

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23510299

研究課題名(和文)哺乳類精子の真空乾燥及び室温保存法の開発：究極の長期室温保存法を目指して

研究課題名(英文)Long-term preservation of mouse spermatozoa at room temperature after vacuum-drying

研究代表者

多田 昇弘(Tada, Norihiro)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50338315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウス精子を室温保存できれば、凍結保存に比べ、保存スペースが少なく済み、液体窒素を補充する必要もなく、輸送も容易である。本研究では、マウス精子の室温保存技術を確立するために、トレハロース及び緑茶ポリフェノールを含む保存液を用いて真空乾燥させたマウス精子を室温保存し、復水後の受精率及び発生率を確認した。また、一部の保存精子について、1年以上の室温保存を行い、産仔の作出も試みた。その結果、トレハロースの室温保存における有効性が明らかになった。また、1年以上(446日)長期室温保存した精子を用いて顕微授精を行い、得られた受精卵の卵管移植により、正常な産仔の作出に成功した。

研究成果の概要(英文)：Cryopreservation of spermatozoa requires elaborate protocols of freezing, the regulation of transport for frozen spermatozoa and addition of LN2 during storage. In this study, we report the fertilizing and developmental abilities of spermatozoa vacuum-dried with the stock solution (Tris-EGTA: TE) containing trehalose (Tr) and epicatechin (Asc), and then stored in the desiccator for 1 week at room temperature. Rehydrated spermatozoa were injected into oocytes using ICSI and embryonic development was followed. The percentages of blastocysts that developed from spermatozoa stored with Tr/TE, Tr+EC+Asc/TE, EC+Asc/TE and TE was significantly higher than spermatozoa without Tr. Two-cell embryos from spermatozoa stored with Tr+EC+Asc/TE for 446 days at room temperature developed to normal live offspring. These results indicate that Tr has a significant beneficial effect in preserving the developmental potential of mouse spermatozoa desiccated and stored at room temperature for long term.

研究分野：生物資源保全学、発生工学、実験動物学

キーワード：マウス 精子 真空乾燥 室温保存 長期保存 トレハロース 顕微授精 受精

1. 研究開始当初の背景

ポストゲノム時代が到来し、遺伝子の機能を明らかにするためのツールとして遺伝子改変マウス(トランスジェニック/ノックアウトマウス)の作製が飛躍的に増加している。それに伴って、これらマウスの系統(ライン)保存として精子の凍結保存が世界的に行われるようになってきた。マウス精子の凍結保存は、1990年にTadaraがラフィノースを凍害保護物質として用いて世界で初めて成功して以来、中潟らによってラフィノースを用いた凍結保存法に改良が加えられ、現在では、“中潟法”として世界的に普及している(Tada N. *et al.*, *J. Reprod. Fert.*, 89, 511-516, 1990; Nakagata N. & Takeshima T., *Exp. Anim.*, 42, 317-320, 1993)。また、近年、動物愛護及び感染防御の観点から、個体ではなく、凍結保存した状態で、遺伝子改変マウス等の精子を大学等の研究機関の間で輸送する機会も世界的に増加している。しかし、従来の凍結保存においては、液体窒素での長期保存がほとんどで、蒸発するため、定期的に保存タンクに液体窒素を補充しなければならない。また、凍結精子を輸送する際もドライシッパー等の特殊な輸送容器に液体窒素を充填して運ばなければならないため、輸送途中に液体窒素の補充もしなければならないため、輸送における労力がかなりかかる。更に、凍結保存後のマウス精子の生存性及び体外受精後の受精率に系統差が認められ、特に、遺伝子改変マウスの一般的な遺伝的背景であるC57BL/6Jマウスの凍結融解後の生存性及び受精率は、極めて低いことが明らかになっている(Thornton CE. *et al.*, *Mamm. Genome*, 10, 987-992, 1999; Szein JM. *et al.*, *Biol. Reprod.*, 63, 1774-1780, 2000)。一方、凍結乾燥したマウス精子を用いたICSIによる産仔作出の成功例は、若山らによって報告されている(Wakayama T. & Yanagimachi R., *Nat. Biotechnol.*, 16,

