

200827017A

厚生労働科学研究費補助金

障害保健福祉総合研究事業

優良補助犬の効率的育成と普及に関する生殖工学的研究

平成20年度 総括研究報告書

研究代表者 鈴木 宏志

平成21(2009)年 4月

厚生労働科学研究費補助金

障害保健福祉総合研究事業

優良補助犬の効率的育成と普及に関する生殖工学的研究

平成20年度 総括研究報告書

研究代表者 鈴木 宏志

平成21(2009)年 4月

目 次

I. 総括研究報告

優良補助犬の効率的育成と普及に関する生殖工学的研究 1

鈴木宏志

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 10

III. 研究成果の刊行物・別刷 11

厚生労働科学研究費補助金（障害保健福祉総合研究事業）
総括研究報告書

優良補助犬の効率的育成と普及に関する生殖工学的研究

主任研究者 鈴木 宏志 帯広畜産大学教授

（研究要約）障害者の社会参加の促進に資するために、補助犬の人工繁殖技術の開発と実用化および補助犬適性の遺伝子レベルでの診断系の開発を果たし、優秀な補助犬の効率的育成とその啓蒙・普及を達成することを目的に、(I)イヌ精子の超急速凍結保存法の開発、(II)盲導犬の人工授精法の普及に関する検討、(III)盲導犬の卵巣移植法の開発、(IV)イヌ胚の凍結保存技術・胚移植技術の開発、および(V)遺伝子多型の解析による盲導犬適性検査法の開発を行った。(I)スキムミルクと糖を基礎とする新規凍結保存液を開発し、これを用いたイヌ精子の人工授精によって産仔を得ることに成功したことを受け、この凍結保存液の実用性の向上を目指して保存液組成の改良を加えた結果、イヌ精子の凍結保存にはトレハロースが最も適していることを明らかにした。(II)人工授精の実用化を果たした。現在までに全国5ヶ所の盲導犬施設で人工授精の試行・実用化の取り組みがなされるに至ったが、最も実用化が進んでいる盲導犬事業所においては、全出産頭数の53%が凍結精子由来の産仔で占められている。また、本年度は、全国の盲導犬協会7施設の繁殖犬、育成犬についてのブルセラ症検査サービスを継続的に提供した。(III)卵巣の異種移植については、マウスの皮下および腎皮膜下が移植部位として優れていることを明らかにした。また、卵子の成熟誘起については、培養時の酸素分圧を低く保つことが効果的であることを明らかにした。(IV)世界で初めて、イヌ凍結融解胚由来の産仔を、しかも非外科的移植によって得ることに成功した。マイクロサテライトマーカーを用いた親子鑑定の結果、得られた産仔とレシピエントの親子関係は否定されるとともに、産仔はドナーに由来することが証明された。(V)9種の性格関連遺伝子の合計19多型について、盲導犬適性との間の関連性の有無を検討した結果、5-HTR1BおよびGLT-1に存在する合計3種類の一塩基多型について、盲導犬群と非盲導犬群の遺伝子頻度に統計学的に有意な差認められた。また、本年度は、4盲導犬事業所の合計122頭を対象に進行性網膜萎縮症の遺伝子診断を実施した結果、14頭(11%)にキャリアーの存在を確認した。

A. 研究目的

障害者の社会参加の促進に資するため、補助犬の人工繁殖技術の開発と実用化および補助犬適性の遺伝子レベルでの診断系の開発を

果たし、優秀な補助犬の効率的育成とその啓蒙・普及を達成する基礎・応用研究を計画する。

身体障害者補助犬の導入によって自立と社

会参加を果たし得る障害者は数多く存在しており、その普及には法体系や社会的受け入れ体制の整備とともに、良質な補助犬の育成体制の整備が不可欠である。我が国の盲導犬は、約 1,000 頭が実働しているが、盲導犬希望者は約 4,800 人と推定されている。盲導犬の安定的・効率的繁殖育成は、最も重要な課題のひとつであるが、現在、全国の盲導犬訓練施設では、優れた雌雄の繁殖犬の確保が困難であること、盲導犬の合格率が低いなどの問題を抱えている。事実、我が国の盲導犬普及率は、欧米先進諸国と比較して 1/2~1/10 程度と極めて低く、まったくの「盲導犬後進国」の状況にある。歴史の浅い他の補助犬の育成、利用に至っては、適切な犬種の選定、繁殖システムなどについて、手探りの状態が続いている。さらに、我が国に導入されているラブラドルトリパーについては、補助犬としては不適格な股関節形成不全症や進行性の網膜萎縮症などの重篤な遺伝性疾患のキャリアーが高頻度で存在するといわれており、実態の把握を含めた緊急な対処を要する状況にある。

適切な資質を有する補助犬の安定的な提供は、我が国の身体障害者の経済社会への一層の進出、貢献を促すものである。本研究の成果は、盲導犬や介助犬などの補助犬、あるいは災害救助犬や麻薬探知犬などの資質向上にも寄与することから、国内の安心・安全で快適な社会の構築への寄与のみならず、大きな国際貢献をも果たす。

B. 研究方法

(1) イヌ精子の超急速凍結保存法の開発

に関する研究：これまでのイヌ精子の凍結保存は、煩雑な操作を要した。主任研究者らは、これまでに平衡時間を 3 時間から 1 時間に短縮することに成功しているが、既存の凍結保存法では、保存液にニワトリの卵黄を用いているため、トリインフルエンザの蔓延によって、凍結精子の輸出入に困難が生じており、化学的組成の明確な新規の凍結保存液の開発が急務となっている。そこで、卵黄の代替として LDL あるいは糖類等を用いた保存液を開発し、遺伝子資源の促進に寄与する。本年度は、保存液組成の最適化のための詳細を検討するとともに、*in vitro* における受精能力検査系の開発に着手する。

(2) 盲導犬の人工授精法の普及に関する研究：大型犬の人工授精においては、精子の子宮体部への注入が困難である。主任研究者らは、ヒト膀胱鏡を用いた経子宮頸管人工授精に成功していることから、全国の盲導犬協会への普及を目指すとともに、規模の小さな盲導犬協会については、人工授精サービスを提供するシステムを実現する。また、海外から導入した凍結精液を用いて盲導犬の改良を図る。

(3) 盲導犬の卵巣移植法の確立：すでにイヌ卵巣の凍結保存法の開発に成功しており、成獣をレシピエントとした場合においてもグラフト（凍結融解卵巣片）の拒絶が少ないことを明らかにしている。本研究においては、新生仔をレシピエントとすることで同種移植の成功率の向上を図るとともに、異種移植による卵胞発育・卵子の成熟誘起の可能性を検討する。

(4) イヌ胚の凍結保存技術、胚移植技術

の開発：これまでにイヌ桑実胚および胚盤胞の凍結保存に成功しているが、本研究においては、イヌ卵子・胚の超急速凍結保存法とヒト膀胱鏡を応用した胚の移植術を確立する。これらの成果によって、避妊手術（卵巣摘出術）に先立って人工授精を施し、胚を凍結保存する雌側からの育種が可能となる。本年度は、特に、胚移植による産仔の獲得を目指すとともに、複数のガラス化保存法について、凍結保存に最適な胚の発生ステージを検討することによって、より適切な胚の凍結融解条件を見出す。

