

最終報告

未来への財産である動物遺伝子資源を永久に保存する技術の開発

研究代表者：若山 照彦 山梨大学発生工学研究センター センター長・教授

共同研究者：幸田 尚 山梨大学 生命環境学部・生命工学科 教授
岸上 哲士 山梨大学 生命環境学部・生命工学科 教授
若山 清香 山梨大学発生工学研究センター 助教



1. 研究の背景と達成目標

(1) 研究の狙い

生物の多様性すなわち遺伝資源は人類の未来にとって必要不可欠な財産であり、必要な時が来るまで可能な限り多くの遺伝資源を保存しなければならない。だが動物細胞の保存には液体窒素が必要であり、貯管理費が膨大になるだけでなく、大災害などで液体窒素の供給が止まった場合の対策は存在しない。そこで本研究では精子や卵子、体細胞などを凍結乾燥することで、動物遺伝資源を室温で安全に長期間保存することができる新技術の開発を目指す。

(2) 研究項目毎の目標

①精子の室温保存技術の改良

精子を凍結乾燥すると産仔率が低下してしまう原因を明らかにし、凍結乾燥保護剤の探索や保存容器の開発により産仔率を改善する。また応用を目指し、簡便な精子の輸送方法の開発や、絶対に安全な保存場所について検討する。さらに、凍結乾燥以外の常温保存方法も探索する。

②体細胞の凍結乾燥保存技術の開発

精子や卵子を採取できない個体の場合、クローン技術を用いれば体細胞を遺伝資源にすることができる。しかし精子以外の細胞の凍結乾燥保存には成功していないため、本研究で史上初の成功を目指す。

③卵子の凍結乾燥技術の開発

卵子は巨大な細胞質を有するため、凍結乾燥は最も難しいと考えられており、まだ誰も成功していない。そこで、卵子内へ保護剤を注入する方法や、卵子の核だけを取り出して凍結乾燥する方法を検討する。

2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

①精子の室温保存技術の改良

精子を薄いシート内で保存する技術を開発し、ハガキに貼り付けて輸送することや、プラスチックチューブで保存することに成功した。また国際宇宙ステーションで保存した精子から産仔を得ることに成功し、遺伝資源を月の地下で永久保存する可能性を示した。

②体細胞の凍結乾燥保存技術の開発

精子前駆細胞の凍結乾燥に成功し、精子以外の細胞でも凍結乾燥が可能であることを証明した。この技術をもとに凍結乾燥保存した体細胞からクローンマウスを作り出すことに世界で初めて成功した。

③卵子の凍結乾燥技術の開発

卵子内へ膜透過性のない凍結乾燥保護剤を注入して卵子の内部からも保護させる方法、および卵子の核だけを取り出して凍結乾燥保存する技術を開発し、核置換により初期発生に成功した。

3. 研究成果

① 精子の室温保存技術の改良

精子は、すでに1年以上室温で保存することに成功しているが、生きた精子にくらべ産仔率が1/3に低下してしまう。本方法が世界で信頼性を得て利用されるようになるためには、出産成績を低下させないこと、および長期間保存しても影響がないことを証明しなければならない。そこで本研究では、1. 精子を室温保存した時に生じるダメージの解明、2. それを回避する新しい室温保存方法の開発、3. 壊れない保存容器の開発、および4. この方法を利用した応用研究を実施した。

1. 凍結乾燥で生じるダメージの解明

1-1. FD 精子の DNA ダメージ。凍結乾燥精子と受精した胚には、染色体の分離異常や微小核が高頻度で発生する。この原因を明らかにするためには、異常染色体あるいは微小核を調べる必要があるが、次世代遺伝子 (NGS) 解析では同一細胞内の核と区別できない。そこで細胞の中からわずか

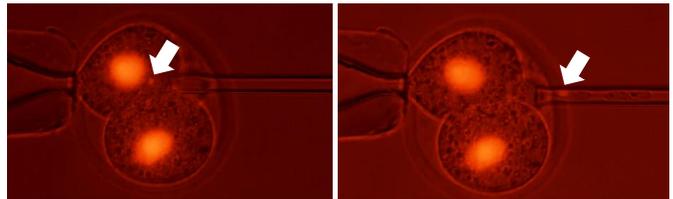


図 1. 受精卵の微小核の抽出方法。矢印は微小

数 μm の微小核を取り出す技術を開発し、その DNA を調べることを試みた。2 細胞期胚に細胞骨格の重合阻害剤を加えの異常染色体 (図 1) を、直径 $5\mu\text{m}$ 程度のガラス管で吸い取ることに成功した。それらの異常染色体に対して DNA-seq 解析を行った結果、特定の染色体に偏ることはなく、ランダムに染色体が千切れて異常染色体になっていることが明らかとなった (投稿中)。

