

令和3年 8月 2日

国立大学法人山梨大学

各報道機関 御中

凍結乾燥した精子を薄いシートで保存することに成功

—ハガキで精子を送ることや1冊のアルバムでマウス系統の管理が可能に！—

山梨大学大学院医工農学総合教育部の伊藤大裕大学院生、大学院総合研究部発生工学研究センターの若山照彦教授らの研究グループは、凍結乾燥したマウス精子を薄いプラスチックシートに挟んで保存することに初めて成功しました。本方法を用いれば、数百種類のマウス系統の精子をたった1冊のアルバムに収めて冷凍保存できるため、従来の液体窒素タンクを使った方法に比べマウス系統の管理が容易になります。また常温でも数日間は保存出来き、マウス精子をハガキで他の研究機関へ送ることにも成功しました。この成果はCellの姉妹紙、iScienceに掲載が決まっただけでなく、雑誌側が独自に行う海外プレスリリース論文にも選ばれました。原論文のオンライン掲載は8月5日(木)午前11時(日本時間8月6日(金)午前0時)を予定しています。

タイトル: **Mailing viable mouse freeze-dried spermatozoa on postcards**

(マウス凍結乾燥精子のハガキによる郵送)

本研究のポイント

- 薄いプラスチックシートでマウスの凍結乾燥精子を保存する世界初の方法を開発した
- ポストに投函したハガキからマウスを作出することに初めて成功した
- 数百種類の膨大なマウス系統を、実験にすぐに使えるインスタント精子の状態で、たった1冊のアルバムに保管できるようになった

1. 概要

精子の保存技術は、優良家畜の人工授精や、絶滅危惧種の保全、膨大な数の実験用マウスの系統維持など幅広い分野に求められる技術です。最も一般的な保存方法は、液体窒素タンクや超低温の冷凍庫を利用した凍結保存技術ですが、液体窒素や電力の絶え間ない供給には維持費がかかるだけでなく、震災などで道路の分断や停電が起こると、全ての精子は溶けて利用できなくなってしまいます。

この問題を解決するため、山梨大学の研究グループはマウス精子を使って哺乳類精子の凍結乾燥(フリーズドライ)技術の開発を行ってきました(注1)。近年はこの凍結乾燥技術を使

って、マウス精子を常温（机の引き出しの中）で1年以上保存することや、国際宇宙ステーションで長期間保存することに成功しました（注2）。しかし、これまでの方法にはガラス製のアンプルビンが必要であり（写真A中央）、ガラスが破損し保存に失敗する危険性や、大量の保存には適さないなどの欠点がありました。

本研究では、ガラス製のアンプルビンの代わりに薄いプラスチックシートを使って凍結乾燥精子を保存する技術開発を行いました（写真A右）。このシート保存技術は、破損の心配がないだけでなく作製コストもかかりません。現時点では長期保存するには冷凍庫が必要ですが、非常に薄いため数百種類のマウス系統の精子をたった1冊の“アルバム”の中で保存することも可能になります。数日間であれば常温でも問題なく保存出来るため、ハガキにシートを貼り付けポストへ投函するだけで、マウス精子の国内郵送が簡単に出来ます。液体窒素が必要な従来の輸送方法に比べ、本方法は運搬費用を大幅に削減します。

本プロジェクトは、山梨大学大学院医工農総合教育部の伊藤大裕大学院生、江村里南大学院生、同大学大学院総合研究部生命環境学域の大我政敏助教、同大学大学院総合研究部発生工学研究センターの若山清香助教、若山照彦教授による研究成果です。

2. 研究方法

(1) シート保存方法の開発および保存可能温度と期間の調査

最初に紙やサランラップ、和紙などの上で精子を凍結乾燥し、もっとも適した材質を選び出しました。次に凍結乾燥した精子を載せた材質を薄いプラスチックシートで挟み、圧着しました（写真A右）。このシートを冷凍庫（-30℃）で1日～3ヶ月間、および常温で1日～3日間保存し、保存可能温度と期間を調べました。シートの一部は写真や名刺を収納するアルバム状の冊子体（写真B）の中に入れ、冷凍庫で長期間保存しました。

