

令和 2 年 4 月 23 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07985

研究課題名(和文) 複雑な細胞集合構造体(ウシ卵丘卵子複合体・ラット膵島)の保存技術開発

研究課題名(英文) Cryopreservation of complex structures comprised from different cell types (bovine cumulus-oocyte-complexes and rat pancreatic islets)

研究代表者

保地 眞一 (Hochi, Shinichi)

信州大学・学術研究院繊維学系・教授

研究者番号：10283243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は機能の異なる複数の細胞からなるウシ卵丘卵子複合体(COC)とラット膵島の保存技術を開発することである。(1)GV期ウシCOCのCryotopデバイス上でのガラス化耐性は、卵丘細胞層の減量により改善できた。(2)M-II期ウシ卵子はナイロンメッシュ(NM)を新規デバイスとして適用すれば大量・一括にガラス化保存できた。(3)ラット膵島の蘇生率は凍結法よりもガラス化の方が高く、さらにNMデバイスの適用によって大容量保存も可能になった。(4)ガラス化・加温ラット膵島は1型糖尿病モデルラットの腎被膜下に移植すれば血糖値の正常化に寄与できると実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

耐凍性が極めて低いウシ未受精卵子の超低温保存に挑戦し、世界最高水準のガラス化蘇生率を達成するに至った道のりは、ヒトの不妊治療現場で問題となっている加齢等で低品質になった卵子を保存可能にするためにも有用な情報となる。卵子とはまったく異なる異種細胞構造体である膵島にガラス化保存研究を展開し、ラットを用いた糖尿病治療モデルを提唱するに至った。膵島移植というインスリン依存性1型糖尿病の根治療法を普及させるために慢性的障害となっているドナー不足の克服に貢献するもので、移植膵島に高頻度で起こる免疫拒絶の回避に挑戦する足場を築くことができた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to establish the cryopreservation protocols suitable for tissue complexes composed of multiple cell types, such as bovine cumulus-oocyte complexes and rat pancreatic islets. Results obtained were: (1) Downsizing cumulus layers in germinal vesicle-stage bovine cumulus-oocyte complexes contributed to the higher revivability of the oocytes after Cryotop vitrification. (2) Large amounts of metaphase-II stage bovine oocytes were able to survive vitrification on a novel cryodevice, nylon mesh triangle. (3) Cryotop vitrification protocol was superior to conventional Bicell freezing regimen in cryopreservation of rat pancreatic islets, when their revivability was evaluated by glucose-stimulated insulin secretion ability in vitro. The nylon mesh triangle device was also applicable to a large amount of pancreatic islets. (4) Type-1 diabetes model rats were rescued from hyperglycemia by syngeneic transplantation of post-warm islets beneath the kidney capsule.

研究分野：動物生産科学

キーワード：ガラス化保存 卵丘卵子複合体 膵島 クライオトップ ナイロンメッシュ シルクフィブリン

1. 研究開始当初の背景

哺乳類において単一の細胞集団や比較的単純な細胞構造物であったとき、超低温保存した後、蘇生させて個体再生や移植に利用できる。生殖細胞等のバイオリソース保存や人工授精、受精卵移植、体外受精 (IVF) のような先進家畜繁殖技術の普及を目的として精力的に開発されてきた配偶子 (精子・卵子) や胚の超低温保存に関する研究は、不妊治療や移植医療のために細胞の長期保存を目指す研究者を大いに刺激した。現在では「細胞バンク」や「精子バンク」のみならず「胚バンク」も多くの哺乳動物種で実用化されており、単一かつ最大の細胞からなる排卵卵子 (第二成熟分裂中期: M-II 期) では実験小動物を中心に「卵子バンク」さえ実現の可能性を帯びている。研究代表者らは、卵細胞質内に脂質顆粒が多いことが負に作用して耐凍性が著しく低いウシ M-II 期卵子において、超急速な冷却速度を演出できる Cryotop® をデバイスとするガラス化保存法を最適化し、凍結傷害に感受的な小器官を細胞骨格系に定めるなかで、加温卵子の回復培養液へ ROCK 阻害剤や α -トコフェロールを添加することが 30% を超える胚盤胞発生率の達成につながると見出した。一方、核置換などの先端生殖医療研究の推進やホルモン剤の投与なしに回収できることから特にヒトで注目されている卵核胞 (GV) 期卵子においては超低温保存後の蘇生率はかなり低く、ウシでは胚盤胞発生率は 20% を超えない。GV 期卵子は透明帯の内側でギャップ結合 (コネキシン 37) を介して卵丘細胞層との連結を保った卵丘卵子複合体 (COC) の形態をしており、この連結部に傷害を受けると低分子物質の輸送が妨げられ、GV 期卵子は機能不全に陥る。精子や発育に連れて割球サイズが小さくなる胚のケースとは異なり、COC のような複数のサイズ・機能が異なる細胞集合体を効率的に超低温保存する方法論は未だに確立されていない。

