

### 23) マウスおよびヒト凍結乾燥精子ゲノムの高温耐性獲得に関する研究

研究代表者 日下部博一

#### [背景・目的]

哺乳類の精子や細胞を長期間保存する場合、通常は液体窒素による凍結保存が行なわれる。一方、非凍結条件で室温永久保存するための方法として凍結乾燥法が期待できる。しかしながら、マウスの凍結乾燥精子を室温（25℃）で保存した場合、保存開始から1カ月以内で精子の染色体異常が増加する<sup>1)</sup>。さらに、通常の方法で作製したマウス凍結乾燥精子を50℃で3日間処理すると、DNA 傷害が誘発される<sup>1) 2)</sup>。本研究では、マウスまたはヒト精子の懸濁液を、多糖類のデンプンまたは耐乾燥剤として知られている二糖類のトレハロースを加えて凍結乾燥した。その凍結乾燥精子に高温ストレス（50℃）を3日間与え、精子 DNA に生じる傷害のレベルを単一細胞ゲル電気泳動法（コメットアッセイ）により調べた。今回はマウス凍結乾燥精子の結果を中心に報告する。

#### [材料と方法]

##### 1. 精子

7 週齢以上の雄マウス（B6D2F<sub>1</sub>）の精巢上体尾部を両側から切除し、2つの切除片を 1.2 ml の凍結乾燥

用溶液 [50 mM EGTA + 100 mM Tris-HCl(pH 7.4)]<sup>3)</sup> に加え、インキュベーション (10 分間、37°C) した。ヒトの精液サンプルは 30 分間インキュベーション (37°C) することによって液化させ、その 0.5 ml を 2 ml の凍結乾燥用溶液を含む 15 ml 遠心チューブの底部に静かに加え、さらに 10 分間インキュベーション (37°C) した。マウスおよびヒト精子ともに、運動精子が豊富な懸濁液の上層から 1 ml を回収し、凍結乾燥に使用した。

## 2. 化学物質処理と精子凍結乾燥法

マウス精子を凍結乾燥する場合、3 日から 7 日間冷蔵 (4°C) した精子懸濁液に、凍結乾燥用溶液に溶解したトレハロース (Sigma) または馬鈴薯デンプン (ナカライ) を等量加え、その 0.1 ml を凍結乾燥用ガラスアンプル (Wheaton 製) に加えて液体窒素で予備凍結 (1 分) した。ガラスアンプルを凍結乾燥機 (Labconco 製) に装着して真空乾燥 (4 時間、 $40 \times 10^{-3} \sim 80 \times 10^{-3}$  mbar) した後、熔封した。

ヒト凍結乾燥精子の作製には回収した直後の精子懸濁液を用いた。真空乾燥を 1 時間だけ行い、乾燥サンプルにトレハロースと可溶性デンプン (ナカライ) を加えた後、再度凍結乾燥を行った。

必要に応じて、新鮮な精子懸濁液をメチルメタンスルフォネート (MMS) で 2 時間処理 (200  $\mu$ g/ml、37°C) することにより、陽性対照群を設けた。

## 3. DNA 傷害の検出

凍結乾燥精子の DNA 傷害を検出するため、単一細胞ゲル電気泳動法 (コメットアッセイ) の変法<sup>2) 4)</sup> を行った。凍結乾燥精子を含むガラスアンプルをカットして  $\alpha$ -アミラーゼ (ナカライ) 溶液あるいは蒸留水で再加水し、精子懸濁液を得た。50°C の 1% アガロース 70  $\mu$ l に精子懸濁液を 30  $\mu$ l 加えてよく混和し、スライドガラス上に滴下してカバーガラスをかけた。カバーガラスを除去したスライド標本を細胞溶解液に加えて精子細胞膜やタンパク質を溶解した後、300mM NaOH で 1 分間アルカリ処理を行った。電気泳動は TAE buffer 中で 10 分間 (12V、10 mA) 行ない、精子 DNA の移動を YOYO-1 iodide (インビトロジェン) 染色によって検出した。フリーウェアの解析ソフト (CometScore Freeware version 1.5, TriTek) を用

いて、精子の DNA 傷害のレベル (% tail DNA: percent of DNA in the tail) を測定した。高温ストレス (50°C) を与えた凍結乾燥精子の DNA 傷害性は、Mann-Whitney 検定 ( $p < 0.05$ ) によって新鮮な精子あるいは 4°C で 3 日間冷蔵した凍結乾燥精子と比較された。

