを添加して凍結乾燥処理した精子を顕微授精した胚の γ -H2A.x染色を行った。画像は、DAPIで染めた雌雄の前核(左上)、緑色蛍光にてH3K9me2の発現を確認した雌性前核(右上)、赤色蛍光にて γ -H2A.xの発現を観察した雄性前核(左下)、及び3枚を合わせた画像(右下)をそれぞれ示す。Pb: Polar body。(c) 作製直後(1日保存)と(d) 3ヶ月間保存した凍結乾燥精子由来の雄性前核の輝度をプロットした。円の点は0 M トレハロース区、四角の点は0.5 M トレハロース区の雄性前核の輝度をそれぞれ示す。

1-4 考察

トレハロースの凍結乾燥保護効果には以下の2点を考えた。1つは、凍結乾燥処理時に精子細胞質の内外で発生する氷晶によって精子の細胞小器官や DNA に及ぶ凍結乾燥処理そのものによるダメージ^{89,130}からの保護である。もう1つは、室温保存中、ガラスアンプル内に微かに残った空気や水分による、酸化ストレスなどの保存によるダメージ^{41,46,54,55}である。本章では、トレハロースを添加した Tris-EGTA 培地を用いて精子の凍結乾燥処理を行なった。元来凍結乾燥処理は精子を殺してしまう。本章において、精子はトレハロースを添加して凍結乾燥処理をしても動かず、そして凍結乾燥処理直後の産仔率の改善はみられなかったため、トレハロースには精子を凍結乾燥処理そのものから保護する働きはないことが示された(表1-5、1-6)。これに対し、トレハロースには室温保存した凍結乾燥精子の産仔率を改善する効果があることが明らかとなった(表1-7、1-8、1-9、1-10)。

2018年の先行研究は、1年以上室温で保存した凍結乾燥精子から産仔を得ることに成功し、アンプル内に残存する空気や湿気は室温保存後の精子の質を低下させていたため、アンプル内の高真空状態を維持することが凍結乾燥精子の室温保存に重要であることを報告した⁹¹。しかしながら、非破壊検査によって高真空であると判定したアンプルであっても全てのアンプルには少量の空気が含まれており、現在の技術ではアンプル内から完全に空気を取り除くことは難しい。本章において精子は、前培養を行ったのち、遠心して培地を HTF 培地からトレハロース溶液に置換し、そのまま30分ほど浸漬させた後、アンプル瓶に分注した。トレハロースは分子量が大きいので、トレハロースは精子細胞質内には入っておらず⁵²、凍結乾燥処理の前に精子細胞膜から細胞質内へ入ることはできない⁶⁰。そのため、本章においてトレハロースは精子の周りに存在するだけの状態であった可能性が高い。しかしトレハロースは、タンパクの酸化や変性を抑制する働きが報告されているため¹³¹⁻¹³⁴、トレハロースの添加はアンプル内に残ったごく少量の空気による精子の劣化(酸化やタンパクの変性)を防ぐうえで効果を示したのではないかと考える。

また、凍結乾燥精子の室温保存におけるトレハロースの最適濃度は0.5 Mであり、高濃度のトレハロースを添加した凍結乾燥精子の顕微授精胚の胚盤胞率や産仔率は低下する傾向がみられた(表1-5、1-6、1-7、1-8、1-9、1-10)。この理由として、凍結乾燥処理後のトレハロースの結晶化は精子に対し物理的なダメージを与えていた可能性が考えられる。低濃度のトレハロースを用いた場合、結晶化によるダメージは少ないが、トレハロースが少ない分得られる保護効果も少ない一方で、高濃度のトレハロースを添加した場合は、保護効果よりも結晶化による物理的なダメージの影響を受けやすいのではないかと^{130,135}。以上の理由から、0.5 Mは最も高い保護効果を得られる最適濃度であったと考える。倒立顕微鏡による観察では、各トレハロース濃度区の精子の形態に違いはみられなかったため、電子顕微鏡を用いた観察によって、トレハロースの添加、および室温保存に伴い、精子の形態変化の有無や、トレハロースが精子に対しどのように存在していたのかを明らかにできる可能性がある。

精子のトレハロース処理方法については、トレハロースに精子をより長時間浸漬してから凍結乾燥処理する方法や、精子細胞膜に傷をつけた精子^{136,137}にトレハロースを添加してから凍結乾燥処理を行う方法をはじめ、細胞内にトレハロースを取り込ませる方法^{121,138,139}を検討することで、精子細胞質内外でのトレハロースの働きの違いを調べられると考える。

凍結乾燥精子は精子 DNA にダメージが入っているために、顕微授精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¹⁰⁸。Kusakabe は精子 DNA のダメージは、凍結乾燥処理中だけでなく、長期保存中の酸化ストレスなどによっても増加することを報告している¹¹¹。本章の結果より、トレハロースは室温保存した後の凍結乾燥精子の産仔率を改善することが分かったが、その理由を調べるため、1-3-4の結果のなかでも特に産仔率の改善効果が得られた B6N 系統の凍結乾燥精子を用い、精子 DNA の損傷率を調べた。凍結

乾燥直後に精子 DNA の損傷率を調べた結果、トレハロースを添加しても精子 DNA の損傷率に変化はみられなかったが、この結果は 1-3-1 においてトレハロースを添加して凍結乾燥処理した直後の産仔率に改善がみられなかった結果を支持している。1-3-4 では3ヶ月間室温保存した B6N 系統の凍結乾燥精子の顕微受精胚の産仔率はトレハロースの添加によって有意に改善していたにもかかわらず、精子 DNA の損傷率には変化がなかった (図 1-6)。我々は先行研究において、トレハロースは凍結乾燥精子の高温耐性を増強することを報告している⁹²。したがって、トレハロースの産仔率の改善効果の作用点は、精子 DNA 以外の因子であり、トレハロースによる室温保存後の産仔率の改善効果は精子の細胞質や細胞小器官などの保護によって得られたのではないかと考える。

本章のトレハロースによる産仔率の改善効果は近交系マウスの精子を用いた場合に顕著に得られた (図 1-5、表 1-1 1)。近交系の生殖細胞は体外操作に弱く、交雑種と比較すると産仔率は低いことが知られている^{90,119}。しかし、細胞に含まれる DNA の構成は生物に共通である場合、生殖細胞の体外操作に対する耐性は、例えば細胞質の違いに起因すると考えられる。一方、3ヶ月の室温保存後の産仔率へのトレハロースの効果の検証には5系統を用いたが、このうちトレハロースによる産仔率の改善傾向がみられたのは、1ヶ月の室温保存においてトレハロースによる産仔率の改善がみられた ICR 系統を除く、BDF1 (交雑系)、B6N、C3H/He、129/Sv (近交系) の4系統であった。これらの結果は、マウス精子において、DNA の構造や凍結乾燥処理への耐性には系統間で差がないが、DNA 以外の先体や細胞質、細胞内小器官の構造にはマウス系統間で違いがあり、トレハロースは精子 DNA 以外の他の因子 (先体や細胞質) を室温保存中に保護した結果、精子 DNA の損傷率には差がないが顕微受精胚の産仔率の改善効果には系統間で差が出たのではないかと考える。特に、例えば B6N 系統の“卵子”は細胞膜が非常に弱く顕微注入の操作への耐性は弱いことを踏まえ¹⁴⁰、精子の細胞膜も卵子の細胞膜と同様に“弱い”と考えた場合、系統による体外操作や凍結乾燥処理への精子の耐性の違いは DNA よりも細胞膜や細胞小器官などの耐性の違いによるものであり¹⁴¹、凍結乾燥精子の作製工程中の、遠心やピペッティング、凍結乾燥処理は B6N 系統の精子の細胞膜、細胞質を特に傷つけやすく、その分トレハロースは精子内部にも入るようになり、トレハロースの保護効果が他の系統に比べ働きやすくなったのではないかと考えられる。したがってトレハロースは、クローズドコロニーや交雑種の精子よりも、より“弱い”精子といえる近交系の長期間室温保存した精子の細胞質に対し効果的に働いたと考えられる。だが、生殖細胞の体外操作への耐性が強いとされる交雑系の BDF1 系統の精子でもトレハロースによる産仔率の改善傾向が得られたほか、ICR 系統の精子を用いた場合には、1ヶ月保存の時点ではトレハロースによって産仔率が改善したにもかかわらず、3ヶ月間の室温保存後にトレハロースによる改善効果はみられなくなった。また、トレハロースを添加しなかった場合、ICR 系統の凍結乾燥精子の産仔率が5系統のうちで最も高くなった。これらの理由は、系統ごとに生殖細胞の保存や凍結乾燥精子の作製に対する“適性”や、トレハロースをはじめとする保護剤との“相性”のようなものがあつたためではないかと考える。

また、本研究で得られたトレハロースによる産仔率の改善効果は産仔率の維持を示すものであるのかも検証すべきである。このほかトレハロース以外の試薬¹⁴²を凍結乾燥保護剤として試すことで、本研究だけでは明らかにできなかった、凍結乾燥処理による顕微受精胚の著しい低産仔率の抑制方法の発見につながるかもしれない。

第2章

ガラスアンプル瓶を用いずにシート状の凍結乾燥精子を作製する方法の検討

2-1 序論

マウスをはじめ、ラットやハムスター、ウサギ、ウマ、ヒト、ヒツジ、キリンなど、様々な動物種の精子で凍結乾燥技術の開発が進められている^{58,59,81}が、ガラスアンプル瓶を用いた作製方法が広く利用されている。これは、ガラスが-196℃や高真空の処理にも耐えることができ、また凍結乾燥精子に限らず、日常生活におけるワインやジャムなどの長期保存にも利用されているように、長期保存という点においてガラスには使用実績があるためである。

2018年の我々の先行研究⁹¹では、テスラコイルリークディテクターを用いた非破壊検査により、高真空と判定したガラスアンプル瓶で保存されていた凍結乾燥精子は、デシケーターなどの保存装置を用いなくても、温度や湿度を一切管理せずに1年以上机の引き出しにしまって保存した後でも、多数の産仔を作出できることが明らかになった。一方、ひび割れなどの破損により空気が混入したガラスアンプル瓶で保存された凍結乾燥精子は、たった数週間のうちに発生率が著しく低下するどころか、顕微授精に使用できないほど凝集してしまうことも明らかとなった。

凍結乾燥精子の室温保存後の劣化に関して、Kanekoらがマウス精子を用いて2005年に発表した3ヶ月間保存の研究結果では、室温で保存した場合に染色体異常を示す精子の割合が増加し、4℃以下で保存した精子は染色体の正常性が維持されることが報告されている⁸⁷。

第1章ではガラスアンプル瓶を用いて、低出産率の改善を目的とし、トレハロースを添加して凍結乾燥精子を作製した。その結果、特に長期室温保存した近交系マウスの凍結乾燥精子の産仔率は、トレハロースの添加によって3倍以上改善できることがわかった。この結果は、たとえ高真空と判定されたガラスアンプル瓶の中で室温保存された精子であっても、保存の間徐々に劣化する可能性を示唆している。

実際、上述の2018年の先行研究では、非破壊検査により高真空と判定されるガラスアンプル瓶を含め、全てのアンプル瓶には、微量の空気が含まれていることを確認している。

以上の既報から、空気は凍結乾燥精子の室温保存成績に大きく影響することが示されている。したがって、凍結乾燥精子を室温でも劣化させることなく長期保存するには、凍結乾燥精子の周りから完全に空気を排除する必要があると考えられた。

また、これまで実験を行っている最中には、不意なガラスアンプル瓶同士の衝突や落下により、ガラスが割れ空気が混入したことで、実験に使えなくなってしまったアンプル瓶が多数存在した。このようにアンプル瓶は衝撃に弱く、空気が混入してしまうと精子を失うことになる。そのため、ガラスアンプル瓶が割れないようにクッション材などで保護するとかさばってしまった。また、ガラスアンプル瓶は、保存する系統や種が増えれば増えるほどかさばってしまった。

以上の理由から、まず割れることなくコンパクトに精子を保存できる方法はないかと考え、凍結乾燥精子をシートのような状態で保存する方法を思いついた。しかし、ガラスアンプル瓶は一切用いずに、凍結乾燥精子を何かに挟んでシート状に保存する方法はこれまでに開発されていなかったため、さまざまな材質を用いて凍結乾燥精子を作製する方法を詳細に検討することにした。

次に、新規に開発したシート保存技術で実際に凍結乾燥精子を保存することで、作製直後から長期保存後にかけて、精子をどれくらいの期間保存できるのか、得られた顕微授精胚の産仔率は保存期間の経過とともに低下するかどうかを検討することにした。

2-2 材料及び方法

2-2-1 マウス

日本エスエルシー株式会社より購入、もしくは自家繁殖により得た ICR 系統と B6C3F1(BCF1)系統のオスマウス、及び ICR 系統のメスマウスを用いた。実験終了後は、全てのマウスを実験に使用したその日のうちに頸椎脱臼もしくは二酸化炭素の吸引により安楽死させた。全ての実験は、「動物の保護及び管理に関する法律」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」および山梨大学の定める規程により設置されている動物実験専門委員会の審査を経たのち、動物愛護と安全について細心の配慮をもって行った。

2-2-2 培地

凍結乾燥処理前の精子の前培養に HTF 培地 (表 1-1) を用いた。CZB 培地や HEPES-CZB 培地の使用については第 1 章を参照。

2-2-3 精子懸濁液の調整

頸椎脱臼したオスマウスから精巣上体尾部を採取した。脂肪や血を除去した後、指でつまみながらハサミで切れ込みを入れ、得られた高濃度の精子液をピンセットで回収し、エッペンドルフチューブに分注した 750 μL の HTF 培地中に懸濁した。37°C、5%CO₂ インキュベーター内で 30 分間～1 時間の前培養を行ったのち、培地中に拡散した精子の濃度および運動性を調べ、上澄み 500 μL を回収し、凍結乾燥処理に用いた。

2-2-4 ガラスアンプル瓶を用いた精子懸濁液の凍結乾燥処理

対照区としてガラスアンプル瓶に分注した精子懸濁液は、ガラスアンプルに 1 本あたり 50 μL ずつ分注した。ガラスアンプル瓶ごと液体窒素に浸し 1 分間の凍結処理を行ったのち、続けて FDU-2200 凍結乾燥機器 (EYELA) の栓を、全ての精子サンプルが完全に乾燥されるまで最低 6 時間開栓しておき、凍結乾燥処理後は、FDU-2200 に取り付けたままガラスアンプル瓶の窪みをガスバーナーで溶接することで封入した (図 1-1a-e)。

ガラスアンプル瓶以外の材質に分注 (滴下) した精子懸濁液は、FreeZone2.5®凍結乾燥機器 (LABCONCO) を用いて、真空乾燥処理した (本章 2-3 結果の項参照)。ガラスアンプル瓶、またはシートに保存した凍結乾燥精子は、実験に使用するまで -30°C または室温で保管した (図 1-1f,g)。解析に用いたガラスアンプル瓶はすべてテスラ陽性のアンプル瓶のみを用いた。

2-2-5 凍結乾燥精子の保存

凍結乾燥精子はシートに挟んだのち、顕微授精に使用するまで、-30°C で 1-3 日、1 週間、1 ヶ月、3 ヶ月間保存し、室温では 1 日、3 日、1 週間保存した。一部の精子シートは、名刺ファイルにしまって保管した (本章 2.4 考察の項参照)。

2-2-6 コメットアッセイ

1 本鎖切断、2 本鎖切断を含む精子 DNA 損傷の検出には、CometAssay® Kit (Trevigen) の使用説明に従ってコメットアッセイ⁸⁹を実施した。保存しておいた凍結乾燥精子はガラスアンプル瓶、またはシートの開封直後に加水し、低融点ゲル中に懸濁した。ガラスアンプル瓶とシートでそれぞれ保存した精子を懸濁したゲルは、同一スライド上に塗布し、20 分間の Lysis 処理と 40 分間の NaOH 処理に続け、25 V で 5 分間の電気泳動を TBE 溶液中で行った。電気泳動した精子 DNA は 5 分間エタノール固定し、風乾した。コメットテールの計測は、SYBR Green (タカラバイオ) を滴下したのち、落射蛍光光学顕微鏡 BX51 (オリンパス) と cellSens standard ソフト (オリンパス) を用いて実施した。実験は 3 回繰り返す、1 回につき 100-300 匹程度程度の精子 DNA を測定し、測定したコメットテールの長さは相対値として、ガラスアンプル群の平均測定値から実験回ごとに算出した。

2-2-7 γ -H2A.x 染色

胚操作は、第1章と同様の手順により行った。1次抗体には anti-phospho-H2AX (Ser139) rabbit polyclonal antibody (Millipore-Merck) および anti-histone H3 (dimethyl K9) mouse monoclonal antibody (Abcam) を使用した。翌日、胚を1次抗体液から洗い、ブロッキングバッファーで500倍希釈した2次抗体溶液中に45分浸漬した。2次抗体には、Alexa Fluor Cy5-labeled goat anti-rabbit IgG (Abcam、カタログ番号：Ab97077) 及び Alexa Fluor 568-labeled goat anti-mouse IgG (Molecular Probes、カタログ番号：A-11004) を用いた。DNAは2 µg/mLのDAPI (Molecular Probes) で染色した。胚の蛍光観察には共焦点顕微鏡 FV1000 (オリンパス) を用いた。前核内の点の数を計測するのは難しいため、雄性前核全体の輝度をImage-Jで測定し、胚の細胞質の輝度を差し引いた値を結果に用いた。実験は3回繰り返した。

2-2-8 帝王切開後に蘇生した仔マウスの飼育

得られた産仔の一部は、ホスターマザーにつけ、成長の様子を観察した。

2-2-9 統計処理

コメントアッセイ及び γ -H2A.x染色の結果は、Wilcoxon-Mann-Whitney nonparametric 試験により解析した。受精率、胚盤胞期まで体外培養した発生率、移植後の産仔率はカイ二乗検定により評価した。p値が0.01未満の場合、統計的に有意な差が認められることとした。