（５）遺伝子多型の解析による盲導犬適性検査法の開発：盲導犬の合格率が30%程度で、しかも補助犬としては不適格な疾患遺伝子のキャリアーが多く存在する我が国のコロニーにおいては、盲導犬適性を遺伝子レベルで検査可能なシステムの開発は重要な課題である。そこで、本研究では、最終年度までに性格関連遺伝子の多型解析対象遺伝子数を20までに拡大するとともに海外（フィンランド）の盲導犬のサンプルも解析対象として比較検討し、盲導犬適性を左右する遺伝子多型を同定する。また、疾患関連遺伝子については、訓練時（若齢）時期には症状を示さないが盲導犬の実働年齢と発症時期が重なる疾患として問題となっている進行性網膜萎縮症の原因遺伝子のスクリーニング系を開発し、罹患個体あるいはキャリアーの摘発を可能とさせる。本年度は本疾患のスクリーニングの実用化を図る。

（倫理面への配慮）

ヒトゲノム・遺伝子解析研究、遺伝子組換え実験には該当しない。動物実験に該当するので、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（文部科学省）、厚生労働省における動物実験等の実施に関する基本指針（厚生労働省）、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（環境省）を遵守して動物愛護上の配慮を行う、また、実験に際しては、国立大学法人帯広畜産大学の動物実験指針に沿った実験計画を立案して、計画書を動物実験委員会に提出し、審査、承認を経て実施する。

C. 研究結果

（１）イヌ精子の超急速凍結保存法の開発に関する研究：卵黄を含む凍結保存液に代わる新規のイヌ精子の凍結保存液の開発に取り組み、これまでに、スキムミルク（30 mg/ml）とグルコース（0.3M）を基礎とする溶液（SG液）で凍結融解したイヌ精子の人工授精によって、正常な産仔を得ることに成功している。そこで、この凍結保存液の実用性の向上を目指して、スキムミルクの濃度、糖の種類および濃度条件について、より詳細に検討した。1.5%～6.0%の濃度のスキムミルクでは、3%の濃度で凍結融解後に最も高い精子の運動性を示した。段階的な濃度勾配を持つ、グルコース、トレハロースあるいはラフィノースを含む保存液を用いて凍結融解後の精子の運動性を解析したところ、それぞれの糖の至適濃度は、0.3M、0.2Mおよび0.2Mであった。それぞれの糖の至適濃度における凍結融解後の運動精子の平均値は、それぞれ55%、75%および62%であり、イヌ精子の凍結保存には、トレハロースが最も適していると考えられた。

凍結融解あるいは凍結乾燥精子の *in vitro* における受精能力の検査系については、マウ

ス卵子に対する顕微授精による前核形成能を指標とする評価の可能性について検討した。その結果、新鮮イヌ精子をマウス卵子に顕微授精した場合には、卵子の異常分割を招くが、凍結精子あるいは凍結乾燥精子の顕微授精においては、この異常分割は抑制されることが認められたことから、イヌ凍結精子および凍結乾燥精子の受精能力の評価にマウス卵子を用いた顕微授精系が利用可能であることが示唆された。

(2) 盲導犬の人工授精法の普及に関する研究：人工授精の実用化を果たした。これまでに、全国5か所の盲導犬施設で人工授精の試行・実用化の取り組みがなされるに至っており、最も実用化が進んでいる北海道盲導犬協会では、全出産頭数の53%が凍結精子由来の産仔で占められている。以上、人工繁殖技術の啓蒙、普及活動の効果が顕性化していると考えられる。

また、繁殖生産性の維持、向上のためには、ネオスポーラ症あるいはブルセラ症などの適切なコントロールが重要な課題であるが、ブルセラ症の迅速、的確な摘発のため、血清抗体法およびPCRによる検査系を確立し、本年度は、全国の盲導犬協会7施設の繁殖犬、育成犬についての検査サービスを継続的に提供した。

(3) 盲導犬の卵巣移植法の確立：凍結融解卵巣の同種移植を施行したラブラドルトリバー新生仔3例(6~9日齢)について、発情兆候の出現を継続して観察中である。

異種移植については、マウスの皮下および腎皮膜下が移植部位として優れていることを明らかにした。1mm角のイヌ卵巣片を、卵巣

を摘出したNOD-SCIDマウスの皮下、腎皮膜下、または卵巣のう内に移植し、移植後11週目に移植片を回収して組織学的に観察した。その結果、非移植区(新鮮卵巣組織)に対する一次卵胞および二次卵胞の割合は、皮下区および腎皮膜下区では増加していたのに対し、卵巣のう区では減少していることが観察された。また、腎皮膜下区の一部の卵巣片では、胞状卵胞への発達が認められた。

卵子の成熟誘起については、培養時の酸素分圧を低く保つことが効果的であることを明らかにした。イヌ卵巣を細切して回収した卵丘-卵子複合体(COC)を種々のプロジェステロン濃度(0-50 ng/ml)のイヌ血清を10%添加したTCM199培地内で、38.5°C、5%CO₂、95%空気(高酸素分圧区)、または38.5°C、5%CO₂、5% O₂、90% N₂(低酸素分圧区)の条件下で72時間培養した後、卵子の成熟率を判定した。その結果、高酸素分圧区においては、成熟卵子(M II)は全く観察されなかったのに対し、低酸素分圧区においては、2.7%の成熟卵子が得られた。また、高酸素分圧区においては93%の卵子が退行変性を示したのに対し、低酸素分圧区におけるその割合は、62%に減少した。また、減数分裂を再開した卵子の割合に、プロジェステロン濃度に依存した傾向は認められなかった。

(4) イヌ胚の凍結保存技術、胚移植技術の開発：世界で初めて、凍結融解胚由来の産仔を、しかも非外科的移植によって得ることに成功した。人工授精を施したドナー個体から子宮・卵管を摘出して胚を回収した。胚は、クライオトップを支持体としてE30S(30%エチレングリコール、0.5 M シュクロース)法でガ

ラス化保存した。融解した合計40個の2~16細胞期胚を、ヒト用の膀胱鏡を用いて、6頭のレシピエントに非外科的に移植した結果、2頭で妊娠が確認され、うち1頭が3頭の産仔を娩出した。3頭の産仔のうち1頭は、分娩遅延によって死亡したが、残りの2頭については離乳に至り、順調に育成が進んでいる。娩出したレシピエントには、2頭のドナー由来の合計7個の胚を移植したが、マイクロサテライトマーカーを用いた親子鑑定の結果、得られた産仔とレシピエントの親子関係は否定されるとともに、産仔は両ドナーに由来することが証明された。また、移植成績の一層の向上のため、DAP213 (2M DMSO、1M アセトアミド、3M プロピレングリコール) とクライオトップを併用した卵子の凍結融解を試みた結果、凍結融解後の生存性の向上を認めた。

卵核胞 (GV) 期卵母細胞の凍結保存について、凍結保存液を DAP213 あるいは E30S とし、胚の支持体をクライオトップあるいはクライオチューブとした組み合わせによる卵子の凍結保存後の生存性について検討した結果、DAP213 を保存液として用い、クライオトップを支持体とした場合に最も高い生存性が得られることが明らかとなった。E30S とクライオトップの組み合わせにおける PI 染色により正常と判定された卵子の割合は、21%であったのに対し、DAP213 とクライオチューブおよび DAP213 とクライオトップにおける正常卵子の割合は、それぞれ4%および44%であった。

