

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 KAWASE²

¹*Research 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*

²*Chugai 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⁹⁾、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°C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^{5,13-15)}、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

に *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

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期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

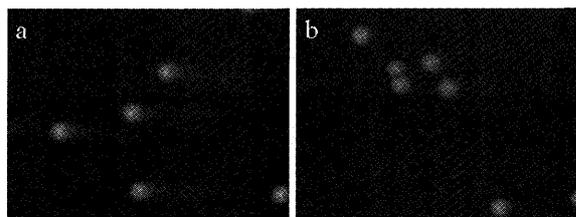


Fig. 1. Comet assay of freeze-dried mouse spermatozoa. Spermatozoa were stored at (a) 4°C, and (b) -80°C for 6 months each. The presence of comet tails in (a) indicates that fragmented DNA is present in these spermatozoa.

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³⁵⁾. 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 Hoshi, 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)