

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24580407

研究課題名(和文)凍結乾燥したウシ精子ならびに二倍体細胞からの胚盤胞作製システム

研究課題名(英文)System for bovine blastocyst production from lyophilized sperm and diploid cells

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) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的はウシの精子や二倍体細胞のDNA損傷を可能な限り抑えた凍結乾燥(FD)条件を決定し、胚盤胞の量産システムを確立することである。以下の結果が得られた。(1)ヘモリジン変異体によるトレハロースの積極的導入はFD後の顆粒膜細胞のDNA損傷を抑制しなかった。(2)FDケーキが潰れる"コラプス"発生にはFDバッファのTg'が関係し、トレハロース添加がTg'上昇とコラプス抑制に有効だった。(3)未受精卵のガラス化・加温後の蘇生改善には回復培養液へのROCK阻害剤やトコフェロールの添加が有効だった。(4)FD精子ならびにFD二倍体細胞に由来する胚盤胞の体外作出に成功した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to establish blastocyst production system from freeze-dried (FD) sperm and diploid cells in the bovine species. Results obtained were: (1) Incorporation of trehalose using alpha-hemolysin mutant did not inhibit DNA damage in FD granulosa cells. (2) Incidence of FD cake collapse was related with the glass transition temperature of the maximally freeze-concentrated phase (Tg'), and trehalose in FD buffer contributed to increase the Tg' and to inhibit the cake collapse. (3) ROCK inhibitor or alpha-tocopherol supplemented to recovery culture medium could rescue metaphase-II oocytes after vitrification and warming. (4) Morphologically normal blastocysts derived from both FD spermatozoa (via intracytoplasmic sperm injection) and FD fibroblasts (via somatic cell nuclear transplantation) were successfully produced in vitro.

研究分野：応用動物科学

キーワード：凍結乾燥 コラプス -ヘモリジン トレハロース ROCK阻害剤 ビタミンE 体細胞クローン ICSI

1. 研究開始当初の背景

ほとんどの哺乳類において精子の凍結保存は可能となっており、この技術は人工授精 (AI) や体外受精 (IVF) と組み合わせることで実用化されている。一方、精子を凍結乾燥 (FD) してから常温あるいは低温で保存できるようになると、精子の維持や輸送に関するコストを大幅に軽減できる。精子の運動性を損なうことなく凍結乾燥することは極めて困難なので、現状では復水細胞由来の動物個体を作製するには卵細胞質内精子注入法 (ICSI) を適用することになる。ICSI 技術の開発当初は受精現象のメカニズム解析のために利用されたが、現在ではウマやクジラといった IVF が困難な動物種における胚作製手段としてのみならず、ヒトの不妊治療の一手法としても脚光を浴びている。ICSI による産仔獲得は 1988 年にウサギで初めて報告され、ピエゾマニピュレーターの登場によって精子頭部が釣り針状のマウスやラットといった実験小動物でも産仔獲得が可能になった。一方、大型産業家畜のウシでも 1990 年に初めて ICSI 由来の仔牛が誕生しているが、卵子活性化補填処理が施されるようになり、安定して胚盤胞作出ができるようになったのは 2005 年以降のことである。

FD 精子に由来する ICSI 胚の産仔発生は 1998 年、マウスで最初に報告された。この種ではその後再現性も確認され、対照の産仔率と比較しても遜色ないレベルにまで FD-ICSI 技術が完成しつつある。FD 後 2 年間にわたって冷蔵保存した精子を ICSI して 1 匹の産仔が生まれたただだが (産仔率は 0.5%)、ウサギでの報告がそれに続いた。その後、ラットで我々が 2 日間冷蔵保存した FD 精子に由来する ICSI 産仔作出を報告した。1 年間にわたって冷蔵保存した FD 精子からも生存ラット産仔を得ることに成功したのは、凍結乾燥機そのものを真空度や乾燥時の棚温度を多段階に設定可能なプログラマブル・フリーズドライヤーに変えたことが大きかった。一方、ウシ精子の FD に関する情報は極めて限られているが、ICSI 後の胚盤胞発生例は得られている。ラット精子に対して最適化したプログラマブル・フリーズドライヤー利用の FD 条件をウシ精子に適用したところ、コメットアッセイ上は DNA 損傷のない精子を回収できているように思われたが、ICSI 後に胚盤胞に達した割合はわずか 1~2% に過ぎなかった。異種あるいは同種顕微授精系を駆使してその原因を探ったが、FD 精子の $[Ca^{2+}]_i$ オシレーション誘起 (SOAF) の活性や微小管形成中心 (MTOC) の機能、さらには前核期卵における雄性ゲノムのエピジェネティクスに特段の問題点は認められなかった。よって、FD 保存において精子が「生きている」ということの定義を DNA 損傷が修復可能なレベルまで軽微であることと定め、ゲノム DNA の損傷を可能な限り

