

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 12 日現在

機関番号：32701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658085

研究課題名（和文）膜透過型不凍タンパク質を用いた哺乳類卵子における超低温保存法の開発

研究課題名（英文）Cryopreservation of mammalian oocytes with transmembrane-type protein

研究代表者

柏崎 直巳（KASHIWAZAKI NAOMI）

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号：90298232

研究成果の概要（和文）：哺乳類生殖細胞の超低温保存は、実験動物・家畜における効率的な遺伝資源の保存やヒト生殖補助医療技術として重要である。さらに、未受精卵の状態でも効率よく超低温保存することが出来れば、体外受精あるいは卵細胞質内精子注入法に用いる際、雄の遺伝的背景が選択可能になることから、極めて重要な技術になると考えられる。しかし、初期胚と比較して未受精卵の超低温保存は、加温後の卵の発生能は著しく低下してしまうことが知られている。本研究では、新規凍害保護物質であるカルボキシル基導入ポリリジン(COOH-PLL)を用いて、マウス未受精卵の超低温保存の改良を試みた。ガラス化保存した加温後の卵は、生存率においては高い値(90%以上)を示し、体外受精後の前核形成率においては、20% (v/v) ethylene glycol および 10% (w/v) COOH-PLL (E20P10 区)で高い割合(約 70%)を示した。2細胞期率においても E20P10 区は高い割合(約 70%)を示した。以上の結果から、マウス未受精卵の超低温保存においても COOH-PLL は凍害保護物質として有効であることが初めて明らかにされた。

研究成果の概要（英文）：The aim of the present study was to improve vitrification of mouse oocytes. We examined whether carboxylated e-poly-L-lysine (COOH-PLL), a new cryoprotective agent, is available for vitrification of mouse embryos. When the oocytes were vitrified with 20%(v/v) ethylene glycol and 10% (w/v) COOH-PLL, the fertility and developmental ability were significantly higher than those in other groups. These embryos at the 2 cell stage were transferred to recipient females. Most of the recipients became pregnant and pups were delivered. In conclusion, our data clearly showed COOH-PLL is a useful cryoprotective agent for vitrification of mouse oocytes. These findings will contribute to improve oocyte vitrification in not only experimental animals but also clinical application for human infertility.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,200,000	0	2,200,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
総計	3,200,000	300,000	3,500,000

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：哺乳類，卵，凍結保存

#### 1. 研究開始当初の背景

現在までに，多くの研究者が生殖細胞の超低温保存について検討を行ってきた。これらの研究の多くは，凍害保護効果の期待できる物質を保存液に添加し，融解後の生存性・発生能を調べるという『Trial & Error』によって行われてきた。近年になって，他の生物・細胞において，生体内で凍害保護物質として機能するトレハロース等の糖類や，凍結の際に障害となる水分子の輸送を制御するチャンネルタンパク質であるアクアポリン等が注目され，トレハロースそのものやアクアポリンの mRNA を哺乳類卵・胚の細胞質へ直接顕微注入することにより，耐凍性を改善できることが報告されるようになった。しかし，これらの方法を用いる場合，卵子の顕微操作が必要となることから，熟練した技術と高価な設備が必要であり，また多くの卵子・胚を同時に処理することができない。そこで，未受精卵の超低温保存を一般的な技術とするためには，簡便かつ再現性の高い未受精卵の超低温保存法の確立が必要となる。

#### 2. 研究の目的

哺乳類生殖細胞(卵および初期胚)の超低温保存は，実験動物・家畜における効率的な遺伝資源の保存やヒト生殖補助医療技術として重要である。特に未受精卵での超低温保存は，今後ますます重要になってくると考えられる。本実験では，新規の凍害保護物質(Cryoprotective agents; CPA)であるカルボキシル基導入ポリリジン:COOH-PLL)および ethylene glycol (EG)で保存したマウス未受精卵・初期胚の胚発生能および産仔への発生能について検討した。

#### 3. 研究の方法

過剰排卵を誘起した雌マウスから卵丘細胞卵子複合体(COCs)を採取した。採取した未受精卵を，15% CPA および 20% FCS を含む平衡液に 3 分間平衡させた後，30% CPA, 20% FCS および 0.5 M sucrose を含むガラス化保存液に 1 分感作させ，クライオトップを用いて液体窒素中で保存した。CPA として COOH-PLL および EG を使い，Control (EG 30%)，E20P10 区(EG 20% + PLL 10%)，E15P15 区 (EG 15% + PLL 15%)の 3 群で比較した。加温は，1.0 M sucrose および 20% FCS を含む PB1 中で行った。その後，TYH 中で 1 時間回復培養を行い，体外受精に用いた。体外受精終了後，卵は体外培養し，胚盤胞への発生を調べた。また一部の卵は，24 時間後に 2 細胞期まで発生したものを胚移植し，産仔への発生率を調べた。

#### 4. 研究成果

E20P10 および E15P15 区ともに胚盤胞までの発生率においてコントロール(E30 区)と比較して有意な差はなく，高い割合を示した。また，E20P10 区の胚 80 個を 5 匹の雌マウスに移植した結果，37 匹の産仔が得られた。この産仔への発生率は 46.2%であり，Control 区の 34.8%(産仔数 32/移植胚数 92)より高い割合を示した。一方，E15P15 区の産仔率は，16.7%(産仔数 12/移植胚数 72)であり低い割合を示した。以上のことから COOH-PLL および EG を CPA としてガラス化保存したマウス未受精卵・初期胚は産仔への発生能を有することが明らかとなった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Kohaya N, Fjiwara K, Ito J, Kashiwazaki N. High developmental rates of mouse oocytes cryopreserved by an optimized vitrification protocol; the effects of cryoprotectants, calcium and cumulus cells. (2011) Journal of Reproduction and Development 57: 675-680
2. Seita Y, Fujiwara K, Takizawa A, Furukawa K, Inomata T, Ito J, Kashiwazaki N. Full-term development of rats from oocytes fertilized in vitro using cryopreserved ejaculated sperm. (2011) Cryobiology 63: 7-11.

[学会発表] (計 7 件)

1. 渡邊 ひとみ, 小早 菜月, 藤原 克祥, 松村 和明, 玄 丞然, 伊藤 潤哉, 柏崎 直巳. 新規凍害保護物質カルボキシル基導入ポリリジンを用いたマウス未受精卵のガラス化保存法の開発. (2011) 第 52 回日本哺乳動物卵子学会.
2. Kashiwazaki N, Nakajima N, K. Fujimaki K, Shudo K, Ito J. Development Of somatic cell nuclear transferred rat embryos to the blastocyst by a histone deacetylase inhibitor, trichostatin A. (2011) 37th Annual Conference of the IETS.

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計◇件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柏崎 直巳 (KASHIWAZAKI NAOMI)

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号：90298232

### (2) 研究分担者

伊藤 潤哉 (ITO JUNYA)

麻布大学・獣医学部・准教授

研究者番号：30454143

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：