

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K04310

研究課題名（和文）氷晶径を制御した新規凍結乾燥技術および凍結乾燥細胞の生存率向上

研究課題名（英文）Novel freeze-drying technology with controlled ice crystal size and improvement of viability of freeze-dried cells

研究代表者

上松 天（Uematsu, Sora）

大阪大学・大学院工学研究科・招へい研究員

研究者番号：10867774

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、液滴を真空中に導入して蒸発熱により瞬時に凍結させ、その後昇華させるという微噴凍結乾燥技術を基盤とし、氷晶制御による凍結乾燥細胞の生存率向上を目的とした。検証細胞としてヒト精子およびマウス精子を用いた。まず精子の噴霧条件を決定し、精子を含む凍結乾燥粉体の作製に成功した。しかし凍結乾燥後の精子は運動能を全て失っていた。精子の損傷原因の詳細な調査を行い、噴霧時にはノズル径によって多少の損傷が生じるのに対し、凍結時にはノズル径によらず精子が大きな損傷を受けて運動能を全て失うと判明した。精子には最適な冷却速度が存在し、本研究ではそれを達成できなかったと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

種の保存目的や生殖補助医療において、現在精子は液体窒素を用いて凍結保存されるが、保存コスト削減や輸送簡便化を期待して凍結乾燥保存も研究されてきた。しかし、現在ヒトを含む全ての動物種で、凍結乾燥後の精子を復水して運動性が回復した例は無い。もし精子の運動性が凍結乾燥後も維持されれば、顕微授精よりも低コストで自然選択が働く人工授精や体外受精が可能となる。本研究では精子の運動性を維持した凍結乾燥は未達成であったが、凍結乾燥における精子の損傷原因を詳細に調査したことは、精子に限らず生細胞の凍結乾燥後の生存率向上に向けた今後の研究発展に貢献する内容である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to improve the survival rate of freeze-dried cells by controlling ice crystals, based on Micro Powder Dry technology, in which droplets are introduced into a vacuum, instantly frozen by the heat of evaporation, and then sublimated. Human sperm and mouse sperm were used as validation cells. First, we determined the spraying conditions for sperm, and succeeded in producing freeze-dried powder containing sperm. However, all the freeze-dried sperm lost motility. We conducted a detailed investigation of the cause of sperm damage and found that while spraying caused some damage depending on the nozzle diameter, freezing caused severe damage to the sperm regardless of the nozzle diameter, resulting in the complete loss of motility. It is conceivable that there is an optimal cooling rate for sperm, which could not be achieved in this study.

研究分野：凍結乾燥

キーワード：凍結乾燥 氷晶径 細胞 精子 凍結乾燥保存

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞の凍結乾燥保存

現在、凍結乾燥は食品や製剤の分野で広く利用されているが、成分の劣化や失活など未だ課題は多い。特に生細胞の凍結乾燥保存は実現しておらず、その一因は粗大な氷晶が生成して細胞膜や細胞内小器官を損傷させることにある。そこで、急速冷却による凍結で氷晶を微細化しつつ、急速乾燥により氷晶の成長前に昇華を完了すれば、細胞の損傷を抑制できると考えられた。

(2) 微噴凍結乾燥技術

微噴凍結乾燥技術 (Micro Powder Dry: μ PD) とは、化学物質の溶液などを真空中に噴霧し、溶媒の蒸発熱で液滴を凍結させ、さらに真空中で乾燥させて粉体を得る技術である (アルバック: 特開 2004-232883)。急速冷却による凍結、そして非加熱かつ急速な乾燥により、細胞の損傷を抑制した凍結乾燥が可能と期待された。

(3) 精子の凍結乾燥保存

種の保存目的や生殖補助医療において、液体窒素による精子の凍結保存が実施されてきた。また、保存コスト削減や輸送簡便化を期待して、液体窒素の補充が不要である凍結乾燥保存も研究されてきた。しかし、現在ヒトを含む全ての動物種で、凍結乾燥後の精子を復水して運動性が回復した例は無く、精子の細胞膜が破壊されていることが一因と考えられている (H. Kusakabe et al. PNAS., 98, 13501-13506, 2001)。マウスやラットでは細胞膜が破壊された精子でも顕微授精により生児獲得に成功しているが、顕微授精は高コストで精子の自然選択が働かない。もし精子の運動性が凍結乾燥後も維持されれば、顕微授精よりも低コストで自然選択が働く人工授精や体外受精が可能となり、種の保存や生殖補助医療の発展に寄与すると期待された。

2. 研究の目的

本研究では、微噴凍結乾燥技術を基盤として、氷晶制御による凍結乾燥細胞の生存率向上を目的とした。検証細胞としては、細胞質が最も少なく運動という機能が明確な精子細胞が好適と考え、ヒト精子およびマウス精子を用いた。