卵子の用意、顕微授精、胚培養及び卵管移植は、第1章と同様に実施した。

2-3 結果

はじめに、ガラスアンプル瓶を使わずに、精子懸濁液を凍結し、真空乾燥処理する方法について、以下の作業工程を確立した。

精子懸濁液の凍結処理は、発泡スチロールに浸んだ液体窒素の液面で行うため、凍結作業を行うための土台として、液体窒素が入り込まないように4辺を立てたアルミの船を作製した(図2-1a)。次に精子懸濁液を滴下するための材質(例:葉包紙)と、接着剤が塗布されていないほうのラミネート(プラスチック)シートはそれぞれ約15mm四方と10cm四方になるように必要な枚数を切り分けておく(図2-1b,c)。各部品はそれぞれ液体窒素の液面から、アルミの船、プラスチックシート、精子の受け皿とする材質、の順に置き、数分間発泡スチロール内の液体窒素の気相で冷却した(図2-1d)。プラスチックシートは、アルミの船と受け皿とする材質の間に置くことで、凍結処理中の精子懸濁液の冷却効率が低下することが想定されたが、アルミの船と精子懸濁液の貼りつきや真空乾燥処理からラミネートまでの作業効率を考慮した結果、凍結処理の開始時点ですでに設置しておくことにした。凍結処理後、前培養を行った精子懸濁液を50 μ Lずつ滴下し(図2-1e)、そのまま10分間静置した。凍結した精子懸濁液はアルミの船ごと即座に真空乾燥機(FreeZone2.5®)に移動させ、真空乾燥処理を6時間行った(庫内圧力:0.100mBar、温度:-50°C)(図2-2a-d)。受け皿に滴下した精子懸濁液は、凍結処理直後は表面に光沢が見られ(図2-2e)、真空乾燥処理後は粉状の見た目に変化した(図2-2f)。

真空乾燥機の真空状態を解除した後、凍結乾燥精子はプラスチックシートに乗せたまま急いで真空乾燥機から取り出し(図2-3a)、上からもう1枚の材質(例:葉包紙)を被せ、ピンセットを使って潰してペレット状に加工し(図2-3b)、さらにその上からあらかじめ接着剤が塗布されているラミネートシートを、できるだけ空気を除きながら貼り合わせた(図2-3c,d)。凍結乾燥精子の吸湿性は非常に高かったため、図2-3の作業工程はできる限り短時間で円滑に行うように配慮した。

シートに挟んだ凍結乾燥精子を実験に使用する際は、受け皿に使用した材質部分を切ることでラミネートシートを開封し(図2-4a-c)、ペレットをピンセットでつまみ上げ、エッペンドルフチューブ中の50 μ Lの蒸留水で加水した(図2-4d)。

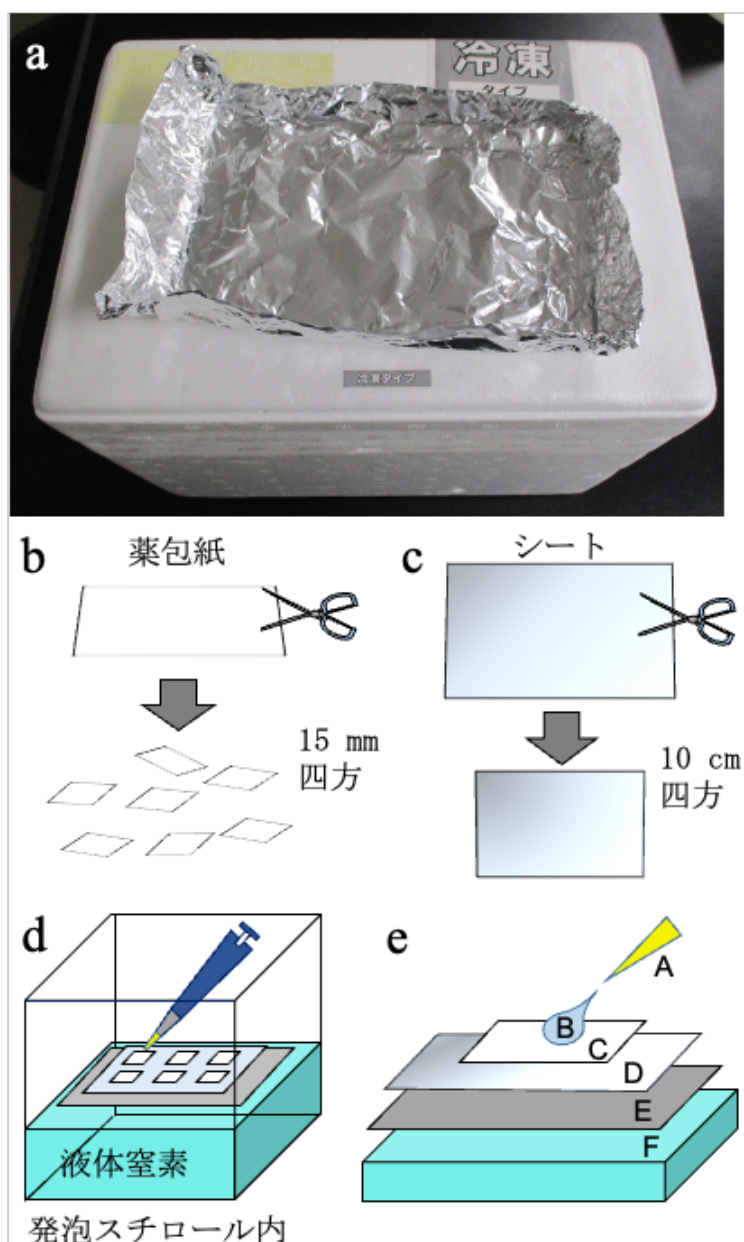


図2-1 ガラスアンプル瓶を用いない精子懸濁液の凍結方法

(a) 実験に使用した発泡スチロールの箱とアルミホイル製の船。(b) 精子の受け皿とする材質（例:薬包紙）は1.5 cm 四方に切った。(c) 精子の受け皿とする材質を乗せるためのプラスチックシートは10 cm 四方に切った。(d) 精子懸濁液の凍結処理は、発泡スチロールに浸んだ液体窒素の液面で行った。(e) A ピペットマンを用いて、B 50 μ L の精子懸濁液を薬包紙の上に滴下した。発泡スチロール内は、C 薬包紙、D プラスチックシート、E アルミホイル（船）、F 液体窒素の順に配置した。



図 2-2 凍結精子の真空乾燥処理

(a) LABCONCO 社の FreeZone2.5® を本実験に使用した。(b) 凍結処理した精子懸濁液はアルミの船に乗せたまま運び、(c) 直ちに蓋をかぶせ、(d) -50°C、0.100 mBar に庫内を設定し、6 時間真空乾燥処理を行なった。(e) 凍結した精子懸濁液は乾燥前に表面に光沢が見える。(f) 凍結した精子懸濁液は真空乾燥処理を経て次第に粉状へと変化する。

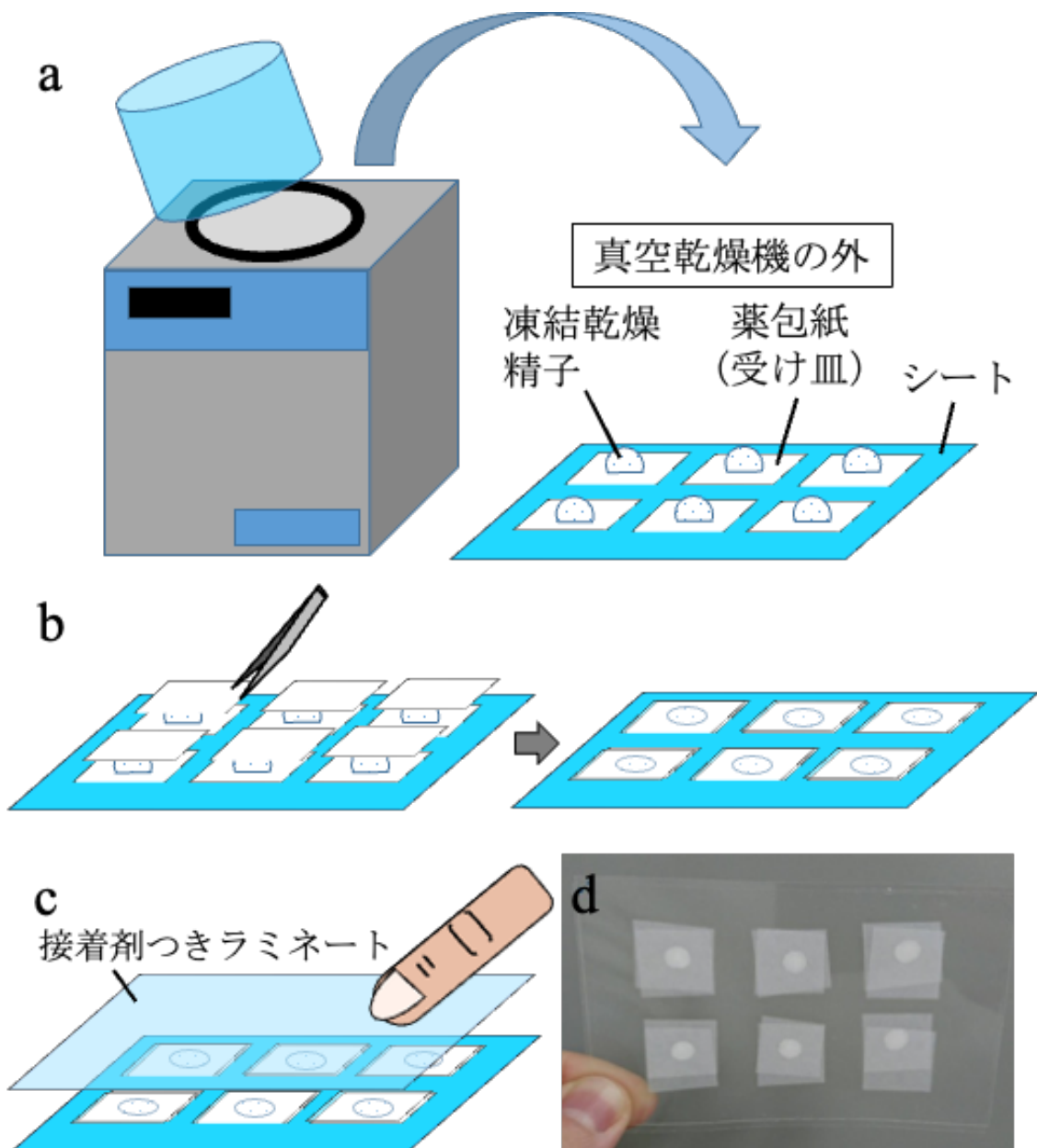


図2-3 凍結乾燥処理後の精子のシート保存方法

(a) 凍結乾燥精子はシートの上に乗せたまま真空乾燥機から取り出した。(b) 凍結乾燥精子が飛散しないように、薬包紙など受け皿として使用したものと同じ材質を上から被せる。(c) 接着剤が塗布されているほうのラミネートシートを静電気に気をつけながら貼り合わせる。空気がシートの間や凍結乾燥精子の周りに残らないように、指で端から貼り合わせるようにする。(d) 凍結乾燥精子をシートに挟んだ様子。

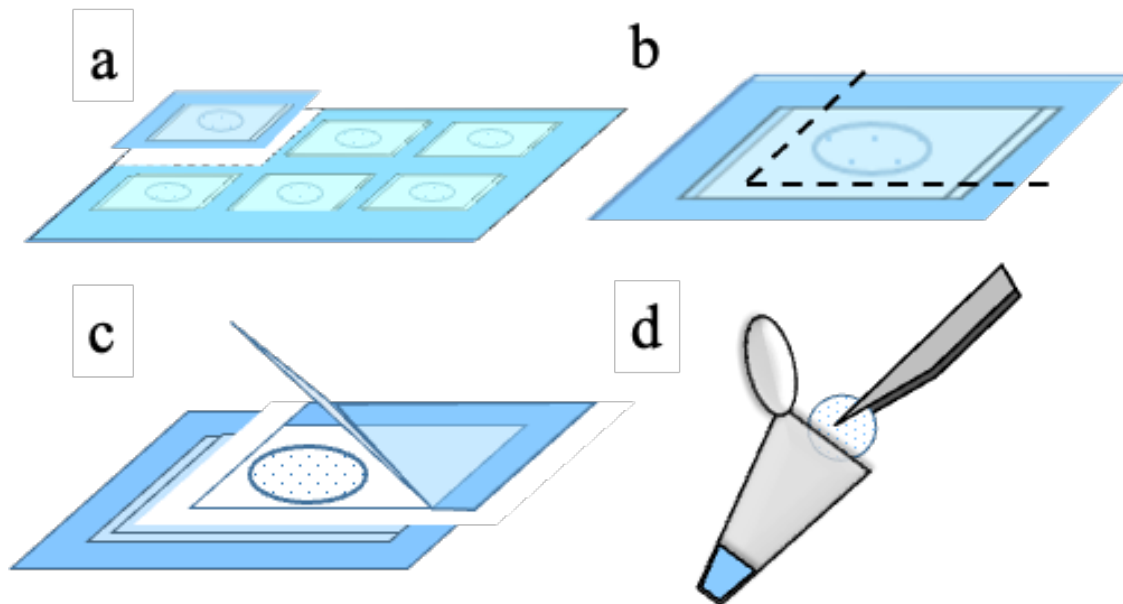


図2-4 シート保存した凍結乾燥精子の加水方法

(a) 精子を挟んでいる部分をシートから必要数だけ切り離す。(b) 精子の周りのシートを切り離す。(c) シートを開き、凍結乾燥精子のペレットを露出させる。(d) 露出した精子ペレットをピンセットで回収し、加水する。

2-3-1 材質の違いによる精子回収率

精子懸濁液を滴下する際に使用する受け皿には、どのような材質が最も適しているのかを決定するために、薬包紙のほか、サランラップ、ビニールシート、和紙、濾紙、オブラートをを用いて、凍結乾燥精子を作製し、作りやすさや保存後の精子の回収率を評価した。その結果、濾紙は精子がこびりついて回収することができなかった。オブラートは加水後に精子を確認することができたが、顕微授精を行うにはオブラートそのものの溶け残りが非常に多く、精子を回収することができなかった。以上の理由から、濾紙とオブラートは使用不可と判定した（表2-1）。薬包紙、サランラップ、ビニールシート、和紙では、加水後に精子を回収することに成功したが、作りやすさや精子の回収のしやすさを総合的に評価した結果、薬包紙と和紙が最も扱いやすかった。

表2-1 材質ごとの凍結乾燥処理の行いやすさと加水後の精子回収効率

試した 材質	調査項目							“Yes” 該当数 (7)	扱い やすさの 総合評価
	作製工程				5. ペレ ットは 回収可 能	加水後			
	1. 破れ にくい	2. 扱い やすい	3. 見逃 さない	4. 凍結 ドロツ プが滑 らない		6. ゴミ が 少ない	7. 顕微 授精し やすい		
和紙	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	6	最良
ラップ	No	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes	4	良
ビニール	Yes	Yes	No	No	Yes	Yes	Yes	5	可
薬包紙	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	7	最良
ろ紙	Yes	Yes	Yes	Yes	No	N.D.	N.D.	4	使用不可
オプ ラート	No	No	No	Yes	No	No	N.D.	1	使用不可
アンプル 瓶	-	-	-	-	Yes	-	-	-	コント ロール

2-3-2 材質ごとの1ヶ月保存後の発生率

精子を回収できた4つの材質について、保存における適性を調べるために、精子を-30℃で1ヶ月間保存したのち顕微授精を行い、得られた胚の発生率を比較した。その結果、4-8細胞期までの発生率には材質ごとに差がみられなかったが、胚盤胞率や産仔率は薬包紙を用いた場合に最も高く、ガラスアンプル瓶で作製した凍結乾燥精子と同程度の成績であった（胚盤胞率：ガラスアンプル瓶57% vs 薬包紙41%、産仔率：ガラスアンプル瓶24% vs. 薬包紙21%）（表2-2、2-3）

表2-2 1ヶ月間-30°Cで保存した精子の顕微授精後の発生率

材質	供試卵数	受精卵数 (%)	各ステージへの胚発生数		
			2細胞期 (%)	4-8細胞期 (%)	桑実期/ 胚盤胞期 (%)
和紙	41	38 (93)	24 (63)	24 (63)	9 (24)
サランラップ	84	75 (89)	55 (73)	38 (51)	22 (29)
ビニールシート	63	60 (95)	52 (87)*	22 (37)	18 (30)
薬包紙	148	116 (78)	88 (76)	68 (59)	47 (41)
コントロール (アンプル瓶)	57	46 (81)	34 (74)	28 (61)	26 (57)

受精率は、供試卵数に対する受精卵数の割合を表す。

各ステージへの胚発生率は、受精卵数を母数として算出した。

*: コントロール区の成績に対し有意な差があることを示す (p<0.01)。

表2-3 1ヶ月間-30°Cで保存した精子の顕微授精後の産仔率

材質	供試卵数	受精卵数 (%)	2細胞期胚数 (%)	移植胚数 (レシピエントの匹数)	産仔数 (%)
和紙	92	87 (95)	60 (69)	60 (4)	5 (8)
サランラップ	75	69 (92)	61 (88)	61 (4)	6 (10)
ビニールシート	106	87 (82)	78 (90)	78 (6)	16 (21)
薬包紙	69	59 (86)	48 (81)	48 (4)	10 (21)
コントロール (アンプル瓶)	76	63 (83)	51 (81)	51 (3)	12 (24)

受精率は、供試卵数に対する受精卵数の割合を表す。

2細胞期への胚発生率は、受精卵数を母数として算出した。

産仔率は、移植胚数に対する産仔数の割合を表す。

2-3-3 薬包紙の上で凍結乾燥処理した精子の DNA 損傷率

薬包紙を精子懸濁液の受け皿にして作製した凍結乾燥精子について、さらに詳しく質を評価するために、凍結乾燥処理の翌日に、精子の DNA 損傷率をガラスアンプル瓶で作製した凍結乾燥精子の DNA と比較した。

コメットアッセイの結果は、薬包紙で作製した凍結乾燥精子のほうが、統計処理において有意な差はあったがわずかにコメットテールの相対値が増加した（ガラスアンプル瓶、計測精子数：781、相対値：1.00 vs. 薬包紙、計測精子数：762、相対値：1.04）（表 2-4、図 2-5 a-c）。

一方、 γ -H2A.x 染色の結果は、薬包紙で作製した凍結乾燥精子の雄性前核の輝度は、ガラスアンプル瓶で作製した凍結乾燥精子と比べ低下した（ガラスアンプル瓶、計測胚数：16、平均輝度：0.72 vs. 薬包紙、計測胚数：25、平均輝度：0.44）（表 2-5、図 2-5 d-f）。

以上の結果から、薬包紙を用いた場合に、ガラスアンプル瓶を用いて作製した凍結乾燥精子と同程度の質の凍結乾燥精子を作製することに成功した。

また 2-3-1、2-3-2、2-3-3 の結果より、精子懸濁液の受け皿には薬包紙が最適であると決定した。

表2-4 ガラスアンプル瓶と薬包紙でそれぞれ作製した凍結乾燥精子のコメットアッセイ

材質	測定精子数	コメットテールの 平均値	SD	p 値
コントロール (アンプル瓶)	781	1.00	±0.10	-
シート	762	1.04	±0.08	<0.01

