

機関番号：16401

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20380155

研究課題名 (和文) 耐凍剤チャンネル発現の誘導による卵子・胚の万能凍結保存法の開発

研究課題名 (英文) Cryopreservation of oocytes and embryos by inducing the expression of cryoprotectant channels.

研究代表者

枝重 圭祐 (EDASHIGE KEISUKE)

高知大学・教育研究部総合科学系・教授

研究者番号：30175228

研究成果の概要 (和文)：水・耐凍剤チャンネル (AQP) を誘導あるいは閉鎖させて細胞膜透過性を均一化させることによって、種々の発育段階の卵子/胚を同じ方法で凍結保存できるかどうかをしらべた。細胞膜透過性が低いマウス卵子では、レチノイン酸存在下で成熟培養すると AQP9 が誘導されて耐凍剤透過性がやや向上したが、成熟率が低下した。AQP3 は低 pH で閉鎖することが報告されているが、AQP3 が多量に発現しているマウス桑実胚では、低 pH でエチレングリコール透過性は返って向上した。したがって、卵子と胚で細胞膜透過性を均一化させることは難しいと考えられた。そこで、細胞膜透過性の影響が少ないスクロースを高濃度含む新しいガラス化保存液を考案し、同じ方法で2細胞期から桑実期までのマウス胚を凍結保存することに成功した。しかも、凍結胚はドライアイス入り簡易輸送箱 (-79℃) で輸送することができた。本研究により、種々の発生段階のマウス胚に有効な汎用性の高い凍結保存法を開発することができた。

研究成果の概要 (英文)：We tried to develop a vitrification method by which mouse oocytes and embryos at various stages can be cryopreserved by a single method. First, we examined whether the membrane-permeability of mouse oocytes and embryos can be equalized, because the permeability largely affects the condition for vitrification. We tried to induce the expression of water/cryoprotectant channels (AQP) in oocytes to increase the low membrane-permeability. We also tried in morulae to decrease the permeability of AQP3 which is markedly expressed in morulae and blastocysts. The cryoprotectant-permeability of oocytes increased slightly by retinoic acid but the maturation rate decreased remarkably. It was reported that the permeability of AQP3 decreased markedly at low pH. However, the permeability to ethylene glycol of mouse morulae, which expressed AQP3 abundantly, increased at low pH. Therefore, we considered that it would be difficult to make the membrane-permeability of oocytes/embryos equal. Next, we tried to develop a new vitrification solution in which a high concentration of sucrose was included to reduce the effect of membrane-permeability of oocytes/embryos on the vitrification condition. With this solution, embryos from the 2-cell to morula stages were successfully vitrified in the same condition, and vitrified embryos could be transported with dry ice (at -79°C). The method would be useful for cryopreservation of mouse embryos at various stages.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,500,000	2,550,000	11,050,000
2009年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2010年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード：凍結保存、卵子、胚、水透過性、耐凍剤透過性、アクアポリン

1. 研究開始当初の背景

家畜や実験動物およびヒトでは、受精卵(胚)の凍結保存がすでに実用化されているが、同じ成熟/発育ステージの卵子・胚を同じ条件で凍結融解しても、しばしば生存性に大きなばらつきが生じる。その原因は、個々の卵子・胚ごとに、細胞の耐凍性に大きな影響を与える細胞膜透過性が異なるためであると考えられる。もし、水や耐凍剤を透過するチャンネルタンパク質の発現を誘導したり、誘導したチャンネルを開閉したりすれば、卵子や胚の細胞膜透過性を自由に変えることが可能となり、同じ凍結保存液を用いて、卵子・胚を安定して高い生存性を維持したまま凍結保存できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、同じ凍結保存液を用いて、卵子・胚を安定して高い生存性を維持したまま凍結保存する方法を開発するために、マウスをモデルとして、(1) 内在性の水・耐凍剤チャンネルを卵子や胚で誘導する方法を開発する(2) 胚に悪影響を与えることなく、チャンネルを開閉させる方法を開発する(3) 様々な発育ステージの卵子・胚に適用できる簡便な万能凍結保存法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウスの卵子と初期分割胚における水・耐凍剤チャンネルの誘導