3. 研究の方法

(1) 精子懸濁液の調製

本研究で用いたヒト精子は、大阪大学医学部附属病院倫理審査委員会の承認を受けたうえで (番号 18456)、生殖補助治療における余剰精子を患者の同意を得て使用した。マウス精子は、マウスから切除した精巣上部尾部を培地に浸し、培地へ移動した運動精子を使用した。

μ PD 噴霧凍結乾燥実験では、マウスの体外受精で使用される THY medium から不要成分を除いた保存溶液に、洗浄したヒト精子を懸濁して使用した。また、凍結乾燥から保護する目的で、トレハロース、さらにアセトアミドを添加した溶液を使用した噴霧凍結乾燥実験も別途実施した (表 1)。

μ PD 噴霧実験および μ PD 噴霧凍結実験では、ヒト精子で一般的に使用される ORGIO® Sperm Wash に、洗浄したヒト精子を懸濁して使用した。

液体窒素中への噴霧凍結実験では、HEPES-buffered saline (pH7.4) およびそれにトレハロース 150 m mol/L を添加した溶液に、マウス精子を懸濁して使用した。

(2) μ PD 噴霧凍結乾燥実験

μ PD 実験機を用いて、ヒト精子懸濁液を噴霧凍結乾燥した (図 1)。事前に安定して真空中に噴霧できる噴霧条件を調査しておき、内径 50 μ m のノズルを使用して (図 2)、シリジポンプを使用して一定噴霧流量 0.750 mL/min で精子懸濁液 2 mL を真空中へ噴霧した。その後、プログラム (表 2) に従い乾燥した。コールドトラップには液体窒素を使用した。凍結乾燥した精子は蒸留水で乾燥前の溶液濃度になるように再水和して評価に供した。

(3) 凍結粒子の氷晶調査

μ PD 実験機内にラマン分光器のプロープを設置し、(2)と同じ噴霧条件で純水を凍結させた氷粒子に対してラマン分光測定を行うことで、氷がアモルファス化しているかを調査した。

Table 1. Spray-freeze-drying medium.

Ingredients	Concentration (g/L)
NaCl	6.976
KCl	0.356
KH ₂ PO ₄	0.162
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.293
NaHCO ₃	2.106
Na pyruvate	0.055
Glucose	1.000
Trehalose	56.75
Acetamide	5.907

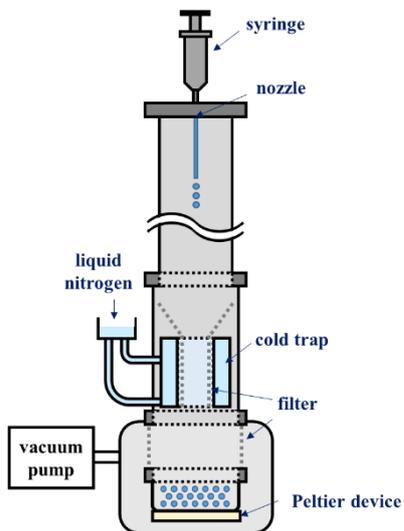


Fig. 1. Experimental apparatus of μ PD.

(4) μ PD 噴霧実験

μ PD 実験機の噴霧機構を用いて、ヒト精子懸濁液 0.5~2 mL を大気中で噴霧した。ノズル内径の精子損傷への影響を調べるため、内径 50、100、200 μ m のノズルを使用した。ノズルを通過する速度を同一にするため、噴霧流量はノズル径に応じて調整した (表 3)。

Table 3. Flow rates of spraying.

Nozzle diameter (μ m)	50	100	200
Flow rate (mL/min)	0.750	3.00	12.0

(5) μ PD 噴霧凍結実験

μ PD 実験機を用いて、ヒト精子懸濁液 2 mL を噴霧凍結してすぐに氷粒子を回収し、37°C の湯浴で融解させた。噴霧実験と同様に、3 種のノズルおよび噴霧流量を使用した。比較として、液体窒素により従来法で凍結させた精子を併せて評価した。

(6) 液体窒素への噴霧凍結実験

μ PD 実験機の噴霧機構を用いて、マウス精子懸濁液 2 mL を大気中から液体窒素中へ噴霧して凍結させた (図 3)。漏斗の出口にステンレスメッシュを取り付けた回収機構を使用し、液体窒素中から氷粒子を回収して 37°C の湯浴で融解させた。内径 100 μ m のノズルを使用し、噴霧流量は 3.00 mL/min とした。

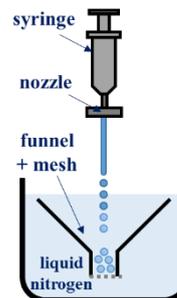


Fig. 3. Experimental apparatus of spray-freezing into liquid nitrogen.