抑えた FD 条件を決定することを目指し、FD 後の DNA 損傷を最小化できた精子を ICSI に供し、効率的に胚盤胞を作製する。

また、クローンヒツジ「ドリー」の誕生に導いた体細胞核移植 (SCNT) 技術は受精によらない動物個体の作出を可能にし、ウシでも翌年に体細胞クローン個体が誕生している。この SCNT 技術の適用により FD 保存後の体細胞から個体への発生能力を備えた胚盤胞を作製できる可能性があるが、これまでにそのステージまでの発育例、すなわち胚盤胞が得られている動物種はマウス、ヒツジ、そしてブタに限定される。そこで、ウシにおいて FD に適した細胞の種類とその FD 条件を決定するとともに、胚性幹 (ES) 細胞様の細胞株を樹立し、外来 DNA あるいは mRNA の導入を介して乾燥耐性を付与した二倍体細胞を構築することを目指す。FD 後の DNA 損傷を最小化できた二倍体細胞を SCNT に供し、効率的に胚盤胞を作製する。

2. 研究の目的

ICSI 技術の発達、FD という新しい遺伝資源保存法を適用した精子に由来する胚または個体の作製に道を開く。我々は、1 年間冷蔵保存したラットの FD 精子を ICSI することによって、正常な産仔の作出に成功している。マウスでは精子の FD は実用化レベルにあり、ウサギでも産仔作出例がある。しかしウシでは、FD 処理した精子の SOAF 活性や MTOC 機能、さらには前核期卵における雄性ゲノムのエピジェネティクスに特別な問題がなかったにも関わらず、FD-ICSI 後の胚盤胞発生率は数% に過ぎなかった (対照区の 1 割以下)。この割合を改善するため、精子の DNA 損傷を可能な限り抑えた FD 条件を決定したい。また、SCNT の適用により FD 保存後の体細胞から個体への発生能力を備えた胚盤胞を作製できる可能性があるが、胚盤胞が得られている動物種はマウス、ヒツジ、そしてブタのみである。本研究の目的は、FD 後の DNA 損傷を最小化できた精子ならびに二倍体細胞を ICSI あるいは SCNT に供し、効率的な胚盤胞作製システムを確立することである。

3. 研究の方法

乾燥行程におけるサンプル表面積、細胞濃度、バッファー組成、バッファー液量、乾燥時真空度、乾燥時間、乾燥後の保存条件といった各種パラメーターの最適化を図ることと平行して、トレハロースを細胞内に積極的に取り込ませる実験を行う。すなわち、精子について、ヘモリジンを細胞膜に埋め込んで細胞外のトレハロースを濃度依存的に細胞内へと移行させることで、乾燥後の細胞内環境におけるガラス化状態の安定化につなげられるかどうか、試みる。FD・復水後の DNA