表 2-5 ガラスアンプル瓶と薬包紙でそれぞれ作製した凍結乾燥精子の顕微受精後の γ -H2A.x 染色

材質	供試 前核期胚数	雄性前核輝度		p 値
		最小値-最大値	平均値	
コントロール (アンプル瓶)	16	0.31-1.35	0.72	-
シート	25	0.11-1.37	0.44	0.0113

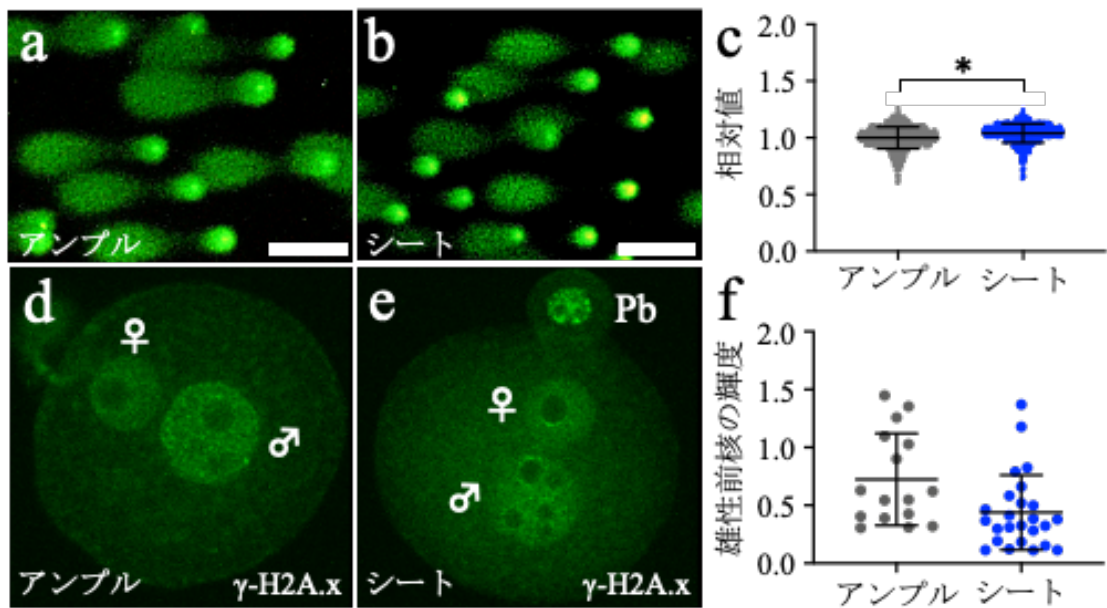


図2-5 ガラスアンプル瓶とシートでそれぞれ作製した凍結乾燥精子のDNA 損傷

(a) ガラスアンプル瓶を用いて作製した凍結乾燥精子と、(b) シートを用いて作製した凍結乾燥精子のコメットアッセイの撮影画像。スケールバー：100 μm 。(c) グレーのプロットはガラスアンプル瓶で作製した凍結乾燥精子のコメットテールの定量値を示す。青のプロットはシートで作製した凍結乾燥精子のコメットテールの定量値を示す。*: $p < 0.01$ 。(d) ガラスアンプル瓶を用いて作製した凍結乾燥精子を顕微授精した前核期胚と、(e) シートを用いて作製した凍結乾燥精子を顕微授精した前核期胚の撮影画像。Pb: Polar body。(f) グレーのプロットはガラスアンプル瓶で作製した凍結乾燥精子由来の雄性前核の輝度を示す。青のプロットはシートで作製した凍結乾燥精子由来の雄性前核の輝度を示す。

2-3-4 シート保存した凍結乾燥精子の保存期間の経過に伴う発生率の推移

シート（薬包紙とラミネートシートを使用して作製）に挟んで1-3日、1週間、1ヶ月、3ヶ月間保存しておいた凍結乾燥精子について、それぞれ加水後に顕微授精に利用することができ、全ての保存期間において黒目の産仔を得ることに成功した（表2-6、図2-6 a, b）。また、得られた産仔のなかからランダムに選出したマウスは正常に成長し、繁殖能に問題はなく、生まれてきた次世代も健康であった（図2-6 c, d）。以上の結果から、凍結乾燥精子は -30°C であれば、少なくとも3ヶ月間は顕微授精後の発生能を損なうことなく、シートで保存できることが分かった。

次に1日、3日、1週間それぞれ室温でシート保存した凍結乾燥精子について、いずれの保存期間においても加水後に精子を回収でき、顕微授精胚を作出することができた。ところが、受精率及び2細胞期までの発生率は、保存期間が長くなるにつれ低下した（表2-7）。最長3日間室温でシート保存した精子から産仔を作出することに成功したが、1週間室温保存した精子からは産仔が得られなかった。

表 2-6 -30°Cでシート保存した凍結乾燥精子の産仔率

保存期間	供試卵数	受精卵数 (%)	2細胞期胚数 (%)	移植胚数 (レシピエントの匹数)	産仔数 (%)
1-3 日	151	128 (85)	118 (92)	118 (7)	12 (14)
1 週間	147	126 (86)	116 (92)	116 (8)	2 (2)*
1 ヶ月	203	145 (71)*	98 (68)*	98 (6)	14 (14)
3 ヶ月	182	145 (80)	128 (88)	128 (7)	10 (8)

受精率は、供試卵数に対する受精卵数の割合を表す。

2細胞期への胚発生率は、受精卵数を母数として算出した。

産仔率は、移植胚数に対する産仔数の割合を表す。

*: 各列において、1-3 日間の保存区の成績に対しそれぞれ有意な差があることを示す ($p < 0.01$)。

表 2-7 室温でシート保存した凍結乾燥精子の産仔率

保存期間	供試卵数	受精卵数 (%)	2細胞期胚数 (%)	移植胚数 (レシピエントの匹数)	産仔数 (%)
1日	194	165 (85)	139 (84)	139 (7)	10 (7)
3日	167	140 (84)	100 (71)*	100 (5)	5 (5)
1週間	186	114 (61)*	66 (58)*	66 (3)	0 (0)

受精率は、供試卵数に対する受精卵数の割合を表す。

2細胞期への胚発生率は、受精卵数を母数として算出した。

産仔率は、移植胚数に対する産仔数の割合を表す。

*: 各列において、1日保存区の成績に対しそれぞれ有意な差があることを示す ($p < 0.01$)。

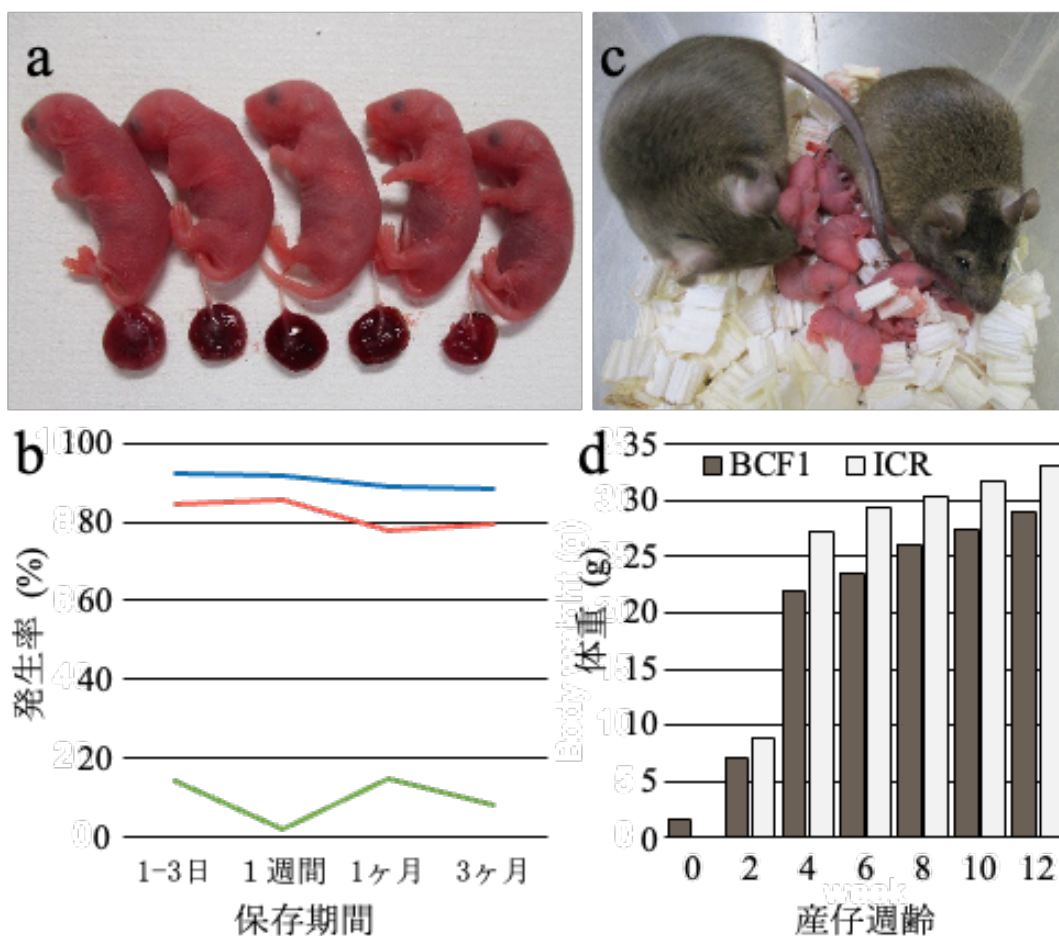


図2-6 シート保存した凍結乾燥精子から得られた産仔およびその次世代 (a) 1ヶ月間-30°Cでシート保存したBCF1系統の凍結乾燥精子から得られた産仔。(b) 得られた産仔は発育後、正常に繁殖した。(c) 保存期間の経過に伴う発生率の推移を示す。赤線は受精率、青線は2細胞期への発生率、緑線は産仔率をそれぞれ表す。(d) 得られた産仔の週齢ごとの体重平均の増加を示す。

2-4 考察

本章で検討した材質のうち、最も凍結乾燥処理が行いやすく、顕微授精後の発生率が高い材質は薬包紙であった(表2-1)。薬包紙はもともと試薬の計量に最適に製造されているため、細かな作業を行っても破れることなく、また作製した凍結乾燥精子が簡単に剥がれ回収することができた。また、静電気が発生しにくく、また凍結した精子懸濁液が滑らない点でも、凍結乾燥の一連の作業工程やラミネートに挟む作業が行いやすかった。これらの点は、今回試した材質のうちで繊維状の材質であった和紙と薬包紙の両者に当てはまった。しかし薬包紙と和紙を比較した場合、吸水性は和紙の方が高いため、凍結乾燥処理後に大気中に取り出した際に水分を和紙は多く含んでしまい、精子が劣化し、顕微授精後の発生率が低下したと考えた。また、一般的な研究室において薬包紙は和紙よりも広く普及しているため、精子の受け皿として最適な材質は薬包紙であると判断した。

ガラスアンプル瓶を用いて凍結乾燥精子を室温保存する場合、高真空状態が保たれたアンプル瓶であれば1年以上保存した精子であっても多数の産仔を得られるが、微かでも破損し空気が混入したアンプル瓶で保存された精子の質は著しく低下することから、空気や水分の混入は精子の室温保存成績を低下させる。ガラスアンプル瓶で精子懸濁液を凍結乾燥処理した後は、ガラスアンプル瓶の口を真空乾燥機に取り付けたままアンプル瓶の窪みをバーナーで熱し溶接するため、精子は凍結乾燥処理後、空気に触れることなく保存される。一方、薬包紙の上で精子懸濁液を凍結乾燥処理した後は、凍結乾燥精子の粉は薬包紙の上に乗ったまま、真空乾燥機の外に運び出し、大気中でラミネートシートの中に挟まれるため、凍結乾燥精子は空気と一緒にシートで保存される(図2-3)。そのため室温保存では精子の劣化が進みやすく、室温での保存期間が長くなるにつれ、顕微授精後の発生率は低下してしまったのに対し、 -30°C 保存であれば精子の劣化は進みにくく^{87,90}、3ヶ月間保存しても受精率や2細胞期への発生率、産仔率が低下しなかったと考える(表2-6、2-7)。ラミネートシートの中に含まれた空気量について、精子懸濁液の受け皿として使用した材質のうち、サランラップや薬包紙の発生率が高かった理由として、両者は今回使用した材質の中で最も薄い材質であったため、ラミネートを貼り合わせた時に生じる隙間の体積が小さくなり、発生率が最も高くなった可能性が考えられる。また、今回使用した薬包紙やラミネートは、 -30°C 保存であれば精子や卵子に対し毒性を示さないといえる。

ガラスアンプル瓶とシートでそれぞれ作製した凍結乾燥精子のDNA損傷率や顕微授精後の発生率は同程度であった(図2-5、表2-2、2-3、2-4、2-5)。特にガラスアンプル瓶に分注して作製しても、シートの上で作製しても、精子は凍結乾燥後には死んでしまう。この理由について、作業工程は異なるが、凍結乾燥の原理は同じであり、まず液体窒素で凍結処理を行う(ガラスアンプル瓶:液相で1分間、シート:液面、気相で10分間)。一般的な精子の凍結処理であれば、不凍剤など凍結保護剤を使うことで細胞は保護されるが、その多くは乾燥しないため、凍結乾燥処理に用いることはできない。第1章ではトレハロースによる産仔率の改善を試みたが、凍結乾燥直後の著しい産仔率の低下を防ぐことはできなかった。そのため、精子懸濁液は最適な保護剤が添加されないまま、室温から液体窒素温度まで冷却されることで、ガラスアンプル瓶とシートを用いたそれぞれの方法どちらにおいても、氷晶が形成し精子の細胞膜や核が損傷を受けていると考えられる^{39,108}。次に乾燥処理について、同程度の真空度の乾燥機で昇華による6時間の真空乾燥処理を行なった(ガラスアンプル瓶に用いたFDU2200内:約50 pa、シートに用いたFreeZone2.5内:約0.100 mBar)。乾燥条件の違いは、精子核の保存状態に影響することが明らかになっている⁵⁷。しかし、ガラスアンプル瓶とシートを用いた場合のそれぞれの方法では、真空乾燥機のチャンバー温度や凍結した精子懸濁液の暴露面積は異なるが、凍結乾燥精子の質には違いがなかったため、凍結精子が乾燥処理によってダメージを受ける原因は、チャンバー温度や暴露面積に伴う乾燥スピード以外にあり、結果として同程度のダメージ

が精子に及んだと推測される。以上の理由から、氷晶の抑制効果があり、乾燥できる試薬を見つけ出すか、段階的な温度下降方法の決定など、まずは乾燥処理を見据えた凍結処理方法の見直しが必要であり、精子の乾燥処理条件については、凍結処理条件と同様に詳細に検討する価値が十分にあると考えられる。

一方、本章ではシートで保存した ICR 及び BCF1 系統のオスマウスの凍結乾燥精子から産仔を得ることに成功した (図 2-6a)。少なくとも 3 ヶ月間は、発生率が低下することなく精子を保存できたため (図 2-6c、表 2-6)、凍結乾燥精子のシート保存技術は、複数系統のマウス精子に利用できる可能性がある。名刺ファイルなどに入れて保管しておく (図 2-7) ことで、何種類もの凍結乾燥精子が、従来のガラスアンプル瓶よりもコンパクトに保存できるようになるだろう。次章では、本技術の実用性を高めるための実験を行うこととした。



図2-7 シート保存した凍結乾燥精子の保管例

(a) 多数の精子シートを1冊の名刺ファイルに入れ、シート精子をアルバムのように保管する様子。(b) この方法は、冷凍庫や保管庫にしまって、コンパクトに精子を保存することができる。

第3章

室温での精子シート保存技術の実用化に向けた試み

3-1 序論

精子の長期保存において現在最も広く利用されている凍結保存技術は、主に液体窒素を利用するため、維持費用の負担やタンクを設置する場所及び安全な作業スペースの確保、液体窒素が枯渇してしまうリスクへの懸念など、解決すべき多くの課題が残る⁷¹⁾ため、精子の室温保存技術の実用化が待望されている。その候補のひとつとして、精子の乾燥保存技術があり、2年間室温保存したマウス精子から個体が作出された例が報告されている⁶⁾。これらの乾燥保存技術は、精子を室温で保存できるため、液体窒素をはじめとした低温環境を確保しなければならないという課題は解決できるのだが、塩化リチウム瓶などの特殊な保存設備や保存環境を整備しなければならない。一方、精子の凍結乾燥保存技術⁶⁹⁾は、長さ6 cm程度の小さなガラスアンプル瓶を高真空に保つことで、机の引き出しでも精子を1年以上保存できる⁹⁾。しかし、凍結乾燥精子は新鮮精子と比べ産仔率が著しく低下してしまう。また、ガラスアンプル瓶は衝撃が加わることで破れる可能性があり、空気や水分が混入すると精子は保存できなくなってしまう。

第1章において、0.5 M トレハロースは、特に長期室温保存した近交系マウスの凍結乾燥精子の産仔率を改善できることを明らかにした。この結果は、非破壊検査（テスラコイルリークディテクター）により高真空と判定されたアンプル瓶であったとしても、その中に残存した微量の空気や水分が凍結乾燥精子の劣化を招く可能性があることを示唆した。そこで第2章では、ガラスアンプル瓶を一切使わずに、保存スペースから空気を除去して薬包紙とラミネートシートの上に凍結乾燥精子を挟んで保存する方法の開発を試みた。その結果、シートに挟んで保存した精子は、ガラスアンプル瓶で作製した凍結乾燥精子と比較して、精子 DNA の損傷率や発生率に低下がみられず、 -30°C で3ヶ月間、室温では3日間保存できることがわかった。

また保存された精子は、畜産現場では農協から農家へ運ばれたのち人工授精に用いられるほか、研究室間では共同研究や依頼実験が行われる際に輸送されている。そのため、精子の輸送技術は、世界中で保存技術と同様に常に求められる方法である⁷¹⁾。だが凍結保存された精子は、たった数本のストローで運ぶためにも液体窒素が必要なため、ドライシッパーなどの容器や専門の運搬業者を手配する必要があり、輸送費や手間がかかっているほか、液体窒素が枯渇しないようにするには細心の注意が必要である。凍結乾燥精子は室温保存が可能で、ガラスアンプル瓶は小さいが、割れないようにするためにクッション材を使うとかさばってしまう。

以上を踏まえ、本章ではまず、凍結乾燥精子のシート保存技術が、液体窒素などを一切利用せずに、はがきに貼り付けるだけの簡便で安価な精子の一般郵便に応用できるかどうかを検討することにした。和牛の精子をはじめ、国際間の生物資料の運搬には規制がかかることが多く、日数もかかるが、国内の輸送であれば数日以内に配送や運搬が完了するため、まずは国内の輸送を行うことにした。