(5) 遺伝子多型の解析による盲導犬適性検査法の開発: 盲導犬および非盲導犬 (不合格犬)、それぞれ、海外 (フィンランド) 由来

も含めて約100~200例のDNAサンプルを血液、口腔粘膜細胞あるいは爪から調整し、9遺伝子の19多型について解析を行った。対象とした遺伝子は、ドーパミンD4受容体 (DRD-4; exon I: $p=0.1$, exon II: $p=0.91$)、モノアミン代謝酵素 (MAOB; T199C: Male: $p=0.35$ 、T199C: Female: $p=0.92$)、ドーパミン合成酵素 (TH; G180A: $p=0.15$, C264T: $p=0.65$)、ノルアドレナリン合成酵素、(DBH; C789A: $p=0.51$, A1819G: 両群とも全例がメジャーアリル)、カテコール-O-メチル基転移酵素 (COMT; G39A: $p=0.43$, G216A: $p=0.64$, G482A: $p=0.49$)、セロトニン受容体1B (5-HTR1B; A157C: $p=0.007$, G246A: $p=0.007$, C660G: $p=0.88$, T955C: $p=0.01$)、グルタミン酸輸送体 (GLT-1; C129T: $p=0.24$, T471C: $p=0.02$)、セロトニン受容体1A (HTR1A; T65G: $p=0.39$, C808A: $p=0.38$)、セロトニントランスポーター (SLC6A4; C411T: $p=0.42$) であったが、これらのうち5-HTR1B (A157C, G246A) および GLT-1 (T471C) に存在する合計3種類の一塩基多型について、盲導犬群と非盲導犬群の遺伝子頻度に統計学的に有意な差が認められた。さらに、これら3種類の遺伝子多型について、盲導犬群で有意に頻度の高い遺伝子型すべてを持つイヌの合格率は74%であったが、頻度の高い遺伝子型を全く持たないイヌの合格率は45%という解析結果であった。

ラブラドルリトリバーにおける進行性の網膜萎縮症 (PRA) は、遅発性の進行性桿体-錐体異形成 (pred) タイプであることが明らかにされた (Zangerl *et al.*, 2006) ことから、イヌ染色体9番上の pred 遺伝子を PCR 法によって増幅後、制限酵素 Rsa I および ApaI を用

いた制限酵素断片長多型解析系を確立して、解析サービスの実用化に至った。今年度は、4盲導犬事業所の合計 122 頭を対象に遺伝子の変異の有無を検出した結果、14 頭(11%)にキャリアーの存在を確認した。これらのキャリアー個体は特定の盲導犬事業所に集中していた。

D. 考察

(1) イヌ精子の超急速凍結保存法の開発に関する研究：昨年度の本研究によって開発された SG 液は、凍結融解後の運動性に関して、既存の卵黄を基礎とするイヌ精子保存液と同等かそれ以上の効果を示すこと、および SG 液で凍結融解したイヌ精子の人工授精によって産仔を得ることに成功しているが、本年度は、糖を主成分とする凍結保存液の実用性を向上させる目的で、種々の検討を行った結果、トレハロースがより適切な糖として期待できることが知られた。今後は、より化学的組成の明確な凍結保存液の開発を目指して、スキムミルクの代替となり得る、例えば、カゼインや大豆レシチンなどを用いた検討も必要であると考えられる。また、マウス卵子に対する顕微授精系を用いた凍結あるいは凍結乾燥精子の受精能評価法の開発に着手したが、すでに、予備的検討においては、卵子の細胞質体積を増加させることによって、卵子の異常卵割の割合が大きく低下することも見出ししており、研究材料の入手が困難なイヌ卵子の代替としての利用が期待できる。本研究の成果は、盲導犬のみならず、種々の補助犬の人工授精、遺伝子資源の移動に有効に利用し得ると考えられる。今度の研究の進展によって、すべての種雄犬精子の凍結保存に妥当性を有する凍

結保存法の開発が期待される場所である。

(2) 盲導犬の人工授精法の普及に関する研究：人工繁殖の有用性については、これまでの研究あるいは啓蒙活動によって全国の盲導犬協会の理解が進み、その利用が増加することが十分期待されるが、人工授精の意義、有効性について十分理解しているものの、施設面、経済面あるいは人的要因から、その導入が困難な盲導犬事業所も存在すると考えられる。今後は、そのような比較的規模の小さい盲導犬事業所に対して、適切にサービスを提供でき得るようなシステムの構築が必要である。このような仕組みを整備しつつ、今後、人工繁殖技術の積極的な利用と開発によって、年間 300 頭の盲導犬育成、1,500 頭の現役盲導犬を維持する体制を構築したい。

また、プルセラ症の診断については、全国の盲導犬事業所の需要に対応可能な血清抗体検査および PCR 検査体制を構築し、サービスの提供を継続している。今後とも、人獣共通感染症を中心とした種々の疾患の検査システムを樹立して、盲導犬の安定かつ効率的な供給に寄与したい。

(3) 盲導犬の卵巣移植法の確立：イヌ卵巣のマウスへの異種移植については、腎皮膜下および皮下が移植部位として適当であること、卵子の体外成熟誘起には酸素分圧の低い気相がより適切であることが知られた。すでに、これまでの研究および予備的な実験において、アシアロ化エリスロポエチンの局所、あるいは全身投与が移植卵巣の卵胞保護に有効であること、および外因性の性腺刺激ホルモンの投与によって、胞状卵胞への発達を促すことが可能である成績が得られている。これらの

知見の組み合わせによって、雌性生殖細胞の有効利用が実現することが期待できると思われる。

(4) イヌ胚の凍結保存技術、胚移植技術の開発：E30S 法でガラス化保存したイヌ胚を融解後、ヒト用膀胱鏡を用いて非外科的に胚移植を行った結果、世界で初めて産仔を得ることに成功したことは、特筆すべき成果であると考えられる。また、得られた産仔については、DNA マイクロサテライトマーカーを用いた親子鑑定によって、ドナー個体由来であることを確認したことから、この成果の信憑性はゆるぎのないものとなった。

しかし、胚の非外科的な回収は困難を極めており、今後、適切な胚回収用カテーテルの開発が急がれるところである。

(5) 遺伝子多型の解析による盲導犬適性検査法の開発：盲導犬群で有意に頻度の高い遺伝子多型すべてを持つイヌの合格率は 74%で、これら頻度の高い遺伝子多型を全く持たないイヌの合格率は 45%であったことから、性格関連遺伝子の遺伝子多型が、盲導犬適性の指標となり得ることを示していると思われるが、環境を異にする海外の盲導犬を含めた解析規模の一層の拡大によって、より詳細・正確な情報が提供されるものと考えられる。

現在のところ、PRA の治療法は存在しないため、交配前の遺伝子診断が唯一の解決手段である。本年度の procd の変異の有無のスクリーニングにおいては、解析した盲導犬集団 122 頭の 11% にキャリアが存在すること、また、キャリアは一部の盲導犬事業所に集中していることが明らかとなった。この割合は、これまで信じられていたキャリアの頻度から