1-2. 乾燥によるダメージ。凍結乾燥による精子 DNA へのダメージが全工程のどこで起こるのか明らかにするため、精子を凍結しないで真空乾燥処理を行い、凍結しただけの非乾燥精子と比較した。精子を凍結せずに乾燥させると、水分は急速に蒸発し乾燥状態になった。この精子から産仔を得ることに初めて成功したが、その成績は凍結乾燥精子に比べ低下した。乾燥せず凍結だけ行った精子による産仔率は、新鮮精子を用いた場合とほぼ同程度だった。急速な乾燥が原因なのか調べるために、乾燥時の温度や液量を変更した結果、産仔率は乾燥速度が遅いほど高くなった。これらの結果から、精子 DNA にダメージを与える工程は凍結より乾燥の方であり、凍結乾燥はゆっくり行った方がよいことが明らかとなった (Ushigome et al., 2022)。

1-3. 精子への加水方法。次に全工程の中で全く調べられたことのない、凍結乾燥精子への加水時の DNA ダメージについて検討した。すでに上記の研究から、乾燥工程はゆっくり行った方がよいことが分かっており、逆の加水工程についても、急激な加水



図 2. 加水方法の改良により産仔率が改善され

は良くないと考えられた。最初に、高分子化合物 (PVP) を加え粘性を高めた水で加水することで浸透速度を遅くしてみたところ、産仔率は逆に低下してしまった。そこで、今度は浸透速度を早くするために加温した水で加水する実験を行った。一般的に精子は高温に弱いため、体温以上に加熱することは禁忌とされている。だが我々は最高 90°C まで加温した水で加水してみた。その結果、精子の DNA ダメージは 50°C まで加温すると最も低くなり、それ以上では逆にダメージが増加した。この 50°C の水で加水した精子で受精させると、産仔率は最高で 36% まで改善された (図 2)。従来の凍結乾燥精子による産仔率は 20% 程度

なので、2 倍近く改善されたことになる（投稿準備中）。

2. 新しい凍結乾燥保存方法の開発

2-1.保護剤を精子内部へ浸透させてから凍結乾燥。凍結乾燥でよく使われる乾燥保護剤はトレハロースなどの糖類である。しかしこれらの凍結乾燥保護剤は細胞膜を通過できないため、細胞の外からしか保護することが出来ない。そこで精子の細胞膜をアルカリ処理で溶かしてからトレハロースに浸すことを試みた。最初に細胞膜を除去しても受精や発生に影響のないアルカリ処理方法を確立した。次に最適トレハロース濃度を検討した結果、産仔率は未処理区より2倍以上高くなった（投稿準備中）。

2-2.精子のガラス化保存の試み。凍結乾燥は食品や医薬品など広く使われている確立した技術だが、高額な凍結乾燥機が必要である。一方、お菓子のアメは糖がガラス化したものであり、常温で長期間保存できる。そこで精子のガラス化保存方法の開発を試みた。1.0Mトレハロースに精子を加え、10~100 μ lのドロップを作り、デシケーター内で24時間乾燥させ後で表面や硬さを確認した（図3）。同時に作ったドロップだが、表面がつるつるのもの、ひびが入ったもの、粘性が残っているものなど様々な形態を示した。このドロップを室温のデシケーター内で1~3週間保存してから精子を回収し受精させたところ、最長で14日間ガラス化状態で保存した精子から産仔を得ることに成功した。脱酸素剤や密封などにより保存期間を伸ばすことが出来れば、凍結乾燥より優れた方法になるだろう。



図 3. ガラス化保存した精子。左：つるつる。右：ひび割れ

2-3.微生物の凍結乾燥方法を利用。酵母などは凍結乾燥後に加水すると生き返ることが知られている。そこで酵母の凍結乾燥に使われているグルタミン酸ナトリウムをマウス精子の凍結乾燥に利用してみた。その結果、加水後に精子頭部と尾部が分離する物理的ダメージは、未処理区に比べ1/3に低下した。この精子で受精した胚の胚盤胞への発生率は1.8倍に、産仔率は1.6倍にまで改善された。グルタミン酸ナトリウムは酵母の凍結乾燥において膜保護や抗酸化作用に関与しており、おそらく精子に対しても同様の効果があると考えられる。今後、様々な微生物に用いられている乾燥培地について検討する。