ところが第2章で作製した精子のシートは、室温保存期間は3日間が限界で、1週間保存した精子からは産仔は得られなかった。この原因は、凍結乾燥精子をシートに挟む際に大気中に取り出すため、その際に微量の空気や水分が取り込まれてしまうためであると考えた。

そこで本章では、第1章で発見した、0.5 M トレハロースの添加による室温保存成績の改善効果を第2章で開発したシート保存へ応用することによって、シートでの室温保存期間の長期化を試みた。またプラスチックシートの種類の再検討と、脱酸素剤や除湿剤の利用を試みることによって、凍結乾燥精子をシートで長期間室温保存できる方法の確立を試みた。

3-2 材料及び方法

3-2-1 マウス

ICR 系統は、自家繁殖により得たオスマウスと日本エスエルシー株式会社より購入したメスマウスをそれぞれ用いた。BCF1、B6N、およびC3H/He 系統のオスマウスはそれぞれ日本エスエルシー株式会社より購入し、凍結乾燥精子の作製に用いた。実験終了後は、全てのマウスを実験に使用したその日のうちに頸椎脱臼もしくは二酸化炭素の吸引により安楽死させた。全ての実験は、「動物の保護及び管理に関する法律」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」および山梨大学の定める規程により設置されている動物実験専門委員会の審査を経たのち、動物愛護と安全について細心の配慮をもって行った。

3-2-2 凍結乾燥精子の作製

採精は第1章及び第2章に準じて実施した。精子は、37°C、5%CO₂ インキュベーター内で30分間～1時間の前培養を行い、HTF 培地中に拡散した精子の濃度および運動性を調べたのち、第2章に準じて薬包紙1枚につき50 µL を滴下して凍結乾燥処理した。0.5 M トレハロースを含むHTF 培地を使用する場合は前培養後、上澄み500 µL を回収し、5,000 rpm で10分間遠心処理を行った後、上清を取り除き、精子のペレットを500 µL のHTF 培地 (0.5 M トレハロースを含む) に懸濁させ、薬包紙1枚につき50 µL を滴下した。

3-2-3 精子の郵送

凍結乾燥精子は作製後、GBC アコブランズジャパン社製のラミネートシートに挟んだのち、郵送するまで-30°Cで保存した。郵送当日、シートに挟んだ凍結乾燥精子は-30°C冷凍庫から取り出し、ハガキに貼り付けるか封筒に入れ、ポストに投函した (図3-1 a, b)。郵送は2区間を実施し、山梨大学付近の郵便ポストから山梨大学までを配達した区間と、東京大学柏キャンパス内の郵便ポストから山梨大学までを配達した区間を設けた。投函から到着までは、すべて2日以内に完了した。配達された精子は、顕微授精に使用するまで再度-30°Cで保存した。また、対照区に用いた精子は、郵送と同期間中、郵送は行わずに研究室にて室温保存し、郵送区精子と同時に-30°Cに戻し、顕微授精に使用するまで保存した。

3-2-4 プラスチックシート

プラスチックシートの検討実験 (本章結果3-3-2 参照) では、ラミネートタイプのシート2種類 (GBC アコブランズジャパン社製1種類、及びナカバヤシ社製1種類) と、嫌気パウチ (三菱ガス化学社製) のもの、計3種類を用いた (図3-1c)。

3-2-5 シート中への凍結乾燥精子の挟み方

ラミネートタイプのシートを用いた場合は、凍結乾燥精子を真空環境下でラミネートに挟むために、真空乾燥機内にあらかじめ接着剤が塗布されたラミネートを凍結精子の上に乗せた状態で真空乾燥処理を行い、内蓋を下降させラミネートを接着させたのち凍結乾燥精子をシートに挟んだ状態で真空乾燥機から取り出すことで、凍結乾燥精子が空気に触れることなくラミネートに挟まるようにした。凍結乾燥処理後は-30°Cもしくは室温で保存した。

パウチタイプのシートを用いた場合は、凍結乾燥処理後、精子を一度大気中に取り出した後、ただちにパウチの中に入れ、業務用卓上密封包装機 (旭化成パックス株式会社) に取り付け脱気しながらパウチをシーリングし、そのまま室温で保存した。対照区に用いる精子は、-30°Cで室温保存区と同期間保存した。

3-2-6 脱酸素剤と除湿剤

脱酸素剤は「アネロパウチ」 (三菱ガス化学)、除湿剤は「合成ゼオライト」板状強力乾燥剤 (アズワン) をそれぞれ用いた。両者は、精子の凍結乾燥処理後、適当なサイズに調整した嫌気パウチの中に、いずれか

1 個のみ、もしくは同時に1 個ずつ入れ、すぐに業務用卓上密封包装機に取り付け脱気しながらパウチをシーリングし、凍結乾燥精子と一緒に保存した（図3-1d）。

3-2-7 凍結乾燥精子の切り離し

脱酸素剤と除湿剤を入れて保存した凍結乾燥精子を切り離す場合は、脱気は行わずに嫌気パウチをシーリングし、数日間置いたのち、業務用卓上密封包装機のシーリング機能のみを利用して精子が入った空間の周りを溶接し、ハサミで切り取ってそのまま保存した（図3-1e）。

3-2-8 統計処理

受精率、胚盤胞期まで体外培養した発生率、移植後の産仔率はカイ二乗検定により評価し、p 値が 0.01 未満の場合、統計的に有意な差が認められることとした。

凍結乾燥精子の加水、卵子の用意、顕微授精、胚培養、胚移植及び帝王切開については前章を参照。

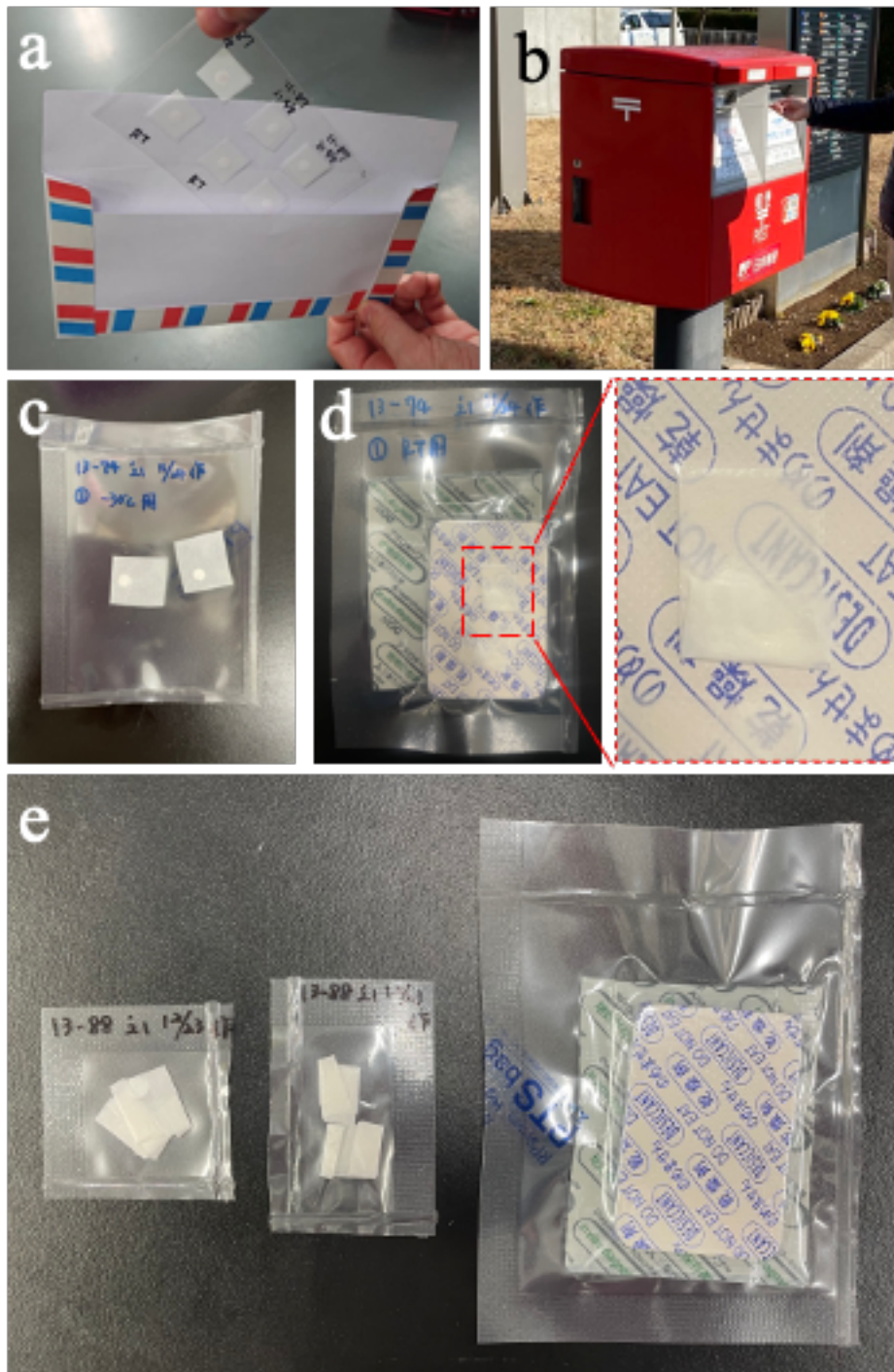


図3-1 シート保存した凍結乾燥精子を室温で保存する様子

(a) 精子を挟んで保存しているシートは、はがきに貼り付けたり、封筒に入れたりすることができる。(b) シート保存した精子を貼り付けたはがきをポストに投函した。(c) パウチタイプのプラスチックシートで凍結乾燥精子を保存する様子。(d) 凍結乾燥精子を脱酸素剤と除湿剤と一緒にに入れて保存した様子。(e) 数日間の室温保存後、精子が包まれた薬包紙は脱酸素剤と除湿剤から切り離して保存した。

3-3 結果

3-3-1 シートをはがきに貼り付けて郵便配達した精子からの個体作出

対照区の受精率は77%(受精卵数/供試卵数、78/101)、2細胞期までの発生率は81%(2細胞期胚数/受精卵数、63/78)、産仔率は3%(産仔数/移植胚数、2/63)であった。山梨県内を郵送した精子の受精率は73%(77/106)、2細胞期までの発生率は66%(51/77)、産仔率は4%(2/51)であった。さらに、千葉県から山梨県まで県をまたいで郵送した精子の受精率は76%(76/100)、2細胞期までの発生率は79%(60/76)、産仔率は7%(4/60)であった。以上の結果から、郵送した精子から発生率が低下することなく産仔が得られ、精子のシート保存技術は、ポストへの投函を介した簡便な一般郵便に応用できることがわかった(表3-1)。また、得られた仔をランダムに選出し交配させると、健康な産仔が多数生まれ、繁殖能に問題がないことを確認した。

表 3-1 一般郵便で国内輸送した凍結乾燥精子の産仔率

郵送	供試卵数	受精卵数 (%)	2細胞期胚数 (%)	移植胚数 (レシピエントの匹数)	産仔数 (%)
なし	106	77 (73)	51 (66)	51 (3)	2 (4)
山梨県内	100	76 (76)	60 (79)	60 (4)	4 (7)
千葉-山梨	101	78 (77)	63 (81)	63 (5)	2 (3)

受精率は、供試卵数に対する受精卵数の割合を表す。

2細胞期への胚発生率は、受精卵数を母数として算出した。

産仔率は、移植胚数に対する産仔数の割合を表す。

3-3-2 シートの種類の違いによる1週間の室温保存後の発生率

3種類のプラスチックシートでそれぞれ保存したICR系統の凍結乾燥精子について、 -30°C で1週間保存した場合、顕微授精胚の発生率は発生ステージによらず差がなかった。ところが、1週間の室温保存を行なった場合、どのシートを使っても発生率は著しく低下した(表3-2)。以上の結果から、凍結乾燥精子は、真空環境下でシーリングしたとしても、シートの種類を変更するだけではシートで室温保存できないことがわかった。

表 3-2 異なるプラスチックシートで1週間室温保存した凍結乾燥精子の発生率

シート	保存 温度	供試 卵数	受精卵数 (%)	各ステージへの胚発生数		
				2細胞期 (%)	4-8細胞期 (%)	桑実期/ 胚盤胞期 (%)
ラミネートA	-30°C	42	39 (93)	37 (95)	30 (77)	22 (56)
	室温	58	21 (36)*	14 (67)*	9 (43)*	4 (19)*
ラミネートB	-30°C	25	24 (96)	19 (79)	14 (58)	13 (54)
	室温	63	19 (30)*	6 (32)*	6 (32)	2 (11)*
パウチ	-30°C	39	30 (77)	23 (77)	21 (70)	15 (50)
	室温	38	16 (42)*	10 (63)	4 (25)*	1 (6)*

受精率は、供試卵数に対する受精卵数の割合を表す。

各ステージへの胚発生率は、受精卵数を母数として算出した。

*: シートの種類ごと、各列において-30°C保存区の成績に対し有意な差があることを示す (p<0.01)。

3-3-3 脱酸素剤と除湿剤の効果

ICR 系統の凍結乾燥精子を、脱酸素剤のみと一緒に保存した結果、脱酸素剤は水分を出したため、凍結乾燥精子は吸湿し、薬包紙に貼り付いたことで回収できなくなってしまった。次に、除湿剤のみと一緒に保存した場合、精子を回収することに成功した。受精率は、何も添加せずに保存した凍結乾燥精子と比べ受精率が改善したが、顕微授精胚はかろうじて4細胞期まで発生したものの、胚盤胞期まで発生しなかった。ところが、脱酸素剤と除湿剤を併用して保存しておいた凍結乾燥精子（図3-1d）では受精率がさらに改善し、得られた顕微授精胚は胚盤胞期まで発生した。この方法で1ヶ月間室温保存した凍結乾燥精子の顕微授精胚も胚盤胞期まで発生した（表3-3）。さらに2細胞期胚を卵管に移植すると産仔が得られ、産仔率は-30℃で1ヶ月間保存した精子と同程度であった（表3-4）。得られた産仔をランダムに選出し、交配させた結果、健康な産仔が多数生まれ、繁殖能にも異常がないことを確認した（図3-2a）。

表 3-3 脱酸素剤と除湿剤を入れて室温保存した凍結乾燥精子の発生率

保存期間	保存温度	添加剤	供試卵数	受精卵数 (%)	各ステージへの胚発生数		
					2細胞期 (%)	4-8細胞期 (%)	桑実期/胚盤胞期 (%)
1週間	-30°C	なし	33	26 (79)	25 (96)	21 (81)	14 (54)
		なし	34	4 (12)*	1 (25)*	0 (0)	0 (0)
	室温	脱酸素剤	N.A.	-	-	-	-
		除湿剤	37	25 (68)	16 (64)*	3 (12)*	0 (0)
		脱酸素剤と除湿剤の併用	42	35 (83)	32 (91)	27 (77)	14 (40)
1ヶ月	-30°C	なし	35	31 (89)	29 (94)	27 (87)	21 (68)
	室温	脱酸素剤と除湿剤の併用	67	60 (90)	46 (77)	29 (48)**	24 (40)

受精率は、供試卵数に対する受精卵数の割合を表す。

各ステージへの胚発生率は、受精卵数を母数として算出した。

*: 1週間保存した精子について、各列において-30°C保存区の成績に対し有意な差があることを示す(p<0.01)。

** : 1ヶ月間保存した精子について、各列において-30°C保存区の成績に対し有意な差があることを示す(p<0.01)。

表 3-4 パウチタイプのシートを使って1ヶ月間保存した凍結乾燥精子の産仔率

保存温度	供試卵数	受精卵数 (%)	2細胞期胚数 (%)	移植胚数 (レシピエントの匹数)	産仔数 (%)
-30℃	197	162 (82)	140 (86)	140 (8)	24 (17)
室温	208	173 (83)	143 (83)	143 (9)	24 (17)

受精率は、供試卵数に対する受精卵数の割合を表す。

2細胞期への胚発生率は、受精卵数を母数として算出した。

産仔率は、移植胚数に対する産仔数の割合を表す。

3-3-4 多系統マウス精子の室温シート保存

ICRのほか、BCF1、B6N、及びC3H/Heの全4系統の凍結乾燥精子を、3-3-3に示した脱酸素剤と除湿剤を併用する方法で3ヶ月間室温保存した。その結果、全ての系統において精子を回収することができ、ICR及びBCF1系統の精子では、トレハロースを添加せずに保存しても前核期胚や2細胞期胚が得られ、産仔を作出することに成功した。一方、近交系の精子を用いた場合、特にB6N系統の精子について2細胞期への発生率に低下の傾向がみられ、B6N及びC3H系統の両系統で産仔を得ることができなかった。しかし、0.5 Mのトレハロースを添加した場合、得られた顕微授精胚を2細胞期に卵管移植したところ、産仔を得ることに成功した(表3-5)。以上の結果から、4系統全ての精子において、シートで室温保存した後に、顕微授精胚から産仔を得ることに成功した。

表 3-5 3 ヶ月間室温保存した精子の産仔率

系統	トレハ ロース	供試 卵数	受精卵数 (%)	2 細胞期胚数 (%)	移植胚数 (レシピエントの匹数)	産仔数 (%)
ICR	0 M	63	51 (81)	37 (73)	37 (3)	5 (14)
BCF1	0 M	65	42 (65)	37 (88)	37 (3)	4 (11)
	0.5 M	70	55 (79)	38 (69)	38 (3)	6 (16)
B6N	0 M	89	53 (60)	25 (47)	25 (2)	0 (0)
	0.5 M	89	77 (87)	53 (69)	53 (4)	6 (11)
C3H	0 M	75	31 (41)	23 (74)	23 (3)	0 (0)
	0.5 M	68	44 (65)*	29 (66)	29 (2)	2 (7)

受精率は、供試卵数に対する受精卵数の割合を表す。

2 細胞期への胚発生率は、受精卵数を母数として算出した。

産仔率は、移植胚数に対する産仔数の割合を表す。

*: 系統ごと、各列において 0 M 区の成績に対し有意な差があることを示す(p<0.01)。

3-3-5 脱酸素剤と除湿剤から切り離した後に1ヶ月間室温保存したマウス精子の発生率

脱酸素剤と除湿剤を入れたままでは、かさばってしまうため、切り離した状態（図3-1e）でも室温保存が可能かどうかを検討した。まず、切り離すまでに必要な期間を調べるために、脱酸素剤と除湿剤を入れて室温保存を開始してから1日後に切り離した精子と、3-5日後に切り離した精子をそれぞれ、切り離してから1週間室温保存した。その結果、いずれの精子も回収に成功し、得られた顕微授精胚の発生率に差はなかった（表3-6）。