比較すると極めて低率である。しかし、健全なコロニーの維持のためには、凍結精液の導入等による、より効率的な交配計画も必要であろう。

E. 結論

研究計画に沿った活動によって、新規のイヌ凍結精子保存液の開発を果たすとともに、人工授精の実用化、普及を進展させた。また、ブルセラ症、進行性網膜萎縮症の診断・検査系を確立し、診断サービスを継続的に提供した。加えて、世界で初めて、凍結胚由来の産仔を、しかも非外科的移植によって得たことは、特筆すべき成果であると考えられる。次年度以降の本研究の遂行によって、一層の優良補助犬の効率的育成と普及に寄与する成果が得られるものと思われる。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 鈴木宏志、川瀬洋介：凍結乾燥によるマウス精子の保存 低温生物工学 54: 21-27, 2008.
- 2) Abe Y, Suwa Y, Ueta YY, Suzuki H: Preimplantation development of embryos in laborador retrievers. *J. Reprod. Dev.* 54: 135-137, 2008.
- 3) Abe Y, Lee DS, Kim SK, Suzuki H: Vitrification of canine oocytes. *J. Mamm. Ova Res.* 25: 32-36, 2008.

- 4) Tachibana M, Watanabe K, Yamasaki Y, Suzuki H, Watarai M: Expression of heme oxygenase-1 is associated with abortion caused by *Brucella abortus* infection in pregnant mice. *Microb. Pathog.* 45: 105-109, 2008.
- 5) Abe Y, Lee DS, Sano H, Akiyama K, Ueta YY, Asano T, Suwa Y, Suzuki H: Artificial insemination with canine spermatozoa frozen in a skim milk/glucose-based extender. *J. Reprod. Dev.* 54: 290-294, 2008.
- 6) Watanabe K, Iwai N, Tachibana M, Furuoka H, Suzuki H, Watarai M: Regulated upon activation normal 1-cell expressed and secreted (RAN1ES) contributes to abortion caused by *Brucella abortus* infection in pregnant mice. *J. Vet. Med. Sci.* 70: 681-686, 2008.
- 7) Watanabe K, Tachibana M, Tanaka S, Furuoka H, Horiuchi M, Suzuki H: Heat shock cognate protein 70 contributes to *Brucella* invasion into trophoblast giant cells that cause infectious abortion. *BMC Microbiol. Biol.* 8: 212, 2008.
- 8) Suzuki H, Ishijima T, Maruyama S, Ueta YY, Abe Y, Saitoh H: Beneficial effect of desialylated erythropoietin administration on the frozen-thawed canine ovarian xenotransplantation. *J. Assist. Reprod. Genet.* 25: 571-575, 2008.
- 9) Tsogetbaatar G, Tachibana M, Watanabe K, Kim S, Suzuki H, Watarai M: Enzyme-linked immunosorbent assay for screening for canine brucellosis using recombinant Cu-Zn superoxide dismutase. *J. Vet. Med. Sci.* 70: 1387-1389, 2008.
- 10) Ishijima T, Abe Y, Suzuki H: Follicular loss of the cryopreserved canine ovary after xenotransplantation. *J. Mamm. Ova Res.* In press.
- 11) Kawase Y, Tachibe T, Hani T, Tateishi H, Jishage K, Suzuki H: Effect of zona incision by Piezo-micromanipulator (ZIP) on the *in vitro* fertilization in 21 transgenic mice lines. *Exp. Anim.* In press.
2. 学会発表
- 1) 阿部靖之、諏訪義典、鈴木宏志：イヌ GV 期卵母細胞および胚のガラス化保存 第 49 回日本哺乳動物卵子学会 S70, 2008.
- 2) 阿部靖之、秋山幸司、浅野智由、鈴木宏志：イヌ卵丘細胞の生存性 北海道実験動物研究会日本実験動物技術者協会北海道支部合同研究会 pp16, 2008.
- 3) 秋山幸司、阿部靖之、鈴木宏志：異種移植および体外成熟によるイヌ未成熟卵母細胞の人為的成熟誘起 北海道実験動物研究会日本実験動物技術者協会北海道支部合同研究会 pp17, 2008.
- 4) 阿部靖之、秋山幸司、浅野智由、鈴木宏志：イヌ卵丘細胞の生存性 第 101 回日本繁殖生物学会大会 j78, 2008.
- 5) 渡部浩之、鈴木宏志、Bhuiyan Mohammad、福井 豊：マウス顕微授精における精子処理が受精、胚発生および染色体正常性に及ぼす影響 第 101 回日本繁殖生物学会大会 j100, 2008.
- 6) 鈴木宏志：身体障害者補助犬の人工繁殖の現状と将来 第 21 回動物生殖工学研究会（熊本シンポジウム）pp4, 2007.
- 7) Abe Y, Suwa Y, Suzuki H: Vitrification of canine embryos at various developmental stages. 41th Annual Meeting, Society for the Study of Reproduction, pp152, 2008.

- 8) Suzuki H, Abe Y, Suwa Y: Preimplantation development of embryos in Labrador Retrievers. 41th Annual Meeting, Society for the Study of Reproduction, pp207, 2008.
- 9) 鈴木宏志：盲導犬の繁殖研究の動向 日本身体障害者補助犬学会 2008 年シンポジウム「補助犬の福祉を考える」－動物福祉の現状と課題－ pp26, 2008.
- 10) 阿部靖之、浅野智由、諏訪義典、鈴木宏志：イヌ胚の凍結保存 第 22 回動物生殖工学研究会 pp4, 2008
- 11) 浅野智由、阿部靖之、鈴木宏志：スキムミルクと糖を用いたイヌ精子の凍結保存 第 22 回動物生殖工学研究会 pp5-6, 2008.
- 12) 血管収縮剤の局所投与を伴う胚の卵管内移植 第 22 回動物生殖工学研究会 pp11-12, 2008.
- 13) 阿部靖之、鈴木宏志：イヌ生殖細胞の凍結保存 - 盲導犬の効率的な繁殖を目指して - 第 14 回日本臨床エンブリオロジスト学会 pp32, 2009.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
該当なし
 2. 実用新案登録
該当なし
 3. その他
該当なし