3. 保存容器の検討

3-1.プラスチックシートによる保存。

ガラスアンプルビンを用いた凍結乾燥精子技術は、室温で長期間の保存を可能にする優れた方法だが、落とせば割れてしまい試料は失われてしまう。また、アンプルビンは小さいとはいえ保護剤を巻くため場所を取る。



図 4. 精子のシート保存。郵便で送ることも可能になった！

そこで、精子をシートで挟んで保存する方法を開発した。シート保存では真空状態を作れないため、常温での長期保存はまだ出来ない。しかし3日間の室温保存は問題ないこと、薄くて封筒に入れることもできることから、精子の国内輸送コストがほとんど不要になる。また、シートをアルバムなどに入れて冷凍保存すれば、この1冊で数百系統のマウス精子を保存できるようになる（図4）（Ito et al., 2021）。

3-2.汎用チューブによる保存。これまでの凍結乾燥保存には高真空に耐えられる特殊なガラスアンプルビ

ンを用いる必要があり、簡単に入手できないだけでなく単価も高かった。そこで誰でも簡単かつ安価で購入できるプラスチックチューブ（一般的にエッペンチューブと呼ばれている）で精子を凍結乾燥保存することを試みた。このチューブでは真空状態を維持できないため、チューブ内に除湿剤や脱酸素剤を同時に封入することも試みた。残念ながらエッペンチューブでの常温は1週間保存が限界だったが、 -30°C の冷凍庫で保存すれば、9か月間保存しても産仔率は低下しなかった。したがって本方法は、冷凍庫での保存は必要だが作製費用は最も安いと、コスト重視の場合の新たな選択肢になるだろう（Yang et al., 2023）。

4. 精子の宇宙保存

4-1.精子をISSで長期保存。 遺伝資源は人類の未来のために永久保存しなければならない。しかし、候変動や自然災害、戦争や原子力発電所の事故などがある地球上に、遺伝資源を絶対安全に永久保存できる場所はあるのだろうか。そこで我々は、月の地下なら地球で何が起きても遺伝資源を永久保存できると考え、国際宇宙ステーション（ISS）を利用してその可能性を検討した。凍結乾燥精子をISSへ打ち上げ、宇宙放射線に6年間被ばくさせた後に回収し、地上コントロールと精子DNAへのダメージや宇宙精子で生まれた仔の網羅的遺伝子発現を調べた（図5）。ISSで保存した精子は、地上の数百倍の宇宙放射線にさらされたが、受精率や産仔率が低下することはない。網羅的遺伝子発現解析でも、地上と宇宙の精子由来マウスの間には差は見つからなかった。地上で行ったX線照射実験では凍結乾燥精子は30Gyまで放射線に耐性があることがわかり、これをリファレンスとすることで、凍結乾燥精子はISSで200年は保存可能なことが明らかとなった（Wakayama S. et al., 2021）。