(2) ハガキを用いた精子の郵送実験

精子を挟んだプラスチックシートを普通のハガキに貼り、ポストに投函しました。温度管理や保護などは一切行っていません。ハガキによる郵送実験は、山梨県内間、および千葉県から山梨県までの2種類行い、コントロール区は、郵送と同期間、研究室の机の引き出しの中で保存した精子を利用しました。

(3) 行った実験内容

それぞれの実験方法については補足説明を参照。

精子のDNA損傷について：シート保存およびガラスアンプルビンで保存した精子のそれぞれについて、核（DNA）にどのような損傷が生じているのか、コメットアッセイ法、 γ H2AX免疫染色、受精能力測定により調べました。

精子の受精能および受精卵の正常性について：シート保存した精子をマウスの卵子に顕微注入し（写真C）、受精率、受精卵の正常性、胚盤胞への発生能力、および産仔への発育能力を調べました。

産仔の正常性について：生まれた子供は1週間ごとに体重を測定しながら成長の様子を観察

しました。また、生まれた子供が大人になった後で交配し、次世代の繁殖能力を調べました。

3. 結果

シート保存した凍結乾燥精子は、冷凍庫（-30℃）であれば3ヶ月間保存しても健康な産仔を多数得ることが可能でした（写真D）。出産率は作製直後の成績と同じであることから、冷凍庫保存であればより長い期間の保存が可能だと思われます。常温の場合、3日間の保存であれば問題なく産仔を得ることができました（表1）。

次に、シート保存した凍結乾燥精子をハガキに貼り付けてポストで郵送した実験では（写真E、F）、ハガキは山梨県内および千葉県ー山梨県間のどちらの場合でも2日以内に届き、どちらの郵送ハガキからも健康な産仔を得ることに成功しました。またその出産率は、郵送をせずに研究室で常温保存しておいた精子と差がありませんでした（表1）。

4. 今後の期待と課題

本研究により精子を非常に薄いプラスチックシートで保存することが可能になりました。たった1冊のアルバムで膨大な数のマウス系統のすべての精子を保管できれば、従来必要であった保管場所、および維持費用の大幅な削減が期待されます。また、ハガキを使用すれば、他の研究機関へ安価で手軽に貴重なマウス系統を分与できるようになるため、マウスを使った研究を促進すると思われます。従来は液体窒素を使って精子を運んでいたため、送料は数百分の1以下（液体窒素を使用した輸送は数万円、ハガキは85円）まで下がります。

しかし現在の技術では、-30℃であれば長期間の保存が可能ですが、常温では3日程度しか保存できません。今後の研究により、常温でも安定して長期間、精子をシートで保存できるようになれば、エアメールでの精子の国際輸送や、常温での精子のアルバム保存が可能となり、世界で使用されると思われます。研究目的で作られた特殊な遺伝子改変マウスを簡単に国際間で分与できるようになれば、全世界的な共同研究が促進されるでしょう。アルバムで保存できる本方法は維持費も保管場所も不要であるため、地域を問わず世界のどこでも遺伝資源の長期保存が可能になります。開発途上国の絶滅危惧種や家畜の原種は人類の貴重な財産であり、将来の子供たちのために永久に保存しなければならないのです（SDGsの2と15に該当）。

しかし家畜精子へ利用した場合、あってはならないことですが、たとえば和牛の精子をポケットの名刺入れに入れて運べば、空港の検疫でも見つからずに海外へ不正に持ち出すことが出来てしまいます。現在はまだ家畜精子の凍結乾燥保存には成功しておらず、本方法による家畜精子の海外への輸出は不可能ですが、今後の技術開発に備えて、法整備や知的財産の保護などが必要になると考えられます。

謝辞 この研究は浅田生殖医学研究助成金、日本学術振興会特別研究員奨励費（JP20J23364）、キャノン財団研究助成プログラム（MS20-0006）などによって実施されました。