### [結果および考察]

マウス凍結乾燥精子を 4°C で 3 日間冷蔵した場合、1M トレハロースまたは 2% 馬鈴薯デンプンで作製した凍結乾燥精子は、新鮮な精子および両物質を加えずに凍結乾燥した精子 (無添加) と同等の DNA 傷害レベルを示した (図 1、図 2)。一方、両物質を加えずに凍結乾燥した精子に高温ストレス (50°C) を 3 日間与えると、DNA 傷害レベルが 4°C で冷蔵したときよりも 4 ~ 5 倍に増加した (図 1、図 2)。しかし、1M トレハロースまたは 2% 馬鈴薯デンプンを加えて作製した凍結乾燥精子は、両物質を加えない場合よりも DNA 傷害レベルがおよそ二分の一程度にまで抑えられたことから (図 1)、両物質には高温ストレスから凍結乾燥精子を守る働きがあり、しかも馬鈴薯デンプンは、耐乾燥剤として知られているトレハロースと同等の能力をもつ可能性も示唆された。

また、トレハロースと可溶性デンプンはヒト凍結乾燥精子に対しても高温耐性を獲得させる可能性が示されたが (データ未掲載)、実験回数が少ないこともあり、今後は可溶性デンプンと馬鈴薯デンプンとの比較も含

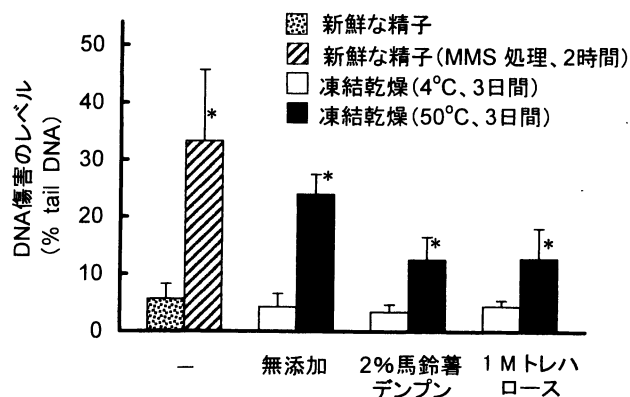


図 1 馬鈴薯デンプンとトレハロースで作製した凍結乾燥精子の高温処理(°C)による DNA 傷害誘発性  
DNA 傷害レベルは、3 回の実験の平均値 (1 実験あたり 100 comets) と SD で示す。\* Mann-Whitney 検定で有意差 ( $p < 0.05$ ) あり。

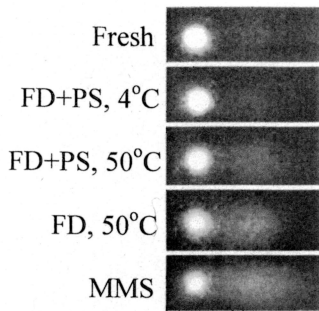


図2 マウス精子のコメット像

Fresh : 新鮮な精子、FD : 凍結乾燥精子、  
FD+PS : 2%馬鈴薯デンプンで凍結乾燥した精  
子、MMS : メチルメタンсульフォネートで処  
理 (200  $\mu$ g/ml) された新鮮な精子

めた再確認が必要である。加えて、多糖類が本当に凍結乾燥精子に高温耐性を獲得させることができるのかについては、凍結乾燥精子の染色体正常性と受精卵の発生能をみることによって正確に評価できるものと思われる。

[参考文献]

- 1) Kusakabe H: Chromosomal integrity and DNA damage in freeze-dried spermatozoa. *Reprod Med Biol* 10:199-210, 2011.
- 2) Kusakabe H and Tateno H: Characterization of chromosomal damage accumulated in freeze-dried mouse spermatozoa preserved under ambient and heat stress conditions. *Mutagenesis* 26:447-453, 2011.
- 3) Kusakabe H, Kamiguchi Y and Yanagimachi R: Mouse and human spermatozoa can be freeze-dried without damaging their chromosomes. *Hum Reprod* 23:233-239, 2008.
- 4) Kusakabe H and Tateno H: Shortening of alkaline DNA unwinding time does not interfere with detecting DNA damage to mouse and human spermatozoa in the comet assay. *Asian J Androl* 13:172-174, 2011.