

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380167

研究課題名(和文) 内在性水チャネルの人為的誘導と開閉制御による哺乳動物卵子の耐凍性向上

研究課題名(英文) The improvement of the tolerance of mammalian oocytes to cryopreservation by inducing endogenous expression of water/cryoprotectant channels or by gating the 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円、(間接経費) 4,140,000円

研究成果の概要(和文)：マウス卵子のガラス化凍結後の生存性を高めるため、細胞内氷晶形成の起点となりやすいミトコンドリアに着目し、その内膜の透過性向上を試みた。内膜に発現するmitochondrial permeability transition poreの開口剤である酸化フェニルヒ素で卵子进行处理すると融解直後の生存性が向上したが、培養1時間後には死滅した。内膜に発現する水チャネルの発現誘導を試みたが、融解後の生存性は向上しなかった。細胞やミトコンドリアの脱水/濃縮促進のため、平衡ガラス化法を用いて近平衡状態で凍結融解すると、培養後の生存性も高かった。従って卵子の凍結保存には平衡ガラス化法が適していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：To increase the survival of mouse oocytes after vitrification, we first tried to increase the permeability of their inner mitochondrial membrane. When oocytes were treated with phenylarsine oxide to open the mitochondrial permeability transition pore, a non-specific channel present in the inner membrane, the survival of vitrified oocytes increased significantly just after warming. However, they were dead after 1 h of culture. Then, we tried to increase the expression of water channels, which are expressed in the inner membrane. However, the tolerance to vitrification was not improved, probably because the expression was not increased. Next, we cryopreserved oocytes by equilibrium vitrification to promote dehydration/concentration of the cell and mitochondria. The survival was high even if they were warmed in the air, suggesting that they were vitrified under a near equilibrium state. These results suggest that equilibrium vitrification is suitable for cryopreservation of mouse oocytes.

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：繁殖

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳動物卵子の凍結保存は、これまでに様々な方法が考案され、成功例が多数報告されているが、未だ安定して高い生存率は得られていない。卵子は凍結融解時に細胞内氷晶による傷害を受けやすい。この傷害は、細胞の脱水/濃縮が不十分な場合に起こる。

凍結融解時に傷害を受けた卵子では、ミトコンドリアの破裂が観察されることから、内部で氷晶が形成されていると考えられる。ミトコンドリア内膜は、膜電位を維持するために透過性が極めて低い。したがって、ミトコンドリアは細胞内で最も水や耐凍剤が出入りにくい小器官であり、細胞内氷晶形成の起点となっていると考えられる。しかし、ミトコンドリア内膜は常に水や耐凍剤に対する透過性が低いわけではない。2種類のチャンネルが水と耐凍剤の移動を促進する可能性がある。ひとつは水チャンネル(AQP8とAQP9)で、もう一つは、特定の条件下で1.5 kDa以下の分子を非選択的に透過するmitochondrial permeability transition pore(MPTP)である。このチャンネルの開口は、細胞にアポトーシスを引き起こすことが知られている。これらのチャンネルを発現させたり開口させることによって、ミトコンドリアの脱水/濃縮を促進して内部での氷晶形成を抑制して、卵子の耐凍性を向上させることができるかと期待される。

最近、我々は従来のガラス化保存液と比べて浸透圧が高い保存液を用いる、平衡ガラス化法を開発した。本方法では、保存液の高い浸透圧により細胞の脱水/濃縮が促進され、細胞を近平衡状態で凍結できる。この方法を卵子の凍結保存に適用すれば、卵子全体やミトコンドリアの脱水/濃縮が促進され、高い生存性を維持したまま凍結保存ができるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、マウス卵子を用いて、(1) 卵子のミトコンドリア内膜で形成されるMPTPチャンネルを人為的に開口させる、(2) ミトコンドリア内膜に内在している水チャンネル(AQP8とAQP9)の発現を向上させる等によって、凍結時のミトコンドリアの脱水/濃縮を促進し、安定して高い生存性が得られる卵子の凍結保存法を開発することを目的とした。また、(3) 保存液の高い浸透圧によって卵子全体やミトコンドリアの脱水/濃縮が促進される平衡ガラス化法が、卵子の凍結保存に有効かどうかを明らかにすることも目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) MPTP 開口による卵子の耐凍性向上の試み