損傷はアルカリコメットアッセイによって定量化し、ICSI または SCNT に供して胚盤胞の作製効率を調べる。

4. 研究成果

(1) ウシ精子の凍結乾燥耐性に及ぼすコラプスの影響：凍結乾燥を適切な条件下で行うと、溶液は多孔質のスポンジ様構造（凍結乾燥ケーキ）を形成する。溶液の凍結濃縮相は、ある一定の温度（最大凍結濃縮相ガラス転移温度 = T_g' ）でガラス状態に変化し、分子運動が抑制されて非常に安定な状態になる。一方、この T_g' よりも高い温度で乾燥を行うと溶液は安定なガラス状態からゴム状態へと変化し、コラプスと呼ばれる凍結乾燥ケーキの構造崩壊が観察されるようになる。本実験では、ウシ精子の凍結乾燥ケーキに生じたコラプスが、復水ウシ精子を ICSI した後の発生能に及ぼす影響について調べた。まず、示差走査熱量計 (DSC) を用いて測定した凍結乾燥バッファー (10 mM Tris-HCl, 50 mM EGTA, 0.5 M トレハロース) の T_g' は -27.7 だった。この条件を得るに当たり、凍結乾燥バッファーからの NaCl 除去やトレハロース添加が T_g' を上昇させるのに有効だった (オリジナル EGTA バッファーの T_g' は -45.0)。凍結融解ウシ精子を同バッファーに懸濁し、予備凍結を行ったのちに -30 、 -15 、または 0 のいずれかに制御した凍結乾燥棚上で 6 時間乾燥した。乾燥温度が -30 の凍結乾燥ケーキは完全な形状を保っていた一方、 T_g' よりも高い 0 や -15 で乾燥した場合にはコラプスが生じていた。得られた凍結乾燥ケーキの乾燥度を調べるために含水率の重量測定およびガラス転移温度 (T_g) の DSC 測定を行ったところ、 0 で乾燥した場合の含水率は -30 の場合と比べて約 5 倍だったが、 T_g 測定によりいずれも十分な乾燥状態にあったと確認できた。 -20 で一晩保存した精子を ICSI に供して卵子活性化処理を施したところ、卵割率に差は認められなかったものの、培養 8 日後の胚盤胞発生率については -30 で乾燥した場合の値 (14% : 卵割ベース) が 0 や -15 で乾燥したときの値 (それぞれ 1% と 4%) よりも有意に高かった。 0 で乾燥した精子は注入ピペット内壁に付着しやすく、卵細胞質内への精子の注入操作が困難になった。以上、凍結乾燥ケーキのコラプス発生はウシ精子に対する乾燥ストレスを増加させ、ICSI 後の胚盤胞発生能を低下させることが明らかになった。

(2) 黄色ブドウ球菌由来ヘモリジンを介したトレハロース導入：体内に多量のトレハロースを合成・蓄積することで極限乾燥環境下に適応しているネムリユスリカ幼虫のような生物が存在する。細胞膜上で 7 量体を形成して膜貫通型の孔を形成する α ヘモリジン (アミノ酸 293 個からなる) を用いれば二糖類

のトレハロースを細胞内に導入することが可能で、さらに 130~134 番目のアミノ酸残基をヒスチジンに置換した変異体 (H5) は亜鉛イオンの有無によって孔の開閉を制御できる。本実験では、黄色ブドウ球菌ゲノム由来のヘモリジン変異体を作製し、トレハロースをウシ顆粒膜細胞内に導入したときの凍結乾燥耐性について調べた。まず、黄色ブドウ球菌ゲノム由来の α ヘモリジン遺伝子を pET28-c プラスミドに組み込み、インバース PCR によって H5 作製のベクターを調製した。それをコンピテントセルに形質転換して大量培養し、発現誘導後にカラムクロマトグラフィーにより精製した。ウシ顆粒膜細胞における Calcein-AM の蛍光消失を指標にして、H5 濃度は 25 mg/L、作用時間は 5 分、0.5 M トレハロース導入時間は 30 分、硫化亜鉛濃度は 0.05 mM と定めた。トレハロース添加区の凍結乾燥ケーキにはコラプスは誘起されず、復水後の細胞の形態も正常に維持されていた。しかし、アルカリコメットアッセイで調べた復水細胞における DNA 損傷は、トレハロースの細胞内導入によって抑制できていなかった。結論として、トレハロースを細胞内に導入しただけではウシ顆粒膜細胞の凍結乾燥耐性を改善するには至らず、トレハロース合成開始をトリガーとして働くようになる「DNA 損傷の修復機構」がより重要である、ということが示唆された。

(3) SCNT 効率化のための未受精卵のガラス化保存：細胞質内の脂肪顆粒量が多いウシやブタではガラス化・加温後の未受精卵を IVF しても胚盤胞までの発生率はあまり高くない。IVF 前の短時間培養が加温卵の回復にとって有効なことが経験的に知られており、本実験では、ホスホジエステラーゼ阻害剤、抗酸化剤の回復培養液への添加がガラス化・加温したウシ未受精卵の蘇生率を改善するのに有効かを調べた。新鮮卵巣から回収した未成熟卵子を成熟培養し、卵丘細胞層を完全剥離した後に第一極体放出が確認できた成熟未受精卵を集め、15% DMSO、15% エチレングリコール、0.5M シュクロースを含むガラス化保存液中でクライオトップをデバイスとして超低温保存した。ホスホジエステラーゼ阻害剤のカフェイン (20 mM)、水溶性抗酸化剤の L-アスコルビン酸 (50 μ g/ml)、脂溶性抗酸化剤の α -トコフェロール (10 μ M) のいずれかを回復培養液に添加し、IVF に先立って 2 時間、加温卵子を培養した。IVF から 8 日後の胚盤胞発生率は、無処理区のガラス化・加温卵子における 26% に対し、カフェイン区の 28% と L-アスコルビン酸区の 28% は差がなかったが、 α -トコフェロール区では 36% と有意に高い成績が得られた。次に α -トコフェロールを 0、10、30、100、300 μ M の濃度で添加したところ、胚盤胞発生率はそれ