ICR 系雌マウスにウマ絨毛性性腺刺激ホルモン (eCG) を投与して 48 時間後に卵巣を取り出し、卵丘細胞に包まれた卵核胞期卵子を採取した。培養細胞等で AQP3 を誘導することが報告されているデキサメサゾンあるいはレチノイン酸を添加した成熟培養液あるいはソルビトールを添加して高張にした成熟培養液で 12 時間培養した。また、ICR 系雌マウスに eCG とヒト絨毛性性腺刺激ホルモンを投与して過排卵を誘起した後、同系雄マウスと交配して 1 細胞期胚を採取した。そして、卵子と同様に AQP3 を誘導することが報告されている条件下で 12 時間あるいは 24 時間培養し、それぞれ 2 細胞期と 4 細胞期にまで発育させた。培養後、卵子と胚を 25°C のスクロース、グリセロール、エチレングリコール、アセトアミドあるいは DMSO を添加した高張な PB1 液に浸してその体積変化を算出し、2-parameter formalism を用いて、水透過性 (スクロース添加 PB1 液) と耐凍剤透過性 (耐凍剤添加 PB1 液) をしらべた¹。レチノイン酸によって細胞膜透過性が向上した卵子の一部は、透明帯を除去した後にホルマリンで固定し、蛍光抗体法を用いて AQP3 と AQP9 の発現量をしらべた¹。

(2) マウス桑実胚で発現している水・耐凍剤チャンネルの pH による透過特性の変化

ICR 系雌マウスに過排卵を誘起して同系雄マウスと交配して桑実胚を採取した。25°C の pH 7.2, 6.0, 5.8, 5.5 あるいは 5.3 の PB1 液に 5 分間浸してから、同じ pH のスクロース、グリセロール、エチレングリコール、アセトアミドあるいは DMSO を添加した PB1 液に浸してその体積変化を算出し、水透過性と耐凍剤透過性をしらべた。

(3) マウス胚の新しいガラス化凍結法の開発

細胞膜透過性が大きく異なるマウス初期分割胚と桑実期以降の胚でも、同じ方法でガラス化凍結できるように、従来のガラス化法と比べて細胞をより濃縮できる、スクロース濃度を高めた新しいガラス化保存液を考案した。ICR 系マウスと C57BL/6 マウスから採取した 2 細胞期胚、8 細胞期胚、桑実胚および胚盤胞を、25°C の EFS20a (20% v/v エチレングリコールを含む FSc 液) で 2 分間前処理した後、EFS35c (35% v/v エチレングリコールを含む FSc 液) あるいは EFS40c (40% v/v エチレングリコールを含む FSc 液) で 1 分間処理し、ストローに封入して液体窒素でガラス化凍結した。FSc 液は従来の濃度のスクロース (0.5 M) と 30% w/v Ficoll PM-70 を含む PB1 液で、FSc 液は 3 倍濃度のスクロース (1.5 M) と 30% w/v Ficoll PM-70 を含む PB1 液である。25°C の水中で融解し、融解直後の胚の形態と、胚の発生能 (2 細胞期胚、8 細胞期胚および桑実胚は胚盤胞への発育率、胚盤胞は胞胚腔の再拡大) により生存性を判定した。また、一部の胚は、液体窒素で凍結後、-80°C に数日間保持してから融解し、生存性をしらべた。さらに、C57BL/6 マウスの 2 細胞期胚、8 細胞期胚および桑実胚を同じ方法で凍結した後、ドライアイス入り簡易輸送箱を用いて冷凍宅配便にて高知大学から理化学研究所バイオリソースセンターに送り、液体窒素で再冷却後、融解して偽妊娠マウスに移植して産仔への発生能をしらべた。

4. 研究成果

(1) マウスの卵子と初期分割胚における水・耐凍剤チャンネルの誘導

卵子をデキサメサゾン添加培養液で培養しても水透過性も耐凍剤透過性も向上しなかった。高濃度のレチノイン酸を添加して培養した場合と、ソルビトールを添加して高張にした培養液で培養した場合に、アセトアミド透過性が向上した。しかしながら、高濃度のレチノイン酸を添加した場合には卵子の成熟率は低く、ソルビトールを添加した培養液では成熟しなかった。レチノイン酸添加培養液で培養した卵子では、AQP9 の発現が向上し