まず、卵子のMPTPを開口させるのに適した条件をしらべた。マウス卵子にあらかじめミトコンドリア膜電位指示薬であるJC1を取

り込ませてからMPTPの開口剤である15  $\mu$ M 酸化フェニルヒ素(PAO)を添加した修正MEM液(37 )で卵子を一定時間処理してから修正MEMで20分間培養してJC1の蛍光変化と卵子の形態を観察し、マウス卵子にあまり傷害を与えないでMPTPが開口(ミトコンドリア膜電位の消失)する条件をしらべた。それから、適した条件下で卵子をPAOで前処理し、25のエチレングリコール(EG)をベースとした通常のガラス化保存液(EFS40)で2分間処理してから、精子凍結用ストローを用いてガラス化凍結した。融解は25水中で行い、0.5 M sucrose 添加PB1液に5分間浸して耐凍剤を除去した。融解後の卵子の形態から生存性を判定した。

### (2) 水チャンネルの発現誘導による卵子の耐凍性向上の試み

培養細胞でAQP8の発現を誘導することが知られているdibutyl cAMPを添加した修正MEM液中でマウスの卵巣から採取した未成熟卵子を12時間成熟培養した。そして、EFS40を用いてガラス化凍結し、融解後の形態から生存性を判定した。同様に培養細胞等でAQP9の発現を誘導することが知られているrosiglitazone、オレイン酸あるいはWy14643を添加した修正MEM液で未成熟卵子を成熟培養し、EFS40を用いてガラス化凍結し、融解後の形態から生存性をしらべた。

### (3) 平衡ガラス化法による卵子の凍結保存の試み

平衡ガラス化法の1つであるHOV法でマウス卵子の凍結保存を試みた。すなわち、25の5%v/v EGと5%v/v DMSOを添加したPB1液で5分間処理した後、42.5%v/v EGを添加した40%w/v Ficoll PM-70と2.35 M sucroseを含むPB1液(25 )で0.5あるいは1分間処理し、ストローを用いてガラス化凍結した。融解は25の水中か25の空気中で行い、融解直後と修正MEM液で1時間培養後の卵子の形態を観察し、生存性を判定した。

## 4. 研究成果

### (1) MPTP 開口による卵子の耐凍性向上の試み

卵子を15  $\mu$ M PAOで10分間処理してから20分間培養すると、卵子へあまり傷害を与えずにMPTPを開口できることがわかった(図は示さず)。そこでこの条件で卵子をPAOで前処理してからEFS40を用いてガラス化凍結した。

無処理の卵子の融解後の生存率は10%とかなり低かった(図1)。一方、PAOで前処理した卵子の生存率は43%と有意に高かった。したがって、MPTPを開口することによって、ミトコンドリアの脱水/濃縮が促進されて内部で氷晶が形成されにくくなり、卵子の耐凍性が向上することが示唆された。