ぞれ、19、31、28、27、35%となった。 α -トコフェロール 300 μ M 区で得られた拡張胚盤胞の品質は、構成細胞数と染色体倍数性に基づいて評価する限り新鮮対照区と同程度だった。ガラス化・加温卵子の IVF 後に多発し、微小管ネットワークの形成不全により前核融合や第一卵割の遅延を引き起こす「精子星状体形成の数的異常」に及ぼす α -トコフェロールの影響を調べた。媒精 10 時間目でのチューブリン免疫染色の結果、単一の星状体からなる正常な前核期卵の割合は無処理区で 48%だったのが、300 μ M α -トコフェロール処理によって新鮮対照 (85%) と同等の 90%にまで改善されていた。以上、 α -トコフェロールを回復培養液へ添加することでガラス化・加温したウシ未受精卵の蘇生率が改善できることが明らかになり、その効果には微小管ネットワークを正常に張り巡らせる卵細胞質マトリクスの機能回復が関係していると示唆された。また、1 日保存した卵巣由来の成熟卵子を用いた実験において、ROCK 阻害剤の Y-27632 (10 μ M) をガラス化・加温後の卵子の回復培養液へ添加するだけで救済効果を発揮するという知見も得た。

(4) 凍結乾燥二倍体細胞の核移植：熱処理した体細胞や凍害保護物質なしで冷凍保存されていた体細胞からクローン個体が作出されたことから、細胞の生死に関わらず核が正常でさえあれば、SCNT によって個体作出が可能なが証明された。現在、マウス、ヒツジ、ブタにおいて、凍結乾燥した体細胞を核移植することで胚盤胞が得られているが、ウシにおける成功例はない。本実験では、凍結乾燥時の細胞懸濁液量と細胞濃度、さらに凍結乾燥後の封入方法がウシ顆粒膜細胞の DNA 損傷に与える影響を調べると同時に、同細胞を核移植に供することでクローン胚盤胞の作出を目指した。ウシ顆粒膜細胞を 22 時間体外培養し、mEGTA バッファーに懸濁して -30 で予備凍結した後、一次乾燥を 0.37 hPa で 14 時間、二次乾燥を 0.001 hPa で 3 時間、行った。乾燥行程終了後、バイアル瓶を窒素充填後あるいは真空状態のまま密封し、4 で保存した。復水細胞の DNA 損傷度をアルカリコメットアッセイによって評価したところ、コメット尾部長、尾部 DNA 比率、及びそれらの積であるモーメント値には、乾燥サンプルの保存期間に関わらず、細胞懸濁液量と細胞濃度との異なる組み合わせからなる各区のあいだで差はなかった。一方、封入方法の比較においては、保存期間 1 週間では有意差が認められなかったものの、1 ヶ月保存では真空保存区と比べて窒素充填区において有意に DNA 損傷が検出された。次に、クローン胚盤胞を作出するため、窒素充填お

よび真空状態で 1 ヶ月間保存した凍結乾燥細胞を復水し、除核未受精卵に顕微注入した。1 時間後に 10 μ M イオノフォア A23187 の 5 分間処理と 2 mM 6-ジメチルアミノプリンの 5 時間処理による複合活性化誘起処理を行い、引き続き 7 日間の発生培養に供した。窒素充填区の卵割率は 3%しかなく、胚盤胞への発生例も得られなかった。しかし真空保存区の卵割率は窒素充填区より有意に高く (51%)、さらに 1 例 (3%) ながら孵化胚盤胞までの発生例も得られた。以上、ウシ顆粒膜細胞の凍結乾燥後の保存には窒素充填よりも真空状態が適しており、凍結乾燥後に 1 ヶ月間冷蔵保存した顆粒膜細胞の SCNT によりクローン胚盤胞を作製できた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

In-Sul Hwang, Dae-Jin Kwon, Gi-Sun Im, Kazuya Tashima, [Shinichi Hochi](#), (2016) Seongsu Hwang. High incidence of polyspermic fertilization in bovine oocytes matured in vitro after cryotop vitrification, *CryoLetters*, 37 巻, 27-33, 査読有.