ていた。一方、1細胞期胚は、いずれの条件下で発生させても水透過性も耐凍剤透過性も向上しなかった。したがって、マウス卵子の成熟能と1細胞期胚の発生能に影響を与えることなく水・耐凍剤チャンネルの発現を誘導して細胞膜透過性を向上させることは難しいと考えられた。

(2) マウス桑実胚で発現している水・耐凍剤チャンネルの pH による透過特性の変化

酸性のスクロース添加PB1液に浸した場合のマウス桑実胚の水透過性は、pHが下がるにつれて低下した(図1)。これは、AQP3が低pHでは水をほとんど透過しないとの報告に一致していた²。しかしながら、グリセロール透過性はpH 5.5でも変わらなかった。一方、エチレングリコール透過性は、低pHで返って向上した(図1)。これらの結果から、AQP3は低pHで閉鎖するのではなく、透過物質に対する特異性が変わると考えられた。したがって、マウス桑実胚で大量に発現しているAQP3を凍結保存液のpHを下げることによって閉鎖させて、桑実胚の水透過性と耐凍剤透過性を初期分割胚のように低くすることは難しいと考えられた。

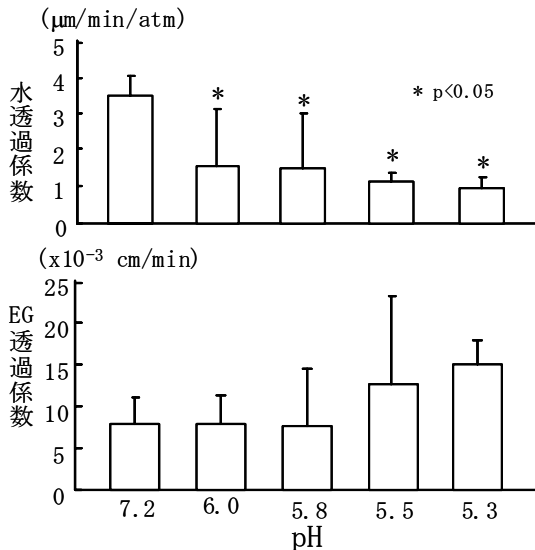


図1. ICR系マウス桑実胚の水透過性とエチレングリコール(EG)透過性に対するpHの効果
水透過性は25℃のスクロース添加PB1液、EG透過性は25℃のEG添加PB1液中での体積変化から算定した。

(3) マウス胚の新しいガラス化凍結法の開発

25℃のEFS20aで2分間処理した後にEFS35cあるいはEFS40cで1分間処理してガラス化凍結した2細胞期胚は、融解後ほとんどの胚が生存していた(図2)。同じ方法で凍結した8細胞期胚と桑実胚も、ほとんどの胚は生存していた(図2)。しかし、胚盤胞の生存率は有意に低かった。したがって、スクロースを高濃度含むガラス化保存液を用いた2段階法によって、同じ操作で2細胞期

から桑実期までのマウス胚をガラス化凍結保存できることがわかった。

この方法で凍結した胚は、高度に濃縮されているため、高度に細胞を脱水・濃縮するオリジナルの緩慢法(-70℃まで緩慢冷却してから液体窒素で凍結)で凍結した胚と同様にドライアイス温度(-79℃)で長時間保持することが可能であると予想された。そこで、この新しいガラス化法でICR系マウスの2細胞期胚を液体窒素で凍結した後、-80℃で10日間保持した結果、EFS35cとEFS40cのいずれの保存液を用いても生存率はほとんど低下しなかった。また、-80℃で4日間保持した後に液体窒素で再冷却しても生存率は低下しなかった。同じ方法で凍結した8細胞期胚と桑実胚も、-80℃で4日間保持しても生存率はほとんど低下しなかった。

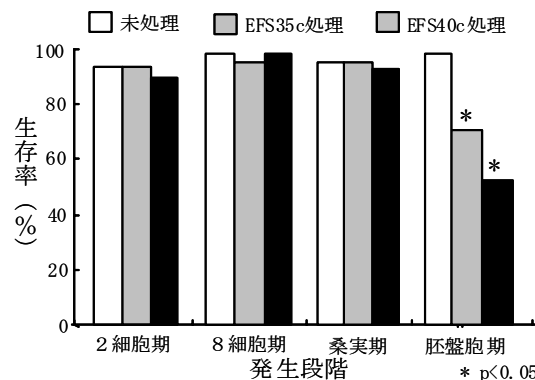


図2. 高濃度スクロースを含む保存液でガラス化凍結した種々の发育ステージのICR系マウス胚の生存性

種々の发育ステージの胚を25℃のEFS20aで2分間、EFS35cあるいはEFS40cで1分間処理して凍結保存した。生存性は、2細胞期～桑実期の胚は胚盤胞への发育率、胚盤胞は胎胚腔の再拡大で判定した。