次に、脱酸素剤と除湿剤から切り離した状態で1ヶ月間室温したICR系統及びB6N系統の凍結乾燥精子を用いて顕微授精を行なった。その結果、切り離して保存した精子を用いた場合であっても2細胞期までの発生率に低下はみられず（表3-7）、得られた2細胞期胚を卵管移植するといずれの系統においても産仔を得ることに成功した（図3-2b）。

表 3-6 脱酸素剤と除湿剤から切り離してから 1 週間室温保存した精子の発生率

切り離すまでの 日数	保存温度	供試卵数	受精卵数 (%)	各ステージへの胚発生数		
				2 細胞期 (%)	4-8 細胞期 (%)	桑実期/ 胚盤胞期 (%)
-	-30℃	41	36 (88)	33 (92)	23 (64)	18 (50)
1 日		48	36 (75)	25 (69)	19 (53)	11 (31)
3-5 日	室温	46	42 (91)	31 (74)	19 (45)	15 (36)
なし		46	37 (80)	29 (78)	20 (54)	15 (41)

受精率は、供試卵数に対する受精卵数の割合を表す。

各ステージへの胚発生率は、受精卵数を母数として算出した。

表 3-7 脱酸素剤と除湿剤から切り離してから1ヶ月室温保存した精子の産仔率

系統	切り離し	供試卵数	受精卵数 (%)	2細胞期胚数 (%)	移植胚数 (レシピエントの匹数)	産仔数 (%)
ICR	なし	24	18 (75)	16 (89)	16 (1)	4 (25)
	あり	119	91 (76)	69 (76)	69 (4)	3 (4)
B6N	なし	84	58 (69)	57 (98)	57 (4)	5 (9)
	あり	82	65 (79)	61 (94)	61 (4)	2 (3)

受精率は、供試卵数に対する受精卵数の割合を表す。

2細胞期への胚発生率は、受精卵数を母数として算出した。

産仔率は、移植胚数に対する産仔数の割合を表す。

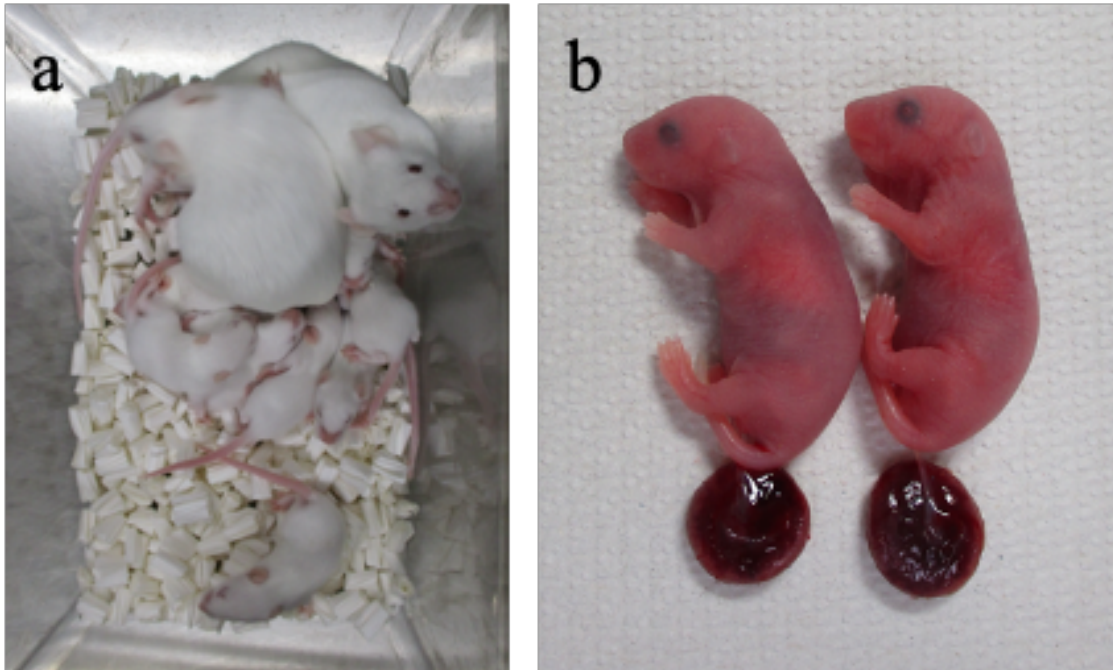


図3-2 室温でシート保存した凍結乾燥精子から得られたマウス個体

(a) 脱酸素剤及び除湿剤と一緒に1ヶ月間室温保存した凍結乾燥精子から得られたオスマウスとメスマウスを交配させると、次世代の産仔が多数得られた。(b) 脱酸素剤と除湿剤から切り離して1ヶ月間シートの状態で室温保存したB6N系統の凍結乾燥精子を用いて得られた産仔。

3-4 考察

本章でははがきや封筒を使った、日本国内の一般郵便で精子を輸送したのち、個体を作成することに成功した(図3-1a, b、表3-1)。シートに挟んだ精子をポストカードや封筒で運ぶ場合、液体窒素を含む特殊な運搬を一切必要とせず、さらにガラスアンプル瓶では必要だったクッション材を使わなくても破損の心配なく、一般郵便と同じように輸送できたため、手間やコストを大幅に削減することができた。

より高い実用性を示すには、日本以外の国や地域でも同様の短期輸送が可能か、さらには国際輸送を行なっても健康な産仔を得られるかどうかを調べる必要がある。同時に、衛生上の輸出入の制限や研究倫理規定によっては輸送区間や地域ごとに設けられている項目もあるため、実用化にはこのような条件を満たすように改良を加えるか、もしくは条件に抵触しない範囲で正しく用いられるべきである。

そして本章では、シートを使った凍結乾燥精子の数ヶ月間の室温保存に成功した。

シートの種類を変えただけでは、1週間の室温保存後の発生率を改善することはできなかった(表3-2)、脱酸素剤と除湿剤を入れると発生率は改善した(図3-1d、表3-3、3-4)。先行研究では、高真空と判定したガラスアンプル瓶を使い、凍結乾燥精子の1年以上の室温保存に成功したが、大量の空気や水分が混入したアンプル瓶では精子を室温保存できなかった結果⁹⁾は、本章の結果と一致している。そのため、ラミネートやパウチだけで凍結乾燥精子を保存した場合は可能な限り空気を排除したが、残った水分量や酸素量を測定することはできず、わずかな残存空気ですえも発生率を低下させた可能性がある。そのため、凍結乾燥精子は数日間脱酸素剤と除湿剤と一緒に保存してから切り離したことで、あらかじめ除湿剤と脱酸素剤と一緒に保存しておけば、切り離して小さく加工しても、精子をシートで室温保存できた(図3-1e、表3-6、3-7)。したがって、小さなシートを作るためには、切り離した空間にもできる限り酸素や水分が残らないように注意を払う必要があった。

小さなシートに入った精子を効率よく保管するには、例えばカードホルダーを使えば、数千種類のマウス精子を図鑑や写真アルバムのように一覧にまとめ、実験機や本棚で簡単に管理できるようになる。

C57BL/6N 系統や C3H/He 系統などの近交系マウスは、遺伝子改変系統の作製や、次世代シーケンスによく用いられる系統であり、近交系の精子や卵子、胚の凍結保存技術は、系統維持に欠かせない技術である。本章ではシートで室温保存した4系統すべてのマウス精子で産仔を得ることに成功したため(表3-5)、本技術はより多くの系統や、国際間の共同研究に応用できるだろう。

しかしながら、近交系マウスの生殖細胞は、交雑系のマウスと比べ体外操作に弱く、産仔率も低いことが報告されている。第1章では、ガラスアンプル瓶に入れて室温保存した近交系マウスの凍結乾燥精子の産仔率がトレハロースによって改善することを明らかにした。シート保存した近交系精子でも、トレハロースを加えた場合に室温保存して産仔を得ることができたため(表3-5)、トレハロースは特に、近交系マウスの凍結乾燥精子を室温保存する場合、保存容器の違いによらず保存に特化した保護剤として利用できるだろう。

総括

精子の保存技術は、畜産現場や生殖補助医療、研究のために作出された遺伝子改変系統の維持、そして絶滅危惧種の保護など、地球上の生態系および人類の営みの根幹を支える多くの分野で欠かせない技術である。これまで、液体窒素やディープフリーザーを用いた凍結保存が普及しているが、液体窒素や電力の供給に必要な道路の分断やシステムの異常が生じると、超低温は維持できなくなってしまう問題は、凍結保存ではどうしても解決することができなかった。東日本大震災発生時には、東北地方で冷凍保存されていた精子が東海地方まで急遽輸送され事なきを得たが、冷凍保存の弱点を浮き彫りにした。この事例により、不妊治療クリニックをはじめ、外部から精子の提供や保存を受託している研究機関や家畜事業団は、精子の保管状況や復旧システムを一般公開するようになってきたが、根本的な解決ではなかった。

精子の保存技術には、凍結保存以外に、蒸発乾燥やマイクロ波を利用した乾燥保存も開発が進められているが、最適な保存条件の維持には特殊装置や冷凍庫などを必要とする。

精子の凍結乾燥保存技術は、1998年にWakayamaらがハワイ大学柳町研究室で世界に先駆けて成功し、2018年には高真空ガラスアンプル瓶を用いることで、机の引き出しの中で1年以上室温保存できるようになった。さらには、新鮮精子には耐えられないような極限温度環境や宇宙空間でも保存できることも明らかになっている。しかしながら、精子は一度凍結乾燥処理するだけで、新鮮な状態の場合と比較し、顕微授精後の産仔率が著しく低下してしまう。精子は凍結乾燥処理によって死んでしまっても、顕微授精をすれば健康な産仔を得ることができるが、凍結乾燥精子は精子DNAにダメージが入っているために、顕微授精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ことが報告されている。

第1章では、凍結乾燥処理が精子に及ぼすダメージを抑制することを狙いとして、精子懸濁液にトレハロースを添加して精子の凍結乾燥処理を行った。だが、凍結乾燥処理直後の著しい産仔率の低下を防ぐことはできず、凍結乾燥処理直後の精子DNAの損傷率にもトレハロースによる変化はみられなかったことから、トレハロース溶液に精子をただ懸濁するだけでは、凍結乾燥処理のダメージから精子の細胞質やDNAをトレハロースは保護できないことが明らかとなった。ところが、1ヶ月間の室温保存後にICR系統の凍結乾燥精子を用いて顕微授精を行うと、凍結乾燥処理直後にはみられなかったトレハロースによる産仔率の改善効果が得られた。トレハロースは分子量が大きいので、凍結乾燥処理の前に精子細胞膜から細胞質内へ入ることはできない⁹⁾と考えられるが、タンパクの酸化や変性を抑制する働きも報告されている。アンプル内からの完全な空気の除去は難しく、全てのアンプルには少量の空気が含まれているため、トレハロースの添加はアンプル内に残ったごく少量の空気から精子を保護するうえで効果的な手段であると考えられる。この効果は、3ヶ月間室温保存した近交系の精子において顕著にみられた。しかしながら、3ヶ月間の室温保存の時点で、精子DNAの損傷率について調べてみると、産仔率に最も大きな改善効果が得られたB6N系統の凍結乾燥精子であっても、精子DNAの損傷率に変化はみられなかった。これらの結果は、産仔率の改善につながったトレハロースによる凍結乾燥精子の保護効果の作用点は、精子DNA以外の細胞質などにあることを示唆する。だが、この説明では3ヶ月間の室温保存後の産仔率について、クローズドコロニーのICR系統の精子を用いた場合のみトレハロースの改善効果が唯一得られていないこと、生殖細胞の体外操作への耐性が“強い”とされる交雑系のBDF1系統ではトレハロースによる産仔率の改善効果が得られたということについて、メカニズムを説明できない。またICR系統の精子を用いた場合、1ヶ月保存の時点ではトレハロースによって産仔率が改善したにもかかわらず、3ヶ月保存の時点では、トレハロースによる改善効果はみられなくなった。このほか、トレハロースを添加しなかった場合5系統のうちで最も高い産仔率が得られたのはICR系統の凍結乾燥精子であった理由は、凍結乾燥精子が抱えるロット差に起因する可能性も考えられるが、明確な理由を本研究では明らかにできなかった。系統ごとに、生殖細胞の保存及び凍結乾燥処理に対する“適

性（耐性）”、トレハロースをはじめとする保護剤との“相性”があると仮定した場合、新鮮精子と凍結乾燥精子の産仔率や、作製直後から室温保存期間を追った産仔率の推移を、系統ごとあるいは系統間で比較する必要があるだろう。

次に、すべてのガラスアンプル瓶には、凍結乾燥処理後に高真空と判定されたアンプル瓶であったとしても微量の空気や水分が含まれること、空気や水分は精子の室温保存状態を劣化させることが、先行研究や第1章の結果から分かった。また、精子の凍結乾燥保存技術に従来使われてきたアンプル瓶はガラス製のため衝撃が加わると破損し、精子を保存できなくなってしまう恐れがあった。

そこで第2章では、真空ガラスアンプル瓶の代わりに、薄いプラスチックシートに挟んで凍結乾燥精子を保存することで、空気や水分を排除しながら、破れることなくコンパクトに精子を長期保存できる技術の確立を試みた。まず、6種類の材質のなかから、精子懸濁液の受け皿として最適な材質を選ぶことにした。その結果、最も精子の凍結乾燥処理が行いやすく、かつ発生率が高かった薬包紙を、精子懸濁液の受け皿として選出した。薬包紙の間に挟んで保存した精子の顕微受精胚の発生率が最も高かった理由は、薬包紙は今回検討した材質のうち最も薄く、ラミネートの隙間から水分や酸素を除去しやすく、精子の劣化を防いだためと考える。それでも、第2章において得られた結果では、室温保存の場合は3日間の保存が限界であった。試作を繰り返していた間、凍結乾燥処理後、大気中に取り出した粉状の凍結乾燥精子を眺めていると、みるみる液状に変化したことから、凍結乾燥精子は瞬時に空気や水分を取り込んでしまうため、どんなに薄い材質を使ったとしても、一度大気中に取り出した精子の質は顕著に低下してしまうことが考えられる。

そして、凍結乾燥処理の原理は従来法と同じであったため、DNA 損傷率や産仔率はガラスアンプル瓶で作製した凍結乾燥精子と同程度であり -30°C であれば少なくとも3ヶ月間保存しても発生率が低下することなく産仔が得られることを明らかにした。世界初の凍結乾燥保存の報告以来、冷凍であれば長期保存が可能であった一方、室温長期保存に関しては、保存後の染色体異常率が増加することや、凍結乾燥精子の1年以上の室温保存に成功した先行研究では、凍結乾燥精子の質は空気や水分の混入により著しく低下することが示されている。 -30°C であれば精子頭部に含まれる細胞質や核タンパクの変性、DNA 損傷が起こりにくく、シートでの凍結乾燥精子の保存も -30°C であれば数ヶ月以上の保存が可能であったと考えられる。このシート保存技術は、非常に薄くて軽いため、かさばることなく、名刺ホルダーの1ページに何種類もの精子を保管することができた。地球上の生態系維持に対しては、絶滅危惧種に指定されるような希少個体も含め遺伝情報を残すことが世界中で求められており、精子の保存は最も有効な手段だと考えられている。世界中の研究機関では、毎日絶えず遺伝子改変マウスやラット系統が作出されているが、その全てを生かして維持管理するには、実験動物や労働者にかかる負担、飼育費用が大きいと、個体ではなく精子を凍結して系統を維持している。このように、分野ごとの目的に応じながら、動物精子の保存技術は世界中で需要が増すばかりである。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だが、アルバムでの保管が可能になれば、精子試料がどんなに大量になっても、液体窒素タンクやディープフリーザーを用いることなくコンパクトかつ安価に管理することができるだろう。世界中の絶滅危惧種や希少種の精子を遺伝資源として網羅的に収録した「動物精子大全集」を世界各地で保管しておけば、たとえ地球規模の災害が起きてもバックアップが可能になる。

第3章では、シートを用いた凍結乾燥精子の長期室温保存の実現に向け、脱酸素剤、除湿剤、そしてトレハロースを利用し、ICR、BCF1、B6N、C3H 系統の精子を室温保存した。その結果、シートに挟んだ状態で最低3ヶ月間室温保存しておいた4系統すべての精子から産仔を作出することに成功した。さらに脱酸素剤と除湿剤は保存開始直後の数日間だけ一緒に保存しておけば、その後は切り離しても少なくとも1ヶ月は室温保存できることを示した。

精子のシート保存技術の実用化に向けては今後、より長期間室温で保存した精子の DNA 損傷率や発生率の変化の推移を検討する必要がある。加えて、シート保存はどのような保管場所や世界各地の気候にも対応した技術であるか、例えば光毒性や湿度条件などについて、実用化を見越した試験も詳細に調べておく必要があるだろう。加速度加齢試験は、医薬品や食品の安定性や保存可能期間を調べるために広く用いられる方法である。しかしながら凍結乾燥精子は、先行研究により熱耐性が判明しているため、実際に長期間保存することでしか、保存可能期間を明らかにすることができない。長期間室温保存しても出産率が低下しないことの証明や高い信頼性を得るには、実際に保存した精子を解析するのが正しい手段であると考えられる。将来的に、世界中の絶滅危惧種や希少種の精子を遺伝資源として網羅的に収録した「動物精子大全集」の保管が世界各地で可能になれば、地球規模の災害が起きた場合の対策になる。

そして精子の輸送について、従来、凍結保存により管理されていた精子は、畜産分野では人工授精のたびにストロー（精子の凍結保存容器）を頻りに農場へ運び、研究分野では共同研究や依頼実験が行われる際に、たった数本の輸送にも専用の液体窒素タンクが必要で手間とコストがかかった。そこで、シートに挟んで保存した凍結乾燥精子は、薄さと軽さ、安全性を利用し、ハガキや封筒に貼り付けて投函することで、場所や時間を選ばず簡便に、一般郵便で国内輸送できることを明らかにした。この方法を用いれば、凍結精子で数万円かかっていた輸送費が、ハガキ 1 枚の 85 円に抑えることも可能である。精子の国内輸送にはすでに成功したが、ポストカードや封筒を使って、数カ国から日本に向けた精子の国際輸送を行い、産仔を作出することができれば、本技術の実用性の高さをさらに示すことができる。

精子のアルバム保存や簡便な郵送技術は、世界中の畜産業や生殖医療の従事者、研究者にとって、非常に有益な技術に発展することが期待される。だが、全く新しい技術のため、法的小よび倫理的な整備ができていない。例えば、本方法では税関や検疫を通過しない精子の輸送が可能になるため、貴重な遺伝資源の不正輸出を助長する恐れも発生しうる。本成果の普及に際しては、国際的な法整備や、保存されている全試料のバーコード管理の義務付けなど、利便性を損なわない範囲で、不正利用への対策をとることの重要性も提唱していかなければならない。