Hiromasa Hara, Miho Tagiri, Masumi Hirabayashi, [Shinichi Hochi](#), (2016) Multiple aster formation is frequently observed in bovine oocytes retrieved from 1 day-stored ovaries, *Zygote*, 24 巻, 115-120, 査読有.

DOI: 10.1017/S096719941400080X

Ikuko Yashiro, Miho Tagiri, Hayato Ogawa, Kazuya Tashima, Seiji Takashima, Hiromasa Hara, Masumi Hirabayashi, [Shinichi Hochi](#), (2015) High revivability of vitrified-warmed bovine mature oocytes after recovery culture with α -tocopherol, *Reproduction*, 149 巻, 347-355, 査読有.

DOI: 10.1530/REP-14-0594

Hiromasa Hara, Iori Yamane, Ichiyo Noto, Noriko Kagawa, Masashige Kuwayama, Masumi Hirabayashi, [Shinichi Hochi](#), (2014) Microtubule assembly and in vitro development of bovine oocytes with increased intracellular glutathione level prior to vitrification and in vitro fertilization, *Zygote*, 22 巻, 476-482, 査読有.

DOI: 10.1017/S0967199413000105

Hiromasa Hara, Miho Tagiri, In-Sul Hwang, Masato Takahashi, Masumi Hirabayashi, [Shinichi Hochi](#), (2014) Adverse effect of cake collapse on the functional integrity of freeze-dried bull spermatozoa, *Cryobiology*, 68 巻, 354-360, 査読有.

DOI: 10.1016/j.cryobiol.2014.04.005

In-Sul Hwang, Hiromasa Hara, Hak-Jae Chung, Masumi Hirabayashi, [Shinichi Hochi](#), (2013) Rescue of vitrified-warmed bovine oocytes with Rho-associated coiled-coil kinase

inhibitor, *Biology of Reproduction*, 89 巻, 26 1-6, 査読有.

DOI: 10.1095/biolreprod.113.109769

Hiromasu Hara, In-Sul Hwang, Noriko Kagawa, Masashige Kuwayama, Masumi Hirabayashi, Shinichi Hochi, (2012) High incidence of multiple aster formation in vitrified-warmed bovine oocytes after in vitro fertilization, *Theriogenology*, 77 巻, 908-915, 査読有.

DOI: 10.1016/j.theriogenology.2011.09.018

〔学会発表〕(計 19 件)

田島 和弥, 山中 貴寛, 佐藤 美月, 平林 真澄, 保地 眞二, 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, 第 57 回日本卵子学会, 平成 28 年 5 月 14~15 日, 朱鷺メッセ (新潟県新潟市).

保地 眞二, ウシ精子保存技術のこれまでとこれから, 第 108 回日本繁殖生物学会市民公開講座「宇宙における動物繁殖の可能性」, 平成 27 年 9 月 20 日, 宮崎市民プラザ (宮崎県宮崎市).

田島 和弥, 平林 真澄, 保地 眞二, GV 期ウシ卵丘卵母細胞複合体の裸化処理が胚盤胞の体外作出に及ぼす影響, 第 108 回日本繁殖生物学会, 平成 27 年 9 月 17~19 日, 宮崎大学 (宮崎県宮崎市).

田切 美穂, 八代 育子, 平林 真澄, 保地 眞二, ガラス化ウシ成熟卵母細胞の体外受精後に活性化補填することで胚盤胞発生率は改善できるか? 第 119 回日本畜産学会, 平成 27 年 3 月 28~30 日, 宇都宮大学 (栃木県宇都宮市).

八代 育子, 平林 真澄, 保地 眞二, トコフェロール存在下におけるガラス化・加温したウシ成熟卵母細胞の回復培養, 第 107 回日本繁殖生物学会, 平成 26 年 8 月 21~24 日, 帯広畜産大学 (北海道帯広市).

原 弘真, 田切 美穂, 平林 真澄, 保地 眞二, 保存卵巣由来のウシ前核期卵における星状体形成と胚盤胞発生との関係, 第 107 回日本繁殖生物学会, 平成 26 年 8 月 21~24 日, 帯広畜産大学 (北海道帯広市).