そこで、C57BL/6マウスの2細胞期胚、8細胞期胚および桑実胚をEFS20aとEFS35cを用いて液体窒素でガラス化凍結した後、ドライアイス入り簡易輸送箱に入れ、冷凍宅配便で国内輸送した。そして、液体窒素で再冷却してから融解し、偽妊娠させたICR系雌マウスに移植した。その結果、いずれのステージの胚も高率に産仔にまで发育した。

これまで卵子・胚の凍結保存法は、「融解後の生存性」と「操作の簡便性」の観点から改良されてきた。最近では、微量のサンプルを用いて急速に冷却・融解する「超急速ガラス化法」の研究がさかんに行われている。しかし、この方法では一度に少量の卵子・胚しか凍結できない。一方、本研究で開発されたガラス化法では、従来のコンベンショナルなガラス化凍結法と同じ方法で、様々な发育ステージの比較的多くの胚を一度に凍結できる。しかも、従来のガラス化法とは異なり、凍結した胚をドライアイスを用いた簡便で安価な方法で輸送することができる。これは、

様々な系統が開発されているマウス胚の分与に極めて有効であり、本ガラス化法は、近い将来、実験動物胚凍結法のスタンダードになりうる。また、ウシ胚等に応用できれば、凍結家畜胚の流通が容易になり、食肉や牛乳の生産性の向上等、畜産業への貢献が期待できる。

○参考文献

¹Edashige et al., Biol Reprod, 74, 625-632, 2006.

²Zuethen et al., J Biol Chem, 271, 21631-21636, 1999.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

- ①Yohei Yamaji, Shinsuke Seki, Kazutsugu Matsukawa, Chihiro Koshimoto, Magosaburo Kasai, Keisuke Edashige. Developmental ability of vitrified mouse oocytes expressing water channels. The Journal of Reproduction and Development, 査読有, 57, 2011, 403-108.
- ②Shinsuke Seki, Toshimitsu Kouya, Ryoma Tsuchiya, Delgado M. Valdez Jr., Bo Jin, Chihiro Koshimoto, Magosaburo Kasai, Keisuke Edashige. Cryobiological properties of immature zebrafish oocytes assessed by their ability to be fertilized and develop into hatching embryos. Cryobiology, 査読有, 62, 2011, 8-14.
- ③S. Matsuda, A. Yamashita, Y. Sato, S. Kitajima, T. Koike, C. Sugita, S. Moriguchi-Goto, K. Hatakeyama, M. Takahashi, C. Koshimoto, Y. Matsuura, T. Iwakiri, Y.E. Chen, J. Fan, Y. Asada. Human C-reactive protein enhances thrombus formation after neointimal balloon injury in transgenic rabbits. The Journal of Thrombosis and Haemostasis, 査読有, 9, 2011, 201-208.
- ④Bo Jin, Keiji Mochida, Atsuo Ogura, Eri Hotta, Yukiko Kobayashi, Kaori Ito, Go Egawa, Shinsuke Seki, Hiroshi Honda, Keisuke Edashige, Magosaburo Kasai. Equilibrium vitrification of mouse embryos. Biology of Reproduction, 査読有, 82, 2010, 444-450.
- ⑤Yorio Maeda, Seiji Naganuma, Ichiro Niina, Akio Shinohara, Chihiro Koshimoto, Kazuhiro Kondo, Kazuo Chijiwa. Effects of bile acids on rat hepatic microsomal type I 11 β -hydroxyl steroid dehydrogenase. Steroids, 査読有, 75, 2010, 164-168.
- ⑥Misaki Takahashi, Atsushi Yamashita,

Sayaka Moriguchi-Goto, Kousuke Marutsuka, Yuichiro Sato, Hiroshi Yamamoto, Chihiro Koshimoto, Yujiro Asada. Critical role of von Willebrand factor and platelet interaction in venous thromboembolism. Histology and Histopathology, 査読有, 24, 2009, 1391-1398.