しかしながら、融解後に卵子を1時間培養

すると、PAO 処理卵子は全て死滅した（図は示さず）。PAO によるアポトーシスの誘起か、あるいは他の化学的毒性によるものと考えられた。

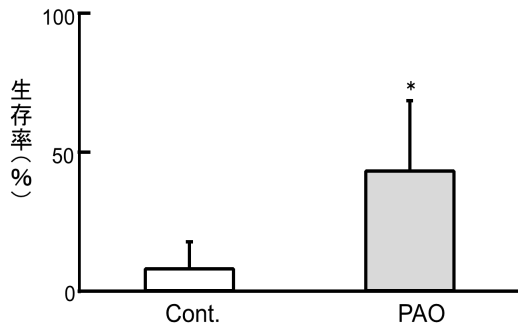


図1 PAOで処理した卵子の凍結融解後の生存性

PAO, 15  $\mu$ M 酸化フェニルヒ素で10分間前処理した。

(2) 水チャンネルの発現誘導による卵子の耐凍性向上の試み

AQP8 の発現を誘導する 0 ~ 200  $\mu$ M dibutyl cAMP を添加した修正 MEM 液で卵子を成熟培養すると、50  $\mu$ M までは成熟率（約 90%）は低下しなかったが、100 ~ 200  $\mu$ M ではやや低下（約 75%）した（図は示さず）。これらの卵子をガラス化凍結すると、無処理卵子の生存率が約 15%であったのに対し、dibutyl cAMP の濃度が高くなるにつれて生存率はやや向上し、200  $\mu$ M では約 30%であった（図2）。しかしながら、ばらつきが大きく、有意な差はなかった。

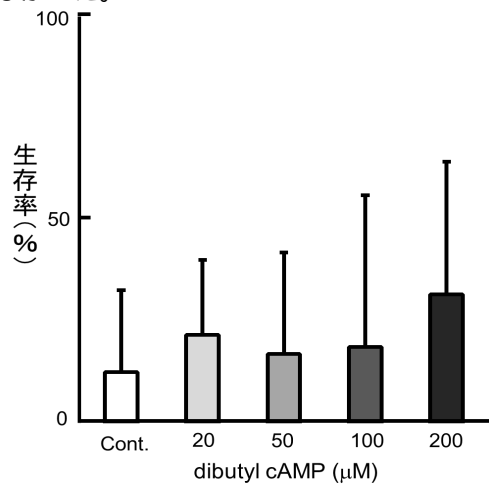


図2 dibutyl cAMPを添加した培養液で成熟させた卵子の凍結融解後の生存性

AQP9 の発現を誘導する rosiglitazone、オレイン酸あるいは Wy14643 を添加した修正 MEM 液で未成熟卵子を成熟培養した場合は、いずれの濃度でも凍結融解後の生存率は向上しなかった（図は示さず）。

成熟中のマウス卵子では、これらの物質によって AQP8 と AQP9 のいずれも発現は誘導されないと考えられた。

(3) 平衡ガラス化法による卵子の凍結保存の試み

平衡ガラス化法で凍結した卵子の融解直後の生存率は、保存液で 0.5 分間処理した場合が全般的に高く、25  $^{\circ}$ C の水中で融解した場合はほぼ 100%の卵子が生存し、25  $^{\circ}$ C の空气中で融解した場合でも約 90%の卵子が生存していた（図3）。

融解後 1 時間培養した卵子の生存率は、保存液で 0.5 分間処理して凍結して水中で融解した場合は約 90%と高く、25  $^{\circ}$ C の空气中で融解した場合でも約 70%と比較的高かった。空气中で融解しても生存率が高かったことから、卵子の多くは近平衡状態で凍結されていたと考えられる。

また、25  $^{\circ}$ C 水中で融解した場合、90%以上の卵子が生存していたことから、平衡ガラス化法で安定して高い生存性を維持したままマウス卵子を凍結できることがわかった。

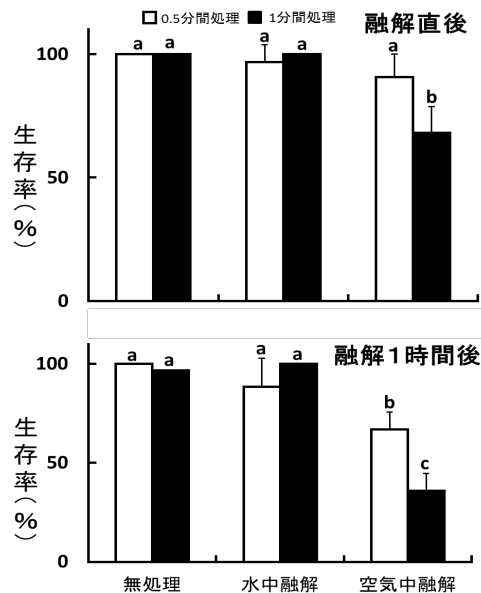


図3 平衡ガラス化法で凍結したマウス卵子の融解後の生存性

融解直後と1時間後の形態から生存性を判定した。25  $^{\circ}$ C の前処理液で5分間、ガラス化保存液で0.5分間あるいは1分間処理して、ストローを用いてガラス化凍結した。