ヒトの移植医療は患者の QOL 向上に資するもので、インシュリン依存性 1 型糖尿病患者に対する膵島移植も臨床研究の対象となっている。またドナー不足に鑑みて、ES 細胞/iPS 細胞を用いた幹細胞工学が貢献する「再生医療」に対する期待も大きい。膵臓欠損マウス (*Pdx1*^{-/-}) にラット iPS 細胞を用いた胚盤胞補充術を施すことによってマウス体内でラット膵臓を再生でき、幹細胞に由来する臓器再生の可能性が示唆された。膵臓はインシュリンの内分泌を担う β 細胞のみならず、 α 細胞 (グルカゴン分泌) と δ 細胞 (ソマトスタチン分泌) が混ざり合った構造を取り、アミラーゼやリパーゼ等の各種消化酵素を含む外分泌腺房細胞からは独立して膵臓内に数万 (ヒトでは数百万) の単位で存在する。ラット膵島のサイズは 50- μ m から 500- μ m まで幅はあるが、ウシの COC と似通った外径約 200- μ m 程度が圧倒的多数を占める。-80 °C での凍結保存では保存期間が一週間を超えるとグルコース応答性インシュリン分泌 (GSIS) の著しい低下が起こり、一般的な培養細胞に適用されている -196 °C の凍結保存でも GSIS の低下が起こると報告されている。一方、これまでに究められつつあるガラス化保存法の膵島への適用例はほとんど報告されていない。膵島移植による糖尿病治療における慢性的ドナー不足に対しては、超低温保存技術の介入がもっとも有効と思われる。

2. 研究の目的

超低温保存後に個体再生や移植に利用したいのに、周囲の環境との相互作用を保ちながらその機能を調節する、複数種類の細胞集団からなる複雑な構造物の保存技術は未だに確立されていない。本研究では、ギャップ結合を介して透明帯の内外で連結があるウシの未成熟な GV 期 COC、および血糖値調整のためにインスリン分泌性細胞のみならず細胞や細胞などと共存して構成されるラットの膵臓を対象とした半永久保存技術の開発に挑戦した。

3. 研究の方法

(1) ウシ卵丘卵子複合体の超低温保存と蘇生評価: 長野県食肉公社から購入したウシ卵巣から GV 期 COC を回収し、M-II 期に成熟させるための体外成熟培養 (IVM) を 22 時間、テオフィリン処理した凍結融解精子による IVF を 6 時間、そして低酸素濃度下での体外発生培養 (IVC) を 8 日間行った。蘇生指標としては IVC 後の胚盤胞発生率を用いた。GV 期 COC の卵丘細胞量はガラスピペットによる連続吸引操作で 3~4 層にまで減じるか、完全に剥離 (裸化) し、市販の Cryotop® デバイス上に 10 個単位で乗せてガラス化保存した。ガラス化保存液 (VS) には 15% DMSO、15% エチレングリコール (EG)、0.5 M シュクロースが凍害保護物質 (CPA) として含まれ、7.5% DMSO、7.5% EG からなる前平衡液で 3 分間、前処理してから、VS で 1 分間処理した。この 1 分間にサンプル周りの余剰 VS を取り除き、液体窒素に素早く投入することでガラス化させた。M-II 期卵子を用いる場合、IVM 後に卵丘細胞層を完全に除去してからガラス化し・加温し、CPA 除去後、IVF 前に 2 時間の回復培養時間を置いた。一部の実験では、この回復培養液に抗酸化剤でサーチュイン遺伝子アクチベーターでもあるレスベラト

ロールを添加しておいた。Cryotop®以外のデバイスとしては、目開き 37- μm のナイロンメッシュ (NM) トライアングル (1辺 1 cm) を三角錐展開図様に折り込んだもの (卵子搭載数は 40 個)、および蚕繭から調製した多孔質高吸水性シルクフィブロイン (SF) シート (1.5% SF 水溶液由来) を 5 重巻きにしたものを用いた。いずれのデバイスも、高度なピペティング操作をすることなく、培地交換や VS 液量最小化ができるように考案したものである。