- ⑦Chihiro Koshimoto, Daisuke Watanabe, Akio Shinohara, Tetsuo Morita. Maintenance of fertility in cryo-preserved Indian gerbil (*Tatera indica*) spermatozoa. Cryobiology, 査読有, 58, 2009, 303-307.
- ⑧ Takeshi Haga, Niho Murayama, Yuya Shimizu, Akatsuki Saito, Takumi Sakamoto, Tetsuo Morita, Katsuhiko Komase, Tetsuo Nakayama, Kazuyuki Uchida, Tetsuro Katayama, Akio Shinohara, Chihiro Koshimoto, Hiroshi Sato, Hironori Miyata, Kiyooki Katahira, Yoshitaka Goto. Analysis of antibody response by temperature-sensitive measles vaccine strain in the cotton rat model. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 査読有, 32, 2009, 395-406.
- ⑨Bo Jin, Chihiro Yamasaki, Naoko Yamada, Shinsuke Seki, Delgado M. Valdez Jr., Magosaburo Kasai, Keisuke Edashige. The mechanism by which mouse spermatozoa are injured during freezing. Journal of Reproduction and Development, 査読有, 54, 2008, 265-269.
- ⑩Bo Jin, Kenji Kusanagi, Makiko Ueda, Shinsuke Seki, Delgado M. Valdez Jr., Keisuke Edashige, Magosaburo Kasai. Formation of extracellular and intracellular ice during warming of vitrified mouse morulae and its effect on embryo survival. Cryobiology, 査読有, 56, 2008, 233-240.
- ⑪Shinsuke Seki, Toshimitsu Kouya, Ryoma Tsuchiya, Delgado M. Valdez Jr., Bo Jin, Takao Hara, Naoya Saida, Magosaburo Kasai, Keisuke Edashige. Development of a reliable *in vitro* maturation system for zebrafish oocytes. Reproduction, 査読有, 135, 2008, 285-292.

[学会発表] (計 25 件)

- ①有村隼, 中田裕一, 関信輔, 松尾完, 金波, 松川和嗣, 葛西孫三郎, 枝重圭祐. マウスの卵子および胚への耐凍剤透過における Aquaporin 9 の役割. 第 103 回日本繁殖生物学会大会, 2010 年 9 月 2~4 日, 十和田市, 北里大学獣医学部.