(4) 考察

ミトコンドリア内膜に内在的に発現する水チャンネルの発現を誘導することによって、ミトコンドリアの脱水/濃縮を促進してマウス卵子の耐凍性を向上させることには成功しなかった。しかしながら、MPTP を開口させてミトコンドリアの脱水/濃縮を促進することによって、卵子の耐凍性を向上させることに成功した。また、本研究の結果は、ミトコンドリアが細胞内氷晶形成の起点になっている可能性を支持している。今後、卵子に傷害を与えることなくミトコンドリア内膜の透過性を向上させることができるようになれば、実用性の高い卵子の凍結保存法の開発につながると考えられる。

一方、最近我々が開発した平衡ガラス化法を用いることによって、卵子全体とミトコンドリアの脱水/濃縮を促進し、安定して高い生存性を維持したままマウス卵子を凍結保存できることがわかった。本研究で用いた平衡ガラス化法で多くの卵子を近平衡状態で

凍結できたことから、さらに改良を進めれば、凍結卵子をドライアイス入り簡易輸送箱で輸送することが可能な凍結保存法が開発できると考えられた。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 10 件)

Kazutoshi Nishijima, Mai Tanaka, Yusuke Sakai, Chihiro Koshimoto, Masatoshi Morimoto, Teruo Watanabe, Jianglin Fan, Shuji Kitajima. Effects of type III antifreeze protein on sperm and embryo cryopreservation in rabbit. *Cryobiology*, (in press). doi: 10.1016/j.cryobiol.2014.04.014

Atsushi Yamashita, Yan Zhao, Yunosuke Matsuura, Kazuaki Yamasaki, Sayaka Moriguchi-Goto, Chihiro Sugita, Takashi Iwakiri, Nozomi Okuyama, Chihiro Koshimoto, Keiichi Kawai, Nagara Tamaki, Songji Zhao, Yuji Kuge, Yujiro Asada. Increased metabolite levels of glycolysis and pentose phosphate pathway in rabbit atherosclerotic arteries and hypoxic macrophage. *PLoS One*, 9, e86426, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0086426

Kazutoshi Nishijima, Shinji Yamaguchi, Mai Tanaka, Yusuke Sakai, Chihiro Koshimoto, Masatoshi Morimoto, Teruo Watanabe, Jianglin Fan, Shuji Kitajima. Effects of cholesterol-loaded cyclodextrins on the rate and the quality of motility in frozen and thawed rabbit sperm. *Experimental Animals*, 63, 149-154, 2014. doi: 10.1538/expanim.63.149

Delgado M. Valdez Jr., Bo Jin, Ryoma Tsuchiya, Shinsuke Seki, Naoya Saida, Chihiro Koshimoto, Kazutsugu Matsukawa, Magosaburo Kasai, Keisuke Edashige. A trial to cryopreserve immature medaka (*Oryzias latipes*) oocytes after enhancing their permeability by exogenous expression of aquaporin 3. *Journal of Reproduction and Development*, 59, 205-213, 2013. doi: 10.1262/jrd.2012-179

Bo Jin, Ryu-ichi Higashiyama, Yu-ichi Nakata, Jun-ichi Yonezawa, Shangdan Xu, Masashi Miyake, Sei-ichi Takahashi, Kazuhiro Kikuch, Ken-ichi Yazawa, Shuhei Mizobuchi, Saori Niimi, Mizuho Kitayama, Chihiro Koshimoto, Kazutsugu Matsukawa, Magosaburo Kasai, Keisuke Edashige. Rapid movement of water and cryoprotectants in pig expanded blastocysts via channel processes: its relevance to their higher tolerance to cryopreservation. *Biology of Reproduction*, 89, 1-12, 2013. doi: 10.1095/biolreprod.112.107250