研究成果の刊行に関する一覧

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
鈴木宏志、川瀬洋介	凍結乾燥によるマウス精子の保存	低温生物学	54	21-27	2008
Abe Y, Suwa Y, Ueta YY, Suzuki H	Preimplantation development of embryos in laborator retrievers.	<i>J. Reprod. Dev.</i>	54	135-137	2008
Abe Y, Lee DS, Kim SK, Suzuki H	Vitrification of canine oocytes.	<i>J. Mamm. Ova Res.</i>	25	32-36	2008
Tachibana M, Watanabe K, Yamasaki Y, Suzuki H, Watarai M	Expression of heme oxygenase-1 is associated with abortion caused by <i>Brucella abortus</i> infection in pregnant mice.	<i>Microb. Pathog.</i>	45	105-109	2008
Abe Y, Lee DS, Sano H, Akiyama K, Ueta YY, Asano T, Suwa Y, Suzuki H	Artificial insemination with canine spermatozoa frozen in a skim milk/glucose-based extender.	<i>J. Reprod. Dev.</i>	54	290-294	2008
Watanabe K, Iwai N, Tachibana M, Furuoka H, Suzuki H, Watarai M	Regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted (RANTES) contributes to abortion caused by <i>Brucella abortus</i> infection in pregnant mice.	<i>J. Vet. Med. Sci.</i>	70	681-686	2008
Watanabe K, Tachibana M, Tanaka S, Furuoka H, Horiuchi M, Suzuki H, Watarai M	Heat shock cognate protein 70 contributes to <i>Brucella</i> invasion into trophoblast giant cells that cause infectious abortion.	<i>BMC Microbiol.</i>	8	212	2008
Suzuki H, Ishijima T, Maruyama S, Ueta YY, Abe Y, Saitoh H	Beneficial effect of desialylated erythropoietin administration on the frozen-thawed canine ovarian xenotransplantation.	<i>J. Assist. Reprod. Genet.</i>	25	571-575	2008
Tsogtbaatar G, Tachibana M, Watanabe K, Kim S, Suzuki H, Watarai M	Enzyme-linked immunosorbent assay for screening for canine brucellosis using recombinant Cu-Zn superoxide dismutase.	<i>J. Vet. Med. Sci.</i>	70	1387-1389	2008
Ishijima T, Abe Y, Suzuki H	Follicular loss of the cryopreserved canine ovary after xenotransplantation	<i>J. Mamm. Ova Res.</i>			In press
Kawase Y, Tachibana T, Hani T, Tateishi H, Jishage K, Suzuki H	Effect of zona incision by Piezo-micromanipulator (ZIP) on the <i>in vitro</i> fertilization in 21 transgenic mice lines.	<i>Exp. Anim.</i>			In press

凍結乾燥によるマウス精子の保存

¹ 帯広畜産大学原虫病研究センターゲノム機能学分野 東京大学大学院医学系研究科発生・医療工学講座² 中外医科学研究所鈴木宏志¹, 川瀬洋介²

Freeze-drying Spermatozoa in Mice

Hiroshi SUZUKI¹ and Yosuke KAWASE²¹Research Unit for Functional Genomics, National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, Hokkaido 080-8555 Japan and

Department of Developmental and Medical Technology, Graduate School of Medicine,

The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033 Japan

²Chugai Research Institute for Medical Science Inc., Gotemba, Shizuoka 412-8513 Japan

Cryopreservation of mouse spermatozoa has been widely applied for maintenance of genetically modified mouse strains. Although cryopreservation of mouse spermatozoa is simpler, less time-consuming, and less costly than of embryos for preservation of the genetic materials, maintenance of cryopreserved spermatozoa still has a high running cost because of the need for a constant supply of liquid nitrogen. In 1998, it has been reported that freeze-dried mouse spermatozoa are capable of participating in normal embryonic development after injection into oocytes, and so they have attracted a great deal of attention as storable gene resources. However, attempts of freeze-dry spermatozoa are not new. Successful conception and full-term development using freeze-dried spermatozoa were reported in the cow and rabbit prior to 1960. Unfortunately, these preliminary results have not been confirmed. Spermatozoa become defective in motility after freeze-drying and are unable to fertilize eggs both in vivo and in vitro. Since freeze-drying of mammalian spermatozoa was demonstrated without loss of genetic or reproductive potential, recent investigations of freeze-dried sperm have focused on the factors affecting freeze-drying spermatozoa in an effort to store the male gamete at ambient temperature. It is particularly essential to assure long-term preservation for several decades or centuries. Recent findings indicate that the pressure levels at primary drying of freeze-dried spermatozoa, in addition to the components of the suspending solution, appears to be an important factor for long-term preservation of freeze-dried spermatozoa in mice.

(Received Sep. 12, 2007; Accepted Apr. 18, 2008)

セミナー「低温と乾燥による生物保存技術への挑戦
〜マミーエンジニアリング」3.

凍結乾燥精子の歴史

[Key words: Mice, Freeze-drying, Spermatozoa;

マウス, 凍結乾燥, 精子]

これまで、精子の凍結保存技術は、ヒトの不妊治療を含めた人工繁殖や遺伝子資源の保存・輸送に大きな貢献を果たしてきた。しかし、凍結乾燥によって精子を室温や冷蔵庫温度で長期間保存することが可能となれば、維持コストの削減は大きく、さらに、封筒などに凍結乾燥精子を入れて容易に送付することが可能となるため、遺伝子資源の保存・輸送における凍結乾燥精子の実用化の期待は大きいように思われる。また、液体窒素は取り扱いに注意が必要である（凍傷、酸欠事故）とともに、一部の国、地域においては、その入手が容易ではない。

凍結乾燥は、凍結状態にある材料から氷を昇華させて水分を除去するプロセスであるが、この技術は、細菌、酵母、ウイルス、および他の生物由来生成物の保存に利用されており、精子の凍結乾燥についても、比較的古い歴史がある。精子の保存への凍結乾燥技術の応用は、1949年に Polge らによって試みられており、彼らは、その受精能力については検定していないものの、50%の凍結乾燥精子が復水（水分の再添加）後に運動性を回復したと報告している¹⁾。さらに、1950年代から1960年代にかけて、ヒト²⁾、ウサギ³⁾、ウシ⁴⁻¹⁰⁾、および野牛¹⁰⁾の凍結乾燥精子に関する多くの報告がなされている。1957年には、Yushchenko によってウサギ凍結乾燥精子による最初の分娩例が報告された。彼は、復水後に15-20%の運動精子を観察し、これらから12例の産仔を得た³⁾。ウシ精子においては、Leidl⁴⁾、Bialy and Smith⁵⁾、Albright ら⁶⁾、および Singh and Roy¹⁰⁾が凍結乾燥精子の運動性の回復を報告している。1959年と1960年には、Meryman のグループが凍結乾燥精子の40-50%が復水後に運動性を示し、人工受精後に受胎に至ったことを示した^{7,8)}。さらに、Larson and Graham は、凍結乾燥精子を25℃で一ヶ月間保存後に、人工授精によって妊娠を確認したことを報告している¹¹⁾。しかしながら、これらの報告については、その後の再現性が確認されておらず^{6,13-15)}。ウシ精子においては、凍結乾燥によって残水量が2%を下回ると受精能力を失うこと¹⁵⁾、および精漿タンパクの3次構造に変化が認められることが報告されている¹⁶⁾。さらに、電子顕微鏡による観察によって、凍結乾燥精子では先体や細胞膜に大きな障害や欠損が生じていることが報告されて以来^{17,18)}、精子は、凍結乾燥によって運動性ととも

vivoあるいはin vitroにおける受精能力を喪失するものと理解されている。

マウス凍結乾燥精子の細胞質内精子注入による産仔獲得の成功

しかしながら、この問題は、細胞質内精子注入技術(Intracytoplasmic sperm injection: ICSI)を応用することによって克服することが可能であった。ICSIは、1995年にKimura and Yanagimachi¹⁹⁾がピエゾマイクロマニピュレータを用いることによって、ICSI後の生存率および受精卵の移植後の産仔への発生率を、それぞれ、80%および30%にまで向上させ、その汎用性を大きく向上させた技術であるが、1998年にWakayama and Yanagimachiによって、マウス凍結乾燥精子をICSIした後、受容雌への移植によって移植胚の30%が産仔に発生したことが報告された¹⁷⁾。凍結乾燥精子では、しばしば、頭部と尾部が離れていたり、細胞膜に障害を認めることから、これまでの一般的な感覚では、死滅細胞と考えるのが普通であるが、ICSIを介してではあるものの、正常な産仔への発生を支持する能力を有しているため、凍結乾燥精子は生存していると理解しなければならない。このように、生殖工学的技術の進歩によって、精子の生死の定義は、かなり曖昧となってきた。