- ②長尾さや子, 長瀬祐樹, 枝重圭祐, 葛西孫三郎, 保地眞一, 松川和嗣. 凍結乾燥したウシ体細胞による核移植胚作出の試み. 第103回日本繁殖生物学会大会, 2010年9月2~4日, 十和田市, 北里大学獣医学部.
- ③Keisuke Edashige, Shinsuke Seki, Hayato Arimura, Kan Matsuo, Yu-ichi Nakata, Bo Jin, Kazutsugu Matsukawa, Chihiro Koshimoto, Magosaburo Kasai. Aquaporin 9 facilitates the movement of DMSO and acetamide through the plasma membrane in mouse morulae. 第15回中国畜産獣医学会(動物繁殖分会), August 15-18, 2010, Tianjin, Ruby Hotel.
- ④Keisuke Edashige, Shinsuke Seki, Hayato Arimura, Kan Matsuo, Yu-ichi Nakata, Bo Jin, Chihiro Koshimoto, Magosaburo Kasai. The role of aquaporin 9 in the movement of Me₂SO and acetamide in mouse morulae. 47th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, July 17-20, 2010, Bristol, Bristol Royal Marriott Hotel.
- ⑤Bo Jin, Keiji Mochida, Atsuo Ogura, Magosaburo Kasai, Keisuke Edashige. Handy transportation of vitrified mouse embryos with dry ice. 47th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, July 17-20, 2010, Bristol, Bristol Royal Marriott Hotel.
- ⑥和田紗希子, 中田裕一, 金波, 越本知大, 葛西孫三郎, 枝重圭祐. 耐凍剤チャンネル発現の誘導によるマウス卵子の耐凍性向上の試み. 第57回日本実験動物学会総会, 2010年5月12~14日, 京都, 京都テルサ.
- ⑦中潟直己, 枝重圭祐. LAS セミナー3: 胚・精子の凍結保存. 第57回日本実験動物学会総会, 2010年5月12~14日, 京都, 京都テルサ.
- ⑧金波, 本田宙, 西門優, 葛西孫三郎, 枝重圭祐. マウス卵巢のガラス化凍結保存. 第102回日本繁殖生物学会大会, 2009年9月10~12日, 奈良, 近畿大学農学部.
- ⑨Shinsuke Seki, Keisuke Edashige, Peter Mazur. Effect of the expression of aquaporins 1 and 3 in mouse MII oocytes on the nucleation temperature for intracellular ice formation. 46th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, July 19-23, 2009, Sapporo, Conference Hall on Hokkaido University.
- ⑩Keisuke Edashige, Bo Jin, Ryu-ichi Higashiyama, Jun-ichi Yonezawa, Masashi Miyake, Sei-ichi Takahashi, Ken-ichi Yazawa, Magosaburo Kasai. Rapid movement of water and cryoprotectants in pig expanded blastocysts via channel processes -its relevance to their tolerance to cryopreservation-. 46th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, July 19-23, 2009, Sapporo, Conference Hall on Hokkaido University.
- ⑪Bo Jin, Eri Hotta, Yukiko Kobayashi, Kaori Ito, Go Egawa, Shinsuke Seki, Hiroshi Honda, Keiji Mochida, Atsuo Ogura, Keisuke Edashige, Magosaburo Kasai. Equilibrium vitrification of mouse embryos. 46th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, July 19-23, 2009, Sapporo, Conference Hall on Hokkaido University.
- ⑫Keisuke Edashige, Delgado M. Valdez Jr., Hiroshi Honda, Yu Nishikado, Bo Jin, Magosaburo Kasai. Survival of oocytes in antral follicles of vitrified mouse ovaries. 46th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, July 19-23, 2009, Sapporo, Conference Hall on Hokkaido University.
- ⑬持田慶司, 鬼頭靖司, 金波, 枝重圭祐, 葛西孫三郎, 小倉淳郎. ドライシッパーを用いないマウス胚の冷蔵及びドライアイス温度下での輸送の検討. 第56回日本実験動物学会総会, 2009年5月14~16日, 大宮, 大宮ソニックシティ.
- ⑭金波, 堀田英里, 小林由希子, 伊藤香, 関信輔, 本田宙, 持田慶司, 小倉淳郎, 葛西孫三郎, 枝重圭祐. 様々な発育ステージのガラス化凍結マウス胚の-80°Cでの短期保持 -ドライアイスを用いた簡便な輸送を目指して-. 第56回日本実験動物学会総会, 2009年5月14~16日, 大宮, 大宮ソニックシティ.
- ⑮中潟直己, 枝重圭祐. LAS セミナー3: 胚・精子の凍結保存. 第56回日本実験動物学会総会, 2009年5月14~16日, 大宮, 大宮ソニックシティ.
- ⑯金波, 東山龍一, 米澤潤一, 高橋誠一, 三宅正史, 葛西孫三郎, 枝重圭祐. ブタの卵子和拡大胚盤胞における水と耐凍剤の透過経路. 第110回日本畜産学会大会, 2009年3月27~29日, 藤沢市, 日本大学生物資源科学部.
- ⑰Shinsuke Seki, Bo Jin, Tsuchiya Ryouma, Toshimitsu Kouya, Takao Hara, Delgado M. Valdez Jr., Magosaburo Kasai, Keisuke Edashige. Exogenous expression of rat aquaporin-3 enhances permeability to water and cryoprotectants of immature oocytes in the zebrafish (*Danio rerio*). The 5th Annual Conference of the Asia Reproductive Biotechnology Society, Nov. 27-Dec. 1, 2008, Kunming, Horizon Hotel.
- ⑱Bo Jin, Eri Hotta, Yukiko Kobayashi,

Shinsuke Seki, Masahiro Yoshimura, Hiroshi Honda, Keiji Mochida, Atsuo Ogura, Magosaburo Kasai, Keisuke Edashige. Short-term storage of vitrified two-cell mouse embryos at -80°C for handy transportation with dry ice. 第 101 回日本繁殖生物学会大会, 2008 年 9 月 18~20 日, 福岡市, 九州大学医学部百年講堂.