Atsushi Yamashita, Yan Zhao, Songji Zhao, Yunosuke Matsuura, Chihiro Sugita, Takashi

Iwakiri, Nozomi Okuyama, Kazuyo Ohe, Chihiro Koshimoto, Keiichi Kawai, Nagara Tamaki, Yuji Kuge, Yujiro Asada. Arterial <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose uptake reflects thrombus formation and tissue factor expression via nuclear factor-κB in rabbit atherosclerotic lesions. *Circulation Journal*, 77, 2626-2635, 2013. doi: 10.1253/circj.CJ-12-1463

Bo Jin, Keiji Mochida, Atsuo Ogura, Chihiro Koshimoto, Kazutsugu Matsukawa, Magosaburo Kasai, Keisuke Edashige. Equilibrium vitrification of mouse embryos at various developmental stages. *Molecular Reproduction and Development*, 79, 785-794, 2012. doi: 10.1002/mrd.22113

Shinsuke H. Sakamoto, Satoshi N. Suzuki, Yousuke Degawa, Chihiro Koshimoto, Ryo O. Suzuki. Seasonal habitat partitioning between sympatric terrestrial and semi-arboreal Japanese wood mice, *Apodemus speciosus* and *A. argenteus* in spatially heterogeneous environment. *Mammal Study*, 37, 261-272, 2012. doi: 10.3106/041.037.0401

Bo Jin, Yasunori Kawai, Takao Hara, Shoko Takeda, Shinsuke Seki, Yu-ichi Nakata, Kazutsugu Matsukawa, Chihiro Koshimoto, Magosaburo Kasai, Keisuke Edashige. Pathway for the movement of water and cryoprotectants in bovine oocytes and embryos. *Biology of Reproduction*, 85, 834-847, 2011. doi: 10.1095/biolreprod.110.088641

Shinsuke Seki, Keisuke Edashige, Sakiko Wada, Peter Mazur. Effect of the expression of aquaporins 1 and 3 in mouse oocytes and compacted 8-cell embryos on the nucleation temperature for intracellular ice formation. *Reproduction*, 142, 505-515, 2011. doi: 10.1530/REP-10-0538

### 〔学会発表〕(計 23 件)

新見沙織, 北山みずほ, 竹下純隆, 松川和嗣, 葛西孫三郎, 枝重圭祐. プタ卵子の低温傷害に温度感受性 TRP チャンネルは関与しているか. 第 106 回日本繁殖生物学会大会, 2013 年 9 月 12~17 日, 東京農工大学農学部府中キャンパス, 府中市.

北山みずほ, 中田裕一, 新見沙織, 平川猛, 松川和嗣, 葛西孫三郎, 枝重圭祐. Mitochondrial permeability transition pore の開口によるマウス卵子の耐凍性向上の試み. 第 106 回日本繁殖生物学会大会, 2013 年 9 月 12~17 日, 東京農工大学農学部府中キャンパス, 府中市.

平川猛, 佐々木智世, 北山みずほ, 竹下純隆, 新見沙織, 松川和嗣, 葛西孫三郎, 枝重圭祐. ラット胚における水および耐

凍剤に対する透過性と透過経路．第 106 回日本繁殖生物学会大会，2013 年 9 月 12～17 日，東京農工大学農学部府中キャンパス，府中市．

住友弘明，竹下純隆，新見沙織，北山みずほ，平川猛，松川和嗣，葛西孫三郎，枝重圭祐．水・耐凍剤チャンネルおよび不凍タンパクの発現によるゼブラフィッシュ Stage III 卵子の耐凍性向上の試み．第 106 回日本繁殖生物学会大会，2013 年 9 月 12～17 日，東京農工大学農学部府中キャンパス，府中市．