639-641, 1998)。この保存法も凍結保存法に代わり得る方法として注目されているが、比較的高価な真空凍結乾燥機が必要であること、精子DNAの損傷が顕著であること、及び今のところ室温下での長期保存は不可能であること等の問題がある(Kusakabe H. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 13501-13506, 2001)。また、最近、Biggersのグループは、室温下にて窒素ガスでマウス精子を乾燥させ、-80℃で3ヶ月間保存後、ICSIにより受精卵を得ることに成功し、移植により産仔が得られたことを報告している(Li MW. *et al.*, *Reproduction*, 133, 919-929, 2007)。しかし、この方法でも乾燥させた精子の長期の室温保存は、今だ、成功していない。そこで、本研究では、液体窒素等での保存を必要としない、所謂、室温保存を真空乾燥させた精子で試みることによって、室温下での長期保存、あるいは室温下での輸送が可能になるような方法を確立することを目的として行う。

2. 研究の目的

本研究では、トレハロース、ポリフェノール及びアスコルビン酸を含む保存液を用いて真空乾燥及び室温保存されたマウス精子について、保存後、顕微授精(intracytoplasmic sperm injection; ICSI)を行い、保存精子の受精能及び発生能を確認する。最終的には、精子の凍結保存法及び凍結乾燥法に代わり得る、まったく新規な精子の室温保存法(長期室温保存法)を確立することを目的とする。本法が確立できれば、従来の凍結及び凍結乾燥による保存とは、まったく異なり、液体窒素やドライアイス等のエネルギーを必要とせず、室温下で保存や輸送が可能なので、取り扱いも簡便で安価な次世代の保存法としてマウス精子等の系統保存などに適用できる。

3. 研究の方法

(1)トレハロース、エピカテキン(EC)及びアスコルビン酸を含む保存液の開発

BDF1 マウス (10~16 週齢) より精巢上体尾部を採取し、500 μ l の hepes-mCZB 液に精巢上体尾部精子を懸濁させた後、等量の 2 x α -ヘモリジン溶液を加え、室温、遮光下で 30 分処理することにより精子細胞膜に小孔を開ける。その後、遠心分離を行い、その精子塊にトレハロース(Tr)、エピカテキン(EC)及びアスコルビン酸(Asc)を含む Tris-EGTA 液 (50mM NaCl and 50mM EGTA in 10mM Tris-HCl buffer; pH 8.2) (Kusakabe H. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 13501-13506, 2001)を 200 μ l 加え、静かにピペティングし、精子を懸濁させた。EC は、非常に酸化されやすいので、それを防ぐために抗酸化効果のある Asc を EC と等量添加した。なお、Tris-EGTA 液に加える Tr、EC 及び Asc の濃度は、各々 0.5 ~ 1.5M、50 ~ 400 μ M 及び 50 ~ 400 μ M とした。これらの精子懸濁液を 50 μ l ずつ 24 穴培養プレート(Falcon)の well 中に滴下した後、遮光して、室温下にて 2 時間、真空のデシケーター内で真空乾燥させた。乾燥後、真空のデシケーター内で 1 週間、室温保存した。その後、滅菌ミリ Q 水 500 μ l を well 中に滴下し、乾燥精子を復水させた。これらの真空乾燥精子を用いて BDF1 マウス卵子に ICSI を行うことにより、受精能及び胚盤胞までの発生能を確認した。なお、ICSI により得られた受精卵の一部は、2 細胞期胚に発生した時点で、偽妊娠 0.5 日目のレシピエントマウス (ICR, 8~12 週齢) の卵管に移植した後、胎生 13.5 日目の胎児あるいは新生児への発生能を確認した。

(2) 真空乾燥精子の障害に関する解析

電子顕微鏡的解析

培養プレート内にて、種々の濃度の Tr、EC 及び Asc を含む Tris-EGTA 液で真空乾燥及び室温保存 (1 週間) した精子について電子顕微鏡を用いた解析を行うことにより、精子先体主部、先体赤道部、先体後部鞘及び尾部などの構造的変化を確認した(Wakayama T.