- ①9 松尾完, 関信輔, 金波, Valdez M. Delgado Jr., 太田悟史, 好村正博, 葛西孫三郎, 枝重圭祐. マウス桑実胚の耐凍剤透過性における aquaporin 9 の役割. 第 101 回日本繁殖生物学会大会, 2008 年 9 月 18~20 日, 福岡市, 九州大学医学部百年講堂.
- ②0 好村正博, 金波, 山崎千寛, 山田奈央子, 関信輔, Valdez M. Delgado Jr., 葛西孫三郎, 枝重圭祐. マウス精子が凍結保存によって受ける傷害のメカニズム. 第 101 回日本繁殖生物学会大会, 2008 年 9 月 18~20 日, 福岡市, 九州大学医学部百年講堂.
- ②1 河合泰典, 原隆夫, 松尾完, Valdez M. Delgado Jr., 金波, 好村正博, 東山龍一, 市川恭子, 恒石望太郎, 枝重圭祐, 葛西孫三郎. ウシ桑実胚の水透過と耐凍剤透過における aquaporin 3 の役割. 第 101 回日本繁殖生物学会大会, 2008 年 9 月 18~20 日, 福岡市, 九州大学医学部百年講堂.
- ②2 Keiji Mochida, Chihiro Koshimoto, Keisuke Edashige, Kentaro Aizawa, Kyuichi Taguma, Akihiko Ohta, Atsuo Ogura. Effects of raffinose concentration and methyl-beta-cyclodextrin on IVF with cryopreserved C57BL/6 sperm. 45th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, July 20-23, 2008, Charlotte, The Omni Charlotte Hotel.
- ②3 Keisuke Edashige, Takao Hara, Yasunori Kawai, Masahiro Yoshimura, Bo Jin, Delgado M. Valdez, Jr., Magosaburo Kasai. The pathway for the movement of water and cryoprotectants in bovine oocytes and embryos. 45th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, July 20-23, 2008, Charlotte, The Omni Charlotte Hotel.
- ②4 Delgado M. Valdez Jr., Ryoma Tsuchiya, Shinsuke Seki, Naoya Saida, Bo Jin, Masahiro Yoshimura, Chihiro Koshimoto, Magosaburo Kasai, Keisuke Edashige. Permeability to water and cryoprotectants of zebrafish (*Danio Rerio*) oocytes at mid stage III. 45th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, July 20-23, 2008, Charlotte, The Omni Charlotte Hotel.

②5 枝重圭祐. 動物細胞と凍結—哺乳動物の卵子と受精卵の耐凍性に関わるタンパク質—. 第 54 回日本生物工学会大会セミナー, 2008 年 6 月 13~14 日, 石川郡野々市町, 石川県立大学.

〔図書〕(計 2 件)

- ① Magosaburo Kasai, Keisuke Edashige. Cambridge University Press, Movement of water and cryoprotectants in mouse oocytes and embryos at different stages: relevance to cryopreservation, In "Fertility Cryopreservation", Ri-Cheng Chian & Patrick Quinn (Eds.), 2010, 16-23.
- ② 葛西孫三郎, 枝重圭祐. 近代出版, 生殖系列細胞の保存. 生命の誕生に向けて(第二版) 生殖補助医療 (ART) 培養の理論と実際, 日本哺乳動物卵子学会編, 2010, 27-34.

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称: 生物材料用ガラス化液、ガラス化キット、及びその利用

発明者: 小倉敦郎、持田慶司、葛西孫三郎、枝重圭祐

権利者: 理化学研究所、高知大学

種類: 特許

番号: 特願 2009-187493

出願年月日: 2009 年 8 月 12 日

国内外の別: 国内

○取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

枝重 圭祐 (EDASHIGE KEISUKE)

高知大学・教育研究部総合科学系・教授

研究者番号: 3 0 1 7 5 2 2 8

(2) 研究分担者

葛西 孫三郎 (KASAI MAGOSABURO)

高知大学・教育研究部総合科学系・教授

研究者番号: 6 0 1 5 2 6 1 7

越本 知大 (KOSHIMOTO CHIHIRO)

宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・教授

研究者番号: 7 0 2 9 5 2 1 0