第 1 章、第 2 章、及び第 3 章の郵送実験に関する研究成果は、2019 年に *Journal of Reproduction and Development* 誌、2021 年に *iScience* 誌と *STAR Protocols* 誌にそれぞれ論文として発表した。

本研究では精子の凍結乾燥保存技術の実用化に向けて、シートに挟んで精子を保存することに成功し、膨大な精子をコンパクトに保存できることや郵送できることを示したが、凍結乾燥精子が抱える産仔率の低下と運動機能の消失の解決には至らなかった。顕微授精、体外受精、そして人工授精技術はいずれも家畜の生産や生殖補助医療、研究を支える技術だが、凍結乾燥精子は顕微授精にしか用いることができない。また顕微授精胚を移植しても、産仔率は 3 割程度に留まる。

上記課題の解決に向けて、精子の凍結処理や乾燥処理条件の詳細な条件検討は不可欠な検討項目であると考えられる。

泳ぐことが出来る精子を産仔率が低下することなくシートで室温保存できるようになれば、精子の保存技術を求めるすべての分野において、事故や災害発生時に備えた保存中の安全面を強化し、なおかつ費用を抑えて精子を保管することができるようになるだろう。

さらには精子に限らず、卵子をはじめとした各種生殖細胞、体細胞もまた、凍結保存が広く行われている。体細胞核移植（クローン）技術や未成熟精子細胞を用いた胚作製技術もまた、動物個体の作出を支える重要な技術であり、実用化に向けた研究が盛んに行われており、卵丘細胞や円形精子細胞に

ついて我々は凍結乾燥保存することに成功した。卵子や胚についてはまだ凍結乾燥保存に成功していないが、凍結技術の開発も非常に難しいため、培養条件や凍結条件の模索から着実に進めていく必要がある。この過程を経て、将来的にはすべての遺伝資源が室温で安全かつコンパクトに保存できるよう、これからも研究を続けたい。

※ 甲第 号	学位申請者氏名	伊藤 大裕
論文目録		
1 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		
2 関係論文		
1. Sayaka Wakayama, <u>Daiyu Ito</u> , Masatoshi Ooga, Teruhiko Wakayama. Production of mouse offspring from zygotes fertilized with freeze-dried spermatids. <i>Scientific Reports</i> , Nov 1;12(1):18430, 2022. (本文との関連、序章および総括に対応)		
2. Mizuki Sakamoto, <u>Daiyu Ito</u> , Rei Inoue, Sayaka Wakayama, Yasuyuki Kikuchi, Li Yang, Erika Hayashi, Rina Emura, Hirotsuke Shiura, Takashi Kohda, Satoshi H Namekawa, Takashi Ishiuchi, Teruhiko Wakayama, Masatoshi Ooga. Paternally inherited H3K27me3 affects chromatin accessibility in mouse embryos produced by round spermatid injection. <i>Development</i> , Sep 15;149(18):dev200696, 2022. (本文との関連、総括に対応)		
3. Sayaka Wakayama, <u>Daiyu Ito</u> , Erika Hayashi, Takashi Ishiuchi, Teruhiko Wakayama. Healthy cloned offspring derived from freeze-dried somatic cells. <i>Nature Communications</i> , Jul 5;13(1):3666, 2022. (本文との関連、序章および総括に対応)		
4. Natsuki Ushigome, Sayaka Wakayama, Kango Yamaji, <u>Daiyu Ito</u> , Masatoshi Ooga, Teruhiko Wakayama. Production of offspring from vacuum-dried mouse spermatozoa and assessing the effect of drying condition on sperm DNA and embryo development. <i>Journal of Reproduction and Development</i> , Aug 1;68(4):262-270, 2022. (本文との関連、総括に対応)		
5. Erika Hayashi, Sayaka Wakayama, <u>Daiyu Ito</u> , Ayumi Hasegawa, Keiji Mochida, Masatoshi Ooga, Atsuo Ogura, Teruhiko Wakayama. Mouse in vivo-derived late 2-cell embryos have higher developmental competence after high osmolality vitrification and -80°C preservation than IVF or ICSI embryos. <i>Journal of Reproduction and Development</i> , Apr 1;68(2):118-124, 2022. (本文との関連、総括に対応)		
6. Yasuyuki Kikuchi, Sayaka Wakayama, <u>Daiyu Ito</u> , Masatoshi Ooga, Teruhiko Wakayama. Optimised CO2-containing medium for in vitro culture and transportation of mouse preimplantation embryos without CO2 incubator. <i>PLoS One</i> , Dec 23;16(12):e0260645, 2021. (本文との関連、総括に対応)		
7. <u>Daiyu Ito</u> and Teruhiko Wakayama. Protocol to preserve mouse freeze-dried spermatozoa in the thin plastic sheets. <i>STAR Protocols</i> , Nov 3;2(4):100933, 2021. (本文との関連、第2章に対応)		
8. <u>Daiyu Ito</u> , Sayaka Wakayama, Rina Emura, Masatoshi Ooga, Teruhiko Wakayama. Mailing viable mouse freeze-dried spermatozoa on postcards. <i>iScience</i> , Aug 5;24(8):102815, 2021. (本文との関連、第2章および第3章に対応)		
9. Sayaka Wakayama, <u>Daiyu Ito</u> , Yuko Kamada, Toru Shimazu, Tomomi Suzuki, Aiko Nagamatsu, Ryoko Araki, Takahiro Ishikawa, Satoshi Kamimura, Naoki Hirose, Kousuke Kazama, Li Yang, Rei Inoue, Yasuyuki		

Kikuchi, Erika Hayashi, Rina Emura, Ren Watanabe, Hiroaki Nagatomo, Hiromi Suzuki, Tohru Yamamori, Motoki N Tada, Ikuko Osada, Masumi Umehara, Hiromi Sano, Haruo Kasahara, Akira Higashibata, Sachiko Yano, Masumi Abe, Satoshi Kishigami, Takashi Kohda, Masatoshi Ooga, Teruhiko Wakayama. Evaluating the long-term effect of space radiation on the reproductive normality of mammalian sperm preserved on the International Space Station. *Science Advances*, Jun 11;7(24):eabg5554. 2021.

(本文との関連、序章および総括に対応)

10. Shunsuke Konno, Sayaka Wakayama, **Daivu Ito**, Kousuke Kazama, Naoki Hirose, Masatoshi Ooga, Teruhiko Wakayama. Removal of remodeling/reprogramming factors from oocytes and the impact on the full-term development of cloned embryos. *Development*, Aug 7;147(15):dev190777. 2020.

(本文との関連、総括に対応)

11. **Daivu Ito**, Sayaka Wakayama, Yuko Kamada, Ikue Shibasaki, Satoshi Kamimura, Masatoshi Ooga, Teruhiko Wakayama. Effect of trehalose on the preservation of freeze-dried mice spermatozoa at room temperature. *Journal of Reproduction and Development*, Aug 9;65(4):353-359. 2019.

(本文との関連、第1章に対応)

12. Sayaka Wakayama, **Daivu Ito**, Yuko Kamada, Shigenobu Yonemura, Masatoshi Ooga, Satoshi Kishigami, Teruhiko Wakayama. Tolerance of the freeze-dried mouse sperm nucleus to temperatures ranging from -196°C to 150°C . *Scientific Reports*, Apr 5;9(1):5719. 2019.

(本文との関連、序章、第1章および総括に対応)

13. Yuko Kamada, Sayaka Wakayama, Ikue Shibasaki, **Daivu Ito**, Satoshi Kamimura, Masatoshi Ooga, and Teruhiko Wakayama. Assessing the tolerance to room temperature and viability of freeze-dried mice spermatozoa over long-term storage at room temperature under vacuum. *Scientific Reports*, Jul 13;8(1):10602. 2018.

(本文との関連、序章、第1章、第2章、第3章および総括に対応)

学位申請者

伊藤 大裕

Ⓔ

※印の欄は記入しないこと。

論文内容の要旨

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

氏名 伊藤 大裕

精子の凍結乾燥保存技術は、液体窒素やディープフリーザーを使わずに哺乳類の遺伝資源を室温保存できる簡便で安全な保存技術である。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は真空状態が保たれた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などの懸念が伴う。

第1章では、凍結乾燥マウス精子の室温保存における保護剤として、トレハロースの最適濃度および保護効果を検討した。ICR 系統の精子を用いた結果より、トレハロースには凍結乾燥処理そのものによるダメージから精子を保護する効果はなかった。ところが、トレハロースを添加して凍結乾燥精子を1ヶ月以上室温保存すると、トレハロースを添加せずに保存した区に対し胚盤胞率は有意に改善し(56-63% vs. 29%)、最適濃度は0.5 Mであった。重要なことに、0.5 Mトレハロースによる顕著な保護効果は、近交系マウス(C57BL/6N、C3H/He、及び129/Sv)の精子を室温で3ヶ月保存した場合に得られた(26-28% vs. 6-11%)。しかしながら、 γ -H2Ax染色による凍結乾燥精子のDNA損傷率を検証してみると、トレハロースには精子DNAを保護する効果はなかった。以上の結果より、トレハロースには凍結乾燥精子の長期的な室温保存において、DNA以外の他の因子を保護し、その効果は近交系においてより顕著であ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ている可能性があることが示唆された。

そこで第2章では、アンプル瓶を使わずに薄いプラスチックシートの中に凍結乾燥精子を挟んで保存する方法の探索、及びその技術を用いた産仔の作出を試みた。精子懸濁液の凍結乾燥処理を行う受け皿には薬包紙、プラスチックシート、ラップフィルム、和紙、オブラート、濾紙を用いた。キャパシテーションをした精子懸濁液は、液体窒素の液面に浮かべた上記の材質(受け皿)の上に滴下し、10分間の凍結処理後、直ちにLABCONCO FreezOne2.5®にて6時間の乾燥処理を行った。乾燥処理後、精子を載せた材質をラミネート加工し、-30°Cで数日から1ヶ月間保存した精子について、加水後の精子回収率、ICSI後の発生率と産仔率、DNA損傷率を調べた。その結果、薬包紙を受け皿として使用した場合に凍結乾燥精子を効率よく回収することに成功し、1ヶ月間冷凍保存した精子から産仔を得ることに成功した(産仔率21%)。産仔率やDNA損傷率は、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った。

さらにプラスチックシートに挟んで保存した精子について、-30°Cと室温でそれぞれ保存した場合の顕微授精胚の発生率の推移を調査するために、-30°Cでは1-3日間、1週間、1ヶ月間、3ヶ月間、室温では、1日間、3日間、1週間保存した後に顕微授精胚を作製した。その結果、-30°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、健康な産仔を得ることに成功した。一方、室温保存の場合、保存日数の経過に伴い、受精率や2細胞期への発生率は低下し、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。

第3章では、凍結乾燥精子のシート保存技術の室温での実用化に向けて、まずシート保存技術がはがきに貼り付けるだけで簡便に精子を輸送できるかどうかを検討した。従来、精子の輸送には、液体窒素が用いられているが、タンクやドライシッパーなどの特殊容器が必要なうえ運搬には特別料金がかかり、作業には窒

息や超低温による怪我の恐れを伴っているためである。精子を挟んだシートは、はがきに貼り付けるか、封筒に入れてポストに投函し、山梨県内、あるいは東京大（千葉県）から山梨大へ一般郵送した。対照区として郵送と同期間、研究室内の室温でシートを保存した。回収した精子はマウス卵子へ顕微注入し、受精率及び産仔率を調べた。山梨県内及び千葉・山梨県の郵送はいずれも2日以内で到着した。郵送した精子の産仔率（県内：産仔数2匹、4%、千葉・山梨県：産仔数4匹、7%）は、研究室で室温保存した対照区の精子の産仔率（産仔数2匹、3%）と差がなかった。したがって、凍結乾燥精子のシート保存は、従来の凍結精子の輸送にかかっていたコストや手間、リスクを省き、簡便に郵送できる技術として利用することができた。

しかし、1週間以上の室温保存には成功していなかったため、次に、プラスチックシートの種類を検討したが、1週間室温保存した精子の顕微受精後の発生率は30°Cで同期間保存した精子と比べ著しく低下してしまった。そこで、脱酸素剤と除湿剤をパウチ状のプラスチックシートの中に入れる方法、及び精子懸濁液への0.5Mトレハロースの添加による改善を試みた。脱酸素剤のみを凍結乾燥精子と一緒に1週間室温保存した結果、脱酸素剤は酸素を吸着したが水分を発したために、加水状態となった凍結乾燥精子は薬包紙にこびりついてしまい、保存後に回収できなくなってしまった。除湿剤のみを添加した結果、精子を回収することに成功し、一部の顕微受精胚が4細胞期まで発生したが、胚盤胞は得られなかった。そこで、脱酸素剤と除湿剤を同時に使用して凍結乾燥精子を1週間室温保存した結果、受精率や胚盤胞期までの発生率は著しく改善した。さらに、0.5 Mトレハロースを精子懸濁液に添加し作製した凍結乾燥精子を上記の方法でシート保存すると、3ヶ月間室温保存したICR、BCF1、B6N、C3H系統の4系統全ての精子を用いて、産仔を作出することに成功した。

ところがこの方法では、シートに厚みと重さが生じてしまうため、凍結乾燥処理直後の数日間は脱酸素剤と除湿剤をパウチシートの中に入れておき、その後切り離しても、精子の室温保存が可能かどうかを検討した。凍結乾燥精子はICR系統及びB6系統のオスマウスから作製した。脱酸素剤と除湿剤と一緒に1日、もしくは3-5日間保存したのち、凍結乾燥精子を包む薬包紙と、脱酸素剤及び除湿剤の間のシート部分をシーラーで溶接し切り離した。まず1週間の室温保存後に顕微受精を行い、胚盤胞期までの発生率を調べた結果、切り離すまでの日数によらず発生率の低下はみられなかった。次に、この方法を用いて1ヶ月間室温で保存した精子から産仔が得られるか試した結果、ICR系統及びB6系統の両系統において産仔を作出することに成功した。

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だが、本方法によりアルバムでの精子の管理が可能になれば、精子試料がどんなに膨大になっても、液体窒素タンクやディープフリーザーを用いることなくコンパクトかつ安価に管理することができる。さらに、研究室間の簡便かつ低コストでの遺伝子改変マウスなどの分与を可能にし、研究の円滑な遂行に役立つと考えられる。

しかし本方法が悪用された場合、例えば和牛の精子をはがきに貼り付けて海外へ不正輸出した場合、検疫で見つけることは困難であり、貴重な遺伝資源の違法流出さえも促進しかねない。本方法の実用化には、より長期間保存した精子の評価や、国際輸送の検証をはじめとした技術改良とともに、保存す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。

SUMMARY OF DISSERTATION

TITLE: Development of the sheet preservation method for freeze-dried mice spermatozoa and attempts at long-term preservation

NAME: Daiyu Ito

Freeze-drying technique of spermatozoa is a simple and safe preservation technique that allows mammalian genetic resources to be stored at room temperature without the use of liquid nitrogen or deep freezers. However, the birth rate of embryos produced by Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using freeze-dried (FD) sperm is significantly lower than that of embryos produced from fresh sperm. In addition, the storage of FD sperm at room temperature requires the use of glass ampoules in which a vacuum condition is maintained, but there are concerns that the ampoules may be broken due to errors in their preparation or by being dropped.

In Chapter 1, the optimal concentration and protective effect of trehalose as a protective agent for FD mouse sperm during room temperature storage were examined. As the results, it was found that trehalose was not effective in protecting sperm from the damage caused by the freeze-drying process itself. However, when FD sperm were stored at room temperature for more than one month with trehalose, the blastocyst rate was significantly improved (56-63% vs. 29%) compared to those stored without trehalose, and the optimal concentration of trehalose was 0.5 M. Importantly, a significant protective effect of 0.5 M trehalose was obtained when sperm from inbred mice (C57BL/6N, C3H/He, and 129/Sv) were stored at room temperature for 3 months (26-28% vs. 6-11%). However, when the DNA damage of FD sperm was examined by γ -H2A.x staining, trehalose had no protective effect on sperm DNA. These results indicate that trehalose protects other factors besides DNA during long-term storage at room temperature of FD sperm. It was also suggested that air and moisture, which inevitably remain in the glass ampoule, may have slightly degraded the quality of the sperm during storage at room temperature.

In Chapter 2, it was attempted to develop a method of storing FD sperm between thin plastic sheets without using glass ampoules, and to produce offspring using this technique. Weighing paper, plastic sheets, wrapping film, Washi (Japanese traditional paper), oblongs, and filter paper were used as receptacles for the freeze-drying process of sperm suspensions. The sperm suspension was dropped onto the above materials (e.g. Weighing paper) floating on the liquid nitrogen surface, frozen for 10 minutes, and immediately dried in LABCONCO FreezOne 2.5® for 6 hours. After the freeze-drying treatment, the material on which the sperm were placed was laminated and stored at -30°C for several days to one month. The sperm collecting rate after rehydration, the developmental and offspring rates after ICSI, and the DNA damage rate were examined. As the results, we succeeded in efficiently collecting FD sperm and in obtaining the offspring (rate: 21%) after one-month preservation when

Weighing paper was used as a receptacle. The developmental rate and DNA damage were comparable to those of FD sperm stored in glass ampoules.

In order to further investigate the transition in the developmental ability when FD sperm between plastic sheets were preserved at -30°C and room temperature, respectively, ICSI embryos were produced after storage for 1-3 days, 1 week, 1 month, and 3 months at -30°C , and for 1 day, 3 days, and 3 days at room temperature, respectively. As the results, the fertilization rate, the developmental rate to the 2-cell stage, and the birth rate did not decrease after 3 months of storage at -30°C , and healthy offspring were successfully obtained. On the other hand, when FD sperm contained in the sheets was stored at room temperature, the fertilization rate and the developmental rate to the 2-cell stage decreased with the number of days of storage, and we succeeded in producing pups from sperm stored for up to 3 days.