& Yanagimachi R., *Nat. Biotech.*, 16, 639-641, 1998)。

免疫形態学的解析

精子先体及び赤道に局在する MN9 及び MN13 の抗体を用いた免疫蛍光抗体法による形態解析を行うことにより精子頭部の損傷の程度を確認した。

精子 DNA の integrity の確認

精子 DNA の integrity を確認するために sperm chromatin structure assay (SCSA)を行った。SCSA は精子を酸処理して、アクリジンオレンジ染色を行ない、二本鎖 DNA の塩基対に挿入されたアクリジンオレンジは緑に、クロマチン構造が壊れ一本鎖の DNA は赤に染色される特性を利用して精子核の損傷度を測定する手法である。

SYBR14/PI 染色

SYBR14/PI 染色は、細胞膜の破壊の程度を解析する方法で、細胞が生存していて細胞膜が無傷であれば、SYBR Green により緑色の蛍光を発生し、死滅して細胞膜が破壊されていれば、PI で染色されて赤色の蛍光を発生する。この蛍光の違いにより細胞の生死を判定できる (Garner DL *et al.*, *J. Androl.*, 15, 620-629, 1994)。実験 1 で実施した Tr、EC 及び Asc を含む Tris-EGTA 液を用いた真空乾燥精子について SYBR14/PI 染色を行う。Hepes-buffer に懸濁させた精子に 100nM SYBR と 12 μ M PI を加え 37 $^{\circ}$ C で 10 分間培養した後、蛍光顕微鏡下で観察した。

コメットアッセイ

真空乾燥精子を復水後、精子をスライドガラス上のアガロースに包埋してアルカリ処理で溶解した後、アルカリ条件下で電気泳動する。電気泳動すると断片化した DNA は核外へ移動する。DNA 損傷を起こした精子の場合、SYBR Green で蛍光染色すると彗星状の "Comet Tail" を示す。一方、正常な精子 DNA は、アルカリ処理の影響を受けずに、

核内に留まる。このパターンの違いから、個々の精子の DNA 損傷を検証する(Kawase Y. *et al.*, *Biol. Reprod.*, 72, 568-573, 2005)。

(3) 保存容器の検討

24 穴培養プレート他に 1.5ml マイクロチューブ及びスライドグラスについて真空乾燥精子の保存における有効性について検討する。

1.5ml マイクロチューブによる保存
精子を採取し、実験 1 で明らかになった至適濃度の Tr、EC 及び Asc を含む Tris-EGTA 液 (Tea 液) に懸濁させた精子 50 μ l を 1.5ml マイクロチューブ (トレフ) に注入し、遮光した後、真空デシケーター内で 24 時間乾燥させた。その後、キャップをして、シールした後、真空のデシケーター内で 1 週間 ~ 1 年間室温保存した。これらの保存精子について ICSI 後の受精能及び発生能を確認した。

スライドグラスによる保存

Tea 液に懸濁させた精子 20 μ l をスライドグラス (MATSUNAMI) 上のリングマーク (直径 15mm) に滴下した。遮光して、真空デシケーター内で 2 時間乾燥させた後、乾燥した部分にカバー (22x22mm; HybriSlip, Grace Bio-Labs) をし、封入剤オイキッド液で封入した。その後、真空のデシケーター内で 1 週間 ~ 1 年間室温保存した後、マイクロチューブと同様に ICSI 後の受精能及び発生能を確認した。

(4) マウス系統及び種々の形成過程の精子における保存耐性の確認

今までの研究により明らかにされた精子の室温保存に最適の保存液 (Tea 液) 及び保存容器を用い、近交系 (C57BL/6J, BALB/c, C3H/HeN, DBA/2N, CBA/N, A/J, 129/sv) 遺伝子改変マウスの精巢上体尾部精子及び BDF1 マウスの精巢内精子 (円形精子細胞) 精巢上体頭部精子及び子宮内射出精子について、1 週間 ~ 1 年間の室温保存を行い、その後の受精能及び発生能を確認した。