上述したマウスの成功以来、精子の凍結乾燥は、他の哺乳動物でも試みられるとともに、凍結乾燥の至適条件に関する研究が進められている。マウスに加え、ウサギ¹⁸⁾およびラット²⁰⁾において凍結乾燥精子による産仔への発生が報告されているとともに、ブタにおける妊娠例²¹⁾やウシ^{22,23)}やブタ²⁴⁾の胚盤胞までの発生が観察されている。また、ハムスターにおいては、凍結乾燥精子のICSI後に、前核形成が報告されている²⁵⁾。

精子の凍結乾燥の受精能や受精卵子の発生能に影響をおよぼす要因

凍結乾燥精子のICSI後の受精能および受精卵子の発生能に関しては、幾つかの検討がなされている。哺乳動物の正常な受精は、細胞質内カルシウムの周期的な上昇を伴うが、このカルシウムオシレーショ

ンが受精卵の発生にとって重要であることが知られている。マウスあるいはウシの凍結乾燥精子においても、この十分なカルシウムオシレーション誘導能が維持されていることが報告された²⁶⁾。精子によるカルシウムオシレーションの誘導は、精子と卵子との間の膜融合の際に、卵細胞質内に拡散する精子タンパク因子によって惹起されることから、精子の凍結乾燥、復水および ICSI の一連の過程において、精子タンパク因子の活性が維持されていることを示している。また、染色体解析によって、凍結乾燥精子が、染色体レベルでの遺伝的な健全性を比較的良好に維持していることも示されている²⁷⁻³¹⁾。したがって、凍結乾燥法は、哺乳動物精子の保存に有効な手段のひとつであるように思われる。また、凍結乾燥時における EDTA や EGTA などのキレート剤の添加^{21, 27, 28)} や中性あるいは酸性溶液(pH7.4-6.0)よりもややアルカリ性(pH8.0)の溶液の方が²⁹⁾、染色体構造の維持に有効に働くことが報告されている。新鮮精子と比較して、凍結乾燥精子の正常な染色体像の頻度は低い(100% vs 61-83%)が^{27, 29, 30, 32)}、放射線照射に対しては、耐性が高いことが報告されている³⁰⁾。精巣から採取した未成熟精子は、精巣上体に貯蔵されている成熟精子と比較して、凍結乾燥によって障害を受けやすく、染色体レベルでの遺伝的な健全性を失う。しかし、ジアミドによってチオールを酸化してジスルフィドにすることによって、抵抗性を獲得する³³⁾。一方、精巣上体精子をジスルフィド還元剤であるジチオトレイトールで処理することによって、凍結乾燥による障害に対する感受性が亢進する³³⁾。

環境温度下における凍結乾燥精子の長期保存の可能性

遺伝子資源の保存方法のひとつとして、凍結乾燥精子を利用するためには、数年程度の保存性の保証では全く意味を成さず、数十年あるいは数百年にわたる

長期保存の可能性の保証が、重要な課題である。Ward らは、4°C で 18 ヶ月間保存した凍結乾燥精子に由来する産仔を得たことを報告したが³²⁾、より長期間の保存による受精能力あるいは発生支持能を検証することは困難であった。そこで、筆者らは、医薬品の安定性を速度論的に考察するのに利用されている「アレニウスプロット」を用いた加速試験を応用することによって、凍結乾燥精子の長期保存性の予測を実現化した³⁴⁾。加速試験とは、ある温度で長期間保存した物質の化学反応速度を短時間で予測する試験系である。ここでは、マウス凍結乾燥精子に対して 30~50°C の温度を 0~7 日間負荷した後に ICSI を実施し、実測した胚の発生率から得られた分解速度定数をもとに、任意の温度の分解速度定数を算出することで、各温度における凍結乾燥精子の保存期間に対する ICSI 後の胚の発生率を予測した (Table 1)。加速試験の結果、現在汎用されている条件で凍結乾燥した精子を 4°C で 1 年間保存した場合、胚盤胞への発生率は 1%、10 年以上保存すると胚盤胞は得られないとの予測値が得られた。一方、-80°C で凍結乾燥精子を保存した場合には、100 年間保存しても胚盤胞までの発生率の低下は、ほとんどないものと予測された。さらに、実際に 4°C あるいは -80°C で 3 ヶ月間から 2 年間保存した凍結乾燥精子を用いた際の胚の発生率は、予測値とほぼ一致しており^{31, 34-36)}、アレニウスプロットを用いた加速試験を凍結乾燥精子に応用することの妥当性が示されている。また、種々の条件で保存した凍結乾燥精子の DNA の損傷程度について、コメットアッセイを用いて調べたところ、4°C にて 3 ヶ月間および 6 ヶ月間保存した精子には、DNA 損傷を示すコメットテイルが観察されたが、-80°C で保存した凍結乾燥精子と凍結乾燥を施していない新鮮精子においては、コメットテイルを認めなかった (Fig. 1)。4°C にて、長期間保存した凍結乾燥精子から胚盤胞を得ることが困難な原因のひとつは、残存水分による保存期間中の酸化などに起因する精子 DNA の損傷にあると考

Table 1. Estimated rates of development to the blastocyst stage (%) by extrapolation of the Arrhenius plot

Storage temp. (°C)	Storage term						
	0 mo	1 mo	3 mo	6 mo	1 yr	10 yr	100 yr
25	59.00	1.66	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	59.00	42.21	21.60	7.91	1.00	0.00	0.00
-20	59.00	58.19	56.00	54.30	49.86	10.96	0.00
-80	59.00	59.00	59.00	59.00	59.00	59.00	58.99

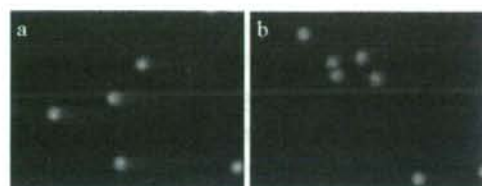


Fig. 1. Comet assay of freeze-dried mouse spermatozoa. Spermatozoa were stored at (a) 4°C, and (b) -80°C for 6 months each. The presence of comet tails in (a) indicates that fragmented DNA is present in these spermatozoa.