(2) ラット膵ランゲルハンス島の超低温保存と蘇生評価： BN 系雄ラットの膵臓からリベラーゼ消化とヒストパック不連続密度勾配遠心によって単離した外径 100~200 μm の膵島を 24 時間培養し、膵島表面のデブリスを取り除いてから実験に供した。Bicell®凍結法では 5% DMSO を CPA とし、クライオチューブに入れた膵島 50 個を Bicell®容器に移して、-80 のディープフリーザーに一晩静置して緩慢凍結した後に液体窒素中で保存した。Cryotop®ガラス化法における VS 組成、各処理時間、搭載サンプル数はウシ卵子の場合と同じとした。NM トライアングルデバイスは目開き 57 μm の市販 NM から加工し、SF スポンジ (4.0% SF 水溶液由来) は厚さ約 1 mm のものを直径 8 mm のディスク状に切り出した (搭載膵島数 100 個)。SF スポンジディスク上でガラス化する場合、あらかじめ液体窒素上で冷却したアルミ皿上でガラス化する固体表面ガラス化法 (SSV) を採用した。In vitro での膵島蘇生評価は、FDA/PI の二重染色による形態生存率、ならびに ELISA で定量化した GSIS における SI 値 (グルコース応答性インスリン分泌能の指標：膵島移植には 3 以上が推奨) を、一部の実験では qPCR によって関連遺伝子発現を数値化した。一方、In vivo での膵島蘇生評価は、糖尿病モデルラットの血糖値を正常化できるかどうかによった。移植予定 1 週間前、BN 雄ラットにストレプトゾトシンを静脈内投与することで 1 型糖尿病モデル (血糖値 >350 mg/dL) を作製し、左腎被膜下に 800 個のガラス化・加温膵島を移植した。移植 70 日目には腎切除して移植膵島の生着と血管新生を視認するとともに、レシピエントラットの再高血糖化を確認した。

4. 研究成果

(1) GV 期ウシ COC の Cryotop®デバイス上でのガラス化耐性は、あらかじめ卵丘細胞層を 3~4 層にまで減量しておくことで改善できた (Tashima et al., 2017)。M-II 期卵子ですでに最適化されていたガラス化保存法 (Cryotop®をデバイスに使用、VS には 15% DMSO、15% EG、0.5 M シュクロースを含有、VS 処理時間 1 分) を未処理の GV 期 COC に対して適用し、加温後に IVM、IVF、IVC の順で処理しても、蘇生指標である胚盤胞発生率は 10%程度と低かった。さらに GV 期 COC から卵丘細胞層を完全に除去してしまうと、IVM 後に核成熟はできて細胞質成熟が不完全となり、ガラス化保存には適さないサンプルになってしまうことがわかった。そこで卵丘細胞層を薄くするダウンサイズ処理を GV 期 COC に施してからガラス化・加温、IVM、IVF、IVC に供したところ、超低温保存卵子由来の蘇生としては世界最高水準の胚盤胞発生率 (30%超) を達成することができた。

(2) M-II 期ウシ裸化卵子は、NM を三角錐展開図様に加工したものを新規デバイスとして用いることで大量・一括にガラス化保存することができた。Cryotop®をデバイスに用いる場合、卵子周囲の VS 液量を 1 分以内に最小化して急冷するには、一度に最大 10 個程度の裸化卵子しか搭載できない。ピペット操作に時間的制約があるためだが、NM の背面から VS を吸引除去する方法を採用することで胚盤胞発生率を低下させることなく搭載卵子数上限を 40 個に増やすことができた (Chinen et al., 2019)。また、多孔性 SF フィルムを主材料とし、自動的に VS を浸み込ませられるデバイスの開発にも成功した (Nakayama et al., 2020)。さらに、ガラス化・加温卵子の回復培養液に抗酸化剤のレスベラトロールを添加して 2 時間処理するだけで IVF・IVC 後の胚盤胞発生率は 42% (世界最高値) にまで改善された。これは新鮮対照の値 (49%) と遜色ない成績だった (Chinen et al., 2020)。