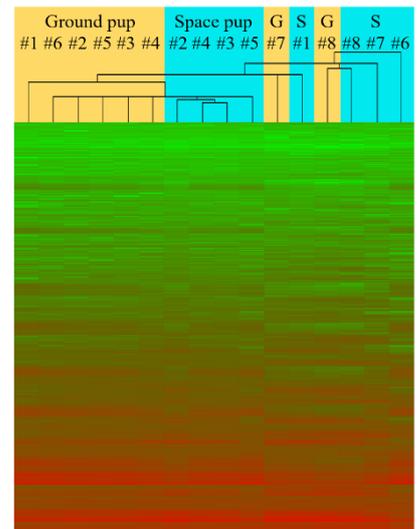


図5. 地上と宇宙で保存した精子由来の仔の遺伝子発現解析。茶色：地上、青：宇宙。ほぼ違いはなかった。

4-2.精子を深宇宙放射線から防護する方法。 凍結乾燥精子には放射線耐性があることが分かったが、より強力な深宇宙放射線が当たる月で長期間保存することは難しい。そこで精子の周りに放射線防護材を置き、深宇宙放射線の代替として鉄重粒子線を照射する実験を行った。最初に、打ち上げコストおよびブラッグピークを考慮して厚さ10cmのポリエチレンで重粒子線の防護を試みたところ、防護なしでは8Gyが産仔を得られる限界値だったが、防護により50Gy照射しても産仔が得られるようになった（黒川ら。学会発表）。しかしポリエチレンは防護材としては優れていても、それ以外の利用ができない。次に、もっと防護効果が高いと思われる水で防護を試みることにした。水は防護以外にも生活用水や燃料にも利用できるだけでなく、月面上で採取可能だと考えられている。厚さ10cmの水槽で重粒子線の防護を試みたところ、驚いたことに150Gy照射した精子からでも産仔を得ることに成功した。150Gyの鉄重粒子線は、放射線過重係数を考慮すると3000Sv相当となる。近年JAXAが発見した月の地下の巨大な溶岩洞には、推定値だが30mSv/年の被ばくがある。したがって、 $3000\text{Sv} \div 30\text{mSv/年} = 10$ 万年は月の地下で遺伝資源を保存できることとなる（古澤ら。学会発表）。（投稿準備中）

② 体細胞の凍結乾燥保存技術の開発

1. 円形精子細胞の凍結乾燥保存。

高齢や不妊などで精子が取れないオスの場合、精巣から精子の前駆細胞である円形精子細胞を採取して顕

微授精により子供を作ることが可能である。だが、細胞の凍結乾燥については、これまで世界中で挑戦されてきたが、まだ精子以外の細胞で成功した例はない。我々は円形精子細胞に対して最適な凍結乾燥条件を見つけ出し、ついに凍結乾燥保存後に産仔を作出することに成功した (Wakayama et al., 2022a)。

2. 体細胞の凍結乾燥保存。

オスと異なりメスの場合、たとえ健康な若い個体であっても卵子をたくさん回収することは出来ない。高齢で不妊になる場合も多い。しかし、どんな年齢や性別、健康状態の個体からでも確実に回収できるのは体細胞であり、クローン技術を用いれば体細胞から子供を作り出せることから、体細胞も遺伝資源とみなすことが出来る。だが、体細胞の凍結乾燥保存には誰も成功していない。我々は試行錯誤の末に、酸化防止剤としてカテキンを加えれば、凍結乾燥後の形態が新鮮な細胞と同じに見えるほど改善された。次に、我々が以前開発した 2 段階核移植法とカテキン処理を合わせた結果、



図 6. 凍結乾燥体細胞から生まれたクローンマウスとその子孫たち

ついに凍結乾燥体細胞から産仔を作ること成功した (図 6)。また絶滅危惧種の場合、一方の性だけしか生き残っていない場合は絶滅が避けられないが、この時の実験では、オスから Y 染色体が抜け落ちメスのクローンを作ることにも成功した。まだ成功率はわずか 0.03% であり冷凍保存でしか成功していないが、この成功によりついに体細胞の凍結乾燥保存の道が開けた (Wakayama et al., 2022b)。

③ 卵子の凍結乾燥技術の開発

1. 卵子の核を保存。精子だけでなく体細胞の凍結乾燥保存に成功したが、卵子についてはまったく成功例が無い。卵子は巨大な細胞であり、凍結乾燥後に細胞膜が破れ、もう手の施しようがなかった。そこで最初に卵子から核を取り出し、それだけを凍結乾燥するための技術開発を行った。加水後に回収した凍結乾燥核を別の新鮮卵子の核と置換することで、再構築卵子を作製した。この再構築卵子を単為発生させると良好な胚盤胞へ発育し、卵子の凍結乾燥も可能であることが示された (図 7)。だが、現時点でこれら再構築卵子から産仔の作出には成功していない。

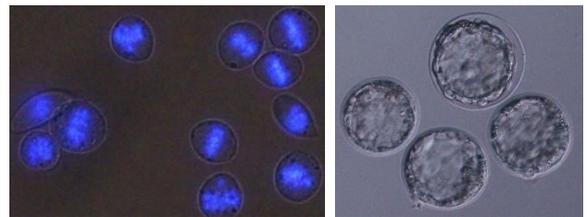


図 7. 凍結乾燥した卵子の核と再構築卵の胚盤胞への発生。左：卵子の核をヘキスト染色。右：凍結乾燥核由来の胚盤胞

2. 卵子への保護剤の注入。トレハロースなどの凍結乾燥保護剤は膜透過性がない。そこであらかじめ卵子内へトレハロースを注入してから凍結乾燥することを試みた。最初に、2M のトレハロースを注入しても受精や発生に影響がない濃度を決定した。次にそれらの卵子を凍結融解してみたが、全く影響なかった。現在凍結乾燥を試みているところである (市川ら。学会発表)。