えられるが、その詳細は明らかではない。

凍結乾燥精子の長期保存に向けて

液体窒素を用いた精子の凍結保存の代替として凍結乾燥を利用し、その特性を最大限に利用するという観点からは、比較的高い保存温度で長期間保存可能な凍結乾燥条件を見出すことが必須であり、このことが凍結乾燥精子の実用化のための大きな課題であると思われる。比較的高い温度（例えば室温）で長期間保存可能な凍結乾燥条件を見出すためには、添加物を含む凍結乾燥溶液の組成の改良や凍結乾燥時の真空度の変更などがあげられる。なかでも凍結乾燥時の昇華により大部分の水分を除去する一次乾燥期の真空度は極めて重要な条件の一つであると考

えられるが、この条件の検討に関する報告はなされていなかった。これまで、一次乾燥期の真空度は0.03~0.04 mbar (1 bar = 100 kPa)が用いられているが^{18, 24, 27-34)}、これを約10倍程度緩やかにすることによって、凍結乾燥精子の保存性が向上することが示されている(Tables 2, 3)³⁵⁾。筆者らは、一次乾燥期の真空度を0.04 mbar, 0.37 mbar および1.03 mbar に設定して凍結乾燥した精子を、30°Cで3日間あるいは4°Cで6ヶ月間保存後、ICSIによって受精させた卵子の胚盤胞への発生率を比較したところ、凍結乾燥直後の精子の場合は0.04 mbarでは59%, 0.37 mbarでは71%, および1.03 mbarでは33%であった³⁵⁾。また、30°Cで3日間保存後の凍結乾燥精子を用いた場合の胚盤胞への発生率は、0.04 mbarでは20%, 0.37 mbarでは54%, および1.03 mbarでは19%であった³⁵⁾。さらに、4°Cで6ヶ月間保存後の発生率については、0.04 mbarでは13%, 0.37 mbarでは50%, および1.03 mbarでは36%と(Table 2)、いずれの保存条件においても、一次乾燥期の真空度を0.37 mbarにした場合の発生率が、他の実験区に比べて有意に高い成績であった³⁵⁾。発生した胚盤胞の受容雌への移植後の産仔への発生率についても、一次乾燥期の真空度を0.37 mbarとした場合が、統計学的に有意な差異ではないものの、他の実験区と比較して高い傾向が認められた(Table 3)。これらの成績から、4°Cで6ヶ月間保存した凍結

Table 2. Effect of vacuum pressure at primary drying on the in vitro development of embryos generated by ICSI of freeze-dried spermatozoa stored at 4°C for 6 months

Vacuum pressure (mbar)	No. of oocytes injected	No (%) of oocytes survived	No. (%) of oocytes fertilized ^a	No. (%) of embryos developed to 2-cell stage ^b	No. (%) of embryos developed to blastocyst stage ^b
0.04	522	404 (77) ^a	367 (91) ^a	346 (94) ^a	48 (13) ^a
0.37	213	156 (73) ^a	145 (93) ^{ab}	142 (98) ^a	73 (50) ^b
1.03	267	187 (70) ^a	182 (97) ^b	179 (98) ^a	66 (36) ^c

Different superscript letters within a column indicate significantly different values (P<0.05).

^aPercentage of oocytes survived. ^bPercentage of oocytes fertilized.

Table 3. Effect of vacuum pressure at primary drying on the in vivo development of embryos generated by ICSI using freeze-dried spermatozoa

Vacuum pressure (mbar)	Storage temperature (°C)	Sperm storage time (months)	No. of blastocysts transferred	No. (%) of implantation sites	No. (%) of live-term fetuses
0.04	RT	Non-stored	194	137 (71) ^a	58 (30) ^a
0.37	RT	Non-stored	132	93 (70) ^a	48 (36) ^a
1.03	RT	Non-stored	99	70 (71) ^a	20 (20) ^a
0.04	4	6	48	28 (58) ^a	4 (8) ^a
0.37	4	6	73	39 (53) ^a	15 (21) ^a
1.03	4	6	66	56 (85) ^b	16 (24) ^b

Values within a column with the same superscript are not significantly different (P>0.05).

Table 4. Fertilization and development of oocytes by ICSI using air-transported (Japan ⇄ Belgium) freeze-dried spermatozoa

Vacuum pressure (mbar)	No. of oocytes injected	No. (%) of oocytes survived	No. (%) of oocytes fertilized ¹⁾	No. (%) of embryos developed to 2-cell ²⁾	No. of 2-cell transferred	No. (%) of implantation sites	No. of live term fetuses
0.04	180	125 (69) ^a	120 (96) ^a	115 (96) ^a	115	7 (6) ^a	1 (1) ^a
0.37	198	145 (73) ^a	141 (97) ^a	134 (95) ^a	134	43 (32) ^b	22 (16) ^b
1.03	180	119 (66) ^a	114 (96) ^a	108 (95) ^a	108	16 (15) ^a	5 (5) ^a

Values within a column with the same superscript are not significantly different ($P > 0.05$)

Air transportation of the freeze-dried spermatozoa consisted of roundtrip jet service between Japan and Belgium as check-in baggage (12,000 miles, 7 days, mean temperature: 18°C, range: 0.5-27°C).

Freeze-dried spermatozoa were stored at -80°C until use.

¹⁾Percentage of survived oocytes. ²⁾Percentage of fertilized oocytes.

乾燥精子を用いた ICSI 後のマウスの生産効率 (ICSI によって受精した卵子 100 個から得られる産仔数) を算出したところ, 0.04 mbar では 1.1, 0.37 mbar では 10.3, および 1.03 mbar では 8.8 と, 0.37 mbar の生産効率が最も高い成績であった³⁶⁾. これらの成績は, 一次乾燥期の真空度が, 凍結乾燥精子の保存性を左右する重要な因子のひとつであることを明確に示していると考えられる.

おわりに

マウスにおいては, 精子の凍結乾燥の技術開発と並行して, 遺伝子資源の簡便な保存法・輸送法としての実用性の検証も行われている. Wakayama and Yanagimachi は, 3 週間の旅行に凍結乾燥精子を携帯し (この間の環境温度は, 5°C~30°C), 旅行 1 週間後に ICSI を行い, 得られた受精卵を移植した結果, 移植胚の 16%の産仔を得たことを報告している¹⁷⁾. また, 筆者らは, 一次乾燥期の真空度を 0.04 mbar, 0.37 mbar あるいは 1.03 mbar の条件で凍結乾燥したマウス精子を 4°C あるいは -80°C で 2~2.5 年間保存後, 陸路 (1,740 マイル, 5 日間, 平均環境温度: 22°C, 温度幅: 17~24°C) あるいは空路 (12,000 マイル, 7 日間, 平均環境温度: 18°C, 温度幅: 0.5~27°C) で輸送を行い, ICSI 後の発生支持能について検討している (Table 4)³⁶⁾. 一次乾燥期の真空度が 0.04 mbar の場合, 4°C で 2 年間保存されて凍結乾燥精子由来の産仔を得ることはできなかったが, -80°C の保存においては, 2.5 年を経過しても移植胚の 28%が産仔へ発生することが示された³⁶⁾. さらに, 輸送によって環境温度に曝露された凍結乾燥精子においては, 一次乾燥期の真空度が 0.37 mbar であった場合に, 移植胚の 16%が産仔へと発

生した (Table 4). この移植後の発生率は, 十分に実用に耐え得る成績であることから, 一次乾燥を 0.37 mbar として凍結乾燥を行ったマウス精子を -80°C に保存しておくことによって, 環境温度下における数日間の輸送が現実的となったことを示している.

しかしながら, 冷蔵庫温度あるいは室温などの, より高温度における長期間の保存に耐え得る条件は見出されておらず, 一次・二次乾燥期の真空度や懸濁液組成を含む凍結乾燥過程のより詳細な条件検討が求められるところである.