(3) ラット膵島の凍結 (ガラス化) 蘇生率は Bicell®凍結法よりも Cryotop®ガラス化法を採用したときの方が高く、さらに NM デバイスの適用によって大容量保存も可能になることを加温膵島の In vitro 機能評価から明らかにした。一般的な培養細胞で汎用されている Bicell®凍結法と前述の Cryotop®ガラス化法の直接比較を行ったところ、凍結・融解後とガラス化・加温後のラット膵島の生存率はそれぞれ 50%と 57%で、アポトーシス関連遺伝子 (*Bax/Bcl2*) の発現量も変わらなかった。新鮮対照膵島の SI 値は 6.7 だったのに対して凍結区のそれは 1.9、ガラス化区のそれは 3.9 であり、細胞機能関連遺伝子 (*Pdx1*, *Glut2*) の発現量は凍結区でのみ減少した (Yamanaka et al., 2016)。また NM デバイスの適用により、一度に搭載可能な膵島数を 50~100 個に増加させることができた (SI 値 2.8~3.8, Yamanaka et al., 2017)。

(4) ガラス化・加温ラット膵島は 1 型糖尿病モデルラットの腎被膜下に移植すれば血糖値の正常化に寄与できることを実証した。NM トライアングル、ならびに SF スポンジディスクをデバイスとして外径 100~200- μm のラット膵島を 100 個単位でガラス化保存した。ストレプトゾトシンの静脈内投与によって 1 型糖尿病を発症させたラット (血糖値 >350 mg/dL) の腎被