4. 今後の展開

本研究により動物遺伝資源の室温永久保存の可能性を大きく発展させることが出来た。卵子や体細胞はまだ基礎研究が必要だが、精子については実用レベルにまで到達させることが出来た。今後は精子の室温保存技術が安全かつ低コスト、そして信頼性のある方法であることを全世界に理解してもらい、液体窒素に代わる新たな方法として利用されるよう、実用例などを発表していくことが必要である。体細胞および卵子の凍結乾燥保存は部分的に成功しており、まだ目途は立たないが成功する可能性は高まっている。今後も試行錯誤を繰り返すことで、遺伝資源の室温永久保存技術を確立していく予定である。

5. 発表実績

【論文】

1. Wakayama S, Ito D, Kamada Y, Shimazu T, Suzuki T, Nagamatsu A, Araki R, Ishikawa T, Kamimura S, Hirose N, Kazama K, Yang L, Inoue R, Kikuchi Y, Hayashi E, Emura R, Watanabe R, Nagatomo H, Suzuki H, Yamamori T, Tada MN, Osada I, Umehara M, Sano H, Kasahara H, Higashibata A, Yano S, Abe M, Kishigami S, Kohda T, Ooga M, **Wakayama T**. Evaluating the long-term effect of space radiation on the reproductive normality of mammalian sperm preserved on the International Space Station. *Sci Adv*. 2021 Jun 11;7(24):eabg5554. doi: 10.1126/sciadv.abg5554.
2. Ito D, Wakayama S, Emura R, Ooga M, **Wakayama T**. Mailing viable mouse freeze-dried spermatozoa on postcards. *iScience*. 2021 Aug 5;24(8):102815. doi: 10.1016/j.isci.2021.102815. eCollection 2021 Aug 20.
3. Wakayama S, Ito D, Hayashi E, Ishiuchi T, **Wakayama T**. [Healthy cloned offspring derived from freeze-dried somatic cells](#). *Nat Commun*. 2022 Jul 5;13(1):3666. doi: 10.1038/s41467-022-31216-4.
4. Ushigome N, Wakayama S, Yamaji K, Ito D, Ooga M, **Wakayama T**. [Production of offspring from vacuum-dried mouse spermatozoa and assessing the effect of drying conditions on sperm DNA and embryo development](#). *J Reprod Dev*. 2022 Aug 1;68(4):262-270. doi: 10.1262/jrd.2022-048.
5. Wakayama S, Ito D, Ooga M, **Wakayama T**. Production of mouse offspring from zygotes fertilized with freeze-dried spermatids. *Sci Rep*. 2022 Nov 1;12(1):18430. doi: 10.1038/s41598-022-22850-5.
6. Yang LL, Ito D, Ushigome N, Wakayama S, Ooga M, **Wakayama T**. A novel, simplified method to prepare and preserve freeze-dried mouse sperm in plastic microtubes. *J Reprod Dev*. 2023 Aug 11;69(4):198-205. doi: 10.1262/jrd.2023-034. Epub 2023 Jun 23.
7. Wakayama S, Kikuchi Y, Soejima M, Hayashi E, Ushigome N, Yamazaki C, Suzuki T, Shimazu T, Yamamori T, Osada I, Sano H, Umehara M, Hasegawa A, Mochida K, Yang LL, Emura R, Kazama K, Imase K, Kurokawa Y, Sato Y, Higashibata A, Matsunari H, Nagashima H, Ogura A, Kohda T, **Wakayama T**. Effect of microgravity on mammalian embryo development evaluated at the International Space Station. *iScience*. 2023 Oct 27;26(11):108177. doi: 10.1016/j.isci.2023.108177.

【学会発表】

2021 年度：第 114 回日本繁殖生物学会：3 演題を発表。第 61 回日本卵子学会：1 演題を発表。

2022 年度：第 115 回日本繁殖生物学会：6 演題を発表。

2023 年度：第 116 回日本繁殖生物学会：5 演題を発表。第 63 回日本卵子学会：1 演題を発表。

SSR 56th Society for the study of reproduction: 1 演題を発表。

2024 年度：第 117 回日本繁殖生物学会：5 演題を発表予定。第 64 回日本卵子学会：3 演題を発表予定。

SSR 57th Society for the study of reproduction: 3 演題を発表予定。

【特許】

若山照彦、若山清香、鈴木智美、山崎千秋 「凍結卵培養装置及び凍結卵の培養方法」 2020 年 7 月 28 日、特願 2020-127635 公開番号：EP4174163 公開日：2023/05/03 出願番号：21849563.8 (2021/07/28)

【その他】

本研究は日本だけでなく世界の多くの国のメディアで広く紹介された。