竹下純隆，住友弘明，山内健嗣，新見沙織，松川和嗣，葛西孫三郎，枝重圭祐．水・耐凍剤チャンネルと不凍タンパクの発現によるゼブラフィッシュ Stage I 卵子の耐凍性向上の試み．第 106 回日本繁殖生物学会大会，2013 年 9 月 12～17 日，東京農工大学農学部府中キャンパス，府中市．

郡七海，枝重圭祐，葛西孫三郎，赤木悟史，保地眞一，松川和嗣．ウシ線維芽細胞の培養時期が細胞周期および凍結乾燥後の DNA 損傷に与える影響．第 117 回日本畜産学会大会，2013 年 9 月 9～10 日，新潟大学五十嵐キャンパス，新潟市．

Keisuke Edashige, Shinsuke Seki, Hayato Arimura, Mizuho Kitayama, Saori Niimi, Chihiro Koshimoto, Kazutsugu Matsukawa, Magosaburo Kasai. Aquaporin 9 plays a significant role in the channel-dependent movement of Me<sub>2</sub>SO and acetamide in mouse morulae. The 50th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, July 28-31, 2013, North Bethesda Marriott and Conference Center, Bethesda, Maryland.

Kazutsugu Matsukawa, Nanami Kori, Shinichi Hochi, Satoshi Akagi, Keisuke Edashige, Magosaburo Kasai, Pasqualino Loi. Production of bovine blastocysts by nuclear transfer using freeze-dried fibroblast cells. The 46th Annual Meeting of the SSR, July 22-26, 2013, Montréal, Palais des congrès de Montréal, Montreal, Quebec.

佐々木智世，平川猛，北山みずほ，越本知大，松川和嗣，葛西孫三郎，枝重圭祐．平衡ガラス化法によるラット胚の凍結保存．第 60 回日本実験動物学会総会，2013 年 5 月 15～17 日，つくば国際会議場，つくば市．

竹中由布，枝重圭祐，葛西孫三郎，松川和嗣．アスコルビン酸 2 リン酸の発生培地への添加がウシ体外受精胚の発生に及ぼす影響．第 116 回日本畜産学会大会．2013 年 3 月 27 日～30 日，安田女子大学 7，9 号館，広島市．

枝重圭祐．動物生殖細胞の凍結保存技術の開発研究．第 6 回ラットリソースリサーチ研究会/第 1 回実験動物科学シンポジウム（招待講演）2013 年 2 月 1 日京都大

学百周年時計台記念館，京都市．  
Atsushi Yamashita, Yan Zhao, Songji Zhao, Yunosuke Matsuura, Chihiro Sugita, Takashi Iwakiri, Kazuyo Ohe, Chihiro Koshimoto, Keiichi Kawai, Nagara Tamaki, Yuji Kuge, Yujiro Asada. <sup>18</sup>F-FDG uptake reflects thrombus formation and tissue factor expression via nuclear factor-κB in rabbit atherosclerotic lesions. American Heart Association, Scientific Session. Nov. 3-7, 2012, JW Marriott Los Angeles at LA Live, Los Angeles, California.

西本あずさ，枝重圭祐，葛西孫三郎，保地眞一，松川和嗣．予備凍結および保存温度が凍結乾燥ウシ体細胞の DNA 損傷および核移植後の発生に及ぼす影響．第 105 回日本繁殖生物学会大会．2012 年 9 月 5 日～8 日，筑波大学大学会館，つくば市．

山内健嗣，住友弘明，有村隼，新見沙織，佐々木智世，松川和嗣，葛西孫三郎，枝重圭祐．水・耐凍剤チャンネルを発現させた未熟なゼブラフィッシュ卵子の耐凍性．第 105 回日本繁殖生物学会大会．2012 年 9 月 5 日～8 日，筑波大学大学会館，つくば市．