田切 美穂, 原 弘真, 黄 仁悞, 八代 育子, 平林 真澄, 保地 眞二, 保存卵巣由来のウシ前核期卵における星状体形成ならびにその後の胚盤胞発生に及ぼす短期 ROCK 阻害処理の影響, 第 55 回日本卵子学会, 平成 26 年 5 月 16~18 日, 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市).

能登 一葉, 小林 あゆみ, 田切 美穂, 野村 隆臣, 保地 眞二, 黄色ブドウ球菌由来ヘモリジン変異体を用いてトレハロース導入したウシ顆粒膜細胞の凍結乾燥耐性, 第 118 回日本畜産学会, 平成 26 年 3 月 26~28 日, エポカルつくば (茨城県つ

くば市).

八代 育子, 田切 美穂, 能登 一葉, 山根 伊織, 原 弘真, 保地 眞二, ガラス化ウシ成熟卵母細胞の回復培養液におけるビタミン C 及び E の添加効果, 第 118 回日本畜産学会, 平成 26 年 3 月 26~28 日, エポカルつくば (茨城県つくば市).

Hiromasu Hara, Miho Tagiri, Masumi Hirabayashi, Shinichi Hochi, Effect of cake collapse on integrity of freeze-dried bull spermatozoa, 第 40 回 International Embryo Transfer Society (IETS), 平成 26 年 1 月 12~14 日, ネバダ州レノ (USA).

11 黄 仁悞, 八代 育子, 原 弘真, 平林 真澄, 保地 眞二, Rescue of vitrified-warmed bovine oocytes by recovery culture in the presence of Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK) inhibitor, 第 106 回日本繁殖生物学会, 平成 25 年 9 月 12~14 日, 東京農工大学 (東京都府中市).

12 原 弘真, 田切 美穂, 平林 真澄, 保地 眞二, 凍結乾燥ウシ精子の発生能に及ぼすコラプスの影響, 第 106 回日本繁殖生物学会, 平成 25 年 9 月 12~14 日, 東京農工大学 (東京都府中市).

13 郡 七海, 枝重 圭祐, 葛西 孫三郎, 赤木 悟史, 保地 眞二, 松川 和嗣, ウシ繊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, 平成 25 年 9 月 9~10 日, 新潟大学 (新潟県新潟市).

14 山根 伊織, 原 弘真, 平林 真澄, 保地 眞二, 成熟培養における ROCK 阻害が保存卵巣に由来するウシ卵母細胞の発生能に及ぼす影響, 第 117 回日本畜産学会, 平成 25 年 9 月 9~10 日, 新潟大学 (新潟県新潟市).

15 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, 第 46 回 Society for Study of Reproduction (SSR), 平成 25 年 7 月 22~26 日, ケベック州モントリオール (カナダ).

16 原 弘真, 田切 美穂, 平林 真澄, 保地 眞二, 凍結乾燥ケーキにおけるコラプス形成と復水ウシ精子の正常性との関係, 第 116 回日本畜産学会, 平成 25 年 3 月 28~30 日, 安田女子大学 (広島県広島市).

17 八代 育子, 黄 仁悞, 山根 伊織, 能登 一葉, 原 弘真, 平林 真澄, 保地 眞二, ガラス化したウシ成熟卵母細胞の蘇生率は回復培養液へ添加した ROCK 阻害剤によって改善される, 第 116 回日本畜産学会, 平成 25 年 3 月 28~30 日, 安田女子大学 (広島県広島市).

18 西本 あずさ, 枝重 圭祐, 葛西 孫三郎, 保地 眞二, 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，平成 24 年 9
月 6～8 日，筑波大学（茨城県つくば市）。

- ¹⁹ 原 弘真，能登 一葉，山根 伊織，香川
則子，桑山 正成，平林 真澄，保地 眞一，
ガラス化・加温したウシ体外成熟卵子にお
ける細胞内グルタチオン濃度と精子星状
体および胚盤胞発生との関係，第 105 回日
本繁殖生物学会，平成 24 年 9 月 6～8 日，
筑波大学（茨城県つくば市）。

〔その他〕

ホームページ等

<http://fiber.shinshu-u.ac.jp/hochi/index.html>

6．研究組織

(1)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： 1 0 2 8 3 2 4 3