With the aim of practical application of sheet preservation method for FD sperm at room temperature, in Chapter 3, at first, it was examined whether sheet preservation method could be used to transport sperm easily by simply attaching them to a postcard. In the past, liquid nitrogen has been used to transport sperm, but this requires special containers such as tanks and dry sippers, special charges for transportation, and the work is accompanied by the fear of asphyxiation and injury due to ultra-low temperatures. The sheets with sperm sandwiched between them were pasted on postcards or put in envelopes and mailed inside Yamanashi Prefecture or to University of Yamanashi from University of Tokyo (Chiba Prefecture). As a control, the sheets were stored at room temperature in the laboratory for the same period as the mailing. The collected sperm were used for ICSI, and developmental rates were examined. Both mailings within Yamanashi Prefecture and between Chiba and Yamanashi Prefecture arrived within 2 days. The offspring rates of the mailed sperm (in-prefecture: 2 pups, 4%; Chiba-Yamanashi: 4 pups, 7%) were not different from that of the control (2 pups, 3%), which were stored at room temperature in the lab. Therefore, the sheet preservation method of FD sperm could be used as a convenient technique for transporting of sperm, eliminating the cost, labor, and risk involved in conventional transportation of sperm in liquid nitrogen.

However, since we had not succeeded in preserving sperm using the sheets at room temperature for more than one week, it was next examined the several types of plastic sheet. No matter which types of sheets were used, the developmental ability of sperm after 1 week preservation at room temperature was significantly decreased compared with that of sperm preserved at -30°C . Therefore, it was tried to improve the condition by placing the oxygen absorber and desiccant in a pouch-like plastic sheet and by adding 0.5 M trehalose to the sperm suspension. As a result of storing FD sperm with only the oxygen absorber together at room temperature for one week, the oxygen absorber adsorbed oxygen but emitted moisture, and the FD sperm, which were in rehydrated state, stuck to the weighing paper and could not be collected after storage. As a result of adding only desiccant, sperm were successfully collected, and some ICSI embryos developed to the 4-cell stage, but blastocysts were not obtained. Then, the fertilization rate and the development rate to the blastocyst stage were markedly improved as a result of storing FD sperm using both the deoxidant and desiccant. Furthermore, when FD sperm prepared by adding 0.5 M trehalose were preserved in the sheets at room temperature for 3-month using the above method, pups were successfully produced using FD sperm from all four strains (ICR, BCF1, B6N, and C3H).

However, since this method creates thickness and weight in the sheets, it was examined whether FD sperm could be stored at room temperature even after oxygen absorber and desiccant, which were kept inside the pouch sheet for several days immediately after the lyophilization process, were detached from that sheet. The FD sperm were

stored with oxygen absorber and desiccant for 1 day or 3-5 days, and then the sheets were welded with a sealer between the weighing paper containing the FD sperm and the oxygen absorber and desiccant to detach them.

After ICSI performed following one week of room temperature storage of sperm, as a result, the developmental rate up to the blastocyst stage showed no decrease regardless of the durations until the detachment. Finally, we demonstrated that above method could be used to produce offspring from FD sperm both ICR and B6 strains after more than 1-month preservation at room temperature.

The demand for animal sperm preservation technology is increasing all over the world, and the preservation of a huge number of sperm is necessary to maintain a rich diversity of genetic resources. However, if sperm can be managed in albums using the method of this study, no matter how the sample volume of sperm was large, it can be managed compactly and inexpensively without using liquid nitrogen tanks or deep freezers. Furthermore, it would enable the easy and low-cost distribution of such as genetically modified strains between laboratories, which would be useful for the smooth execution of the research internationally collaborated.

However, if this method were to be abused, for example, if Wagyu sperm were pasted on postcards and illegally exported overseas, it would be difficult to detect in quarantine, and could even facilitate the illegal outflow of valuable genetic resources. For putting this method into practical use, it is essential to improve the technology, including evaluation of sperm stored for longer period and verification of international transportation, as well as to establish international laws, such as international registration of stored sperm and mandatory use records.

謝辞

本研究の進行、学位論文の執筆、学位審査にあたり終始ご指導いただきました山梨大学発生工学研究センター 若山照彦教授、若山清香助教、山梨大学大学院総合研究部生命環境学域 岸上哲士教授、黒澤尋教授、幸田尚教授、鈴木堅太郎教授、永松剛教授、大山拓次教授、望月和樹教授、石内崇士准教授、藤本由佳先生、山梨大学生命環境学部生命工学科の先生方、麻布大学獣医学部動物応用科学科 大我政敏講師、量子科学技術研究開発機構放射線医学研究所 上村悟氏主任研究員、マウス管理全般についてご指導いただいた山梨大学発生工学研究センター特任助手神田祥加さん、山口千尋さんに厚く御礼申し上げます。また、第1章に関してご支援ご助言いただいた鎌田裕子先輩、飯窪（柴崎）郁江先輩、そして本研究の進行に際しご協力いただいた発生工学研究センターの先輩方、同期、後輩の皆様に御礼申し上げます。

参考文献

- (1) Kühnert, B.; Nieschlag, E. Reproductive functions of the ageing male. *Hum Reprod Update* **2004**, *10* (4), 327.
- (2) Wakayama, S.; Kishigami, S.; Van Thuan, N.; Ohta, H.; Hikichi, T.; Mizutani, E.; Yanagimachi, R.; Wakayama, T. Propagation of an infertile hermaphrodite mouse lacking germ cells by using nuclear transfer and embryonic stem cell technology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102* (1), 29.
- (3) Jamsai, D.; O'Bryan, M. K. Mouse models in male fertility research. *Asian J Androl* **2011**, *13* (1), 139.
- (4) Hirota, T.; Ohta, H.; Powell, B. E.; Mahadevaiah, S. K.; Ojarikre, O. A.; Saitou, M.; Turner, J. M. A. Fertile offspring from sterile sex chromosome trisomic mice. *Science* **2017**, *357* (6354), 932.
- (5) Yanagimachi, R. Mysteries and unsolved problems of mammalian fertilization and related topics. *Biol Reprod* **2022**, *106* (4), 644.
- (6) Davis, T. C.; White, R. R. Breeding animals to feed people: The many roles of animal reproduction in ensuring global food security. *Theriogenology* **2020**, *150*, 27.
- (7) Grötter, L. G.; Cattaneo, L.; Marini, P. E.; Kjelland, M. E.; Ferré, L. B. Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. *Reprod Domest Anim* **2019**, *54* (4), 655.
- (8) Lautz, T. B.; Burns, K.; Rowell, E. E. Fertility Considerations in Pediatric and Adolescent Patients Undergoing Cancer Therapy. *Surg Oncol Clin N Am* **2021**, *30* (2), 401.
- (9) Thomson, C. E.; Brown, S. D.; Glenister, P. H. Large numbers of mice established by in vitro fertilization with cryopreserved spermatozoa: implications and applications for genetic resource banks, mutagenesis screens, and mouse backcrosses. *Mamm Genome* **1999**, *10* (10), 987.
- (10) Fickel, J.; Wagener, A.; Ludwig, A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. *European Journal of Wildlife Research* **2007**, *53* (2), 81.
- (11) Benson, J. D.; Woods, E. J.; Walters, E. M.; Critser, J. K. The cryobiology of spermatozoa. *Theriogenology* **2012**, *78* (8), 1682.
- (12) Van Thuan, N.; Wakayama, S.; Kishigami, S.; Wakayama, T. New Preservation Method for Mouse Spermatozoa Without Freezing. *Biology of Reproduction* **2005**, *72* (2), 444.
- (13) Yanagimachi, R. The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. *J Reprod Fertil* **1970**, *23* (1), 193.
- (14) Iwamatsu, T.; Chang, M. C. In vitro fertilization of mouse eggs in the presence of bovine follicular fluid. *Nature* **1969**, *224* (5222), 919.
- (15) Yanagimachi, R.; Chang, M. C. FERTILIZATION OF HAMSTER EGGS IN VITRO. *Nature* **1963**, *200*, 281.
- (16) Luyet, B. J.; Hodapp, E. L. Revival of Frog's Spermatozoa Vitrified in Liquid Air. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **1938**, *39* (3), 433.
- (17) Polge, C.; Smith, A. U.; Parkes, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* **1949**, *164* (4172), 666.
- (18) Lovelock, J. E.; Bishop, M. W. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature* **1959**, *183* (4672), 1394.
- (19) Bojic, S.; Murray, A.; Bentley, B. L.; Spindler, R.; Pawlik, P.; Cordeiro, J. L.; Bauer, R.; de Magalhães, J. P. Winter is coming: the future of cryopreservation. *BMC Biol* **2021**, *19* (1), 56.

- (20) Rodríguez-Wallberg, K. A.; Waterstone, M.; Anastácio, A. Ice age: Cryopreservation in assisted reproduction - An update. *Reprod Biol* **2019**, *19* (2), 119.
- (21) Yáñez-Ortiz, I.; Catalán, J.; Rodríguez-Gil, J. E.; Miró, J.; Yeste, M. Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. *Anim Reprod Sci* **2022**, *246*, 106904.
- (22) Penfold, L. M.; Moore, H. D. A new method for cryopreservation of mouse spermatozoa. *J Reprod Fertil* **1993**, *99* (1), 131.
- (23) Fuller, S. J.; Whittingham, D. G. Effect of cooling mouse spermatozoa to 4 degrees C on fertilization and embryonic development. *J Reprod Fertil* **1996**, *108* (1), 139.
- (24) Songsasen, N.; Betteridge, K. J.; Leibo, S. P. Birth of live mice resulting from oocytes fertilized in vitro with cryopreserved spermatozoa. *Biol Reprod* **1997**, *56* (1), 143.
- (25) Songsasen, N.; Leibo, S. P. Cryopreservation of mouse spermatozoa. I. Effect of seeding on fertilizing ability of cryopreserved spermatozoa. *Cryobiology* **1997**, *35* (3), 240.
- (26) Songsasen, N.; Leibo, S. P. Cryopreservation of mouse spermatozoa. II. Relationship between survival after cryopreservation and osmotic tolerance of spermatozoa from three strains of mice. *Cryobiology* **1997**, *35* (3), 255.
- (27) Tada, N.; Sato, M.; Yamanoi, J.; Mizorogi, T.; Kasai, K.; Ogawa, S. Cryopreservation of mouse spermatozoa in the presence of raffinose and glycerol. *J Reprod Fertil* **1990**, *89* (2), 511.
- (28) Takeshima, T.; Nakagata, N.; Ogawa, S. [Cryopreservation of mouse spermatozoa]. *Jikken Dobutsu* **1991**, *40* (4), 493.
- (29) Nakagata, N.; Matsumoto, K.; Anzai, M.; Takahashi, A.; Takahashi, Y.; Matsuzaki, Y.; Miyata, K. [Cryopreservation of spermatozoa of a transgenic mouse]. *Jikken Dobutsu* **1992**, *41* (4), 537.
- (30) Nakagata, N. Production of normal young following insemination of frozen-thawed mouse spermatozoa into fallopian tubes of pseudopregnant females. *Jikken Dobutsu* **1992**, *41* (4), 519.
- (31) Nakagata, N. Production of normal young following transfer of mouse embryos obtained by in vitro fertilization between cryopreserved gametes. *J Reprod Fertil* **1993**, *99* (1), 77.
- (32) Nakagata, N. Use of cryopreservation techniques of embryos and spermatozoa for production of transgenic (Tg) mice and for maintenance of Tg mouse lines. *Lab Anim Sci* **1996**, *46* (2), 236.
- (33) Marschall, S.; Huffstadt, U.; Balling, R.; Hrabě de Angelis, M. Reliable recovery of inbred mouse lines using cryopreserved spermatozoa. *Mamm Genome* **1999**, *10* (8), 773.
- (34) Szein, J. M.; Takeo, T.; Nakagata, N. History of cryobiology, with special emphasis in evolution of mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology* **2018**, *82*, 57.
- (35) Nakata, K.; Yoshida, K.; Yamashita, N. Preclinical evaluation of a new cryopreservation container for a limited number of human spermatozoa. *J Reprod Dev* **2019**, *65* (4), 297.
- (36) Mochida, K.; Hasegawa, A.; Shikata, D.; Itami, N.; Hada, M.; Watanabe, N.; Tomishima, T.; Ogura, A. Easy and quick (EQ) sperm freezing method for urgent preservation of mouse strains. *Sci Rep* **2021**, *11* (1), 14149.
- (37) Kimura, Y.; Yanagimachi, R. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol Reprod* **1995**, *52* (4), 709.
- (38) Ohta, H.; Sakaide, Y.; Wakayama, T. Long-term preservation of mouse spermatozoa as frozen testicular sections. *J Reprod Dev* **2008**, *54* (4), 295.
- (39) Wakayama, T.; Whittingham, D. G.; Yanagimachi, R. Production of normal offspring from mouse oocytes injected with spermatozoa cryopreserved with or without cryoprotection. *J Reprod Fertil* **1998**, *112* (1), 11.

- (40) Lee, K. B.; Niwa, K. Fertilization and development in vitro of bovine oocytes following intracytoplasmic injection of heat-dried sperm heads. *Biol Reprod* **2006**, *74* (1), 146.
- (41) Sitaula, R.; Elmoazzen, H.; Toner, M.; Bhowmick, S. Desiccation tolerance in bovine sperm: a study of the effect of intracellular sugars and the supplemental roles of an antioxidant and a chelator. *Cryobiology* **2009**, *58* (3), 322.
- (42) Sitaula, R.; Guo, M.; Bhowmick, S. Developing a predictive tool for reactive oxygen species damage during bovine sperm storage at ambient temperature. *Biopreserv Biobank* **2009**, *7* (2), 95.
- (43) Alonso, A.; Baca Castex, C.; Ferrante, A.; Pinto, M.; Castañeira, C.; Trasorras, V.; Gambarotta, M. C.; Losinno, L.; Miragaya, M. In vitro equine embryo production using air-dried spermatozoa, with different activation protocols and culture systems. *Andrologia* **2015**, *47* (4), 387.
- (44) Li, X. X.; Diao, Y. F.; Wei, H. J.; Wang, S. Y.; Cao, X. Y.; Zhang, Y. F.; Chang, T.; Li, D. L.; Kim, M. K.; Xu, B. Tauroursodeoxycholic acid enhances the development of porcine embryos derived from in vitro-matured oocytes and evaporatively dried spermatozoa. *Sci Rep* **2017**, *7* (1), 6773.
- (45) Carretero, M. I.; Chaves, M. G.; Arraztoa, C. C.; Fumuso, F. G.; Gambarotta, M. C.; Neild, D. M. Air-Drying Llama Sperm Affects DNA Integrity. *Front Vet Sci* **2020**, *7*, 597952.
- (46) Brogna, R.; Fan, J.; Sieme, H.; Wolkers, W. F.; Oldenhof, H. Drying and temperature induced conformational changes of nucleic acids and stallion sperm chromatin in trehalose preservation formulations. *Sci Rep* **2021**, *11* (1), 14076.
- (47) Carretero, M. I.; Arraztoa, C. C.; Fumuso, F. G.; Chaves, M. G.; Santa Cruz, R. C.; Neild, D. M. Dehydration of llama sperm using different osmolarity media and temperatures for preservation. *Anim Reprod Sci* **2021**, *225*, 106683.
- (48) Bhowmick, S.; Zhu, L.; McGinnis, L.; Lawitts, J.; Nath, B. D.; Toner, M.; Biggers, J. Desiccation tolerance of spermatozoa dried at ambient temperature: production of fetal mice. *Biol Reprod* **2003**, *68* (5), 1779.
- (49) McGinnis, L. K.; Zhu, L.; Lawitts, J. A.; Bhowmick, S.; Toner, M.; Biggers, J. D. Mouse sperm desiccated and stored in trehalose medium without freezing. *Biol Reprod* **2005**, *73* (4), 627.
- (50) Li, M. W.; Biggers, J. D.; Elmoazzen, H. Y.; Toner, M.; McGinnis, L.; Lloyd, K. C. Long-term storage of mouse spermatozoa after evaporative drying. *Reproduction* **2007**, *133* (5), 919.
- (51) Elmoazzen, H. Y.; Lee, G. Y.; Li, M. W.; McGinnis, L. K.; Lloyd, K. C.; Toner, M.; Biggers, J. D. Further optimization of mouse spermatozoa evaporative drying techniques. *Cryobiology* **2009**, *59* (1), 113.
- (52) Liu, J.; Lee, G. Y.; Lawitts, J. A.; Toner, M.; Biggers, J. D. Preservation of mouse sperm by convective drying and storing in 3-O-methyl-D-glucose. *PLoS One* **2012**, *7* (1), e29924.
- (53) Lee, K. B.; Park, K. E.; Kwon, I. K.; Tripurani, S. K.; Kim, K. J.; Lee, J. H.; Niwa, K.; Kim, M. K. Develop to term rat oocytes injected with heat-dried sperm heads. *PLoS One* **2013**, *8* (11), e78260.
- (54) Patrick, J. L.; Elliott, G. D.; Comizzoli, P. Structural integrity and developmental potential of spermatozoa following microwave-assisted drying in the domestic cat model. *Theriogenology* **2017**, *103*, 36.
- (55) Lee, P. C.; Zahmel, J.; Jewgenow, K.; Comizzoli, P. Desiccated cat spermatozoa retain DNA integrity and developmental potential after prolonged storage and shipping at non-cryogenic temperatures. *J Assist Reprod Genet* **2022**, *39* (1), 141.
- (56) Klooster, K. L.; Burrue, V. R.; Meyers, S. A. Loss of fertilization potential of desiccated rhesus macaque spermatozoa following prolonged storage. *Cryobiology* **2011**, *62* (3), 161.