(7) 精子評価手法

運動能の評価のため、光学顕微鏡およびマクラー精子カウントチャンバーを用いて、運動精子数を全体数で除することで、精子の運動率を算出した。乾燥粉体の観察は走査電子顕微鏡 (SEM) を用いた。精子断面の観察は透過電子顕微鏡 (TEM) を用いた。TEM 観察サンプルは、ジェノスタッフ製 iPGell® を用いて精子を固定、樹脂埋めし、マイクロトームで超薄切して作製した。精子細胞膜の損傷評価には Thermo Fisher Scientific 製 LIVE/DEAD™ Sperm Viability Kit を用いた。精子のミトコンドリア活性の評価には同仁化学研究所製 JC-1 MitoMP Detection Kit を用いた。

4. 研究成果

(1) 精子凍結乾燥粉体の作製

μ PD によりヒト精子を含む凍結乾燥粉体の作製に成功した。SEM による粉体観察により、粉体中に精子が含まれることを確認した (図 4)。しかし、凍結乾燥粉体を再水和した精子の運動率は 0% であった。トレハロースのみ、またはトレハロースおよびアセトアミドを添加した場合でも、運動率は 0% であった。この結果を受け、噴霧および凍結の段階ごとに精子が受ける損傷を引き続き調査した。

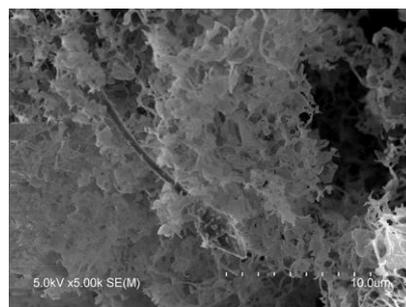


Fig. 4. SEM image of lyophilized sperm.

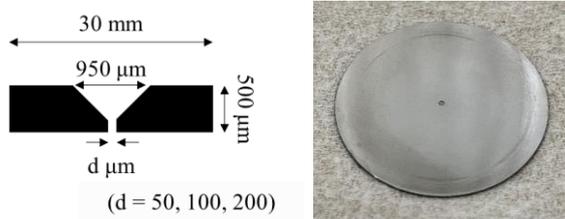


Fig. 2. Size and appearance of nozzles.

Table 2. Process parameters of spray-freeze-drying.

Process	spraying	primary drying	secondary drying	
Peltier temp. (°C)	-20	-10	0	20
Pressure (Pa)	< 1	36	36	36
Time (hr)	-	0.5	10	20

(2) μ PD 噴霧による精子損傷の調査

50 μ m ノズルで噴霧したヒト精子は、噴霧前と比べて有意に運動率が低下したが、100、200 μ m ノズルで噴霧した精子では有意差はなかった (図 5)。さらに、TEM による精子断面観察の結果、50 μ m ノズルで噴霧した精子は精子頭部の先体が崩壊した割合が有意に上昇した (図 6)。精子の長さは 60 μ m 程度のため、それと同程度の孔径を持つノズルでは、噴霧時にノズルとの接触やせん断応力により精子が損傷すると考えられる。

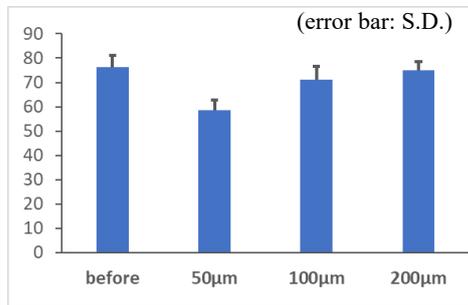


Fig. 5. Motility of unprocessed and sprayed sperm.

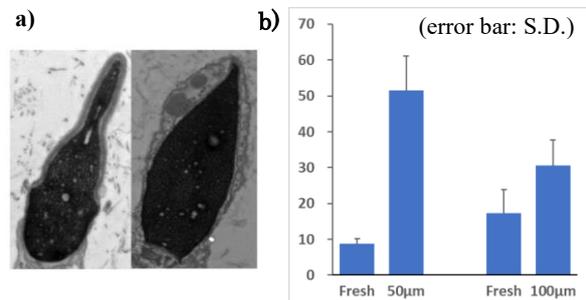


Fig. 6. a) TEM image of acrosomes of unprocessed sperm (left) and sperm sprayed with 50 μ m nozzle (right) and b) their proportions.