Article

Mailing viable mouse freeze-dried spermatozoa on postcards

Mailing viable mouse freeze-dried spermatozoa on postcards

Daiyu Ito, Sayaka Wakayama, Rina Emura, Masatoshi Ooga, Teruhiko Wakayama

伊藤大裕、若山清香、江村里南、大我政敏、若山照彦

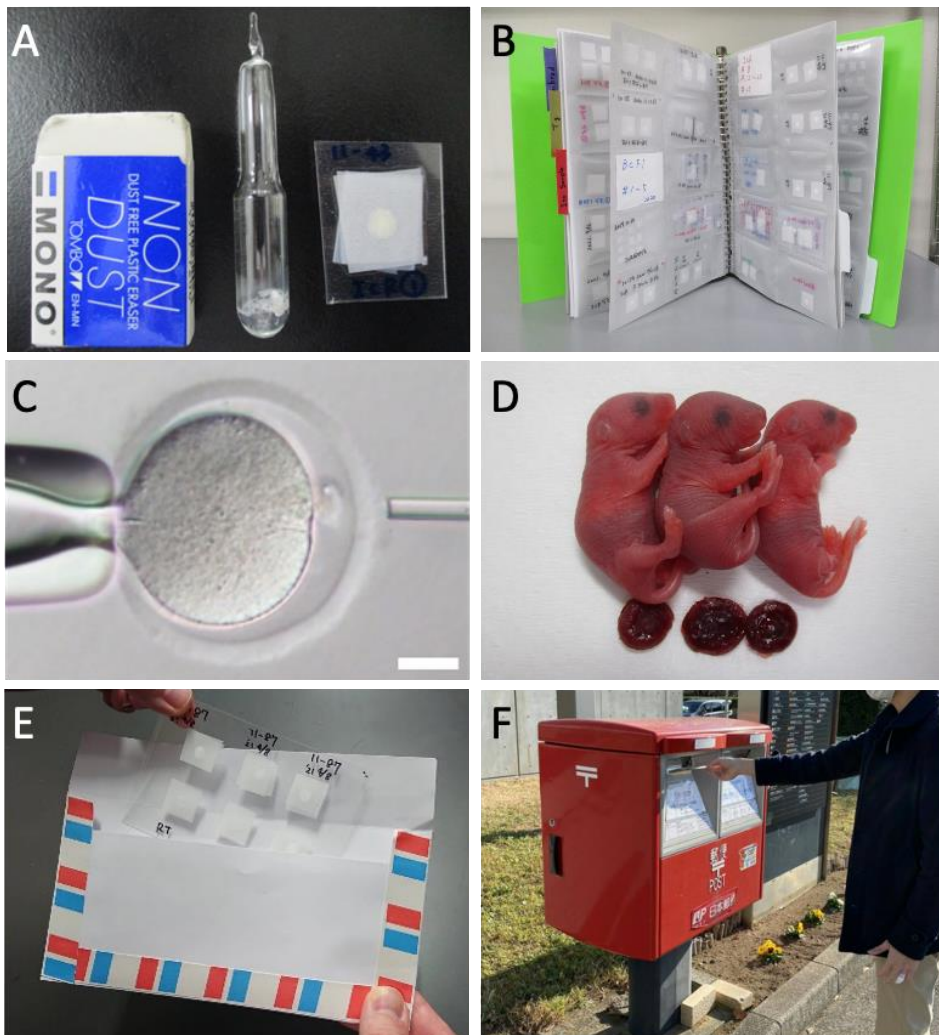


写真. マウス凍結乾燥精子のシート保存とその利用例

A. 従来のガラスアンプル（中央）とシート（右）で保存した凍結乾燥精子。B. シートを名刺入れやアルバムに入れば、1冊で大量のマウス系統を保管することができます。C. シートから回収した精子を卵子内へ注入（顕微授精）。D. 3ヶ月間シート保存した精子から生まれた

マウスの赤ちゃん。E、F.シートをハガキに貼り付けたり封筒に入れたりすれば、ポストで簡単に郵送できるようになります。

表 1. シート保存および郵便配達した凍結乾燥精子によるマウスの作出

郵送	保存温度	精子の 保存期間	顕微授精した 卵子数	正常に 受精した 卵子数(%)	翌日 2 細胞期へ 発生した胚数 (%)	出産数 (%)*
なし	-30℃	1 週間	298	254 (85)	234 (92)	14 (6)
		1 ヶ月	203	145 (71)	98 (68)	14 (14)
		3 ヶ月	182	145 (80)	128 (88)	10 (8)
	常温	3 日	167	140 (84)	100 (71)	5 (5)
山梨県内	常温	1～2 日	106	77 (73)	51 (66)	2 (4)
千葉-山梨		2 日	100	76 (76)	60 (79)	4 (7)