膜下に 800 個のガラス化・加温膵島を移植して血糖値の動向を追跡調査したところ、NM 区、SF 区とも、すべてのレシピエントラットが膵島移植から 2 週間以内に正常血糖値 (<200 mg/dL) に戻った。移植 70 日目に腎摘出するとラットは再び高血糖になったことから、移植したガラス化・加温膵島が分泌したインスリンが糖尿病治癒に関係していたと結論づけた (国際学会発表済み、投稿論文審査中)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nakayama Kenyu, Yamanaka Takahiro, Tamada Yasushi, Hirabayashi Masumi, Hochi Shinichi	4. 巻 88
2. 論文標題 Supplementary cryoprotective effect of carboxylated -poly-l-lysine during vitrification of rat pancreatic islets	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cryobiology	6. 最初と最後の頁 70 ~ 74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cryobiol.2019.03.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamanaka Takahiro, Goto Teppei, Hirabayashi Masumi, Hochi Shinichi	4. 巻 15
2. 論文標題 Nylon mesh device for vitrification of large quantities of rat pancreatic islets	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biopreservation and Biobanking	6. 最初と最後の頁 457 ~ 462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/bio.2017.0044	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamanaka Takahiro, Tashima Kazuya, Takahashi Rio, Takashima Seiji, Goto Teppei, Hirabayashi Masumi, Hochi Shinichi	4. 巻 73
2. 論文標題 Direct comparison of Cryotop(R) vitrification and Bicell(R) freezing on recovery of functional rat pancreatic islets.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Cryobiology	6. 最初と最後の頁 376 ~ 382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cryobiol.2016.09.003.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tashima Kazuya, Kubo Yuki, Hirabayashi Masumi, Hochi Shinichi	4. 巻 95
2. 論文標題 Downsizing cumulus cell layers to improve cryotolerance of germinal vesicle-stage bovine oocytes.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Theriogenology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.theriogenology.2017.02.016.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chinen Shoichiro, Yamanaka Takahiro, Hirabayashi Masumi, Hochi Shinichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Rescue of vitrified-warmed bovine mature oocytes by short-term recovery culture with resveratrol	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cryobiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cryobiol.2020.03.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakayama Kenyu, Chinen Shoichiro, Teshima Junki, Tamada Yasushi, Hirabayashi Masumi, Hochi Shinichi	4. 巻 145
2. 論文標題 Silk fibroin sheet multilayer suitable for vitrification of in vitro-matured bovine oocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Theriogenology	6. 最初と最後の頁 109 ~ 114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.theriogenology.2020.01.052	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirabayashi Masumi, Goto Teppei, Hochi Shinichi	4. 巻 28
2. 論文標題 Pluripotent stem cell-derived organogenesis in the rat model system	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Transgenic Research	6. 最初と最後の頁 287 ~ 297
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11248-019-00161-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chinen Shoichiro, Yamanaka Takahiro, Nakayama Kenyu, Watanabe Hiroki, Akiyama Yoshitake, Hirabayashi Masumi, Hochi Shinichi	4. 巻 90
2. 論文標題 Nylon mesh cryodevice for bovine mature oocytes, easily removable excess vitrification solution	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cryobiology	6. 最初と最後の頁 96 ~ 99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cryobiol.2019.09.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計23件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 知念 照一郎、山中 貴寛、平林 真澄、保地 眞一
2. 発表標題 ナイロンメッシュデバイスで一度に大量のウシ成熟未受精卵をガラス化保存できるか？
3. 学会等名 第111回日本繁殖生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山中 貴寛、中山 研祐、平林 真澄、保地 眞一
2. 発表標題 ガラス化保存したラット臍島の蘇生率に及ぼすレスベラトロールの影響
3. 学会等名 Cryopreservation Conference 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山中 貴寛、根岸 淳、後藤 哲平、平林 真澄、保地 眞一
2. 発表標題 ナイロンメッシュデバイスを用いたラット臍島の大容量ガラス化保存
3. 学会等名 Cryopreservation Conference 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田島 和弥、山中 貴寛、佐藤 美月、平林 真澄、保地 眞一
2. 発表標題 卵丘細胞層ダウンサイズ後にガラス化保存した卵核胞期ウシ卵母細胞の蘇生能力
3. 学会等名 第57回日本卵子学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 田島 和弥、久保 友紀、平林 真澄、保地 眞一
2. 発表標題 ガラス化GV期ウシ卵丘卵子複合体を成熟培養した後の卵細胞質内脂肪滴動態について
3. 学会等名 第109回日本繁殖生物学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 山中 貴寛、田島 和弥、高橋 理央、後藤 哲平、高島 誠司、平林 真澄、保地 眞一
2. 発表標題 外径が異なるウシ卵核胞期卵丘卵子複合体ならびにラット豚ランゲルハンス島のガラス化耐性
3. 学会等名 第109回日本繁殖生物学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 山中 貴寛、高橋 理央、田島 和弥、高島 誠司、後藤 哲平、平林 真澄、保地 眞一
2. 発表標題 ラット豚島の保存に対するCryotopガラス化法とBicell凍結法の適性比較
3. 学会等名 Cryopreservation Conference 2016
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 田島 和弥、久保 友紀、保地 眞一
2. 発表標題 ウシM-II期卵子のガラス化時にCryotopに載せる保存液量が増えても胚盤胞発生率は影響されない
3. 学会等名 第122回日本畜産学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中山 研祐、山中 貴寛、平林 真澄、保地 眞一
2. 発表標題 ラット膵島のガラス化保存におけるカルボキシル基導入ポリ-L-リジンの凍害保護効果
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山中 貴寛、中山 研祐、根岸 淳、平林 真澄、保地 眞一
2. 発表標題 IEQ換算標準径 (150 μ m) を境にして血糖値を正常化する移植膵島の能力は異なる
3. 学会等名 日本内分泌学会第37回内分泌代謝学サマーセミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamanaka Takahiro, Nakayama Kenyu, Negishi Jun, Hirabayashi Masumi, Hochi Shinichi
2. 発表標題 Size effect of rat pancreatic islets on cryotolerance and euglycemia post-transplantation
3. 学会等名 第56回国際低温生物学会 (CRYO) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 知念 照一郎、山中 貴寛、中山 研祐、平林 真澄、保地 眞一
2. 発表標題 ウシ成熟未受精卵のガラス化保存：ナイロンメッシュデバイスの孔径、ならびに回復培養液中のレスベラトロールの影響
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山 研祐、知念 照一郎、手島 淳輝、玉田 靖、平林 真澄、保地 眞一
2. 発表標題 ウシ成熟未受精卵子用の新規ガラス化デバイス、シルクフィブロインシート
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山中 貴寛、中山 研祐、根岸 淳、平林 真澄、保地 眞一
2. 発表標題 ラット臍島のガラス化保存：至適デバイスの決定から糖尿病モデルへの移植まで
3. 学会等名 Cryopreservation Conference 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山-岩月 研祐、山中 貴寛、根岸 淳、手島 淳輝、玉田 靖、平林 真澄、保地 眞一
2. 発表標題 シルクフィブロインディスクをデバイスとしてSSV法によってガラス化保存したラット臍島の腎被膜下移植
3. 学会等名 第67回日本実験動物学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Hirabayashi Masumi、Hochi Shinichi	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Humana Press	5. 総ページ数 14
3. 書名 Micro-injection / Methods in Molecular Biology Book Series Vol. 1874	

1. 著者名 Hirabayashi Masumi、Takizawa Akiko、Hochi Shinichi	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Humana Press	5. 総ページ数 16
3. 書名 Rat Genomics / Methods in Molecular Biology Book Series Vol. 2018	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----