新見沙織，杉岡篤，佐々木智世，松川和嗣，葛西孫三郎，枝重圭祐．ガラス化凍結したマウス卵巣内の胞状卵胞内卵子の受精能と発生成能．第 105 回日本繁殖生物学会大会．2012 年 9 月 5 日～8 日，筑波大学大学会館，つくば市．

有村隼，北山みずほ，関信輔，佐々木智世，新見沙織，松川和嗣，葛西孫三郎，枝重圭祐．マウス桑実胚での DMSO と Acetamide の透過における Aquaporin 9 の役割．第 105 回日本繁殖生物学会大会．2012 年 9 月 5 日～8 日，筑波大学大学会館，つくば市．

Keisuke Edashige, Shinsuke Seki, Hayato Arimura, Kan Matsuo, Yu-ichi Nakata, Bo Jin, Kazutsugu Matsukawa, Chihiro Koshimoto, Magosaburo Kasai. The role of aquaporin 9 in the movement of DMSO and acetamide in mouse morulae. SSR's 45th Annual Meeting of Society of the Study of Reproduction. August 12-15, 2012. The Alumni Hall at the Hetzel Union Building, The Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania.

田仲梨絵，有村隼，松川和嗣，葛西孫三郎，枝重圭祐．未熟なゼブラフィッシュ卵子の低温生物学的特性．第 104 回日本繁殖生物学会大会，2011 年 9 月 15 日～17 日，いわて県民情報交流センター・アイーナ，盛岡市．

長谷川由貴，濱本圭佑，保地眞一，長尾さや子，枝重圭祐，葛西孫三郎，松川和嗣．凍結乾燥したウシ顆粒膜細胞の核移植に由来する胚盤胞の作出．第 104 回日

本繁殖生物学会大会，2011年9月15日～17日，いわて県民情報交流センター・アイーナ，盛岡市。

長尾さや子，濱本圭佑，枝重圭祐，葛西孫三郎，保地眞一，松川和嗣。ウシ体細胞の凍結乾燥後の保存法がDNA損傷度および核移植後の発生に及ぼす影響。第114回日本畜産学会，2011年8月26日～27日，北里大学十和田キャンパス，十和田市。

- ⑳ Keisuke Edashige, Yohei Yamaji, Shinsuke Seki, Kazutsugu Matsukawa, Chihiro Koshimoto, Magosaburo Kasai.  
Developmental ability of vitrified mouse oocytes expressing water channels. The 48th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, July 24-27, 2011, The LaSells Stewart Center on the campus of Oregon State University, Corvallis, Oregon.
- ㉑ 枝重圭祐．EFSを用いた胚の凍結保存．LASセミナー2「胚・精子の凍結保存」．第58回日本実験動物学会総会，2011年5月25～27日，タワーホール船堀，江戸川区．
- ㉒ 持田慶司，長谷川歩未，枝重圭祐，葛西孫三郎，小倉淳郎．緩慢融解が可能な新規マウス胚ガラス化保存法の開発．第58回日本実験動物学会総会，2011年5月25～27日，タワーホール船堀，江戸川区．

〔図書〕(計3件)

葛西孫三郎．メディカルレビュー社，HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY Vol. 20 No. 2, 吉村泰典編，生殖系列細胞の凍結の歴史と意義，2013，11-14頁．

枝重圭祐．日本冷凍空調学会，冷凍空調便覧IV巻，食品・生物編，第8章動物細胞および動物組織8・2 精液8・2・2 水産動物，2013，332-333頁．

枝重圭祐．日本冷凍空調学会，冷凍空調便覧IV巻 食品・生物編，第8章動物細胞および動物組織 8・3 動物胚と卵子 8・3・2 水産動物，2013，338-339頁．

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

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：30175228

(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：60152617

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：70295210

松川 和嗣 (MATSUKAWA Kazutsugu)  
高知大学・教育研究部総合科学系・准教授  
研究者番号：00532160

(3) 連携研究者

なし