* : 移植した胚に対する出産率

<補足説明>

注 1. 凍結乾燥（フリーズドライ）精子

哺乳類の細胞や精子は凍結乾燥するとすべて死んでしまいます。しかし本研究グループは 1998 年に、凍結乾燥により死んだ精子から健康な産仔を作ることによって初めて成功しました (Wakayama and Yanagimachi, Nature Biotechnology 1998)。この技術によって、それまで液体窒素がなければ保存できなかった精子を常温でも保存できるようになりました。

注 2. 精子の常温保存 および 宇宙ステーション保存

山梨大学の研究グループは 2018 年に、ガラスアンプル瓶の改良により凍結乾燥精子を常温（機の引き出しの中）で 1 年以上保存することに成功しました (Kamada et al., Scientific Reports 2018)。

<https://www.yamanashi.ac.jp/wp-content/uploads/2018/07/20180718pr.pdf>

また、国際宇宙ステーションにマウスの凍結乾燥精子を長期間保存して、宇宙放射線が子孫へどのような影響を与えるのか調べる研究を行いました (Wakayama et al., PNAS 2017, Science Advances 2021)。 [20210607pr.pdf \(yamanashi.ac.jp\)](https://www.yamanashi.ac.jp/wp-content/uploads/2021/06/20210607pr.pdf)

若山研究室の HP : <https://www.ccn.yamanashi.ac.jp/~twakayama/LSHP/index.html>

実験方法

1. 精子 DNA の損傷度の測定（コメットアッセイ）

個々の精子の損傷した DNA 断片を電気泳動で移動させ、蛍光色素により発色させて損傷度

を測定する方法です。核から流れ出た DNA 断片が彗星の尾のように見えることからコメットアッセイと呼ばれています。損傷が多ければゲル中を移動する DNA 量が増え、彗星の尾の長さが伸びます。本研究ではガラスアンプルで保存した精子とシートで保存した精子の DNA をそれぞれ 700 回以上計測しました。

2. 顕微授精による受精能の測定

マイクロマニピュレーターで精子を卵子内へ直接注入して受精させる方法です。運動性の弱い精子などを受精させる不妊治療でも使用される技術です。凍結乾燥処理した精子はすべて死んでしまうため、顕微授精しなければ子供を作ることはできません。もしプラスチックシートを用いた方法が精子の保存に不適切で受精能が失われていたら、卵子内に注入しても受精することはできません。

3. 受精卵における精子由来 DNA の損傷度の測定

DNA に傷が生じると、直ちにその部分のヒストン蛋白がリン酸化されガンマ H2AX (γ H2AX) と呼ばれる状態になります。したがって γ H2AX を認識する抗体で免疫染色を行えば DNA の傷の量を調べることが出来ます。本研究では核全体の相対輝度で測定しました。

4. 受精卵の初期発生能の調査

シート保存した精子で受精した受精卵を 4 日間培養して、胚盤胞期までの初期発生の成績を調べました。

5. シート保存した精子からのマウスの作出と産仔率の測定

シート保存した精子で受精した胚を 2 細胞期に借り腹メスへ移植して出産させ、シート保存後の出産率を調べました。

6. 次世代、次々世代の影響の比較

生まれた産仔を交配し、次世代および次々世代まで産ませることで、繁殖能と子及び孫の正常性を調べました。

(注) カラー写真等がありますので、ご入用の方は下記広報担当までお知らせください。

(本件に関する問い合わせ先)

山梨大学 発生工学研究センター

大学院生 伊藤大裕 g20dib01@yamanashi.ac.jp

教授 若山 照彦 twakayama@yamanashi.ac.jp

TEL : 055-220-8826 FAX : 055-220-8827

(広報担当)

同 総務部総務課広報グループ

TEL : 055-220-8005, 8006 FAX : 055-220-8799

E-mail : koho@yamanashi.ac.jp