4. 研究成果

(1) トレハロース、エピカテキン (EC) 及びアスコルビン酸を含む保存液の開発

1.0M-Tr., 1.0M-Tr. EC, 1.0M-Tr. Asc. および 1.0M-Tr. EC/Asc. の 4 種の保存液で、7 日間室温保存した精子の ICSI 後の受精率は、各々 100%, 100%, 91.9% 及び 97.6% であり、1.0M-Tr. Asc. が 1.0M-Tr. に比べて有意に低い値を示した。一方、胚盤胞への発生率は、各々 29.2%, 30.6%, 17.6% 及び 29.3% であり、有意な差は認められなかった。更に、1.0M-Tr. Asc. 及び 1.0M-Tr. EC/Asc. の保存液で、約 1 年室温保存した精子から正常な産仔が得られた。

(2) 真空乾燥精子の障害に関する解析

電子顕微鏡的解析

室温保存マウス精子の電子顕微鏡による観察では、4 群間での微細構造に差は認められず、いずれの群においても頭部細胞膜、先体主部の細胞外膜が欠損していることがわかった。

免疫形態学的解析

MN9 及び MN13 抗体を用いた蛍光抗体法による解析でも、4 群すべてにおいて、ほとんどの精子で頭部細胞膜が破壊されていることがわかった。

精子 DNA の integrity の確認

SCSA では、いずれの群においても精子の DNA damage は少なく、ICSI 後の受精能及び発生能との関連性は認められなかった。

SYBR14/PI 染色

各群の真空乾燥精子について、SYBR14/PI 染色を行ったところ、各群すべての精子は PI で染色され、死滅していることがわかった。

コメットアッセイ

各群の真空乾燥精子について、実施したが、すべての群の精子で "Comet Tail" は認められなかった。このことから精子の DNA 損傷は極めて少ないものと推測された。

(3) 保存容器の検討

マイクロチューブで保存した場合の胚盤胞への発生率は、1M Tr+EC+Asc/TE 及び 1M Tr/TE で、各々29.3%及び 29.2%であった。一方、スライドグラスで保存した場合の胚盤胞への発生率は、1M Tr+EC+Asc/TE, 1M Tr/TE, EC+Asc/TE 及び TE を 50 μ l 滴下した群で、各々14.6%, 6.4%, 0%及び 0%であり、20 μ l 滴下した群では、各々25.0%, 23.1%, 1.5%及び 0%が胚盤胞へ発生した。また、1M Tr+EC+Asc/TE 保存液にて、マイクロチューブ内で長期室温保存(446日)した精子から、正常な産子が得られた。以上の結果から、1M Tr を含む保存液が、マイクロチューブ及びスライドグラスで共に真空乾燥・室温保存精子由来受精卵の胚盤胞までの発生率が比較的良好であったことから、Tr の精子の室温保存における有効性が認められた。また、Tr を含む保存液で1年以上の室温保存した精子でも、正常な産子が得られることが明らかになった。

(4) マウス系統及び種々の形成過程の精子における保存耐性の確認

7日間室温保存した C57BL/6J、BALB/c、C3H/HeN および DBA/2N のマウス精子の受精率は、各々95.8%、100%、91.7%および 90.0%であった。また、2cell への発生率は、各々95.7%、96.9%、100%および 94.4%であり、受精能および2cell への発生率において、系統間に有意な差は認められなかった。一方、胚盤胞への発生率は、各々13.0%、59.4%、50%および 5.6%であり、BALB/c および C3H/HeN マウスの室温保存精子の胚盤胞への発生率は比較的良好であったが、C57BL/6J および DBA/2N マウス精子では低値を示し、系統差が認められた。

<引用文献>

Tada N, Sato M, Yamanoi J, Mizorogi T, Kasai K and Ogawa S. Cryopreservation of mouse spermatozoa in the presence of

raffinose and glycerol. *J. Reprod. Fert.* 89, 1990, 511-516

Nakagata N and Takeshima T. Cryopreservation of mouse spermatozoa from inbred and F1 hybrid strains. *Exp. Anim.* 42, 1993, 317-320