(3) μ PD 噴霧凍結による精子損傷の調査

50、100、200 μ m の全てのノズルで、噴霧凍結して融解したヒト精子の運動率は 0%であった。細胞膜の損傷評価の結果、噴霧凍結した精子は全て細胞膜を損傷していると判明した (図 7)。さらに、ミトコンドリア活性評価の結果、噴霧凍結した精子は全てミトコンドリア活性を消失していると判明した (図 8)。ラマン分光測定により、 μ PD で作製した凍結粒子中の氷はアモルファス状態ではなく結晶状態であると明らかになったことから、 μ PD 噴霧凍結による精子損傷の原因は氷晶であると考えられる。一方、液体窒素により従来法で凍結した精子では損傷のない精子も存在していたことから、精子の損傷原因の切り分けを行うため、液体窒素中へ精子を噴霧して凍結する実験を引き続き実施した。

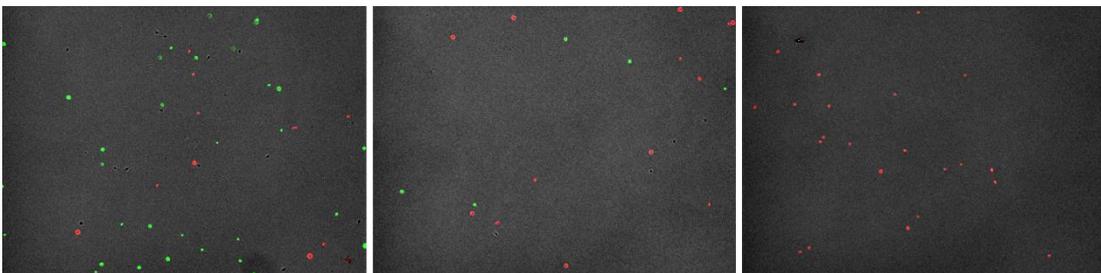


Fig. 7. Images of human sperm viability of unprocessed (left), frozen with LN2 (center) and spray-frozen with 100 μ m nozzle (right). (red: damaged membrane, green: normal membrane)



Fig. 8. Images of human sperm mitochondria activity of unprocessed (left), frozen with LN2 (center) and spray-frozen with 100 μ m nozzle (right). (red: active, green: disactive)

(4) 液体窒素中への噴霧凍結による精子損傷の調査

大気中から液体窒素中へ噴霧して凍結させ、融解したマウス精子の運動率は 0%であった。細胞膜の損傷評価やミトコンドリアの活性評価の結果も (3) と同様で、マウス精子は全て細胞膜を損傷し、ミトコンドリア活性を消失していた。トレハロースを添加した場合でも同様であった。この結果から、 μ PD において凍結時に精子が大きな損傷を受ける原因は、真空中への噴霧や比較的高い冷却到達温度 (-20~-40 $^{\circ}$ C) に限定されないと判明した。具体的には、精子の凍結には最適な冷却速度が存在しており、液体窒素による従来法ではそれを達成しているが、 μ PD や液体窒素中への噴霧凍結ではそれを達成していなかったと考えられる。

(5) 成果のまとめ

本研究では、目的としていた凍結乾燥細胞の生存率向上には至らなかったものの、 μ PD を用いた凍結乾燥における精子の損傷原因を詳細に調査した。精子の長さと同程度の孔径を持つノズルを使用すると、精子は噴霧時に多少の損傷を受けるが、精子の長さより大きな孔径のノズルを使用すれば噴霧時の損傷は防ぐことが可能と判明した。また、 μ PD において精子は特に凍結時に大きな損傷を受け、細胞膜が損傷してミトコンドリア活性を消失し、運動能を失うと判明した。真空中への噴霧および凍結による精子の損傷を調査した報告はこれまでに見当たらず、本研究が最初の報告となる。本研究の調査結果は、今後の凍結乾燥細胞の生存率向上に向けた研究発展に貢献する内容である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 上松 天, 佐治 史恵, 瀧内 剛, 木村 正	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 ヒト精子の凍結乾燥保存に向けた噴霧凍結時の損傷調査	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 低温生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上松 天, 佐治 史恵, 瀧内 剛, 木村 正
2. 発表標題 ヒト精子の凍結乾燥保存に向けた噴霧凍結時の損傷調査
3. 学会等名 第67回 低温生物工学会 大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	西橋 勉 (Nishihashi Tsutomu) (00517469)	大阪大学・工学研究科・招へい研究員 (14401)	削除：2022年3月15日
研究分担者	木村 正 (Kimura Tadashi) (90240845)	大阪大学・医学系研究科・教授 (14401)	
研究分担者	瀧内 剛 (Takiuchi Tsuyoshi) (40733358)	大阪大学・医学系研究科・特任准教授（常勤） (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	佐治 史恵 (Saji Fumie) (40600987)	大阪大学・医学部附属病院・技術職員 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関