- (57) Ushigome, N.; Wakayama, S.; Yamaji, K.; Ito, D.; Ooga, M.; Wakayama, T. Production of offspring from vacuum-dried mouse spermatozoa and assessing the effect of drying conditions on sperm DNA and embryo development. *J Reprod Dev* **2022**, *68* (4), 262.
- (58) Saragusty, J.; Loi, P. Exploring dry storage as an alternative biobanking strategy inspired by Nature. *Theriogenology* **2019**, *126*, 17.
- (59) Comizzoli, P.; Amelkina, O.; Lee, P. C. Damages and stress responses in sperm cells and other germplasm during dehydration and storage at nonfreezing temperatures for fertility preservation. *Mol Reprod Dev* **2022**, DOI:10.1002/mrd.23651 10.1002/mrd.23651.
- (60) Liu, J.; Lee, G. Y.; Lawitts, J. A.; Toner, M.; Biggers, J. D. Live pups from evaporatively dried mouse sperm stored at ambient temperature for up to 2 years. *PLoS One* **2014**, *9* (6), e99809.
- (61) Gil, L.; Olaciregui, M.; Luño, V.; Malo, C.; González, N.; Martínez, F. Current status of freeze-drying technology to preserve domestic animals sperm. *Reprod Domest Anim* **2014**, *49* Suppl 4, 72.
- (62) Flosdorf, E. W.; Mudd, S. Procedure and Apparatus for Preservation in “Lyophile” form of Serum and Other Biological Substances. *The Journal of Immunology* **1935**, *29* (5), 389.
- (63) Sherman, J. K. Freezing and freeze-drying of human spermatozoa. *Fertil Steril* **1954**, *5* (4), 357.
- (64) Sherman, J. K. Freezing and freeze-drying of bull spermatozoa. *Am J Physiol* **1957**, *190* (2), 281.
- (65) Saacke, R. G.; Almquist, J. O. Freeze-drying of bovine spermatozoa. *Nature* **1961**, *192*, 995.
- (66) Sherman, J. K. Improved methods of preservation of human spermatozoa by freezing and freeze-drying. *Fertil Steril* **1963**, *14*, 49.
- (67) Larson, E. V.; Graham, E. F. Freeze-drying of spermatozoa. *Dev Biol Stand* **1976**, *36*, 343.
- (68) Jeyendran, R. S.; Hunter, A. G.; Graham, E. F. Alteration of seminal proteins during freeze-drying of bovine semen. *J Dairy Sci* **1983**, *66* (4), 887.
- (69) Wakayama, T.; Yanagimachi, R. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nat Biotechnol* **1998**, *16* (7), 639.
- (70) Bossi, R. L.; Cabral, M.; Oliveira, M.; Lopes, S.; Hurtado, R.; Sampaio, M.; Geber, S. Ultrastructural analysis of Lyophilized Human Spermatozoa. *JBRA Assist Reprod* **2021**, *25* (3), 473.
- (71) Shahmoradi, E.; Baheiraei, N.; Halvaei, I. Trehalose Attenuates Detrimental Effects of Freeze-Drying on Human Sperm Parameters. *Biopreserv Biobank* **2022**, *20* (1), 31.
- (72) Olaciregui, M.; Luño, V.; Domingo, P.; González, N.; Gil, L. In vitro developmental ability of ovine oocytes following intracytoplasmic injection with freeze-dried spermatozoa. *Sci Rep* **2017**, *7* (1), 1096.
- (73) Palazzese, L.; Gosálvez, J.; Anzalone, D. A.; Loi, P.; Saragusty, J. DNA fragmentation in epididymal freeze-dried ram spermatozoa impairs embryo development. *J Reprod Dev* **2018**, *64* (5), 393.
- (74) Kwon, I. K.; Park, K. E.; Niwa, K. Activation, pronuclear formation, and development in vitro of pig oocytes following intracytoplasmic injection of freeze-dried spermatozoa. *Biol Reprod* **2004**, *71* (5), 1430.
- (75) Nakai, M.; Kashiwazaki, N.; Takizawa, A.; Maedomari, N.; Ozawa, M.; Noguchi, J.; Kaneko, H.; Shino, M.; Kikuchi, K. 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* (1), 15.
- (76) Keskintepe, L.; Pacholczyk, G.; Machnicka, A.; Norris, K.; Curuk, M. A.; Khan, I.; Brackett, B. G. Bovine blastocyst development from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Biol Reprod* **2002**, *67* (2), 409.

- (77) Hara, H.; Abdalla, H.; Morita, H.; Kuwayama, M.; Hirabayashi, M.; Hochi, S. Procedure for bovine ICSI, not sperm freeze-drying, impairs the function of the microtubule-organizing center. *J Reprod Dev* **2011**, *57* (3), 428.
- (78) Olaciregui, M.; Luño, V.; Gonzalez, N.; De Blas, I.; Gil, L. Freeze-dried dog sperm: Dynamics of DNA integrity. *Cryobiology* **2015**, *71* (2), 286.
- (79) Watanabe, H.; Asano, T.; Abe, Y.; Fukui, Y.; Suzuki, H. Pronuclear formation of freeze-dried canine spermatozoa microinjected into mouse oocytes. *J Assist Reprod Genet* **2009**, *26* (9-10), 531.
- (80) Ringleb, J.; Waurich, R.; Wibbelt, G.; Streich, W. J.; Jewgenow, K. Prolonged storage of epididymal spermatozoa does not affect their capacity to fertilise in vitro-matured domestic cat (*Felis catus*) oocytes when using ICSI. *Reprod Fertil Dev* **2011**, *23* (6), 818.
- (81) Kaneko, T.; Ito, H.; Sakamoto, H.; Onuma, M.; Inoue-Murayama, M. Sperm preservation by freeze-drying for the conservation of wild animals. *PLoS One* **2014**, *9* (11), e113381.
- (82) Hirabayashi, M.; Kato, M.; Ito, J.; Hochi, S. Viable rat offspring derived from oocytes intracytoplasmically injected with freeze-dried sperm heads. *Zygote* **2005**, *13* (1), 79.
- (83) Muneto, T.; Horiuchi, T. Full-term Development of Hamster Embryos Produced by Injecting Freeze-dried Spermatozoa into Oocytes. *Journal of Mammalian Ova Research* **2011**, *28* (1), 32.
- (84) 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. et al. Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits. *Biol Reprod* **2004**, *70* (6), 1776.
- (85) Choi, Y. H.; Vamer, D. D.; Love, C. C.; Hartman, D. L.; Hinrichs, K. Production of live foals via intracytoplasmic injection of lyophilized sperm and sperm extract in the horse. *Reproduction* **2011**, *142* (4), 529.
- (86) Olaciregui, M.; Gil, L. Freeze-dried spermatozoa: A future tool? *Reprod Domest Anim* **2017**, *52* Suppl 2, 248.
- (87) Kaneko, T.; Nakagata, N. Relation between storage temperature and fertilizing ability of freeze-dried mouse spermatozoa. *Comp Med* **2005**, *55* (2), 140.
- (88) Kawase, Y.; Araya, H.; Kamada, N.; Jishage, K.; Suzuki, H. Possibility of long-term preservation of freeze-dried mouse spermatozoa. *Biol Reprod* **2005**, *72* (3), 568.
- (89) Kawase, Y.; Suzuki, H. A study on freeze-drying as a method of preserving mouse sperm. *J Reprod Dev* **2011**, *57* (2), 176.
- (90) Kaneko, T.; Serikawa, T. Long-term preservation of freeze-dried mouse spermatozoa. *Cryobiology* **2012**, *64* (3), 211.
- (91) Kamada, Y.; Wakayama, S.; Shibasaki, I.; Ito, D.; Kamimura, S.; Ooga, M.; Wakayama, T. Assessing the tolerance to room temperature and viability of freeze-dried mice spermatozoa over long-term storage at room temperature under vacuum. *Sci Rep* **2018**, *8* (1), 10602.
- (92) Wakayama, S.; Ito, D.; Kamada, Y.; Yonemura, S.; Ooga, M.; Kishigami, S.; Wakayama, T. Tolerance of the freeze-dried mouse sperm nucleus to temperatures ranging from -196 °C to 150 °C. *Sci Rep* **2019**, *9* (1), 5719.
- (93) Wakayama, S.; Kamada, Y.; Yamanaka, K.; Kohda, T.; Suzuki, H.; Shimazu, T.; Tada, M. N.; Osada, I.; Nagamatsu, A.; Kamimura, S. et al. Healthy offspring from freeze-dried mouse spermatozoa held on the International Space Station for 9 months. *Proc Natl Acad Sci USA* **2017**, *114* (23), 5988.
- (94) Wakayama, S.; Ito, D.; Kamada, Y.; Shimazu, T.; Suzuki, T.; Nagamatsu, A.; Araki, R.; Ishikawa, T.; Kamimura, S.; Hirose, N. et al. Evaluating the long-term effect of space radiation on the reproductive normality of mammalian sperm preserved on the International Space Station. *Sci Adv* **2021**, *7* (24).

- (95) Ogura, A.; Matsuda, J.; Yanagimachi, R. Birth of normal young after electrofusion of mouse oocytes with round spermatids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**, *91* (16), 7460.
- (96) Kimura, Y.; Yanagimachi, R. Mouse oocytes injected with testicular spermatozoa or round spermatids can develop into normal offspring. *Development* **1995**, *121* (8), 2397.
- (97) Ogura, A.; Suzuki, O.; Tanemura, K.; Mochida, K.; Kobayashi, Y.; Matsuda, J. Development of normal mice from metaphase I oocytes fertilized with primary spermatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, *95* (10), 5611.
- (98) Wakayama, T.; Perry, A. C.; Zuccotti, M.; Johnson, K. R.; Yanagimachi, R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* **1998**, *394* (6691), 369.
- (99) Wakayama, T.; Rodriguez, I.; Perry, A. C.; Yanagimachi, R.; Mombaerts, P. Mice cloned from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, *96* (26), 14984.
- (100) Wakayama, T.; Yanagimachi, R. Mouse cloning with nucleus donor cells of different age and type. *Mol Reprod Dev* **2001**, *58* (4), 376.
- (101) Yanagimachi, R. Fertilization and developmental initiation of oocytes by injection of spermatozoa and pre-spermatozoal cells. *Ital J Anat Embryol* **2005**, *110* (2 Suppl 1), 145.
- (102) Wakayama, S.; Ito, D.; Hayashi, E.; Ishiuchi, T.; Wakayama, T. Healthy cloned offspring derived from freeze-dried somatic cells. *Nat Commun* **2022**, *13* (1), 3666.
- (103) Wakayama, S.; Ito, D.; Ooga, M.; Wakayama, T. Production of mouse offspring from zygotes fertilized with freeze-dried spermatids. *Sci Rep* **2022**, *12* (1), 18430.
- (104) Konno, S.; Wakayama, S.; Ito, D.; Kazama, K.; Hirose, N.; Ooga, M.; Wakayama, T. Removal of remodeling/reprogramming factors from oocytes and the impact on the full-term development of cloned embryos. *Development* **2020**, *147* (15).
- (105) Kamimura, S.; Inoue, K.; Mizutani, E.; Kim, J. M.; Inoue, H.; Ogonuki, N.; Miyamoto, K.; Ihashi, S.; Itami, N.; Wakayama, T. et al. Improved development of mouse somatic cell nuclear transfer embryos by chlamydocin analogues, class I and IIa histone deacetylase inhibitors†. *Biol Reprod* **2021**, *105* (2), 543.
- (106) Ogonuki, N.; Kyogoku, H.; Hino, T.; Osawa, Y.; Fujiwara, Y.; Inoue, K.; Kunicda, T.; Mizuno, S.; Tateno, H.; Sugiyama, F. et al. Birth of mice from meiotically arrested spermatocytes following biparental meiosis in halved oocytes. *EMBO Rep* **2022**, *23* (7), e54992.
- (107) Sakamoto, M.; Ito, D.; Inoue, R.; Wakayama, S.; Kikuchi, Y.; Yang, L.; Hayashi, E.; Emura, R.; Shiura, H.; Kohda, T. et al. Paternally inherited H3K27me3 affects chromatin accessibility in mouse embryos produced by round spermatid injection. *Development* **2022**, *149* (18).
- (108) Ward, M. A.; Kaneko, T.; Kusakabe, H.; Biggers, J. D.; Whittingham, D. G.; Yanagimachi, R. Long-term preservation of mouse spermatozoa after freeze-drying and freezing without cryoprotection. *Biol Reprod* **2003**, *69* (6), 2100.
- (109) Kusakabe, H.; Kamiguchi, Y. Ability to activate oocytes and chromosome integrity of mouse spermatozoa preserved in EGTA Tris-HCl buffered solution supplemented with antioxidants. *Theriogenology* **2004**, *62* (5), 897.
- (110) Kusakabe, H.; Yanagimachi, R.; Kamiguchi, Y. Mouse and human spermatozoa can be freeze-dried without damaging their chromosomes. *Hum Reprod* **2008**, *23* (2), 233.
- (111) Kusakabe, H. Chromosomal integrity and DNA damage in freeze-dried spermatozoa. *Reprod Med Biol* **2011**, *10* (4), 199.

- (112) Kusakabe, H.; Tateno, H. Prevention of high-temperature-induced chromosome damage in mouse spermatozoa freeze-dried using Ca(2+) chelator-containing buffer alkalized with NaOH or KOH. *Cryobiology* **2017**, *79*, 71.
- (113) Men, N. T.; Kikuchi, K.; Nakai, M.; Fukuda, A.; Tanihara, F.; Noguchi, J.; Kaneko, H.; Linh, N. V.; Nguyen, B. X.; Nagai, T. et al. Effect of trehalose on DNA integrity of freeze-dried boar sperm, fertilization, and embryo development after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* **2013**, *80* (9), 1033.
- (114) Olaciregui, M.; Luño, V.; González, N.; Domingo, P.; de Blas, I.; Gil, L. Chelating agents in combination with rosmarinic acid for boar sperm freeze-drying. *Reprod Biol* **2017**, *17* (3), 193.
- (115) Oldenhof, H.; Zhang, M.; Narten, K.; Bigalk, J.; Sydykov, B.; Wolkers, W. F.; Sieme, H. Freezing-induced uptake of disaccharides for preservation of chromatin in freeze-dried stallion sperm during accelerated aging. *Biol Reprod* **2017**, *97* (6), 892.
- (116) Palazzese, L.; Anzalone, D. A.; Turri, F.; Faieta, M.; Donnadio, A.; Pizzi, F.; Pittia, P.; Matsukawa, K.; Loi, P. Whole genome integrity and enhanced developmental potential in ram freeze-dried spermatozoa at mild sub-zero temperature. *Sci Rep* **2020**, *10* (1), 18873.
- (117) Kaneko, T.; Nakagata, N. Improvement in the long-term stability of freeze-dried mouse spermatozoa by adding of a chelating agent. *Cryobiology* **2006**, *53* (2), 279.
- (118) Woelders, H.; Matthijs, A.; Engel, B. Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiology* **1997**, *35* (2), 93.
- (119) Barbas, J. P.; Mascarenhas, R. D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank* **2009**, *10* (1), 49.
- (120) Zhu, Z.; Fan, X.; Pan, Y.; Lu, Y.; Zeng, W. Trehalose improves rabbit sperm quality during cryopreservation. *Cryobiology* **2017**, *75*, 45.
- (121) Dou, M.; Lu, C.; Sun, Z.; Rao, W. Natural cryoprotectants combinations of l-proline and trehalose for red blood cells cryopreservation. *Cryobiology* **2019**, *91*, 23.
- (122) Boothby, T. C.; Tapia, H.; Brozena, A. H.; Piszkiwicz, S.; Smith, A. E.; Giovannini, I.; Rebecchi, L.; Pielak, G. J.; Koshland, D.; Goldstein, B. Tardigrades Use Intrinsically Disordered Proteins to Survive Desiccation. *Mol Cell* **2017**, *65* (6), 975.
- (123) Elbein, A. D.; Pan, Y. T.; Pastuszak, I.; Carroll, D. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* **2003**, *13* (4), 17r.
- (124) Gordon, J. W.; Ruddle, F. H. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science* **1981**, *214* (4526), 1244.
- (125) Quinn, P.; Moinipannah, R.; Steinberg, J. M.; Weathersbee, P. S. Successful human in vitro fertilization using a modified human tubal fluid medium lacking glucose and phosphate ions. *Fertil Steril* **1995**, *63* (4), 922.
- (126) Kusakabe, H.; Szczygiel, M. A.; Whittingham, D. G.; Yanagimachi, R. Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci USA* **2001**, *98* (24), 13501.
- (127) Chatot, C. L.; Lewis, J. L.; Torres, I.; Ziomek, C. A. Development of 1-cell embryos from different strains of mice in CZB medium. *Biol Reprod* **1990**, *42* (3), 432.
- (128) Fernandez-Capetillo, O.; Lee, A.; Nussenzweig, M.; Nussenzweig, A. H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst)* **2004**, *3* (8-9), 959.

- (129) Hara, H.; Tagiri, M.; Hwang, I. S.; Takahashi, M.; Hirabayashi, M.; Hochi, S. Adverse effect of cake collapse on the functional integrity of freeze-dried bull spermatozoa. *Cryobiology* **2014**, *68* (3), 354.
- (130) Sieme, H.; Oldenhof, H.; Wolkers, W. F. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Anim Reprod Sci* **2016**, *169*, 2.
- (131) Oku, K.; Watanabe, H.; Kubota, M.; Fukuda, S.; Kurimoto, M.; Tsujisaka, Y.; Komori, M.; Inoue, Y.; Sakurai, M. NMR and quantum chemical study on the OH...pi and CH...O interactions between trehalose and unsaturated fatty acids: implication for the mechanism of antioxidant function of trehalose. *J Am Chem Soc* **2003**, *125* (42), 12739.
- (132) Cordone, L.; Cottone, G.; Giuffrida, S.; Palazzo, G.; Venturoli, G.; Viappiani, C. Internal dynamics and protein-matrix coupling in trehalose-coated proteins. *Biochim Biophys Acta* **2005**, *1749* (2), 252.
- (133) Jain, N. K.; Roy, I. Effect of trehalose on protein structure. *Protein Sci* **2009**, *18* (1), 24.
- (134) Olsson, C.; Jansson, H.; Swenson, J. The Role of Trehalose for the Stabilization of Proteins. *J Phys Chem B* **2016**, *120* (20), 4723.
- (135) Best, B. P. Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions. *Rejuvenation Res* **2015**, *18* (5), 422.
- (136) Li, C.; Mizutani, E.; Ono, T.; Wakayama, T. Production of normal mice from spermatozoa denatured with high alkali treatment before ICSI. *Reproduction* **2009**, *137* (5), 779.
- (137) Li, C.; Mizutani, E.; Ono, T.; Wakayama, T. An efficient method for generating transgenic mice using NaOH-treated spermatozoa. *Biol Reprod* **2010**, *82* (2), 331.
- (138) Lynch, A. L.; Chen, R.; Dominowski, P. J.; Shalaev, E. Y.; Yancey, R. J., Jr.; Slater, N. K. Biopolymer mediated trehalose uptake for enhanced erythrocyte cryosurvival. *Biomaterials* **2010**, *31* (23), 6096.
- (139) Rao, W.; Huang, H.; Wang, H.; Zhao, S.; Dumbleton, J.; Zhao, G.; He, X. Nanoparticle-mediated intracellular delivery enables cryopreservation of human adipose-derived stem cells using trehalose as the sole cryoprotectant. *ACS Appl Mater Interfaces* **2015**, *7* (8), 5017.
- (140) Kawase, Y.; Iwata, T.; Toyoda, Y.; Wakayama, T.; Yanagimachi, R.; Suzuki, H. Comparison of intracytoplasmic sperm injection for inbred and hybrid mice. *Mol Reprod Dev* **2001**, *60* (1), 74.
- (141) Kaneko, T.; Whittingham, D. G.; Overstreet, J. W.; Yanagimachi, R. Tolerance of the mouse sperm nuclei to freeze-drying depends on their disulfide status. *Biol Reprod* **2003**, *69* (6), 1859.
- (142) Hezavehei, M.; Sharafi, M.; Kouchesfahani, H. M.; Henkel, R.; Agarwal, A.; Esmaeili, V.; Shahverdi, A. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reprod Biomed Online* **2018**, *37* (3), 327.