文 献

- 1) Polge, C., Smith, A. U. and Parkes, A. S.: Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature, *Nature*, **164**, 666-667 (1949)
- 2) Sherman, J. K.: Freezing and freeze-drying of human spermatozoa, *Fertil. Steril.*, **5**, 357-371 (1954)
- 3) Yushchenko, N. P.: Proof of the possibility of the spermatozoa in dried state, *Proc. Lenin. Acad. Agr. Sci.*, **22**, 37-40 (1957)
- 4) Leidl, W.: Experiments in freeze-drying of bull semen, In *Proc. 3rd Congr. On Animal Production*, Vol. 3, p. 39-41, Cambridge (1956)
- 5) Bialy, G. and Smith, V. R.: Freeze-drying of bull spermatozoa, *J. Dairy Sci.*, **40**, 739-745 (1957)
- 6) Sherman, J.K.: Freezing and freeze-drying of bull spermatozoa, *Am. J. Physiol.*, **190**, 281-286 (1957)
- 7) Meryman, H.T. and Kafig, E.: Survival of spermatozoa following drying, *Nature*, **184**, 470-471 (1959)
- 8) Meryman, H.T.: Drying of living mammalian cells, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **85**, 729-739 (1960)

- 9) Albright, J.L., Erb, R. and Ehlers, M.H.: Freeze-drying bovine spermatozoa, *J. Dairy Sci.*, **41**, 206 (1958)
- 10) Singh, S.G. and Roy, D.J.: Freeze-drying of bovine semen, *Indian J. Vet. Sci.*, **37**, 1-7 (1967)
- 11) Larson, E.V. and Graham, E.F.: Freeze-drying of spermatozoa. p.343-348. in International symposium of freezing biological products, Vol 36. Cabasso, V.J. and Regamey R.H. (eds.), Karger, S., Basel, Switzerland. (1977)
- 12) Saacke, R.G. and Almquist, J.O.: Freeze-drying of bovine spermatozoa, *Nature*, **192**, 995-996 (1961)
- 13) Nei, T. and Nagase, H.: Attempt to freeze-dry bull spermatozoa, *Low Temp. Sci. Ser. B*, **19**, 107-115 (1961)
- 14) Meryman, H.T. and Kafig, E.: Freeze-drying bovine spermatozoa, *J. Reprod. Fertil.* **5**, 87-94 (1963)
- 15) Jeyendran, R.S., Graham, E.F. and Schmehl, M.K.L.: Fertility of dehydrated bull semen, *Cryobiology*, **18**, 292-300 (1981)
- 16) Jeyendran, R.S., Hunter, A.G. and Graham, E.F.: Alteration of seminal proteins during freeze-drying of bovine semen, *J. Dairy Sci.* **66**, 887-891 (1983)
- 17) Wakayama, T. and Yanagimachi, R.: Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa, *Nat. Biotechnol.*, **16**, 639-641 (1998)
- 18) 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. and Yang, X.: Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits, *Biol. Reprod.*, **70**, 1776-1781 (2004)
- 19) Kimura, Y. and Yanagimachi, R.: Intracytoplasmic sperm injection in the mouse, *Biol. Reprod.*, **52**, 709-720 (1995)
- 20) Hirabayashi, M., Kato, M., Ito, J. and Hochi, S.: Viable rat offspring derived from oocytes intracytoplasmically injected with freeze-dried sperm heads, *Zygote*, **13**, 79-85 (2005)
- 21) Nakai, M., Kashiwazaki, N., Takizawa, A., Maedomari, N., Ozawa, M., Noguchi, J., Kaneko, H., Shino, M. and Kikuchi, K.: Effect 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*, **15**, 15-24 (2007)
- 22) Keskinetepe, L., Hassan, A., Khan, I. Stice, S.L.: Bovine embryo development after lyophilized sperm injection, *Theriogenology*, **55**, 505 (2001)
- 23) Keskinetepe, L., Pacholczyk, G., Machnicka, A., Norris, K., Curuk, M.A., Khan, I. and Brackette, B.G.: Bovine blastocyst development from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa, *Biol. Reprod.*, **67**, 409-415 (2002)
- 24) Kwon, I. K., Park, K.E. and Niwa, K.: Activation, pronuclear formation, and development *in vitro* of pig oocytes following intracytoplasmic injection of freeze-dried spermatozoa, *Biol. Reprod.*, **71**, 1430-1436 (2004)
- 25) Hoshi, K., Yanagida, K., Katayose, H. and Yazawa, H.: Pronuclear formation and cleavage of mammalian eggs after microsurgical injection of freeze-dried sperm nuclei, *Zygote*, **2**, 237-242 (1994)
- 26) Liu, Q.C., Chen, T.E., Huang, X.Y. and Sun, F.Z.: Mammalian freeze-dried sperm can maintain their calcium oscillation-inducing ability when microinjected into mouse eggs, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **328**, 824-830 (2005)
- 27) Kusakabe, H., Szczygiel, M.A., Whittingham, D.G. and Yanagimachi, R.: Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 13501-13506 (2001)
- 28) Kaneko, T. and Nakagata, N.: Improvement in the long-term stability of freeze-dried mouse spermatozoa by adding of a chelating agent, *Cryobiology*, **53**, 279-282 (2006)
- 29) Kaneko, T., Whittingham, D.G. and Yanagimachi, R.: Effect of pH value of freeze-drying solution on the chromosome integrity and developmental ability of mouse spermatozoa, *Biol. Reprod.*, **68**, 136-139 (2003)
- 30) Kusakabe, H. and Kamiguchi, Y.: Chromosomal integrity of freeze-dried mouse

- spermatozoa after ^{137}Cs γ -ray irradiation, *Mutat. Res.*, **556**, 163-168 (2004)
- 31) Kaneko, T. and Nakagata, N.: Relation between storage temperature and fertilizing ability of freeze-dried mouse spermatozoa, *Comparative Med.*, **55**, 140-144 (2005)
- 32) Ward, M.A., Kaneko, T., Kusakabe, H., Biggers, J.D., Whittingham, D.G. and Yanagimachi, R.: Long-term preservation of mouse spermatozoa after freeze-drying and freezing without cryoprotection, *Biol. Reprod.*, **69**, 2100-2108 (2003)
- 33) Kaneko, T., Whittingham, D., Overstreet, J.W. and Yanagimachi, R.: Tolerance of the mouse sperm nuclei to freeze-drying depends on their disulfide status, *Biol. Reprod.*, **69**, 1859-1862 (2003)
- 34) Kawase, Y., Araya, H., Kamada, N., Jishage, K. and Suzuki, H.: Possibility of long-term preservation of freeze-dried mouse spermatozoa, *Biol. Reprod.*, **72**, 568-573 (2005)
- 35) Kawase, Y., Hani, T., Kamada, N., Jishage, K. and Suzuki, H.: Effect of pressure at primary drying of freeze-drying mouse sperm reproduction ability and preservation potential, *Reproduction*, **133**, 841-846 (2007)
- 36) Kawase, Y., Tachibe, T., Jishage, K. and Suzuki, H.: Transportation of freeze-dried mouse spermatozoa under different preservation conditions, *J. Reprod. Dev.* **53**, 1169-1174 (2007)