Thornton CE, Brown SD and Glenister PH. Large numbers of mice established by in vitro fertilization with cryopreserved spermatozoa: implications for genetic resource banks, mutagenesis screens, and mouse backcrosses. *Mamm. Genome* 10, 1999, 987-992

Sztejn JM, Farley JS, Mobraaten LE. In vitro fertilization with cryopreservation inbred mouse sperm. *Biol. Reprod.* 63(6), 2000, 1774-1780

Wakayama T and Yanagimachi R. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nat. Biotechnol.* 16, 1998, 639-641

Kusakabe H, Szczygiel MA, Whittingham DG, Yanagimachi R. Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 2001, 13501-13506

Li MW, Biggers JD, Elmoazzen HY, Toner M, McGinnis L, Lloyd KC. Long-term storage of mouse spermatozoa after evaporative drying. *Reproduction* 133, 2007, 919-929

Garner DL, Johnson LA, Yue ST, Roth BL and Haugland RP. Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. *J. Androl.* 15(6), 1994, 620-629

Kawase Y, Araya H, Kamada N, Jishage K and Suzuki H. Possibility of long-term preservation of freeze-dried mouse spermatozoa. Biol. Reprod. 72(3), 2005, 568-573

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計10件)

1. Tada N, Nakamura E: Mouse offspring resulting from intracytoplasmic sperm injection of spermatozoa vacuum-dried and stored at room temperature. The Asian Federation of Laboratory Animal Science Associations (AFLAS) Congress 2014 (Nov.10~12, Kuala Lumpur, Malaysia, 2014).
2. 中村衣里、多田昇弘：マウス精子の真空乾燥・室温保存に有効な保存液の検討。第107回日本繁殖生物学会大会、2014年8月22日、帯広畜産大学、北海道・帯広市
3. 中村衣里、多田昇弘：マウス精子における3-O-methyl-D-glucoseの真空乾燥・室温保存効果。日本実験動物科学技術さっぽろ2014、2014年5月17日、札幌コンベンションセンター、北海道・札幌市
4. Tada N, Nakamura E.: Birth of Normal live mice derived mouse spermatozoa vacuum-dried and preserved at room temperature for long term. The 3rd World Congress of the International Society for Fertility Preservation (Nov.7-9, Valencia, Spain, 2013).
5. 中村衣里、多田昇弘：室温保存した各種近交系マウス精子の受精能および発生能の比較。第60回日本実験動物学会総会、2013年5月15日、つくば国際会議場、茨城県・つくば市
6. Tada N, Nakamura E: Birth of normal live mice derived mouse spermatozoa vacuum-dried and preserved at room

temperature for long term. The 9th Annual Meeting of Asian Reproductive Biotechnology Society (ARBS) and the 49th Annual Convention of the Philippines Society of Animal Science (PSAS) (Oct.23~28, Manila, Philippine, 2012)

7. 中村衣里、多田昇弘：真空及び常圧乾燥がマウス精子の室温保存後の受精能及び発生能に与える影響。第105回日本繁殖生物学会大会、2012年9月7日、筑波大学、茨城県つくば市
8. 中村衣里、多田昇弘：Trehaloseを含む保存液で室温保存したマウス真空乾燥精子は顕微授精後の受精卵の発生率が改善する。日本実験動物科学・技術九州2012(第59回日本実験動物学会総会)、2012年5月24日、別府国際コンベンションセンター、大分県別府市
9. 中村衣里、多田昇弘：ポリフェノール及びアスコルビン酸の保存液への添加が真空乾燥マウス精子における長期室温保存後の受精能および発生能に及ぼす影響。第104回日本繁殖生物学会大会、2011年9月16日、いわて県民情報交流センター・アイーナ、岩手県盛岡市
10. 中村衣里、外山芳郎、伊藤千鶴、年森清隆、多田昇弘：室温保存したエアードライマウス精子の超微形態学的解析と機能評価。第58回日本実験動物学会総会、2011年5月25日、タワーホール船堀、東京都江東区

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

多田 昇弘 (TADA, NORIHIRO)
順天堂大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：(50338315)